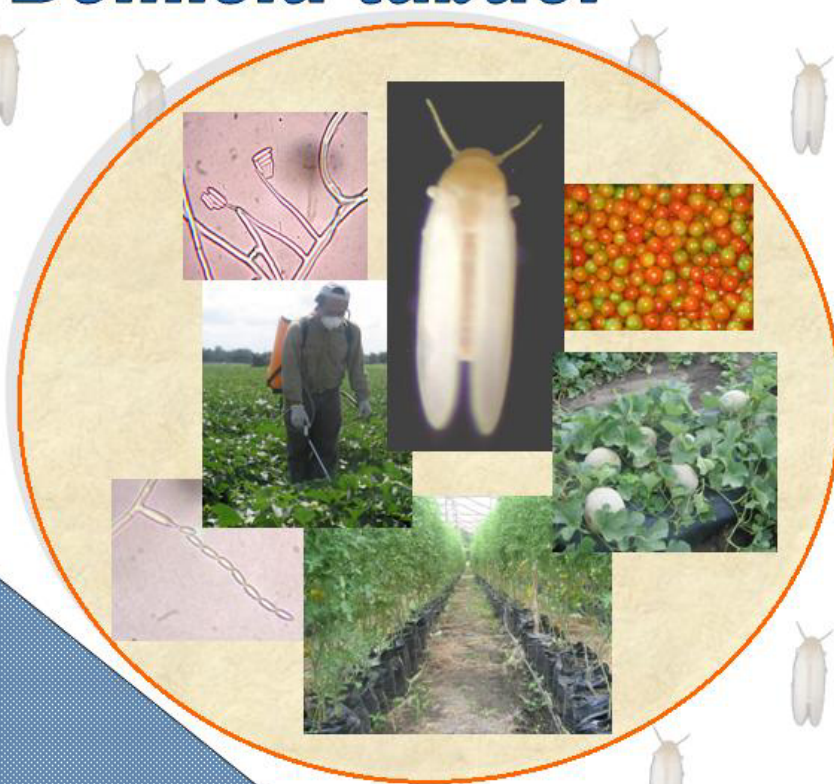




Desarrollo de un bioplaguicida para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci*



Desarrollo de un bioplaguicida para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci*

Autores

INVESTIGADORES

Carlos Espinel Correal, M.Sc.¹
Laura Villamizar Rivero, M.Sc.¹
Lissette Torres Torres, Bióloga.¹
Erika Grijalba Bernal, Q.F.¹
Maria Denis Lozano, M.Sc.³
Alba Marina Cotes Prado, Ph.D.¹
Aristóbulo López Ávila, Ph.D.²
Javier García González, M.Sc.²
Victoria González I.A.

ESTUDIANTES

Pedro Forero ¹

AUXILIARES DE TÉCNICO

Juan Alberto Arias ¹
Jesús Gómez ²
Felipe Rivas ³
Dimas Segura ³
Arboney Guzmán ³
Lucio Barrios ³

COMPILADORES

Carlos Espinel Correal
Lissette Torres Torres

ISBN

958-8210-90-9

BOLETÍN TÉCNICO 2006

¹ Laboratorio de Control Biológico. C.I. Tibaitatá. Km.14 vía Mosquera (Cundinamarca-Colombia) A.A.240142 Las Palmas, Parque Central Bavaria, Bogotá.

² Laboratorio de Entomología. C.I. Tibaitatá. Km.14 vía Mosquera (Cundinamarca-Colombia) A.A.240142 Las Palmas, Parque Central Bavaria, Bogotá.

³ Corpoica Centro de Investigaciones Nataima Km. 9 vía Espinal-Chicoral (Tolima-Colombia) A.A.240142 Las Palmas, Parque Central Bavaria, Bogotá.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción

Agradecimientos

1. Problemática de *Bemisia tabaci* en Colombia

1.1. Daño

1.2. Alternativas de control

2. Desarrollo tecnológico de insecticidas microbianos

2.1. Colección de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos

2.2. Selección y evaluación de la virulencia de aislamientos nativos

2.3. Desarrollo de medios de producción masiva de los hongos entomopatógenos seleccionados

2.4. Desarrollo de preformulados a base de los hongos entomopatógenos

2.4.1. Caracterización del principio activo

2.4.2. Selección de auxiliares de formulación

2.4.3. Desarrollo y caracterización de preformulados

2.4.4. Estabilidad frente a la radiación ultravioleta

2.4.5. Compatibilidad con agroquímicos utilizados

2.5. Determinación de la eficacia de los preformulados bajo condiciones de laboratorio

2.6. Efecto de la aplicación combinada de los preformulados sobre *Bemisia tabaci* bajo condiciones de laboratorio

2.7. Susceptibilidad de los estados de desarrollo de *B. tabaci* a los preformulados

3. Eficacia de los productos bajo condiciones de campo

3.1. Evaluación sobre cultivo de melón

3.2. Evaluación sobre cultivo de tomate

4. Recomendaciones y perspectivas

5. Referencias bibliográficas

INTRODUCCIÓN

Alba Marina Cotes P.

Las moscas blancas son consideradas la principal plaga a nivel mundial. Dentro de éstas *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) es una de las más limitantes debido al gran número de hospedantes que ataca, a los daños directos e indirectos que ocasiona, a su amplia distribución geográfica y a la ineficiencia que para su control han mostrado los insecticidas químicos (Rodríguez y Cardona 2001).

En América, *B. tabaci* afecta al menos 23 cultivos, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y en todos los países del Caribe. En zonas neotropicales, estos incluyen frutales, hortalizas y ornamentales de gran importancia nutricional y económica tales como melón, sandía, uva, tomate, pepino, habichuela, frijol, papa, maní, algodón, soya, crisantemo y poinsettia (Hilje 1996; McAuslane 2000).

Aunque es difícil cuantificar adecuadamente el impacto causado por las moscas blancas sobre la producción, se ha demostrado que *B. tabaci* ha causado pérdidas anualmente por más de US \$ 500 millones en la producción agrícola de USA, durante los últimos 15 años (Gerling 2002). No obstante, a las pérdidas *per se* debe sumarse el aumento en los costos de producción, debidos sobre todo al uso de insecticidas. Por ejemplo, un diagnóstico realizado en Colombia reveló que los productores hacen 12 o más aplicaciones de insecticidas, con 32 diferentes ingredientes activos (40% de organofosforados, 11% de carbamatos, 12% de piretroides y 29% de insecticidas de nueva generación). Así mismo, el 46% de los agricultores encuestados abandonó su cultivo alguna vez, por las pérdidas, y cerca del 40% tuvo pérdidas de 50-100% (Rendón *et al.*, 2001). Actualmente, *B. tabaci* ha demostrado en algunas zonas ser resistente a varios de los insecticidas usados para su control (Cardona *et al.*, 2001), lo cual tiene serias implicaciones económicas y ambientales, ya que los agricultores usan mayores dosis de estos productos, elevando los costos de producción y generando mayor contaminación al ambiente

Los problemas con moscas blancas han alcanzado magnitud mundial en los últimos años, lo cual ha hecho que se dediquen grandes esfuerzos en investigación básica y métodos de control (Quintero *et al.*, 2001), es así como el control biológico se presenta como una de las alternativas más promisorias dentro de los programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), soportados por los éxitos hasta ahora logrados y en el avance en conocimiento básico sobre los tres principales grupos de enemigos naturales: parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos (López-Ávila 2000; López-Ávila *et al.*, 2001). En ese sentido, el Laboratorio de Control biológico de CORPOICA ha dedicado importantes esfuerzos de investigación al aislamiento y evaluación de microorganismos entomopatógenos, así como a la producción, formulación y evaluación en campo de los mismos. Esto ha conducido al desarrollo de prototipos de bioplaguicida que además de haber demostrado ser altamente eficientes en el control de las moscas blancas en condiciones comerciales de cultivo tanto en invernadero como en campo, han mostrado su bajo impacto ambiental contra enemigos naturales del tipo depredadores y parasitoides que podrían coadyuvar en el control de la plaga. Teniendo en cuenta el impacto de *B.tabaci* sobre diferentes sistemas de producción, los resultados de investigación tendientes al desarrollo de estrategias biológicas de manejo de este insecto se mencionan a continuación.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a FONTAGRO, por su apoyo financiero en la realización del presente trabajo.

De igual manera agradecemos al personal directivo y administrativo del Centro de Investigación Tibaitatá, del Centro de Investigación Palmira y del Centro de Investigación Nataima, por su valioso apoyo y disposición durante el transcurso del trabajo.

Por último a los productores de melón y tomate, a Don Guillermo Restrepo y a todo el personal de trabajadores e ingenieros de las fincas La Patricia y Canaima de Grajales S.A., por abrirnos sus puertas y creer en la investigación y en las alternativas biológicas para el manejo de esta plaga tan limitante.

1. Problemática de *Bemisia tabaci* en Colombia

Carlos Espinel C. ; Lissette Torres T.; Aristóbulo López-Ávila

Entre las más de 1200 especies de moscas blancas (Hemiptera:Aleyrodidae) que se encuentran descritas en el momento, sólo unas pocas se consideran de importancia económica debido al daño ocasionado en diferentes cultivos del mundo, tanto en campo abierto como en condiciones de invernadero (López-Ávila, 1994). Dentro de estas especies de mosca blanca sobresalen por su importancia económica *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. La importancia económica de estas especies se relaciona con la amplia distribución geográfica, con el tipo de daño que ocasiona y con el gran número de cultivos afectados (Rodríguez y Cardona, 2001).

1.1. Daño

La mosca blanca *B. tabaci* se ha encontrado atacando más de 500 especies de plantas agrupadas en 74 familias, en hospedantes que incluyen, tomate, pepino, habichuela, frijol, papa, maní, algodón, soya, melón, patilla y ornamentales como crisantemo y poinsettia (McAuslane, 2000). Los daños ocasionados por el insecto se pueden dar por la succión de savia y por la inyección de toxinas a través de la saliva, ocasionando el debilitamiento de la planta o manchas cloróticas. En ataques intensos se producen síntomas de deshidratación, disminución o detención del crecimiento. De igual forma, la excreción de miel de rocío sobre hojas, flores y frutos proporciona el medio adecuado para el establecimiento del hongo *Capnodium* sp., lo cual ocasiona reducción de la fotosíntesis y respiración de la planta, disminución en la calidad de la cosecha y mayores gastos de comercialización. Así mismo, *B. tabaci* es transmisora de virus patogénicos en diversos cultivos, tales como el virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate, el virus dorado del tomate, el virus moteado del tomate y del virus del mosaico dorado del frijol (Infoagro, 2004). En algunos cultivos, tales como tomate, la presencia de un solo adulto de mosca blanca por planta es suficiente para causar el 100% de infección con geminivirus (Faria y Wraight, 2001).

En algunas regiones del Brasil el daño ocasionado por mosca blanca alcanzó el 100% de disminución en los rendimientos de leguminosas (Martines y Peixoto, 1988; citado por López-Ávila y García, 2000). En Cuba hubo reducciones de rendimiento de un 63% en tomate y de 65% en frijol (Murguido *et al.*, 1997; citado por López-Ávila y García, 2000).

Teniendo en cuenta la severidad del daño producido por esta especie en sus hospedantes se ha podido distinguir dos biotipos, A y B, ya que mediante sus caracteres morfológicos no es posible. Es así como el biotipo B presenta un mayor rango de hospedantes y una mayor densidad de población que el biotipo A. Además, tiene la capacidad de inducir desordenes fisiológicos manifestados por síntomas característicos en tomate, crucíferas y algunas cucurbitáceas, entre otras (Brown *et al.*, 1995; citado por Quintero *et al.*, 1998). Tal es el caso de la maduración irregular del fruto del tomate, el cual presenta externamente una coloración roja e internamente una coloración blanca y de consistencia dura; dicho daño ocasionó pérdidas por 25 millones de dólares en 1989, en el estado de la Florida (Mc Auslane, 2000).

El biotipo B fue descrito por Bellows y Perring en 1993 como una nueva especie y la denominaron *Bemisia argentifolli*, sin embargo hay dudas serias sobre si realmente es una especie diferente.

En Colombia, los primeros indicios de la presencia del biotipo B surgieron a finales de 1994 en la Costa Atlántica, donde se presentaron grandes pérdidas en algodón, debido a la excesiva presencia de miel de rocío, y a principios de 1995, por la maduración no uniforme de los frutos de tomate y el desarrollo de plateado en hojas de algunas cucurbitáceas. La presencia del biotipo B se confirmó mediante estudios bioquímicos, moleculares y etiológicos realizados por Quintero *et al.*, (1998).

Por otra parte, en un estudio realizado sobre la incidencia de la plaga y las pérdidas ocasionadas en varias regiones de Colombia, se mostró una mayor incidencia de la plaga en los departamentos de Tolima, Cundinamarca, Santander y Cesar, con pérdidas que oscilaron entre el 25 al 100% en cultivos de fríjol, tomate, pepino, melón, algodón y tabaco. En los departamentos de Magdalena, Guajira y Atlántico, la mosca blanca se presentó de manera aislada en algunos municipios aunque su incidencia fue elevada y registró pérdidas hasta del 100% en cultivos de tomate, patilla, col y melón (López y García, 2000).

1.2. Alternativas de control

Se han diseñado diferentes estrategias de manejo de la mosca blanca, siendo la del control químico la herramienta más utilizada y en ocasiones la única. En ataques severos se ha llegado a frecuencias de aplicación muy altas, de hasta 11 ó 12 aplicaciones, generalmente en mezclas, durante un periodo vegetativo de apenas 80 a 90 días (Prada *et al.*, 1994; López-Ávila y García, 2000).

Aparte del riesgo ambiental y de salud humana, el uso inadecuado de plaguicidas químicos ha acarreado un gran problema, que es el desarrollo de resistencia de la mosca blanca a los insecticidas. Los biotipos A y B de *B. tabaci* han mostrado resistencia a una amplia gama de insecticidas tradicionales como los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, así como insecticidas más novedosos como reguladores de crecimientos y nicotinoides (Cardona *et al.*, 2001).

En Colombia se detectaron niveles moderados de resistencia a monocrotofos y metamidofos, bajos para profenofos y carbofurán, intermedios para metomil y altos para los piretroides, cipermetrina y deltametrina (Buitrago *et al.*, 1994). En un estudio sobre la resistencia a insecticidas por parte de mosca blanca realizado en municipios del norte de Ecuador, la región Andina y Caribe de Colombia, se mostró que el biotipo B de *B. tabaci* fue muy resistente a metomil en nueve de 10 localidades estudiadas, altamente resistente a metamidofos en toda la Costa Atlántica y medianamente resistente a cipermetrina en tres localidades de la costa (Cardona *et al.*, 2001).

Debido a las pérdidas ocasionadas y a las dificultades para realizar el control de mosca blanca mediante métodos químicos, se ha hecho esfuerzos en la búsqueda de alternativas para su manejo, dentro de las que se destaca el control biológico incluido en un programa de manejo integrado. Lo anterior se soporta por los éxitos logrados y el avance en el conocimiento básico sobre los tres principales grupos de enemigos naturales como los hongos entomopatógenos, los parasitoides y depredadores (López-Ávila, 1994).

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces* spp. y *Lecanicillium lecanii* han sido reconocidos como agentes de control biológico importantes para

plagas de la familia Aleyrodidae, en cultivos tanto en campo como en invernadero, atacando principalmente estados ninfales (Wraight *et al.*, 1998; Faria y Wraight, 2001). Trabajos realizados por Wraight *et al.*, (1998), encontraron niveles de mortalidad sobre ninfas de *B. tabaci* entre el 68 y el 94%, ocasionados por *Paecilomyces fumosoroseus*. Herrera *et al.*, (1999) evaluaron aislamientos de *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae* y *P. fumosoroseus* bajo condiciones de laboratorio, y encontraron una gran variabilidad en los porcentajes de mortalidad, siendo mayor el ocasionado por un aislamiento de *M. anisopliae* (97%). Los aislamientos de *Beauveria* spp. produjeron una mortalidad entre el 2 y el 63% y los de *P. fumosoroseus* entre el 20 y el 52%. Así mismo, en un estudio en el cual se evaluaron 50 aislamientos de *B. bassiana* sobre ninfas de *B. tabaci* se encontraron porcentajes de mortalidad que variaron entre el 10% y el 93% (Vidal *et al.*, 1997).

En trabajos previos el Laboratorio de Control Biológico del Programa de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica realizó investigaciones encaminadas hacia la búsqueda y selección de microorganismos entomopatógenos para el control de otra de las especies de moscas blancas con gran importancia económica, *Trialeurodes vaporariorum*. Es así como se hicieron muestreos en la región del Sumapaz, en los que se encontraron 43 aislamientos, mediante bioensayos en laboratorio se seleccionó el aislamiento VI 026 de *Lecanicillium lecanii* por ocasionar una mortalidad del 100% (García, 1996). Actualmente, este microorganismo constituye el principio activo de un bioplaguicida, el cual al ser evaluado en un cultivo de habichuela, ocasionó un porcentaje de infección del 76.8% y una producción de 11.7 Ton/ha en contraste con 7 Ton/ha obtenidas en el tratamiento en el que se aplicaron insecticidas químicos (Jiménez, 2002). Este mismo producto al ser evaluado en un cultivo de tomate bajo invernadero produjo un porcentaje de infección de 68.1% sobre el estado ninfal, porcentaje que fue significativamente diferente con respecto al tratamiento correspondiente a la combinación del bioplaguicida con insecticidas químicos (36.6%). Así mismo, en el tratamiento con el bioplaguicida se obtuvo la mayor producción, siendo ésta de 68 kg/ha (Garzón, 2004). Este insecticida microbiano se ha evaluado contra ninfas de *B. tabaci* bajo condiciones de laboratorio ocasionando un porcentaje de eficacia de 71.2% (Espinell *et al.*, 2006a; Espinell *et al.*, 2006b); los resultados de las evaluaciones bajo condiciones de campo se presentan en este boletín técnico (Capítulo 3).

Los parasitoides son otros agentes de control biológico comúnmente usados en el manejo de la mosca blanca. Están definidos como insectos que se desarrollan en su estado larval en los tejidos de otros artrópodos a los cuales termina matando cuando se cumple el estado de desarrollo inmaduro. Sobresalen especies de los géneros *Encarsia*, *Eretmocerus* y *Amitus* (López-Ávila, 1994).

El parasitoide de mosca blanca más estudiado y utilizado en el mundo es *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera:Aphelinidae). Este insecto ha sido efectivo en muchos países y especialmente en Holanda e Inglaterra (López-Ávila 1994). En 1985 se realizaron infestaciones en casi 2400 hectáreas de cultivos de invernadero en 20 países y fue criada comercialmente en Europa y Norte América. En Colombia se ha introducido varias veces lográndose establecer en cultivos bajo invernadero y aunque actualmente no se produce masivamente, hay técnicas de producción existentes para implementar su uso en cultivos de invernadero. Aunque en campo abierto presenta desventajas y no ha sido posible utilizarlo con éxito en ninguna parte del mundo (López-Ávila 1994).

En un estudio realizado por López-Ávila *et al.*, (2001), en el cual se realizó un reconocimiento de los enemigos naturales de las moscas blancas en Colombia y Ecuador, encontraron presencia de la especie *Encarsia nigricephala* en ocho

departamentos, Cauca, Valle del Cauca, Tolima, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander, Atlántico y Guajira, parasitando a *B. tabaci* y a *T. vaporariorum* en cultivos de fríjol, habichuela y tomate en municipios con altitudes que oscilaron entre 120 a 1460 msnm. *E. nigricephala* presentó la distribución más amplia, junto con *Amitus fuscipennis* al ser comparada con otras especies del mismo género como *E. formosa*, *Encarsia pergandiella* Howard, *Encarsia mineoi* Viggiani, *Encarsia hispida* De Santis y *Encarsia strenua* (Silvestri).

En cuanto a depredadores promisorios, en el mismo estudio se registró la presencia de *Chrysopa* sp. (Neuroptera: Chrysopidae), *Delphastus pusillus* (Le Conte) (Coleoptera: Coccinelidae), *Nephaspis* sp. (Coleoptera: Coccinelidae) y *Geocoris* sp. (Heteroptera: Lygaeidae) (López-Ávila *et al.*, 2001) (Figura 1).

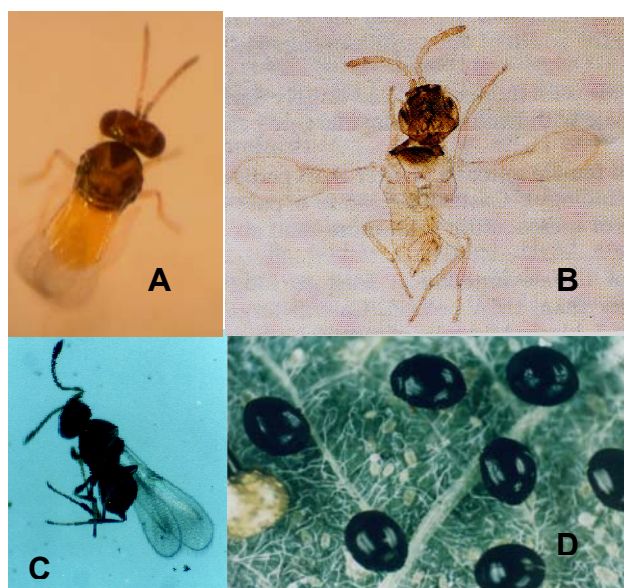


Figura 1. Entomófagos de las moscas blancas A. *Encarsia formosa*. B. *Encarsia nigricephala* C. *Amitus fuscipennis*. D. *Delphastus pusillus* (Fotografías: Espinel, García, López-Ávila).

Debido a los grandes daños y pérdidas que ocasiona la mosca blanca, a los inconvenientes planteados sobre el uso de métodos químicos como única alternativa de control y a las ventajas que representa el uso del control biológico, se realizó el presente trabajo en el que se incluyen los avances en el desarrollo de productos a base de hongos entomopatógenos para el control de esta plaga de importancia económica.

2. Desarrollo tecnológico de insecticidas microbianos

Carlos Espinel C. ; Lissette Torres T.; Laura Villamizar ; Erika Grijalba ; Alba Marina Cotes.; Javier García

2.1. Colección de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos.

Con el propósito de recolectar individuos de *B. tabaci* para realizar el aislamiento de potenciales entomopatógenos, se definieron dos rutas de muestreo. La primera abarcó los departamentos del Tolima y Valle del Cauca sobre cultivos de melón, tomate, algodón y berenjena; y la segunda involucró los departamentos del Magdalena y Atlántico sobre cultivos de tomate y melón. Los criterios de recolección de las muestras fueron ninfas o adultos de *B. tabaci* muertos o con signos de infección presentes en sitios distanciados como mínimo por 5 km entre ellos.

