CARACTERIZACIÓN DE UN PROTOTIPO DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* (Th003) Y EL GRANULOVIRUS DE *Phthorimaea operculella* PARA LA PROTECCIÓN DE SEMILLA DE PAPA EN ALMACENAMIENTO.

ADRIANA MARCELA SANTOS DÍAZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar por el título de

Microbióloga Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTÁ, D.C. COLOMBIA

FEBRERO DE 2009

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velá por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

CARACTERIZACIÓN DE UN PROTOTIPO DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* (Th003) Y EL GRANULOVIRUS DE *Phthorimaea operculella* PARA LA PROTECCIÓN DE SEMILLA DE PAPA EN ALMACENAMIENTO

ADRIANA MARCELA SANTOS DÍAZ

Laura Fernanda Villamizar D.Sc.
Directora

Magda Xiomara García M.Sc.
Codirectora

Camilo Rubén Beltrán B.Sc
Asesor

Erika Grijalba. Q.F
Jurado

José Salvador Montaña M.Sc.
Jurado

CARACTERIZACIÓN DE UN PROTOTIPO DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* (Th003) Y EL GRANULOVIRUS DE *Phthorimaea operculella* PARA LA PROTECCIÓN DE SEMILLA DE PAPA EN ALMACENAMIENTO

ADRIANA MARCELA SANTOS DÍAZ

Ingrid Schuler. Ph.D	**Janeth Arías M.Sc.**
Decana Académica **Facultad de Ciencias**	**Directora de Carreras** **Microbiologías**

Al creador de todo lo que existe,

A mis padres y hermano, por apoyarme y guiarme y
por quienes estoy donde estoy,

A mis amigas, Mª Fernanda, Lorena y Katherine

por permitirme conocerlas y
compartir nuestras vidas

AGRADECIMIENTOS

A Alba Marina Cotes Ph.D. Directora del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica-Tibaitatá, por darme la oportunidad de ingresar a su excelente grupo de trabajo.

A Laura Fernanda Villamizar D.Sc. Investigadora del Laboratorio de Control Biológico y directora de este trabajo, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por sus invaluables enseñanzas, su paciencia, su constante apoyo y sobre todo por su aporte en mi formación personal y profesional.

A Magda Xiomara García M.Sc. Investigadora del Laboratorio de Control Biológico y codirectora de este trabajo, por su inmensa colaboración y apoyo incondicional en todo momento.

A Camilo Rubén Beltrán B.Sc. Investigador del Laboratorio de Control Biológico y asesor de este trabajo, por su incondicional ayuda, su colaboración y por brindarme sus conocimientos.

A los auxiliares del Laboratorio de Control Biológico por su colaboración, entusiasmo, apoyo incondicional y gran amistad.

A los investigadores del Laboratorio de Control Biológico por sus enseñanzas y aportes a este trabajo.

A todos los estudiantes del Laboratorio de Control Biológico, Andrea, Martha, Isabel, Paula y Lina, por brindarme su amistad, por apoyarme, escucharme y por poder compartir un poco de nuestras vidas.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 20

2. MARCO TEÓRICO 23

2.1. El cultivo de papa en Colombia (Tubérculo - semilla). 23

2.1.1. Principales enfermedades de la papa en Colombia. 25

2.2. *Rhizoctonia solani* Kühn. 25

2.2.1. Clasificación taxonómica y generalidades de *Rhizoctonia solani* 25

2.2.2. Síntomas. 26

2.2.3 Diseminación. 27

2.2.4. Ciclo de la enfermedad 27

2.2.5. Métodos de prevención y control. 29

2.2.6. Control biológico. 29

2.3. *Trichoderma* como agente biocontrolador. 30

2.3.1. Clasificación taxonómica y generalidades de *T. koningiopsis.* 30

2.3.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp. en control biológico. 31

2.3.3. Bioplaguicidas a base de *Trichoderma* sp. 32

2.4. *Tecia solanivora* (Polilla guatemalteca). 34

2.4.1. Ciclo de vida de *Tecia solanivora.* 35

2.4.2. Daños producidos en el cultivo de papa. 38

2.4.3. Métodos de prevención y control. 38

2.4.4. Control biológico. 39

2.5 Baculovirus 40

2.5.1. El género granulovirus 40

2.5.2. Proceso de Infección 41

2.5.3 Sintomatología 43

2.6. Bioplaguicidas. 44

2.6.1. Preformulación y formulación 44

2.7. Formulaciones sólidas. 45

2.7.1. Granulados. 45

2.7.2. Polvos. 46

2.8. Características físico-químicas de los polvos. 46

2.8.1. Porosidad. 47

2.8.2. Fluidez. 47

2.8.3. Humedad. 48
2.8.4. Voluminosidad. 48
2.8.5. pH. 48
2.8.6. Tamaño de partícula. 49
2.9. Estabilidad en almacenamiento. 50
2.10. Control de calidad de productos a base de hongos y virus como agentes de biocontrol. 52
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA 56
4. JUSTIFICACIÓN 56
5. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS 59
5.1. OBJETIVO GENERAL 59
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 59
6. MATERIALES Y MÉTODOS 60
6.1. Producción de principio activo *Trichoderma koningiopsis* 60
6.1.1. Microorganismo y medio de cultivo 60
6.1.2. Producción de *Trichoderma koningiopsis* Th003 60
6.1.3. Elaboración de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* 61
6.2. Elaboración del bioplaguicida a base de Baculovirus 62
6.3. Elaboración del prototipo de bioplaguicida a base de conidios de *T. koningiopsis* y Baculovirus. 63
6.4. Caracterización microbiológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus. 63
6.4.1. Concentración del principio activo *T. koningiopsis.* 63
6.4.2. Germinación del principio activo *T. koningiopsis*. 64
6.4.3. Contenido de contaminantes 64
6.5. Caracterización físico-química del prototipo de bioplaguicida a base *T. koningiopsis* y Baculovirus. 65
6.5.1. Porosidad 65
6.5.2. Fluidez Estática. 66
6.5.3. Humedad. 66
6.5.4. Voluminosidad 67
6.5.5. pH 67
6.5.6. Tamaño de partícula 67
6.6. Actividad Biocontroladora 68

6.6.1. Prueba de patogenicidad en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta.* 68
6.6.2. Prueba de eficacia contra *R. solani* en condiciones *in planta* 70
6.6.3. Prueba de eficacia contra *R. solani* en condiciones de almacenamiento... 71
6.7.2. Prueba de eficacia contra *Tecia solanivora* 72
6.8. Estabilidad del bioplaguicida mixto en condiciones de almacenamiento… 73
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 75
7.1. Desarrollo del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *Trichoderma koningiopsis* y Baculovirus. 75
7.1.1. Elaboración del producto a base de *T. koningiopsis*..... 75
7.1.2. Elaboración del bioplaguicida a base de *Baculovirus.* 77
7.1.3. Elaboración del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *Trichoderma koningiopsis* y Baculovirus. 78
7.2. Caracterización microbiológica del prototipo de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* y Baculovirus. 79
7.2.1. Concentración del principio activo *T. koningiopsis* 79
7.2.2. Germinación del principio activo *T. koningiopsis* 79
7.2.3. Contenido de contaminantes en el prototipo de bioplaguicida mixto. 80
7.3. Caracterización fisicoquímica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus 81
7.3.1. Porosidad..... 81
7.3.2. Fluidez Estática..... 82
7.3.3. Humedad 83
7.3.4. Voluminosidad 85
7.3.5. pH..... 87
7.3.6. Tamaño de Partícula..... 89
7.4. Caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus. 92
7.4.1. Prueba de patogenicidad en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*..... 92
7.4.2. Eficacia frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones *in planta*..... 98
7.4.3. Eficacia frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento 101
7.4.4. Eficacia frente a *Tecia solanivora* bajo condiciones de almacenamiento. 104

7.5. Estabilidad microbiológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus bajo condiciones de almacenamiento..... 105

7.5.1. Concentración. 105

7.5.2. Germinación..... 117

7.5.3. Contenido de Contaminantes..... 126

7.6. Estabilidad físicoquímica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus bajo condiciones de almacenamiento..... 133

7.6.1. Porosidad..... 133

7.6.2. Fluidez Estática..... 135

7.6.3. Humedad 138

7.6.4. Voluminosidad 140

7.6.5. pH 143

7.6.6. Tamaño de partícula 146

7.7. Estabilidad biológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y *Baculovirus* bajo condiciones de almacenamiento..... 148

7.7.1. Estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta*..... 149

7.7.2. Estabilidad del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento. 156

7.7.3. Estabilidad de la eficacia del bioplaguicida mixto para el control de *Tecia solanivora* en condiciones de almacenamiento..... 161

8. CONCLUSIONES..... 167

9. RECOMENDACIONES..... 168

10. REFERENCIAS..... 169

11. ANEXOS 185

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones comerciales de *Trichoderma* sp. (Copping, 2001)..... 33
Tabla 2. Productos comerciales a base de *Trichoderma* registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario. 34
Tabla 3. Tratamientos de la prueba de patogenicidad: 69
Tabla 4. Tratamientos de la prueba de eficacia *in planta:* 70
Tabla 5. Tratamientos evaluaos en la prueba de eficacia con *R. solani*..... 72
Tabla 6. Tratamientos evaluados en la prueba de eficacia con *T. solanivora* 73
Tabla 7. Características físico-químicas del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *Trichoderma koningiopsis* y *Baculovirus* 86
Tabla 8. Porcentaje de porosidad del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a las temperaturas de almacenamiento 8ºC, 18ºC y 28ºC. 134
Tabla 9. Fluidez estática expresada como ángulo de reposo (º) del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC. 136
Tabla 10. Porcentaje de humedad del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a las temperaturas de almacenamiento 8ºC, 18ºC y 28ºC. 138
Tabla 11. Voluminosidad del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC expresada en mL/g. 141
Tabla 12. Distribución de frecuencias de tamaño de partícula para el prototipo de bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC, 18ºC y 28ºC durante tres meses de almacenamiento. 147
Tabla 13. Eficacia (%) del bioplaguicida mixto y la formulación a base de *T. koningiopsis* (control) almacenados a 8ºC, 18ºV y 28ºC durante tres meses, frente a *R. solani* en condiciones *in planta.* 152
Tabla 14. Eficacia (%) del bioplaguicida mixto y la formulación en polvo a base de *T. koningiopsis* (control) almacenados a 8ºC, 18ºC y 28ºC durante tres meses, frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento. 157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la enfermedad de *Rhizoctonia solani*. 28
Figura 2. Ciclo Biológico de la polilla guatemalteca. 37
Figura 3. Sintomatología de la infección viral. 43
Figura 4. Distribución de frecuencias de tamaño de partícula para el prototipo de bioplaguicida mixto. 90
Figura 5. Peso seco promedio de las plantas sembradas en presencia del aislamiento Rh176 después de 30 días de la inoculación.. 93
Figura 6. Peso seco promedio de las plantas sembradas en presencia del aislamiento Rh200 después de 30 días de inoculación. 94
Figura 7. Incidencia de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* (Rh176 y RH200) en plantas de papa *Solanum phureja.*. 96
Figura 8. Peso seco de las plantas tratadas con el bioplaguicida mixto, testigo absoluto y el testigo patógeno.. 100
Figura 9. Plantas de papa variedad *Solanum phureja* provenientes de la semilla de papa tratada o no con el bioplaguicida mixto. 101
Figura 10. Semilla de papa no tratada y tratada con el bioplaguicida mixto 102
Figura 11. Comportamiento de la concentración del bioplaguicida mixto, almacenado durante tres meses a 8°C. 107
Figura 12. Comportamiento de la concentración del bioplaguicida mixto, almacenado durante tres meses a 18°C. 108
Figura 13. Comportamiento de la concentración del bioplaguicida mixto, almacenado durante tres meses a 28°C. 109
Figura 14. Reducción de la concentración o viabildad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 110
Figura 15. Comportamiento de la concentración o viabildad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), durante tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C.. 114
Figura 16. Estabilidad de la viabilidad del prototipo de bioplaguicida mixto y la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, almacenados a 8ºC. 118

Figura 17. Estabilidad de la viabilidad del prototipo de bioplaguicida mixto y la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, almacenados a 18ºC..... 119
Figura 18. Estabilidad de la viabilidad del prototipo de bioplaguicida mixto y la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, almacenados a 28ºC..... 121
Figura 19. Reducción de la germinación del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 123
Figura 20. Comportamiento del contenido de contaminantes en el bioplaguicida mixto y los tratamientos controles (formulación en polvo de *T. koningiopsis* y formulación a base de Baculovirus) almacenados durante tres meses a 8ºC. 127
Figura 21. Comportamiento del contenido de contaminantes en el bioplaguicida mixto y los tratamientos controles (formulación en polvo de *T. koningiopsis* y formulación a base de Baculovirus) almacenados durante tres meses a 18ºC. 128
Figura 22. Comportamiento del contenido de contaminantes en el bioplaguicida mixto y los tratamientos controles (formulación en polvo de *T. koningiopsis* y formulación a base de Baculovirus) almacenados durante tres meses a 28ºC. 129
Figura 23. Porcentaje de incremento del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto, formulación a base de *T. koningiopsis* (Th003) y la formulación a base de Baculovirus, después de tres meses de almacenamiento a de 8ºC, 18ºC y 28ºC.. 131
Figura 24. pH del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC. 144
Figura 25. Eficacia del bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Corpoica almacenados a 8ºC durante tres meses frente a *T. solanivora*. 162
Figura 26. Eficacia del bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Corpoica almacenados a 18ºC durante tres meses frente a *T. solanivora.* 163
Figura 27. Eficacia del bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Corpoica almacenados a 28ºC durante tres meses frente a *T. solanivora*. 164

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Medios de Cultivo 185

ANEXO 2. Resultados de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Rh176 en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*. 186

ANEXO 3. Análisis estadístico de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Rh176 en *S. phureja* para la prueba de eficacia *in planta*. 187

ANEXO 4. Resultados de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Rh200 en *S. phureja* para la prueba de eficacia *in planta*. 188

ANEXO 5. Análisis estadístico de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Rh200 en *S. phureja* para la prueba de eficacia *in planta*. 189

ANEXO 6. Resultados de la prueba de patogenicidad (Incidencia) con los aislamientos Rh176 y Rh200 en *S. phureja* para la prueba de eficacia *in planta*. . 190

ANEXO 7. Análisis estadístico la prueba de patogenicidad (Incidencia) con los aislamientos Rh176 y Rh200 en *S. phureja* para la prueba de eficacia *in planta*. . 191

ANEXO 8. Resultados de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta.* 192

ANEXO 9. Análisis estadístico de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta* (peso seco) 193

ANEXO 10. Resultados de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento. 194

ANEXO 11. Análisis estadístico de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento (peso brotes) 195

ANEXO 12. Resultados de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *T. solanivora* en condiciones de almacenamiento. 196

ANEXO 13. Resultados de la estabilidad de la concentración del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC 197

ANEXO 14. Resultados de la estabilidad de la concentración del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC 198

ANEXO 15. Resultados de la estabilidad de la concentración del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 28ºC 199

ANEXO 16. Resultados de la reducción de la concentración o viabilidad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 200

ANEXO 17. Análisis estadístico de la reducción de la concentración o viabilidad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 201

ANEXO 18. Análisis estadístico del comportamiento de la concentración o viabilidad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), durante tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. ... 202

ANEXO 19. Resultados de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC. 204

ANEXO 20. Análisis estadístico de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC. 205

ANEXO 21. Resultados de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC..... 206

ANEXO 22. Análisis estadístico de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC 207

ANEXO 23. Resultados de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 28ºC..... 208

ANEXO 24. Análisis estadístico de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 28ºC..... 209

ANEXO 25. Resultados de la reducción de la germinación del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 210

ANEXO 26. Análisis estadístico de la reducción de la germinación del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 211

ANEXO 27. Resultados de la estabilidad del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC. 212

ANEXO 28. Resultados de la estabilidad del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC. 213

ANEXO 29. Resultados de la estabilidad del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 28ºC 214

ANEXO 30. Resultados del porcentaje de incremento del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto después de tres meses de almacenamiento a de 8ºC, 18ºC y 28ºC..... 215

ANEXO 31. Análisis estadístico del porcentaje de incremento del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto después de tres meses de almacenamiento a de 8ºC, 18ºC y 28ºC..... 216

ANEXO 32. Resultados de la estabilidad de la porosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 217

ANEXO 33. Análisis estadístico de la estabilidad de la porosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 218

ANEXO 34. Resultados de la estabilidad de la fluidez estática del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 219

ANEXO 35. Análisis estadístico de la estabilidad de la fluidez estática del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 220

ANEXO 36. Resultados de la estabilidad de la humedad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 221

ANEXO 37. Análisis estadístico de la estabilidad de la humedad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 222

ANEXO 38. Resultados de la estabilidad de la voluminosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 223

ANEXO 39. Análisis estadístico de la estabilidad de la voluminosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 224

ANEXO 40. Resultados de la estabilidad del pH del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 225

ANEXO 41. Análisis estadístico de la estabilidad del pH del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento. 226

ANEXO 42. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (eficacia) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta* 227

ANEXO 43. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (peso seco) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta* 228

ANEXO 44. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (eficacia) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento..... 229

ANEXO 45. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (peso promedio de brotes) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento 230

ANEXO 46. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC frente a *T. solanivora* 231

ANEXO 47. Análisis estadístico de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC frente a *T. solanivora.* 232

ANEXO 48. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 18ºC frente a *T. solanivora* 233

ANEXO 49. Análisis estadístico de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 18ºC frente a *T. solanivora.* 234

ANEXO 50. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 28ºC frente a *T. solanivora* 235

ANEXO 51. Análisis estadístico de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 28ºC frente a *T. solanivora.* 236

RESUMEN

Dentro de los problemas fitosanitarios que presenta la semilla de papa en almacenamiento, se encuentran el insecto plaga *Tecia solanivora,* que ocasiona pérdidas cercanas al 30% y el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* que afecta los brotes, las raíces y los tallos reduciendo los rendimientos del cultivo hasta en un 50%. Con el propósito de ofrecer una alternativa ecológica para el manejo de estos problemas, el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica, diseñó un bioplaguicida mixto a base de dos principios activos: conidios del hongo nativo *T. koningiopsis* (Th003) y un granulovirus nativo aislado de *T. solanivora* codificado como VG003. Ambos aislamientos fueron seleccionados en trabajos previos por su eficiencia para el control de *R. solani* y *T. solanivora* respectivamente. El nuevo prototipo de bioplaguicida mixto desarrollado es un polvo para espolvoreo, que presenta como ventaja principal, una posible doble acción para el control de los dos problemas fitosanitarios mencionados anteriormente. En el presente trabajo se realizó la caracterización de las propiedades microbiológicas, físicoquímicas y biológicas del mismo, además de la evaluación de la estabilidad de estas propiedades durante tres meses de almacenamiento. El prototipo de bioplaguicida presentó una concentración de 10^5 partículas virales/g, $4{,}1x10^8$ conidios/g de *T. koningiopsis*, una germinación del hongo superior al 96% a las 24 horas de incubación y un contenido de contaminantes de $2{,}17x10^4$ UFC/g. Los parámetros microbiológicos evaluados se mantuvieron estables a las temperaturas de almacenamiento de 8ºC y 18ºC, caso contrario a lo evidenciado a 28ºC, donde se presentó una reducción en la viabilidad y la germinación de *T. koningiopsis*. Dentro de las características fisicoquímicas, el prototipo presentó una humedad del 0,52%, un pH de 9,21, una voluminosidad 1,53 mL/g, una porosidad 39,99% y un tamaño de partícula inferior a 150 µm, las cuales no variaron durante el tiempo de almacenamiento en las tres temperaturas evaluadas y además cumplieron con los parámetros de calidad requeridos. La actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta* como en condiciones de almacenamiento, y frente a *T. solanivora* en condiciones de almacenamiento, se mantuvo estable durante los tres meses de almacenamiento evaluados. Sin embargo, se observó que a mayor temperatura de almacenamiento, disminuyó la eficacia del producto. Los resultados obtenidos confirman el potencial del bioplaguicida desarrollado para la protección de la semilla de papa durante la fase de almacenamiento, contra los dos principales problemas que presentan un impacto económico en el cultivo.

ABSTRACT

One of the major phytosanitary problems of potato tubers in storage condition is the pest insect *Tecia solanivora* which causes losses near to 30% in storage facilities and the fungus *Rhizoctonia solani* which affects the roots and the stems reducing the yields of the crop up to 50%. In order to offer an ecological alternative for these problems, the Laboratory of Biological Control of the Center of Biotecnology and Bioindustry of Corpoica, designed a mixed biopesticide with two active principles: conidia of native fungus *T. koningiopsis* (Th003) and a native granulovirus isolated from *T. solanivora* codified as VG003. Both isolates were selected in previous works on the basis of their efficiency for the control of *R. solani* and *T. solanivora*. The new prototype of mixed biopesticide is a powder that whose like main advantage is a possible double action for the control of both phytosanitary problems. For this reason, the main goal of the present work was to characterize the microbiological, physic-chemical and biological properties, and the evaluation of the stability of these properties during three months of storage. The biopesticide prototype presents a concentration of 10^5 viral particles/g, $4{,}1x10^8$ conidia/g of *T. koningiopsis*, a germination of the fungus higher to 96% at the 24 hours of incubation and a contaminating organism count of 2,17x104 UFC/g. The evaluated microbiological parameters were stabled under storage temperatures of 8ºC and 18ºC, at 28ºC a reduction in the viability and the germination of *T koningiopsis* were observed. Within the physical-chemical characteristics, the prototype presented a humidity of 0.52%, a pH of 9.21, a voluminosity of 1.53 mL/g, a porosity 39.99% and particle size lower than 150 µm, that did not change during of storage time in the three evaluated temperatures. All the properties fulfilled the quality parameters. The biocontrol activity of the mixed biopesticide against *R. solani* in conditions *in plant* like in conditions of storage, and *T.solanivora* under storage conditions, was stable during the three months. However, it was observed that at higher storage temperatures, the effectiveness of the product decreases. The obtained results allowed to confirm the potential of the mixed biopesticide for the protection of potato tubers in storage, against two phytosanitary problems that cause important economic losses in the potato crop.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa es de gran importancia socio-económica en Colombia, ya que alrededor de 100.000 familias se encuentran vinculadas con la explotación directa de este producto, el cual genera alrededor de 20 millones de jornales al año (Martínez *et al.*, 2003)

Por diversas razones, el rendimiento aproximado por año en nuestro país es cercano a 17 Ton/ha, (Faostat, 2004) valor muy bajo en comparación con los grandes productores a nivel mundial como China, Rusia, India, Estados Unidos y Ucrania, que alcanzan 43.8 Ton/ha (Faostat, 2004). Este bajo rendimiento se debe en parte a que en el país no se acostumbra utilizar semillas certificadas y a un bajo desarrollo tecnológico en el manejo del cultivo (Alvarado, 1998 y Martínez *et al.*, 2003).

Tradicionalmente en Colombia, el agricultor no le ha dado mucha importancia a la consecución de semilla de buena calidad para su cultivo, limitándose a dejar para la próxima siembra, la papa de menor calidad y valor para el mercado. Esta práctica ha dado lugar a pérdidas significativas en la producción y a un bajo rendimiento físico y económico (Alvarado, 1998).

La semilla es el recurso más importante para obtener un alto rendimiento por unidad de superficie, pero los agricultores acostumbran a guardar la semilla durante tres a seis meses en cuartos oscuros, mal ventilados y con pésimas condiciones fitosanitarias, obteniendo finalmente semilla de mala calidad (Murcia y Barreto, 2002).

Las pérdidas que sufre la semilla en almacenamiento se relacionan con la reducción de peso y de calidad. La disminución de peso se produce durante el proceso de transpiración y respiración, ya que pierden entre un 10 y 20 % de masa, entre la cosecha y el momento en que los brotes alcanzan su estado óptimo para la siembra (Porras, 2002).

Dentro de las causas de pérdida de calidad se encuentran la presencia de patógenos e insectos plagas. Entre los fitopatógenos más importantes en el cultivo

de papa se destaca *Rhizoctonia solani*, el cual es capaz de afectar raíces, tallos, y especialmente los tubérculos, ya que produce deformaciones y grietas en la epidermis. Este fitopatógeno es un habitante natural del suelo y causa pérdidas entre el 10% y el 26% (Guerrero, 1998).

Asimismo, este cultivo se ve afectado por insectos plaga como la polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora*, la cual fue reportada en Colombia por primera vez en el departamento de Norte de Santander en 1985, posteriormente en 1991 se registró en Boyacá y años después se dispersó al resto de zonas paperas del país. Este insecto ha causado grandes pérdidas económicas durante el cultivo, como en el almacenamiento y comercialización, con daños anuales en campo desde el 43% y hasta del 100% en almacenamiento (Corpoica, 1998).

En la actualidad, no existe un tratamiento integrado, efectivo, y ambientalmente sostenible para el control del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* y del insecto plaga *Tecia solanivora*, debido a que la mayoría de estrategias se basan en la aplicación de prácticas culturales y productos químicos, siendo estos últimos usados indiscriminadamente lo que genera un riesgo para el ambiente y para la salud de animales y de humanos (Cotes, 2001).

Dentro de los plaguicidas de mayor utilización para el control del fitopatógeno *R. solani* se encuentran los fungicidas Vitavax (Carboxin + captan), Benlate (Benomyl) y Rhizolex (Metil-Toclofos). Estos fungicidas pertenecen a la categoría toxicológica III, correspondiente a moderadamente tóxica, es decir que pueden generar riesgos para la salud humana, además de la posible acumulación en suelo y agua. Para el control de *T. solanivora*, los insecticidas de mayor uso son el Pirestar 38 EC, Orthene 75% SP, Lorsban 4 EC y Curacron 500 EC, cuyos ingredientes activos son clorpirifos, permetrina y profenofos, altamente tóxicos para el hombre por exposición aguda y pueden presentar problemas de neurotoxicidad retardada (Gómez, J. 2006).

Debido a lo anterior, una de las alternativas más interesantes de bajo costo y ambientalmente sostenible es el uso de agentes de control biológico ACB's, dentro de los que se destacan bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoos. Para el control de fitopatógenos se concentra el uso de microorganismos antagonistas, destacándose el género *Trichoderma* que ha sido eficiente en el control de

patógenos de los géneros *Rhizoctonia* sp, *Phytophthora* sp., *Sclerotium* sp., y *Fusarium* sp. entre otros. Dentro de los mecanismos de acción utilizados por este antagonista se destaca la competición directa por espacio o por nutrientes, la producción de metabolitos, antibióticos y parasitismo directo (Candela *et al.,* 2007). Este género no solamente se usa con éxito contra hongos en el suelo, sino también en almacenamiento, en semillero y en demás ciclos de un cultivo agrícola (Wraight *et al*., 2007). Para el manejo de *Tecia solanivora,* la herramienta más promisoria es la utilización de virus entomopatógenos; ya que no presentan ningún impacto ambiental para la salud de animales y de humanos (Hoyos *et al*., 2006). Los virus que se utilizan en el control de la polilla guatemalteca pertenecen a la familia *Baculoviridae*, caracterizados por su alta especificidad y virulencia (Hoyos *et al.,*2006).

Considerando las ventajas que presentaría el desarrollo de un bioplaguicida que ejerza a la vez un control sobre *Rhizoctonia solani* y *Tecia solanivora*, el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica, desarrolló un prototipo de bioplaguicida, que incluye como ingredientes activos conidios de *Trichoderma koningiopsis* y virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella*. Este prototipo presenta como ventaja principal, una posible doble acción para el control de los dos problemas fitosanitarios mencionados anteriormente. Dicho producto no ha sido caracterizado físico-químicamente ni microbiológicamente, así mismo, no se ha determinado su eficacia en condiciones de laboratorio. El conocimiento generando a partir de este trabajo permitirá optimizar el bioplaguicida con miras a su utilización para el control de *Rhizoctonia solani* y *Tecia solanivora* en el cultivo de papa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. El cultivo de papa en Colombia (Tubérculo - semilla).

En Colombia se siembra papa de las especies *Solanum tuberosum* variedad *andígena,* que corresponde a las variedades conocidas de "papa de año" y la especie *Solanum phureja* conocida como "papa criolla", variedad "Yema de Huevo", que representa uno de los más importantes recursos genéticos del país, por su potencial de exportación, su alto valor nutricional y excelentes condiciones de sabor y calidad culinaria. La especie *Solanum tuberosum* var*. tuberosum* corresponde a variedades de papa cultivadas en zonas templadas, que han mostrado baja adaptabilidad y pobre tuberización en las condiciones agroecológicas de los Andes Colombianos (Porras, 2002).

Por la diversidad de condiciones agroecológicas en las que se desarrolla el cultivo de la papa en Colombia, se produce una amplia gama de sistemas, formas y condiciones de producción, que no se pueden generalizar para todas las zonas productoras. La producción comercial de papa está localizada entre los 2000 y 3500 msnm, con una zona óptima de producción entre 2500 y 3000 msnm, con temperaturas que van desde los 10ºC hasta los 15ºC y precipitación pluvial promedia entre 500 y 2500 mm al año (Cevipapa, 2004).

Aproximadamente el 90% de la producción comercial de papa se concentra en los departamentos de Cundinamarca (35%), Boyacá (30%), Nariño (15%) y Antioquia (10%); el restante porcentaje se distribuye en las zonas de Caldas, Tolima, Santanderes y otras zonas de menor importancia (Martínez *et al.,* 2003).

A nivel comercial, la papa se propaga vegetativamente por medio del tubérculo, al cual se le da el nombre genérico de semilla; esto permite mantener su constitución genética inalterable. Sin embargo, existen otras formas de propagación por medio de semilla sexual o, por partes vegetativas como esquejes, brotes y meristemos (Peña, 2000)

Aún cuando está comprobado que el uso de semilla certificada aumenta hasta en un 25% los rendimientos del cultivo, debido a la menor vulnerabilidad de la papa frente al ataque de plagas y enfermedades, sin embargo su uso en Colombia no es muy común (Mora y Mosquera, 2002). En el país la producción de papa se adelanta casi en su totalidad utilizando semilla informal, obtenida por los agricultores en su propia finca (de cosechas anteriores), de fincas de la misma región o adquiridas en los centros de mercadeo del producto (centrales de abastos, centros mayoristas de origen, etc.), estimándose de esta forma, que tan solo el 1% del total de la producción utiliza semilla certificada (Cevipapa, 2004).

La principal razón por la cual los productores nacionales no utilizan la semilla certificada en sus cultivos, es la percepción generalizada del alto costo de la misma. A esto se le une la relativa facilidad con la cual los agricultores pueden producir sus propias semillas de aceptable calidad sanitaria (Martínez *et al.,* 2003)

Teniendo en cuenta lo anterior, la semilla es el insumo que en mayor medida condiciona el éxito o el fracaso de esta actividad agrícola, y por tratarse de un organismo vivo que respira, perecedero, con una vida útil limitada, voluminoso y con alto contenido de agua (cerca del 80%), requiere de especial atención y cuidado durante el proceso de producción, transporte, acondicionamiento, tratamiento, almacenamiento y siembra (Porras, 1999).

Por tal razón, el almacenamiento es uno de los pasos más importantes en la producción de tubérculo – semilla. Según Pérez (1986) y Alvarado (1998), uno de los principales objetivos que se persiguen al acondicionar un sitio de almacenamiento de tubérculo de papa destinado para semilla, se refieren a reducir pérdidas en cantidad y calidad, buscar las mejores condiciones para que se desarrollen brotes fuertes, sanos y vigorosos, protegerla del daño de fitopatógenos, de manera que el almacenamiento garantice el retorno de la inversión realizada en infraestructura y adecuación del sitio destinado para tal fin.

El almacenamiento de papa destinada para semilla es variado y va desde bultos arrumados en lotes comerciales de papa, tapados con un plástico, hasta arrumes destapados debajo de las copas de los árboles; almacenamiento en bodegas oscuras poco ventiladas, con piso de tierra, bultos dispuestos en casas, patios o zarzos, hasta bodegas habilitadas para tal fin, silos rústicos, almacenes o bodegas

acondicionadas que presentan diversas condiciones. Es decir, se presentan desde muy malas e inconvenientes, hasta excelentes condiciones de almacenamiento que influyen en la calidad final de la semilla (Porras, 2002).

2.1.1. Principales enfermedades de la papa en Colombia

La papa es la especie vegetal mejor estudiada con respecto a sus patógenos e insectos plagas. Numerosos microorganismos y agentes infecciosos han sido identificados y sus métodos de control sugeridos. Entre los problemas más importantes durante el almacenamiento y el cultivo en campo se encuentra la Rhizoctoniasis o costra negra causada por *Rhizoctonia solani* y el insecto-plaga *Tecia solanivora* conocida como la polilla guatemalteca de la papa (Mejia, 2000 y Martínez *et al.,* 2003).

2.2. *Rhizoctonia solani* Kühn.

2.2.1. Clasificación taxonómica y generalidades de *Rhizoctonia solani*

Según Carling *et al.* (2002):

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deutoromycota
Subclase	Hyphomycedae
Clase	Hyphomycete
Orden	Moliniales
Familia	Agronomycemycetaceae
Género	*Rhizoctonia*
Especie	*Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani Kühn fue descrita por primera por Kühn en 1865 y es una de las especies más estudiadas de este género (Snech *et al.*, 1998). Las colonias de este hongo son blancas, algodonosas y planas. Sin embargo, dependiendo de la especie, pueden presentar tonalidades crema o café. Microscópicamente el micelio está constituido de hifas fraccionadas en células individuales polinucleadas y comunicadas entre sí, a través de un poro septal que permite el movimiento del citoplasma, las mitocondrias y los núcleos de una célula a otra (Anderson, 1982).

R. solani no produce normalmente esporas sexuales (conidios), sin embargo, puede producir en algunas ocasiones basidiosporas. En la naturaleza, el hongo se reproduce asexualmente y existe como micelio vegetativo, el cual forma estructuras de resistencia o esclerocios, que son masas de hifas estrechamente entretejidas con superficies duras y resistentes. (Domsch *et al.*, 1980).

Debido a que el género *Rhizoctonia* no produce conidios y raramente basidiosporas, la clasificación de este hongo ha sido compleja. Por esta razón, se utiliza el concepto de anastomosis hifal, con el fin de caracterizar e identificar más fácilmente a esta especie. Esto concepto implica que los aislamientos de *Rhizoctonia* que tienen la habilidad de reconocerse y fusionarse entre sí, están genéticamente ligados (Carling *et al.,* 2002)

2.2.2. Síntomas.

La Rhizoctoniasis, conocida también con los nombres de costra negra (por la presencia de esclerocios en la superficie de los tubérculos afectados) y chancro del tallo (por las lesiones necróticas en los tallos), es una enfermedad que está presente en todas las zonas productoras de papa del mundo (Frank, 1981).

La enfermedad afecta sólo los tejidos jóvenes de brotes, tallos y estolones. En la planta, este microorganismo afecta los brotes del tubérculo semilla, en los estados de pre y pos emergencia. Los brotes afectados muestran lesiones necróticas de color marrón en la base que cuando son profundas, los estrangulan (Guerrero, 1998). Los tallos y estolones son afectados, mostrando lesiones o chancros hundidos de color castaño rojizo. El estrangulamiento parcial de los tallos pueden

inducir a varios síntomas como el arrosetamiento apical, necrosis del tejido, pigmentación púrpura de las hojas superiores, enrollamiento foliar y destrucción de raíces. En los tubérculos afectados se observa la presencia de esclerocios que son estructuras de conservación del hongo. Estas costras negras le dan un mal aspecto a los tubérculos y en un mercado exigente, los tubérculos son rechazados (Guerrero 1998).

2.2.3 Diseminación.

El patógeno se mantiene en el suelo, en forma de esclerocios y micelio sobre los tubérculos y los residuos vegetales que quedan enterrados en el lote. Los esclerocios germinan e invaden los brotes de la semilla especialmente a través de heridas. La población de *R. solani* en el suelo puede incrementarse cuando se cultiva en el mismo lote sin hacer adecuadas rotaciones. Las condiciones ambientales que favorecen al patógeno son la baja temperatura del suelo y el alto nivel de humedad; este último factor sumado a la falta de drenaje, tienden a incrementar la formación de esclerocios sobre los tubérculos recién formados (Brewer y Larkin, 2005).

2.2.4. Ciclo de la enfermedad

El hongo se mantiene de un año a otro, como esclerocios y como micelio en los residuos de la cosecha que se encuentran en el suelo (Brewer y Larkin, 2005). Cuando el tubérculo semilla es sembrado, el hongo crece en la superficie de estos, desarrollándose especialmente en los brotes y raíces. El proceso de infección es promovido por la producción de diferentes enzimas extracelulares que degradan varios componentes de la pared celular de las plantas. Después de este primer ataque, el hongo continúa su desarrollo en la superficie externa de la planta, causando la enfermedad por la formación de apresorios que penetran las células de

la planta, los cuales toman los nutrientes de éstas para continuar su crecimiento y desarrollo (Wharton *et al.,* 2007).