Los insectos recolectados se ubicaron de forma individual en tubos eppendorf previamente esterilizados. Al terminar la jornada diaria de recolección, los insectos adultos con signos de infección se ubicaron individualmente en viales de vidrio que contenían 2 mL de agar agua acidificado y posteriormente se sellaron con algodón y una película transparente auto adherente, se mantuvieron en condiciones de refrigeración a 4°C hasta iniciar el proceso de aislamiento en condiciones de laboratorio. Por otra parte, aquellos insectos encontrados muertos pero sin signos de infección, se ubicaron en cámara húmeda que consistió en una caja de Petri plástica en cuya base se ubicó una toalla de papel humedecida con agua estéril y sobre ésta una lámina portaobjetos con cada uno de los insectos recolectados. Las cámaras húmedas se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C) hasta observar el crecimiento micelial sobre los individuos y posteriormente estos se ubicaron en los viales con el medio de cultivo de la misma manera descrita anteriormente.

Aislamiento, purificación e identificación de los entomopatógenos.

Las muestras recolectadas en campo se incubaron a 25°C en presencia de luz constante hasta evidenciar el crecimiento micelial y esporulación de los microorganismos.

Posteriormente, se realizó el aislamiento y la purificación de los hongos mediante siembras sucesivas en los medios de cultivo Saboureaud Rosa de Bengala (SRB) y Papa Sacarosa Agar (PSA). Una vez purificados los aislamientos de entomopatógenos encontrados, se realizaron microcultivos con cada uno de ellos con el fin de identificarlos mediante la ayuda de claves taxonómicas. Adicionalmente los microorganismos aislados se crioconservaron a -70°C, utilizando los protocolos previamente estandarizados.

Se obtuvieron 15 aislamientos recolectados en las salidas de campo; 10 aislamientos provenientes de los departamentos del Tolima y Valle del Cauca, correspondientes a los géneros *Beauveria* y *Paecilomyces* y cinco aislamientos de los departamentos del Magdalena y Atlántico pertenecientes únicamente al género *Paecilomyces* (Tabla 1). Estos microorganismos han sido registrados mundialmente como agentes de control microbiano de *B. tabaci* (Faria y Wraight 2001).

Cabe resaltar que en ninguno de los muestreos se recolectaron aislamientos pertenecientes a los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis* y *Metarhizium anisopliae*, comúnmente utilizados en el control de moscas blancas. Estos resultados podrían indicar que la distribución de los microorganismos encontrados está influenciada tanto por las condiciones agroclimáticas de las zonas muestreadas como por el hospedero; debido a que en muestreos realizados en la región del Sumapaz (Cundinamarca) por García (1996), se encontraron 43 aislamientos pertenecientes únicamente a *Lecanicillium lecanii* provenientes de adultos de *Trialeurodes vaporariorum*.

Tabla 1. Aislamientos provenientes de adultos de *B. tabaci* recolectados en campo.

Código	Procedencia	Coordenadas geográficas	Cultivo hospedante	Género o especie
Bv 056	Prado (Tolima)	3° 45' 11" N 74° 55' 59" W	Algodón	<i>Beauveria bassiana</i>
Bv 057	Guamo (Tolima)	4° 02' 05" N 74° 58' 25" W	Melón	<i>Beauveria bassiana</i>
Pc 016	Toro (Valle)	4° 41' 12" N 76° 02' 17" W	Melón	<i>Paecilomyces</i> sp.
Pc 008	Toro (Valle)	4° 41' 12" N 76° 02' 17" W	Tomate	<i>Paecilomyces</i> sp.
Bv 058	Toro (Valle)	4° 41' 12" N 76° 02' 17" W	Berenjena	<i>Beauveria bassiana</i>
Pc 007	Toro (Valle)	4° 41' 12" N 76° 02' 17" W	Berenjena	<i>Paecilomyces</i> sp.
Bv 055	Buga (Valle)	3° 54' 06" N 76° 18' 14" W	Tomate	<i>Beauveria bassiana</i>
Pc 014	Buga (Valle)	3° 54' 06" N 76° 18' 14" W	Tomate	<i>Paecilomyces</i> sp.
Bv 059	San Pedro (Valle)	3° 59' 50" N 76° 13' 50" W	Tomate	<i>Beauveria bassiana</i>
Pc 015	Pradera (Valle)	3° 25' 20" N 76° 14' 42" W	Tomate	<i>Paecilomyces</i> sp.
Pc 012	Zona bananera (Magdalena)	11° 01' 00" N 74° 15' 00" W	Algodón	<i>Paecilomyces</i> sp.
Pc 009	Zona bananera (Magdalena)	11° 01' 00" N 74° 15' 00" W	Tomate	<i>Paecilomyces</i> sp.
Pc 010	Zona bananera (Magdalena)	11° 01' 00" N 74° 15' 00" W	Tomate	<i>Paecilomyces</i> sp.
Pc 011	Zona bananera (Magdalena)	11° 01' 00" N 74° 15' 00" W	Melón	<i>Paecilomyces</i> sp.
Pc 013	Ciénaga (Magdalena)	11° 01' 00" N 74° 15' 00" W	Tomate	<i>Paecilomyces</i> sp.

2.2. Selección y evaluación de la virulencia de aislamientos nativos

Carlos Espinel C.; Lissette Torres; Alba Marina Cotes; Javier García

Infestación del material vegetal.

Se tomaron semillas de fríjol de la variedad ICA-Calima las cuales se sembraron en materos plásticos de 10 cm de diámetro, mantenidos bajo condiciones de invernadero con una temperatura de $25 \pm 5^\circ \text{C}$ y una humedad relativa de $66 \pm 10\%$. Una vez las plantas emergidas presentaron un trifolio, se infestaron confinando 30 adultos de *B. tabaci* en jaulas pinza por 24 h para asegurar una suficiente oviposición. Después de este tiempo, los adultos se retiraron y las plantas se ubicaron en un cuarto aislado hasta que los individuos de la siguiente generación presentaron segundo instar ninfal. La metodología de infestación de las plantas se realizó de la misma forma en todos los bioensayos bajo condiciones de laboratorio (25°C ; HR 70%).

Selección de aislamientos nativos.

Con el fin de determinar la actividad biocontroladora de los aislamientos recolectados en campo, se llevó a cabo un bioensayo bajo condiciones de laboratorio en donde se avaluaron además ocho aislamientos de las especies *L. lecanii*, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin *Metarhizium anisopliae* (Metchnikov) Sorokin y *Nomuraea rileyi* (Farlow) conservados en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico.

Para ello se preparó una suspensión de cada uno de los microorganismos en Tween 80 al 0.1%, a partir de su cultivo sobre medio YDB (constituido por levadura, dextrosa y peptona). Dicha suspensión se ajustó a la concentración de 1×10^7 conidios. mL^{-1} y se aplicó un volumen de 3 ml sobre las ninfas de *B. tabaci* mantenidas por trifolio de fríjol, mediante el uso de un microaspersor con una presión de 50 psi.

Posteriormente, al sexto día post aplicación se realizó el conteo de las ninfas totales y ninfas enfermas por trifolio, estas últimas presentaron cambio de coloración y pérdida de turgencia, evidenciada por un aplastamiento corporal. Al día 13 se contaron los adultos emergidos, evidenciados por las exuvias presentes. La unidad experimental correspondió a una planta de fríjol con nueve folíolos y la unidad de muestreo correspondió a un folíolo previamente infestado con mosca blanca y tratado con los respectivos aislamientos.

Se utilizó un diseño experimental de bloques divididos con 25 tratamientos, que correspondieron a los 23 aislamientos evaluados, un testigo tratado que consistió en la aplicación de Tween 80 al 0.1% y un testigo absoluto. Cada tratamiento tuvo tres réplicas.

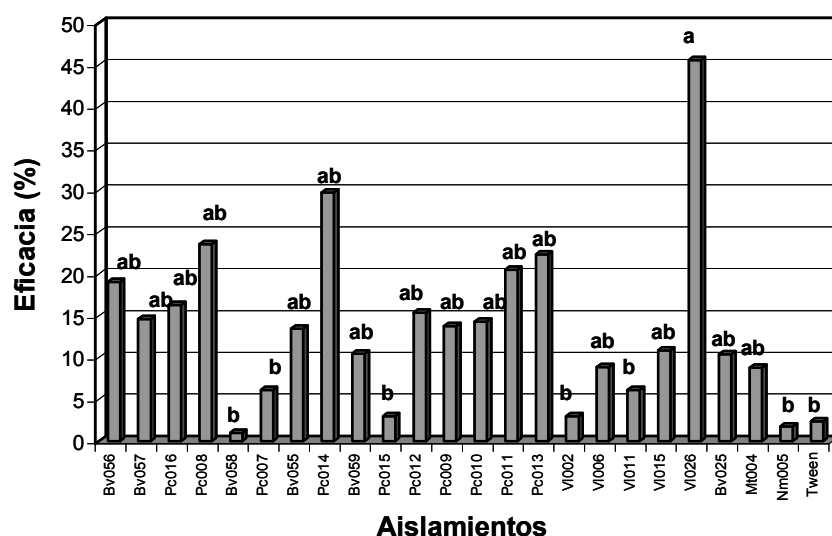
Se determinó el porcentaje de eficacia de cada uno de los aislamientos, mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba – Geigy 1978):

Porcentaje de eficacia = $(b - k) / (100 - k) \times 100$, donde **b** equivale al porcentaje de individuos muertos en el tratamiento y **k** equivale al porcentaje de individuos muertos en el testigo. Adicionalmente, los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis ($\alpha=0.05$), con el fin de evidenciar diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos.

En la evaluación de la población de ninfas enfermas realizada al día seis después de la aplicación, el mayor porcentaje de eficacia se observó con el aislamiento VI 026 de *L. lecanii* con un 45%, seguido por el aislamiento Pc 014 de *P. fumosoroseus* con un 29.7%; los demás tratamientos mostraron niveles de eficacia inferiores al 25% (Figura 2). A pesar de evidenciarse diferencias numéricas marcadas, la prueba

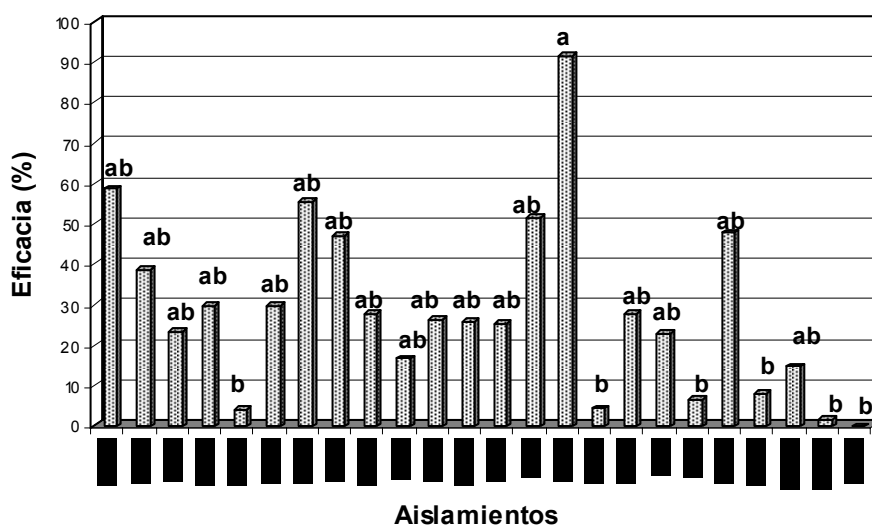
estadística de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) no detectó diferencias significativas entre la mayoría de los aislamientos.

En la evaluación realizada al día 13, los porcentajes de eficacia fueron superiores para la mayoría de los tratamientos. Se destacó el aislamiento Pc 013 de *P. fumosoroseus* con un porcentaje de eficacia del 91.7%, seguido por el aislamiento Bv 056 de *Beauveria bassiana* con 58.6%. A pesar de que el aislamiento VI 026 produjo el mayor porcentaje de eficacia a los seis días después de su aplicación, a los 13 días de evaluación la mortalidad producida sólo aumentó en un 2%. Otros aislamientos de *Beauveria bassiana* y de *Paecilomyces* spp. alcanzaron porcentajes de eficacia superiores al 50%, tal fue el caso de los aislamientos Bv 055 y Pc 011, con un 55.2% y 51.5%, respectivamente (Figuras 3 y 4).



Bv: *Beauveria*; Pc: *Paecilomyces*; VI: *Lecanicillium lecanii*; Mt: *Metarhizium anisopliae*; Nm: *Nomuraea rileyi*

Figura 2. Efecto de los aislamientos nativos sobre ninfas de *B. tabaci* a los seis días después de la aplicación.



Bv: *Beauveria*; Pc: *Paecilomyces*; VI: *Lecanicillium lecanii*; Mt: *Metarhizium anisopliae*; Nm: *Nomuraea rileyi*

Figura 3. Efecto de los aislamientos nativos sobre ninfas de *B. tabaci* a los trece días después de la aplicación.

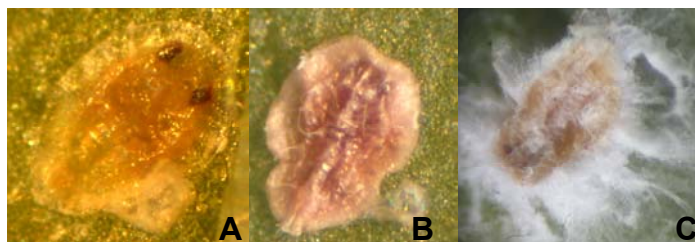


Figura 4. Signos de infección en ninfas de *B. tabaci* por hongos entomopatógenos. A. Infección por *P. fumosoroseus*. B. Infección por *Beauveria bassiana* C. Infección por *L. lecanii* (Fotografías Espinel).

Los hongos entomopatógenos *Beauveria*, *P. fumosoroseus* y *L. lecanii* han sido reconocidos como agentes de control biológico importantes para plagas de la familia Aleyrodidae, en cultivos tanto en campo como en invernadero, atacando principalmente estados ninfales (Wraight *et al.*, 1998; Faria y Wraight, 2001). Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los realizados por Wraight *et al.*, (1998), quienes reportaron niveles de mortalidad sobre ninfas de *B. tabaci* entre el 68 y el 94%, ocasionados por *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize). Herrera *et al.*, (1999) evaluaron aislamientos de *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae* y *P. fumosoroseus* bajo condiciones de laboratorio, encontrando una gran variabilidad en los porcentajes de mortalidad, siendo mayor el ocasionado por un aislamiento de *M. anisopliae* (97%), si se tiene en cuenta que los aislamientos de *Beauveria* spp. ocasionaron una mortalidad entre el 2% y el 63% y los de *P. fumosoroseus* produjeron una mortalidad entre el 20% y el 52%. Así mismo, en un estudio en el cual se evaluaron 50 aislamientos de *B. bassiana* sobre ninfas de *B. tabaci* se encontraron porcentajes de mortalidad que variaron entre el 10% y el 93%, de nuevo presentando alta variabilidad entre todos los aislamientos (Vidal *et al.*, 1997). Estos resultados en general concordaron con los obtenidos en el presente trabajo, debido a que aunque se seleccionó una cepa de *Paecilomyces* sp. por su elevada actividad biocontroladora, para la mayoría se observó una gran variabilidad en ésta y valores que no superaron el 60%, posiblemente debido a que fueron aislamientos con diferente grado de virulencia.

Los criterios para la selección de los microorganismos en el laboratorio involucran factores biológicos y tecnológicos; el principal factor biológico de selección es el mayor porcentaje de eficacia obtenido en el menor tiempo sobre el insecto blanco; los factores tecnológicos involucran las características de desarrollo del microorganismo para que las etapas de producción de un bioplaguicida se cumplan en forma eficiente, tales como la cantidad de conidios producidos sobre un medio de cultivo específico y su facilidad de separación de éste.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los criterios expuestos anteriormente, se seleccionó un aislamiento de cada especie, siendo estos, *Beauveria bassiana* (Bv 056) y *P. fumosoroseus* (Pc 013), como principios activos para el desarrollo de prototipos de bioplaguicidas y *L. lecanii* (VI 026) como el principio activo de un bioplaguicida desarrollado previamente para el control de *T. vaporariorum* (Figura 5).

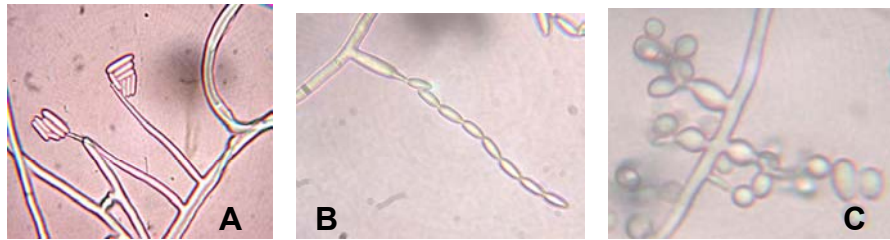


Figura 5. Aislamientos nativos seleccionados. A. *Lecanicillium lecanii* (VI 026). B. *P. fumosoroseus* (Pc013) C. *Beauveria bassiana* (Bv 056). (Fotografías Torres).

El aislamiento Bv 056 produjo una eficacia del 58.6% y presentó una esporulación pulverulenta facilitando la etapa de separación. Así mismo, el aislamiento Pc 013, además de que ocasionó el mayor porcentaje de eficacia (91.7%) es un aislamiento obtenido de adultos de *B. tabaci* provenientes de un cultivo de tomate en la costa caribe colombiana; zona caracterizada por tener alta temperatura y baja humedad relativa, factores medioambientales adversos para cualquier microorganismo. Lo anterior sugeriría que el aislamiento Pc 013 podría tener la capacidad de tolerar estas condiciones adversas y por lo tanto sería más estable en una formulación. Por último, se seleccionó el aislamiento VI 026, el cual a pesar de no superar una mortalidad de 50%, fue el que ocasionó la mayor mortalidad en el menor tiempo correspondiente a 45% a los seis días post aplicación, con lo cual se podría inferir que su mecanismo de acción es más rápido y posiblemente sería muy eficiente al emplearse en una formulación de manera combinada con otro aislamiento que causara una mortalidad final mayor, con el fin de atacar a la plaga desde los primeros días de aplicación. Este aislamiento es además el principio activo de un bioplaguicida que se ha evaluado exitosamente en cultivos de habichuela (Jiménez, 2002) y tomate (Garzón, 2004) contra *Trialeurodes vaporariorum*; siendo de gran ventaja la aplicación de este producto en cultivos en donde se presenta una combinación de los dos insectos *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, como en el caso de tomate en el Valle del Cauca (Colombia) (C. Espinel, obs. pers.).

Determinación de las concentraciones letales de los aislamientos seleccionados.

A partir de los tres aislamientos seleccionados *B. bassiana* Bv 056, *P. fumosoroseus* Pc 013 y *L. lecanii* VI 026, se realizó el montaje del bioensayo para la determinación de las concentraciones letales media y noventa (CL_{50} y CL_{90}).

Una vez alcanzado el segundo instar ninfal, se realizó la aplicación de los aislamientos bajo las mismas condiciones metodológicas mencionadas anteriormente. Para ello se evaluaron de cada uno de los aislamientos seleccionados cinco concentraciones correspondientes a 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios.mL⁻¹, además de un testigo absoluto.

Las variables por medir correspondieron a la población inicial de ninfas y al número total de exuvias al día 14, las cuales correspondieron a los adultos emergidos y por sustracción se determinó el número de individuos muertos. Los datos de mortalidad obtenidos se corrigieron con respecto al testigo por medio de la fórmula de Schneider-Orelli y se analizaron mediante el programa estadístico Polo PC- procedimiento Probit.

La unidad experimental correspondió a una planta de frijol y la unidad de muestreo fueron seis foliolos previamente infestados con mosca blanca y tratados con los respectivos tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 16 tratamientos, que correspondieron a las cinco concentraciones de cada uno de los tres aislamientos seleccionados y el testigo absoluto. Cada tratamiento tuvo seis réplicas.

Al analizar los resultados obtenidos después de aplicar cinco concentraciones de los aislamientos seleccionados Bv 056, Pc 013 y VI 026, al cabo de los 14 días, se encontró una mayor mortalidad a medida que aumentó la concentración de los microorganismos. Para el aislamiento Bv 056 los porcentajes de eficacia se encontraron en un rango entre 0.59% y 66.06%, para las concentraciones 1×10^4 y 1×10^8 conidios.mL⁻¹, respectivamente; para el aislamiento VI 026 fueron del 22.21% y del 69.58%, respectivamente y para el aislamiento Pc 013 fueron del 27.68% y del 81.91%, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de eficacia ocasionado por los tres aislamientos seleccionados a diferentes concentraciones sobre ninfas de *Bemisia tabaci*.

Concentración (conidios.mL ⁻¹)	VI 026 (% eficacia)	Bv 056 (% eficacia)	Pc 013 (% eficacia)
1×10^4	22,21	0,59	27,68
1×10^5	27,69	37,91	50,77
1×10^6	40,00	49,85	57,53
1×10^7	48,00	49,06	74,51
1×10^8	69,58	66,06	81,91

Según el programa estadístico Probit, se encontró que las concentraciones letales media y noventa (CL₅₀ y CL₉₀) correspondieron a 2.4×10^5 conidios.mL⁻¹ y a 1.9×10^8 conidios.mL⁻¹ para el aislamiento Pc 013, a 3.5×10^6 conidios.mL⁻¹ y a 7.9×10^8 conidios.mL⁻¹, respectivamente, para el aislamiento Bv 056 y de 5.0×10^6 conidios.mL⁻¹ y de 9.9×10^9 conidios.mL⁻¹, respectivamente para el aislamiento VI 026 (Tabla 3). Los resultados obtenidos podrían indicar que el aislamiento Pc 013 de *P. fumosoroseus* es más virulento contra *B. tabaci* al compararse con los otros dos aislamientos. Respecto a los resultados obtenidos con el aislamiento VI 026 de *L. lecanii*, las concentraciones letales media y noventa fueron inferiores a las obtenidas por García (1996), al evaluar este mismo aislamiento sobre ninfas de *T. vaporariorum*, correspondientes a 1.75×10^8 conidios.mL⁻¹ y de 3.7×10^{11} conidios.mL⁻¹, respectivamente. Lo anterior podría indicar una mayor susceptibilidad de *B. tabaci* al aislamiento de *L. lecanii*.

Tabla 3. Concentraciones letales 50 y 90 de los aislamientos evaluados sobre estados ninfales de *B. tabaci*.

Aislamientos	CL ₅₀ (conidios.mL ⁻¹)	CL ₉₀ (conidios.mL ⁻¹)
VI 026	5.0×10^6	9.9×10^9
Bv 056	3.5×10^6	7.9×10^8
Pc 013	2.4×10^5	1.9×10^8

2.3. Desarrollo de medios de producción masiva de los hongos entomopatógenos seleccionados

Laura Villamizar; Erika Grijalba, Alba Marina Cotes

En el desarrollo de actividades correspondientes a proyectos de investigación previos llevados a cabo en el Laboratorio de Control Biológico, se estandarizaron medios de producción masiva mediante fermentación sólida para los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* (Figura 6). Por esta razón, en este proyecto los esfuerzos se enfocaron en el desarrollo de sustratos para la producción masiva del hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus*.



Figura 6. Producción masiva mediante fermentación sólida de *L. lecanii*.

Producción masiva en bolsas

Para el crecimiento del hongo se evaluaron dos sistemas de producción masiva por fermentación. El primero en bolsas de polietileno de alta densidad y el segundo en bandejas galvanizadas. Así mismo se evaluaron cuatro medios de cultivo a base de arroz y millo en bolsas y a base de avena y soya en bandejas.

En bolsas de polietileno de alta densidad, se evaluaron los sustratos humedecidos de arroz y millo. Para el sustrato arroz se utilizó una relación (P/P) de matriz sólida y agua de 5:4 y para el sustrato millo se trabajó con una relación (P/P) matriz sólida y solución de sacarosa al 2% de 5:4.

A partir de una suspensión de conidios en una solución de Tween 80 al 0.1% ajustada a una concentración de 2.19×10^5 conidios.mL⁻¹, se tomaron 2 mL de ésta para la inoculación de los sustratos contenidos en las bolsas. Por cada sustrato evaluado se utilizaron tres repeticiones.

Las bolsas se incubaron durante quince días, tiempo después del cual se determinó el número de conidios producidos por gramo de sustrato. Para tal fin, se tomó un peso conocido del sustrato esporulado y se suspendió en Tween 80 al 2.0%. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y se determinó la concentración mediante recuento en cámara de Neubauer.

En todos los medios evaluados se observó la colonización de *P. fumosoroseus* y su esporulación evidenciada en el cambio de color de blanco a violeta claro. El análisis de varianza no detectó diferencias significativas entre la cantidad de conidios producidos en los dos sustratos evaluados. Sin embargo, se observó una tendencia numérica a una mayor esporulación en el sustrato arroz, posiblemente debida a una mayor

disponibilidad de nutrientes en dicho medio, particularmente de carbohidratos que favorecieron la colonización. Por esta razón, se seleccionó el medio arroz para la producción masiva de *P. fumosoroseus* en bolsas (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimientos obtenidos en los sustratos de producción masiva del hongo *P. fumosoroseus* contenidos en bolsas de polietileno de alta densidad.

Repetición	Rendimiento en Sustrato Arroz (conidios.g ⁻¹)	Rendimiento en Sustrato Millo (conidios.g ⁻¹)
1	2.03 x 10 ⁹	7.61 x 10 ⁸
2	8.04 x 10 ⁸	1.25 x 10 ⁹
3	1.16 x 10 ⁹	4.91 x 10 ⁸
Promedio	1.33 x 10 ⁹	8.34 x 10 ⁸

Producción masiva en bandejas

A partir de una suspensión de conidios de *P. fumosoroseus* en un a solución de Tween 80 al 0.1% ajustada a una concentración de 8.5 x 10⁶ conidios.mL⁻¹, se tomaron 10 mL para la inoculación de los sustratos a base de avena y soya humedecidas, los cuales se ubicaron en bandejas de lámina galvanizada. Por cada sustrato evaluado se utilizaron tres repeticiones.

Después de ocho días de incubación, se determinó la concentración de conidios producida por gramo de sustrato en cada bandeja. Se tomaron tres muestras de 1 cm² en forma diagonal dentro de cada bandeja, se pesaron y se colocaron en un tubo con 9 mL de Tween 80 al 2.0%. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones seriadas y se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer.

En los dos medios evaluados se observó el crecimiento y esporulación del microorganismo. Los resultados de rendimiento no cumplieron con los requerimientos de homogeneidad de varianzas y normalidad por lo que no fue posible analizarlos mediante pruebas paramétricas. Al aplicar la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) no se detectaron diferencias significativas entre la cantidad de conidios.g⁻¹ producida en el sustrato a base de avena con el medio a base de soya (Tabla 5). Sin embargo, la esporulación en el sustrato soya fue de apariencia pulverulenta y muy seca, características que facilitan la separación de conidios siendo deseables en la industria de bioplaguicidas, razón por la cual, dicho sustrato fue seleccionado para la producción del hongo en bandejas.

Tabla 5. Rendimientos obtenidos en los sustratos de producción masiva del hongo *P. fumosoroseus* contenidos en bandejas de lámina galvanizada.

Repetición	Rendimiento en Sustrato Avena (conidios.g ⁻¹)	Rendimiento en Sustrato Soya (conidios.g ⁻¹)
1	4.1 x 10 ⁹	1.56 x 10 ⁹
2	2.7 x 10 ⁹	1.05 x 10 ⁹
3	1.28 x 10 ⁸	1.04 x 10 ⁹

Promedio	2.7 x 10 ⁹	1.21 x 10 ⁹
----------	-----------------------	------------------------

Separación de conidios de *P. fumosoroseus* y *Beauveria bassiana*

Para separar los conidios de *P. fumosoroseus* y *B. bassiana* a partir de la producción masiva en bolsas con arroz, el sustrato se lavó con una solución de Tween 80 al 2.0%, agitando vigorosamente hasta observar la separación de los conidios. Posteriormente la suspensión se filtró por una muselina para retirar los residuos de arroz y el filtrado se centrifugó durante 20 minutos a 4000 r.p.m. El sobrenadante se desechó y los conidios presentes en el sedimento se secaron en una estufa de corriente de aire a 30° C hasta obtener una humedad de 5.34%, la cual se determinó empleando una balanza de humedad.

Para el caso de la producción masiva realizada en bandejas, los conidios se separaron del sustrato frotando la superficie con una brocha suave desinfectada y se recogieron con una cuchara. Los conidios secos se tamizaron por una malla con un tamaño de poro de 500 micras y el polvo resultante constituyó el principio activo de los bioplaguicidas por desarrollar.

La separación de los dos hongos por vía húmeda se seleccionó para la producción masiva realizada en el medio de cultivo a base de arroz debido a que en este sistema de producción los conidios son hidrofílicos y se lavan fácilmente con una solución de tensioactivos. La agitación del medio debe ser moderada para evitar el rompimiento de la matriz sólida, ya que si el arroz se fractura libera partículas de almidón que quedan en la biomasa separada y disminuyen la concentración en conidios por gramo del principio activo.

Para la producción realizada en bandejas se seleccionó la separación de conidios vía seca considerando que en este sistema de fermentación las células producidas son altamente lipofílicas y se requieren altas concentraciones de tensioactivo para su lavado con agua, lo que podría afectar la integridad de la membrana celular y por tanto la viabilidad.

2.4. Desarrollo de preformulados a base de los hongos entomopatógenos

Laura Villamizar; Erika Grijalba; Alba Marina Cotes

2.4.1. Caracterización de los principios activos a base de *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana*

Inicialmente se determinó la concentración de cada principio activo obtenido a partir de la producción masiva de cada hongo mediante recuento en cámara de Neubauer. Para esto, se pesaron 0.10 g de conidios secos que se mezclaron con 100 mL de Tween 80 al 0.1%; a partir de esta suspensión se prepararon diluciones seriadas y se realizó el conteo, expresando el resultado en conidios por gramo de principio activo. La determinación se realizó por triplicado. Adicionalmente se determinó la humedad residual de tres muestras diferentes mediante el uso de una balanza halógena de humedad. En cuanto al tamaño de partícula, éste se determinó por microscopía; para tal fin, una muestra de cada principio activo se colocó en una lámina sobre la cual se adicionaron dos gotas de Tween 80 al 0.1% y se cubrió con una laminilla; la lámina se observó al microscopio con un aumento de 40X midiendo individualmente el diámetro mayor de 100 conidios. La germinación se determinó preparando una suspensión de conidios e inoculándola en tres cajas de Petri con Agar-Extracto de malta. Las cajas se

incubaron por 24 horas y se observaron al microscopio 10 campos ópticos por caja, en los cuales se contaron el número de conidios germinados y no germinados, expresando el resultado como porcentaje de germinación.

El principio activo a base de *Paecilomyces* sp. presentó una concentración de 10^{10} conidios.g⁻¹ mientras que en el de *Beauveria bassiana* dicha concentración fue de 8.8×10^{10} conidios.g⁻¹. La humedad residual después del proceso de secado en estufa fue del 5.34% y del 5.20% para *Paecilomyces* sp. y *B. bassiana* respectivamente, humedades que según lo reportado por diferentes autores son adecuadas para el almacenamiento de la biomasa (Vélez *et al.*, 1997).

Con los resultados correspondientes al tamaño de partícula de los dos principios activos en estudio se elaboraron histogramas de distribución de frecuencias, los cuales indicaron que los conidios de *Paecilomyces* sp. presentaron un tamaño que oscila entre 2.5 y 7.5 micras, predominando aquellos que se encuentran en el rango de 2.6 a 5.0 micras. Para los conidios de *B. bassiana* se observó que su tamaño de partícula osciló entre 2.5 y 5.0 micras, predominando aquellos con un diámetro entre 2.6 a 5.0 micras (Figura 7).

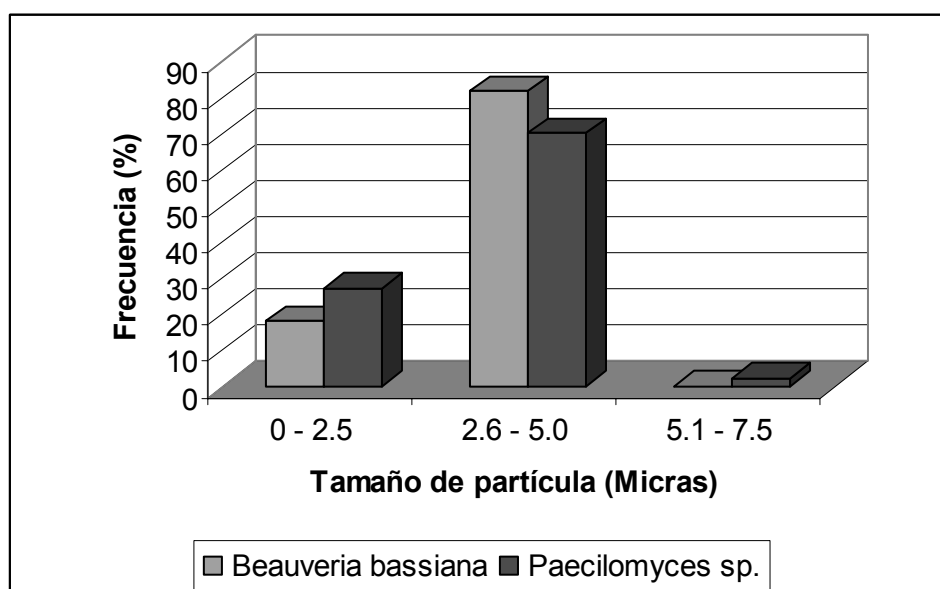


Figura 7. Distribución de frecuencias del tamaño de conidios de *P. fumosoroseus* y *Beauveria bassiana*.

En cuanto a la capacidad de germinación de los conidios se obtuvieron porcentajes del 95 y 98% para los conidios del principio activo a base de *P. fumosoroseus*. y de *B. bassiana*, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron adecuados si se considera que se ha establecido como parámetro de calidad para bioplaguicidas una germinación mayor al 90% a las 24 horas de incubación (Vélez *et al.*, 1997).

2.4.2. Selección de auxiliares de formulación

Compatibilidad de los principios activos con los posibles auxiliares de formulación

Muestras de 0,1g de los conidios secos se mezclaron con los posibles auxiliares de formulación en una relación 1:5 P/P. Los auxiliares de formulación incluyeron filtros ultravioleta (UV), adherentes (Ag), diluentes (Di) y tensioactivos (T). Las mezclas se

almacenaron en viales de vidrio secos y agrafados y se determinó la germinación inmediatamente después del proceso de mezcla y después de uno y dos meses de almacenamiento a 8°C y 28°C. Para tal fin, cada muestra se suspendió en 10 mL de una solución de Tween 80 al 0,5% y se realizaron diluciones seriadas, de las cuales se sembraron 100 µL en tres cajas de Petri con medio Agar-Extracto de malta. Las cajas se incubaron a 25°C y al cabo de 16 horas se determinó la germinación de los conidios mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos por repetición contando los conidios germinados y no germinados. El diseño experimental fue completamente al azar, donde la unidad experimental consistió en un vial y se utilizaron tres repeticiones por tratamiento.

- ***B. bassiana***

Los resultados de este estudio para *B. bassiana* mostraron que todos los tratamientos presentaron una disminución de la germinación durante el almacenamiento con los auxiliares de formulación a las tres temperaturas evaluadas, la cual no fue estadísticamente significativa, sin embargo numéricamente se observa un efecto del almacenamiento que posiblemente se puede atribuir al efecto del tiempo (edad de las células) y la temperatura. Una de las condiciones adversas que pudo afectar la germinación de los conidios fue el almacenamiento en viales de vidrio bajo condiciones aeróbicas, ya que se ha demostrado que durante el almacenamiento, el oxígeno interactúa con los sistemas membranosos afectando la iniciación de la síntesis del DNA y en consecuencia la viabilidad de las células (Abadías *et al.*, 2001).

La prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) no detectó diferencias estadísticas entre la germinación a los diferentes tiempos de evaluación cuando los conidios se almacenaron solos o con los auxiliares de formulación Ag01, Di03, De05 a las dos temperaturas evaluadas. Este resultado podría indicar que dichos excipientes son compatibles con el microorganismo y pueden ser utilizados en el desarrollo de una formulación. Con el excipiente codificado como UV se observó estabilidad a 8°C, donde no presentó pérdidas significativas de la germinación, sin embargo, a 28°C se obtuvo una disminución significativa de la capacidad para germinar de este microorganismo. La germinación de las esporas de dicho tratamiento fue evaluada hasta las 48 horas de incubación, momento en el cual se alcanzó el 95%, resultado que sugiere que este auxiliar de formulación produce una inducción de latencia en el microorganismo almacenado a temperaturas elevadas sin afectar su viabilidad.

Basados en los resultados obtenidos, se inició el desarrollo de la formulación utilizando todos los excipientes evaluados.

- ***Paecilomyces sp.***

La viabilidad de los conidios de *P. fumosoroseus* disminuyó con todos los auxiliares de formulación evaluados, incluyendo el tratamiento control, siendo en todos los casos mayor la disminución en la capacidad de germinación de los conidios cuando se almacenaron a la temperatura más alta (28°C). De esta manera se confirmó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento (Villamizar *et al.*, 1997, Mariño *et al.*, 2004).

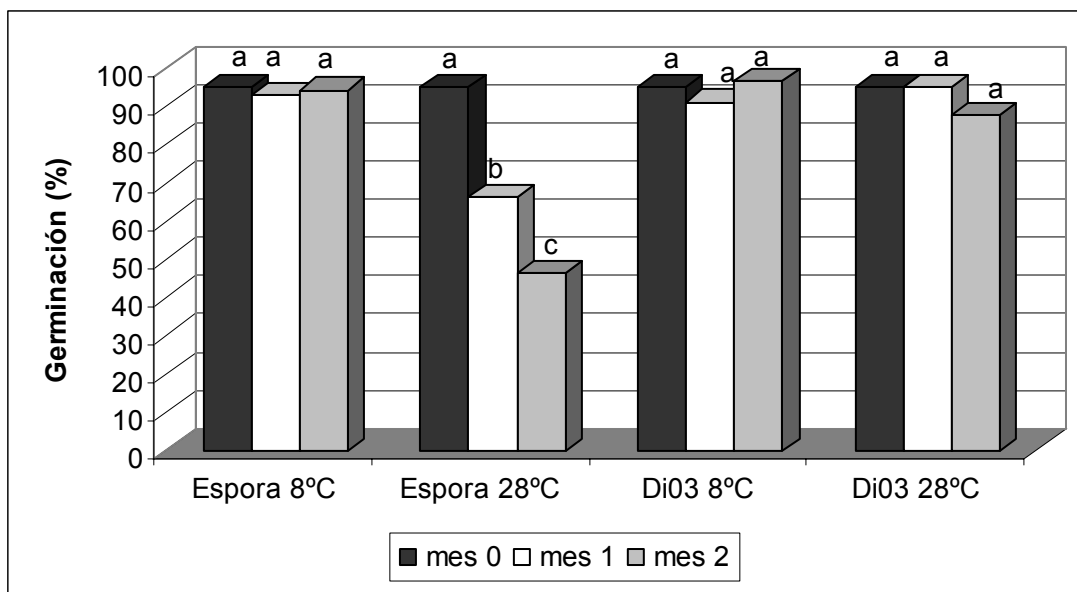


Figura 8. Efecto del diluyente Di03 sobre la estabilidad de la germinación de conidios de *P. fumosoroseus*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

En el tratamiento control (Figura 8) se observó que los conidios no presentaron una pérdida significativa de la germinación cuando fueron almacenados a 8°C durante los tiempos evaluados, mientras que a 28°C, la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) determinó diferencias estadísticas entre los porcentajes de germinación de las células recién obtenidas del proceso de secado y las almacenadas durante 2 meses a dicha temperatura. Este comportamiento confirmó lo reportado por otros autores, en cuanto a una mayor estabilidad de la viabilidad de los microorganismos cuando se almacenan a temperaturas de refrigeración (Villamizar *et al.*, 1997).

Con el diluyente Di03 (Figura 8), el cual es un material inerte que actúa como vehículo del principio activo (Morales, 1993), no se presentó reducción en el porcentaje de germinación durante el almacenamiento a 8°C y 28°C. Este resultado sugiere que el diluyente Di03 ejerció un efecto protector de los conidios de *P. fumosoroseus* Pc013 almacenados, a diferencia de los demás excipientes evaluados (Ag01, filtro Uv y De05) haciéndolo promisorio para la formulación de un bioplaguicida estable en almacenamiento.

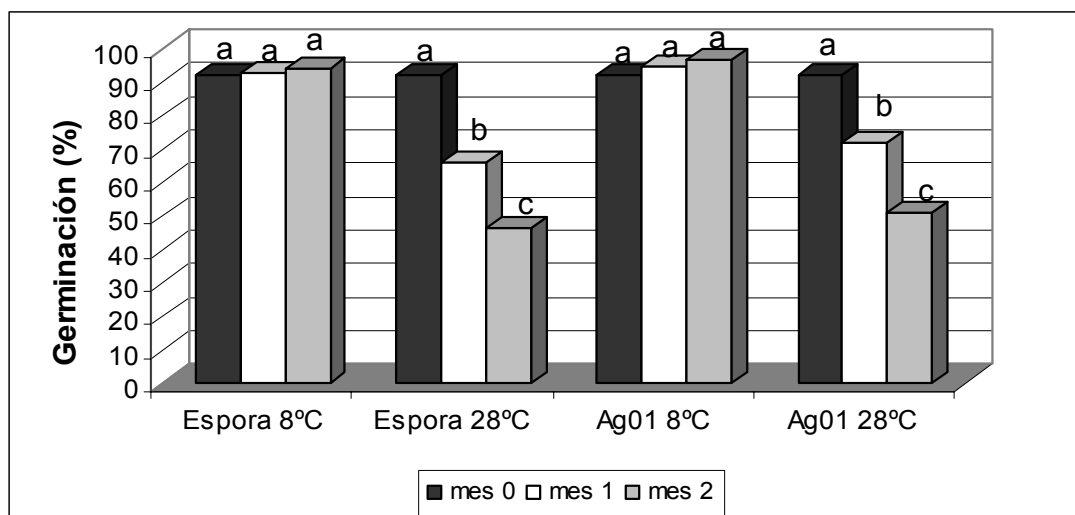


Figura 9. Efecto del aglutinante Ag01 sobre la estabilidad de la germinación de conidios de *P. fumosoroseus*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

El aglutinante Ag01 es un auxiliar empleado con el fin de recubrir homogéneamente los conidios con el filtro solar. Durante los dos meses de almacenamiento a 8°C no se presentó una reducción en la germinación. Sin embargo, a 28°C la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) detectó una disminución significativa de la capacidad de germinación de los conidios, obteniéndose un comportamiento similar al del tratamiento control sin encontrarse diferencias significativas en los porcentajes de germinación obtenidos con cada tratamiento en cada tiempo de evaluación (Figura 9). Estos resultados indican que este auxiliar de formulación no ejerce ningún efecto sobre la estabilidad de las células almacenadas, pudiendo ser incorporado en el desarrollo del bioplaguicida.

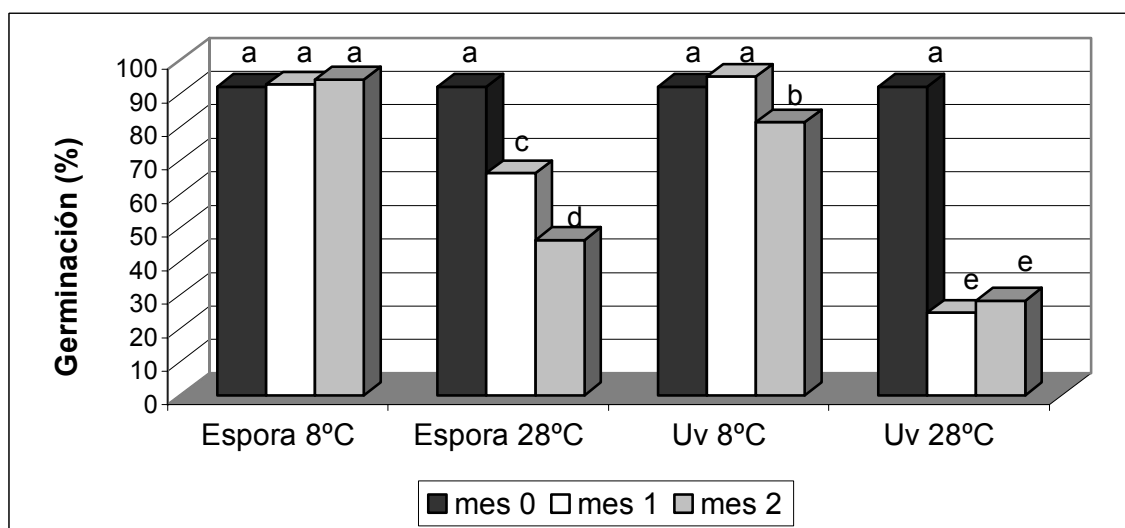


Figura 10. Efecto del filtro ultravioleta UV sobre la estabilidad de la germinación de conidios de *P. fumosoroseus*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

Al evaluar el filtro ultravioleta (figura 10) se presentó una reducción significativa de la germinación del hongo a las dos temperaturas evaluadas. A 8°C la reducción en la germinación fue del 10.58% después de dos meses de almacenamiento, cuando las células del hongo se encontraban con el auxiliar de formulación, mientras que no se

presentó pérdida de la germinación en el tratamiento control, lo que sugiere que la sustancia empleada tiene un efecto deletéreo sobre las células fúngicas almacenadas. A 28°C fue más notorio dicho efecto negativo, encontrándose una reducción de la germinación del 63.81%, después de dos meses de almacenamiento la cual fue significativamente superior a la obtenida en el tratamiento control (45.6%), confirmando el efecto del filtro solar sobre el hongo. La germinación de los conidios de dicho tratamiento fue evaluada hasta las 48 horas de incubación observándose un aumento en el porcentaje de germinación, resultado que sugiere que este auxiliar de formulación produce una inducción de latencia en el microorganismo almacenado al igual que se observó para *B. bassiana*.