Como el hongo destruye las células de las plantas, las hifas continúan el crecimiento y colonización del tejido muerto, muchas veces formando nuevos esclerocios. El nuevo inóculo es producido dentro y fuera del tejido del hospedero, repitiéndose sucesivamente nuevos ciclos, cuando nuevos tubérculos – semilla y material vegetal se encuentran disponibles (Anderson, 1982).

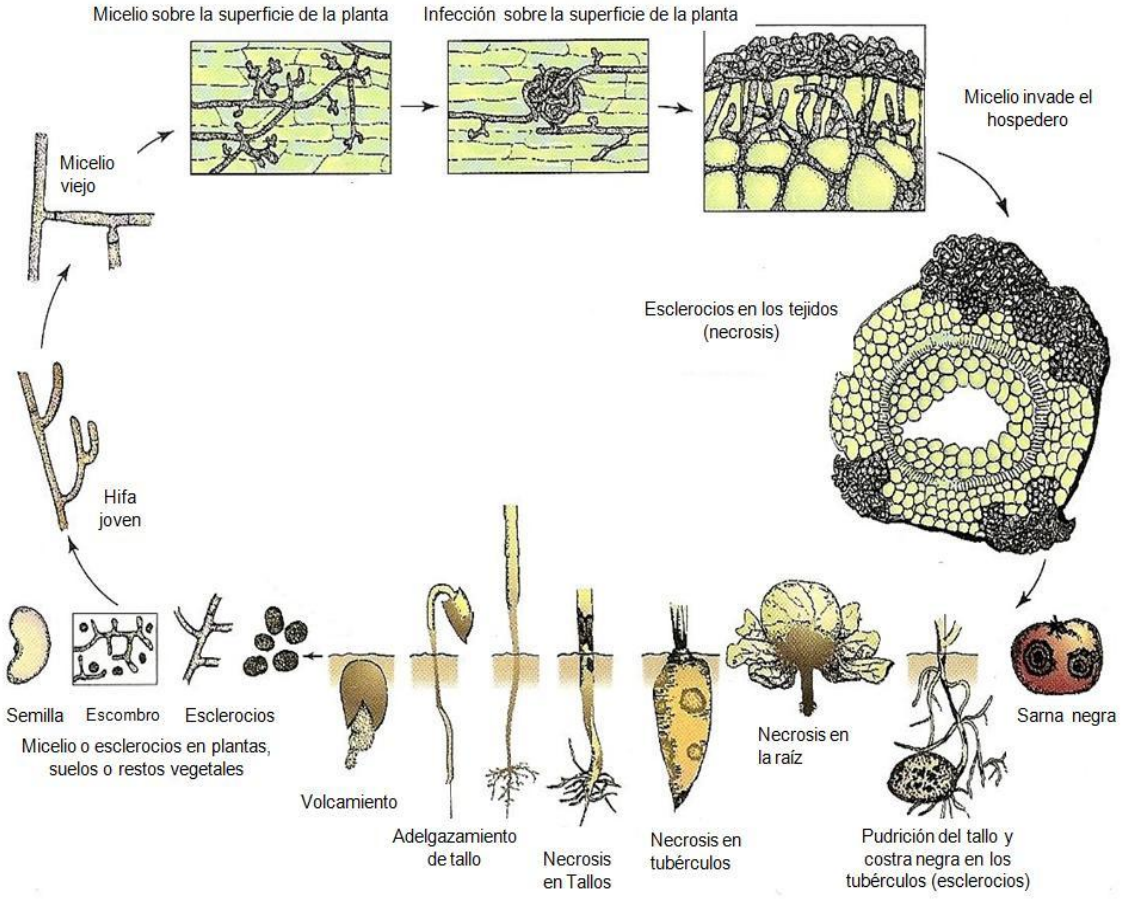

Figura 1. Ciclo de la enfermedad de *Rhizoctonia solani* (Agrios, 2005).

2.2.5. Métodos de prevención y control.

No existe un tratamiento totalmente efectivo para el control de esta enfermedad. No obstante, el agricultor utiliza el control cultural y químico y en algunas ocasiones el control biológico. Dentro del control cultural se encuentra el uso semilla sana o libre de esclerocios, la adecuada rotación de cultivos, la pronta cosecha y el control del exceso de humedad. El control químico es considerado como la más efectiva y rápida alternativa, ya que aunque no incrementa el rendimiento, incrementa la calidad sanitaria de los tubérculos. Sin embargo, algunas especies de *Rhizoctonia* pueden volverse resistentes a los agroquímicos, debido a la aplicación excesiva de éstos, que además genera un impacto negativo sobre el medio ambiente y la salud de animales y humanos (Guerrero, 1998)

2.2.6. Control biológico.

El control biológico de las enfermedades causadas por *Rhizoctonia* sp. en el cultivo de papa representa una estrategia adicional que puede proveer efectividad y un uso sostenible al cultivo. El biocontrol puede ser efectivo en casos en donde el control químico y cultural, no es viable o práctico (Lumsden y Papavizas, 1998; citado por Brewer y Larkin, 2005).

Muchos microorganismos antagonistas, algunos de ellos viables para una formulación comercial, han mostrado un control potencial de *R. solani* en papa y en otros cultivos (Romero, 2004). *Trichoderma harzianum*, *T. virens, Pseudomona fluorescens, Stibella aciculosa, Verticillium biguttatum* y *Bacillus subtilis* son algunos microorganismos que han mostrado potencial para el control de esta enfermedad. Sin embargo, estos biocontroladores han sido evaluados en condiciones limitantes y de laboratorio, por lo que su actividad biocontroladora no ha sido cuantificadas a nivel de campo o en otros fitosistemas (Brewer y Larkin, 2005).

2.2.7.*Trichoderma* sp. en el control biológico de *Rhizoctonia solani*.

El género *Trichoderma* ha desarrollado diversos mecanismos para atacar y parasitar hongos patógenos en diferentes estados de desarrollo como conidios, hifas o clamidosporas (Lewis y Lumsden, 2001). Generalmente, *Trichoderma* sp. ejerce un control sobre hongos del suelo de los géneros de *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium.* Un ejemplo de lo anterior, es el estudio realizado por Avila *et al.* (1994) quienes realizaron pruebas en semilla de papa bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo, utilizando diferentes aislamientos de biocontroladores, en donde se estableció que cepas *de T. koningiopsis*, *Trichoderma sp* y *Gliocladium,* lograron conferir porcentajes de control del fitopatógeno *R. solani,* superiores o iguales al 70%. Lewis y Lumsden (2001) también, demostraron que la aplicación de *Trichoderma* en condiciones de casa de malla disminuyó en un 85% la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa.

2.3. *Trichoderma* como agente biocontrolador.

2.3.1. Clasificación taxonómica y generalidades de *T. koningiopsis.*

Según Samuels *et al.* (2006):

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deutoromycota
Subclase	Hyphomycedae
Clase	Hyphomycete
Orden	Moliniales
Género	*Trichoderma*
Especie	*Trichoderma koningiopsis*

El hongo *Trichoderma* spp. produce colonias blancas, amarillas o verdes, dependiendo del medio de cultivo en el que crezca (Samuels *et al.,* 2006). *Trichoderma koningiopsis* se distingue por sus colonias, al principio de superficie lisa, que a través del tiempo se forman hifas áreas que se pueden observar por ser ligeramente algonodosas (Samuels *et al.,* 2006). El color de las colonias cambia gradualmente de blanco a blanco verdoso por la formación de fialosporas hasta tornarse de color verde oscuro.

Dentro de las características microscópicas, *T. koningiopsis* presenta micelio hialino, altamente ramificado, septado y de pared lisa, con un diámetro de la hifa de 2 a 10 µm. Las fiálides tienen forma de bolos estrechos en la base inmediatamente por encima del medio y luego atenuados, algunas veces separados bruscamente (Samuels *et al.,* 2006).

Los conidios de este hongo son de color verde oscuro y forman racimos de conidióforos sueltos o muy compactos, además son elípticos u ovoides y miden entre 3.2 y 4.8 µm de ancho, son lisos, hialinos y ocasionalmente con la base truncada (Samuels *et al*., 2006).

2.3.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp. en control biológico.

El control de fitopatógenos por parte del microorganismo antagonista *Trichoderma* sp. ocurre por varios mecanismos, tales como la competencia por fuentes de carbono, de nitrógeno y por elementos esenciales en el proceso de la infección (Barker y Cook,1982; Paulitz y Bélanger, 2001). Además, se puede presentar la producción de enzimas hidrolíticas como exo-quitinisas, celulosas y exo – β,1-3 glucanasas, cuya función es digerir la pared celular de los microorganismos patógenos (Cotes, 2000).

Harman *et al.* (2004) presentó una descripción de los mecanismos más utilizados por *Trichoderma* sp. para el control entre los que se encuentra los siguientes:

Micoparasitismo: en este mecanismo el microorganismo benéfico se establece por medio de una vigorosa adherencia de sus hifas sobre el patógeno, produciendo

enrollamiento hifal y provocando fragmentación de las hifas a nivel del septo (Papavizas, 1985 y Howell, 2003)

Antibiosis: consiste en que un organismo produce sustancias que inhiben o destruyen otro organismo. Para el caso de *Trichoderma* sp. este hongo puede producir algunos metabolitos como gliotoxina, viridin, trichodermina, suzukalicina y acetaldehído, que suprimen la presencia de patógenos en el suelo (Cai-Yun *et al.*, 2006 y Howell, 2003).

Competencia: en este caso, dos o más organismos demandan recursos nutricionales o de espacio, es decir, el antagonista reduce la actividad patogénica por la ganancia de un factor limitante (Candela *et al*., 2007 y Howell, 2003).

La reacción existente entre *Trichoderma* sp*.* y *Rhizoctonia solani*, es de dos tipos: Tipo I en el cual las hifas del patógeno se aprecian necróticas y aparentemente vacías, en la proximidad de las hifas de *Trichoderma* sp., indicando que la producción de toxinas ejerce un papel importante en la detección del patógeno, sugiriendo que estos daños se deben a enzimas extracelulares. En la reacción tipo II, se observa el enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* sp*.* sobre las hifas de *Rhizoctonia solani*, (típico de micoparasitismo) (Lo *et al.,* 1998).

2.3.3. Bioplaguicidas a base de *Trichoderma* sp.

En la actualidad, a nivel internacional existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de *Trichoderma* sp., siendo este el biocontrolador más utilizado a nivel comercial (Jayaraj *et al.,* 2006) (Tabla 1).

Tabla 1. Formulaciones comerciales de *Trichoderma* sp. (Copping, 2001).

Agente biocontrolador	Nombre del producto	Fitopatógenos que controla	Uso
T. harzianum	Root Pro® Harzam® Trichodex® Trchoderma 2000® Trichopel® Promot® Bio - fungus®	*Pythium* sp. *Fusarium* spp. *Rhizoctonia solani,* *Sclerotium rolfsii* *Botrytis* sp. *Sclerotinia* sp.	Aplicación a suelo y foliar
T. polysporum *T. harzianum*	Binab TF WP®	*Botrytis cinerea* *Heterobasidian annosum*	Aplicación a suelo,frutas y árboles.
T. harzianum *T. viride*	Trisan® Trichoseal® Trichodowels® Trichoject® Trisan®	*Pythium* sp. *Fusarium*, spp. *Rhizoctonia solani,* *Sclerotium rolfsii* *Botrytis* sp.	Aplicación a suelo y foliar
T. stromaticum	Tricovab®	*Crinepellis perniciosa*	Aplicación a follaje del árbol de cacao.
T. virens	SoilGard®	*Pythium* sp. *Fusarium* spp. *Rhizoctonia solani*	Aplicación a suelo y foliar

En Colombia existen 10 productos comerciales a base de *Trichoderma* sp. registrados ante el Instituto Colombia Agropecuario (ICA). Sin embargo, ninguno es específico para el control de *Rhizoctonia solani* en papa (Tabla 2). (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006)

Tabla 2. Productos comerciales a base de *Trichoderma* registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario.

Producto	Principio activo	Nombre de la empresa	Patógenos y cultivo en que controla
TRICHOBIOL WP	*T. lignorum*	Mora Jaramillo. Biocontrol	*Botrytis cinerea* (fresa y tomate), *Fusarium oxysporum* (tomate, papa y maíz). *Phytophthora infestans* (papa) *R. solani* (lechuga)
AGROGUARD	*T. harzianum*	Live Systems Technology S.A. Lst S.A.	*Botrytis cinerea* (tomate)
ANTAGON	*T. harziamun*	Bioecológicos LTDA	----------
TRIFESOL	*T. viride*	Biocultivos S.A	*Rhizoctonia solani* (arroz)
TRICHOGEN WP	*T. lignorum*	Agroquímicos Genéricos	*Fusarium* spp. (arroz) *Botrytis cinerea* (frutales)
BIOREGULA	*T.harzianum*	Orius Biotecnología	*Rhizoctonia* spp. y *Sclerotinia* spp.
FITOTRIPEN WP	*Trichoderma sp.*	Safer Agrobiológicos	*Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Sclerotinia* spp. (Damping-Off) y *Botrytis* spp.(flores)
TRICHO D WP	*T. harzinum*	Orius Biotecnología	*Rhizoctonia* spp. y *Sclerotinia* spp.

2.4. *Tecia solanivora* (Polilla guatemalteca).

La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny), pertenece al complejo de polillas de la familia Gelechiidae (Orden Lepidóptera) que atacan al cultivo de la papa. Se le conoce con varios nombres comunes: polilla gigante, palomilla grande, polilla centroamericana, gusano guatemalteco y principalmente, como polilla guatemalteca. Es una plaga originaria de Centroamérica que causa importantes pérdidas económicas en varios países de esta zona y en países andinos

(Venezuela, Colombia y Ecuador). Actualmente, este insecto constituye una amenaza potencial para los cultivos de papa ubicados en los demás países del área andina (Niño, 2004).

Su clasificación taxonómica según Araque y García (1999):

Clase	Insecta
Orden	Lepidóptera
Suborden	Dytrisia
Superfamilia	Tincoidea
Familia	Gelichiidae
Tribu	Gnorimoschemine
Genero	*Tecia*
Especie	*Tecia solanivora*

Esta plaga originaria de Guatemala, fue introducida desde Costa Rica a Táchira (Venezuela) en 1983 y por esta vía llego a Colombia a través de Norte de Santander en 1985. Desde entonces, se ha establecido en todas las zonas productoras de papa en Colombia (Corredor y Flores, 2003)

2.4.1. Ciclo de vida de *Tecia solanivora.*

Durante su ciclo de vida, *Tecia solanivora* pasa por una metamorfosis completa (holometábolo), que comprende cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Sotelo, 1997)

Los huevos son de forma ovalada y miden 0,5 mm de largo. Recién puestos son de color blanco, luego cambian a amarillo y finalmente se pueden apreciar de coloración oscura, cuando están próximos a eclosionar. Éstos son depositados en el

suelo cerca de la base de las plantas de papa o sobre los tubérculos almacenados (Niño, 2004).

La larva es de forma cilíndrica y recta, pasa por cuatro estadíos, recién nacida mide 1,4 mm de largo y llega alcanzar entre 14 a 16 mm de longitud al completar su desarrollo en el cuarto estadío. La cabeza y la placa protoráxica son de color marrón (López – Ávila y Espitia, 2000).

En los primeros estadíos, el cuerpo es de color blanco hialino, luego en el último estadío, adquiere un color verdoso amarillento y finalmente se torna de color rosado violáceo en el dorso, color característico de la fase de prepupa. Posee pequeñas manchas de color marrón en la base de las setas o pelos corporales, distribuidas de manera uniforme sobre todos los segmentos torácicos y abdominales del cuerpo y tres pares de patas verdaderas, más cinco pares de pseudopatas o protuberancias abdominales (Niño, 2004).

Las larvas del primer estadío penetran en los tubérculos formando galerías o túneles durante su proceso de alimentación y desarrollo. Sólo se alimentan de la pulpa del tubérculo y aunque el consumo por larva es bajo, aproximadamente un gramo (Hilje, 1994), cuando se incrementa la densidad de larvas por tubérculo, llegan a consumir gran parte de la pulpa, ocasionando un deterioro significativo en la calidad del tubérculo (Hilje, 1994).

La larva durante el último estadio larval, sale del tubérculo a través de un orificio limpio. Posteriormente forma un capullo de seda que puede recubrir con tierra u otras partículas, manteniendo su forma, pero perdiendo la movilidad. Esta fase se conoce como prepupa, luego se va transformando hasta pasar al estado de pupa (Niño, 2004).

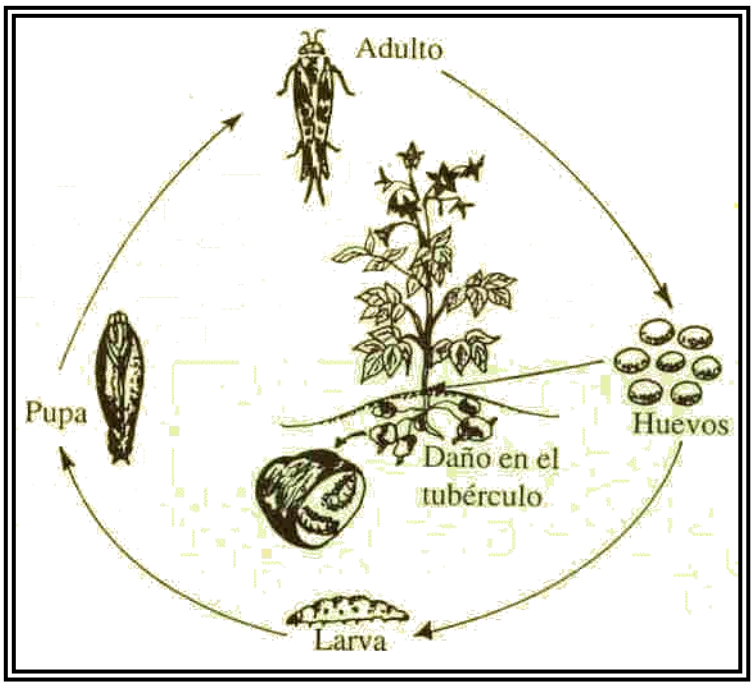

Figura 2. Ciclo Biológico de la polilla guatemalteca (CIP, 1994).

Las pupas miden entre 7,63 a 8,52 mm de largo por 2,58 a 2,98 mm de ancho en machos y hembras respectivamente (Torres *et al*.,1997). Van cambiando la coloración inicial hasta adquirir un color marrón oscuro de aspecto brillante. Aunque ocasionalmente puede pupar dentro del tubérculo, lo más común es que se encuentren fuera de éste, ya sea dentro del suelo en condiciones de campo o adheridos a los tubérculos, sacos u otros envases, así como en las hendiduras de pisos y paredes de los locales donde se mantiene la papa almacenada (López – Ávila y Espitia, 2000).

El adulto de *T. solanivora* es una polilla de color marrón, las hembras son más grandes y robustas, midiendo 12 mm de largo por 3,3 mm de ancho, mientras que los machos son más pequeños, con largo de 10 a 11 mm y ancho de 2,9 mm. Las hembras presentan las alas anteriores de color marrón más claro con tres estigmas y líneas longitudinales de color negro muy notables, mientras que los machos son de color marrón oscuro (Niño, 2004; López – Ávila y Espitia, 2000).

La duración de cada uno de estos estados depende de las condiciones ambientales, siendo la temperatura y la humedad relativa los factores que más influyen,

observándose una relación inversa entre la duración del desarrollo y la temperatura (Niño, 2004).

2.4.2. Daños producidos en el cultivo de papa.

Las larvas de *T. solanivora* causan daños directos a los tubérculos de papa tanto en campo como en almacén, afectando la calidad de los mismos, y ocasionando pérdidas económicas, por el rechazo del material afectado. Su manejo incrementa el uso de agroquímicos y de esta forma los costos de producción (Murcia y Barreto, 2002).

Cuando las condiciones climáticas son favorables para la plaga y se cuenta con fuentes de infestación significativas, la polilla guatemalteca es una de las plagas más dañinas en las zonas productoras de papa, por cuanto ha llegado a causar pérdidas significativas del producto, tanto en campo como en almacén, y en ocasiones los tubérculos se deterioran de tal manera, que no pueden ser utilizados para el consumo humano, animal y mucho menos para semilla (Niño, 2004).

Para estimar la magnitud de los daños se utiliza la información sobre el porcentaje de tubérculos con daño y la intensidad del daño o porcentaje de infestación, teniendo en cuenta además la distribución de la plaga en las principales zonas productoras y su alta densidad poblacional (Murcia y Barreto, 2002).

2.4.3. Métodos de prevención y control.

Las técnicas o métodos de control de la polilla de la papa *T. solanivora* generados, evaluados y validados en las diferentes investigaciones realizadas para este fin, están enmarcadas dentro del control cultural, etológico, químico y biológico, los cuales al utilizarse de manera compatible con las condiciones agroecológicas y teniendo en cuenta las condiciones socioeconómicas en los sistemas de producción del cultivo de papa; permiten el diseño de programas de manejo integrado, que se

constituyen en un componente más del manejo del cultivo (Wraigth *et al.*, 2007). Cuando las poblaciones son altas, ningún método de control individual proporciona una protección adecuada (Romero, 2004).

2.4.4. Control biológico.

Para el control biológico de la polilla de la papa, se han buscado diferentes controladores biológicos, pero a excepción de los aislamientos de virus entomopatógenos del género *Baculovirus* (Zeddam *et al*., 2003), se han identificado hasta ahora pocos agentes benéficos que puedan desempeñar un papel significativo en el manejo de esta plaga (Niño, 2004).

Los Baculovirus son altamente específicos para ciertos insectos y han sido considerados por la OMS y la FAO, como una de las herramientas más promisorias en el control de plagas a diferencia de los insecticidas químicos (Villamizar *et al.,* 2003).

El Centro Internacional de la Papa del Perú (CIP), aisló un *Baculovirus* de una de las polillas de la papa, *Phthorimaea operculella*, el cual ha sido ampliamente utilizado para el control de este insecto y de *Tecia solanivora.* Con el fin de realizar varias pruebas de control en los países productores de papa, se desarrolló una formulación de dicho virus, obteniendo como resultado en pruebas de laboratorio, una mortalidad de las larvas entre el 97% - 100% (CIP, 1992).

Actualmente, el uso de un bioinsecticida en polvo, denominado “Baculovirus”, formulado con larvas de la polilla guatemalteca infectadas con el virus y un material inerte (silicato de magnesio o silicato de aluminio) desarrollado para proteger los tubérculos semillas durante el almacenamiento, junto con otras prácticas MIP, constituye el producto biológico más promisorio dentro del programa de manejo integrado de esta plaga (Niño, 2004).

También se han evaluado otros agentes de control biológico, que han mostrado menor potencial tales es el caso de *Bacillus thuringiensis*, bacteria cuya preparación comercial ha producido una reducción de la plaga cercana al 80% (Martínez *et al.,*

2003); el nemátodo *Steinernema feltiae* y los parasitoides C*opidosoma koehleri* y *Trichogramma lopezandinensis* (Herrera, 1998).

2.5 Baculovirus

La familia Baculoviridae es la más numerosa y estudiada entre los grupos de virus patógenos de insectos. Esta familia está subdividida en dos géneros: Nucleopoliedrovirus (NPV) y Granulovirus (Virus de la granulosis, GV), que se caracterizan por ser virus de DNA de doble cadena, cuyos viriones tienen forma de bastón, y están incluidos en cuerpos de inclusión OB (Winstanley y O' Reilly , 1999).

Los cuerpos de inclusión son las unidades de infección de los Baculovirus en los hospederos y en cada cuerpo de inclusión pueden existir uno o varios de viriones (Cory y Myers, 2003).

Los nucleopliedrovirus y los granulovirus, se diferencian por la morfología (forma, tamaño y estructura) de sus cuerpos de inclusión y también en aspectos citopatológicos de interés taxonómico (Caballero *et al.,* 2001).

2.5.1. El género granulovirus

Los granulovirus (Virus de la granulosis) han sido aislados solamente de larvas de insectos correspondientes al genero Lepidoptera (Winstanley y O' Reilly, 1999)

Los cuerpos de inclusión de este género suelen ser de tamaños homogéneos, oscilan entre 160 y 300nm de ancho, por 300 a 500 nm de largo, y generalmente son de forma granular semejantes a óvalos. Cada cuerpo de inclusión contiene sólo un virión de tipo simple (Caballero *et al.,* 2001). La mayor proteína de los granulovirus es la granulina, la cual tiene un tamaño de 28 a 30 kDa (Winstanley y O' Reilly, 1999).

El genoma de los granulovirus está organizado en una molecula circular de DNA de doble cadena, que contiene de 100 a 200 genes y cuyo tamaño puede oscilar entre 80 y 100 pares de bases (Cory y Evans, 2007).

Entre los granulovirus más estudiados se encuentran los de *Choristoneura occidentalis, Cydia pomonella, Cryptophlebia leucotreta, Adoxophyes orana Phthorimaea operculella, Plutella xylostella,* Xestia *c-nigrum y Agrotis segetum* (Schwarz *et al.,* 2007).

2.5.2. Proceso de Infección

El ciclo de infección comienza cuando los cuerpos de inclusión son ingeridos por larvas al alimentarse, continúa con la dispersión de la enfermedad dentro del insecto y finaliza tras la muerte del mismo, con la liberación de nuevos cuerpos de inclusión que contienen partículas infectivas (Caballero *et al.,* 2001).

Durante el ciclo se producen dos fenotipos de viriones con idéntico genotipo. El primero de ellos son los viriones derivados de los cuerpos de inclusión VDC, los cuales son responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad y por consiguiente los causantes de la infección primaria en el insecto (Caballero *et al*., 2001 y Schwarz, *et al.,* 2007). Estos cuerpos de inclusión contiene una proteína mayoritaria, que para el granulovirus es la granulina, proteína encargada de permitir la persistencia del virus en la naturaleza. Los segundos viriones son los viriones brotados (VB), los cuales son los encargados de diseminar la enfermedad dentro del hemocele del insecto, provocando la infección secundaria que dará como resultado la generación de nuevos cuerpos de inclusión y posteriormente la muerte de insecto hospedero (Cory y Evans, 2007; Cory y Myers 2003; Caballero *et al.,* 2001).

Infección Primaria

El inicio de la infección primaria es por la ingestión de los cuerpos de inclusión presentes como contaminantes en el alimento de las larvas. Otras vías de entrada o de infección incluyen la transmisión transovárica o por contaminación superficial de

los huevos al ovipositar hembras infectadas, el parasitismo y el paso a través de los espiráculos (Cory y Evans, 2007).

Cuando los cuerpos de inclusión son ingeridos, debido al pH alcalino presente en los jugos estomacales del insecto, se produce la disolución de los cuerpos de inclusión, con la consecuente liberación de las partículas virales dentro del lumen (Winstanley y O' Reilly, 1999). Una vez liberados los viriones deben atravesar la membrana perotrófica del intestino, ayudados por la proteínas denominadas factores encadenantes de virus, que actúan alterando la integridad de la membrana perotrófica (Caballero *et al*., 2001).

Los viriones se fusionan a la membrana citoplasmática de las microvellosidades de las células del intestino medio. Una vez fusionadas, las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen al núcleo, donde liberan el ADN a través de los poros nucleares. Entonces comienza la trascripción de los genes virales generando una nueva progenie viral (Winstanley y O' Reilly, 1999).

De esta manera se forman nuevas nucleocápsides, las cuales pasan a través de la membrana nuclear adquiriendo una envoltura de dicha membrana, se alinean con la membrana plasmática en las base de la célula y emergen a través de ésta como viriones brotados (VB), que atraviesan la lámina basal y llegan a la hemolinfa (Winstanley y O' Reilly, 1999 y Caballero *et al.,* 2001)

Infección secundaria

La diseminación de la enfermedad dentro del hospedero es causada por la progenie de virus brotantes que infectan células vecinas y diversos tejidos, por medio de los hemocitos y las células traqueales. Una vez producida la infección secundaria, se produce la dispersión de la enfermedad por paso de los viriones brotados de célula a célula por endocitosis (Cory y Evans, 2007).

Avanzada la infección, el hospedero muere y en el caso de infecciones donde se ve afectada la epidermis, se produce la lisis del tegumento y la liberación de una masa de cuerpos de inclusión, que darán origen a un nuevo ciclo y proceso de infección (Caballero *et al.,* 2001).

2.5.3 Sintomatología

Las larvas infectadas por granulovirus exhiben síntomas característicos, que empiezan a manifestarse uno o varios días después de haberse iniciado la infección. En general se observa un cambio en la coloración, debido a la acumulación de cuerpos de inclusión en los tejidos afectados, que van desde amarillos hasta blanco; además los insectos exhiben menor movilidad, mayor flacidez, pérdida de apetito y retraso en el desarrollo (Caballero *et al.,* 2001 y Villamizar, 2006).

Figura 3. Sintomatología de la infección viral (Villamizar, 2006).

Caballero *et al.* (2001) señala que las larvas de lepidópteros infectadas, tienden a alejarse de su fuente de alimentación, emigrando hacia las partes superiores de las plantas. Tras la muerte de las larvas, el cadáver se melaniza y desintegra dependiendo del tipo de infección (Winstanley y O' Reilly, 1999).

2.6. Bioplaguicidas.

Como método principal para disminuir el impacto ambiental causado por el uso de productos químicos para el control de insectos plaga, hongos fitopatógenos, nemátodos y malezas, se emplea promisoriamente el control biológico, mediante el uso de microorganismos. Para su utilización es necesario desarrollar sistemas de producción y formulación de bioplaguicidas, productos que deben brindar la misma o una mayor eficiencia, que los productos químicos (Boyetchko y Hynes, 2006).

Para poder comercializar un bioplaguicida, es importante resaltar que su desarrollo implica el cumplimiento de diversas etapas que garanticen la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable (Gómez y Villamizar, 2000).

Según Fravel (2005), existen ciertos pasos críticos para impulsar un producto de este tipo al mercado: el aislamiento del microorganismo, las pruebas *in vitro* e *in vivo*, el desarrollo de un sistema de producción del agente biocontrolador, la formulación, la estandarización del proceso, la determinación de formas de aplicación, los estudios de mercadeo, el registro ante el ente competente y la entrega del producto al mercado.

2.6.1. Preformulación y formulación

La preformulación y formulación son etapas fundamentales en el desarrollo de un bioplaguicida (Gómez y Villamizar, 1996).

La preformulación se define como el conjunto de actividades organizadas encaminadas a la determinación de las características del principio activo y de los cambios químicos, físicos y microbiológicos, que éste pueda sufrir al combinarlo con los auxiliares de formulación necesarios para la elaboración del producto final (Gómez y Villamizar, 2000)

En toda formulación independiente de su uso final, se distinguen dos clases de componentes: el principio activo responsable de la actividad controladora y los

excipientes, que actúan como vehículos de la materia activa, sean sólidos o líquidos, ayudando al principio activo en el cumplimiento de su función, aumentando la persistencia en el ambiente o mejorando la acción (Gómez y Villamizar, 1996).

El propósito de la formulación es ofrecer un producto que sea útil, optimizando la eficiencia, estabilidad, seguridad y aplicación del ingrediente activo empleado. El tipo de formulación que se realiza, depende en muchos casos de la tecnología de aplicación con que se disponga y del mecanismo de acción del ingrediente activo, además de sus propiedades físico-químicas como solubilidad, voluminosidad y comportamiento en el organismo blanco (Galán, 2002).

2.7. Formulaciones sólidas.

2.7.1. Granulados.

La granulación es una operación contraria a la división de los sólidos, que aglomera sustancias finamente divididas mediante presión o por la adición de una sustancia aglutinante; la cual tiene como objetivos principales mejorar la humectabilidad y dispersibilidad del sólido en agua, facilitar la manipulación y dosificación, aumentar la compresibilidad y la densidad del producto y mejorar las características de flujo al producirse partículas de tamaño similar (Därr, 1981).

Una formulación granulada consiste en una mezcla de principio activo con un soporte mineral y un agente que le de cohesión. Los gránulos tienen un tamaño entre 0.2 mm y 1.5 mm; contiene del 5% al 20 % de principio activo, del 80% al 95% de soporte y del 1% al 5 % de adherente. El tamaño de los gránulos evita el problema de deriva y los riesgos para las personas que aplican el producto y para el ambiente, pues no produce emisiones de polvo. Las aplicaciones granulares se aplican directamente a las plantas o al suelo (Morales, 1993; Gómez y Villamizar, 2000).

2.7.2. Polvos.

Los polvos son productos secos formados de partículas sólidas. Las partículas difieren en forma, tamaño y peso y contactan mutuamente entre sí. La partícula individual se define como la unidad elemental de un polvo. Su forma depende del procedimiento utilizado para su preparación o pulverización (Voight y Bornschein, 1982). En general son formulaciones consistentes en un principio activo combinado con un material sólido, seco y muy finamente dividido. El tamaño de partícula oscila entre 5 – 200 µm (Burgues, 1998).

Los diluyentes empleados en este tipo de formulación son polvos finos; los talcos de silicatos son los más utilizados (Garzón, 2002). También se utilizan otros diluyentes de naturaleza botánica, como la harina de maíz, tierra de diatomeas, piedra caliza, oxido de zinc, oxido de magnesio, entre otras. Las tres principales características que se evalúan a este tipo de material son: la densidad, la fluidez y el tamaño de partícula (Morales, 1993; Gómez y Villamizar, 2000).

El costo de este producto suele ser menor en formulaciones más concentradas, pero se incrementa la peligrosidad y se requiere más cuidado de transporte, manipulación y disolución. Los polvos no suelen presentar problemas de fitotoxicidad ya que su soporte está constituido de minerales biológicamente inertes (Morales, 1993).

Estas formulaciones suelen ser compatibles con otros polvos y con fertilizantes. Su desventaja principal es el poder de sus componentes inertes que contribuye a un mayor y más rápido desgaste de las boquillas, bombas y otros elementos de los equipos de aplicación (Morales, 1993).

2.8. Características físico-químicas de los polvos.

Las características físico-químicas de los polvos están basadas en fenómenos físicos y reacciones químicas que depende directamente del tipo de formulación. De

la misma forma, estas características pueden influir en la estabilidad microbiológica, física y química y por lo tanto en la eficacia del producto.

Las principales características físico-químicas a determinar en los polvos son el tamaño de partícula, la porosidad, la fluidez, la humedad y el pH, características que no solamente se determinan para la estabilidad de la formulación, sino también para el proceso de producción (Voight y Bornschein, 1982).

2.8.1. Porosidad.

La porosidad de un producto en polvo es el resultado de sus espacios interparticulares, sumados a los de los poros internos y de las superficies de cada partícula. Por lo tanto, la penetración del agua en un producto con propiedades superficiales iguales, depende de la porosidad, la cual variará según las características físicas, los constituyentes y las fuerzas de aglomeración que se aplican al momento de la fabricación del producto (Voigh y Borns, 1982).

Los aglomerados dificultan la determinación del tamaño de partícula, e influyen en la fluidez del polvo de manera que desfavorecen en la mayoría de los casos los procedimientos de mezclado (Därr, 1981).

2.8.2. Fluidez.

La fluidez y la capacidad de deslizamiento, son de gran importancia en los polvos y preparados pulverulentos que se han dosificado volumétricamente. La fluidez es influenciada por diferentes factores, entre ellos la humedad del ambiente, el tamaño y la forma de las partículas, las fuerzas de adhesión y de cohesión (Därr, 1981).

La prueba de fluidez se realiza con el objetivo de establecer la facilidad de flujo de los productos secos en un sistema mecánico de alimentación, lo que permite inferir los problemas que se puedan presentar en los procesos de llenado y manipulación, en las etapas de producción (Mariño, 2001). Una de las formas para determinar la

fluidez es a través del ángulo de reposo como un indicativo de la intensidad de las fuerzas de rozamiento entre partículas sólidas (Voigh y Borns, 1982).

2.8.3. Humedad.

El porcentaje de humedad de un producto es importante, ya que esta característica influye en la posibilidad de crecimiento microbiano y en el flujo del material, pues si el porcentaje de humedad es alto el producto tenderá a formar aglomerados que no permitirán su flujo libre (Voight y Bornschein, 1982).

Según Valencia (2000) los porcentaje de humedad en un producto biológico menores al 5%, garantizan la latencia del microorganismo, permitiendo su almacenamiento y su viabilidad por períodos de tiempo prolongados.