2.4.3. Desarrollo y caracterización de preformulados

Elaboración de los prototipos de bioplaguicidas

Con los principios activos de los dos microorganismos, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* y los auxiliares de formulación evaluados en el estudio de compatibilidad, se procedió al desarrollo prototipos de bioplaguicida. Se seleccionó como sistema de entrega de los dos productos un polvo mojable, para el cual se fijaron algunos parámetros deseados como una humedad del 5%, un tamaño de partícula inferior a 100 μ y una concentración mínima de 10^{10} conidios.g⁻¹. Basados en la información generada previamente en el desarrollo del bioplaguicida a base de *L. lecanii* se fijaron las concentraciones de cada excipiente y las operaciones unitarias implicadas en el proceso de formulación. Se elaboraron los prototipos, los cuales fueron sometidos a un proceso de secado por liofilización y se les realizó un control de calidad y un estudio de estabilidad acelerada a 8°C, 18°C y 28°C durante tres meses de almacenamiento (Figura 11).

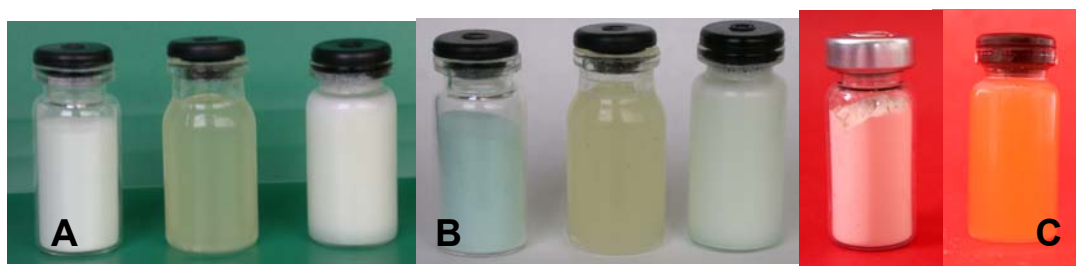


Figura 11. Prototipos a base de *B. bassiana* (A) y *P. fumosoroseus* (B) y bioplaguicida a base de *L. lecanii* (C) (Fotografías Villamizar).

Caracterización de los prototipos

Los prototipos de bioplaguicidas a base de *P. fumosoroseus* y *B. bassiana* y el bioplaguicida a base de *L. lecanii* se caracterizaron determinando su concentración, germinación, humedad y tamaño de partícula. Para los tres productos se obtuvo una concentración de 10^{10} conidios.g⁻¹ y considerando que la concentración requerida en el producto reconstituido para su aplicación en campo es de 10^7 conidios.mL⁻¹, se requeriría 1g de producto por litro de agua. Esta proporción corresponde a una dosis aproximada por hectárea de 400g de producto, la cual es coherente con las cantidades de agroquímicos comúnmente utilizadas para el control del insecto.

La germinación de *L. lecanii* y *B. bassiana* fue del 96% a las 24 horas de incubación, resultado que se encuentra dentro de los parámetros de calidad de un bioplaguicida de este tipo, los cuales recomiendan un porcentaje de germinación superior al 95% (Vélez *et al.*, 1997). Para el caso de *P. fumosoroseus* se obtuvo una germinación del 67.4% a las 24 horas, la cual se incrementó al 95% después de 48 horas de incubación. Estos

resultados indican que el microorganismo formulado presenta un retardo en el crecimiento, por lo que se plantea como objetivo posterior a una optimización del formulado, la evaluación de potenciales inductores de germinación y su inclusión dentro de la formulación. La humedad de los tres bioplaguicidas fue inferior al 5%, resultado adecuado para plaguicidas microbianos, ya que la baja humedad disminuye la tasa metabólica de los hongos y mejora su estabilidad durante el almacenamiento (Abadías *et al.*, 2003, Sabaratnam y Traquair 2002).

El tamaño de partícula de los tres prototipos fue ajustado a 45 μ , un polvo fino con partículas muy pequeñas que disminuyen la velocidad de sedimentación del producto reconstituido y de esta forma se asegura la homogeneidad en la concentración del producto durante la aplicación (Tabla 6).

Tabla 6. Principales características de los prototipos de bioplaguicidas a base de *P. fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* y del bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii*.

Característica	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Paecilomyces sp.</i>
Concentración (conidios.g-1)	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰
Germinación 24 horas (%)	96	96	67,4 (95% - 48 h)
Humedad (%)	4,20	4,82	3,41
Tamaño de partícula (micras)	45	45	45

Estudio de la estabilidad de los prototipos bajo condiciones de almacenamiento

Mediante este estudio se evaluó la estabilidad microbiológica del principio activo y del prototipo de formulación sólida.

Se utilizó un diseño completamente al azar en el que la unidad experimental consistió en un frasco de polietileno de alta densidad de 10 mL de capacidad que se llenó con 7 mL de parafina, sobre la que se colocaron 0.1 g del prototipo de la formulación a base de *P. fumosoroseus* (Pc013) o de *Beauveria bassiana* (Bv056). Como tratamiento control se pesaron 0.1 g de los conidios sin formular de cada hongo y se colocaron de igual manera en los frascos con parafina. Los tratamientos se almacenaron a 8°C y 28°C.

Como parámetro de evaluación se determinó la capacidad de germinación de cada hongo, para lo cual en cada mes se tomó una muestra que se suspendió en una solución de Tween 80 al 0.1%, se agitó durante 30 segundos y a partir de esta suspensión se realizó una segunda dilución. De cada una de éstas se tomaron 0.1 mL que se inocularon sobre una caja de Petri con medio Agar Extracto de Malta por triplicado. Las cajas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 25°C, tiempo después del cual se cortó de cada caja un cuadrado de Agar de 1 cm². Dicho

fragmento de medio se colocó sobre una lámina portaobjetos y se le adicionó una gota de azul de lactofenol. Posteriormente, se realizó la lectura de los conidios germinados y sin germinar en 10 campos ópticos mediante observación en un microscopio con el objetivo de 40X.

Para *P. fumosoroseus* se observó que después de los primeros 30 días de almacenamiento a las dos temperaturas no se presentó una reducción en la capacidad de germinación para el hongo formulado y sin formular. Después de 60 días de almacenamiento los conidios sin formular disminuyeron significativamente su capacidad de germinación a las dos temperaturas evaluadas. A 4°C, el porcentaje de germinación del prototipo de formulación disminuyó en un 80,60% y el de los conidios sin formular en un 48.47%. Sin embargo, a las 48 horas de incubación se alcanzó en ambos casos un porcentaje de germinación superior al 95%, lo que sugiere que el almacenamiento no causó la muerte celular si no que indujo un estado de latencia, retrasando el proceso de germinación. La latencia posiblemente se produjo como consecuencia de la baja humedad a la que se realizó la prueba de almacenamiento, ya que se ha reportado que dicha condición disminuye el metabolismo celular de los microorganismos retrasando su desarrollo (Gómez y Villamizar, 1996; Gutiérrez, 2001).

A 28°C la germinación a las 24 horas de incubación no fue sincronizada, algunos conidios germinaron primero formando micelio, el cual no permitió realizar el conteo, sin embargo se observó un alto número de conidios sin germinar. El almacenamiento a esta temperatura posiblemente generó efectos diferentes en las células del hongo induciendo diversos grados de latencia que hicieron que éstas germinaran a diferentes tiempos, lo que no se observó a 4°C.

Después de 90 días de almacenamiento a 4°C y 28°C se observó que sólo el 5% de los conidios formulados y sin formular germinaron a las 24 horas de incubación. Sin embargo, a las 72 horas de incubación se alcanzó el 95% en los dos tratamientos, confirmando la inducción de estados de latencia en las células como resultado del almacenamiento. También se observó que a mayor tiempo de almacenamiento, la latencia es mayor y las células requieren más tiempo para germinar.

Inmediatamente después del proceso de formulación, el hongo *B. bassiana* formulado y sin formular presentó una germinación del 96% y del 95% respectivamente después de 24 horas de incubación. Después de 30 días de almacenamiento a las dos temperaturas no se presentó reducción en la capacidad de germinación del microorganismo formulado y sin formular. Por el contrario, pasados 60 días de almacenamiento la capacidad de germinación del hongo formulado y sin formular disminuyó significativamente a las dos temperaturas evaluadas con germinaciones del 46% y 42% respectivamente a 4°C y del 21% y 14% respectivamente a 28°C. A las 48 horas de incubación aumentaron los porcentajes de germinación, los cuales para los dos tratamientos y las dos temperaturas superaron el 95%. Este resultado sugiere que al igual que con *P. fumosoroseus*, el proceso de almacenamiento indujo un estado de latencia que retrasó el proceso de germinación de conidios.

Después de 90 días de almacenamiento a las dos temperaturas se observaron porcentajes de germinación significativamente menores que los obtenidos a los 60 días de almacenamiento. Se obtuvieron valores del 9% y 14% para los conidios formulados y sin formular a 4°C y germinaciones inferiores al 5% para los almacenados a 28°C. Sin embargo, nuevamente se observó que la germinación aumentó e igualó la germinación inicial al continuar la incubación hasta las 72 horas, confirmando la inducción de estados de latencia en las células como resultado del almacenamiento.

Se puede concluir que la formulación no tuvo un efecto negativo en la estabilidad de los dos hongos bajo condiciones de almacenamiento. Para continuar con el desarrollo de estos bioplaguicidas es importante en la etapa de optimización de productos, evaluar posibles inductores de germinación que le ayuden a los microorganismos a romper la latencia que se induce por el almacenamiento. Estas sustancias podrían incorporarse en la formulación con el fin de lograr que el porcentaje de germinación de los conidios almacenados sea siempre superior al 95% en un tiempo no mayor a 24 horas de incubación y de esta forma asegurar la eficacia de los productos al momento de ser aplicados en el campo.

2.4.4. Estabilidad frente a la radiación ultravioleta

Evaluación de la susceptibilidad de los principios activos frente a la radiación ultravioleta monocromática (254 nm)

En cajas de Petri estériles se colocaron muestras de 0,1 g de los principios activos de los prototipos de bioplaguicidas a base de *L. lecanii* (VI026), *P. fumosoroseus* (Pc013) y *B. bassiana* (Bv056) y se cubrieron con papel vinipel.

Las cajas de Petri con las muestras se expusieron a una distanciada de 20 cm de una lámpara Sylvania T8G30 que emite radiación ultravioleta monocromática tipo C con una longitud de onda de 254 nm. Antes de iniciar la exposición y después de 3, 6 y 24 horas de exposición a la radiación para el caso de *P. fumosoroseus* y antes de iniciar la exposición y después de 2, 4, 6 y 24 horas de exposición para *B. bassiana* y *L. lecanii* se retiró una muestra y se evaluó su germinación. Para determinar la capacidad de germinación de los conidios, la muestra se suspendió en una solución de Tween 80 al 0.1%, se agitó durante 30 segundos y a partir de esta suspensión se realizó una segunda dilución decimal. De cada dilución se tomaron 0.1 mL que se inocularon sobre una caja Petri con Agar Extracto de Malta por triplicado. Las cajas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 25°C, tiempo después del cual se cortó de cada caja un cuadrado de Agar de 1 cm² que se colocó sobre una lámina portaobjetos. Se adicionó una gota de azul de lactofenol y se cubrió con una laminilla. Posteriormente se realizó la lectura de los conidios germinados y sin germinar en 10 campos ópticos de cada fragmento de Agar mediante observación al microscopio.

Después de 24 horas de exposición a la radiación UV tipo C se encontró que la capacidad de germinación de los conidios de *L. lecanii* disminuyó en un 82,3%, para el caso de *P. fumosoroseus* no se presentó reducción en la germinación del hongo y para *B. bassiana* se obtuvo una reducción de la germinación del 47.70% después de 24 horas de exposición. Estos resultados indican que los conidios de *L. lecanii* y *B. bassiana* son susceptibles a los efectos nocivos de la radiación ultravioleta monocromática utilizada en el presente estudio, la cual puede causar diferentes tipos de daño. La radiación UV induce efectos negativos en las células como consecuencia de su acción sobre diversas moléculas: porfirinas, carotenoides, esteroides, quinonas, proteínas y ácidos nucleicos. En hongos, estos efectos negativos pueden causar retraso del crecimiento, mutaciones o muerte celular. El ADN expuesto a la radiación UV puede sufrir lesiones directas e indirectas. El daño directo resulta de la formación de fotoproductos tales como dímeros de pirimidinas (aparición de enlaces covalentes entre bases pirimidínicas adyacentes: citosina-citosina o citosina-timina), hidratos de pirimidina y entrecruzamientos entre ADN y proteínas. El daño indirecto se debe principalmente a la aparición de especies de oxígeno reactivo (peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radicales hidroxilos) que oxidan la pentosa presente en el ADN y rompen la hebra de la molécula (Devotto y Gerding 2003).

En el caso de *P. fumosoroseus* no se observó un efecto negativo producido por la radiación ultravioleta evaluada en el presente trabajo, posiblemente porque este microorganismo presenta algún mecanismo de defensa frente a la luz. Esto podría atribuirse a la pigmentación de las esporas que tienen un color violeta claro, mientras que los conidios de *L. lecanii* son totalmente blancos y los de *B. bassiana* presentan una ligera coloración beige. Nicholson *et al.*, (2005) sugirieron que uno de los mecanismos de protección de las células frente a la radiación UV consiste en la acumulación de pigmentos de absorción en la parte superficial de la espora, en particular en la cobertura exterior de la membrana. Estos pigmentos actúan absorbiendo la radiación antes de que ésta penetre y produzca daños sobre el DNA.

Evaluación de la fotoestabilización brindada por las formulaciones a los tres hongos entomopatógenos

Teniendo en cuenta que el mayor porcentaje de radiación solar que alcanza la atmósfera terrestre se encuentra en el rango de los 300 nm a 400 nm, (radiación tipo UVA y una fracción de UVB) y considerando que la evaluación bajo condiciones de laboratorio se desarrolló exponiendo los hongos a una longitud de onda perteneciente al UVC, se decidió realizar un ensayo bajo condiciones de campo con el fin de establecer el efecto estabilizador de las formulaciones frente a la radiación solar. Esta prueba se realizó en el municipio del Espinal, departamento del Tolima, debido a que en esta región se presentó una alta presencia de la plaga por controlar y por ende, se realizaron los estudios de eficacia en campo de los prototipos de bioplaguicidas desarrollados.

El ensayo se realizó bajo un diseño completamente al azar en el cual la unidad experimental consistió en una caja de Petri con Agar Agua sobre la que se ubicó una hoja de tomate previamente desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 1.0%. Se pesaron muestras de 0.1 g del principio activo y del producto a base de *L. lecanii*, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, los cuales fueron colocados sobre las hojas de tomate. Las cajas destapadas fueron expuestas al sol durante 6 horas retirando cada hora una muestra de espora desnuda y contenida en el producto de cada uno de los hongos. Como parámetro de evaluación de la viabilidad de los conidios se estableció la capacidad de germinación a las 24 horas de incubación, variable que se midió por triplicado en cajas de Petri con medio Agar Extracto de Malta. Las muestras expuestas a la radiación fueron llevadas al laboratorio en donde cada hoja de tomate se lavó con 1 mL de una solución de Tween 80 al 1%, la suspensión de lavado fue llevada a un tubo con 9 mL de una solución de Tween 80 al 0.1%, a partir de la cual se inocularon las cajas con el medio de Agar Extracto de Malta. Pasado el tiempo de incubación se cortaron fragmentos de 1 cm² de cada caja de Petri y se aplicó una gota de azul de lactofenol. Los fragmentos de medio de cultivo fueron ubicados en una lámina portaobjetos y cubiertos con una laminilla. Posteriormente se observaron en el microscopio y se determinó el porcentaje de germinación en cada fragmento contando los conidios germinados y sin germinar en diez campos ópticos.

Se observó una reducción en la germinación de todos los tratamientos a medida que avanzó el tiempo de exposición, resultado que indica que en todos los casos la radiación solar presentó un efecto negativo sobre la viabilidad de los microorganismos formulados y sin formular (Figura 12, Tabla 7).

Después de 6 horas de exposición a la radiación solar, los conidios no formulados de *L. lecanii* (VI026) disminuyeron su capacidad de germinación en un 69,69%, en tanto que los formulados en un 37,39%, presentándose diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de germinación de los conidios formulados y sin

formular, lo que indica que para este caso la formulación presenta un efecto protector de las células frente a la radiación. Los conidios sin formular de *B. bassiana*, (Bv056) presentaron una reducción del 46,52% y del 26,36% cuando se encontraban formulados detectándose diferencias estadísticas entre estos tratamientos, lo que indica que para este microorganismo la formulación también protegió significativamente las células durante su exposición directa al sol. Los conidios de *P. fumosoroseus* (Pc013) disminuyeron en un 43,11% y en un 42,43% su capacidad para germinar cuando se encontraban formulados y sin formular respectivamente, resultados que no fueron estadísticamente diferentes, lo que sugiere que para este microorganismo la formulación no protege al hongo durante su exposición a la radiación solar.

El efecto protector ejercido por la formulación se atribuye al filtro solar, a partir de los resultados obtenidos se puede deducir que el filtro solar empleado para las formulaciones no produjo en ninguno de los casos una protección del 100% en la viabilidad de los hongos, lo que podría atribuirse a que estas sustancias normalmente sólo absorben algunas longitudes de onda y posiblemente no cubrieron todo el rango de radiación emitido por el sol y capaz de atravesar la atmósfera terrestre el cual comprende entre los 300nm a 400nm y por tanto es probable que los microorganismos absorbieran parte de la radiación a la que fueron expuestos. Dicha radiación pudo causar la disminución de su capacidad de germinación como consecuencia de los daños a nivel del ADN y de las proteínas de la célula por la acción de la formación de fotoproductos o la acción de radicales libres como se mencionó anteriormente.

Al comparar los resultados obtenidos en los ensayos realizados en campo, con los que se llevaron a cabo en el laboratorio empleando una longitud de onda de 254 nm, se observó que en los dos ensayos, los conidios de *L. lecanii*, (Lv026), fueron los más susceptibles a la radiación solar (Radiación tipo UV-A y UV-B) y a la longitud de onda evaluada de la radiación tipo C. Este resultado posiblemente se debió a que este microorganismo presenta una coloración blanca, lo que se relaciona con la ausencia de pigmentos que lo protejan de la radiación ultravioleta, presumiblemente al absorberla antes de que penetre al ADN siendo una de las posibles causas de su sensibilidad a la misma. Además, es posible que este microorganismo no posea otros mecanismos de defensa, como enzimas, que le permitan controlar el estrés oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno generadas por la radiación UV-A (Friedberg *et al.*, 1995) así como por la radiación UVB que actúa modificando los aminoácidos que poseen en su estructura anillos aromáticos (Imshenetsky *et al.*, 1979; Margalith 1992; Pourzand y Tyrell 1999) lo que genera la formación de especies reactivas de oxígeno (Miller *et al.*, 2004).

Para el caso de los conidios de *P. fumosoroseus* los resultados obtenidos indicaron que fueron sensibles a la radiación solar (UV-A y UV-B), pero no lo fueron a la longitud de onda de 254nm empleada en laboratorio que corresponde a radiación ultravioleta tipo UV-C. Es posible que el pigmento de este aislamiento de *P. fumosoroseus* absorba la radiación con una longitud de onda de 254 nm; pero que no absorba longitudes de onda mayores como es el caso del UV-B y UV-A. Asimismo, como en el caso de *L. lecanii* los resultados indican que posiblemente el hongo Pc013 no posee tampoco mecanismos enzimáticos de defensa para controlar el estrés oxidativo generado por la radiación. Esta sensibilidad del aislamiento Pc013 a la radiación solar concuerda con los resultados obtenidos por Fargues *et al.*, (1997), quienes empleando un simulador solar encontraron que la radiación UV-B es el principal factor responsable de la mortalidad de los hongos entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae*.

Es importante en la etapa de optimización de los productos a base de *P. fumosoroseus* y de *B. bassiana*, tener en cuenta los resultados obtenidos en estas pruebas y evaluar otros tipo de filtros solares o mezclas de ellos para optimizar la estabilidad de los formulados frente a la luz solar.

Tabla 7. Estabilidad de los bioplaguicidas y los conidios sin formular frente a la luz solar.

Tiempo	<i>L. lecanii</i>		<i>B. bassiana</i>		<i>Paecilomyces sp.</i>	
	Producto	Espora	Producto	Espora	Producto	Espora
0	86,03	80,97	76,83	86,52	55,72	67,59
1	45,55	58,82	64,84	62,07	12,00	31,73
2	47,00	43,00	63,63	46,26	15,30	32,11
3	38,61	36,66	54,72	45,13	15,74	27,27
4	41,74	37,34	50,95	37,04	15,00	18,18
5	43,24	23,72	55,00	47,06	18,85	31,09
6	48,64	11,28	50,47	40,00	13,29	24,48

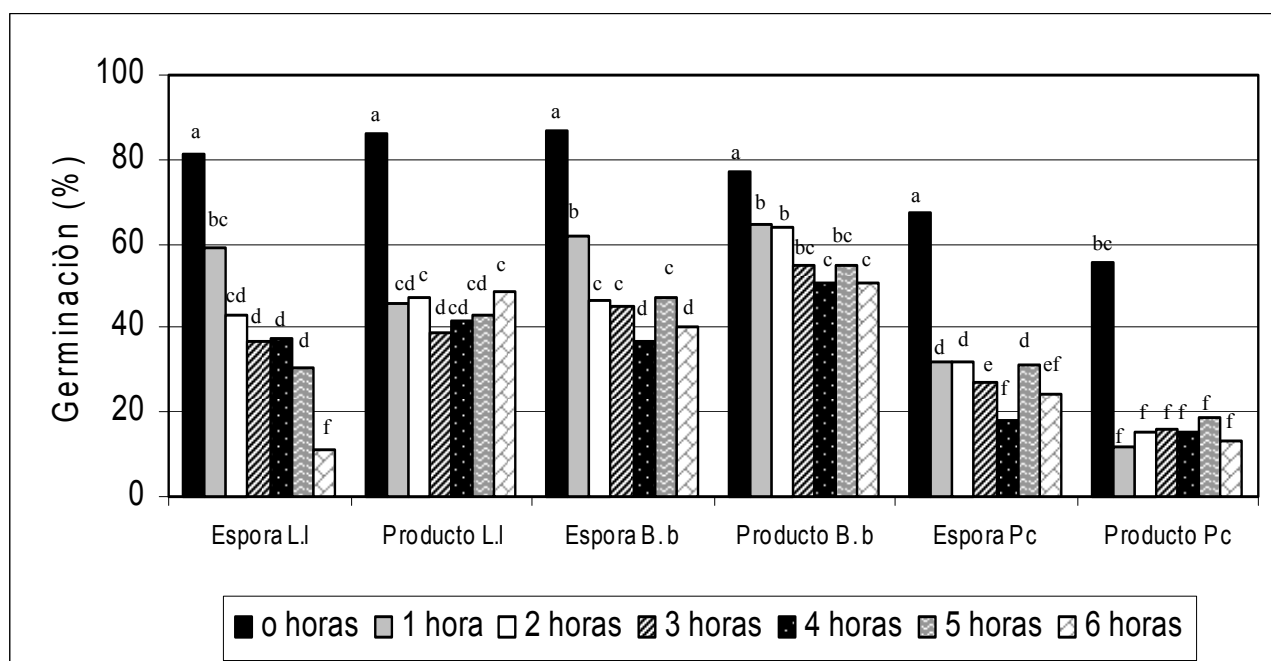


Figura 12. Estabilidad de los bioplaguicidas y los conidios sin formular frente a la luz solar. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

2.4.5. Compatibilidad con agroquímicos utilizados

Una de las principales limitantes que se han detectado cuando un producto biológico es evaluado bajo condiciones de campo, es su posible incompatibilidad con los insumos usados dentro de las prácticas del cultivo, entre ellos los plaguicidas químicos que deben ser utilizados para los demás problemas fitosanitarios que se presentan en él. Por tal razón y con miras a integrar el bioplaguicida desarrollado previamente a base de *L. lecanii* y los bioplaguicidas por desarrollar a base de *Beauveria bassiana* y *P. fumosoroseus* en un programa de manejo integrado de plagas, se realizaron algunos estudios de compatibilidad *in vitro* de dichos microorganismos con plaguicidas de uso frecuente en cultivos de tomate y melón. Para tal fin se seleccionaron los

productos fungicidas: Metalaxil, Benomil, Captan + Carboxim, Pencycuron, Propiconazol, Pyrimethanil, Carbendazim, Clorotalonil, Dimetomorf, Triforina, Mancozeb, Oxicloruro de Cobre Ditiocarbamato y Fosetil aluminio; así como los insecticidas Carbofurán, Permetrina, Carbosulfán, Clorpirifos, Spinosad, Metiltiofanato, Profenofos y Thiodicarb.

Este experimento se realizó en cajas de Petri con medio Agar Saboureaud, al cual se le adicionó cada plaguicida independientemente, a la dosis comercial recomendada en la etiqueta, la mitad y un cuarto de ésta. En dichos medios de cultivo con plaguicidas y en medio Saboureaud sin agroquímicos (control), se sembraron diluciones seriadas de conidios de los hongos, evaluándose posteriormente la germinación por observación al microscopio. También se evaluó el efecto de estos plaguicidas sobre el crecimiento diametral de los hongos, para lo cual se sembraron en la parte central de cajas de Petri con los medios mencionados anteriormente, fragmentos circulares de 5mm de diámetro de medio de cultivo crecidos con cada hongo, tanto en los medios con plaguicida a las dosis mencionadas previamente como en medios sin plaguicidas. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento y se midió el diámetro de la colonia formada a los 3, 6 y 9 días de incubación.

- ***B. bassiana***

En la figura 13 se observan los resultados obtenidos con los diferentes fungicidas evaluados, en donde se evidenció el efecto negativo de la mayoría de estos sobre la germinación de los conidios de *B. bassiana* Bv056. Los fungicidas Metalaxil, Benomil, Captan + Carboxim, Propiconazol, Pyrimethanil, Clorotalonil, Dimetoato + Mancozeb, Triforina y Mancozeb inhibieron totalmente la germinación del microorganismo, razón por la cual no se consideran compatibles con el entomopatógeno. Estos fungicidas tienen mecanismos de acción variados que causaron la inhibición de la germinación entre los que se encuentran: la unión con la subunidad beta de los dímeros de tubulina (componente de la estructura celular), que produce el cese de la división celular, la desorganización de la estructura fina de las células fúngicas y la pérdida de la integridad celular (benomil), interrupción de la síntesis del ergosterol e interferencia con el metabolismo de la glucosa.

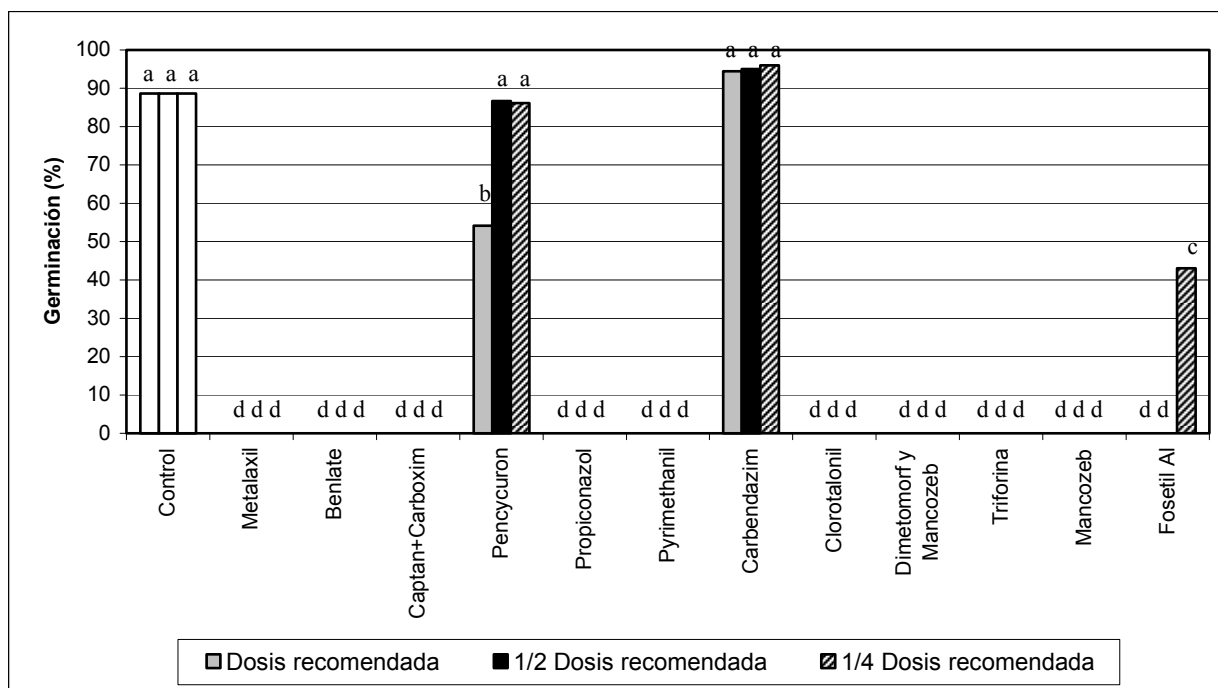


Figura 13. Efecto de diferentes fungicidas sobre la germinación de conidios de *B. bassiana* Bv056. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

El fungicida Carbendazim no afectó la germinación del microorganismo, no encontrándose diferencias estadísticas con respecto al control según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Este agroquímico inhibe la síntesis de DNA durante la mitosis y el mecanismo de transmisión del mensaje genético del DNA al RNA. Impide el desarrollo de las hifas la formación de aporosios y el crecimiento del micelio. Normalmente este fungicida permite la germinación de los conidios pero posteriormente afecta la división celular causando la muerte del hongo (Liñan, 1997). Este efecto fue confirmado con la prueba de crecimiento diametral (Figura 14), en la cual no se obtuvo desarrollo del hongo, confirmando que éste si puede germinar pero no hay crecimiento del micelio, por lo tanto a pesar de no afectar la germinación, el fungicida es incompatible con el microorganismo.

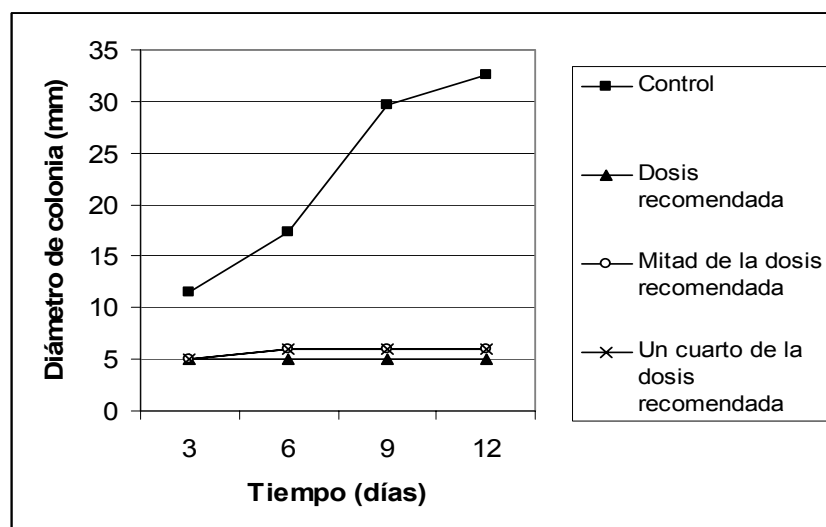


Figura 14. Efecto del fungicida Carbendazim sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* Bv056.

Con el fungicida Pencycuron se observó una reducción significativa de la germinación cuando se utilizó la dosis recomendada, mientras que al emplear la mitad y un cuarto de dicha dosis, el análisis estadístico no detectó diferencias estadísticas con respecto al control. Aunque su mecanismo de acción no ha sido esclarecido completamente, se ha reportado que su efecto se basa en la inhibición de la división celular, permitiendo la germinación pero no el desarrollo de los hongos (Liñan, 1997), lo cual se confirmó con la evaluación de su efecto sobre el crecimiento diametral (Figura 15).

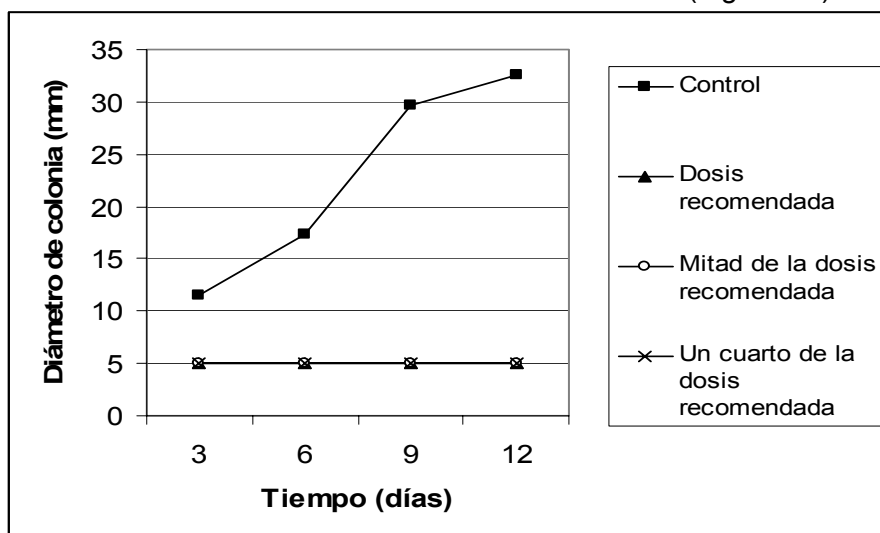


Figura 15. Efecto del fungicida Pencycuron sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* Bv056.

Los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que ninguno de los fungicidas evaluados es compatible con el microorganismo y no deben ser aplicados conjuntamente.

En cuanto a los resultados obtenidos con los insecticidas, se observa en la figura 16 que los productos Clorpirifos y Thiodicarb inhibieron totalmente la germinación del hongo a las tres dosis evaluadas. Profenofos, Carbofurán y Thiodicarb produjeron una reducción significativa de la germinación con las tres dosis evaluadas. Permetrina y Carbosulfán redujeron significativamente la germinación cuando se utilizó la dosis recomendada y la mitad de la misma, pero no cuando se utilizó un cuarto de la dosis.

Con los insecticidas Spinosad y Metil-tiofanato no se presentó efecto sobre la germinación del microorganismo a las tres dosis evaluadas y en la prueba de crecimiento diametral no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), sugiriendo que estos dos productos no afectaron el desarrollo de *B. bassiana* (Bv056) y podrían utilizarse conjuntamente en el manejo integrado de las moscas blancas bajo condiciones de campo.

Con los insecticidas Carbofurán, Permetrina y Carbosulfán a pesar de observarse una disminución en la germinación de conidios, ésta alcanzó el 100% después de 48 horas de incubación del microorganismo. Además en la prueba de crecimiento diametral no se encontraron diferencias estadísticas entre el tratamiento control y los resultados obtenidos con estos insecticidas, lo cual indica que estos agroquímicos causan un retardo en el proceso de germinación pero no interfieren con su desarrollo posterior, considerándose compatibles con *B. bassiana*.

Los resultados obtenidos *in vitro* generaron un idea de la compatibilidad del hongo con los productos químicos evaluados, sin embargo, es necesario demostrar dicha compatibilidad bajo condiciones agronómicas, realizando experimentos *in planta* que

simulen las condiciones reales de contacto entre el microorganismo y los plaguicidas comúnmente usados en cada cultivo.

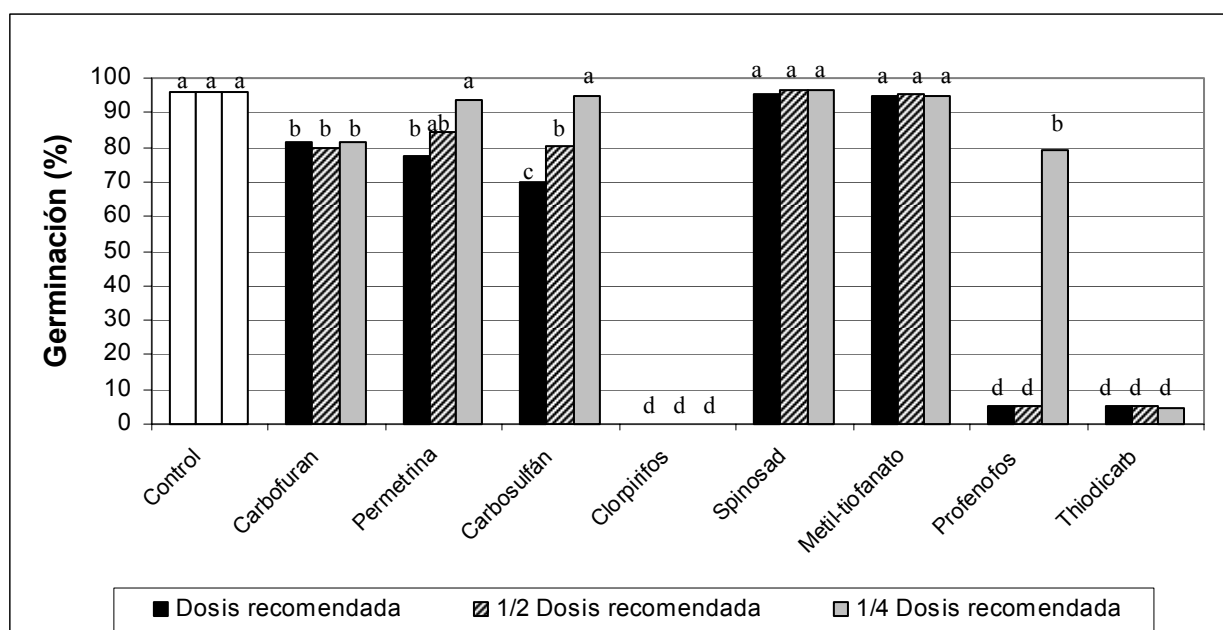


Figura 16. Efecto de diferentes insecticidas sobre la germinación de conidios de *B. bassiana* Bv056. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Con base en los resultados se propuso la siguiente tabla de compatibilidad (Tabla 8) para tener en cuenta al requerir aplicar un agroquímico en los cultivos donde se esté manejando la mosca blanca con el bioplaguicida a base de *B. bassiana*.

Tabla 8. Compatibilidad de *B. bassiana* con agroquímicos.

Agroquímico	Compatibilidad			
	Alta	Media	Incompatible	
Insecticidas	Carbofurán	X		
	Permetrina	X		
	Carbosulfán	X		
	Clorpirifos			X
	Spinosad	X		
	Metil-tiofanato	X		
	Profenofos			X
	Thiodicarb			X
	Fungicidas	Metalaxyl		X
Benlate			X	
Carboxin-Captam			X	
Pencycuron			X	
Propiconazol			X	
Pyrimethanil			X	
Carbendazim			X	
Clorotalonil			X	
Dimetomorf + Mancozeb			X	
Triforina			X	
Mancozeb			X	
Fosetil AI			X	

- ***Lecanicillium lecanii***

En la figura 17 se observa el efecto de los agroquímicos evaluados sobre la germinación del hongo a las 24 horas de incubación. Los resultados mostraron que la germinación del microorganismo no fue afectada por el insecticida hidrolato de helecho macho y los fungicidas Azufre y Oxicloruro de cobre, ya que con estos productos a las tres dosis evaluadas, se obtuvieron porcentajes de germinación superiores al 95%, los cuales no fueron estadísticamente diferentes entre sí, ni lo fueron del porcentaje de germinación del tratamiento control. El fungicida Oxicloruro de cobre inhibe la transferencia de electrones en la respiración celular y afecta el ciclo de Krebs de las hifas y el Azufre cuyo mecanismo no ha sido esclarecido hasta el momento, no disminuyó la capacidad de germinación del hongo biocontrolador, cuando éste fue cultivado en medio de cultivo suplementado con estos agroquímicos. Este resultado es interesante, ya que una de las principales limitantes del uso de hongos biocontroladores en condiciones de cultivo, es su incompatibilidad con los fungicidas que se emplean para otras plagas. Tal es el caso de los fungicidas Clorotalonil y Difenconazol, los cuales mostraron su incompatibilidad con el hongo, ya que redujeron significativamente la germinación de los conidios, no obteniéndose germinación al utilizar las tres dosis de Difenconazol o una y media dosis de Clorotalonil y alcanzando un porcentaje del 5% con un cuarto de dosis de este último. Clorotalonil actúa inhibiendo el ciclo de Krebs y Difenconazol interfiere con la síntesis de los esteroides de la membrana celular (Liñan, 1997), razón por la cual son poco selectivos y por actuar en sitios vitales para el desarrollo celular, posiblemente afectaron drásticamente los conidios de *L. lecanii*.

Los insecticidas Carbofurán y Dimetoato, también fueron incompatibles con el microorganismo, inhibiendo significativamente la germinación del mismo. Se obtuvieron germinaciones del 3%, 5% y 7% cuando se utilizaron una, media y un cuarto de la dosis comercial de Carbofurán, respectivamente y del 0%, 0% y 5% cuando se utilizaron una, media y un cuarto de la dosis comercial de Dimetoato, respectivamente. Estos productos, a pesar de no ser fungicidas y de tener como mecanismo de acción para el manejo de insectos, la inhibición de la acetil-colina (Liñan, 1997), afectaron negativamente al microorganismo, efecto podía atribuirse a la molécula activa o a los auxiliares y solventes de las formulaciones.

En cuanto al efecto de los agroquímicos sobre el crecimiento del hongo, en el tratamiento control, el crecimiento fue progresivo durante el tiempo de incubación, llegando la colonia a un diámetro de 25mm después de 11 días de incubación. Con el fungicida Oxicloruro de Cobre se observó un crecimiento lento del hongo con respecto al control el cual fue más evidente a medida que aumentó la dosis del producto. A pesar de no haberse encontrado efecto sobre la germinación, si se observó un retraso en el crecimiento, lo que sugiere que el fungicida posiblemente no afectó la formación del tubo germinal, pero sí su elongación y la formación posterior de micelio actuando como un fungistático. Con el fungicida azufre, no se observó crecimiento de las colonias a pesar de no haberse presentado efecto sobre la germinación. Con el fungicida Difenconazol, con el cual no se obtuvo germinación de conidios a las 24 horas de incubación, tampoco se presentó crecimiento de las colonias, resultado que indica que este producto es incompatible con el hongo y causó la muerte de los conidios del mismo.

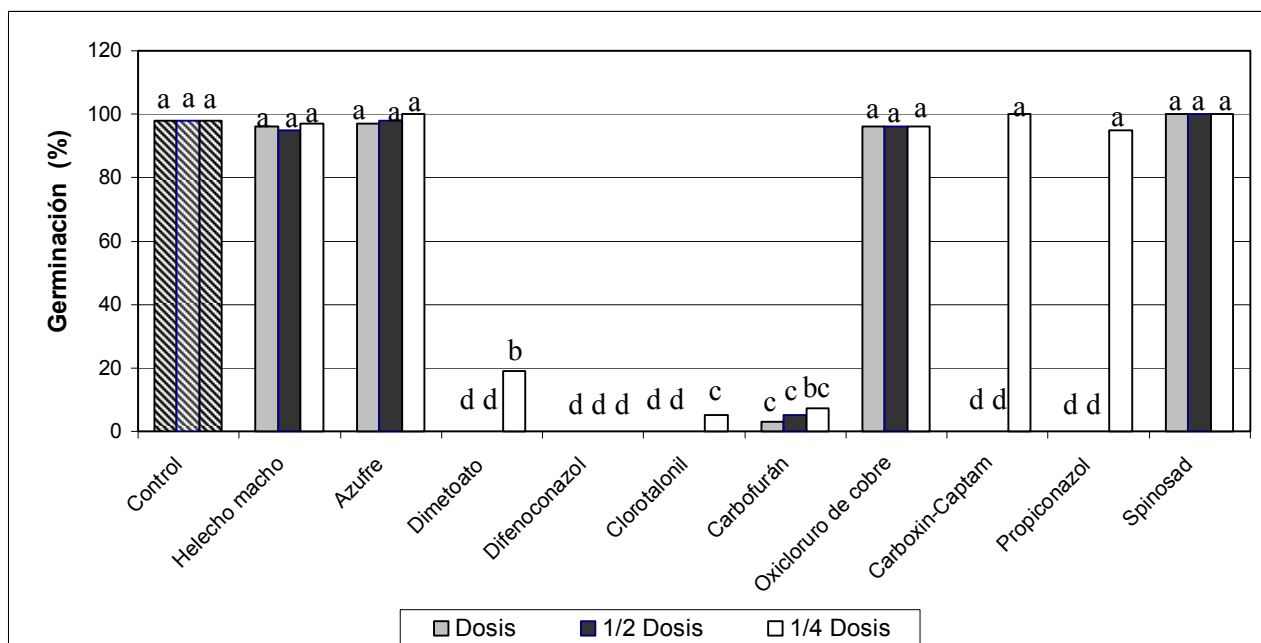


Figura 17. Efecto de diferentes agroquímicos sobre la germinación de *L. lecanii*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Los plaguicidas Dimetoato, Clorotalonil y Furadán inhibieron la germinación del hongo hasta las 24 horas de incubación, sin embargo, posteriormente se observó crecimiento de las colonias en la prueba de crecimiento diametral a excepción del tratamiento consistente en una dosis de Dimetoato, sugiriendo que posiblemente el microorganismo no perdió su viabilidad en los tratamientos restantes con estos productos, sólo requirió más de 24 horas para su germinación. Este resultado indica que los agroquímicos evaluados no mataron las células, posiblemente indujeron un estado de latencia en el microorganismo.