2.8.4. Voluminosidad.

La voluminosidad se define como el volumen que ocupa un peso dado de un material, e incide sobre la posibilidad de llenado de recipientes, la facilidad de mezcla y la densidad global (Voigh y Borns, 1982)

La voluminosidad está determinada, en parte, por las propiedades químicas y físicas de los componentes sólidos de la formulación, además por la forma de interacción entre los distintos componentes, que a su vez dependen de condiciones ambientales (Gennaro, 1995).

2.8.5. pH.

El pH de una sustancia es la medida de su acidez o basicidad, la cual es definida en términos de la concentración del ión hidrogeno expresada como el logaritmo negativo de la misma. La escala numérica que se maneja va del valor extremo 0

para ácidos al valor 14 para básicos, teniendo como punto de equilibrio la neutralidad correspondiente a 7 (Allen *et al.,* 2005).

La acidez o alcalinidad de un producto está determinado por los auxiliares de formulación utilizados, ya que se fundamenta en la actividad del ion hidronio en solución (Contreras, 2005). El pH influye en la germinación y el crecimiento en la mayoría de los hongos, lo que puede tener repercusiones en el modo de la aplicación (Hong *et al*., 2000).

2.8.6. Tamaño de partícula.

Del tamaño de partícula depende la uniformidad en la distribución de los tamaños de aglomerados, de manera que se garantiza las propiedades adecuadas de humectación y fluidez, la adherencia a la superficie de sólidos, facilitando la manipulación del producto y el proceso de empaque y llenado del mismo (Voigh y Borns, 1982)

El tamaño de partícula también influye en el flujo y las propiedades de empaque, las cuales alteran el volumen durante este paso; para evitar este problema, el tamaño de la partícula debe ser definido durante la formulación y debe ser lo más uniforme posible. Los métodos más comunes para determinar el tamaño de las partículas son técnicas directas o indirectas (Gennaro, 1995).

A partir del tamaño y la forma de las partículas se determina el volumen y la constitución del polvo. Las partículas en forma de agujas o pequeños filamentos forman casi siempre empaquetamientos laxos, pues sólo se tocan con sus bordes y extremos, abundando los espacios llenos de aire. Mientras que las partículas de forma esférica y aplanada adoptan, por el contrario, un tipo de empaquetamiento más denso (Voigh y Borns, 1982).

Como la adherencia y la cohesión, son fenómenos que ocurren en la superficie, el tamaño de las partículas influye en la fluidez del polvo. En general, las partículas finas con una relación alta entre superficie y masa son más cohesivas que las

partículas gruesas sobre las que actúan en mayor medida la fuerza de gravedad (Aulton, 2004).

Las fuerzas de cohesión que actúan entre las partículas de un lecho en polvo corresponden sobre todo a fuerzas de van der Waals, inespecíficas y de corto alcance, que aumentan a medida que disminuye el tamaño de partículas y que varían con los cambio de la humedad relativa (Aulton, 2004).

Las técnicas directas miden el tamaño de las partículas por medio de una escala de calibración, como en microscopia y tamizado. Las mediciones indirectas aprovechan alguna característica de la partícula que se pueda relacionar con su tamaño, por ejemplo, la velocidad de sedimentación, la permeabilidad y las propiedades ópticas (Gennaro, 1995).

2.9. Estabilidad en almacenamiento.

La estabilidad se define como la capacidad de una formulación, de permanecer durante determinado tiempo con unas características, físicas, químicas y microbiológicas inalterables (Gennaro, 1995). Generalmente este período de tiempo, es el trascurrido entre la producción y su uso en campo (Burgues, 1998).

La formulación puede afectar muchos aspectos del desarrollo de un producto biológico, especialmente su almacenamiento y la seguridad. Pero tal vez es la estabilidad en almacenamiento, uno de las mayores problemas en el desarrollo de bioplaguicidas, ya que de ésta depende la viabilidad o actividad durante la distribución del producto en el mercado (Fravel, 2005; y Boyetchko y Hynes, 2006).

Durante el almacenamiento, los microorganismos pueden sufrir alteraciones debido a factores del proceso de manufactura del producto, como el medio de cultivo, el proceso de separación y secado y la utilización de agentes protectores de secado (Abadias *et al*., 2001)

Dependiendo del microorganismo biocontrolador, existen diferentes problemas durante el almacenamiento (Batta, 2004). Por ejemplo, Elzein *et al*. (2004) sugierieron que la estabilidad de un producto puede ser prolongada si se utilizan las estructuras de resistencia de los hongos como principio activo en la formulación.

Como ejemplo se encuentra el hongo *Fusarium* sp*.* el cual es utilizado como mycoherbicida y para su formulación se utilizan las clamidosporas, estructuras de resistencias que tienen una estabilidad inherente.

Factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa y la forma de empaque pueden afectar la viabilidad y actividad del agente biocontrolador (Boyetchko y Hynes, 2006).

La humedad relativa y control de la actividad de agua son importantes en el almacenamiento de microorganismos (De Cal *et al*., 2007). Muchas investigaciones han reportado que la longevidad de los condios de hongos formulados, aumenta a humedades relativas bajas (Friesen, 2006). Por ejemplo, el hongo *Alternaria alternata* en una formulación almacenada durante 24 meses a una humedad relativa del 12% y del 75 %, presentó una mayor longevidad de los conidios a la humedad relativa de 12% (Lelan, 2001).

La temperatura también juega un papel importante en la estabilidad de una formulación, ya que la temperatura óptima y sus límites dependen de cada microorganismo. En algunas ocasiones las bajas temperaturas detienen el crecimiento del microorganismo y mantiene su actividad antagónica (Küçük, 2005). Contrario a las temperaturas altas, las cuales pueden inactivar los microorganismos biocontroladores, si estos no son protegidos de alguna forma, generalmente incluyendo aditivos en la formulación (Burges, 1998).

Generalmente, entre más prolongada sea la exposición a altas temperaturas, existe un mayor efecto negativo sobre la formulación, por tal razón es recomendable seleccionar microorganismos que presenten un alto rango de tolerancia a diferentes temperaturas (Burges, 1998).

Teniendo en cuenta lo anterior, la estabilidad durante el almacenamiento depende de una adecuada formulación, la cual debe mantener la viabilidad y la actividad del agente biocontrolador.

2.10. Control de calidad de productos a base de hongos y virus como agentes de biocontrol.

Para poder comercializar un bioplaguicida es necesario realizar un control de las propiedades biológicas, físicas y químicas, que asegure al usuario, en este caso al agricultor, un producto lote tras lote, con la máxima eficacia en campo y con los requerimientos necesarios para su efectiva acción en contra de la plaga o del fitopatógeno a erradicar (Cenicafé, 1997).

Por lo tanto, una característica esencial en la producción de cualquier agente de control biológico es la implementación de un sistema de control de calidad eficiente. Las especificaciones del producto bien definidas, acompañadas de procedimientos de control de calidad ayudan a reducir los costos de manufactura, maximizar los rendimientos, certificar la seguridad del producto, y reducir los riesgos por fallas; logrando de este modo la confianza de los usuarios (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Un proceso de producción que no implemente un sistema de calidad es un proceso no controlado que posiblemente da lugar a lotes de bioproductos con concentraciones de agente activo variable y con una calidad deficiente. Esto se traduce en bioproductos de bajos rendimientos, lo cual es la principal causa de la pérdida de credibilidad ante los usuarios (Jenkins y Grzywacz, 2000).

El estricto control de calidad no solamente es esencial para dar repetibilidad en el bioproducto, sino también seguridad al mismo. En caso de que el control de calidad sea insuficiente, la contaminación microbiana puede ser un problema, que genera la perdida de la eficacia del bioproducto, debido a que el ingrediente activo compite con lo microorganismos contaminantes; además es posible la proliferación de bacterias que potencialmente sean patógenas para humanos o animales (Jenkins y Grzywacz, 2000).

En el caso de los bioplaguicidas a base de hongos, su eficiencia está relacionada con la seguridad y eficacia del bioproducto. Por esta razón, la implementación de un sistema de control de calidad debe ser incluida desde el inicio de la producción (Gaugler *et al*., 2000)

El microorganismo biocontrolador utilizado debe ser correctamente identificado macroscópicamente, microscópicamente y por último por medio de análisis moleculares, de esta manera se asegura que el microorganismo utilizado sea el mismo para todo el proceso de producción. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) insiste en la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio* spp. en el producto terminado, sin embargo son muy pocos los laboratorios que realizan este tipo de análisis en bioproductos, lo que en algunas ocasiones trae como consecuencia la no implementación de los mismos (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Las especificaciones para determinar un nivel aceptable de contaminantes en un producto final dependen en gran medida de los métodos de producción masiva, fermentación, formulación y empaque. El punto más crítico de posible contaminación es el periodo de producción masiva, debido a que los contaminantes, ya sean hongos o bacterias, pueden crecer rápidamente sin ningún tipo de restricción. Además, es necesario tener en cuenta que los procesos de formulación de productos microbianos generalmente no se realizan en condiciones de esterilidad, por lo que es inevitable la contaminación en la cadena de producción en este punto (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Los niveles de contaminación de bioproductos pueden ser cuantificados usando la técnica de recuento en placa utilizando los medios de cultivo apropiados para la detección de bacterias y hongos. Esta metodología provee un nivel de contaminantes expresada en Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mL o g de producto terminado. Con el fin de estandarizar el proceso de producción del microorganismo biocontrolador es necesario determinar los niveles de aceptabilidad de contaminación de microorganismos durante la producción, formulación y empaque del producto (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Sin embargo, para asegurar el rendimiento del bioproducto y la aceptación en el mercado, es necesario estandarizar su eficacia. Si un producto presenta una alta viabilidad y virulencia/patogenicidad su eficacia es la deseada (Jenkins y Grzywacz, 2000).

La viabilidad se determina fácilmente por el método de germinación en productos que tengan como principio activo hongos, ya que este método es rápido y a la vez

económico (Hong *et al*., 1999). Un método menos preciso es el recuento en placa para evaluar las UFC por gramo de producto. Este método es propenso a errores, ya sea por el analista o por que los conidios se adherieren entre sí y pueden formar colonias. Por lo tanto, el uso de recuento en placa para determinar la viabilidad no es muy utilizado (Jenkins y Grzywacz, 2000).

La virulencia/patogenicidad es generalmente verificada por medio de bioensayos estandarizados. El tipo de bioensayo empleado depende del producto, sin embargo la mayoría de los bioensayos tienen en cuenta la dosis recomendada y la comparación con el estándar o control. No es necesario realizar por cada lote de bioproducto un bioensayo, ya que si se encuentran estandarizados los procedimientos por un sistema de control de calidad, no debe variar significativamente la virulencia/patogenicidad del agente biocontrolador (Jenkins y Grzywacz, 2000).

A diferencia de los bioplaguicidas a base de hongos, en los productos a base de baculovirus la efectividad está relacionada con la generación de la infección y su efecto en el hospedero. Debido lo anterior, los procedimientos de control de calidad son implementados desde el inicio de la producción. Por esta razón, el virus utilizado debe ser identificado y caracterizado correctamente por medio de análisis moleculares y de esta manera asegurar la ausencia de contaminantes patógenos de insectos como esporas bacterianas y otros virus que pueden infectar el hospedero e interferir en la eficacia del virus de interés (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Dentro de los aspectos más importantes en la elaboración de bioplagucidas a base de baculovirus se encuentra la propagación viral, la cual en la mayoría de los casos se realiza *in vivo.* Debido a lo anterior es necesario asegurar que los insectos hospederos estén en las condiciones de temperatura, humedad y dieta adecuadas para su completo desarrollo. En este paso se debe monitorear estas condiciones, ya que se es vulnerable a la contaminación de entomopatógenos no deseados, lo que reduce la producción (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Debido a que los baculovirus son específicos para algunos grupos de insectos, son altamente seguros e inocuos para humanos y animales. Sin embargo, el riesgo principal para humanos y animales, es la posible contaminación en los sistemas de producción por bacterias y hongos patógenos, los cuales se pueden multiplicar en

el insecto hospedero durante su vida o en los cadáveres y heces de los mismos (Moscardi, 1999).

Por esta razón se debe realizar un recuento total de bacterias no patógenas, el cual normalmente no debe exceder 1 x 10^8 UFC/ml para productos formulados con una actividad de 1 x 10^9 cuerpos de inclusión/ml o 5 x 10^8 UFC/g para productos secos formulados (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Por último, la eficacia determinada por bioensayos es la herramienta de mayor importancia en el control de calidad durante la producción de baculovirus. Los valores de virulencia o patogenicidad que se obtengan con estas pruebas deberán estar dentro de los límites previamente establecidos por los productores durante su manufactura (Jenkins y Grzywacz, 2000).

La elección de los bioensayos depende de varios factores, sin embargo aquellos que utilizan larvas neonatas criadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, las cuales se infectan mediante gotas a beber o por contaminación superficial de su alimento son las más simples, ya que permiten comparar con relativa facilidad, reducen la variabilidad que puede presentarse cuando se usan larvas de mayor edad y producen resultados más consistentes (Jenkins y Grzywacz, 2000).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Rhizoctonia solani y *Tecia solanivora* son consideradas como problemas fitosanitarios importantes en el cultivo de papa. Para el control y manejo de esta enfermedad y plaga, el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica desarrolló un prototipo de bioplaguicida mixto a base de dos principios activos, *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus aislado de *Phthorimaea operculella.* Este producto biológico posiblemente presente una doble acción en el control de *Rhizoctonia solani* y *Tecia solanivora* en semilla de papa en almacenamiento. Este nuevo prototipo de bioplaguicida requiere ser caracterizado físico-química y microbiológicamente, para determinar si cumple con las especificaciones de calidad necesarias para este tipo de producto. De igual forma es necesario conocer su eficacia tanto *in planta,* como en almacenamiento de papa, para el control de los dos problemas fitosanitarios mencionados anteriormente.

4. JUSTIFICACIÓN

En Colombia, la papa es uno de los cultivos de mayor importancia económica en razón a que juega un papel fundamental en la canasta familiar. Este cultivo, está ligado a la tradición agrícola y de éste dependen cerca de 100.000 familias (Martínez *et al*., 2003).

Sin embargo, este cultivo presenta diferentes problemas fitosanitarios que afectan directamente la producción y la calidad del producto. Dentro de estos se encuentra *Rhizoctonia solani* conocida como la costra negra, que trae como consecuencia una baja producción y venta, ya que directamente influye en la decisión del consumidor, y puede causar una reducción en los rendimientos cercanos al 50% (Guerrero, 1998).

La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora,* es otro problema importante, ya que dependiendo de la infestación puede ocasionar pérdidas desde el 50% hasta el 100% bajo condiciones de almacenamiento (Corpoica, 1998).

La no rotación de cultivos, el uso indiscriminado de plaguicidas e insecticidas que en algunas ocasiones son altamente tóxicos para humanos y animales, la mala preparación del suelo, el uso de cosechas anteriores y principalmente el uso de semillas de mala calidad, son factores que determinan que esta enfermedad *(Rhizoctonia solani*) y esta plaga (*Tecia solanivora*) estén presentes año tras año en los cultivos (Alvarado, 1998).

En estudios adelantados por el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica, se seleccionó la cepa *Trichoderma koningiopsis* (Th003), la cual ha mostrado alta eficiencia para controlar fitopatógenos del suelo y foliares en diferentes patosistemas. A partir de esta cepa se desarrollaron dos prototipos de bioplaguicida, un granulado dispersable y un polvo mojable usando como principio activo los conidios de este hongo. Para estos dos prototipos se han realizados estudios de vida útil, en los cuales no se presentó una disminución significativa en la germinación de los conidios del hongo cuando los prototipos fueron almacenados durante 18 meses a 4º C.

La aplicación de estos prototipos de bioplaguicidas ha demostrando que disminuye la incidencia de los patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Betancour, 1997) y *Rhizoctonia solani* (Cárdenas, 1999) entre un 70% y un 100% en el cultivo de tomate respectivamente. Además, el prototipo polvo mojable ha mostrado un control eficiente de enfermedades foliares como el moho gris (*Botrytis cinerea*) y el mildeo polvoso (*Oidium* sp) en un 41% y un 85% repectivamente. (Moreno, 2003). En casa de malla, con plántulas de papa, Beltrán (2004) determinó que las plántulas tratadas con Th003 presentaron diferencias apreciables en tamaño, vigor y una protección cercana al 70% contra *Rhizoctonia solani*. Asimismo, estos productos han sido evaluados contra fitopatógenos como *Sclerotium cepivorom* en cebolla de bulbo (Paris y Cotes, 2002) y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar *et al*., 2004).

Corpoica también cuenta con un bioplaguicida a base del Baculovirus de *Phthorimaea operculella* registrado ante el ICA para el control de *Tecia solanivora*. Para la producción de este bioplaguicida se construyó y registró una planta de

manufactura con capacidad de 15 Toneladas de producto al mes y se firmó un convenio de cooperación científica y tecnológica con la empresa Vecol, para la producción comercial de este bioinsumo. Este producto ha presentado porcentajes de control de *Tecia solanivora,* superiores al 90% en condiciones de almacenamiento.

Como una solución alternativa para el control de *Rhizoctonia solani* y *Tecia solanivora*, el Laboratorio de Control Biológico desarrolló un nuevo prototipo de bioplaguicida mixto a base de los dos principios activos, conidios de *Trichoderma koningiopsis* y el granulovirus aislado de *Phthorimaea operculella*. Este prototipo presenta como ventaja principal, una posible doble acción de control frente a dos de los principales problemas fitosanitarios que presenta la semilla de papa en condiciones de almacenamiento. Además, plantea la posible disminución del uso de plaguicidas químicos, la implementación de una tecnología amigable para el ambiente y la disminución de costos para el agricultor.

Para continuar con el desarrollo se requiere caracterizar este nuevo prototipo de bioplaguicida determinando sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, su eficacia y estabilidad en almacenamiento, con miras a la optimización de la formulación, de manera que se cuente con un producto eficiente y de excelente calidad.

5. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar un prototipo de bioplaguicida a base *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus de *Phthorimaea operculella* para la protección de semilla de papa en almacenamiento**.**

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar físico-química y microbiológicamente un prototipo de bioplaguicida a base *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus de *Phthorimaea operculella.*

Determinar la eficacia del prototipo de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus de *Phthorimaea operculella* contra *Rhizoctonia* sp. y *Tecia solanivora.*

Evaluar la estabilidad del prototipo de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus de *Phthorimaea operculella* bajo condiciones de almacenamiento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica ubicado en el Km. 14 Vía Mosquera.

6.1. Producción de Principio activo *Trichoderma koningiopsis*

6.1.1. Microorganismo y medio de cultivo

La cepa de *Trichoderma koningiopsis* codificada como Th003 fue proporcionada por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Corpoica. Esta cepa fue seleccionada en trabajos previos por su eficiencia para el control de *Pythium sp, Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporium* (Cotes, 2001).

La cepa de *T. koningiopsis* fue recuperada en medio Agar Papa Dextrosa PDA (Anexo 1) e incubada a 25º C durante 8 días; posteriormente fue crioconservada en viales con glicerol al 10% y peptona al 0,1% , conformando de esta forma la colección de trabajo, de acuerdo a los Procedimientos Operativos Estandar (POES) establecidos por el Banco de Germoplasma.

6.1.2. Producción de *Trichoderma koningiopsis* Th003

Para la producción masiva de Th003 se utilizaron bolsas de polietileno de alta densidad, en las cuales se agregó el sustrato salvado, arroz y agua, en las proporciones estandarizadas previamente en el Laboratorio de Control Biológico. Posteriormente las bolsas fueron selladas con tapones de algodón y a continuación fueron esterilizadas en autoclave a 15 libras de presión y 120 ºC durante media hora (Beltrán, 2004).

Cada bolsa se inoculó con tres fragmentos de 1 cm^2 de medio PDA crecido con el microorganismo biocontrolador de 10 días de edad. Las bolsas fueron incubadas durante 10 días a 25 ºC en condiciones de luz constante. Durante este período de incubación las bolsas fueron agitadas suavemente cada dos días, para promover la colonización uniforme del hongo y evitar la compactación del sustrato (Beltrán, 2004).

El sustrato sólido esporulado se introdujo en un erlenmeyer de cuatro litros y se adicionaron 2000 ml Tween 80 al 0.1%, para facilitar el desprendimiento de los conidios mediante una agitación vigorosa. Posteriormente la mezcla se filtró por los procedimientos estandarizados por el Laboratorio de Control Biológico utilizando una tela fina y la suspensión obtenida fue centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos para concentrar los conidios, los cuales fueron recogidos para su posterior formulación.

6.1.3. Elaboración de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*.

La biomasa obtenida (Numeral 6.1.2) fue formulada de acuerdo a los procedimientos estandarizados por el área de formulación del Laboratorio de Control Biológico. Como control de calidad del producto se evaluó su viabilidad por la técnica de recuento en placa utilizando medio PDA + Tritón X100 al 0.1% (Anexo 1), y se determinó el porcentaje de germinación de conidios evaluado en medio Agar Extracto de Malta (Anexo 1).

Para lo anterior, se analizaron tres muestras del producto cada una de 1 gramo. Cada muestra se adicionó a un tubo de ensayo con 9 mL de una solución de Tween 80 al 0.1% y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7}. A partir de las tres últimas diluciones (10^{-5}, 10^{-6}; 10^{-7}) se sembraron por triplicado 100 µl de cada dilución en cajas de Petri con medio PDA + Tritón X100, las cuales fueron incubadas durante 96 horas a 25ºC. Transcurrido este tiempo se determino el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y el resultado se expresó como UFC/g del producto.

Para el porcentaje de germinación, se analizaron tres muestras del producto de 1 gramo, cada muestra fue reconstituida en un tubo de ensayo con 9 mL de una

solución de Tween 80 al 0.1% y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3}. A partir de las dos últimas diluciones se sembraron por triplicado 100 µl en cajas de Petri con medio Extracto de Malta y se incubaron durante 24 horas a 25 ºC. Tiempo después del cual se determinó el porcentaje de germinación de los conidios mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos, diferenciando conidios germinados y no germinados (Biotécnica, 2003).

El Porcentaje de Germinación se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Germinación\ (\%) = \frac{Conidios\ Germinados}{Conidios\ Totales} * 100$$

6.2. Elaboración del bioplaguicida a base de Baculovirus

A partir de la Unidad de Propagación Viral del Laboratorio de Control Biológico se obtuvieron larvas de *Tecia solanivora* infectadas con el aislamiento nativo de granulovirus (VG003). Estas larvas se maceraron y homogeneizaron con una solución tensioactiva, garantizando la homogeneidad de la suspensión viral obtenida.

Posteriormente esta suspensión viral fue mezclada con los auxiliares de formulación en proporciones establecidas previamente por el Laboratorio de Control Biológico para el producto comercial Baculovirus Corpoica.

La pasta húmeda obtenida fue deshidratada en un cuarto de secado a una temperatura de 18 ºC en condiciones de oscuridad, con el fin de garantizar la viabilidad del virus. Después de 24 horas la pasta seca fue molida en un molino y posteriormente almacenada para su uso.

6.3. Elaboración del prototipo de bioplaguicida a base de conidios de *T. koningiopsis* y Baculovirus.

El prototipo de bioplaguicida que incluye los dos principios activos fue elaborado por el área de formulación del Laboratorio de Control Biológico de acuerdo a las proporciones previamente establecidas.

6.4. Caracterización microbiológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus.

6.4.1. Concentración del principio activo *T. koningiopsis.*

Para estimar la concentración de *T. koningiopsis* expresada en Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por gramo de producto presentes en el prototipo de bioplaguicida, se realizó la técnica de recuento en placa. Para esto se tomó 1 g del producto y se adicionó a un tubo de ensayo con 9 mL de una solución de Tween 80 al 0.1%, siendo ésta la dilución 10^{-1}. La mezcla se homogeneizó en un vortex durante 1 min. Posteriormente se tomaron con una micropipeta, 1000 µL de la dilución 10^{-1} y se agregaron a un tubo de ensayo con 9 mL de una solución de Tween 80 al 0.1% (dilución 10^{-2}). Se continuaron realizando diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-7}.

A partir de las tres últimas diluciones (10^{-5}, 10^{-6}, y 10^{-7}) se sembraron por triplicado 100 µL de cada dilución en 3 cajas de Petri con medio Agar PDA + Tritón X100. Estas cajas se incubaron durante 8 días a 25ºC, después del cual, se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo del producto.

6.4.2. Germinación del principio activo *T. koningiopsis*.

Se analizaron muestras del prototipo de bioplaguicida de 1 g, las cuales se adicionaron a un tubo de ensayo con 9 mL de Tween 80 al 0.1%, siendo esta la dilución codificada como 10^{-1}. Esta mezcla se homogeneizó en un vortex durante 1 minuto. Posteriormente se tomaron con una micropipeta 1000 µl de la dilución 10^{-1} y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3}. A partir de las dos últimas diluciones (10^{-2} y 10^{-3}) se sembraron 100 µL de cada dilución en medio Agar Extracto de Malta. Estas cajas inoculadas se incubaron durante 24 horas a 22 ºC, pasadas las 24 horas de incubación, se adicionó una gota de azul de lactofenol sobre el medio inoculado para detener la germinación y a la vez teñir los conidios del hongo, luego se cortaron tres fragmentos de agar teñidos, los cuales se ubicaron sobre una lámina portaobjetos. Éstos fueron cubiertos con una laminilla y se realizó el conteo de conidios germinados y no germinados en 10 campos ópticos por fragmento (Biotécnica, 2003).

El porcentaje de germinación se determinó de la forma descrita en el numeral 6.1.3.

6.4.3. Contenido de contaminantes

Se pesó 1 g del producto, el cual se adicionó a un tubo de ensayo con 9 mL de una solución de Tween 80 al 0.1%, correspondiendo a la dilución 10^{-1}. La mezcla se homogeneizó en un vortex durante 1 minuto. Posteriormente se tomaron con una micropipeta, 1000 µl de la dilución 10^{-1} y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7}. A partir de las tres últimas diluciones (10^{-5}, 10^{-6}, y 10^{-7}) se sembraron 100 µL de cada dilución en la superficie de cajas de Petri con medio Agar PDA + TritonX100 (para conteo de hongos) y medio Agar Nutritivo (para conteo de bacterias) por triplicado distribuyendo homogéneamente el inóculo con ayuda de un rastrillo. Las cajas inoculadas se incubaron durante 48 horas para observar el crecimiento de bacterias y durante 7 días para observar el crecimiento de hongos. Transcurrido este tiempo se determinó macroscópicamente el crecimiento de las colonias

correspondientes a bacteria y a hongos y se realizó el recuento correspondiente en Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

El producto se aceptó o rechazó de acuerdo al límite establecido por el Laboratorio de Control Biológico, el cual indica que el bioplaguicida debe tener menos de 10^6 UFC de contaminantes por gramo de producto.

6.5. Caracterización físico-química del prototipo de bioplaguicida a base *T. koningiopsis* y Baculovirus.

6.5.1. Porosidad

Se pesaron 40 g del prototipo de bioplaguicida y se dejaron caer libremente en una probeta de 250 mL de base plástica ubicada en un soporte de madera y posteriormente se leyó el volumen ocupado por este material en la probeta (Volumen inicial V_i). La probeta fue levantada desde la parte superior y posteriormente se dejó caer libremente sobre la base del soporte. Este movimiento fue repetido 50 veces rotando la probeta aproximadamente unos 10º en cada movimiento. Al terminar este procedimiento se leyó el volumen ocupado por este material en la probeta (Vf). Para determinar la porosidad se utilizó la siguiente fórmula (Biotécnica, 2004):

$$Porosidad(\%) = \frac{\left(\frac{Vf}{40}\right)}{\left(\frac{Vi}{40}\right)} * 100$$

Este resultado se comparó con los valores estándares establecidos por el Laboratorio de Control Biológico. La determinación se realizó por triplicado (Biotécnica, 2004).

6.5.2. Fluidez Estática.

Para su determinación se pesaron 100 g de producto, los cuales se colocaron dentro de un embudo plástico con un orificio de salida de 2 cm de diámetro, tapado y ubicado a 10 cm de altura de una superficie horizontal en un soporte fijo.

Se destapó el orificio de salida y una vez el producto cayó completamente sobre la superficie horizontal, se midió el diámetro (d) y la altura (h) del cono formado por el material. Con las medidas de altura y diámetro se calculó el ángulo de reposo mediante la fórmula:

$$\text{Tan } \alpha = a / r$$

$$\text{Fluidez} = 1 / \text{Tan } \alpha$$

Donde: a = altura del cono, r = radio del cono

Este determinación se realizó por triplicado y se comparó con el rango de aceptación establecido por el Laboratorio de Control Biológico (Biotécnica, 2004).

6.5.3.Humedad.

El porcentaje de humedad se determinó por la técnica de pérdida de peso por secado. Se utilizó una balanza de humedad halógena OHAUS MB 45, para lo cual se colocaron 0.5 g de producto en el plato de la balanza y se inició la medida. El resultado se leyó en la pantalla del equipo una vez se termino de secar la muestra. La determinación se realizó por triplicado y el resultado se comparó con los rangos de aceptación establecidos por el Laboratorio de Control Biológico (Biotécnica, 2004).

6.5.4. Voluminosidad

Para su determinación se pesaron 40 g de producto, los cuales se introdujeron en una probeta de 250 mL de base plástica ubicada dentro de un soporte de madera. El volumen ocupado por el material (Vi) se leyó y posteriormente se determinó la voluminosidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Voluminosidad} = \frac{Vi}{40g}$$

Esta determinación se realizó por triplicado y el resultado se comparó con los rangos de aceptación establecidos por el Laboratorio de Control Biológico

6.5.5. pH

Se pesó 1 g del producto y se suspendió en 100 mL de agua destilada desionizada, después se medió el pH con el potenciómetro marca Hanna Instruments (Hi-8314) previamente calibrado. Cada determinación se realizó por triplicado (Biotécnica, 2004).

6.5.6. Tamaño de partícula

Se tomaron 100 g de producto, los cuales se ubicaron en el primer tamiz de una columna de tamices organizados según el tamaño de poro, de manera descendente, los cuales fueron asegurados a un shaker vibratorio. Seguido de esto se accionó el shaker durante 10 minutos, después del cual se pesó el material retenido en cada tamiz.

Se determinó en cual de los tamices quedó la mayor cantidad de peso retenido. Si la mayor cantidad de material quedó retenido en un solo tamiz, el resultado se expresó de la siguiente forma: Tamaño de partícula del material que oscila entre el tamaño

de poro del tamiz anterior y el tamaño de poro del tamiz donde quedó retenido el material. Si la mayoría del material quedó retenido en el colector, el resultado se expresa: Tamaño de partícula del material inferior al tamaño de poro del último tamiz. Esta característica se determinó por triplicado y se comparó con los rangos de aceptación establecidos por el Laboratorio de Control Biológico (Biotécnica, 2004).

6.6. Actividad Biocontroladora

6.6.1. Prueba de patogenicidad en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta.*

Con el objetivo de reproducir los síntomas que produce *Rhizoctonia solani* en papa criolla *(Solanum phureja),* determinar la concentración más infectiva y seleccionar el aislamiento que sea más patogénico entre dos aislamientos de *R. solani*, se realizó una prueba de patogenicidad.

Los dos aislamientos codificados como *Rh176* y *Rh200* fueron suministrados por el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Control Biológico. Estos aislamientos fueron cultivados en medio PDA (Anexo 1) para su utilización en el bioensayo.

Este bioensayo contó con un tratamiento testigo, consistente en recipientes plásticos de 16 onzas de capacidad, los cuales fueron llenados con 300 g de suelo, y tres tratamientos que consistieron en recipientes plásticos que contenían la misma cantidad de suelo mencionada anteriormente inoculado con las diferentes dosis y cepas del patógeno. Todos los tratamientos contaron con 10 unidades experimentales, en las cuales se sembró una semilla de papa de la variedad papa criolla (*Solanum phureja*) sin presencia de esclerocios o del fitopatogeno. Posteriormente los recipientes plásticos fueron inoculados con diferente números de discos de agar con el patógeno crecido (4, 8 y 16 discos). El anterior procedimiento se realizó para los dos aislamientos de *R. solani.*

Los tratamientos evaluados presentaron la siguiente codificación:

Tabla 3. Tratamientos de la prueba de patogenicidad:

Código	Tratamiento
T_0	Testigo Absoluto.
T_1	Inoculación de 4 discos de agar/ por recipiente.
T_2	Inoculación de 8 discos de agar/ por recipiente.
T_3	Inoculación de 16 discos de agar/ por recipiente.

Para la inoculación de cada tratamiento, se colocaron el número de discos de medio PDA (Anexo 1) con el hongo crecido que corresponda a cada tratamiento a una profundidad de 1 cm dentro del suelo y a una distancia aproximada de 0.5 cm con respecto a la semilla de papa, cada disco de agar presentaba un área de 19.63 mm^2.

El bioensayo contó con un diseño completamente al azar y cada tratamiento contó con 10 replicas (unidades experimentales). Transcurrido 30 días de sembradas las papas, se evaluaron las siguientes variables: incidencia del patógeno, número de tallos y brotes, peso seco y peso húmedo (parte aérea y parte radicular) (Beltrán, 2002). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (α=0.05), empleando el programa Statistix versión 3.0.

Los resultados permitieron seleccionar la cantidad de inóculo y el aislamiento más patogénico para la semilla de papa variedad papa criolla, condiciones que se utilizaron para evaluar la actividad biocontroladora del prototipo de bioplaguicida.

6.6.2. Prueba de eficacia contra *R. solani* en condiciones *in planta*

El siguiente bioensayo se realizó con el fin de evaluar la eficacia del bioplaguicida aplicado sobre el tubérculo – semilla y esté posteriormente sembrado en suelo inoculado con *Rhizoctonia solani*.

Para este bioensayo se utilizaron recipientes plásticos de 16 onzas de capacidad con 300 g suelo inoculado con 16 discos de agar colonizados con el aislamiento de *Rhizoctonia solani* seleccionado en la prueba de patogenicidad (Numeral 6.6.1).

En los tratamientos correspondientes a los prototipos de bioplaguicidas, la semilla de papa antes de sembrar fue recubierta utilizando la dosis recomendada (5 g por Kilo de papa). En cada tratamiento se utilizaron 10 papas, las cuales fueron pesadas y colocadas en una bolsa de polietileno, en la cual se adicionó la dosis recomendada de bioplaguicida. Las bolsas fueron agitadas vigorosamente hasta que los tubérculos quedaron completamente cubiertos. Posteriormente estos tubérculos-semilla fueron sembrados individualmente en los recipientes plásticos con suelo inoculado con el patógeno.

Tabla 4. Tratamientos de la prueba de eficacia *in planta:*

Código	**Tratamiento**
Control	Testigo Absoluto.
T_0	Testigo Patógeno (Tubérculo semilla sembrada en suelo con *Rhizoctonia solani*)
T_1	Tubérculo semilla tratado con el bioplaguicida que combina los dos principios activos (*T, koningiopsis* y *Baculovirus*).
T_2	Tubérculo semilla tratado con *Trichoderma koningiopsis,* formulación en polvo.

El bioensayo contó con un diseño completamente al azar y cada tratamiento con 10 replicas. Transcurridos 30 días de sembradas las papas, se evaluaron las siguientes variables: incidencia del patógeno, número de tallos y brotes, peso seco y peso húmedo (parte aérea y parte radicular) (Beltrán, 2002). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (α=0.05), empleando el programa Statistix versión 3.0.

El porcentaje de eficacia se determino de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Eficacia\ (\%) = \frac{a - b}{a} * 100$$

Donde **(a)** es la incidencia en el testigo patógeno y **(b)** la incidencia en el tratamiento evaluado.

6.6.3 Prueba de eficacia contra *R. solani* en condiciones de almacenamiento

El siguiente bioensayo se realizó con el fin de evaluar la eficacia del bioplaguicida aplicado al tubérculo – semilla que presenta el fitopatogeno *Rhizoctonia solani* en condiciones de almacenamiento.

Para este bioensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y 5 unidades experimentales por tratamiento. La semilla de papa variedad papa criolla utilizada se seleccionó de tal forma que tuviera un rango de esclerocios de *R. solani* entre 8-10 esclerocios por papa.

En cada tratamiento en donde se aplicó algún prototipo de bioplaguicida, las papas criollas se recubrieron con cada prototipo de bioplaguicida utilizando la dosis recomendada y siguiendo la metodología previamente descrita.

Los tubérculos inoculados se ubicaron individualmente en recipientes plásticos de 16 onzas, los cuales fueron tapados y mantenidos en condiciones de oscuridad,

similares a las utilizadas por el agricultor. Después de 15 días, se evaluó, la presencia de patógeno y el número de brotes y el peso de los mismos para cada papa.

El porcentaje de eficacia se determino de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Eficacia\ (\%) = \frac{a - b}{a} * 100$$

Donde **a** es la incidencia en el testigo patógeno y **b** es la incidencia en el tratamiento evaluado.

Tabla 5. Tratamientos evaluaos en la prueba de eficacia con *R. solani*

Código	Tratamiento
T_0	Testigo Absoluto.
T_1	Tubérculo semilla tratado con el bioplaguicida que combina los dos principios activos (*T. koningiopsis* y *Baculovirus*).
T_2	Tubérculo semilla tratado con *Trichoderma koningiopsis,* formulación en polvo

6.7.2 Prueba de eficacia contra *Tecia solanivora*

Con el objeto de determinar la eficacia del prototipo de bioplaguicida contra *Tecia solanivora* en condiciones de almacenamiento se realizó un bioensayo.

Se contó con un testigo y dos tratamientos cada uno con 3 unidades experimentales correspondientes a 3 papas pastusas. La metodología implementada en la aplicación de los prototipos de bioplaguicidas corresponden a los utilizados en el numeral 6.6.1. Los tratamientos evaluados fueron:

Tabla 6. Tratamientos evaluados en la prueba de eficacia con *T. solanivora*

Código	Tratamiento
T_0	Testigo Absoluto.
T_1	Tubérculo semilla tratado con el bioplaguicida que combina los dos principios activos (*T. koningiopsis* y *Baculovirus*).
T_3	Tubérculo semilla tratado con Baculovirus, formulación en polvo

Cada papa tratada con el prototipo de bioplaguicida se ubicó en un vaso de capacidad de 16 onzas con aproximadamente 60 g de arena estéril. Con la ayuda de un pincel estéril, se colocaron 10 larvas neonatas de *T. solanivora* sobre cada tubérculo. El total de individuos por tratamiento fue de 30, distribuidos en las 3 unidades experimentales. Posteriormente, estos recipientes plásticos fueron colocados en condiciones de oscuridad permanente y una temperatura promedio de 20ºC.

Transcurridos 25 días se evaluó por análisis destructivo de los tubérculos, y se contó el número de larvas muertas y vivas, resultado con el que se calculó el porcentaje de eficacia según la fórmula de Schneider – Orelly (Gómez, 2006).

6.8. Estabilidad del bioplaguicida mixto en condiciones de almacenamiento

Para la evaluación de la estabilidad del prototipo de bioplaguicida bajo condiciones de almacenamiento se empacaron muestras de 20 g del prototipo del bioplagucida que combina los dos principios activos, conidios de *T. koningiopsis* y *Baculovirus,* en bolsas de polietileno selladas al vacío. Este tratamiento fue codificado como T_1. Como tratamientos controles se almacenaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, los prototipos de bioplaguicidas a base de conidios de *T. koningiopsis* formulación en polvo y el producto comercial a base de *Baculovirus,* formulación en polvo, codificados como T_2 y T_3, respectivamente. Todas las

muestras empacadas fueron almacenadas a tres diferentes temperaturas 8ºC, 18 ºC y 28º C, durante tres meses.

Para la determinación de la estabilidad físico-química en almacenamiento del prototipo de bioplaguicida que combina los dos principios activos (T_1), cada mes y por cada temperatura de almacenamiento se analizaron 3 muestras, utilizando las pruebas correspondientes al numeral 6.4

Para la estabilidad microbiológica del prototipo, se evaluaron dos muestras mensuales por tratamiento, almacenadas a cada temperatura, determinando la concentración en UFC/g del principio activo *T. koningiopsis*, la germinación del mismo y la pureza del producto, metodologías descritas en el numeral 6.3.

Adicionalmente se determinó la estabilidad de la actividad biocontroladora utilizando las metodologías de los bioensayos descritos en los numerales 6.6.2. y 6.7. Para tal fin se determinó la eficacia de los prototipos, la cual fue evaluada nuevamente pasados mes y medio de almacenamiento y 3 meses de almacenamiento a cada temperatura.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Desarrollo del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *Trichoderma koningiopsis* y Baculovirus.

7.1.1. Elaboración del producto a base de *T. koningiopsis*

El hongo *T. koningiopsis* (Th003) se produjo mediante fermentación sólida en bolsas de polietileno de alta densidad que contenían un medio sólido de arroz humedecido con agua. En este medio sólido, *T. koningiopsis* creció de forma abundante y uniforme sobre todo el sustrato, observándose la formación de micelio de color blanco en los primeros días de incubación y posteriormente una coloración verde oscura debido a la esporulación del hongo después de siete días de incubación.

El sustrato sólido esporulado se lavó con una solución de Tween 80 al 0,1%, y se obtuvo una suspensión de coloración verde intensa. Esta suspensión se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos para la obtención de la biomasa húmeda, la cual posteriormente se mezcló con los excipientes de la formulación y se secó durante 24 horas a 28 ºC.

El producto seco fue molido y tamizado y posteriormente fue caracterizado teniendo en cuenta parámetros como concentración de conidios por gramo, viabilidad, germinación y pureza. Estas características son de gran importancia para el proceso de producción del bioplaguicida mixto a base de conidios de *T. koningiopsis* y Baculovirus, ya que garantizan que el hongo tendrá las características de calidad necesarias para que el producto sea viable, eficaz y estable bajo condiciones de almacenamiento.

La concentración promedio del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* fue de 2,32 x 10^{10} conidios/g, concentración adecuada para este tipo de producto, que normalmente es reconstituido en agua para su aplicación, utilizando concentraciones finales de 10^6 a 10^7 conidios/mL (Verma *et al*., 2007), lo que índica

que la dosis de aplicación para este producto estaría alrededor de 40 a 400g por hectárea.

La concentración del producto obtenido es aproximadamente 10 veces mayor que el reportado por la mayoría de bioinsumos comerciales registrados en el mundo a base de *Trichoderma* sp., los cuales presentan una concentración promedio de 10^9 conidios/g (Verma *et al*., 2007).

La viabilidad del producto se evaluó por medio de la técnica de recuento en placa, obteniéndose un promedio de 2,62 x 10^{10} UFC por gramo de producto. Resultados similares reportó Garzón (2002), quién obtuvo una viabilidad de 3,4 x 10^{10} UFC/g para el mismo producto evaluado en el presente estudio, valor que se consideró adecuado al ser comparado con los valores de viabilidad reportados para los productos comerciales disponibles en el mercado.

Teniendo en cuenta que los valores tanto de viabilidad, como de concentración del producto a base de *T. koningiopsis*, son del orden de 10^{10} y los coeficientes correspondientes son muy cercanos, es posible sugerir que la totalidad de las células presentes en el bioproducto son viables. Este resultado es de gran importancia, ya que si se obtiene una alta concentración de células pero éstas no son viables, el producto no será eficaz y estable bajo condiciones de almacenamiento.

Además de la técnica de recuento en placa, la viabilidad del microorganismo se determinó por medio de la técnica de germinación, con la cual se obtuvieron resultados superiores al 95% de germinación a las 24 horas de incubación, indicando que más del 95% de lo conidios del hongo, son capaces de germinar en menos de 24 horas, si se encuentran en condiciones de humedad y temperatura adecuadas.

Este valor es óptimo, teniendo en cuenta lo establecido por Cenicafé (1997), quién sugiere que una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Resultados similares obtuvo Garzón (2002) al evaluar la germinación de prototipos de formulaciones a base de la misma cepa utilizada en este estudio, obteniendo porcentajes de germinación entre el 80,8% y el 96,1%.a las 18 horas de incubación. Además, cabe destacar que la germinación

obtenida para el producto en este estudio, es superior a las presentadas por otros bioproductos que se comercializan a nivel nacional e internacional (Jenkins y Grzywacz, 2000).

La alta germinación de los conidios de *T. koningiopsis* en el producto elaborado en el presente trabajo, permite inferir que al aplicarlo, el agente biocontrolador actuará rápidamente sobre el fitopatógeno objeto de control.

El bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* presentó un contenido de contaminantes de $2{,}78 \times 10^4$ UFC/g, es decir, que su nivel de contaminación fue inferior a 10^6 UFC/g, límite establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica (Biotécnica, 2004) para este tipo de producto.

La contaminación de bioproductos con microorganismos diferentes al principio activo, puede ser debida a la introducción de microorganismos contaminantes durante las operaciones unitarias del proceso de manufactura. Se puede sugerir que el proceso utilizado para la elaboración del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* se realizó bajo condiciones adecuadas de limpieza y sanitización de equipos y áreas y con materias primas de alta calidad. Además, el tipo de contaminantes encontrados en el producto no son microorganismos fitopatógenos, ni patógenos de animales o humanos, lo cual garantiza la seguridad e inocuidad del producto cuando sea aplicado en campo.

7.1.2. Elaboración del bioplaguicida a base de *Baculovirus.*

De la unidad de Propagación Viral del Laboratorio de Control Biológico se obtuvieron larvas de *Tecia solanivora* infectadas con el aislamiento nativo de granulovirus codificado como VG003, las cuales se maceraron en una solución tensioactiva, ajustando a una concentración final de 4×10^6 CI/mL.

Esta suspensión se mezcló con los auxiliares de formulación para obtener el producto a base de Baculovirus, el cual fue sometido a las pruebas de control de calidad de producto terminado que el Laboratorio de Control de Calidad Biotécnica registró ante el ICA para este bioinsumo en el año 2004.

El bioplaguicida a base de Baculovirus presentó una contaminación de $2{,}48x10^2$ UFC/g, valor que es inferior al límite máximo establecido para esta característica por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicida Biotécnica (2004), el cual equivale a 10^6 UFC/g. La contaminación presente en el producto podría provenir de las larvas infectadas con Baculovirus que se utilizaron como principio activo, ya que en éstas se pueden encontrar microorganismos colonizadores del intestino del insecto o saprófagos oportunistas que son contaminantes directos del producto o del proceso de fabricación (Caballero *et al.*, 2001).

Debido al bajo contenido de contaminantes del producto a base de Baculovirus, es posible garantizar la inocuidad y seguridad del mismo cuando sea manipulado por el agricultor y aplicado en campo debido a la no presencia de microorganismos potencialmente patógenos para los humanos.

7.1.3. Elaboración del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *Trichoderma koningiopsis* y Baculovirus.

Para elaborar el prototipo de bioplaguicida mixto a base de *Trichoderma koningiopsis* y *Baculovirus* se realizó una mezcla de los dos productos elaborados previamente, de acuerdo a la proporción establecida por el Laboratorio de Control Biológico, para obtener las concentraciones finales adecuadas para cada microorganismo.

Posteriormente, el prototipo de bioplaguicida mixto fue caracterizado teniendo en cuenta parámetros físicoquímicos, microbiológicos y biológicos.

7.2. Caracterización microbiológica del prototipo de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* y Baculovirus.

7.2.1. Concentración del principio activo *T. koningiopsis*

La determinación de la concentración del principio activo en el prototipo de bioplaguicida se evaluó mediante la técnica de recuento de placa y se expresó como Unidades Formadores de Colonia por gramo de producto (UFC/g).

El bioplaguicida mixto presentó una concentración promedio de *T. koningiopsis* de 4,08 x 10^8 UFC/g de producto, lo que indica que el producto original a base de dicho hongo se diluyó 56 veces, considerando que su concentración original fue de 2,32 x 10^{10} UFC/g de producto.

Teniendo en cuenta que la dosis del producto es de 5 gramos por Kilo de papa criolla o pastusa, la concentración de *T. koningiopsis* en el prototipo de bioplaguicida mixto, asegura una dosis por unidad de papa criolla de 1,7x10^6 UFC y de 3,4 x 10^6 UFC por unidad de papa pastusa aproximadamente. Esta dosis se espera que sea efectiva para el control de *R. solani* basados en los resultados de París *et al*. (2003), quienes evaluaron la eficacia de *T. koningiopsis* mediante inmersión de tubérculos de papa en una suspensión ajustada a 10^7 conidios/mL, en donde una dosis aproximada de 10^6 conidios/papa quedaron adheridos al tubérculo, ejerciendo un control eficiente de *R. solani*. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que este método de inoculación no es homogéneo y genera escorrentía. En dicho trabajo se evidenció que los tubérculos tratados presentaron brotes sanos, de mayor desarrollo y vigor a diferencia de los tubérculos no tratados con el agente biocontrolador.

7.2.2. Germinación del principio activo *T. koningiopsis*

Además del recuento en placa, la viabilidad del prototipo de bioplaguicida se determinó por medio de la evaluación del porcentaje de germinación, donde se obtuvo un resultado superior al 95% a las 24 horas de incubación. Este valor es

igual al obtenido durante la caracterización del producto inicial a base de *T. koningiopsis,* lo que sugiere que los excipientes de la formulación y el proceso de elaboración del bioplaguicida mixto no afectó la viabilidad de los conidios del hongo. Lo que es de esperarse ya que el producto final a base de *T. koningiopsis*, fue mezclado con el producto a base de Baculovirus, cuyo componente mayoritario es un soporte inerte del grupo de los silicatos, el cual es un material que posiblemente no afectó la viabilidad de los conidios.

Este tipo de soportes inertes son de amplio uso en formulaciones a base de *Trichoderma* sp. Un ejemplo de lo anterior, son las formulaciones desarrolladas por Thangavelu *et al*. (2004) y Verma *et al*. (2007), los cuales incorporaron silicatos dentro de los excipientes del bioinsumo, obteniendo productos con concentraciones cercanas a 10^8 UFC/g.

La alta germinación obtenida para el bioplaguicida mixto garantiza que el producto tendrá un rápido efecto sobre la población del fitopatógeno a controlar, una vez sea aplicado sobre la semilla de papa en condiciones de almacenamiento.

El porcentaje de germinación de los conidios de *T. koningiopsis* obtenido con el bioplaguicida mixto se encuentra dentro de los estándares nacionales e internacionales de calidad que rigen este tipo de bioinsumos, para los que se exige una viabilidad superior al 85% utilizando el método directo de recuento de conidios germinados y no germinados en microscopio (Cenicafe, 1997; Jenkins y Grzywacz, 2000).

7.2.3. Contenido de contaminantes en el prototipo de bioplaguicida mixto.

El prototipo de bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus presentó un nivel aceptable de contaminación, el cual fue de $2{,}17 \times 10^4$ UFC/g, valor que se encontró dentro de el límite de contaminación establecido el cual es de 10^6 UFC/g de contaminantes (Biotécnica, 2004). A partir de lo anterior, es posible sugerir que el nivel de contaminación durante todo el proceso de producción fue controlado eficientemente.

La baja contaminación del producto indica que el bioplaguicida Baculovirus no presentó una alta carga microbiana, lo que podría deberse a la oportuna recolección de las larvas infectadas, las cuales fueron cosechadas antes de morir, evitando la proliferación de bacterias contaminantes que generalmente se encuentran en el intestino del insecto (principalmente *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*) o de saprófagos oportunistas (Caballero *et al*., 2001).

El bajo nivel de contaminación presente en el prototipo de bioplaguicida mixto posiblemente no influirá en la viabilidad de los dos principios activos durante la etapa de almacenamiento, ya que la baja presencia de contaminantes evitará la competencia entre éstos y los principios activos. Lo anterior fue evidenciado por Jenkins y Grzywacz (2000) al evaluar la pureza de diversas muestras de bioplaguicidas, concluyendo que muestras de bioproductos a base de *Trichoderma* sp. que presentan una alta contaminación, disminuyen drásticamente la viabilidad del principio activo.

Además de asegurar la viabilidad de los principios activos, la baja contaminación del producto permite que éste sea seguro cuando se realice la aplicación sobre la semilla de papa, tanto para el producto agrícola, como para las personas que realizan su manipulación.

7.3. Caracterización Fisicoquímica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus

7.3.1. Porosidad

La porosidad depende de la forma y distribución de las partículas, también de la rugosidad de las superficies y de la forma de empaquetamiento de las mismas (Aulton, 2004).

El prototipo de bioplaguicida presentó una porosidad de 39,99 ± 0,89 % (Tabla 7). El valor óptimo de esta característica establecido por la industria farmacéutica es menor al 60% (Aulton, 2004). Lo que índica el prototipo no presenta una alta

cantidad de espacios inter e intraparticulares. Este valor de porosidad indica que el prototipo de bioplaguicida por poseer una proporción adecuada de espacios intra e interparticulares, posiblemente no presentará problemas durante el proceso de manipulación y almacenamiento (Aulton, 2004).

Garzón (2002) obtuvo porosidades similares a las obtenidas en este estudio al evaluar preformulados en polvo a base de *Trichoderma koningiopsis,* valores entre el 21% y el 35%, sugiriendo que ninguno de los polvos presentaría problemas de absorción de agua en el momento de su aplicación y de manipulación.

Una baja proporción de espacios entre las partículas del producto es recomendable, ya que el material podría compactarse sobre los tubérculos y es posible que su permanencia sobre la semilla de papa sea mayor, debido a que se disminuye la posibilidad de ser arrastrado por corrientes de aire generadas en el lugar de almacenamiento. Sin embargo, la presencia de espacios intra e interparticulares es necesaria para la hidratación del prototipo, puesto que permitirá una mejor absorción de agua del medio ambiente, especialmente para el principio activo *T. koningiopsis*, ya que la humedad es necesaria para inducir la germinación del microorganismo y la posterior competición con el fitopatógeno a controlar.

7.3.2. Fluidez Estática

La fluidez es importante durante el proceso de manufactura de un producto, ya que determina el tipo de sistema de alimentación mecánica requerida para realizar eficientemente el proceso (Aulton, 2004).

La capacidad de flujo del prototipo de bioplaguicida fue determinada por la medida del ángulo de reposo estático. Éste es el ángulo del cono producido respecto al plano horizontal, cuando se le deja caer libremente un material desde un embudo (Martin y Sinko, 2005). El prototipo de bioplaguicida no presentó flujo libre y necesitó vibración para permitir la caída del material a partir del embudo. El ángulo de reposo del prototipo fue de 43,82 ± 1,62º (Tabla 7), el cual se encuentra por encima del límite establecido por el Laboratorio de Control Calidad de Bioplaguicida Biotécnica (Biotécnica, 2004), correspondiente a un ángulo menor 30º. Este resultado sugiere

que el prototipo de bioplaguicida es ligeramente cohesivo y posiblemente presentará problemas en los procesos de llenados de recipientes.

Las fuerzas de cohesión y de rozamiento de las partículas influyen en la forma del cono formado. Debido a lo anterior, es posible inferir que las partículas del bioplaguicida tienen una relación alta entre superficie y masa que hacen que el material no sea de flujo libre (Aulton, 2004).

La fluidez estática del prototipo de bioplaguicida está directamente relacionada con el soporte inerte utilizado en la formulación, ya que éste presenta una estructura reticular con fuerzas de Van der Waals débiles (Voight y Bomschein, 1982). Estas fuerzas de Van der Waals dependen de la forma, densidad y tamaño de las partículas, entre más irregulares y pequeñas sean las partículas aumentará la cohesión y disminuirá la fluidez (Aulton, 2004). Estas características de las partículas son el resultado directo del proceso de mezcla durante la producción, ya que el mezclado puede alterar la forma por erosión y fragmentación produciendo partículas de forma irregular (Voight y Bomschein, 1982).

Es posible que debido a la baja fluidez, el prototipo de bioplaguicida presente inconvenientes en las etapas de llenado de los recipientes en un proceso industrial, por esta razón es importante corregir esta característica en la fase de optimización del producto, especialmente en el proceso de molienda, para obtener un tamaño de partícula más homogéneo. Sin embargo, como el material utilizado como diluente es ligeramente cohesivo por naturaleza, será difícil mejorar sus propiedades de flujo y puede ser necesario utilizar equipos diseñados para manipular materiales de baja fluidez o adicionar a la formulación un lubricante durante la etapa de optimización.

7.3.3 Humedad

La humedad es un parámetro importante en la estabilidad de un producto biológico, siendo recomendables humedades inferiores al 5%, que permiten que los microorganismos se conserven viables y virulentos durante su almacenamiento ya que disminuye el metabolismo de los mismos (Lawrie *et al*., 2001).

Para este parámetro, el bioplaguicida presentó un porcentaje de humedad de 0,52 ± 0,11% (Tabla 7), resultado que se encuentra en el rango de aceptación establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicida Biotecnica, que recomienda que esta característica sea menor al 5% (Biotécnica, 2004).

Este valor se debe principalmente al vehículo inerte utilizado en la formulación, ya que su capacidad de retención de agua es mínima (Voight y Bomschein, 1982). Este bajo porcentaje de humedad posiblemente disminuirá la tasa metabólica del principio activo *T. koningiopsis,* evitando la acumulación de metabolitos tóxicos que afectan su viabilidad (Abadías *et al*., 2003). Además, este porcentaje de humedad disminuye los posibles cambios químicos en la formulación y por lo tanto, se evitan interacciones que afectan la estabilidad de las partículas virales de Baculovirus (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Garzón (2002) evaluó el porcentaje de humedad de distintos preformulados a base de *T. koningiopsis,* encontrando porcentajes del 5.7% hasta 15,2%. A pesar de ser valores por encima del limite establecido, el autor consideró aceptables los valores de humedad para este tipo de productos, ya que disminuye el metabolismo microbiano y permite el almacenamiento del microorganismo sin afectar la viabilidad y evita la inducción de estados de latencia (Cenicafé, 1997)

Este rango de valores de humedad indica indirectamente, que el tiempo empleado en el proceso de secado del prototipo de bioplaguicida (24 horas) fue adecuado para obtener un producto dentro el rango de aceptación (humedades inferiores al 5%) y de esta manera, asegurar la viabilidad de los principios activos.

La humedad también influye de forma indirecta en el flujo del producto, ya que si el porcentaje de humedad es alto, el bioplaguicida tenderá a formar aglomerados y no permitirá un flujo libre (Voight y Bomschein, 1982). Por lo anterior, el porcentaje de humedad del prototipo de bioplaguicida también es adecuado para facilitar la manipulación del mismo, durante la fabricación, empaque y aplicación

7.3.4. Voluminosidad

Los valores de voluminosidad de los polvos están directamente relacionados con las características propias de los excipientes utilizados en la formulación y con el método de mezclado empleado en la producción (Garzón, 2002). Esta característica es de gran importancia a considerar durante los procesos de diseño y compra de equipos de manufactura, además de las etapas de envasado y empaque del producto (Voight y Bomschein, 1982).

Para esta característica, el prototipo de bioplaguicida a base de conidios de *T. koningiposis* y de Baculovirus presentó un valor de 1,23 ± 0,02 mL/g (Tabla 7). Este valor se considera adecuado para productos en polvo de la industria farmacéutica, la cual recomienda voluminosidades inferiores a 3 mL/g, ya que se garantiza que el material sólido evaluado no presentará problemas de manipulación, especialmente en los procesos de manufactura y empaque (Martin y Sinko, 2005).

Además, el prototipo de bioplaguicida cumplió con los requerimientos fijados por Villamizar *et al*. (2005), quienes validaron y estandarizaron la metodología para determinar la voluminosidad para el bioplaguicida comercial Baculovirus Corpoica, estableciendo los límites de aceptación entre 0,60 mL/g y 1,26 mL/g. Dichos límites de aceptación se establecieron durante la estandarización del proceso de producción del bioplaguicida y posteriormente se implementaron para el control de calidad del producto terminado (Villamizar *et al*., 2005).

Este valor de voluminosidad está determinado por el vehículo inerte utilizado en la formulación, el cual hace que el prototipo posea una forma y tamaño de partícula uniforme, lo que permite que las partículas se ordenen fácilmente y se disminuya el espacio interparticular, lo que trae como consecuencia una disminución de la voluminosidad del producto (Aulton, 2004).

Garzón (2002) obtuvo valores similares para esta característica con preformulados en polvo a base de *T. koningiopsis*, los cuales presentaron voluminosidades entre el rango de 1,16 y 1,31 mL/g, atribuyendo este resultados a los bajos valores de voluminosidad de los excipientes empleados en la formulación.

Un ejemplo de la influencia que ejercen los diferentes excipientes en el producto final, es el trabajo realizado por Valencia (2000), quién obtuvo voluminosidades de 1,68 a 1,86 mL/g para granulados a base de *B. bassiana*. El autor atribuyó la baja voluminosidad de los granulados a los excipientes utilizados, ya que éstos presentan un tamaño de partícula uniforme y una baja voluminosidad.

Teniendo en cuenta que el bioplaguicida evaluado se encuentra dentro del límite de aceptación establecido para este material, es posible sugerir que el prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningopsis* y Baculovirus no presentará problemas de envasado y manipulación durante el proceso de producción.

Tabla 7. Características físico-químicas del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *Trichoderma koningiopsis* y *Baculovirus*

Característica	Voluminosidad (ml/g)	Porosidad (%)	Fluidez Estática (Grados º)	Humedad (%)	pH
Réplica 1	1,25	39,48	45,3	0,59	9,06
Réplica 2	1,25	41,03	42,08	0,60	9,44
Réplica 3	1,20	39,48	44,08	0,39	9,14
Promedio	1,23	39,99	43,82	0,52	9,21
Desviación estandar	0,03	0,89	1,62	0,12	0,20
RANGO DE ACEPTACIÓN O RECHAZO	< 30	< 60	≤ 35º Flujo Libre 35º-45º Ligeramente cohesivo >45 Rechazado	< 5	9-10

7.3.5. pH

El pH es un parámetro muy importante durante la etapa de almacenamiento de un bioplaguicida, debido a que cambios drásticos en esta característica pueden inhibir el crecimiento del principio activo (microorganismo) (Friesen *et al.,* 2006).

El prototipo de bioplaguicida presentó un pH de 9,21 ± 0,20 (Tabla 7) cuando fue reconstituido en agua destilada desionizada. Este valor se encuentra dentro del rango de aceptación establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica (Biotécnica, 2004) para el producto Baculovirus Corpoica y es similar a los obtenidos por Villamizar *et al*. (2005) cuando se validó la técnica de control de calidad para dicho producto, trabajo en donde se obtuvieron resultados que oscilaron entre 9,33 y 9,64. Estos valores probablemente se deben al diluente utilizado en la formulación, el cual presenta características de alcalinidad.

El valor de pH del prototipo de bioplaguicida mixto caracterizado en el presente estudio, posiblemente se debe al soporte inerte utilizado como vehículo de la formulación, ya que este excipiente dependiendo de su origen y calidad, al ser reconstituido en agua presenta un rango de pH que puede oscilar entre 6.5 y 10 (Boyland *et al*., 1986)

Caballero *et al*. (2001) establecieron que para bioplaguicidas a base de Baculovirus, un pH superior a 9 y menor a 4 puede afectar drásticamente la integridad de los cuerpos de inclusión virales y por lo tanto la eficacia y la actividad biocontroladora del virus disminuyen significativamente. Esto se debe principalmente a que los cuerpos de inclusión son solubilizados a valores de pH entre 9 y 11, liberando los viriones que son altamente susceptibles a las condiciones ambientales. Sin embargo, como el bioplaguicida mixto es un producto sólido con un nivel de humedad inferior al 5%, no se presentará la disolución de los cuerpos de inclusión durante el almacenamiento, ni durante la aplicación, pues además, la aplicación se realiza en seco, evitando la inactivación que podría sufrir el virus por efecto del pH.

Por otra parte, se ha reportado que el hongo *Trichoderma* sp. soporta un rango amplio de pH para su crecimiento entre 2,0 y 9,0, con un óptimo entre 4,0 y 7,0 (Domsch *et al*.,1980). Kredics *et al*. (2004) establecieron los rangos de pH en donde

especies del género *Trichoderma* sp. con potencial biocontrolador (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma aureoviride*, y *Trichoderma viride*) presentaron porcentajes de germinación superiores al 85%, concluyendo que en valores de pH superiores a 6 e inferiores a 9, la germinación y las enzimas involucradas en los procesos de micoparasitismo no se vieron afectadas en su totalidad, sino retardadas en el tiempo.

Resultados similares obtuvo Begoude *et al*. (2007) al evaluar la influencia de factores ambientales en el crecimiento de *T. asperellum,* demostrando que este hongo puede crecer entre pH 4,5 y 8,5 y a temperaturas entre 20 y 30ºC. Sin embargo, el autor recomienda controlar factores externos como la temperatura y la humedad relativa, para que no se afecte la viabilidad del microorganismo biocontrolador.

De acuerdo a lo anterior, es posible que el pH de bioplaguicida mixto afecte la germinación de *T. koningiopsis* a largo plazo. Sin embargo, el microorganismo puede entrar en un estado de latencia como mecanismo de defensa, en el cual reduce su metabolismo dando lugar a un desarrollo fisiológico más lento. Además, el hongo puede acumular compuestos tipo alcohol o azúcares que le permitan mantener el equilibrio osmótico intracelular, protegiendo las estructuras membranales (Kredics *et al*., 2004; Abadías *et al*., 2001)

Para mejorar la estabilidad y actividad del bioplaguicida mixto, se puede considerar durante la fase de optimización, la adición de un coayudante que regule el pH y lo ajuste a valores entre 5,0 y 6,0. De esta forma se garantizará la estabilidad de los cuerpo de inclusión de Baculovirus y se favorecerán la germinación y la actividad de las enzimas involucradas en los procesos de micoparasitismo de *T. koningiopsis*.

De igual forma, la adición de una sustancia reguladora de pH, que ajuste esta característica a valores adecuados, puede ser una forma efectiva para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes, que podrían afectar la viabilidad del virus y del hongo *T. koningiopsis* bajo condiciones de almacenamiento.

Lo anterior ha sido recomendado por Garzón (2002), quien encontró valores de pH cercanos a 7 en diferentes preformulados en polvo a base de *T. koningiopsis,* a pesar de que este valor es adecuado para el desarrollo y crecimiento de este hongo,

el autor recomendó modificar la composición de estos preformulados agregando una sustancia reguladora de pH, para mantener esta característica en un rango óptimo entre 5,5 y 6,5 y de esta forma obtener una formulación de mayor estabilidad, especialmente bajo condiciones de almacenamiento

En diversos trabajos se ha evaluado el efecto que tiene el pH del bioplaguicida sobre la estabilidad del principio activo. Valencia (2000) caracterizó preformulados a base del hongo *Beaveria bassiana* obteniendo valores de pH entre 8,46 y 8,95, valores posiblemente nocivos para el hongo. El autor concluyó que la capacidad de germinación de *B. bassiana* puede disminuir hasta en un 15% cuando el pH es alcalino, concluyendo que esta característica influye sobre las propiedades del microorganismo especialmente cuando es almacenado.

7.3.6. Tamaño de Partícula

Para determinar la uniformidad del tamaño de partícula del prototipo de bioplaguicida mixto a base de conidios de *T. koningiopsis* y *Baculovirus* se realizó una distribución de frecuencias del tamaño de partícula con los datos obtenidos en la prueba de gravimetría (Figura 4).

Los resultados obtenidos mostraron que en las tres repeticiones, el mayor porcentaje de peso retenido se presentó en el tamiz número 325 cuyo tamaño de poro es de 45 µm con un porcentaje promedio del 62,1%. El siguiente porcentaje de peso retenido se presentó en el tamiz número 100 (150µm) con el 14,8%, seguido del tamiz número 35 (500µm) con un porcentaje del 12,1%. Los menores porcentajes de retención de producto se presentaron en los tamices número 7, 20, y 10 con un 4,3%, 1,4% y 1,1% respectivamente. En el colector solamente se obtuvo un 0,9% del producto.

Teniendo en cuenta que un 62,1% del producto quedó retenido en el tamiz número 325, el cual presenta un tamaño de poro de 45 micras, se concluye que el bioplaguicida mixto presenta un tamaño de partícula entre 45 y 150µm. Este rango de tamaño de partícula cumple con el parámetro de calidad establecido para esta característica por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica;

el cual recomienda que un 60% o más del producto, presente un tamaño inferior a 150 micras (Biotécnica, 2003).

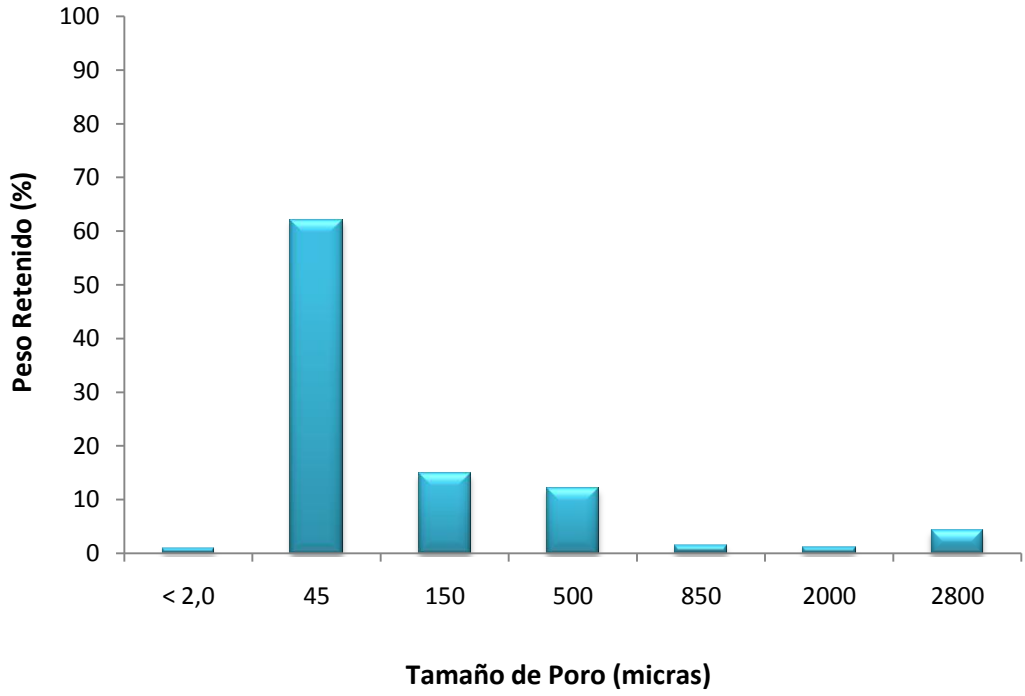

Figura 4. Distribución de frecuencias de tamaño de partícula para el prototipo de bioplaguicida mixto.

Villamizar *et al*. (2005) durante la estandarización del proceso de producción de bioplaguicida comercial Baculovirus Corpoica, obtuvo resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, con un porcentaje cercano al 90% del producto, que presentó un tamaño de partícula inferior a 100 micras.

Este tamaño de partícula del bioplaguicida mixto se debe principalmente al vehículo inerte utilizado en la formulación, el cual presenta entre un 73% y un 90% de las partículas con diámetros inferiores a 200 micras según Boyland *et al*. (1986).

Para garantizar el tamaño de partícula del bioplaguicida mixto se debe monitorear durante el proceso de manufactura del bioplaguicida, la etapa de mezclado, ya en ésta se puede alterar la forma por erosión y fragmentación produciendo partículas

de forma y tamaño irregular, que pueden afectar las características de flujo y el grado de empaquetamiento de las mismas (Aulton, 2004).

Este tamaño de partícula combinado con la baja proporción de espacios entre las mismas, garantiza que el prototipo de bioplaguicida mixto tendrá buena adherencia sobre los tubérculos de papa cuando sea aplicado sobre las superficies de éstos, ya que tendrá una mayor área superficial y por lo tanto una mejor distribución y cubrimiento, asegurando su eficacia.

Sin embargo, el tamaño de partícula podría ocasionar diversos problemas cuando el producto sea almacenado durante períodos prolongados, debido a que puede compactarse en la base del recipiente de empaque, impidiendo un flujo libre del producto cuando sea aplicado y generando la pérdida del mismo. Además se pueden presentar pérdidas del producto por la deriva al momento de ser aplicado sobre los tubérculos a tratar (Garzón, 2002).

Es posible que las personas que manipulen el bioplaguicida mixto sean expuestas a diversas enfermedades de tipo alérgeno o inhalatorio, debido a la inhalación de las partículas, aún cuando el producto es inocuo (Crippa y Pasolini, 1997). Diferentes autores han evidenciado el efecto que produce la exposición ocupacional a los polvos, que incluyen enfermedades como el asma o el síndrome tóxico de polvo orgánico (Strasser y Kirchmair, 2006; Wohlford *et al*., 1999) o diferentes tipos de alergias debido a la exposición a altas concentraciones que pueden afectar el sistema inmune, digestivo, sensitivo y hepático (Zimmermann, 2007; Cook *et al.,* 1996).

Debido al tamaño de partícula de prototipo de bioplaguicida mixto, el cual es inferior a 150 micras, se recomienda manipularlo con un sistema de protección externa para impedir la obstrucción de las vías respiratorias de las personas que manipulan el producto durante las etapas de producción y de aplicación y de esta manera incrementar la seguridad industrial en el manejo del producto.