Tabla 9. Compatibilidad de *L. lecanii* con agroquímicos.

Agroquímico	Compatibilidad		
	Alta	Media	Incompatible
Insecticidas	Carbofurán	X	
	Dimetoato	X	
	Spinosad	X	
	Hidrolato de	X	
	Helecho macho		
Fungicidas	Oxidocloruro de Cu	X	
	Azufre		X
	Carboxin-Captam		X
	Difenconazol		X
	Propiconazol		X
	Clorotalonil		X

Estos productos presentaron al igual que el Oxidocloruro de Cobre a las tres dosis evaluadas y el Spinosad al usar la dosis completa, un efecto fungistático, ya que retrasaron el crecimiento diametral, puesto que los diámetros de la colonia fueron inferiores a los obtenidos con el tratamiento control a los mismos tiempos de evaluación. Cuando el Dimetoato se utilizó en su dosis recomendada por el fabricante y la mitad de ésta, causó la muerte de *L. lecanii*, demostrando su incompatibilidad con éste y no siendo recomendable su aplicación conjunta en un cultivo. Este mismo

efecto se observó con los fungicidas Propiconazol y Captam-Carboxin utilizados a la dosis recomendada y la mitad de ésta. El Hidrolato de helecho macho además de no afectar la germinación del microorganismo, tampoco tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo de las colonias, las cuales presentaron diámetros similares a los obtenidos con el tratamiento control para los diferentes tiempos de evaluación, confirmando su compatibilidad con el agente biocontrolador.

Los resultados obtenidos permitieron proponer la Tabla 9 para tener en cuenta al requerir aplicar un agroquímico en los cultivos donde se esté manejando la mosca blanca con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*.

- ***P. fumosoroseus*.**

Al evaluar la compatibilidad *in vitro* de *P. fumosoroseus* (Pc013) con diferentes fungicidas se observó que el hongo germinó sin presentar diferencias estadísticas con el control cuando se utilizaron los productos Carbendazim y Benomil, resultado que sugiere que dichos agroquímicos no afectaron la capacidad de germinar de este microorganismo (Tukey, $\alpha=0,05$) (Figura 18). Tampoco se observó un efecto sobre el crecimiento, ya que en la prueba de crecimiento diametral no se detectaron diferencias significativas entre los diámetros de las colonias del hongo en los diferentes días de evaluación, cuando éste fue crecido sin los fungicidas y con las tres dosis evaluadas de éstos; sugiriendo que Carbendazim y Benomil son compatibles con *P. fumosoroseus* Pc013. Estos fungicidas sistémicos de la familia de los benzimidazoles, actúan sobre la división celular inhibiendo el desarrollo de los tubos germinativos, la formación de apresorios y el crecimiento del micelio, pero no afectan la germinación. Este comportamiento podría atribuirse a que dichos fungicidas sistémicos de la familia de los benzimidazoles, actúan sobre la división celular inhibiendo el desarrollo de los tubos germinativos, la formación de apresorios y el crecimiento del micelio, pero no afectan la germinación. Sin embargo, tampoco se detectó un efecto sobre el desarrollo micelial, lo que sugiere que Carbendazim y Benomil son compatibles con *Paecilomyces* sp. Pc013.

Con los demás fungicidas evaluados se observó una inhibición significativa de la germinación del microorganismo utilizando las tres dosis evaluadas lo que indica que *P. fumosoroseus* (Pc013) es incompatible con Ditiocarbamato, Dimetomorf, Manazeb, Triforina, Oxiclورو de Cu y Pyrimethanil y no debe ser aplicado conjuntamente con dichos fungicidas o se deben considerar períodos de carencia entre las aplicaciones del hongo y los productos químicos (Figuras 19 y 20).

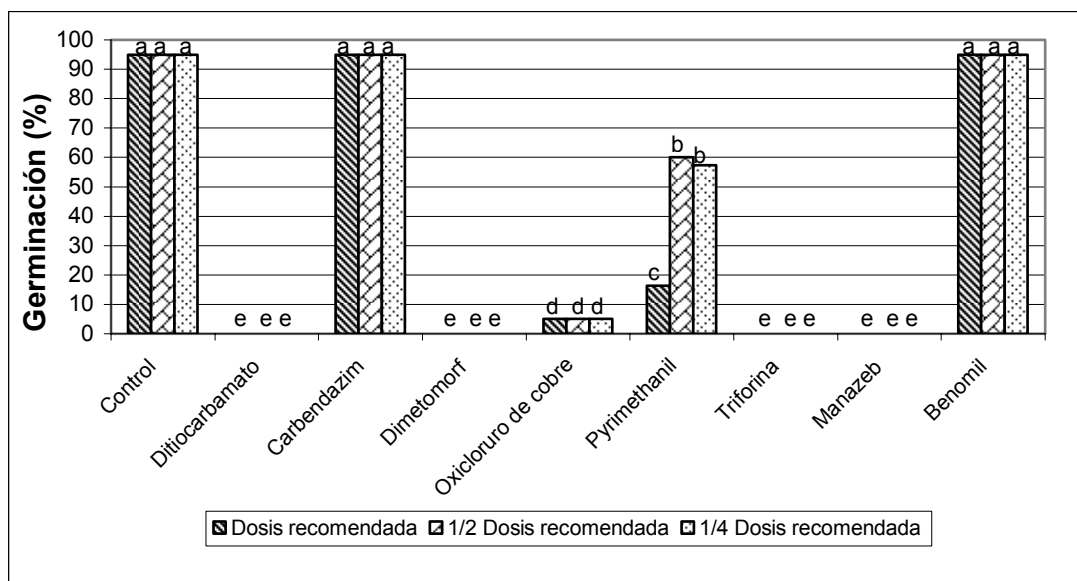


Figura 18. Efecto de diferentes fungicidas sobre la germinación de *P. fumosoroseus*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

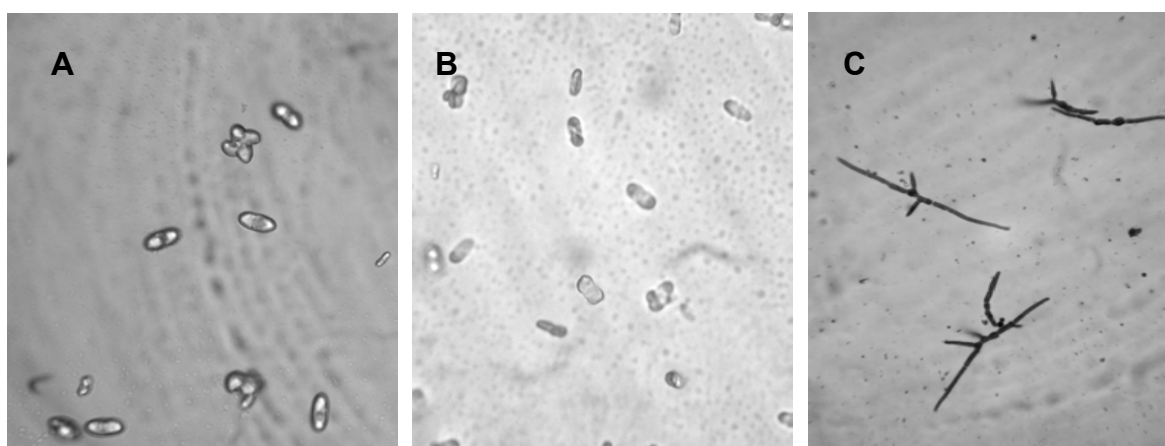


Figura 19. Germinación de *P. fumosoroseus* Pc013 después de 24 horas de incubación. A. Dosis recomendada de Manazeb, B. Dosis recomendada de Dimetomorf, C. Tratamiento control.

En la figura 23 se observan los resultados obtenidos con los insecticidas Spynosad, Clorpirifos y Metil-tiofanato. El insecticida Spynosad no afectó la germinación del microorganismo sugiriendo que es un producto compatible con el agente biocontrolador. Este hecho podría deberse al mecanismo de acción de dicho producto, el cual es un inhibidor de la acetilcolinesterasa (Liñán, 1997), enzima que no se encuentra en los hongos.

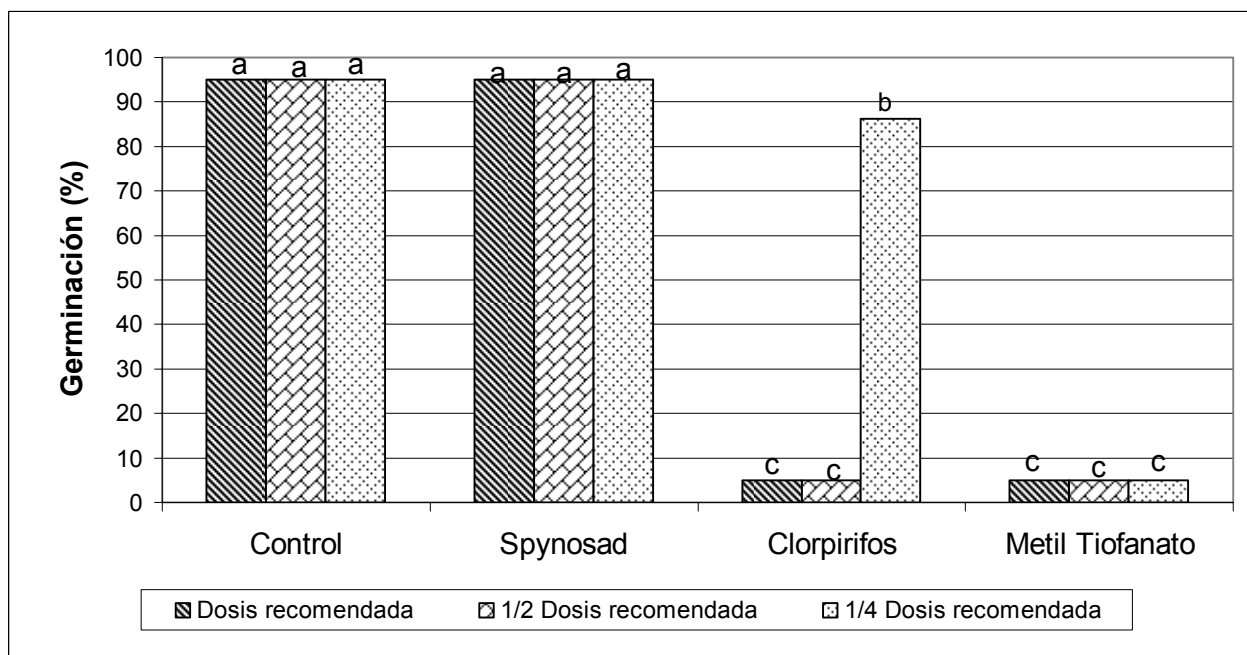


Figura 20. Efecto de diferentes insecticidas sobre la germinación de *P. fumosoroseus*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

Los insecticidas Clorpirifos y Metil-tiofanato redujeron significativamente la germinación del hongo con respecto al tratamiento control, obteniéndose germinaciones inferiores al 5% a excepción del tratamiento con un cuarto de la dosis recomendada de Clorpirifos. Estos insecticidas son inhibidores de enzimas tipo esterases en los insectos (Liñán, 1997), por lo que podrían tener efecto negativo sobre alguna de las enzimas tipo esterasa del microorganismo afectando su germinación y desarrollo. Con los resultados obtenidos se propone la Tabla 10, en la cual se presenta un resumen de la compatibilidad de *P. fumosoroseus* (Pc013) con algunos agroquímicos.

Con los resultados obtenidos se propone la Tabla 10, en la cual se presenta un resumen de la compatibilidad de *P. fumosoroseus* Pc013 con algunos agroquímicos.

Tabla 10. Compatibilidad de *P. fumosoroseus* con agroquímicos

Agroquímico	Compatibilidad		
	Alta	Media	Incompatible
Insecticidas	Clorpirifos		X
	Metiltiofanato		X
	Spinosad	X	
Fungicidas	Oxicloruro de Cu		X
	Carbendazim	X	
	Benomil	X	
	Manazeb		X
	Triforina		X
	Pyrimethanil		X
	Dimetomorf		X

2.5. Determinación de la eficacia de los preformulados bajo condiciones de laboratorio

Carlos Espinel; Lissette Torres; Laura Villamizar; Erika Grijalva; Alba Marina Cotes

Se llevó a cabo la infestación de adultos de mosca blanca en las plantas de frijol bajo las mismas condiciones mencionadas en el numeral 2.2. Una vez observadas ninfas de segundo instar se realizó la aplicación de los preformulados ajustados a la concentración de 1×10^7 conidios.mL⁻¹, mediante un microaspersor con una presión de 50 psi y un volumen de 3 ml por trifolio. Conjuntamente con los preformulados desarrollados a base de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* se evaluó el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* debido a que presentó porcentajes de infección superiores al 68% sobre *T. vaporariorum* bajo condiciones de campo, desconociéndose su efecto sobre *B. tabaci*; además, se podría contar con una alternativa de control en aquellos cultivos en los que se presenten las dos especies de mosca blanca. Los tratamientos evaluados se encuentran en la tabla 11.

Tabla 11. Tratamientos utilizados en la evaluación de la actividad biocontroladora de los preformulados a base de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* y del bioplaguicida a base de *L. lecanii* contra ninfas de *Bemisia tabaci*.

Tratamiento	Descripción
1	Conidios de <i>Lecanicillium lecanii</i> producidos en el sustrato de producción masiva
2	Conidios de <i>Beauveria bassiana</i> producidos masivamente en el sustrato seleccionado
3	Conidios de <i>P. fumosoroseus</i> producidos masivamente en el sustrato seleccionado
4	Bioplaguicida a base de <i>Lecanicillium lecanii</i> (VI 026)
5	Preformulado a base de <i>Beauveria bassiana</i> (Bv 056)
6	Preformulado a base de <i>P. fumosoroseus</i> (Pc 013)
7	Testigo absoluto (sin aplicación)

Posteriormente, al sexto día post aplicación se realizó el conteo de las ninfas totales y ninfas enfermas que presentaron cambio de coloración y pérdida de turgencia, evidenciada por un aplastamiento corporal. Al día 14 se contaron los adultos emergidos, evidenciados por las exuvias presentes. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento.

Se determinó el porcentaje de eficacia de cada uno de los tratamientos, mediante la fórmula de Schneider-Orelli y adicionalmente, a los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza y una prueba de diferencias mínimas significativas (DMS) ($\alpha=0.05$).

Al determinar la actividad biocontroladora de los productos a base de *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* y *L. lecanii*, se encontró que a los seis días post aplicación el mayor porcentaje de mortalidad lo causó el preformulado a base de *B. bassiana* con un 76.5%. La prueba DMS ($\alpha=0.05$), no determinó diferencias significativas con la mortalidad ocasionada por los conidios sin formular, que fue de 66.5%; pero sí presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Cuando se evaluó el aislamiento de *P. fumosoroseus*, se observó un comportamiento similar al obtenido con el de *B. bassiana*, debido a que el mayor porcentaje de mortalidad se presentó con los conidios formulados en comparación con los no formulados, siendo estos del 52.1% y 42.8%, respectivamente. Caso contrario ocurrió con el aislamiento de

L. lecanii, cuyos conidios sin formular produjeron una mayor mortalidad que los formulados, siendo de 56.2% y de 40.9% respectivamente (Figura 21).

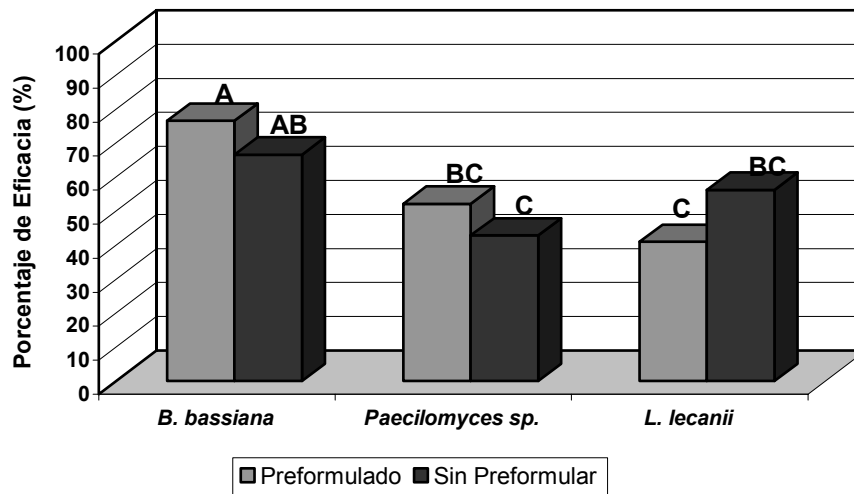


Figura 21. Efecto de los preformulados a base de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* y del insecticida microbiano a base de *L. lecanii* sobre ninfas de *B. tabaci* a los seis días de aplicación. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según DMS ($\alpha=0.05$).

A los 14 días post aplicación, no se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de eficacia producidos por el preformulado a base de *B. bassiana* y los conidios sin formular de *P. fumosoroseus* y *L. lecanii*, los cuales fueron del 96.5%, 95.2% y 92.9%, respectivamente. Adicionalmente, no se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de eficacia alcanzados por los conidios sin formular de *B. bassiana* y los preformulados a base de *P. fumosoroseus* y *L. lecanii* (Figura 22).

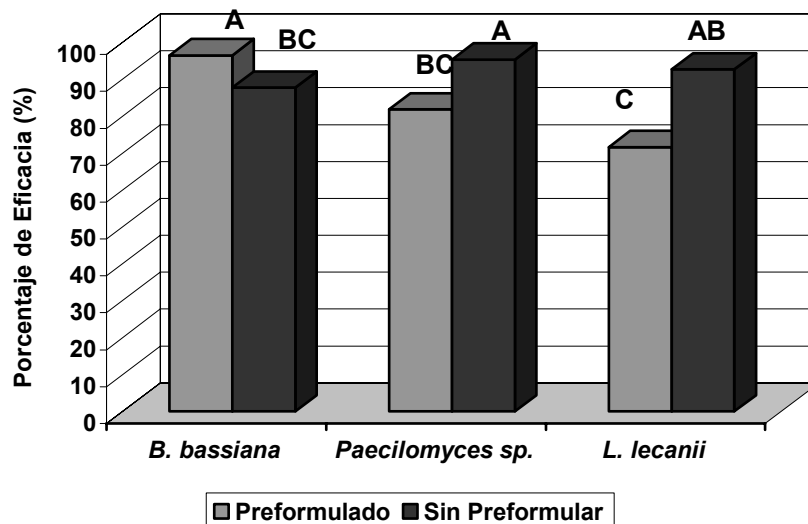


Figura 22. Efecto de los preformulados a base de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* y del insecticida microbiano a base de *L. lecanii* sobre ninfas de *B. tabaci* a los catorce días de aplicación. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según DMS ($\alpha=0.05$).

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los registrados por Espinel *et al.*, (2004) en el cual se seleccionaron estos mismos aislamientos, los porcentajes de eficacia presentaron un incremento del 3.59%, 29.1% y 45.9% para los mismos aislamientos de *P. fumosoroseus*, *B. bassiana* y *L. lecanii*, respectivamente, para el día 14 de evaluación. Esto podría estar relacionado con un efecto conferido por el medio de crecimiento del microorganismo en su actividad biocontroladora; debido a que en el ensayo de selección de aislamientos, los microorganismos se sembraron en medio de cultivo YDB (Espinel *et al.*, 2004) y en el presente estudio para la selección de los preformulados se utilizaron sustratos de producción masiva los cuales pudieron activar algunos factores determinantes en el mecanismo de acción entomopatogénica de los microorganismos. Tal es el caso de un mejoramiento en la capacidad de adherencia de las células, ya sea por modificación de la carga de la pared celular o por un aumento en la producción de mucílago que media el proceso de adhesión a la cutícula del insecto. También podrían haber aumentado la velocidad de germinación de los conidios, la producción de enzimas como quitinasas o la producción de toxinas que determinan la capacidad de virulencia del microorganismo (Lezama, 1994).

Por otra parte, se evidenció una reducción significativa entre los porcentajes de eficacia producidos por el aislamiento de *P. fumosoroseus* sin formular con respecto al preformulado, los cuales fueron del 95.29% y 81.8% respectivamente, al día 14 de la evaluación. Este mismo efecto se observó para el aislamiento de *L. lecanii*, aunque no fue significativo. En contraste, se observó un incremento significativo en los porcentajes de eficacia ocasionados por el preformulado a base del aislamiento de *B. bassiana*, en comparación con los conidios no formulados.

Cabe destacar que los preformulados se evaluaron en condiciones controladas de laboratorio, en que no hay factores ambientales que podrían influenciar negativamente la viabilidad de los entomopatógenos. Bajo las condiciones evaluadas, se encontró que los excipientes utilizados en el desarrollo del preformulado a base de *B. bassiana* podrían haber favorecido su actividad biocontroladora contra *B. tabaci*, contrario a lo sucedido con *P. fumosoroseus* y *L. lecanii*. El incremento en la mortalidad cuando el microorganismo es formulado concuerda con estudios realizados por Gómez *et al.*, (2005), quienes al evaluar virus de la granulosis formulados sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera : Gelechiidae), encontraron porcentajes de eficacia entre el 88% y 100%, resultados significativamente diferentes a los obtenidos por los aislamientos sin formular con un porcentaje de eficacia entre el 36% y 86%. En contraste, Villamizar *et al.*, (2004), al evaluar diferentes prototipos de formulación de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae), encontraron una disminución en el porcentaje eficacia hasta del 57% en comparación con este mismo microorganismo sin formular, indicando en este último caso que la formulación afectó la actividad biocontroladora del microorganismo, lo cual pudo deberse a las operaciones involucradas en el proceso o a alguno de los adyuvantes de formulación que pudieron afectar las células o interfirieron en el proceso de infección.

Por esta razón es importante evaluar los prototipos desarrollados en el presente trabajo en condiciones de campo, ya que es bajo condiciones medioambientales drásticas en que se podrían apreciar las ventajas de la formulación. Tal es el caso de una formulación desarrollada a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera : Acrididae), la cual al evaluarse bajo condiciones de campo ocasionó una mortalidad del 67.8% en comparación con los conidios del hongo sin formular con los que la mortalidad fue del 9.5% (Espinel *et al.*, 1998).

2.6 Efecto de la aplicación combinada de los preformulados sobre *B. tabaci* bajo condiciones de laboratorio

Lisette Torres; Carlos Espinel; Alba Marina Cotes

Con el fin de evaluar el efecto de la aplicación en forma combinada de los preformulados a base de *B. bassiana* (Bv) y de *P. fumosoroseus* (Pc) y del insecticida microbiano a base de *L. lecanii* (VI) sobre *B. tabaci*, se llevó a un cabo un bioensayo en el cual se evaluaron ocho tratamientos, los cuales correspondieron a la aplicación combinada de los tres agentes de control (Bv+Pc+VI), a la aplicación combinada de dos agentes de control (Bv+Pc / Bv+VI / Pc+VI) y a la aplicación individual (Bv / Pc / VI), además de un testigo absoluto, al cual no se le hizo aplicación.