7.4. Caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus.

7.4.1. Prueba de patogenicidad en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*.

Con el fin de estandarizar una metodología para evaluar de forma rápida y sencilla la eficacia del bioplaguicida mixto contra *Rhizoctonia solani* en condiciones *in planta,* se realizó una prueba de patogenicidad con dos aislamientos de *R. solani* codificados como Rh176 y Rh200, utilizado a tres concentraciones diferentes de inóculo (4, 8 y 16 discos de agar colonizados por el hongo) y semillas de papa variedad *Solanum phureja.*

Las semillas de papa presentaron después de siete días de siembra signos del desarrollo de *Rhizoctonia solani,* evidenciándose el crecimiento del micelio del hongo sobre ésta y en el suelo cercano a la misma. El crecimiento del micelio y su establecimiento en la rizósfera pueden iniciar la invasión del tejido de la planta e iniciar los colchones de infección, los cuales son los sitios de posible penetración del micelio en la planta (El Bakali y Martín, 2006).

El establecimiento de *R. solani* en las raíces de la planta es importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que inicia el proceso de infección del tejido, causando la parcial obstrucción y conducción de las sustancias necesarias para la planta y ocasiona un anormal desarrollo radical, ya que disminuye el área de la raíz por los procesos de ataque y degradación del hongo (Fox, 2006).

Transcurridos 30 días de siembra, se evidenció en los tratamientos inoculados con *R. solani* la presencia de esclerocios en las raíces de las plantas. Este hecho sugiere que las condiciones ambientales especialmente la humedad del suelo, proporcionaron al hongo una mayor área de cobertura y por ende condiciones ambientales favorables para la formación de esclerocios, como mecanismo de supervivencia y como una nueva fuente de infección.

Beltrán (2004) argumenta que la formación de los esclerocios se inicia al agruparse el micelio del fitopatógeno, presentándose entrecruzamiento y congregación de

hifas, ya sea formando esclerocios de forma individual o en grupos, lo que permite la formación de nuevas unidades infectivas o estructuras de resistencia que aumentan el número de propágulos del hongo en el suelo.

De igual manera, el crecimiento del fitopatógeno en las plantas de papa trae como consecuencia una disminución en el área y peso de la parte radicular y área de las mismas (Beltrán, 2004). Lo anterior se evidenció por medio de la evaluación del peso seco de las plantas inoculadas con diferentes concentraciones de *R. solani.* Por ejemplo, las plantas inoculadas con el aislamiento Rh176 presentaron un peso seco promedio de 0,87 g, 0,86 g y de 0,32 g, cuando se utilizaron concentraciones de 4, 8 y 16 discos de agar colonizados por el hongo respectivamente (Figura. 5, Anexo 2).

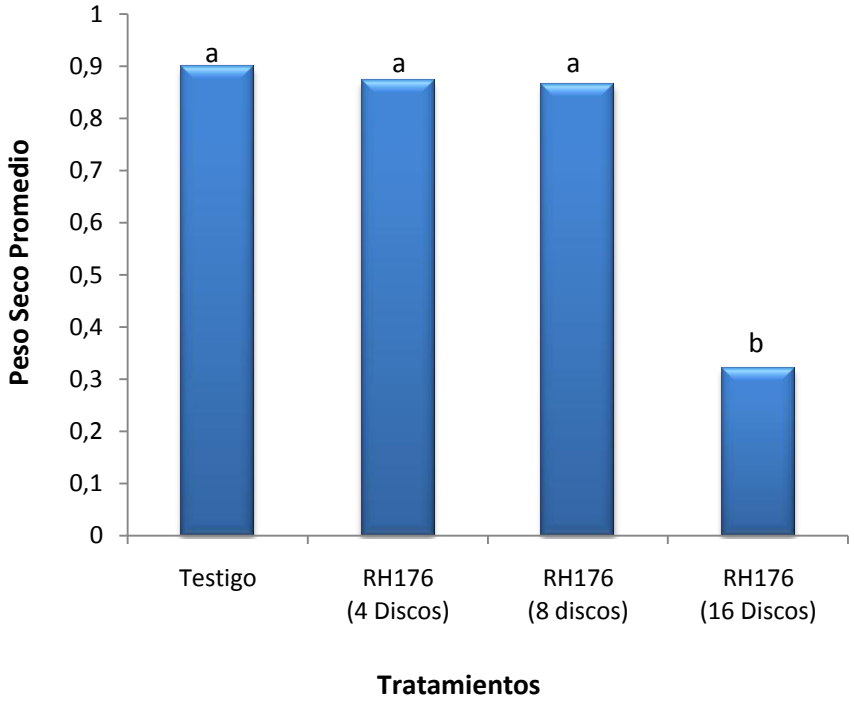

Figura 5. Peso seco promedio de las plantas sembradas en presencia del aislamiento Rh176 después de 30 días de la inoculación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

La comparación de medias de Tukey (95%), detectó diferencias significativas (P<0,05) entre el peso seco de las plantas inoculadas con 16 discos de agar

colonizados por el hongo y los demás tratamientos (Figura 5, Anexo 3). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre el peso seco de las plantas del tratamiento testigo y los inoculados con 4 y 8 discos de agar colonizados por el fitopatógeno. Este resultado permite sugerir que con un inóculo de 16 discos, se evidencia un efecto significativo del patógeno, sobre el desarrollo del área foliar y radicular de las plantas de papa, lo que permitiría utilizar esta dosis para evaluar alternativas de control de *R. solani in planta.*

Un comportamiento similar al anterior presentó el aislamiento Rh200, ya que las plantas inoculadas con 4, 8 y 16 discos presentaron un peso seco promedio de 2,27 g, 2,22 g y 1,49 g respectivamente (Anexo 4). El análisis estadístico nuevamente, sólo detectó diferencias significativas (P<0,05) entre el peso de las plantas inoculadas con 16 discos de agar colonizados por el hongo y los demás tratamientos (Figura 6, Anexo 5).

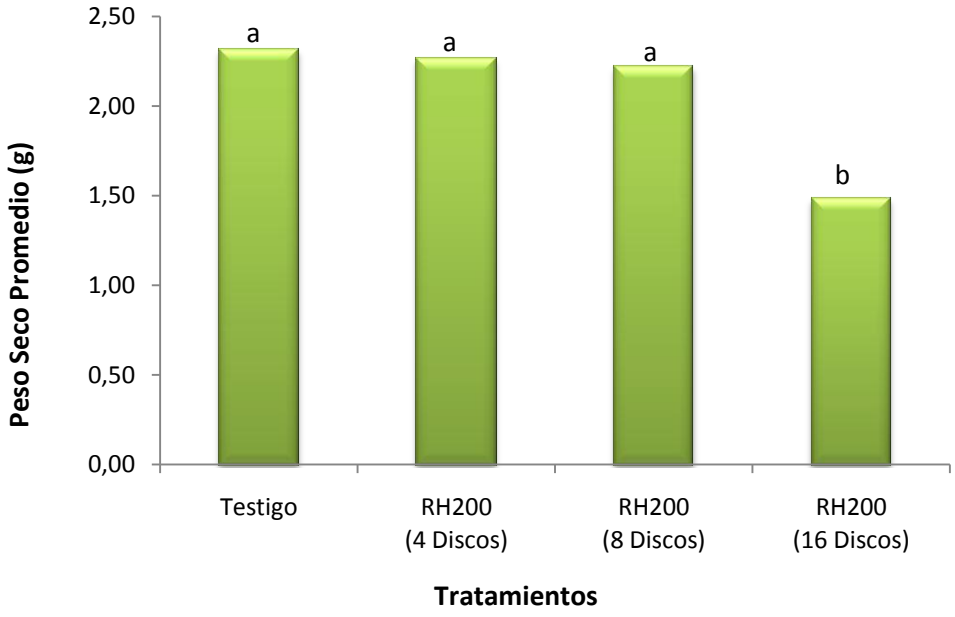

Figura 6. Peso seco promedio de las plantas sembradas en presencia del aislamiento Rh200 después de 30 días de inoculación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

La reducción en el área radicular y foliar se debe principalmente a que el micelio establecido en el suelo es capaz de colonizar las raíces y las paredes de los tallos causando daños en el tejido. Este daño ocasionado por el fitopatógeno puede conllevar a la pérdida de la capacidad de traslocación de nutrientes y de agua en toda la planta y a la disminución del área fotosintética, lo que genera una reducción en el rendimiento del cultivo (Fox, 2006).

Simons y Gilligan, a. (1997) establecieron que una alta densidad de inóculo produce una disminución en el número de tallos y estolones durante el desarrollo de la planta, lo que trae como consecuencia el aumento en la producción de tubérculos, siendo esta una manera de garantizar la progenie de la planta. Sin embargo, estos tubérculos serán una nueva fuente de infección y de permanencia del fitopatógeno en el cultivo.

En el presente estudio, no se observó volcamiento de las plantas, principalmente por el estado fenológico de las mismas. Sin embargo, se observó adelgazamiento de tallos y necrosis en los mismos, lo que probablemente se debe a que las hifas de *R. solani* en el proceso de infección crecen inicialmente de forma longitudinal a lo largo de los brotes del tubérculo y tienden a seguir las uniones de las células cortas y rectas de la epidermis de la planta, formándose hifas primarias que crecen longitudinalmente y que forman posteriormente los colchones de infección. Estos colchones de infección son la principal causa de la entrada del hongo en el tejido vegetal, lo que causa necrosis y estrangulamiento, afectando la conducción de nutrientes, lo que con el tiempo genera la muerte de la planta (Woodhall *et al.*, 2008).

Gillian *et al*. (1996) evaluaron la incidencia de *R. solani* con relación a la frecuencia de cosecha en cultivos de papa utilizando tubérculos micropropagados libres de la enfermedad. Los autores establecieron que el inóculo en el suelo produjo pérdidas económicas debido al volcamiento de las plantas, causado por la necrosis y el ataque del hongo. Además, concluyeron que la incidencia y severidad de la enfermedad varían con los períodos de rotación del cultivo cuando no se implementan las condiciones agroecológicas y de sanidad necesarias.

En el presente estudio, las plantas de papa correspondientes al testigo absoluto presentaron una incidencia del 23,81% después de 30 días de haber sido

sembradas. Por el contrario, las plantas de papa inoculadas con 4 discos de agar del aislamiento Rh176 presentaron un porcentaje de incidencia del 33,33%, con 8 discos de agar la incidencia fue del 47,61% y con 16 discos fue del 52,37% (Figura 7, Anexo 6).

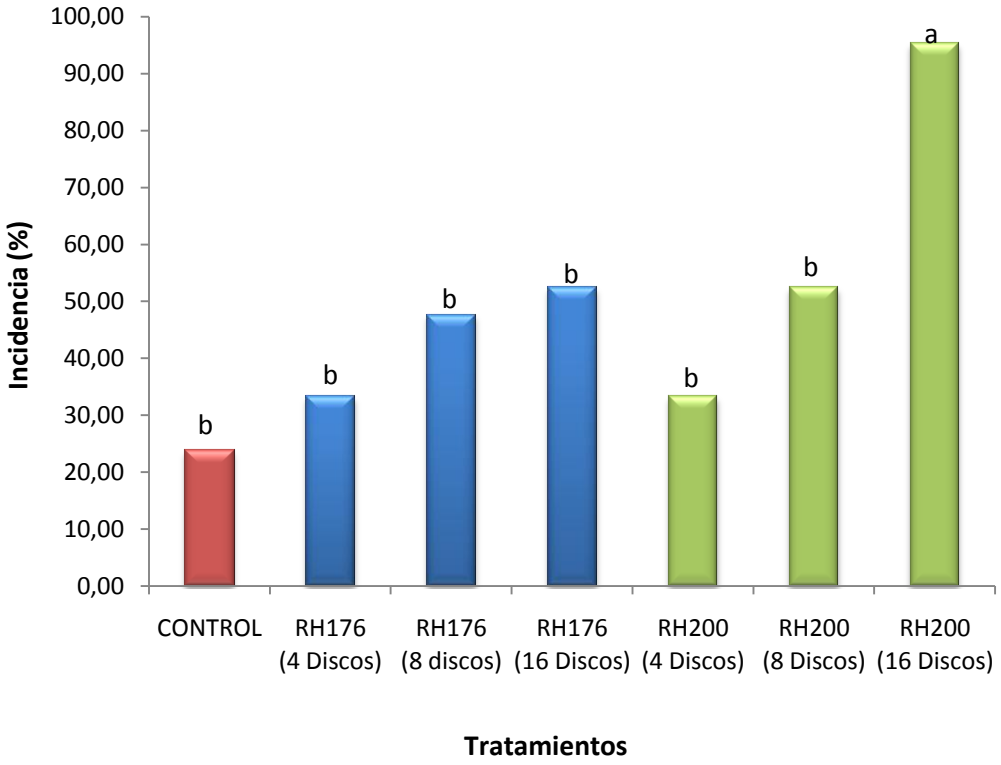

Figura 7. Incidencia de la enfermedad causada por dos aislamientos de *Rhizoctonia solani* (Rh176 y RH200) en plantas de papa *Solanum phureja.* Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas según la prueba de Tukey (95%).

El aislamiento codificado como Rh200 presentó un porcentaje de incidencia del 33,33%, 52,37% y del 95,24%, cuando se utilizaron inóculos correspondientes a 4, 8 y 16 discos de agar colonizados por el hongo respectivamente (Figura 7).

La comparación de medías de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas (P>0,05) entre la incidencia obtenida con el tratamiento correspondiente al testigo absoluto y el tratamiento en el que las plantas se inocularon con el aislamiento RH176 a las diferentes concentraciones evaluadas. Caso contrario a lo evidenciado

con las plantas de papa inoculadas con el aislamiento RH200, ya que cuando se utilizó una concentración de inóculo de 16 discos de agar colonizados por el hongo, se evidenció una incidencia significativamente mayor (P<0,05), con respecto a la obtenida con el testigo absoluto (Figura 7, Anexo 7).

Los resultados anteriormente descritos, permiten concluir que a mayor cantidad de inóculo de *R. solani,* mayor incidencia del patógeno y desarrollo de la enfermedad sobre la planta de papa. En las plantas de papa que presentaban una densidad de inóculo menor (4 discos de agar colonizados por el hongo), se evidenció una menor incidencia de la enfermedad en los dos aislamientos evaluados. A diferencia de las plantas de papa inoculadas con 16 discos de agar colonizados por el hongo, en las cuales se obtuvo mayor incidencia, aunque ésta fue significativamente mayor, solo con el aislamiento RH200 con una valor del 95,24%.

Lo anterior concuerda con lo descrito por Simons *et al*. (1997), quienes sugirieron que las semillas de papa en presencia de bajas densidades del patógeno (entre 5-15%), presentan bajo desarrollo de la enfermedad, en contraste con densidades altas (>50%) del patógeno, en donde se observa porcentajes de incidencias y severidades extremadamente altas.

En otro estudio, Tsror *et al*. (2005) evaluó la importancia e influencia de la cantidad de inóculo del tubérculo y del suelo, en el desarrollo de la enfermedad causada por *R. solani.* Los autores evidenciaron que en plantas en presencia de sólo suelo contaminado con el patógeno se presentó una incidencia del 72,5%, mientras que las plantas provenientes de semilla infestada presentaron un porcentaje de incidencia del 61,6% y la combinación de los dos tratamientos anteriores, causó una incidencia del 100%. Los autores concluyeron que la incidencia y severidad de la enfermedad en tubérculos jóvenes, están correlacionadas directamente con los niveles de inóculo de los tubérculos semilla y del suelo.

El porcentaje de incidencia del fitopatógeno sobre el testigo absoluto fue menor a lo observado en los tratamientos con las diferentes concentraciones de inóculo y aislamientos. Sin embargo, en dicho tratamiento no se inoculó el patógeno, por lo que se podría sugerir que la presencia de éste se debió a la utilización de semilla infectada con el hongo, aunque no fuera evidenciado visualmente; o a la posible

contaminación del suelo utilizado, el cual no fue esterilizado para el montaje del bioensayo.

Lo anterior concuerda con lo descrito por Ñustez (2002), quien estableció que el inóculo de *R. solani* en el suelo como en la semilla, son determinantes para la sanidad y el rendimiento del cultivo. De igual manera, Simons y Gilligan, b. (1997) argumentan que el inóculo del suelo es más infectivo que el inóculo presente en el tubérculo semilla, sin embargo los dos juegan un rol importante en el desarrollo y propagación de la enfermedad en el cultivo.

La prueba realizada permitió seleccionar el aislamiento RH200 a la concentración de 16 discos de agar colonizados por el hongo, para ser utilizado como inóculo patogénico para la siguiente fase del presente estudio, ya que este tratamiento causó síntomas característicos de la enfermedad y un nivel de incidencia (95,24%) significativo comparado con el testigo absoluto.

7.4.2. Eficacia frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones *in planta*

Con el fin de evaluar la eficacia del bioplaguicida mixto aplicado sobre el tubérculo semilla que es sembrado en suelo inoculado con *R. solani* se realizó un bioensayo.

La eficacia obtenida contra *R. solani* con el bioplaguicida mixto fue del 85,7% y la incidencia del patógeno del 14,2%, porcentaje inferior al presentado por el testigo patógeno, en el cual se observó una incidencia del 100%. El valor de eficacia obtenida por el bioplaguicida mixto es superior al límite establecido por el Laboratorio de Control de Calidad Biotécnica (2008), el cual establece una eficacia ≥80% para este tipo de bioplaguicida. El tratamiento absoluto (control) presentó un comportamiento similar al obtenido con el bioplaguicida mixto, con un porcentaje de incidencia del patógeno del 14,2%.

El control que ejerce *T. koningiopsis* sobre *R. solani* se debe a su acción como biocontrolador que involucra mecanismos de competencia (espacio y nutrientes), micoparasitismo y desactivación de las enzimas de los fitopatógenos (Harman *et al*., 2004). Wilson *et al*. (2008) establecieron que el principal mecanismo de acción de

Trichoderma sp. sobre *R. solani* es el micoparasitismo, en donde la reacción existente es de dos tipos. La reacción Tipo I en la cual las hifas del patógeno se aprecian necróticas y aparentemente vacías, en la proximidad de las hifas de *Trichoderma* sp., indicando que la producción de toxinas ejerce un papel importante en la detección del patógeno y sugiriendo que estos daños se deben a enzimas extracelulares (exoquitinanas). En la reacción tipo II, se observa el enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* sp. sobre las hifas de *Rhizoctonia solani* (Lo *et al.,* 1998).

La actividad biocontroladora de *T. koningiopsis* (Th003) en el bioplaguicida mixto fue eficiente en condiciones *in planta.* Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos previos realizados por el Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica. Por ejemplo, Saldamando (1996) demostró que el mismo aislamiento de *T. koningiopsis* (Th003) sin formular, evaluado en semillas pregerminadas de tomate en presencia de *R. solani*, ejerció un efecto protector y vigorizante en plántulas, con porcentajes de protección del 70%. Cotes *et al.,* (2001), observó que el aislamiento Th003 disminuyó las infecciones causadas por *F. oxysporium* y *R. solani* en un 56% y 96% respectivamente, ejerciendo también efectos positivos en el vigor y crecimiento de plántulas de tomate. Asímismo, Beltrán (2004) demostró que la presencia de *T. koningiopsis* (Th003) en plántulas de papa aumentó el tamaño y vigor de la misma y ejerció una protección cercana al 70% contra *R. solani*.

Al evaluar el peso seco promedio por planta de papa, proveniente de la semilla tratada, se obtuvo un valor de 1,2 g de biomasa seca, resultado superior al presentado por el testigo absoluto, el cual presentó un promedio de 0,66 g de biomasa seca y el testigo patógeno con valor de 0,51 g (Figura 8, Anexo 8).

La comparación de medias de Tukey (95%) detectó diferencias significativas (P<0,05) entre el tratamiento correspondiente al bioplaguicida mixto y los demás, siendo el peso seco de las plántulas de semilla tratada con el producto, significativamente mayor que el de las plantas obtenidas a partir de la semilla sin tratar (Anexo 9).

En las plantas de papa originadas de los tubérculos semilla tratados con el bioplaguicida mixto, se evidenció un aumento importante en el crecimiento y desarrollo de las mismas, lo cual se atribuye a la promoción en el crecimiento vegetal ejercido por *T. koningiosis.* Es importante tener en cuenta que, las plantas

originadas de semilla tratada con el bioplaguicida y sembradas en presencia del patógeno, aunque presentaron lesiones en las raíces, no mostraron necrosis total en el órgano afectado, a diferencia de las plantas del testigo patógeno.

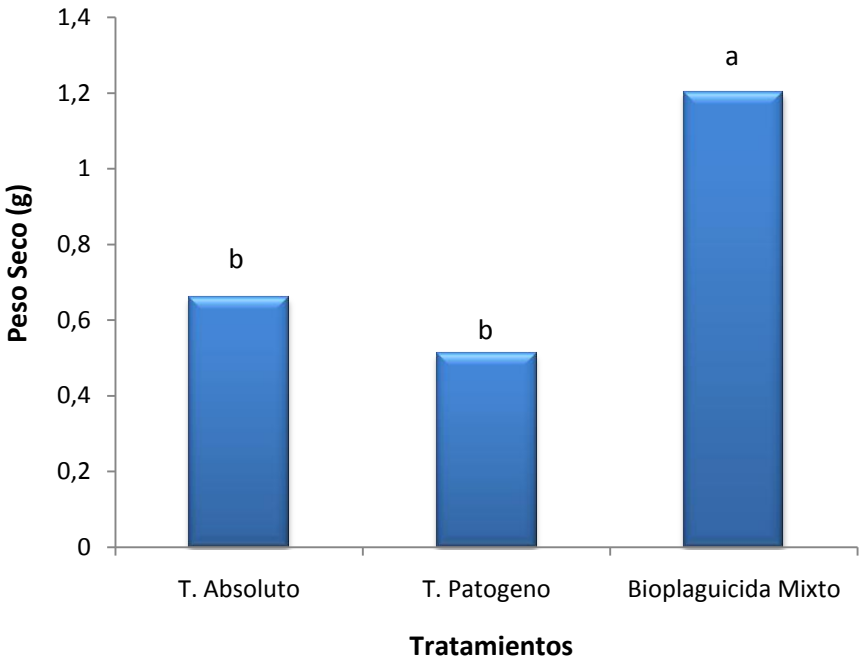

Figura 8. Peso seco de las plantas tratadas con el bioplaguicida mixto, testigo absoluto y el testigo patógeno, después de 30 días de la siembra. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Los resultados del presente estudio, demuestran que la presencia de *T. koningiopsis* (Th003) incrementó la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, especialmente del sistema radical y foliar (Figura 9).

Vinale *et al.* (2008) estableció que los aislamientos de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de producir compuestos que actúan como promotores y reguladores del crecimiento, entre los que se encuentran ácidos orgánicos, como el ácido glucónico, el ácido cítrico o el ácido fumárico, los cuales disminuyen el pH del suelo permitiendo la solubilización de fosfatos, minerales, micronutrientes y cationes como el hierro, manganeso y magnesio, útiles para el metabolismos de la planta.

Figura 9. Plantas de papa variedad *Solanum phureja* provenientes de la semilla de papa tratada o no con el bioplaguicida mixto.

Los resultados permitieron concluir que la aplicación del bioplaguicida mixto a las semillas de papa, que posteriormente se sembraron en suelo inoculado con *R. solani,* ejerció un efecto protector frente al fitopatógeno, lo que sugiere que el bioproducto aplicado a la semilla, no sólo protege el tubérculo durante el almacenamiento, sino que tiene un efecto posterior bajo condiciones de cultivo.

7.4.3 Eficacia frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento

Para determinar la eficacia del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en semilla de papa bajo condiciones de almacenamiento, se realizó un bioensayo en el cual se utilizó semilla de papa variedad *Solanum phureja* que presentaba un rango de esclerocios del patógeno entre 8-10 por papa.

El bioplaguicida mixto presentó una eficacia del 80% frente a *R. solani* con una incidencia del patógeno del 20% comparada con la obtenida para la semilla de papa no tratada, la cual presentó una incidencia del 100%. Este valor de eficacia (80%) obtenido por el bioplaguicida mixto se encuentra dentro del límite establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica (2008) para este tipo de producto.

En la evaluación cualitativa del estado de los tubérculos tratados con el bioplaguicida mixto se observó que los brotes de las semillas tratadas con el bioplaguicida mixto que fueron afectadas por *R. solani,* produjeron más brotes laterales o rebrotres. También se observó que el desarrollo de la infección producida por el patógeno fue más lenta y en algunos casos los brotes que se presentaban cubiertos del hongo no evidenciaron lesiones sobre el tejido.

Todas las semillas de papa tratadas con el bioplaguicida presentaron mayor número de brotes y la brotación se presentaba con mejor vigor y grosor superior a los brotes de las semillas sin tratar (Figura 10).

Figura 10. a. Semilla de papa no tratada con el bioplaguicida mixto, la flecha señala la necrosis en los brotes y poco desarrollo de raíces. **b.** Semilla de papa tratada con el bioplaguicida mixto, la flecha señala el desarrollo de brotes y raíces de mayor longitud y vigor.

Resultados similares obtuvieron Paris *et al.* (2003), quienes evaluaron el efecto del mismo aislamiento de *T. koningiopsis* sobre tubérculos de papa con inóculo natural de *R. solani,* observando que los tubérculos tratados presentaron brotes sanos y raíces de mayor desarrollo y vigor, en comparación con los tubérculos no tratados con el agente biocontrolador.

En el presente estudió se evidenció un efecto promotor de crecimiento ya que al evaluar el peso promedio de los brotes de la semilla de papa tratada con el bioplaguicida mixto se obtuvo un valor de 1,44 g, resultado superior al presentado por el testigo absoluto, el cual fue de 0,178 g (Anexo 10).

La prueba de diferencias mínimas significativas (DMS) con un 95% de confiabilidad detectó que el peso de los brotes de la semilla tratada fue significativamente superior al peso de los brotes de la semilla no tratada (Anexo 11).

La posible acción positiva que ejerce *T. koningiopsis* se concentra en la estimulación de la velocidad de crecimiento y la expresión de los brotes laterales. Verma *et al.* (2007) sugiere que *Trichoderma* spp. puede producir hormonas o metabolitos que aumentan la transferencia de minerales desde la rizósfera hasta las raíces de las plantas, lo que trae como consecuencia un aumento en la velocidad de crecimiento y por lo tanto, un aumento en la biomasa de la planta.

La presencia de esclerocios de *R. solani* adheridos a la epidermis de los tubérculos de papa, demostraron ser una eficiente fuente de infección. Lo anterior ha sido evidenciado por Tsror *et al.* (2005) quienes comprobaron que la influencia del inóculo presente en el tubérculo semilla es de gran importancia en el desarrollo del fitopatógeno, siendo la incidencia y la severidad, formas cuantitativas de expresión de la enfermedad a partir del inóculo presente en la semilla.

En el presente trabajo también se evidenció la presencia de otros microorganismos contaminantes, que son potencialmente fitopatógenos en el tubérculo. Sin embargo, la aplicación del bioplaguicida mixto disminuyó la acción de microorganismos contaminantes como *Fusarium* sp. o *Erwinia* sp. posiblemente por la disminución de la humedad en la superficie de la papa, a causa del excipiente mayoritario usado en el bioplaguicida mixto, el cual presenta una baja capacidad de retención de agua.

Estos resultados indican que la aplicación del bioplaguicida mixto, brinda a la semilla de papa protección contra el patógeno *R. solani* durante las condiciones de almacenamiento de la misma, además de retardar y disminuir la enfermedad.

7.4.4. Eficacia frente a *Tecia solanivora* bajo condiciones de almacenamiento.

Para la determinación de la eficacia del prototipo de bioplaguicida mixto para el control de *Tecia solanivora* se realizó un bioensayo utilizando semilla de papa tratada con el bioplaguicida mixto a la dosis recomendada (5g/Kg de papa). El bioensayo contó con dos tratamientos, un testigo absoluto y el tratamiento consistente en tubérculos tratados con el bioplaguicida mixto.

El bioplaguicida mixto presentó una eficacia del 90% (Anexo 12), valor que se encuentra dentro del límite de aceptación establecido por Villamizar *et al.* (2005) para el producto Baculovirus Corpoica, el cual oscila entre 89,2% y 100%. En el tratamiento testigo no se evidenció mortalidad de las larvas, lo que indica que la mortalidad del tratamiento probablemente fue causada por la aplicación del bioplaguicida mixto. Un comportamiento diferente evidenció Spoleder *et al.* (2005) quienes obtuvieron una mortalidad de 24,3% en el tratamiento testigo utilizando larvas neonatas de *Phthorimaea opercullela*, el mismo estadío de desarrollo de las larvas utilizadas en el presente estudio. Los autores atribuyeron la alta mortalidad presentada en el testigo, a la alta susceptibilidad de las larvas en ese estado de desarrollo.

El resultado obtenido sugiere que la mezcla entre del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus no afectó la actividad biocontroladora de granulovirus utilizado como principio activo en el bioplaguicida mixto. Resultados similares fueron reportados por Arthurs *et al.* (2008), quienes evaluaron dos formulaciones a base de un Granulovirus (PhoGV) con la adición de *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *Kurstaki,* para el control de *Phthorimaea operculella* en tubérculos de papa en condiciones de almacenamiento. Los autores evidenciaron que la mezcla del virus con Bt a las formulaciones de granulovirus no ejerció una acción significativa en la eficacia de las formulaciones para el control de larvas neonatas. Sin embargo, la

formulación en polvo seco de PhoGV fue la más efectiva, con mortalidades hasta del 91,6%.

El valor de eficacia del producto mixto (90%) indica que es eficaz para el control de la plaga bajo condiciones de almacenamiento, considerando que el registro comercial del bioplaguicida Baculovirus Corpoica específica que la eficacia es ≥ 80% (Registro ICA # 5614).

La mortalidad obtenida en los tubérculos tratados con el bioplaguicida mixto, indirectamente sugiere que la dosis de aplicación del producto fue apropiada, existiendo además una distribución homogénea del virus en la superficie de la papa. La homogénea distribución del producto es importante, ya que de lo contrario se pueden presentar sitios sin partículas virales, y como consecuencia la posibilidad de entrada de las larvas a los tubérculos, sin que ingieran la dosis letal del virus (Moscardi, 1999).

7.5. Estabilidad microbiológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus bajo condiciones de almacenamiento.

7.5.1. Concentración.

La concentración y viabilidad de un bioplaguicida son probablemente las características más sensibles durante la etapa de almacenamiento; la disminución de estas características afecta directamente la actividad biocontroladora, lo que genera la disminución en la calidad y la depreciación en el mercado del bioinsumo (Wraith *et al*., 2001). Dentro de los factores que afectan la viabilidad durante el almacenamiento se encuentran las características propias del principio activo, la interacción de éste con los excipientes, el proceso de fabricación, el sistema de envase o empaque y las condiciones ambientales utilizadas durante el transporte, almacenamiento, manipulación y el tiempo transcurrido entre su manipulación y su uso (Gennaro, 1998).

Para determinar la estabilidad microbiológica del bioplaguicida mixto, la concentración fue evaluada mediante la técnica de recuento en placa, analizando muestras de 1 g del prototipo de bioplaguicida mixto almacenadas a 8ºC, 18ºC y 28ºC durante tres meses de almacenamiento. Como tratamiento control se utilizó la formulación en polvo de *T. koningiospsis*. El resultado se expresó como Unidades Formadores de Colonia por gramo de producto (UFC/g) y posteriormente estos valores fueron trasformados determinando el logaritmo decimal de los mismos.

No se utilizó la técnica de recuento en cámara de Neubauer o hemocitómetro para determinar la concentración de conidios *T. koningiopsis*, debido a que el tamaño de partícula del vehículo inerte utilizado en la formulación se encuentra entre 2 y 4 µm (Boyland *et al*., 1986), y el tamaño de los conidios de *T. koningiopsis* varía entre 3 y 4,8 µm (Samuels *et al*., 2006). Por lo anterior, se dificultó diferenciar los conidios de *T. konigiopsis* de las partículas del vehículo inerte, lo que podría causar errores en el resultado. Además, la técnica de recuento en placa permite cuantificar la concentración de unidades viables, a diferencia de la técnica de recuento en cámara de Neubauer, la cual no diferencia las células vivas de las muertas.

El bioplaguicida mixto almacenado a la temperatura de 8ºC presentó una concentración inicial de $4{,}08 \times 10^8$ UFC/g y una concentración de $3{,}78 \times 10^8$ UFC/g, $3{,}58 \times 10^8$ UFC/g y $3{,}40 \times 10^7$ UFC/g al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento, respectivamente (Figura 11, Anexo 13).

El tratamiento control (formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*), a la misma temperatura de almacenamiento (8ºC) presentó un comportamiento similar, con una concentración inicial de $4{,}22 \times 10^8$ UFC/g y concentraciones de $3{,}88 \times 10^8$ UFC/g, $3{,}77 \times 10^8$ UFC/g y $3{,}53 \times 10^8$ UFC/g después de uno, dos y tres meses de almacenamiento respectivamente (Figura 11).

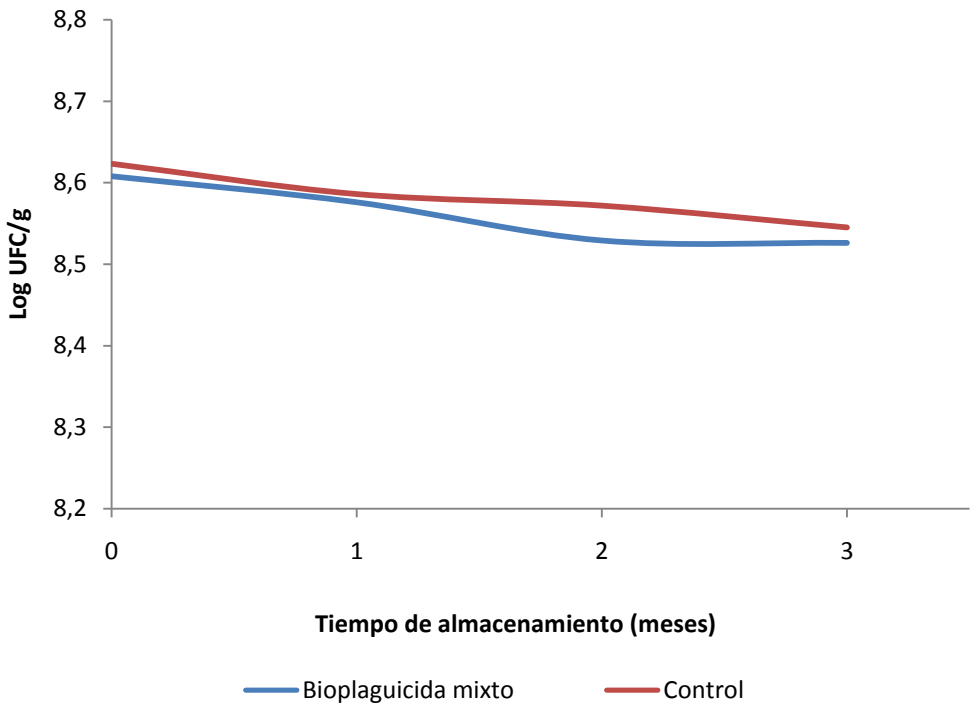

Figura 11. Comportamiento de la concentración de propágulos viables en el bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus, almacenado durante tres meses a 8°C.

A la temperatura de 18ºC, el bioplaguicida mixto presentó una concentración inicial de 4,08x10^8 UFC/g, y concentraciones de 3,72x10^8 UFC/g, 3,52x10^8 y de 3,42x10^8 UFC/g durante el primero, segundo y tercer mes de almacenamiento, respectivamente. Para el tratamiento control se presentaron concentraciones de 4,22x10^8 UFC/g, inmediatamente después de su manufactura, y de 3,76x10^8 UFC/g, 3,58x10^8 UFC/g y 3,38x10^8 UFC/g, durante el primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Figura 12, Anexo14).

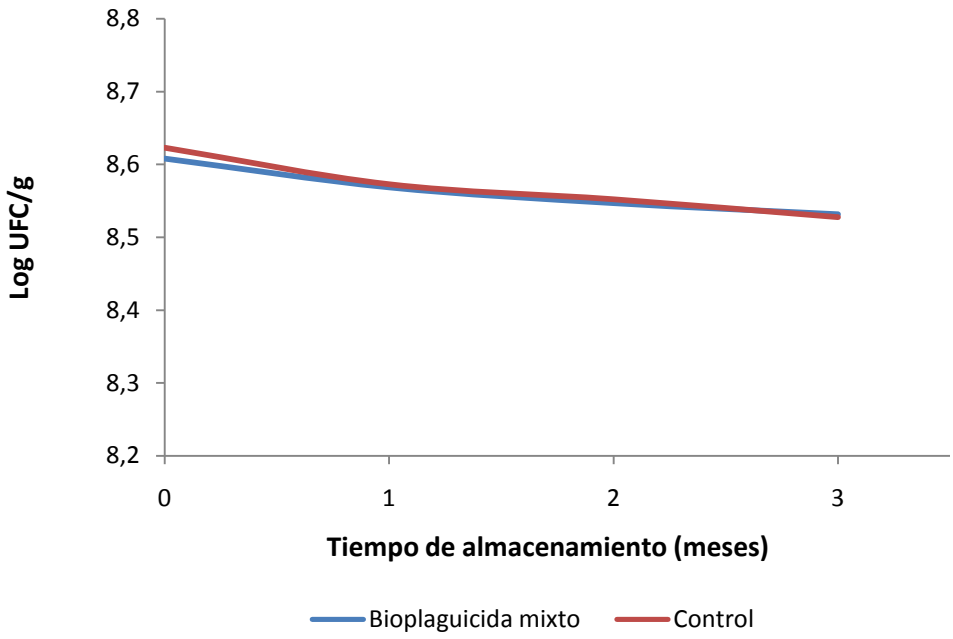

Figura 12. Comportamiento de la concentración de propágulos viables en el bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus, almacenado durante tres meses a 18°C.

Cuando el almacenamiento se realizó a 28°C, el bioplaguicida mixto presentó concentraciones de $4{,}08 \times 10^8$ UFC/g, $3{,}50 \times 10^8$ UFC/g, $3{,}28 \times 10^8$ UFC/g y $2{,}53 \times 10^8$ UFC/g a los cero, uno, dos y tres meses de almacenamiento respectivamente. Para el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*) se presentaron concentraciones de $4{,}22 \times 10^8$ UFC/g, $3{,}48 \times 10^8$ UFC/g, $3{,}12 \times 10^8$ UFC/g y $2{,}57 \times 10^8$ UFC/g antes y después del primer, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Figura 13, Anexo 15).

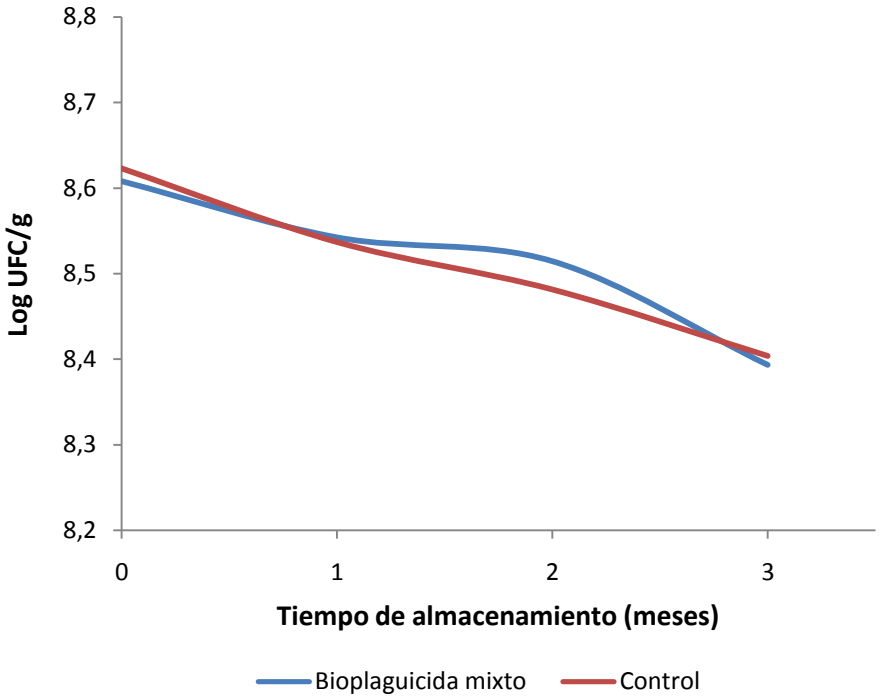

Figura 13. Comportamiento de la concentración de propágulos viables en el bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus, almacenado durante tres meses a 28°C.

La reducción total de concentración o viabilidad del hongo *T. koningiopsis,* después de tres meses de almacenamiento fue del 15,11% a temperatura de refrigeración (8°C), del 16,08% cuando el bioplaguicida fue almacenado a 18ºC y la mayor pérdida fue a 28°C con un 26,02%. Con respecto al tratamiento control (formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*) se presentaron pérdidas del 16,17% cuando fue almacenado a 8°C, del 19,58% a 18°C y del 38,97% a 28°C (Figura 14, Anexo16).

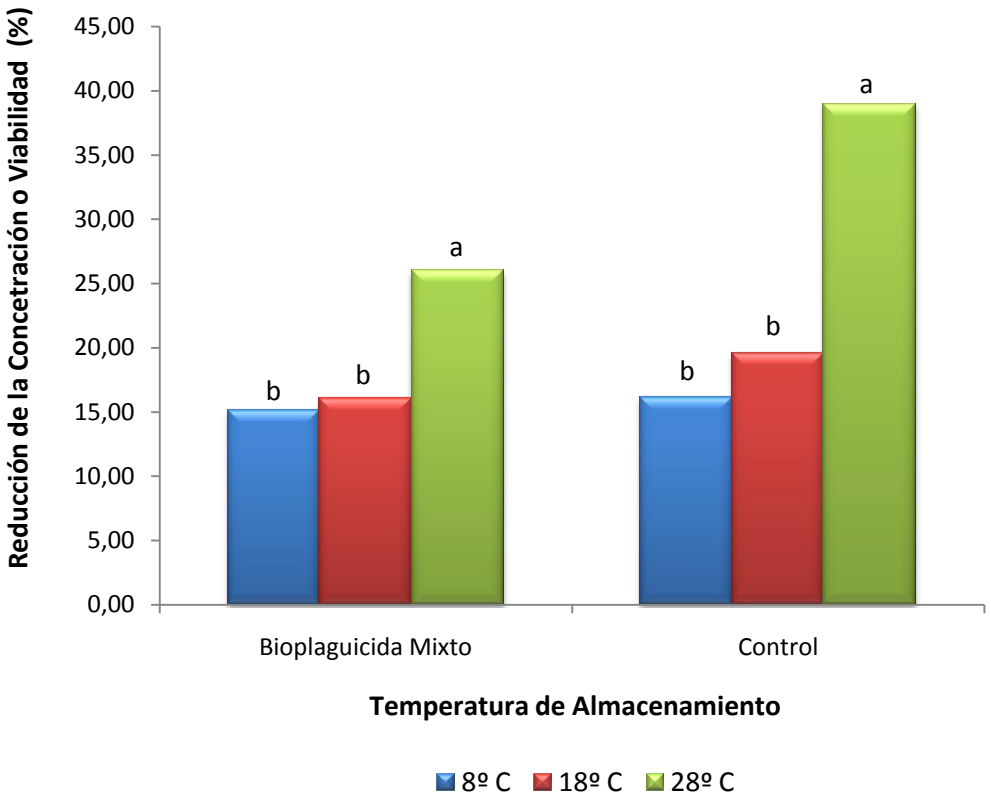

Figura 14. Reducción de la concentración o viabilidad del bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

La comparación de medias de Tukey (95%) no encontró diferencias significativas (*P*>0,05) entre la reducción de la concentración del hongo *T. koningiopsis* en el bioplaguicida mixto y en el tratamiento control cuando fueron almacenados a las temperaturas de 8ºC y 18ºC (Anexo 17). Lo que sugiere que los dos productos presentan la misma estabilidad de la concentración o viabilidad de los conidios del hongo, cuando se almacenaron a dichas temperaturas. Este resultado además permite sugerir que el proceso de mezcla del producto a base de *T. koningiopsis* con el producto Baculovirus, no afectó la estabilidad del hongo a 8ºC y 18ºC, comportamiento de evidenciado de igual forma en la prueba de germinación. A 28ºC se presentó una reducción significativa (*P*<0,05) de la concentración o viabilidad del

hongo, lo que indica que esta temperatura afectó negativamente al principio activo *T. koningiopsis* en el bioplaguicida mixto y en el tratamiento control (Anexo 17).

A partir de los resultados obtenidos, se observa que los dos tratamientos almacenados a las tres temperaturas (8ºC, 18ºC y 28ºC) presentaron una disminución en la concentración de los propágulos durante los tres meses de almacenamiento. Sin embargo, la mayor disminución se presentó cuando los bioplaguicidas fueron almacenados a 28ºC, lo que permite concluir que a mayor temperatura de almacenamiento mayor pérdida de viabilidad. El efecto negativo de las altas temperaturas sobre la viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento se debe a que a mayor temperatura existe una mayor reactividad de las moléculas, presentándose reacciones o procesos de degradación de los auxiliares de formulación, cuyos productos pueden ser tóxicos para el principio activo. De igual manera, el metabolismo celular a temperatura alta puede permanecer activo, lo que causa que las células almacenen metabolitos tóxicos que reducen drásticamente la viabilidad de las mismas (Costa *et al*., 2002).

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron observados por Zahng *et al*. (2006), quienes evaluaron el almacenamiento de una formulación a base de *Cryptococcus nodaensis* a dos temperaturas, obteniendo una concentración de la levadura entre 7,8 y 8,0 Log UFC/g cuando el producto fue almacenado a 4ºC, mientras que a una temperatura de 25ºC se evidenció una reducción en las UFC/g hasta valores de 5 Log UFC/g después de 14 semanas de almacenamiento. Los autores concluyeron que para obtener una mayor estabilidad de la levadura en el tiempo, es necesario almacenar a temperatura de refrigeración e incluir dentro de los excipientes de formulación, sustancias protectoras y osmoreguladoras.

De igual forma, Sabaratnam y Traquair (2002), evaluaron la concentración y la viabilidad de una formulación en perlas de alginato, un granulado y un polvo mojable a base de *Streptomyces* sp., almacenados a las temperaturas de 4ºC y 24ºC. En dicho trabajo se obtuvo que la formulación de mayor estabilidad fue el polvo mojable almacenado a 4ºC durante 14 semanas, el cual mantuvo su concentración en $1,6x10^6$ UFC/g. El microorganismo sin formular fue estable durante dos semanas de almacenamiento, con una concentración de $2,0x10^7$ UFC/g, sin embargo, después de 12 semanas de almacenamiento disminuyó hasta $8,3x10^4$ UFC/g. Los autores

atribuyeron este resultado al almacenamiento a una baja temperatura ya que minimiza la tasa metabólica de las células utilizadas como principio activo e inactiva la producción de metabolitos tóxicos.

La disminución en la concentración de los principios activos de bioplaguicidas a través del tiempo ha sido evidenciada por Kinay y Yildiz (2008), quienes evaluaron formulaciones a base de las levaduras *Metschnikowia pulcherrima* y *Pichia guilliermondi*, obteniendo que las formulaciones almacenadas a 4ºC fueron más estables que las almacenadas a 24ºC. En dicho trabajo se concluyó que la temperatura de almacenamiento para mantener la estabilidad de las levaduras y aumentar la vida útil de las formulaciones es 4ºC, ya que a una temperatura de 24ºC la vida útil de las mismas disminuye de forma drástica después de los dos primeros meses de almacenamiento.

En otro estudio Chen *et al*. (2008), evidenció que el factor más influyente en la viabilidad de conidios de *Lecanicillium lecanii* durante seis meses de almacenamiento fue la temperatura. Concluyendo que la germinación como la virulencia disminuyen a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento. A una temperatura de 35ºC el porcentaje de germinación y de UFC/g fue cercano a cero, a diferencia del resultado obtenido cuando el almacenamiento se realizó a 15ºC, donde el porcentaje de germinación a los seis meses de almacenamiento disminuyó en un 40% y las UFC/g en un 48%.

Burgues (1998), argumenta que la temperatura es la variable más importante en la vida útil de un bioproducto, la cual puede afectar directamente su actividad controladora. Sin embargo, la temperatura de almacenamiento óptima depende de cada microorganismo. Por ejemplo, inoculantes a base de *Rhizobia* sp. tienen una vida útil de seis meses a una temperatura de almacenamiento de 4ºC; a altas temperaturas (> 25ºC) el microorganismo es muy sensible, por lo que el uso de estos inoculantes puede limitarse en países de climas tropicales (Khavazi *et al*., 2007).

Chávez *et al*. (2007), sustentan que la temperatura de almacenamiento depende de cada microorganismo y de la aplicación biotecnológica del mismo. Los autores demostraron que la viabilidad de bacterias probióticas se mantiene estable durante tres meses de almacenamiento a 30ºC. Esta temperatura de almacenamiento es la

necesaria para mantener su actividad benéfica, sin embargo, es necesario implementar un sistema de secado con protectores de desecación como proteína de soya, maltodextrina, o goma arábiga debido a que estas bacterias son altamente sensibles a una temperatura superior a 51ºC.

Costa *et al*. (2002), evaluaron la estabilidad de *Pantoea agglomerans* evidenciando que para todas las formulaciones, la concentración de la levadura disminuyó en mayor proporción cuando fueron almacenadas a 25ºC, a diferencia de cuando se almacenaron a 4ºC. La mayor estabilidad a las bajas temperaturas fue atribuida a que éstas mantienen inactivo el metabolismo celular, evitando la muerte de los propágulos e incrementando la vida útil durante el almacenamiento.

En otro estudio Contreras (2005), evaluó la estabilidad de dos tipos de formulaciones, un concentrado emulsionable y un granulado a base de la levadura *Pichia onychis,* en dicho trabajo se evidenció que la mayor pérdida de viabilidad se presentó a la temperatura de 28ºC, con un 37,13% para el concentrado emulsionable y un 46,3% para el granulado. De manera similar a otros autores, Contreras (2005) encontró que la mayor estabilidad se presentó a temperatura de refrigeración (8ºC), ya que después de seis meses de almacenamiento el concentrado emulsionable perdió un 18,04% y el granulado un 20,29%.

En el presente estudio, la comparación de medias de Tukey (95%) no encontró diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) entre la concentración del hongo *T. koningiopsis* en el bioplaguicida mixto y el tratamiento control antes del almacenamiento, lo que indica que el proceso de mezcla de los dos productos no afectó la concentración ni la viabilidad del hongo.

De igual forma, no se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones de *T. koningiopsis* a través del tiempo cuando los dos tratamientos fueron almacenados a 8ºC y 18ºC (Anexo 18). Por el contrario, a 28ºC se presentaron diferencias significativas ($P<0,05$) entre las concentraciones iníciales y finales de *T. koningiopsis* en los dos tratamientos evaluados (Figura 15, Anexo 19). Este resultado indica que los tratamientos fueron estables cuando se almacenaron a 8ºC y 18ºC.

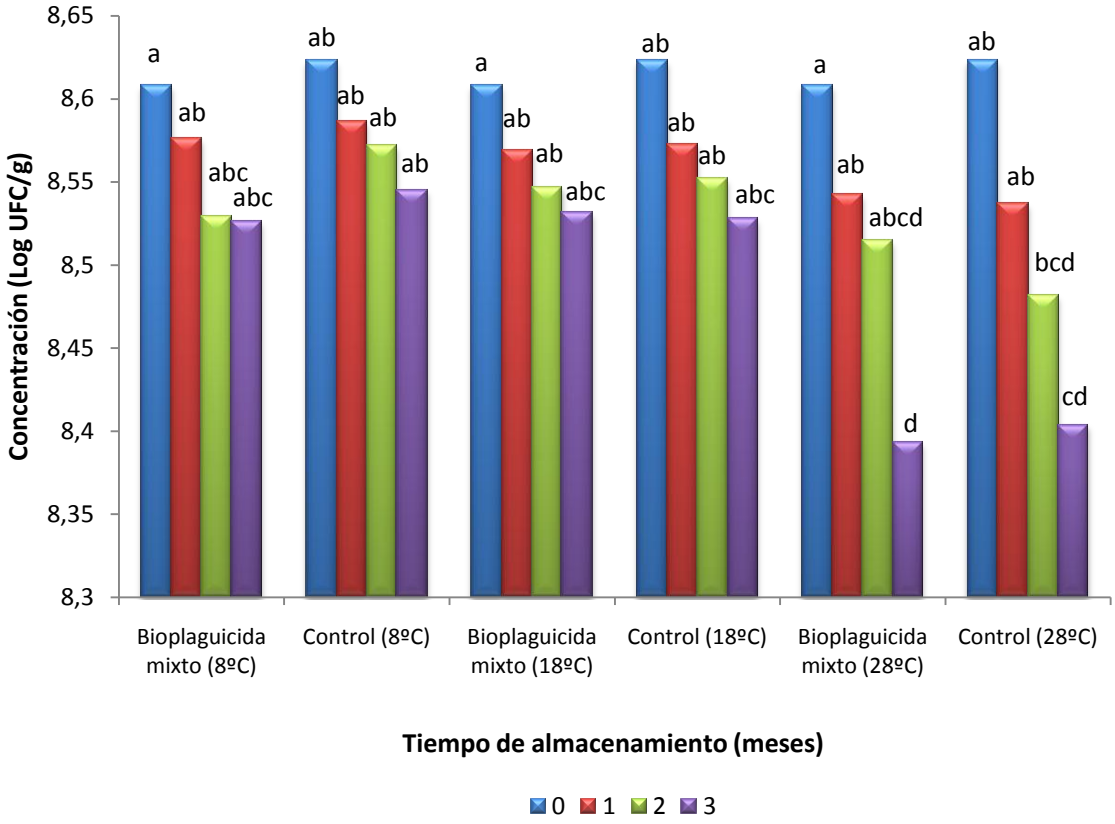

Figura 15. Comportamiento de la concentración o viabildad del bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), durante tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Este comportamiento podría ser el resultado de un posible efecto protector de las células, brindado por las formulaciones. De acuerdo a lo descrito, el vehículo inerte presente en el producto de Baculovirus podría disminuir el estrés osmótico que sufren los conidios de *T. koningiopsis* durante el proceso de almacenamiento ya que por su baja humedad, es capaz de disminuir la tasa metabólica y la producción de sustancias toxicas.

Además, el producto a base de *T. koningiopsis* presenta diferentes auxiliares de formulación que pueden intensificar la acción estabilizadora de los conidios del hongo en el bioplaguicida individual o mixto. Varios autores han evidenciado el

efecto positivo de diversos auxiliares en una formulación. Abadías *et al*. (2001), evaluaron diferentes protectores de secado para aumentar la viabilidad de la levadura *Candida sake*, obteniendo la menor pérdida de viabilidad (14,7%), utilizando una mezcla de lactosa al 10% y de leche descremada al 10%. Este resultado fue atribuido al efecto de la leche, ya que ésta puede proveer una gran variedad de nutrientes que aumentan la recuperación de las células después del proceso de secado y disminuyen el estrés osmótico de las mismas.

En algunos casos, el efecto de los auxiliares de formulación ha sido deletéreo para el microorganismo. Por ejemplo, Jackson *et al*. (1996), evaluaron el efecto de los excipientes sobre el hongo *Colletotrichum truncatum*, encontrando que después de nueve y dieciocho meses de almacenamiento, los microesclerocios sin formular presentaron porcentajes de germinación del 99% y del 93% respectivamente; mientras que los microesclerocios mezclados con almidón de maíz presentaron un porcentaje de germinación del 80% y del 79%. Las diferencias en el porcentaje de germinación se atribuyeron a la capacidad del almidón de absorber fácilmente agua, por lo que posiblemente se incrementó el porcentaje de humedad, activando el metabolismo celular durante el almacenamiento y por lo tanto disminuyendo las células viables en la formulación.

En otro estudio Melin *et al*. (2006), evaluaron la viabilidad y la concentración de formulaciones líquidas a base de la levadura *Pichia anolama,* almacenadas a diferentes temperaturas e incorporando sustancias protectoras a la desecación. Los autores evidenciaron que después de cuatro semanas de almacenamiento a 4ºC y 10ºC, la formulación presentó entre un 75% y un 90% de viabilidad respectivamente. Sin embargo, la incorporación de lactosa o trehalosa aumentó la viabilidad después de 12 semanas de almacenamiento en todas la temperaturas evaluadas (-20ºC a 30ºC). Los autores concluyeron que este efecto se debió posiblemente a que la lactosa y la trehalosa estabilizan las proteínas y los lípidos de la membrana celular cuando la célula es sometida a un proceso de desecación extremo.

Es necesario tener en cuenta, que no solamente la temperatura influye en la estabilidad de un principio activo, dentro de otras variables se encuentran la atmósfera de empaque, el tipo de empaque, la actividad de agua y la humedad relativa (Chen *et al*., 2008). Aunque estas variables no se evaluaron en el presente

estudio, es posible que la atmósfera de empaque contribuyera a que la concentración y la viabilidad de los conidios de *T. koningiopsis* se mantuviera estable durante el tiempo de almacenamiento, ya que las muestras del bioplaguicida mixto y el control fueron almacenados en ausencia de oxígeno. El empaque al vacío puede contribuir a aumentar la estabilidad de un microorganismo cuando es almacenado, ya que de lo contrario, la presencia de oxígeno puede interactuar con los sistemas membranales de las células y causar daños en la síntesis de DNA (Abadías *et al*., 2001).

Con respecto a este factor Teshler *et al*. (2007), evaluaron el efecto de la atmósfera de empaque en la viabilidad de un bioherbicida a base de *Sclerotinia minor,* evidenciando que el almacenamiento en atmósferas libres de oxígeno (CO_2 y N_2), aumentaron la estabilidad de los esclerocios del hongo a diferencia del almacenamiento realizado en presencia de oxígeno. El autor atribuyó este resultado al hecho de que *S. minor* es un microorganismo aerobio, por lo tanto, utiliza el oxígeno como aceptor de electrones en la cadena de fosforilación, por lo que la ausencia o mínima presencia de oxígeno inhibe el crecimiento aeróbico del hongo, contribuyendo a la estabilidad de propágulos infectivos a través del tiempo.

Debido al posible efecto protector o de estabilización que tiene la atmosfera de empaque, se recomienda realizar un estudio de estabilidad en el tiempo en el que se evalué la atmosfera y el tipo de empaque utilizado, para poder establecer si contribuye o no a la estabilización de los principios activos *T. koningiopsis* y Baculovirus y de este modo mejorar la vida útil del bioplaguicida mixto.

De acuerdo a los resultados descritos se recomienda el almacenamiento del producto a una temperatura de 18ºC, ya que a esta temperatura, la concentración y viabilidad de los conidios de *T. koningiopsis* en el bioplaguicida mixto se mantiene estable, no presentándose una pérdida significativa de la misma durante los tres meses, lo que podría asegurar que el hongo mantenga su eficacia frente al fitopatógeno a controlar. El almacenamiento a esta temperatura presenta ventajas tanto para el agricultor como para el productor, ya que disminuiría el costo del producto por la no necesidad de utilización de la cadena de frío en almacenamiento y distribución. Sin embargo, es necesario proseguir con el estudio de estabilidad en

el tiempo para determinar la vida útil real del bioplaguicida y de esta forma establecer también las mejores condiciones para el almacenamiento del mismo.

7.5.2. Germinación

Mediante este estudio se evaluó la estabilidad microbiológica de los conidios de *T. koningiopsis* en el prototipo de bioplaguicida mixto a base de este hongo y Baculovirus.

Se utilizó un diseño completamente al azar en el que la unidad experimental consistió en bolsas de polietileno selladas al vacío, en las cuales se colocaron los tratamientos por evaluar correspondientes al prototipo de bioplaguicida mixto y a la formulación en polvo de *T. koningiopsis* (tratamiento control). Las muestras fueron almacenadas a tres temperaturas: 8ºC, 18ºC y 28ºC.

La evaluación se realizó por medio de la técnica de germinación, determinando el porcentaje de conidios germinados después de 24 horas de incubación. El muestreo se realizó cada mes durante tres meses de almacenamiento.

Para el prototipo de bioplaguicida mixto se observó que durante los tres meses de almacenamiento a 8ºC se presentó una disminución progresiva de la germinación a la temperatura de 8ºC, obteniéndose valores del 97,5% antes de almacenar y del 97,2%, 97,3% y 96,1%, al primer, segundo y tercer mes de almacenamiento, respectivamente, valores que no presentaron diferencias estadísticas según la prueba de Tukey (95%) (Anexo 19).

Por el contrario, el tratamiento correspondiente a la formulación en polvo de *T. koningiopsis,* si presentó una germinación significativamente menor (P<0,05) a la inicial después de tres meses de almacenamiento, siendo la germinación inicial de 97,2% y la final de 95,4% (Figura 16).

El análisis estadístico realizado por medio de la prueba de comparación de medias de Tukey (95%), no detectó diferencias significativas (P>0,05) entre el porcentaje inicial y final de germinación de conidios del hongo presentes en el prototipo de bioplaguicida mixto, indicando que la germinación no se vio afectada durante el

almacenamiento. Por el contrario, la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, presentó diferencias significativas entre el porcentaje de germinación inicial y final (Figura 16, Anexo 20).

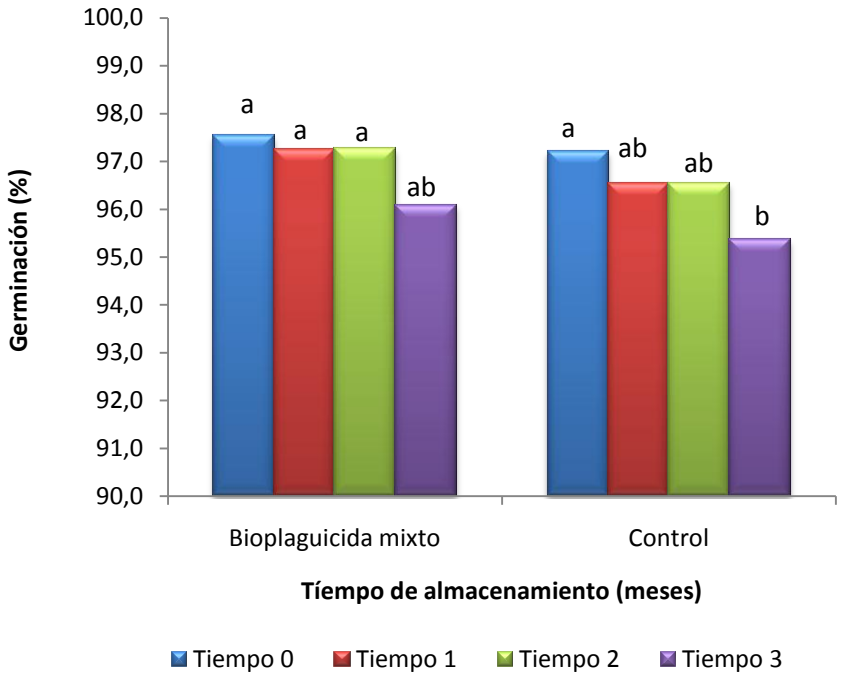

Figura 16. Estabilidad de la viabilidad del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus y la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, almacenados a 8ºC. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Sin embargo, todos los valores de germinación, tanto del prototipo de bioplaguicida mixto como del producto concentrado de *T. koningiopsis*, en todos los tiempo evaluados, fueron superiores al límite establecido en los estándares nacionales e internacionales de calidad, los cuales exigen una viabilidad superior al 85% para este tipo de bioinsumos (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Estas germinaciones dentro de los límites de aceptación indican que los dos bioplaguicidas tanto recién manufacturados como después de 1, 2 o 3 meses de almacenamiento, presentaron una viabilidad adecuada del hongo, que garantiza que

al ser aplicados en campo, el agente de biocontrol actuará rápida y eficazmente frente al fitopatógeno a controlar.

Cuando el almacenamiento se realizó a la temperatura de 18ºC, el prototipo de bioplaguicida mixto presentó un porcentaje de germinación del 97,5%, antes de almacenar y del 96,9%, 96,3% y 94,7%, durante el primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente. El tratamiento correspondiente a la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, disminuyó su porcentaje de germinación del 97,2%, valor antes de almacenar, a 95,4%, 95,4% y 94,5%, al primer, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Figura 17, Anexo 21).

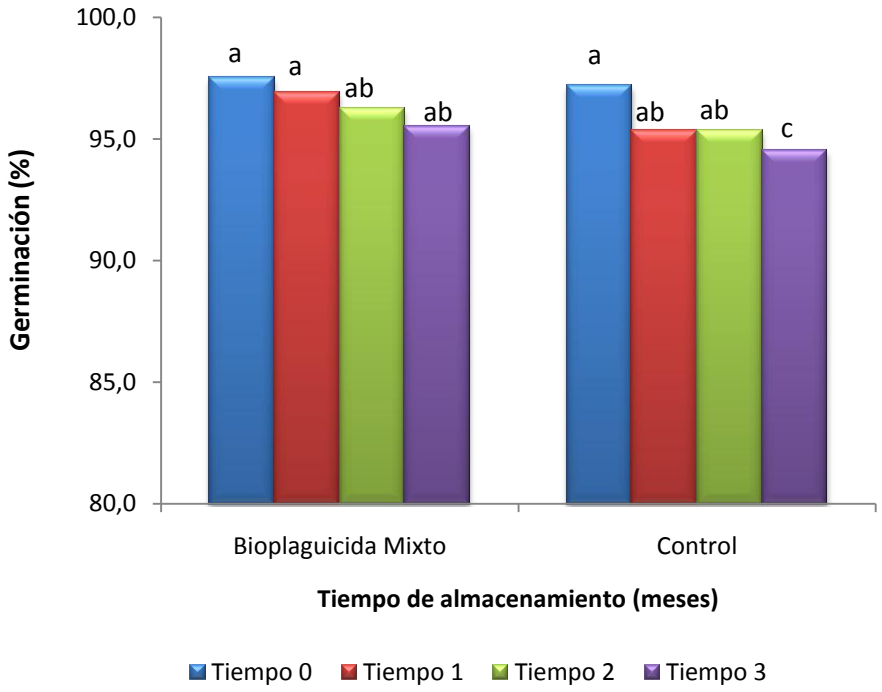

Figura 17. Estabilidad de la viabilidad del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus y la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, almacenados a 18ºC. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

El análisis estadístico (Tukey 95%) no detectó diferencias significativas entre la germinación inicial y final, del prototipo de bioplaguicida mixto. Este resultado

sugiere que a 18ºC, la germinación de los conidios del hongo no se vio afectada, comportamiento similar al observado a 8ºC. El tratamiento formulación en polvo de *T. koningiopsis*, presentó diferencias estadísticas (P<0,05) entre los porcentajes de germinación inicial y final, lo que sugiere que este tratamiento si presentó una pérdida significativa de la viabilidad durante el almacenamiento (Figura 17, Anexo 22). Sin embargo, los valores de germinación en todos los tiempos evaluados se encontraron dentro del rango de aceptación establecido para asegurar la calidad de un bioplaguicida de este tipo (Cenicafé, 1997; Verma *et al*., 2007).

Las muestras almacenadas a 28ºC presentaron una mayor reducción en la capacidad de germinación de los conidios de *T. koningiopsis* tanto en el bioplaguicida mixto como en el tratamiento correspondiente a la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, con respecto a las obtenidas a 8ºC y 18ºC. Para el bioplaguicida mixto el porcentaje de germinación disminuyó del 97,5% (valor antes de almacenar) a 81,9% después de tres meses de almacenamiento (Figura 18, Anexo 23). Sin embargo, transcurridas 48 horas de incubación, la germinación fue superior al 95%, resultado que sugiere que el proceso de almacenamiento no causó la muerte de los conidios, sino que indujo un estado de latencia que retrasó el inicio de la formación del tubo germinal. Un comportamiento similar se observó en el tratamiento correspondiente a la formulación de *T. koningiopsis*, la cual presentó una germinación inicial del 97,2%, y una germinación final del 80,0% después de tres meses de almacenamiento.

La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas entre el porcentaje de germinación inicial y los obtenidos al primer y segundo mes de almacenamiento. Sin embargo, a partir del tercer mes de almacenamiento se observó una disminución significativa (P<0,05) de esta característica. Un comportamiento similar presentó el tratamiento control, para el cual se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de germinación inicial y final (Figura 18, Anexo 24).

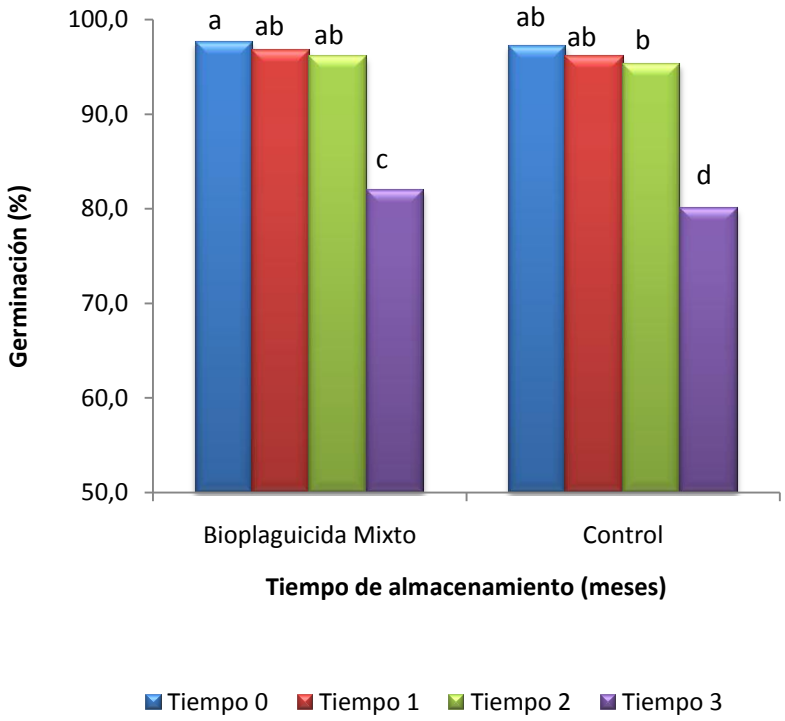

Figura 18. Estabilidad de la viabilidad del prototipo de bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus y la formulación en polvo de *T. koningiopsis*, almacenados a 28ºC. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Las menores germinaciones después de tres meses de almacenamiento fueron obtenidas con el tratamiento control a las tres temperaturas evaluadas, lo que sugiere que los auxiliares de formulación del prototipo de bioplaguicida mixto, posiblemente protegieron más eficientemente al microorganismo, de las condiciones adversas generadas durante el almacenamiento. Este efecto protector podría atribuirse al excipiente mayoritario del bioplaguicida a base Baculovirus, que al ser mezclado con el producto de *T. koningiopsis*, disminuyó el contenido de humedad final de la mezcla. Lo anterior se evidenció, ya que el producto de *T. koningiopsis* antes de ser mezclado presentaba un porcentaje de humedad del 3,37% y después de realizar la mezcla con el bioplagucida a base de Baculovirus, el bioplaguicida mixto presentó un porcentaje de humedad del 0,52 ± 0,11%. La humedad final del

prototipo mixto se debió posiblemente a que el excipiente mayoritario del producto a base de Baculovirus es un silicato, que tiene poca capacidad de retención de agua (Voight y Bomschein, 1982). La baja humedad es importante, ya que puede disminuir la tasa metabólica de los conidios de *T. koningiopsis*, lo que podría evitar la acumulación de metabolitos tóxicos y proteger la integridad de la membrana celular durante el proceso de almacenamiento (Costa *et al.,* 2002).

A pesar de que el bioplaguicida mixto fue más estable, el producto de *T. koningiopsis* se mantuvo dentro de los estándares de viabilidad establecidos, lo que podría deberse a que este producto incluye diferentes aditivos que protegen los conidios del hongo bajo condiciones de estrés. Lo anterior ha sido evidenciado por diferentes autores como Guijarro *et al.* (2007), quién evaluó diferentes aditivos incluidos en formulaciones del hongo *Penicillium frequentans,* con el propósito de aumentar su estabilidad durante el almacenamiento. En dicho trabajo se encontró que la adición de sustancias como la glucosa y el glicerol al 7,5% incrementaron entre un 47,7% y un 69,7% la estabilidad del producto al ser almacenado durante 365 días.

Un resultado similar obtuvieron Jackson *et al.* (2007), al evaluar diferentes formulaciones del hongo *Paecilomyces fumosoroseus* con el fin de aumentar su tolerancia a la desecación y su estabilidad en almacenamiento, observando un aumento significativo de la viabilidad de las blastosporas del hongo (principio activo) al ser almacenado durante 12 meses a 4º y -20ºC, debido a la adición de protectantes como leche descremada.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la temperatura es un factor crítico que determina la estabilización de la viabilidad y en consecuencia de la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas.

La reducción total de la germinación del hongo *T. koningiopsis,* después de tres meses de almacenamiento fue del 1,48% a temperatura de refrigeración (8°C), del 2,85% a 18ºC y a 28°C con un 15,97%, siendo este último la mayor pérdida obtenida. Con respecto al tratamiento control (formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*) se presentaron pérdidas del 1,89% cuando fue almacenado a 8°C, y de 2,74% y 17,68% a 18º y 28°C respectivamente (Figura 19, Anexo 25).