La concentración utilizada fue de 1×10^7 conidios.mL⁻¹; para el caso de las mezclas, la concentración de cada microorganismo se calculó de tal manera que la concentración final de la suspensión presentara la misma concentración anteriormente mencionada.

Se tuvo un diseño experimental completamente al azar, con cinco repeticiones. La unidad experimental fue una planta de frijol y la unidad de muestreo un foliolo con ninfas de *B. tabaci*.

Se llevó el registro a los 14 días post aplicación, contando las ninfas de cuarto instar sanas y/o las exuvias de mosca blanca, las cuales evidenciaron la emergencia de adultos y por lo tanto la ausencia de infección; por sustracción se determinó el número de individuos muertos. Los datos de mortalidad se corrigieron calculando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider - Orelli. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

Los resultados obtenidos indicaron que los porcentajes de mortalidad fueron superiores al 65% en todos los tratamientos, destacándose que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en que se mezclaron los microorganismos y en los que estos se aplicaron individualmente. Sólo se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento Bv+Pc y el tratamiento Pc+VI (Figura 23).

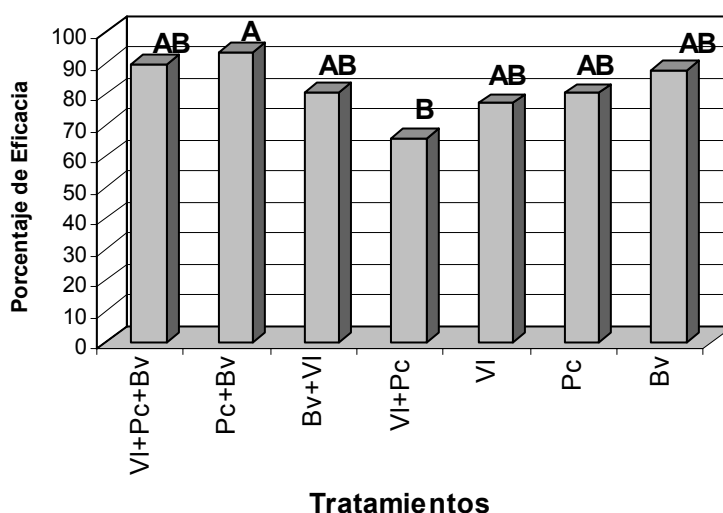


Figura 23. Efecto biocontrolador de la mezcla de preformulados a base de *Beauveria*, *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *Lecanicillium* sobre *B. tabaci*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

Esto podría indicar que no se presentó un efecto sinérgico ni antagonista en los mecanismos de acción de los microorganismos evaluados. Caso contrario ocurrió en el trabajo realizado por Torres y Cotes (1999), quienes al evaluar la actividad biocontroladora de un aislamiento de *Beauveria bassiana* y otro de *Metarhizium anisopliae* de manera combinada, sobre adultos de *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae), encontraron un porcentaje de eficacia del 100% al décimo día de la aplicación. En contraste, cuando se aplicaron estos mismos aislamientos de manera individual, se obtuvo un porcentaje de eficacia del 50% para este mismo día de evaluación. De esta manera y teniendo en cuenta que con la aplicación individual de los preformulados se pueden obtener porcentajes de eficacia similares a los obtenidos con su mezcla, además de las ventajas económicas durante el desarrollo individual de preformulados, se seleccionó el producto a base de *Paecilomyces* sp. para su aplicación en campo. El preformulado a base de *B. bassiana* no se evaluó en campo debido a que la mayoría de los productos existentes en el mercado para el control de *B. tabaci* tienen como principio activo este microorganismo.

2.7 Susceptibilidad de los estados de desarrollo de *B. tabaci* a los preformulados

Carlos Espinel; Lissette Torres; Alba Marina Cotes

Con el fin de determinar el estado de desarrollo de *B. tabaci* más susceptible a la acción de los preformulados a base de *B. bassiana* (Bv) y *P. fumosoroseus* (Pc) y del insecticida microbiano a base de *L. lecanii* (VI), se llevó a cabo la infestación de las plantas con adultos de la plaga de la misma manera descrita anteriormente.

Luego de la infestación y de observar la presencia de posturas sobre los folíolos de frijol, se llevó a cabo el conteo del número de individuos del estado de desarrollo a ser aplicado (huevo (h), primero (N1), segundo (N2), tercero (N3) y cuarto ínstar ninfal (N4)) (Figura 24). Cuando la mayoría de individuos de cada tratamiento estuvieron en el instar indicado, se realizó la aplicación de cada uno de los microorganismos mediante un microaspersor (aerógrafo) con una presión de 50 psi y un volumen de 1 mL por folíolo. En el momento en que los individuos aplicados estuvieron en el siguiente instar al aplicado se realizó el conteo y por sustracción se determinó el porcentaje de mortalidad y de eficacia mediante la fórmula de corrección de Schneider – Orelli.

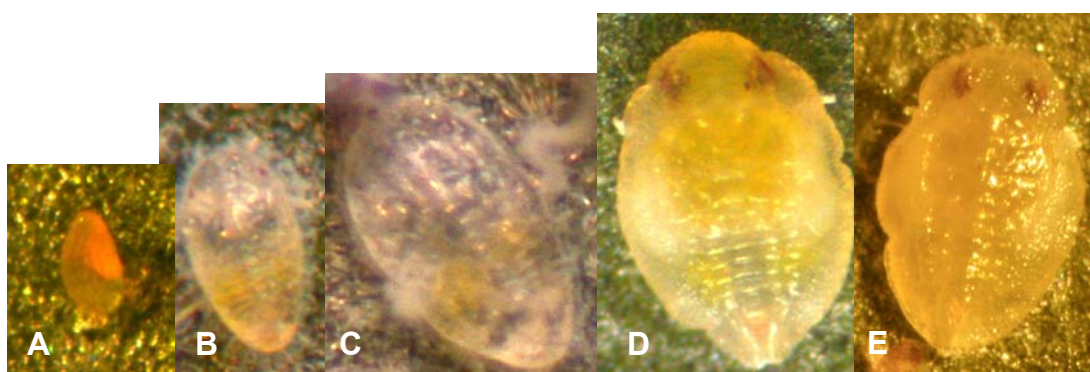


Figura 24. Estados de desarrollo de *B. tabaci*. A. Huevo; B. Primer instar ninfal; C. Segundo instar ninfal; D. Tercer instar ninfal; E. Cuarto instar ninfal. (Fotografías Espinel).

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, los cuales consistieron en la aplicación de cada uno de los microorganismos por estado de desarrollo de *B. tabaci*. La unidad experimental fue

una planta de frijol de variedad diacol-calima y la unidad de muestreo consistió en un foliolo de frijol. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de diferencias mínimas significativas ($\alpha=0.05$).

Cuando se evaluó el efecto de los dos preformulados y del insecticida microbiano sobre el estado de huevo de *B. tabaci*, se encontró que el mayor porcentaje de mortalidad fue producido por el preformulado a base de *P. fumosoroseus* siendo este del 44.3%, seguido por el preformulado a base de *B. bassiana* con 21.7%. Únicamente se presentaron diferencias significativas entre el preformulado a base de *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* (Figura 25).

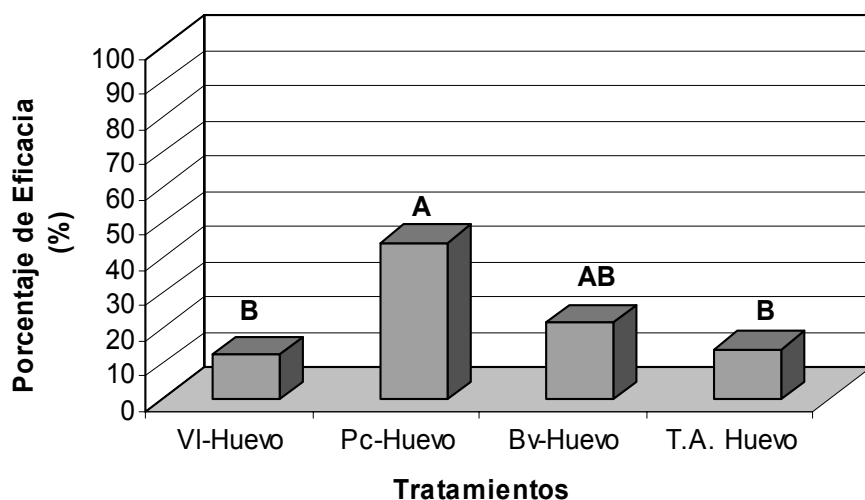


Figura 25. Efecto biocontrolador de los preformulados a base de *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* sobre el estado de huevo de *B. tabaci*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según DMS ($\alpha=0.05$).

Por otra parte, cuando se hizo la evaluación sobre el primer ínstar ninfal, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de eficacia obtenido entre los dos preformulados y el insecticida microbiano, siendo éste porcentaje superior al 58% en los tres casos (Figura 26). Sin embargo, el porcentaje de eficacia fue superior cuando se evaluaron los tres productos sobre ninfas de segundo ínstar, siendo del 72%, 80% y del 95% para el preformulado a base de *B. bassiana*, el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* y el preformulado a base de *P. fumosoroseus*, respectivamente (Figura 27).

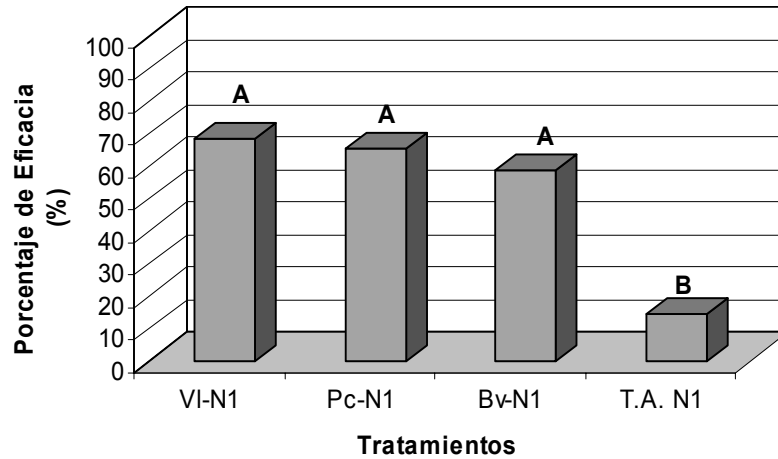


Figura 26. Efecto biocontrolador de los preformulados a base de *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* sobre primer instar ninfal de *B. tabaci*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según DMS ($\alpha=0.05$).

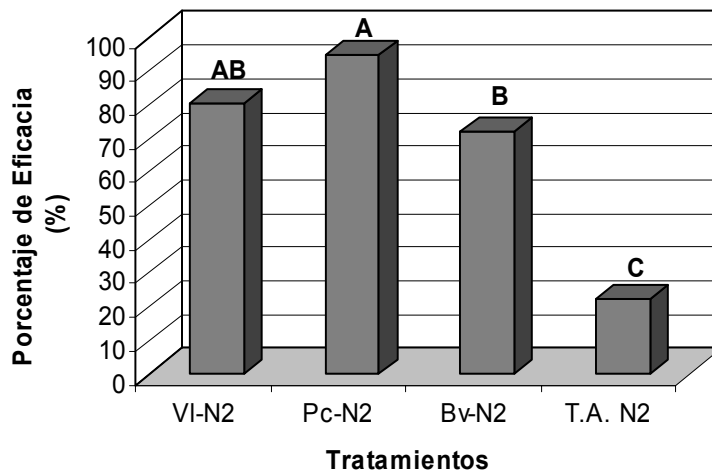


Figura 27. Efecto biocontrolador de los preformulados a base de *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* sobre segundo instar ninfal de *B. tabaci*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según DMS ($\alpha=0.05$).

Cuando se hizo la evaluación de los tres tratamientos sobre el tercer instar ninfal, el porcentaje de eficacia no superó el 54%. La mayor reducción de la mortalidad se observó con el preformulado a base de *P. fumosoroseus* siendo ésta del 33.3% (Figura 28). El comportamiento relacionado con la reducción de la mortalidad ocasionada por cada uno de los tres productos en instares avanzados, se evidenció también sobre el cuarto instar ninfal, debido a que la mortalidad no superó el 25% en este caso (Figura 29).

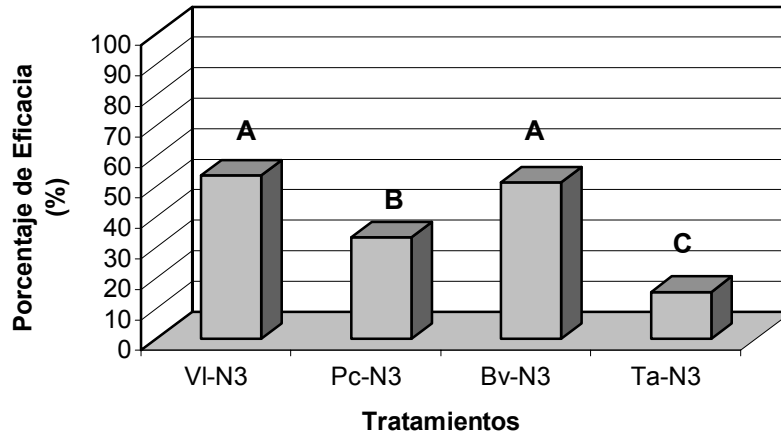


Figura 28. Efecto biocontrolador de los preformulados a base de *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* sobre tercer ínstar ninfal de *B. tabaci*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según DMS ($\alpha=0.05$).

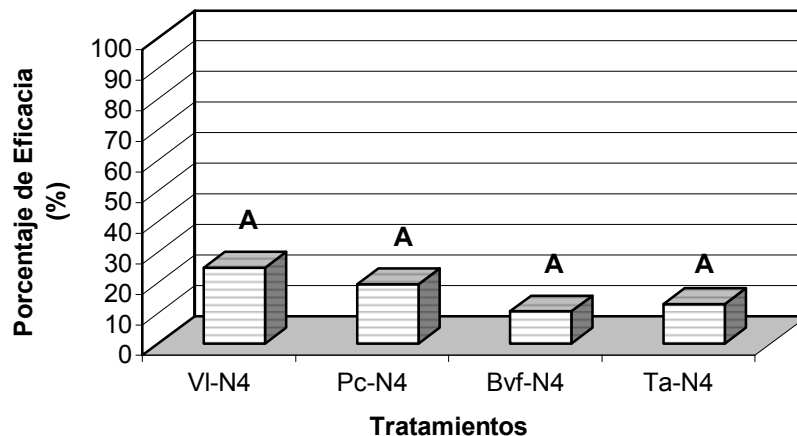


Figura 29. Efecto biocontrolador de los preformulados a base de *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* sobre cuarto ínstar ninfal de *B. tabaci*. Las barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas según DMS ($\alpha=0.05$).

Los resultados obtenidos sugieren que *B. tabaci* presenta mayor susceptibilidad a la acción de estos tres aislamientos de los hongos entomopatógenos en estudio en los estados de desarrollo iniciales, huevo, primero y segundo ínstar ninfal; resultados similares se obtuvieron por García (1996), al evaluar el efecto de 46 aislamientos de *L. lecanii* sobre estados de desarrollo inmaduros de *T. vaporariorum*, la mayor susceptibilidad la encontró sobre el segundo ínstar ninfal, mas en este estudio no evidenció efecto alguno sobre el estado de huevo. Gindin *et al.*, (2000), al evaluar 35 aislamientos de *L. lecanii* sobre huevos, ninfas de tercer y cuarto ínstar y adultos de *B. tabaci* (biotipo B), encontraron la mayor susceptibilidad sobre ninfas de primer ínstar, recién emergidas de los huevos, con una mortalidad entre el 95 y el 98%, la menor mortalidad se evidenció sobre el estado adulto con una máxima del 52.6%.

3. Eficacia de los productos bajo condiciones de campo

Carlos Espinel; María Denis Lozano; Alba Marina Cotes; Aristóbulo López-Avila

3.1. Evaluación sobre cultivo de melón

Con el propósito de evaluar el preformulado a base de *P. fumosoroseus*, seleccionado en la etapa de laboratorio y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii*, se llevó a cabo un ensayo en un cultivo de melón en el municipio de El Espinal (Departamento del Tolima), finca Canaima, ubicada a 414 msnm. En la finca se siembra predominantemente melón a nivel industrial y hay presencia de cultivos de pimentón y papaya en menor proporción (Figura 30).



Figura 30. Panorámica del bioensayo de melón en la finca Canaima (El Espinal – Tolima) (Fotografía Espinel).

La evaluación se realizó en una parcela de 800 m² que contenían 8 surcos de 90 m de largo x 1 m de ancho; a esta parcela se le denominó MIP, debido a que se realizaron una serie de prácticas biológicas y culturales para el manejo integrado del cultivo y de la plaga blanco (*B. tabaci*). Estas prácticas consistieron en una solarización del suelo cubriéndolo por 15 días con un plástico negro y manteniendo el suelo a capacidad de campo. Para lograr una solarización efectiva se debe dejar como mínimo 30 días con el recubrimiento plástico, pero debido a que el ensayo se realizó en una finca de producción industrial se tuvo que adaptar a los requerimientos de tiempo dados por los ingenieros agrónomos de campo, para lo cual únicamente se hizo una solarización durante 15 días. Otra práctica consistió en la aplicación de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningii* desarrollado por el Laboratorio de Control Biológico; esta aplicación se realizó al suelo en el momento de la siembra y posteriormente cada semana durante un mes y luego cada 15 días hasta el final del cultivo. No hubo necesidad de aplicar a nivel foliar porque según los datos suministrados por los ingenieros de campo había muy baja incidencia de patógenos foliares en estos lotes. También se incluyeron trampas amarillas de 12 x 16 cm con pegante, ubicadas cada 5 m en el perímetro de la parcela y en el interior de ésta se ubicaron en forma de “W” 10 trampas, con el fin de hacer la vigilancia de la población. Así mismo, se ubicaron trampas de 1.20 cm de largo por 80 cm de ancho, cada 200 m² para control de mosca blanca. Con el fin de utilizar la estrategia de control biológico, el lote de ocho surcos se dividió en cuatro surcos a los que se les aplicó el bioplaguicida a base de *L. lecanii* y a los cuatro restantes se les aplicó el preformulado a base de *P. fumosoroseus* teniendo como criterio la presencia de adultos de *B. tabaci* en el cultivo. Los dos productos consistieron en un polvo mojable para aplicación con bomba de espalda tradicional, la concentración aplicada de cada producto fue de 10⁷ conidios.mL⁻¹.

Paralelamente, separada por 10 surcos de la parcela MIP, se contó con una parcela de igual dimensión denominada tratamiento agricultor, el cual consistió en el manejo tradicional del cultivo según el esquema de producción industrial ejecutado por la empresa Grajales S.A. Con el fin de determinar la población de mosca blanca también se contó con las trampas amarillas en el perímetro y cinco trampas en el interior de la parcela (Figura 31).



Figura 31. A. Aplicación del bioplaguicida a base de *Trichoderma* en el trasplante. B. Aplicación semanal de *Trichoderma*. C. Ubicación de trampas amarillas. D. Aplicación de los bioplaguicidas (Fotografías Espinel).

La población de los estados inmaduros de mosca blanca se determinó mediante muestreos en dos plantas aledañas a cada una de las trampas del interior de las parcelas, tanto MIP como agricultor. De cada planta se tomaron dos hojas del tercio final del tallo, se guardaron en bolsas plásticas y se llevaron a laboratorio para hacer el conteo mediante un estereoscopio registrando el número total de huevos y ninfas en 4 cm².

La población de los estados adultos de moscas blanca se determinó mediante la ubicación de una cuadrícula móvil, contando número de individuos presentes en cinco cuadros con un área de 10 cm² (Figura 32).

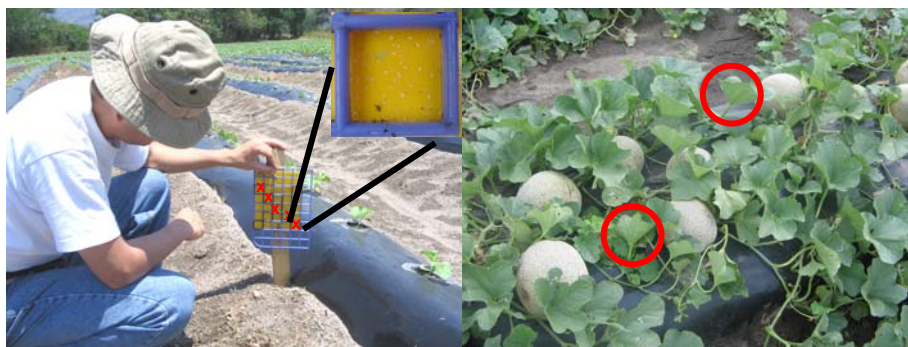


Figura 32. Muestreo de adultos y ninfas de *B. tabaci* en el cultivo de melón (Fotografías Arias).

La eficacia de los tratamientos se determinó mediante la producción total (T/Ha) al momento de la cosecha y los rendimientos obtenidos mediante el índice beneficio-costo, entendido como el ingreso bruto sobre los costos de producción (Calvo 1996).

En el melón, en total se realizaron seis aplicaciones de los productos biológicos, la población de adultos de *B. tabaci* estuvo por debajo de los seis individuos por 10 cm² y únicamente se incrementó durante las dos semanas de la cosecha, la cual estuvo en 10 individuos por 10 cm²; de igual forma, la población de huevos y ninfas en las hojas estuvo por debajo de seis individuos por 4 cm² (Figura 34). La producción total de melón en la parcela en la que se aplicó el bioplaguicida a base de *L. lecanii* fue de 29.4 toneladas por hectárea y tuvo una rentabilidad de U\$ 4.611 dólares, el tratamiento con *P. fumosoroseus* tuvo una producción de 27.3 T/Ha y una rentabilidad de U\$ 3.919 dólares, la producción del agricultor fue de 25 T/Ha y su rentabilidad de U\$ 3.212 dólares. El índice beneficio-costo fue superior en las parcelas con tratamiento MIP, el cual, para el tratamiento con *L. lecanii* fue de 1.9 y con *P. fumosoroseus* fue de 1.7, a su vez, el tratamiento agricultor tuvo un índice B/C de 1.6 (Figura 33).



Figura 33. Producción y melones cosechados en el tratamiento MIP (Fotografías Espinel).