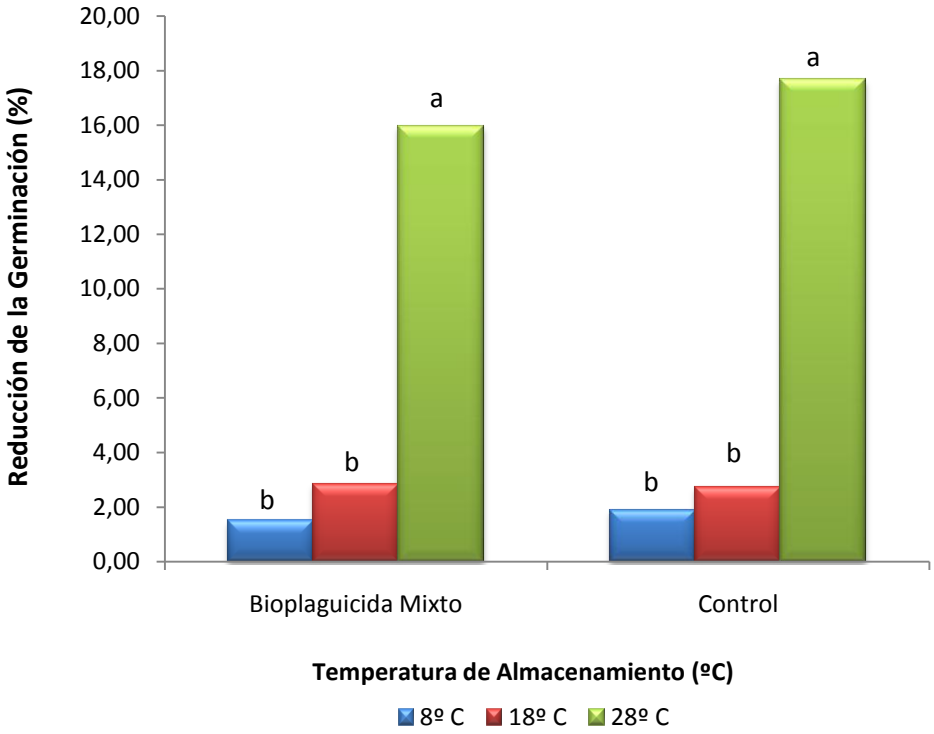

Figura 19. Reducción de la germinación del bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

El análisis estadístico realizado por medio de la prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas (P>0,05) entre la reducción de la germinación del hongo *T. koningopsis* en el bioplaguicida mixto y el tratamiento control cuando fueron almacenados a las temperaturas de 8ºC y 18ºC. Lo que sugiere que los dos productos presentaron la misma estabilidad de germinación de los conidios del hongo, cuando se almacenaron a dichas temperaturas. En contraste, la temperatura de 28ºC causó una reducción significativa (P<0,05) de la germinación del hongo, lo que indica que esta temperatura afectó negativamente la concentración y la viabilidad del principio activo *T. koningiopsis* en el bioplaguicida mixto y en el tratamiento control (Figura 19, Anexo 26).

Las mayores pérdidas de viabilidad obtenidas a 28ºC en comparación con las obtenidas a 8ºC y 18ºC, probablemente se deben a que a una mayor temperatura, se presenta una mayor reactividad de las moléculas, produciéndose reacciones químicas o procesos de degradación de los auxiliares de formulación, cuyos productos pueden ser tóxicos para las células o conidios (Contreras, 2005).

Diferentes autores han determinado el efecto negativo que tiene la alta temperatura sobre la viabilidad de un principio activo en un bioproducto. Lo anterior se evidencia porque cuando la temperatura de almacenamiento incrementa, la mortalidad de las células también lo hace y el tiempo de almacenamiento se reduce; a diferencia de las temperaturas bajas, las cuales mantienen la actividad metabólica en un nivel bajo y la estabilidad del bioplaguicida bajo condiciones de almacenamiento aumenta (Costa *et al.,* 2002).

Elzien *et al.* (2004) evaluaron la viabilidad del producto Pesta cuyo principio activo es *Fusarium oxysporium* Foxy 2, durante seis y doce meses de almacenamiento. Este producto presentó una reducción de la viabilidad del 32% y del 21% durante cada tiempo evaluado. Los autores atribuyeron este resultado a la pérdida de las reservas endógenas de carbono cuando el microorganismo fue almacenado a una temperatura de 25ºC.

De igual manera, Shabana *et al.* (2003) concluyeron que para mantener la viabilidad de *Fusarium oxysporum,* principio activo de un bioherbicida, es necesario realizar su almacenamiento a bajas temperaturas, debido a que después de almacenar formulaciones a base de este microorganismo por un período de un año a 3°C y 25°C, se obtuvieron viabilidades finales del 93% y del 55% respectivamente. Resultados similares obtuvieron Abadías *et al.* (2003), al evaluar la viabilidad de la levadura *Candida sake* a dos temperaturas (4ºC y 25ºC) observando que la viabilidad fue más estable cuando el almacenamiento se realizó a la menor temperatura (4ºC). De igual manera observó que la mayor temperatura (25ºC) disminuyó rápidamente el número de células viables a partir del décimo día de almacenamiento.

En otro trabajo, Garzón (2002) encontró que la temperatura influyó de forma negativa sobre la viabilidad de conidios formulados y sin formular del hongo *T. koningiopsis,* ya que al almacenar el producto a 8°C, 18ºC y 28°C durante 6 meses,

determinó que la mayor estabilidad de la viabilidad se presentó en las muestras del bioplaguicida que fueron almacenadas a 8°C.

Con la viabilidad obtenida en el presente estudio, expresada como porcentaje de germinación de los conidios de *T. koningiopsis*, principio activo del prototipo de bioplaguicida mixto, se puede sugerir que a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento, disminuye la estabilidad de los conidios del hongo y por lo tanto la vida útil del bioproducto.

La vida útil del producto, definida como el período durante el cual los propágulos del ingrediente activo son capaces de mantenerse viables y eficaces, se puede aumentar a bajas temperaturas, las cuales reducen la actividad metabólica de las células evitando la producción de metabolitos tóxicos y el agotamiento de nutrientes (Elzien *et al*., 2004; Sabaratnam y Traquair, 2002).

El posible estado de latencia presentado por lo conidios de *T. koningiopsis* al tercer mes de almacenamiento a 28ºC, sugiere que el almacenamiento no causó la muerte celular, sino que indujo al microorganismo biocontrolador a un estado de dormancia, en el cual se retardó la recuperación metabólica de las células y en consecuencia el proceso de germinación. Boyetchko *et al*. (2006), estableció que en las formulaciones de microorganismos, es necesario que el principio activo entre en un estado de latencia durante el almacenamiento para que no pierda las características biocontroladoras y fisiológicas.

Un comportamiento similar al presentado por el principio activo *T. koningiopsis* del bioplaguicida mixto al ser almacenado a 28ºC, fue observado por Moore *et al*. (1996), quienes evaluaron la germinación del hongo *Metarhizium flavoviridae* almacenado durante 160 semanas a 8ºC, evidenciando la reducción de la germinación del hongo, fenómeno que atribuyeron al hecho de que cada microorganismo posee una temperatura óptima para su crecimiento. Otra posible causa del retraso en la germinación es la deshidratación de los conidios durante el almacenamiento, lo cual incrementa la tensión superficial de los mismos (Burgues, 1998). Debido a lo anterior, Jackson *et al*. (2007) recomendó la adición de sustancias surfactantes como dextrinas, disacáridos y monosacáridos que aumentan la tolerancia a la desecación durante el almacenamiento, reduciendo la tensión superficial y facilitando la rehidratación de las células.

Además de la temperatura, existen otros factores ambientales que determinan en gran medida la estabilidad y vida útil de un bioplaguicida. Dentro de estos factores se encuentra la humedad relativa y el tipo de empaque utilizado durante el almacenamiento, variables no evaluadas en el presente estudio. Por ejemplo, Lawrie *et al.* (2001) determinó que a humedades cercanas al 12% y a temperatura de 4ºC, se mantiene alta la viabilidad y la actividad biocontroladora de un granulado a base de *Alternaria alternata* durante 20 meses de almacenamiento, un comportamiento totalmente diferente al presentado a una temperatura de 20ºC y humedades altas, ya que en este caso se presenta una reducción significativa en la viabilidad después de 12 meses de almacenamiento.

Teniendo en cuenta que la mayoría de bioplaguicidas que se encuentran en el mercado internacional, recomiendan el almacenamiento en condiciones de refrigeración, es importante resaltar que los resultados obtenidos en el presente estudio permiten recomendar el almacenamiento del prototipo de bioplaguicida mixto a una temperatura promedio de 18ºC. Esta recomendación es de gran importancia, especialmente para la cadena de producción y comercialización del bioplaguicida, ya que disminuye los costos tanto para el productor como para el agricultor. Sin embargo, se recomienda proseguir con el estudio de estabilidad en almacenamiento por lo menos por 24 meses, para determinar la vida útil real del bioplaguicida mixto a las tres temperaturas evaluadas.

7.5.3. Contenido de Contaminantes

El estricto control de calidad de un bioplaguicida es esencial para dar repetibilidad y seguridad al bioproducto. En caso de que el control de calidad microbiológico sea insuficiente, la contaminación microbiana puede generar la perdida de la eficacia del bioproducto, además de la posible proliferación de microorganismos patógenos para plantas o animales (Jenkins y Grzywacz, 2000). Por esta razón, la implementación de este control de calidad debe ser incluida desde el inicio de la producción (Gaugler *et al*., 2000).

Mediante el presente estudio se evaluó el contenido de contaminantes en prototipo de bioplaguicida mixto mediante la técnica de recuento en placa, analizando muestras almacenadas a 8ºC, 18ºC y 28ºC durante tres meses.. Como tratamiento control se utilizó la formulación en polvo de *T. koningiopsis* y la formulación a base de Baculovirus. El contenido de contaminantes se expresó como Unidades Formadoras de Colonia por gramo de producto (UFC/g) y posteriormente estos valores fueron transformados determinado el logaritmo decimal de los mismos.

A la temperatura de almacenamiento de 8ºC, el bioplaguicida mixto presentó un contenido de contaminantes inicial de $2{,}17x10^4$ UFC/g y un contenido de contaminantes de $2{,}40x10^4$ UFC/g, $3{,}68x10^4$ UFC/g, $5{,}75x10^4$ UFC/g al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento, respectivamente (Figura 20, Anexo 27).

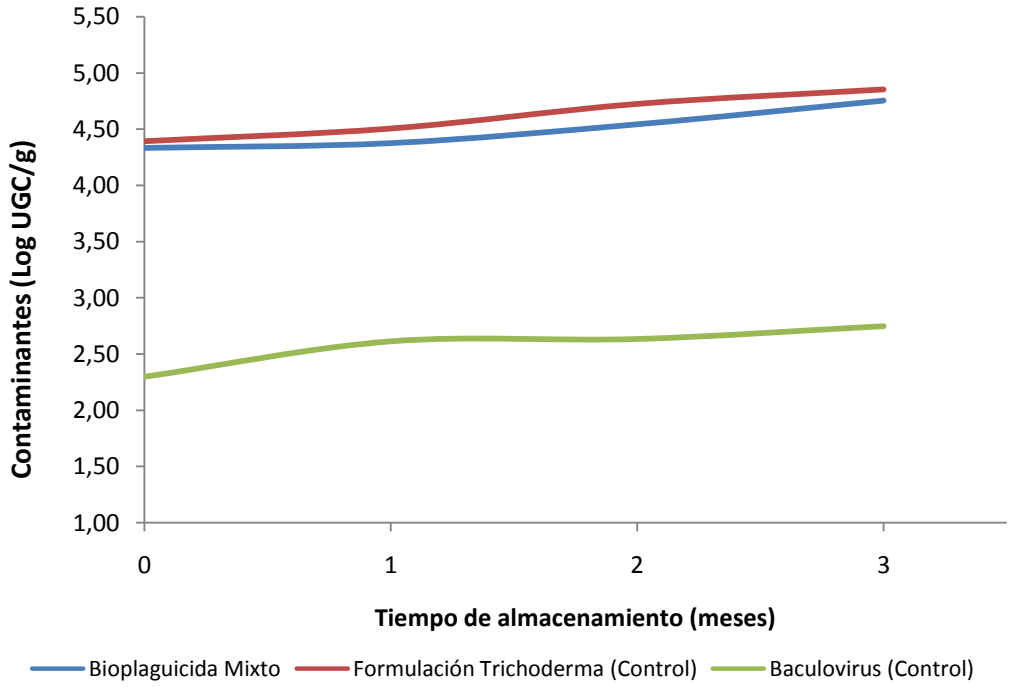

Figura 20. Comportamiento del contenido de contaminantes en el bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus y los tratamientos controles (formulación en polvo de *T. koningiopsis* y formulación a base de Baculovirus) almacenados durante tres meses a 8ºC.

El tratamiento control, formulación a base de *T. koningiopsis*, presentó un contenido inicial de contaminantes de $2{,}78x10^4$ UFC/g y de $3{,}35x10^4$ UFC/g, $5{,}35x10^4$ UFC/g y

de 7,35x10^4 UFC/g después de uno, dos y tres meses de almacenamiento. La formulación a base de Baculovirus presentó un contenido de contaminantes inicial de 2,48x10^2 UFC/g, seguida de 3,22x10^2 UFC/g, 4,63x10^2 UFC/g y de 6,45x10^2 UFC/g al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente, a la misma temperatura de almacenamiento (8º C) (Figura 20, Anexo 27).

A 18ºC el bioplaguicida mixto, presentó un contenido de contaminantes de 2,17x10^4 UFC/g inmediatamente después de manufacturar y de 2,40x10^4 UFC/g, 7,32x10^4 y de 1,25x10^5 UFC/g al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente. La formulación en polvo a base de *T. koningiopsis* presentó un contenido inicial de contaminantes de 2,78x10^4 UFC/g, y después del primero, segundo y tercer mes de almacenamiento la contaminación fue de 3,63x10^4 UFC/g, 8,60x10^4 UFC/g y de 1,05x10^5 UFC/g respectivamente. La formulación a base de Baculovirus presentó un contenido de contaminantes inicial de 2,48x10^2 UFC/g y 5,17x10^2 UFC/g, 6,02x10^2 y 7,22x10^2 UFC/g al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento (Figura 21, Anexo 28).

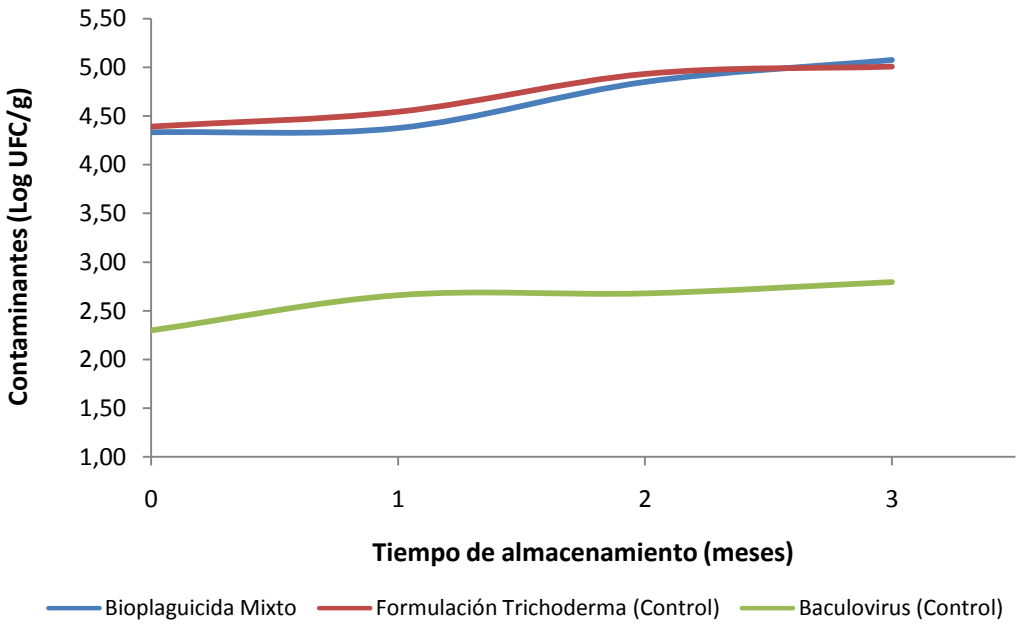

Figura 21. Comportamiento del contenido de contaminantes en el bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus y los tratamientos controles (formulación en polvo de *T. koningiopsis* y formulación a base de Baculovirus) almacenados durante tres meses a 18ºC.

Al almacenar el bioplaguicida mixto a 28ºC, éste presentó un contenido de contaminantes inicial de $2,78x10^4$ UFC/g, seguido de $4,39x10^4$ UFC/g, $1,01x10^5$ UFC/g y $3,35x10^5$ UFC/g después del primero, segundo y tercer mes de almacenamiento. El tratamiento control, formulación en polvo a base de *T. koningiopsis* presentó un contenido inicial de contaminantes de $2,78x10^4$ UFC/g, y después del primero, segundo y tercer mes de almacenamiento la concentración de contaminantes fue de $4,17x10^4$ UFC/g, $1,13x10^5$ UFC/g y de $3,97x10^5$ UFC/g respectivamente. De igual forma, la formulación a base de Baculovirus presentó un contenido de contaminantes inicial de $2,48x10^2$ UFC/g y de $8,15x10^2$ UFC/g, $8,47x10^2$ y $2,43x10^3$ UFC/g pasados uno, dos y tres meses (Figura 22, Anexo 29).

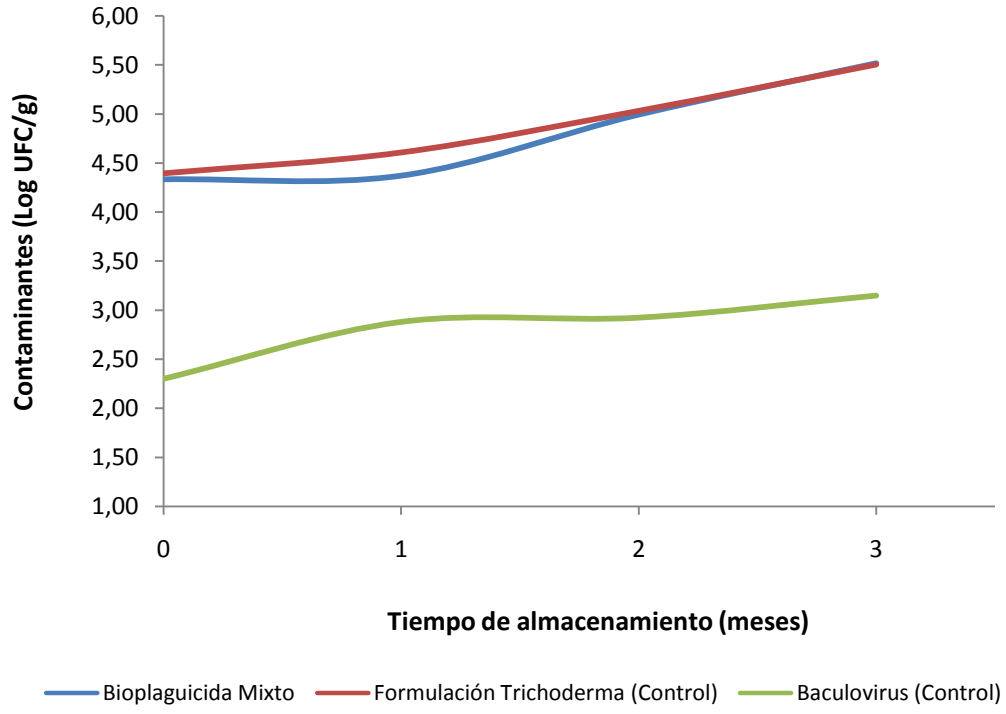

Figura 22. Comportamiento del contenido de contaminantes en el bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* (Th003) y Baculovirus y los tratamientos controles (formulación en polvo de *T. koningiopsis* y formulación a base de Baculovirus) almacenados durante tres meses a 28ºC.

A todas las temperaturas evaluadas (8°C, 18°C y 28ºC) se observó un aumento en el contenido de contaminantes para todos los tratamientos. Sin embargo, el incremento de la contaminación fue mayor cuando los bioplaguicidas fueron almacenados a la mayor temperatura (28ºC), Es posible que este efecto se deba a que dicha temperatura es adecuada para el crecimiento de diversas bacterias contaminantes, las cuales pueden producir metabolitos tóxicos mediante fermentación anaeróbica y de igual manera producir radicales libres que afecten la estabilidad de los principios activos (Burges, 1998).

De acuerdo al límite de contaminantes establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicida Biotécnica (2004) para este tipo de productos, el cual corresponde $<10^6$ UFC/g, los tres bioplaguicidas evaluados estuvieron dentro del rango de aceptación durante los tres meses de almacenamiento, es decir, mantuvieron la calidad microbiológica para estos bioinsumos.

La comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas (P>0,05), entre el aumento del contenido de contaminantes de los tres productos almacenados en cada temperatura, ni entre los obtenidos para cada producto en las tres temperaturas de almacenamiento (Anexo 31). Sin embargo, se observa una tendencia numérica a un mayor aumento en la contaminación a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento. Por ejemplo, para el bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC la contaminación aumentó en un 8,78%, a 18ºC en un 14,59% y a 28ºC en un 21,43% después de tres meses de almacenamiento. El tratamiento control a base de *T. koningiopsis* presentó un comportamiento similar, con un incremento en la contaminación del 9,50% a 8ºC, del 14,59% a 18ºC y del 19,96% a 28ºC (Figura 23, Anexo 30).

La formulación a base de Baculovirus presentó un porcentaje de incremento del contenido de contaminantes numéricamente superior a los obtenidos con los otros dos tratamientos con valores del 15,29% a 8ºC, del 17,43% a 18ºC y un 26,07% a 28ºC (Figura 23, Anexo 30).

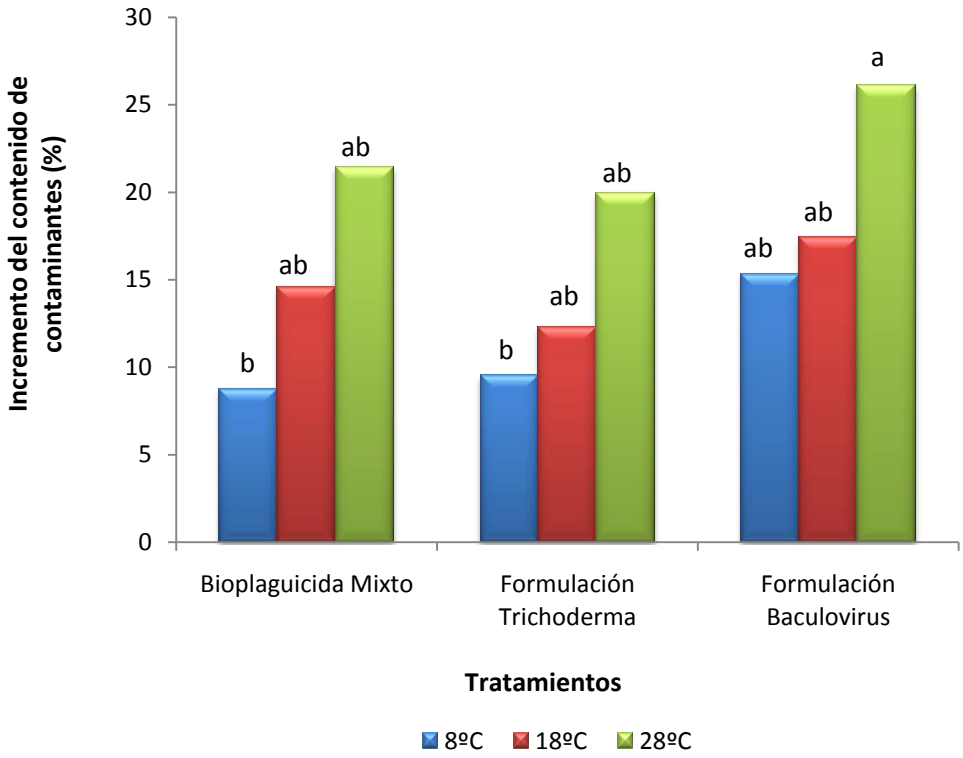

Figura 23. Porcentaje de incremento del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto, formulación a base de *T. koningiopsis* (Th003) y la formulación a base de Baculovirus, después de tres meses de almacenamiento a de 8ºC, 18ºC y 28ºC. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

El aumento en el contenido de contaminantes puede interferir en la estabilidad microbiológica y biológica de los principios activos de los bioplaguicidas. Lo anterior se debe a que los microorganismos contaminantes durante el tiempo de almacenamiento, pueden producir metabolitos tóxicos mediante procesos de fermentación aeróbica o anaeróbica y así como radicales libres que afectan la viabilidad de los ingredientes activos (Burges, 1998).

Un ejemplo de esta influencia de la contaminación sobre la estabilidad del principio activo, se presenta en el estudio realizado por Jenking *et al*. (1998). Estos autores compararon diversas muestras de bioplaguicidas de diferentes partes del mundo; dos muestras de bioplaguicidas provenientes de China, dos de Indonesia, uno de la

India y una de Colombia. Solamente un producto a base de *Beauveria* sp. presentó baja contaminación y alta viabilidad (86%) y los demás presentaron alta contaminación y poca viabilidad. Por otra parte, ninguno de los productos tenían fecha de vencimiento o estudios bajo condiciones de almacenamiento, lo que genera desconfianza sobre la calidad del bioplaguicida. Los altos niveles de contaminación de los productos indicaron que probablemente se manufacturaron sin realizar una control adecuado del ambiente, los materiales o los equipos, aunque también es posible que en las etapas de embalaje y de empaque se haya contribuido al aumento de la contaminación debido a la mala manipulación de los operarios (Jenkins *et al*., 1998).

Jenkins y Grzywacz (2000) sugirieron que las formulaciones a base de Baculovirus que presentan un nivel de contaminación superior a 10^8 UFC/g podrían presentar una pérdida de la virulencia durante el almacenamiento y la eficacia del virus, debido a un efecto autocatalítico o de proteólisis que sufren los cuerpos de inclusión, por causa de los radícales libres, proteínas y lípidos derivados de la actividad metabólica de las bacterias contaminantes. Sin embargo, los productos evaluados en el presente trabajo mostraron contaminaciones más de 100 veces por debajo de ese valor.

La principal fuente de contaminación de los bioplaguicidas a base de Baculovirus producidos *in vivo* son los microorganismos colonizadores del intestino del insecto (*Enterococcus faecium* y *E. faecalis*) y saprófagos oportunistas (Jenkins y Grzywacz, 2000). Por tal razón, Caballero *et al.* (2001) plantea la necesidad de recoger las larvas muertas por virus antes de que se produzca la invasión por bacterias contaminantes, o sugiere intentar limpiar la contaminación de las muestras por medio de procesos de filtración y centrifugación diferencial.

De igual manera, la actividad metabólica de los microorganismos contaminantes puede disuadir a los posibles usuarios, debido a la producción de malos olores asociados a la fermentación bacteriana. Sin embargo, este factor puede ser controlado desde la implementación de la recolección oportuna de las larvas, hasta la implementación de sistemas de almacenamiento óptimos durante la producción hasta la venta al usuario final (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Igual que otros autores, Jenkins y Grzywacz (2000), recomiendan la filtración o centrifugación de las larvas infectadas con el virus, ya que de esta manera se eliminan los desechos o grasas corporales del insecto que contribuyen al mal olor del producto, si éste no se almacena a una temperatura apropiada (<15ºC).

De acuerdo a lo mencionado en la caracterización fisicoquímica del prototipo de bioplaguicida mixto, se recomienda la adición de una sustancia reguladora de pH, la cual además de mantener estable el pH del prototipo entre 5,0 y 6,0, puede ser efectiva para inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes durante el almacenamiento, sin mayores efectos sobre la viabilidad de los conidios de *T. koningiopsis* y de los cuerpos de inclusión del virus.

Se recomienda, al igual que en la prueba de estabilidad de la germinación y la concentración, el almacenamiento del prototipo de bioplaguicida mixto a una temperatura de 18ºC, ya que el nivel de contaminación no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al obtenido a 8ºC. Esta recomendación es de gran importancia, ya que disminuye los costos de producción y comercialización para el productor y el agricultor, por las razones mencionadas anteriormente. Sin embargo, se recomienda proseguir con el estudio de estabilidad en almacenamiento por lo menos por 24 meses, para determinar si esta característica se mantiene estable durante el tiempo y si tiene un efecto determinante sobre la vida útil del bioplaguicida mixto a base de conidios de *T. koningiopsis* y Baculovirus a las tres temperaturas evaluadas.

7.6. Estabilidad físicoquímica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus bajo condiciones de almacenamiento.

7.6.1. Porosidad

La estabilidad de la porosidad del bioplaguicida mixto se evaluó durante tres meses de almacenamiento a tres temperaturas 8ºC, 18º y 28ºC y el resultado se expresó como porcentaje de porosidad (%).

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 8ºC, presentó una porosidad inicial del 39,99%, y valores del 40,04%, 40,06% y del 40,19% después del primero, segundo y tercer mes de almacenamiento (Tabla 8).

Al almacenar el bioplaguicida mixto a 18ºC, éste presentó una porosidad inicial del 39,99%, y después del primero, segundo y tercer mes de almacenamiento, porosidades del 39,98%, 40,04% y 40,12% respectivamente.

Cuando el almacenamiento se realizó a 28ºC, el bioplaguicida mixto presentó un porcentaje de porosidad inicial del 39,99%, seguido del 40,07%, 40,10% y del 40,18% durante el primero, segundo y tercer mes de almacenamiento (Anexo 32).

El análisis de varianza (ANOVA) no detectó diferencias significativas entre los valores de porosidad obtenidos para el producto a las tres temperaturas evaluadas, durante los tres meses de almacenamiento (Anexo 33). Este resultado indica que el almacenamiento durante tres meses a 8ºC. 18ºC y 28ºC, no ejerció un efecto sobre la porosidad del prototipo de bioplaguicida mixto.

Tabla 8. Porcentaje de porosidad del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a las temperaturas de almacenamiento 8ºC, 18ºC y 28ºC.

Tiempo de Almacenamiento (Meses)	Temperatura de Almacenamiento		
	8ºC	18ºC	28ºC
0	39,99	39,99	39,99
1	40,04	39,98	40,07
2	40,06	40,04	40,10
3	40,19	40,12	40,18

Además, todos los resultados de porosidad del bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento se mantuvieron dentro del rango de aceptación establecido por la industria farmacéutica para productos sólidos, el cual sugiere que la porosidad sea menor al 60% (Martin y Sinko, 2005). De acuerdo a lo anterior es posible sugerir que el prototipo no presentará problemas durante la manipulación después del almacenamiento (Aulton, 2004).

La estabilidad de la porosidad garantiza que después de almacenado y aplicado el bioplaguicida mixto, éste tendrá una permanencia adecuada sobre la semilla de papa y asegurará la absorción de agua del medio ambiente, característica especialmente importante para favorecer la actividad del principio activo *T. koningiopsis.*

Un comportamiento similar al observado en el presente estudio fue evidenciado por Contreras (2005), quién evaluó la estabilidad a través del tiempo de un granulado a base de *Pichia onychis,* encontrando un porcentaje inicial de porosidad del 9,09% y después de seis meses de almacenamiento a 8ºC, 18ºC y 28ºC, porosidades del 9,69%, 9,69% y de 9,39%, valores que no presentaron diferencias estadísticas entre sí. El autor concluyó que además de que el granulado presentó una baja porosidad, ésta no cambió durante los seis meses de almacenamiento.

Al igual que las características descritas anteriormente, la porosidad se comportó de la misma forma cuando el producto fue almacenado a 8ºC y 18ºC, lo que confirma nuevamente que el bioplaguicida puede ser almacenado a 18ºC.

7.6.2. Fluidez Estática

La fluidez estática establece la capacidad de flujo que presentan los productos secos en un sistema mecánico de alimentación y permite inferir los problemas que se puedan presentar durante la etapa de producción o manipulación (Aulton, 2004)

La estabilidad de esta característica física se realizó por medio de la técnica del ángulo de reposo, analizando muestras del bioplaguicida mixto almacenadas a 8ºC, 18ºC y 28ºC durante tres meses. El resultado se expresó como ángulo de reposo (º).

Cuando el bioplaguicida mixto se almacenó a 8ºC, éste presento un ángulo de reposo inicial de 43,82º, y posteriormente de 43,80º, 43,92º y de 43,82º al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Tabla 9, Anexo 34).

Tabla 9. Fluidez estática expresada como ángulo de reposo (º) del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC.

Tiempo de Almacenamiento (Meses)	Temperatura de Almacenamiento		
	8ºC	18ºC	28ºC
0	43,82	43,82	43,82
1	43,80	43,83	43,91
2	43,92	43,86	44,01
3	43,82	43,83	43,91

A 18ºC, el bioplaguicida mixto presentó una fluidez inicial de 43,82º antes de almacenar, seguido de valores de ángulos de reposo de 43,83º, 43,86º y de 43,83 al primero, segundo y tercer mes de muestreo respectivamente

A 28ºC, el ángulo de reposo del bioplaguicida mixto después de manufacturar fue de 43,82ºC, y posteriormente de 43,91º, 44,01º y 43,91º al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Tabla 9, Anexo 34).

El análisis de varianza ANOVA no evidenció diferencias significativas entre los ángulos de reposo del bioplaguicida mixto cuando fue almacenado a las tres temperaturas, durante los tres meses de estudio (Anexo 35). Estos resultados

permiten sugerir que ni el almacenamiento, ni la temperatura, ejercieron un efecto sobre la capacidad de flujo del prototipo de bioplaguicida en evaluación.

Sin embargo, todos los valores de ángulo de reposo del prototipo fueron superiores a 30º, límite máximo establecido por el Laboratorio de Control Calidad de Bioplaguicida Biotécnica (Biotécnica, 2004) para asegurar que el producto no presentará problemas durante su manipulación. Este resultado sugiere que el prototipo de bioplaguicida mixto es ligeramente cohesivo y posiblemente presentará algunos problemas en los procesos de llenados de recipientes, así como en su movimiento a través de sistemas de alimentación mecánica, o cuando se realice su aplicación sobre la semilla de papa por parte del agricultor.

El proceso de mezcla durante la manufactura del bioplaguicida mixto está directamente relacionada con la fluidez del producto, ya que en esta etapa se determina el tamaño de partícula y por lo tanto la fuerza de cohesión entre las mismas, alterando por erosión o fragmentación las partículas, lo que produce fuerzas de cohesión y de rozamiento que disminuyen la capacidad de flujo del material (Voight y Bomschein, 1982).

Un ejemplo de lo anterior es el trabajo realizado por Contreras (2005), quién evaluó un granulado a base de *Pichia onychis.* El producto presentó valores de fluidez menores a 30º al inició y al final del tiempo de almacenamiento (seis meses). El autor atribuyó la dificultad del flujo a la no homogeneidad en el tamaño y la forma de los gránulos, debido a la etapa de granulación por extrusión manual, la cual produce gránulos con superficie desigual, aumentado las fuerzas de rozamiento y fricción entre las partículas y limitando el continuo flujo del material.

Debido a la posible dificultad de flujo del bioplaguicida mixto, es necesario corregir esta característica en la fase de optimización del producto, especialmente en el proceso de molienda, para obtener un tamaño de partícula más homogéneo. Otra posible solución, es la adición de un agente lubricante o coadyuvante que disminuya las fuerzas de cohesión y de rozamiento y aumente la adsorción de gases o vapores de las partículas, para incrementar las propiedades de flujo del bioplaguicida. Sin embargo, como el producto es ligeramente cohesivo por naturaleza, será difícil mejorar sus propiedades de flujo y puede ser necesario utilizar equipos diseñados

para manipular materiales de baja fluidez, tanto en la etapa de manufactura como de aplicación en campo.

7.6.3. Humedad

El porcentaje de humedad de un producto a base de microorganismos, es de gran importancia, ya que influye directamente en la viabilidad y estabilidad del mismo (Lawrie *et al*., 2001).

La humedad del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC, 18ºC y 28ºC fue evaluada durante tres meses, realizando un muestreo mensual. El resultado se expresó como porcentaje de humedad (%).

El bioplaguicida mixto inmediatamente después de manufacturar presentó un porcentaje de humedad del 0,53%, y del 0,61%, 0,65% y 0,68% al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento a 8ºC respectivamente (Tabla 10, Anexo 36).