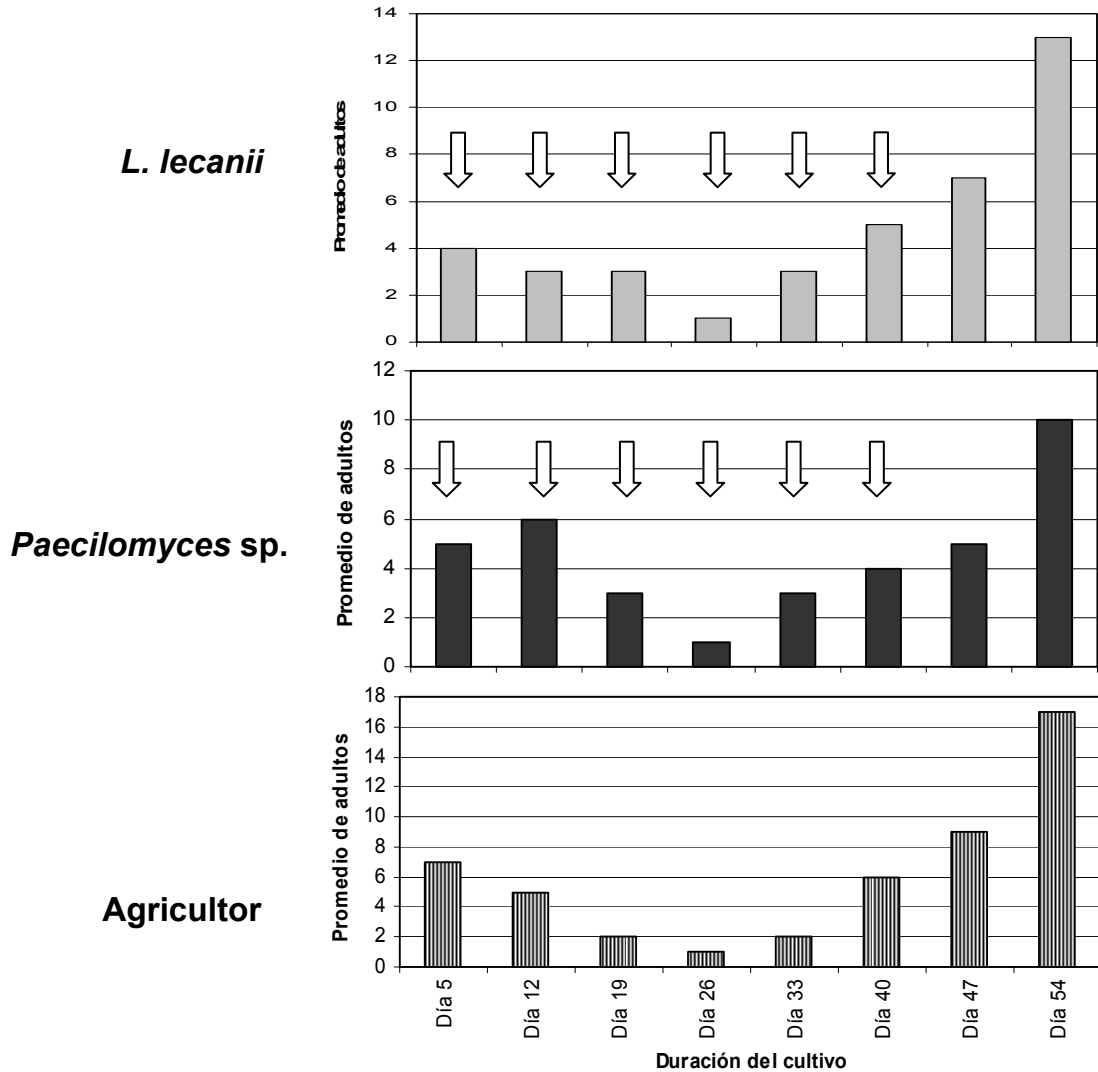


Figura 34. Presencia de adultos de *B. tabaci* en trampas amarillas en el cultivo de melón. Las flechas indican las aplicaciones de los bioplaguicidas.

3.1. Evaluación sobre cultivo de tomate

De igual forma se evaluó el preformulado a base de *P. fumosoroseus* y el insecticida microbiano a base de *L. lecanii* en un cultivo de tomate cherry, variedad Nahomy ubicado en el municipio de El Espinal (Departamento del Tolima), Hacienda El Higueron, ubicada 414 msnm. El cultivo se llevó a cabo con la tecnología empleada por el agricultor, teniendo un tratamiento al suelo, siembra individual de plantas en bolsas y un sistema de riego por goteo (Figura 35).



Figura 35. Panorámica del bioensayo de tomate en la finca El Higuérón (El Espinal – Tolima) (Fotografía Espinel).

La evaluación se realizó en un área de 816 m², la cual se dividió en dos parcelas que contenían 6 surcos de 45 m de largo cada una; una parcela de 6 surcos se denominó MIP debido a que se realizaron una serie de prácticas biológicas y culturales para el manejo integrado del cultivo y de la plaga blanco (*B. tabaci*) y los otros seis surcos se denominaron parcela agricultor. Estas prácticas consistieron en la aplicación de un bioplaguicida a base de *T. koningii* desarrollado por el laboratorio de control biológico. Se realizaron dos aplicaciones en semillero, la primera se hizo dos días antes de la siembra y la segunda a los 15 días después de la siembra. Posteriormente, se hizo una aplicación al suelo al momento del transplante y luego cada semana durante un mes y a partir de allí, cada 15 días hasta el final del cultivo, aplicado al follaje (Figura 36). Como en el caso del cultivo de melón, se incluyeron trampas amarillas de 12 x 16 cm con pegante, ubicadas cada 5 m en el perímetro y en el interior se ubicaron en forma de “W” 10 trampas, con el fin de hacer la vigilancia de la población. Otra estrategia consistió en la eliminación de hojas bajas en las plantas con el propósito de reducir la presión de población de instares ninfales finales. Con el fin de utilizar la estrategia de control biológico, el lote de ocho surcos se dividió en cuatro surcos a los que se les aplicó el bioplaguicida a base de *L. lecanii* y a los cuatro restantes se les aplicó el preformulado a base de *P. fumosoroseus* teniendo como criterio la presencia de adultos de *B. tabaci* en el cultivo. Los dos productos consistieron en un polvo mojable para aplicación con bomba de espalda tradicional.



Figura 36. A. Aplicación del bioplaguicida a base de *Trichoderma* en semillero. B. Ubicación de trampas en el invernadero. C. Aplicación de los bioplaguicidas (Fotografías Espinel).

La determinación de la presencia de adultos y de estados inmaduros se realizó de la misma forma que en el cultivo de melón, teniendo en cuenta de tomar los foliolos del último tercio de la planta (Figura 37).



Figura 37. A. Trampa amarilla. B. Muestreo de foliolos para observación de estados inmaduros (Fotografías Espinel).

La población de adultos se mantuvo por debajo de 30 individuos por 10 cm² hasta los 82 días después del transplante, luego tuvo un incremento hasta 65 a 70 individuos y se redujo hasta estas de nuevo por debajo de 30 individuos en el día 111 (Figura 38). A pesar de la mayor presencia de adultos, la población de estados inmaduros fue baja, siendo inferior a los cuatro individuos por 4 cm². La producción total de tomate cherry en la parcela en la que se aplicó el bioplaguicida a base de *L. lecanii* fue de 13.8 T/Ha y tuvo una rentabilidad de U\$ 7.142 dólares, el tratamiento con *P. fumosoroseus* tuvo una producción de 14.7 T/Ha y una rentabilidad de U\$ 7.535 dólares, la producción del agricultor fue de 13.6 T/Ha y su rentabilidad de U\$ 6.246 dólares. De igual forma el índice beneficio-costo fue superior en las parcelas con tratamiento MIP, el cual, para el tratamiento con *P. fumosoroseus* fue de 3.7 y con *L. lecanii* fue de 3.5 y el tratamiento agricultor tuvo un índice B/C de 2.8 (Figura 39).



Figura 38. Cosecha de tomate cherry (Fotografías Espinel).

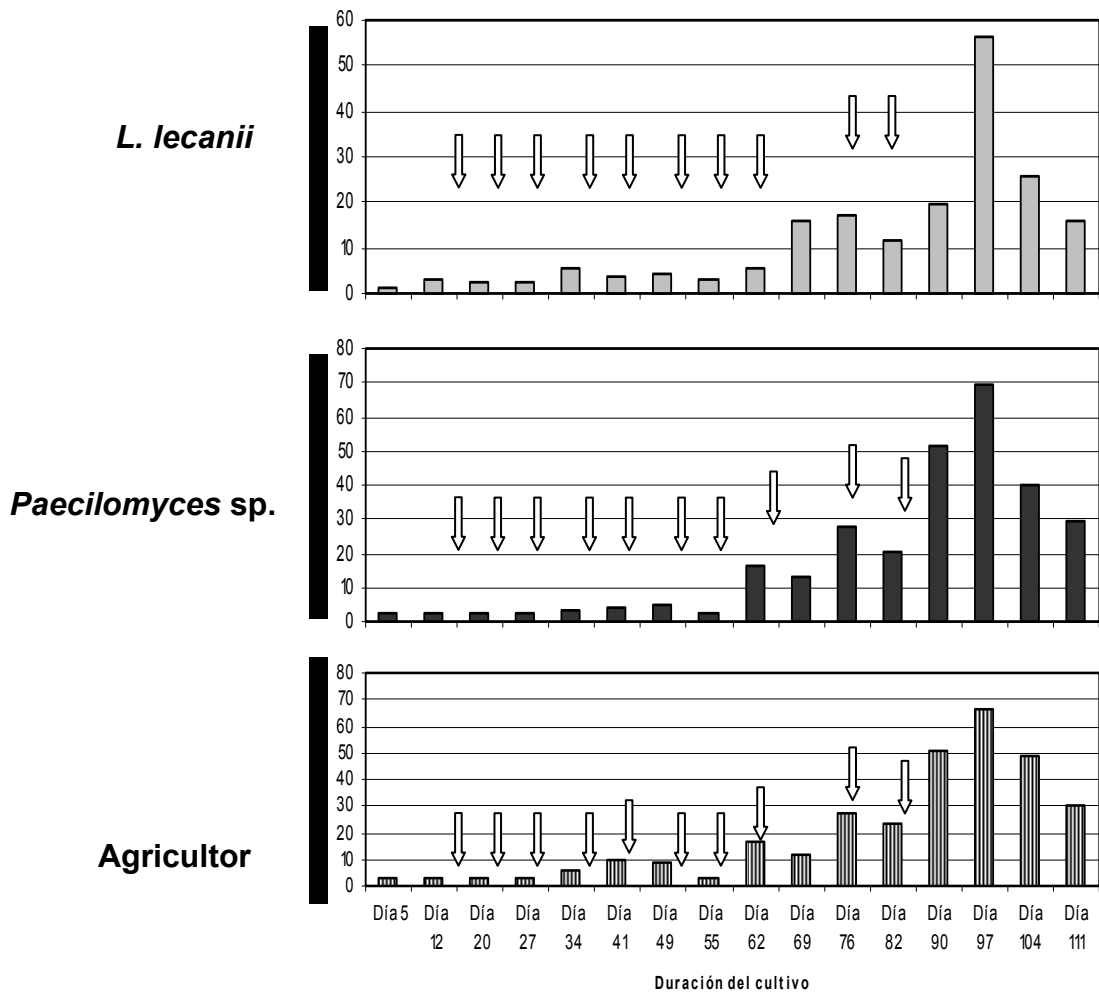


Figura 39. Presencia de adultos de *B. tabaci* en trampas amarillas en el cultivo de tomate cherry. Las flechas indican las aplicaciones de los bioplaguicidas.

Los resultados de producción obtenidos tanto del cultivo de melón como de tomate, permiten concluir que tanto el prototipo de bioplaguicida a base de *P. fumosoroseus* como el bioplaguicida a base de *L. lecanii* son una estrategia de control promisorio bajo el esquema de manejo integrado de la plaga, propuesto anteriormente. Lo cual constituiría una ventaja competitiva en el mercado al tener productos con menor carga y residuos de agroquímicos.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Como se puede observar en el documento, se desarrollaron dos prototipos de bioplaguicida a base de *Beauveria bassiana* y de *P. fumosoroseus* altamente promisorios para el control de *B. tabaci*. Así mismo, se demostró la eficacia de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* previamente desarrollado por CORPOICA. Sin embargo, dada la complejidad de este insecto plaga, es importante continuar con las investigaciones que permitan incorporar estos productos a diferentes sistemas de producción dentro de esquemas de manejo integrado de cultivos. Por lo tanto se proponen las siguientes acciones:

1. Registrar y producir comercialmente el bioplaguicida a base de *L. lecanii* para que esté disponible para los agricultores.
2. Optimizar los prototipos de bioplaguicida desarrollados en el presente estudio, y escalar su producción para evaluarlos en diferentes zonas y cultivos.
3. Realizar estudios para determinar la vida útil de estos bioplaguicidas y seleccionar sustancias o procedimientos que permitan una rápida germinación de los conidios y actividad biocontroladora de los productos luego de su aplicación.
4. Determinar las formas y frecuencias de aplicación más adecuadas para estos productos en cada cultivo evaluado.
5. Realizar estudios toxicológicos y ecotoxicológicos con estos bioplaguicidas.
6. Determinar los sistemas de rotación más eficientes en el control del insecto de los tres bioplaguicidas.
7. Generar otras estrategias complementarias para el manejo de este insecto y evaluar su compatibilidad con los bioplaguicidas desarrollados.
8. Generar sistemas de manejo integrado del cultivo que involucren sistemas de fertilización, de riego y de control de fitopatógenos y de otros insectos que junto con *B. tabaci* afectan a un cultivo determinado.
9. Realizar frecuentemente en diferentes zonas estudios que permitan detectar la resistencia del insecto a los insecticidas utilizados para su control y generar con los productos ambientalmente más amigables sistemas de rotación de los bioplaguicidas con productos químicos que ejerzan diferentes modos de acción contra *B. tabaci*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADÍAS, M.; TEIXIDO, N.; USALL, J.; BENABARRE, A.; VIÑAS, I. 2001. Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. J. Food Protection 64 (6) 856-861.

ABADÍAS, M.; TEIXIDO, N.; USALL, J.; VIÑAS, I. 2003. Liquid Formulation of the Postharvest Biocontrol Agent *Candida sake* CPA-1 in Isotonic Solutions. Phytopathology. 93: 436 – 442.

BUITRAGO, N.; CARDONA, C.; ACOSTA, A. 1994. Niveles de resistencia a insecticidas en *Trialeurodes vaporariorum* (westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), plaga del fríjol común. Revista Colombiana de Entomología 20 (2): 109-114

CALVO, G. 1996. Análisis de datos económicos. En: Metodología para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. Luko Hilje, ed. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Pp.104-111.

CARDONA, C.; RENDÓN, F.; GARCÍA, J.; LÓPEZ-ÁVILA, A.; BUENO, J. M.; RAMÍREZ, J. 2001. Resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. Revista Colombiana de Entomología 27 (1-2) : 33-38

CIBA – GEIGY. 1978. Como realizar un bioensayo. Manual de Ensayos de Campo. pp. 2 – 10.

DEVOTTO L.; GERDING M. 2003. Respuesta de dos aislamientos chilenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin a la adición de un protector solar. Agricultura Técnica (Chile). 63(4):339-346 (Octubre-Diciembre).

ESPINEL, C.; EBRATT, E.; COTES, A. 1998. Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera : Acrididae). Revista Colombiana de Entomología 24 (1-2): 1-6

ESPINEL, C.; TORRES, L.; GARCÍA, J.; GONZÁLEZ, V.; COTES, A. 2004. Aislamiento y selección de hongos entomopatógenos para el control de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). En: Resúmenes del XXXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. p.p 99.

ESPINEL, C.; TORRES, L.; GONZÁLEZ, V.; COTES, A. 2006a. Selección de hongos entomopatógenos para el control de *Bemisia tabaci*. Revista de Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. En prensa.

ESPINEL, C.; TORRES, L.; GRIJALBA, E.; VILLAMIZAR, L.; COTES, A. 2006b. Desarrollo y evaluación de preformulados para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de laboratorio. Revista Colombiana de Entomología. En prensa.

FARIA, M.; WRAIGHT, S. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop protection 20: 767 – 778.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R., SMITS, N.; COUSTERE, C., ITIER, B. 1997. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near- ultraviolet (UV-B and UV-A) and visible radiation). Journal Invertebrates Pathology. 69: 70 – 78.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. 1995. .DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

GARCÍA, J. 1996. Evaluación de cepas nativas de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas en el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Trabajo de grado Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. 121 p.

GARZÓN, I. 2004. Evaluación de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* aplicado con un equipo neumático, para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Trabajo de grado. Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. 48 p.

GERLING, D. 2002. Una reinterpretación sobre las moscas blancas. Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 63: 13-21.

GINDIN, G.; GESCHTOVT, N.; RACCAH, B.; BARASH, I. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica* 28(3): 1-11. (on line). <http://207.57.17.79/phyto/pdfs/2000/issue3/gind2.pdf>

GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 1996. Estudio tecnológico para la producción masiva y preformulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium* sp. para el control biológico de la langosta de los llanos orientales. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. p. 105.

GÓMEZ, J.; VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; COTES, A. 2005. Evaluación de tres virus de la granulosis nativos aislados a partir de *Tecia solanivora* en el departamento de Cundinamarca. En: Resúmenes del XXXII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Ibagué. p.p 81.

GUTIÉRREZ, C. 2001. Control de calidad de un preformulado a base de levaduras para el control de la pudrición blanda del tomate en postcosecha. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Cundinamarca. P. 64

HERRERA, F.; CARBALLO, M.; SHANNON, P. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci* en el laboratorio. <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip54/art6-a.htm>
Fecha última revisión: 15 Febrero 2006.

HILJE, L. 1996. Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 150 p.

IMSHENETSKY, A.; LYSENKO, S.; LACH, S. 1979. Microorganisms of the upper layer of the atmosphere and the protective role of their cell pigments. *Life Sci. Space Res.* 17 (1979) 105- 30.

INFOAGRO. 2004. Métodos de control de la mosca blanca *Bemisia tabaci*. <http://www.infoagro.com/abonos/moscablanca.htm>
Fecha última revisión: 20 Enero 2006.

JIMÉNEZ, L. 2002. Evaluación de técnicas de aplicación de un bioplaguicida a base de *Verticillium lecanii*, para el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes*

vaporariorum en un cultivo de habichuela. Trabajo de grado Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. 83 p.

LEZAMA, R. 1994. Patogenicidad de hongos parásitos de insectos. En: I Seminario Patología. FCBA. U de Tecomán, Colima. pp. 47-69

LÓPEZ - ÁVILA, A. 1994. Avance y perspectivas del control biológico de las moscas blancas. En: Memorias del seminario Manejo Integrado de Mosca Blanca y Técnicas de Aplicación de Pesticidas. Socolen. Comité Regional de Cundinamarca. Bogotá. pp. 42-53

LÓPEZ-ÁVILA, A.; GARCÍA, J. 2000. Manejo integrado sostenible de Moscas Blancas como plagas y vectores de virus en los trópicos. 1. Reconocimiento, diagnóstico y caracterización de moscas blancas como plagas en el trópico alto de América Latina. Informe final. Convenio Danida- Corpoica. CIAT. 43 p.

LÓPEZ-ÁVILA, A.; CARDONA, C.; GARCÍA, J.; RENDÓN, F.; HERNÁNDEZ, P. 2001. Reconocimiento e identificación de enemigos naturales de las moscas blancas (Homoptera:Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. Revista Colombiana de Entomología (Colombia) 27 (2-3):137-141.

MARGALITH, P. 1992. Pigment microbiology. Chapman & may. London, UK. Pp. 5 – 31.

MARIÑO, P.; VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; COTES, A. 2004. Caracterización de preformulados granulados a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Ancognatha scarabeoides*. Revista Colombiana de Entomología. , v.30, p.43 - 49.

McAUSLANE, H. 2000. Sweet potato whitefly B Biotype or silverleaf whitefly www.nysaea.cornell.edu/ent/biocontrol/parasitoids/whitefly. Fecha última revisión: 20 Enero 2006.

MILLER, CH.; RANCEL, D.; BRAGA, G.; FLINT, S.; KWON, S.; MESSIAS, C.; ROBERTS, D.; ANDERSON, A. 2004 Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. Journal Microbiology. 50: 41 – 49.

MORALES, L. 1993 Formulación de bioinsecticidas en biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de México. México. p. 86 - 89

NICHOLSON, W.; SCHUERGER, A.; SETLOW, P. 2005. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. Mutation Research. 571:249-264.

POURZAND; TYRELL. 1999. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar uv radiation. Photochemistry – Photobiology. 70: 380 - 390

PRADA, P.; RODRÍGUEZ, A.; CARDONA, C. 1994. Evaluación de un sistema de manejo integrado de plagas en habichuela en la provincia del Sumapáz. En: Seminario Manejo Integrado de Mosca Blanca y Técnicas de Aplicación de Plaguicidas. Bogotá, CORPOICA (ja:1994: Bogotá) pp.42

QUINTERO, C.; CARDONA, C.; RAMÍREZ, D., JIMÉNEZ, N. 1998. Primer registro del biotipo B de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 24 (1-2): 23-28

QUINTERO, C.; RENDÓN, F.; GARCÍA, J.; CARDONA, C.; LÓPEZ-ÁVILA, A.; HERNÁNDEZ, P. 2001. Especies y biotipos de moscas blancas (Homóptera: Aleyrodidae) en cultivos semestrales de Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*. 27(1-2): 27-31.

RENDÓN, F.; CARDONA, C.; BUENO, J. 2001. Pérdidas causadas por *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) en habichuela en el Valle del Cauca. *Revista Colombiana de Entomología*. 27 (1): 39-43.

RODRÍGUEZ, I.; CARDONA, C. 2001. Problemática de *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae) como plagas de cultivos semestrales en el Valle de Cauca. *Revista Colombiana de Entomología* 27 (1-2): 21-26

SABARATNAM, S.; TRAQUAIR, J. 2002. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in Tomato Transplants. *Biological Control*. 23 : 245 – 253.

TORRES, L.; COTES, A. 1999. Evaluación de la actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos contra *P. vorax* (Coleoptera: Curculionidae) mediante su utilización individual y combinada. *Revista de la Sociedad Colombiana de Entomología*. Vol.25 Nos. 3-4, p.121 – 129.

VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, G. M.; OSORIO, V. E.; BUSTILLO, A. E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Boletín Técnico No 17*. Cenicafé. Chinchiná, caldas, Colombia. p. 7-25.

VIDAL, C.; LACEY, L.; FARGUES, J. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *J. Econ. Entomol.* 90: 765 – 772.

VILLAMIZAR, L.; COTES, A.; GÓMEZ, M. 1997. Producción masiva y preformulación de *Metarhizium* spp. (Metschnikov) para el control biológico de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* (Rhen). *Revista Colombiana de Entomología*. v.23, n.3-4: 119 - 124

VILLAMIZAR, L.; ARRIERO, C.; BOSA, F.; COTES, A. 2004. Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología* 30 (1) : 99-105

WRAIGHT, S.; CARRUTHERS, R.; BRADLEY, C.; JARONSKI, S.; LACEY, L.; WOOD, P.; GALINI – WHAIGHT, S. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly *Bemisia argentifolli*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 217 – 226.