Tabla 10. Porcentaje de humedad del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a las temperaturas de almacenamiento 8ºC, 18ºC y 28ºC.

Tiempo de Almacenamiento (Meses)	Temperatura de Almacenamiento		
	8ºC	18ºC	28ºC
0	0,53	0,53	0,53
1	0,61	0,61	0,71
2	0,65	0,64	0,78
3	0,68	0,75	0,81

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 18ºC, éste presentó un porcentaje de humedad inicial del 0,53%, y posteriormente del 0,61%, 0,64% y 0,75% al primero, segundo y tercer mes de muestreo.

A la temperatura de almacenamiento de 28ºC, el bioplaguicida presentó un porcentaje inicial del 0,53%, y al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento, los valores de humedad aumentaron ligeramente hasta el 0,71%, 0,78% y 0,81% respectivamente (Tabla 10, Anexo 36).

El análisis de varianza (ANOVA) no detectó diferencias significativas (P>0,05) entre los valores de humedad iníciales y finales obtenidos durante el almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas. Estos resultados indican que el contenido de humedad del producto, no aumentó de manera significativa durante los tres meses del estudio. Sin embargo, se observó un ligero aumento numérico de la humedad a través del tiempo de almacenamiento, el cual además presenta una relación directamente proporcional a la temperatura utilizada (Anexo 37).

El bajo porcentaje de humedad que presentó el prototipo de bioplaguicida mixto se debe posiblemente al excipiente mayoritario presente en la formulación, ya que éste se caracteriza por una baja capacidad de retención de agua (Voight y Bomschein, 1982). Sin embargo, es posible que el ligero aumento numérico de la humedad se deba a la ganancia de agua durante el tiempo de almacenamiento, debido al intercambio gaseoso con el ambiente, que puede permitir el empaque utilizado, consistente en bolsas de polietileno.

Costa *et al*. (2002), argumenta que las barreras de empaque influyen en la ganancia de humedad y de esta manera se rehidratan las células del microorganismo comenzando los procesos de respiración o de degradación y produciendo metabolitos tóxicos que afectan la viabilidad del principio activo durante el tiempo de almacenamiento.

El bajo porcentaje de humedad presentado durante todo el tiempo de almacenamiento, tanto al inicio como en cada mes de muestreo, asegura la disminución en la tasa metabólica del principio activo *T. koningiopsis* y de los posibles microorganismos contaminantes, evitando la producción y acumulación de

metabolitos tóxicos que afecten la viabilidad de los conidios del hongo biocontrolador y de los cuerpos de inclusión del virus (Jenkins y Grzywacz, 2000).

En un estudio de estabilidad de preformulados a base de *T. koningiopsis*, Garzón (2002) obtuvo humedades elevadas que oscilaron entre 5,5% y 15,2%. Sin embargo, el alto porcentaje de humedad no ejerció un efecto negativo sobre la estabilidad de la viabilidad de los conidios del hongo durante el almacenamiento.

Contrario a este comportamiento, Valencia (2000) obtuvo porcentajes de humedad mayores al 10% en preformulados a base de *B. bassiana*, factor que atribuyó a las importantes pérdidas de viabilidad de los productos cuando fueron almacenados durante seis meses.

Resultados similares a los observados en el presente estudio, obtuvo Contreras (2005) al evaluar la estabilidad de un granulado a base de *P. onychis*. El autor tampoco evidenció diferencias significativas entre los valores de humedad inicial y final del bioplaguicida almacenado durante seis meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC, concluyendo que ni el tiempo de almacenamiento y ni la temperatura afectaron la humedad del granulado.

El bajo porcentaje de humedad presentado por el bioplaguicida mixto durante los tres meses de almacenamiento, posiblemente evitará que se formen aglomerados, los cuales no permiten el flujo libre del producto. Lo anterior sugiere que el bioplaguicida mixto almacenado tendrá un comportamiento similar al presentado inmediatamente después de manufacturar.

De igual manera a lo recomendado en el estudio de estabilidad microbiológica, y teniendo en cuenta el comportamiento del contenido de humedad, se podría recomendar nuevamente el almacenamiento del producto a 18ºC, ya que a esta temperatura no se evidenció una ganancia significativa de humedad.

7.6.4. Voluminosidad

La voluminosidad es una característica de gran importancia, ya que determina la facilidad y las condiciones requeridas para el llenado de recipientes y en general,

para la manipulación del producto. El valor de esta propiedad está determinado por los excipientes utilizados en el proceso de formulación (Aulton, 2004).

El estudio de estabilidad de esta característica se realizó analizando muestras de 50g del prototipo de bioplaguicida mixto, almacenadas durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC. Los resultados se expresaron en mL/g.

A 8ºC, el bioplaguicida mixto presentó una voluminosidad inicial de 1,23 mL/g, y posteriormente de 1,23 mL/g, 1,24 mL/g y 1,24 mL/g al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento (Tabla 11, Anexo 38).

Tabla 11. Voluminosidad del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC expresada en mL/g.

Tiempo de Almacenamiento (Meses)	Temperatura de Almacenamiento		
	8ºC	18ºC	28ºC
0	1,23	1,23	1,23
1	1,23	1,24	1,24
2	1,24	1,24	1,23
3	1,24	1,24	1,24

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 18ºC, presentó una voluminosidad de 1,23 mL/g inmediatamente después de manufactura, valor que cambio a 1,24 mL/g después del primer mes de almacenamiento y se mantuvo estable hasta el tercer mes del estudio.

Al ser almacenado a 28ºC, el bioplaguicida mixto presentó un comportamiento similar al evidenciado a las temperaturas de 8ºC y 18ºC. Inicialmente el prototipo

presentó una voluminosidad de 1,23 mL/g, y posteriormente del 1,24 mL/g, 1,23 mL/g y de 1,24 mL/g después del primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Tabla 11, Anexo 38).

Todos los valores de voluminosidad obtenidos, independientemente del tiempo y temperatura de almacenamiento, se consideran adecuados para productos en polvo según Martin y Sinko (2005), quienes recomiendan voluminosidades inferiores a 3 mL/g, para garantizar que el material no presenté problemas de manipulación. De igual manera, las diferentes voluminosidades obtenidas en el presente estudio cumplen con lo establecido por Villamizar *et al*. (2005), quienes establecieron los límites de aceptación para el bioplaguicida Baculovirus Corpoica, entre 0,60 mL/g y 1,26 mL/g.

Los bajos valores de voluminosidad se deben posiblemente al pequeño tamaño de las partículas del prototipo de bioplaguicida mixto, que permite que éstas se ordenen con mayor facilidad disminuyendo el espacio interparticular, lo que trae como consecuencia un descenso en el valor de esta característica en el producto final o a través del tiempo (Martin y Sinko, 2005).

El análisis de varianza (ANOVA) con una probabilidad del 95% no detectó diferencias significativas (P>0,05) entre las voluminosidades encontradas en cada tiempo y temperatura evaluada. Este resultado sugiere que el almacenamiento a las tres temperaturas empleadas (8ºC, 18ºC y 28ºC) no afectó la voluminosidad del prototipo de bioplaguicida mixto (Anexo 39). Por lo anterior, se podría sugerir que el bioplaguicida mixto recién manufacturado o después de uno, dos o tres meses de almacenamiento, no presentará problemas de manipulación.

Contreras (2005), evidenció un comportamiento similar al observado en el presente estudio. El autor evaluó la estabilidad de la voluminosidad de un granulado a base de la levadura *Pichia onychis,* obteniendo valores de 2 mL/g inmediatamente después de formulado el producto y de 2,13 mL/g, 2,06 mL/g y 2,06 mL/g después del almacenamiento durante seis meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC. Estos resultados no fueron estadísticamente diferentes entre sí, por lo que el autor concluyó que el almacenamiento no ejerció ningún efecto sobre la voluminosidad del granulado.

En el presente estudio, tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre los valores de voluminosidad a las diferentes temperaturas evaluadas, lo que permite recomendar el almacenamiento del producto a 18ºC, evitando la cadena de frío, de manera similar a lo recomendado cuando se evaluó la estabilidad microbiológica.

7.6.5. pH

El pH es un parámetro muy importante en la etapa de almacenamiento, debido a que cambios drásticos en este valor puede inhibir o afectar el crecimiento y la actividad biocontroladora del principio activo (Friesen *et al.,* 2006).

La estabilidad del pH en el prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres mese a tres temperaturas (8ºC, 18ºC y 28ºC), fue evaluada mediante la técnica potenciométrica.

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 8ºC presentó un pH inicial de 9,21, y valores de 9,06, 8,97 y 8,81 al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Figura 24).

A 18ºC, el bioplaguicida presentó un pH inicial de 9,21 y posteriormente de 8,97, 8,81 y 8,71 al primero, segundo y tercer mes de muestreo.

Finalmente, a 28ºC el prototipo de bioplaguicida mixto presentó un valor inicial de pH de 9,21, seguido de 8,92, 8,68 y 8,50 al primero, segundo y tercer mes de almacenamiento (Figura 24, Anexo 40).

La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas (P>0,05) entre el valor inicial y final del pH del bioplaguicida, almacenado tanto a 8ºC como a 18ºC. Por el contario, la prueba de comparación de medias de Tukey (95%) sí detectó diferencias significativas entre el valor inicial y final de pH, cuando el producto fue almacenado a 28ºC (Figura 24, Anexo 41). Este resultado sugiere que la alta temperatura (28ºC) ejerció un efecto negativo sobre la estabilidad del pH del bioplaguicida mixto.

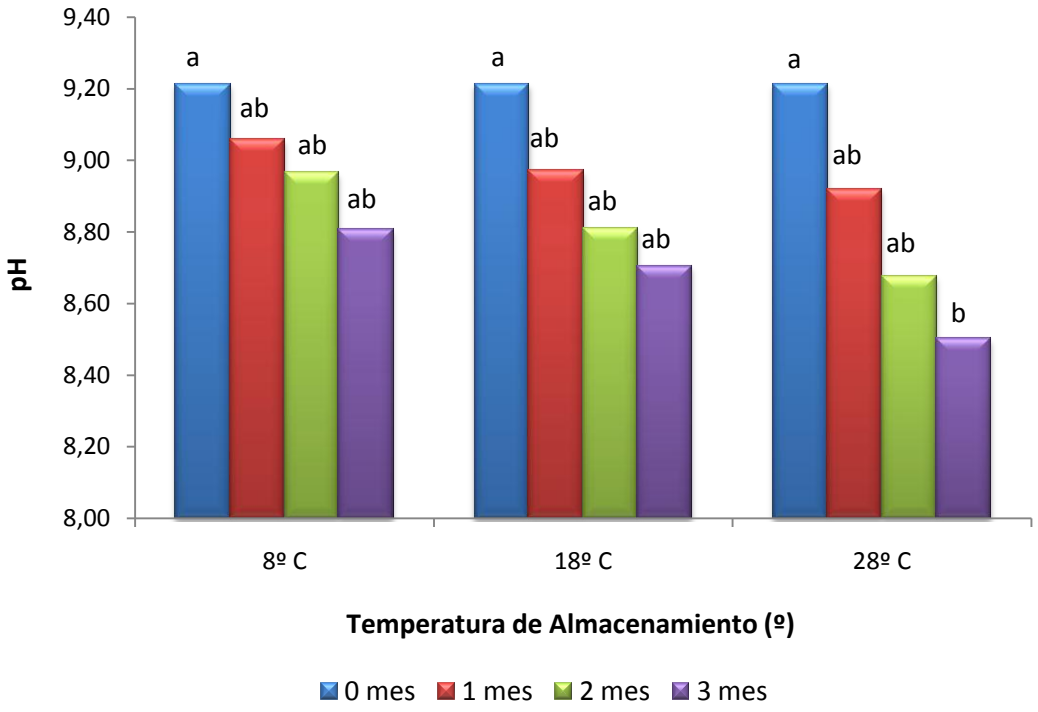

Figura 24. pH del prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

En las temperaturas evaluadas se observó una disminución del pH a través del tiempo de almacenamiento, lo que posiblemente se debe a la producción de metabolitos secundarios de carácter ácido por parte de los microorganismos contaminantes presentes en el prototipo de bioplaguicida mixto (Contreras, 2005), ya que como se mencionó anteriormente, el contenido de contaminantes aumentó durante el almacenamiento y el mayor incrementó de éstos fue evidenciado a 28ºC.

Un comportamiento similar al observado en el presente estudio, fue el evidenciado por Contreras (2005), quién evaluó el pH inicial y final (después de seis meses de almacenamiento) de un granulado a base de la levadura *P. onychis.* El almacenamiento se realizó a 8ºC, 18ºC y 28ºC y el pH final obtenido para cada temperatura fue de 6,04, 6,1 y 6,15, valores inferiores al pH inicial del producto, el cual fue de 6,54.

Los valores de pH del bioplaguicida mixto encontrados a través del tiempo de almacenamiento disminuyeron hasta valores cercanos a 8,5. Teniendo en cuenta que el límite establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica (Biotécnica, 2004) para el producto Baculovirus Corpoica es entre 9 y 10, se recomienda el ajuste de esta característica para el prototipo de bioplaguicida mixto, dentro del rango entre 5 y 6, el cual podría aumentar la estabilidad de los principios activos y disminuir la actividad de los contaminantes.

Para bioplaguicidas a base de Baculovirus, Caballero *et al*. (2001) sugiere que valores de pH inferiores 4 y superiores a 9 pueden afectar drásticamente la integridad de los cuerpos de inclusión virales y por lo tanto la actividad biocontroladora. Esto se debe principalmente a que los cuerpos de inclusión son solubilizados a valores de pH entre 9 y 11, liberando los viriones que son altamente susceptibles a las condiciones ambientales. Sin embargo, como el bioplaguicida mixto durante todo el tiempo de almacenamiento presentó un nivel de humedad inferior al 5%, no se presentará la disolución de los cuerpos de inclusión durante el almacenamiento, ni durante la aplicación, ya que esta se realiza en seco, y para la disolución se requerirá una alta cantidad de agua libre.

En valores de pH superiores a 6 e inferiores a 9, *Trichoderma* sp. aumenta el tiempo requerido para la germinación y las enzimas involucradas en los procesos de micoparasitismo, pero éstas no se inhiben en su totalidad, por lo que el hongo puede entrar en un estado de latencia como mecanismo de defensa, dando lugar a un desarrollo fisiológico más lento (Kredics *et al*., 2004). El anterior comportamiento fue evidenciado en la prueba de estabilidad de germinación en donde a una temperatura de 28ºC, el hongo presentó un porcentaje final de germinación de 81,9%, pero transcurridas 48 horas de incubación, la germinación fue superior a 95%.

La alcalinidad del bioplaguicida mixto puede afectar la actividad biocontroladora de los principios activos, teniendo en cuenta lo descrito anteriormente. Por lo tanto, se confirma la necesidad de la adición de una sustancia reguladora de pH, que además de funcionar como un tampón, inhiba el crecimiento de contaminantes.

Al igual que en el estudio de las características mencionadas anteriormente, y teniendo en cuenta el pH, se recomienda el almacenamiento del prototipo de

bioplaguicida mixto a 18ºC, temperatura en la que no se evidenció un efecto significativo en la estabilidad de esta propiedad durante el tiempo de almacenamiento.

7.6.6. Tamaño de partícula

El estudio de estabilidad de esta característica se determinó por medio de la prueba de gravimetría analizando muestras de 100g del prototipo de bioplaguicida mixto, almacenadas durante tres meses a 8ºC, 18ºC y 28ºC.

Inmediatamente después de la manufactura el bioplaguicida mixto presentó el mayor porcentaje de peso retenido en el tamiz número 325, cuyo tamaño de poro es de 45 µm, con un porcentaje promedio del 62,1% (Tabla 12).

El siguiente porcentaje de peso retenido se presentó en el tamiz número 100 (150µm) con 14,8%, seguido del tamiz número 35 (500µm) con un porcentaje del 12,1%. Estos resultados permitieron sugerir que el tamaño de partícula predominante en el bioplaguicida mixto recién fabricado oscila entre 45 y 150 micras, distribución de partícula que no varió durante los tres meses de almacenamiento (Tabla 12).

Todos los valores de tamaño de partícula obtenidos en los diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento se ubicaron dentro del rango de aceptación establecido por Villamizar *et al*. (2005), para el bioplaguicida comercial Baculovirus Corpoica, el cual sugiere que mínimo el 60% del material debe tener un tamaño de partícula menor a 150 micras.

Durante los tres meses de almacenamiento a las diferentes temperaturas, se obtuvieron los menores porcentajes de retención del producto en los tamices número 7, 20, y 10 con un promedio de 4,1%, 1,01% y 1,2% respectivamente. En el colector solamente se obtuvo un 1,09% del producto.

Tabla 12. Distribución de frecuencias de tamaño de partícula para el prototipo de bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC, 18ºC y 28ºC durante tres meses de almacenamiento.

Tiempo de Almacenamiento (meses)	Temperatura de Almacenamiento (ºC)	Tamaño de Poro (micras)						
		< 2,0	45	150	500	850	2000	2800
0		0,9	62,1	14,8	12,1	1,4	1,1	4,3
1	**8ºC**	1,2	69,9	10,6	9,8	1,8	1,9	4,2
	18ºC	1,1	64,6	9,1	7,8	0,5	0,9	3,1
	28ºC	0,8	63,8	14,8	10,8	1,9	1,8	4,9
2	**8ºC**	1,1	65,3	10,9	6,9	0,3	1,2	4,1
	18ºC	1,5	67,7	12,4	11,3	1,4	1,1	4,6
	28ºC	1,5	61,6	12,6	10,6	1,5	0,2	4,6
3	**8ºC**	1	69,3	13,6	9,8	0,9	0,5	3,7
	18ºC	0,9	66,2	12,7	10,4	1,5	1,3	4,3
	28ºC	0,5	68,4	11,8	13,5	1,2	0,1	3,2

La no variación del tamaño de partícula posiblemente se deba a la baja humedad del producto durante el tiempo de almacenamiento, ya que la máxima humedad presentada fue 0,81%. Esta baja disponibilidad de agua evita la compactación o la formación de agregados que afectan directamente el tamaño de partícula, la fluidez y la manipulación del mismo (Aulton, 2004).

Un comportamiento similar fue evidenciado por Contreras (2005), quien evaluó la estabilidad del tamaño de partícula de un granulado a base de la levadura *Pichia onychis,* durante seis meses de almacenamiento. El autor no evidenció una variación en el tamaño de partícula del producto, manteniéndose éste entre 1 mm y 1,9 mm después de seis meses de almacenamiento.

La estabilidad del tamaño de partícula del bioplaguicida mixto garantiza que inmediatamente después de manufacturar o después de uno, dos o tres meses de almacenamiento, el producto presentará buena adherencia sobre los tubérculos de papa cuando sea aplicado sobre las superficies de éstas, lo que asegura la eficacia del producto.

Debido a que el tamaño de partícula del bioplaguicida mixto no varió durante los tres meses de almacenamiento y presentó una alta cantidad de polvos finos, se recomienda manipularlo con un sistema de protección externa que evite enfermedades del tipo alergénico o inhalatorio a las personas que lo manipulan (Strasser *et al*., 2006; Wohlford *et al*., 1999).

Al igual que las características físico-químicas descritas anteriormente, se recomienda el almacenamiento del bioplaguicida mixto a 18ºC, temperatura en la cual no se evidenció ningún cambio en el tamaño de partícula.

7.7. Estabilidad biológica del prototipo de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* y *Baculovirus* bajo condiciones de almacenamiento.

La estabilidad de la actividad biocontroladora de un bioplaguicida es importante, ya que de esta característica depende la vida útil del producto y por lo tanto la oportunidad de desarrollarlo, registrarlo y comercializarlo (Shabana *et al.,* 2003)

Con el fin de evaluar la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC, 18ºC y 28ºC, se realizaron tres bioensayos diferentes, en los cuales se evaluó la actividad del producto frente a *Rhizoctonia solani* y frente a *Tecia solanivora* en condiciones de almacenamiento de semilla de papa y contra *R. solani* en condiciones *in planta.*

7.7.1. Estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta*

El objetivo del presente estudio fue determinar la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto frente a *R. solani*, cuando el tubérculo semilla tratado con el producto es sembrado en suelo inoculado con el fitopatógeno. Se realizaron tres bioensayos en el tiempo, uno inmediatamente después de manufacturar el bioplaguicida, otro después de 45 días (1.5 meses) y finalmente uno después de 90 días (3 meses) de almacenamiento. Como tratamiento control positivo se utilizó la formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*, además de un testigo patógeno y un testigo absoluto.

En el presente estudio, la incidencia de la enfermedad causada por *R. solani* en el testigo patógeno fue del 100% en todos los bioensayos realizados en el tiempo.

Cuando la semilla de papa fue tratada con el bioplaguicida mixto inmediatamente después de su manufactura, se presentó una incidencia del 14,28%, la cual se mantuvo estable después de 45 días y 90 días de almacenamiento del producto a 8ºC y 18ºC.

Por el contrario, cuando el producto se almacenó a 28ºC, la incidencia del fitopatógeno en las plantas provenientes de semilla tratada fue del 14,28%, a los 45 días y del 28,57% cuando el bioplaguicida se almacenó por 90 días a dicha temperatura. La disminución en la actividad biocontroladora de *T. koningiopsis* después de 90 días de almacenamiento y por lo tanto el aumento en la incidencia del fitopatógeno cuando el almacenamiento del producto se almaceno a 28ºC, posiblemente se debe a la disminución en la viabilidad del principio activo, ya que a ésta temperatura el metabolismo celular puede permanecer activo, lo que causa que

las células almacenen metabolitos tóxicos que reducen drásticamente la viabilidad de las células (Costa *et al*., 2002).

Sin embargo, los resultados obtenidos confirman la actividad biocontroladora que ejerce el principio activo utilizado *T. koningiopsis* frente a *R. solani,* comportamiento anteriormente descrito por Cárdenas (1999) y Beltrán (2004).

Trichoderma sp. ejerce control sobre *R. solani* de diferentes formas, entre las que se encuentran la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo, la antibiosis, la inducción de respuesta de defensa en la planta y la desactivación de enzimas de los patógenos (Vinale *et al*., 2008).

Verma *et al*. (2007) describieron que el micoparasitismo es el principal mecanismo de acción utilizado por *Trichoderma* sp., siendo un proceso que consta de varios eventos consecutivos iniciados por la atracción y el crecimiento directo del hongo sobre el fitopatógeno, generalmente dado por quimiotropismo. Como primer evento, *Trichoderma* sp. detecta las estructuras del hongo patógeno y dirige su crecimiento hacia él (tropismo), a continuación se da la expresión secuencial de enzimas líticas de la pared celular (exoquinasas) y la liberación de oligómeros de la pared celular del hongo objetivo. Posteriormente se induce la expresión de endoquitinasas fúngicas, iniciando el ataque hacia el hongo patógeno antes de entrar en contacto físico con él. Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* sp. ataca el patógeno, mediante la formación de apresorios sobre la superficie del mismo con un consecuente enrollamiento de sus hifas alrededor del patógeno, dicha interacción es mediada por la unión de carbohidratos presentes en la pared celular de *Trichoderma* sp. y las lecitinas en el hongo fitopatógeno. Almeida *et al*. (2007) demostraron que el enrollamiento y penetración de *Trichoderma* sp. sobre las hifas de *R. solani* produce daños como alteración de la pared celular, retracción de la membrana plasmática y agregación del citoplasma.

Diferentes autores sustentan la amplia producción de enzimas líticas del hongo antagonista que facilitan la penetración del micelio del hongo patógeno, debido a la degradación parcial de su pared celular a través de la secreción de enzimas líticas, principalmente quitinasas y glucanasas (Thornton, 2004; Harman *et al*., 2004; Viterbo *et al.,* 2007; Vinale *et al*., 2008).

Recientemente, se han aislado y caracterizado metabolitos secundarios tales como pironas y peptabioles obtenidos a partir de cultivos filtrados de dos cepas comerciales de *T. harzianum* (T22 y T39), en presencia del patógeno *R. solani.* (Vinale *et al.* 2006). Los autores proponen que la producción de compuestos volátiles de bajo peso molecular, no polares, se traduce en una alta concentración de antibióticos en el suelo, y tiene un amplio rango de influencia sobre la comunidad microbiana a larga distancia.

Un ejemplo de lo anterior, es el metabolito secundario 6-pentil-2H-pirano-2-1, el cual fue utilizado para la evaluación en pruebas de antagonismo en placa contra *Rhizoctonia solani y Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*; encontrándose que la adición de 0,3 mg/ml de este producto al medio, redujo el crecimiento de *R. solani* en un 69,6% y un 31,7% en *F. oxysporum* después de 2 días de incubación (Reino *et al.*, 2007). De esta manera, una serie de metabolitos llamados koninginininas, presentes en algunas especies de *Trichoderma koningiposis*, presentan la capacidad de afectar el crecimiento de patógenos del suelo tales como *R. solani, Phytophthora cinnamomi, Pythium middletonii, Fusarium oxysporum y Bipolaris sorokiniana* (Reino *et al*., 2007).

Como se mencionó anteriormente, otro mecanismo de acción que utiliza *Trichoderma* sp. es la inducción de respuestas de defensas en las plantas, que trae como consecuencia una reducción de las enfermedades causadas por uno o más agentes patógenos diferentes, inducida por la resistencia adquirida localizada, LAR (Harman *et al*., 2004).

Howell *et al.* 2000 demostraron que especies de *Trichoderma virens* y *T. koningii*, utilizadas para el tratamiento de semillas de algodón, estimulan la respuesta de defensa de la planta promoviendo la síntesis de terpenoides en las raíces. Los ensayos realizados mostraron que los terpenoides son sustancias tóxicas para patógenos como *R. solani* y además bloquean rutas metabólicas produciendo metabolitos tóxicos para el patógeno.

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 8ºC, se obtuvieron resultados de eficacia del 85,72% durante los tres meses de almacenamiento del producto, comportamiento similar al obtenido con la formulación en polvo de *T. koningiopsis,* la cual presentó una eficacia del 71,43% durante los tres meses del estudio.

Cuando el almacenamiento del producto se realizó a 18ºC, el bioplaguicida mixto presentó una eficacia del 85,72% durante los tres meses de almacenamiento y para la formulación a base de *T. koningiopsis* se obtuvieron eficacias del 71,43%, 71,43% y del 57,15% inmediatamente después de la manufactura y después de 45 días (1.5 meses) y tres meses respectivamente (Tabla 13).

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 28ºC se obtuvo una eficacia inicial del 85,72% y valores del 85,72% a los 45 días y del 71,43% a los 90 días de almacenamiento. Para la formulación en polvo a base de *T. koningiopsis* se obtuvieron eficacias del 71,43%, del 57,15% y del 57,15% inmediatamente después de la manufactura y después de 45 y 90 días respectivamente (Tabla 13)

Tabla 13. Eficacia (%) del bioplaguicida mixto y la formulación a base de *T. koningiopsis* (control) almacenados a 8ºC, 18ºV y 28ºC durante tres meses, frente a *R. solani* en condiciones *in planta.*

Bioplaguicidas	Temperatura de Almacenamiento de los Bioplaguicidas	Tiempo de Almacenamiento de los Bioplaguicidas (días)		
		0	45	90
Bioplaguicida Mixto	**8ºC**	85,72	85,72	85,72
	18ºC	85,72	85,72	85,72
	28ºC	85,72	85,72	71,43
Formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*	**8ºC**	71,43	71,43	71,43
	18ºC	71,43	71,43	51,15
	28ºC	71,43	57,15	57,15

Los resultados obtenidos muestran una tendencia a la disminución de la eficacia del producto a través del tiempo, cuando aumenta la temperatura de almacenamiento empleada. Melin *et al.* (2006), afirman que el tiempo y la temperatura de almacenamiento afectan la viabilidad de los microorganismos y por lo tanto la actividad biocontroladora, que es la propiedad más importante del principio activo en un bioproducto.

Diferentes autores han evidenciado el mismo comportamiento con diversos microorganismos biocontroladores. Lawrie *et al.* (2001) evaluó la estabilidad de un bioherbicida a base de *Alternaria alternata* bajo diferentes condiciones. El autor evidenció que a una temperatura de almacenamiento entre 15ºC y 20ºC, la eficacia del bioplaguicida fue significativamente menor después de doce meses de almacenamiento.

En otro estudio, Li & Tian (2006), evidenciaron que las células de *Cryptococcus laurentii* almacenadas a 4°C redujeron la incidencia y el diámetro de lesión causadas por *Penicillium expansum* en frutos de manzana infectados, a diferencia de las células de la levadura almacenadas a 25°C con las se obtuvieron valores mayores de incidencia y diámetro de lesión, concluyendo que a mayor temperatura de almacenamiento, menor estabilidad de la eficacia del microorganismo biocontrolador.

Es posible sugerir que el almacenamiento en ausencia de oxígeno aumentó la estabilidad biocontroladora del bioplaguicida mixto y la formulación a base de *T. koningiopsis*, dado que los dos productos fueron empacados al vacío. Abadías *et al.* (2001), sustentan que la presencia de aire en las células almacenadas posiblemente causa pérdidas de la viabilidad, debido a que el oxígeno presente en las muestras bajo condiciones de almacenamiento puede interactuar con los sistemas de membranas de las células, causando daños en la iniciación de la síntesis de ADN del microorganismo y por lo tanto repercutiendo en su viabilidad y en su actividad biocontroladora.

Igualmente, Karabulut y Baykal (2004), observaron que el tratamiento correspondiente a la levadura *Candida oleophila* en combinación con una atmósfera modificada, redujo significativamente el diámetro de la lesión causada por los microorganismo patógenos *B. cinérea* y *P. expansum* en frutos de durazno. Los

autores concluyeron que la eficacia de la levadura con atmósfera modificada de empaque, fue significativamente superior a la eficacia de la levadura empacada sin atmósfera modificada.

En el presente estudio se observó que independientemente de las condiciones y el tiempo de almacenamiento, el principio activo conidios de *T. koningiopsis* controló al fitopatógeno *R. solani*.

El efecto biocontrolador de *T. koningiopsis* sobre *R. solani* en el cultivo de papa ha sido evidenciado por diferentes autores. Wilson *et al.* (2008) demostraron que bajo condiciones de invernadero, tubérculos de papa sembrados en materas con suelo previamente infestado con *R. solani* (AG-3) e inoculado con *Trichoderma harzianum*, presentaron una reducción en la severidad de los síntomas causados por la costra negra de la papa. Los autores evidenciaron que el "índice de lesión del tallo causada por *Rhizoctonia"* (RSI) cuya escala presenta un valor máximo de 88, con la inoculación de *Trichoderma harzianum* durante los primeros 7 días se redujo significativamente la severidad presentado valores de RSI de 6 respecto al control cuyos valores de RSI oscilaron entre 40 y 70.

En otro estudio, Tsror *et al*. (2001), evaluaron un preparado comercial a base de una cepa de *Trichoderma harzianum* sobre tubérculos de papa bajo condiciones de campo durante dos años. Los autores obtuvieron una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad del 97% y del 68% en el primer y segundo año respectivamente. La variación en los resultados fue atribuida principalmente, a los cambios medioambientales que favorecieron la actividad del patógeno y del antagonista en cualquiera de los casos.

En el presente estudio, además del efecto protector contra *R. solani*, se observó un efecto de promoción de crecimiento por parte de *T. koningiopsis.* Lo anterior se evidenció en el peso seco de las plantas de papa crecidas a partir de semillas tratadas con el bioplaguicida mixto en los diferentes tiempos evaluados.

Por ejemplo, cuando el bioplaguicida fue aplicado inmediatamente después de manufacturar, las plantas de papa presentaron un peso seco promedio de 1,2 g, a diferencia de las plantas del testigo patógeno que presentaron un peso seco promedio de 0,52 g. Después de 45 días de almacenamiento del bioplaguicida

mixto, las plantas de papa provenientes de la semilla tratada con el producto almacenado a 8ºC, presentaron un peso seco promedio de 1,1 g, y de 1,5 g y 1,03 g cuando el almacenamiento se realizó a 18ºC y 28ºC respectivamente. En contraste con lo anterior, las plantas de papa del testigo patógeno presentaron un peso seco promedio de 0,72 g. Un comportamiento similar se observó en el último bioensayo realizado, a los 90 días de almacenamiento del bioplaguicida mixto, ya que las plantas de papa tratadas con el producto almacenado a 8ºC presentaron un peso seco promedio de 0,94 g y de 1,45 g y 0,89 g cuando éste se almacenó a 18ºC y 28ºC (Anexo 43).

Además, del incremento en el peso seco de las plantas, se observó morfológicamente un mayor número de tallos y brotes en comparación con el de las semillas no tratadas.

Este incremento y cambio morfológico de las plantas varía según las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera, la especie de planta, el tipo de sustrato y las prácticas culturales realizadas (Harman *et al.,* 2004).

Un ejemplo de lo anterior es la cepa de *T. harzianum* codificada como T-22, la cual ha demostrado tener un efecto en el aumento del desarrollo y del crecimiento de la raíces de plantas de maíz. Este efecto puede perdurar durante todo el cultivo del maíz, y puede ser inducido por la adición de pequeñas cantidades de hongo (menos de 1g/hectárea), aplicado como un tratamiento a las semillas (Harman *et al.,* 2004). Estudios realizados en campo evidenciaron la presencia del microorganismo biocontrolador en las raíces de las planta y el incremento de la altura del cultivo, una mayor tolerancia a la sequía y probablemente la resistencia a suelos compactos. La capacidad de T-22 y otras cepas de *Trichoderma* para inducir una mayor formación de raíz, no se limita a este cultivo y el crecimiento de estas plantas puede ser mayor si existe la presencia de otros microorganismos benéficos colonizadores de la raíz (Mausan *et al.,* 2007).

De igual manera, es probable que los exudados de las raíces de las plantas afecten el metabolismo del microorganismo biocontrolador y como consecuencia la producción de moléculas o metabolitos que actúen como fitohormonas o como metabolitos capaces de afectar la capacidad de solubilizar algunos minerales para la planta (Vinale *et al*., 2008).

En el presente estudio es posible recomendar el almacenamiento del producto a 8ºC y 18°C, ya en estas temperaturas de almacenamiento la eficacia obtenida frente a *R. solani* en condiciones *in planta* fue superior al 80%, límite establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica (2008). Sin embargo, el almacenamiento del producto a temperatura ambiente (18ºC) resulta conveniente tanto para el productor como para el agricultor, debido a que disminuye los costos con la no utilización de cadena de frío en la comercialización y distribución del mismo.

7.7.2. Estabilidad del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento.

Para la determinación de la estabilidad biocontroladora del bioplaguicida mixto frente a *Rhizoctonia solani* en semilla de papa bajo condiciones de almacenamiento, se realizaron tres bioensayos en el tiempo; el primero, inmediatamente después de manufactura del producto; el segundo, después de 45 días (1,5 meses) y el último, a los 90 días (3 meses) de almacenamiento. La semilla de papa (*Solanum phureja)* utilizada presentaba un rango de esclerocios del patógeno entre 8-10 por papa. Esta semilla fue tratada con el bioplaguicida mixto a la dosis recomendada (5 g/Kg de papa) y ubicada individualmente en recipientes plásticos de 16 onzas, los cuales fueron tapados y mantenidos en condiciones de oscuridad. Como tratamiento control se utilizó la formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*, además de un testigo absoluto.

En los tres bioensayos realizados en el tiempo se observó que la presencia de esclerocios en la semilla de papa (8-10 por papa) fue una eficiente fuente de infección del patógeno, ya que los tubérculos del testigo absoluto (semilla de papa no tratada), presentaron una incidencia del 100% en todos los tiempos evaluados.

La habilidad de producir enfermedad o causar daño cuando los esclerocios de *R. solani* están presentes en la semilla de papa ha sido evidenciado por diferentes autores. Tsror *et al.* (2005), evaluaron la influencia que tiene el inóculo de *R. solani* (semilla o suelo) en el desarrollo de la costra negra de la papa. Los autores

observaron que la semilla de papa con esclerocios de *R. solani* presentó una incidencia del 61,6%, y la semilla de papa sembrada en suelo contaminado como fuente de inóculo, presentó un porcentaje de incidencia del 72,5%. La combinación de ambas fuentes de patógeno presentó una incidencia del 100%. Estos resultados permitieron concluir que cualquiera de las dos fuentes de inóculo de *R. solani* son importantes en el desarrollo de la enfermedad, pero la combinación de ambas, disminuye significativamente la calidad de la progenie de tubérculos de la planta.

El bioplaguicida mixto presentó un porcentaje de eficacia inicial del 80%, valor que se mantuvo constante para los tres meses de almacenamiento del producto a 8ºC. La formulación en polvo a base de *T. koningiopsis* utilizada como control presentó un comportamiento similar, con una eficacia del 80%, inmediatamente después de la manufactura y después de 45 y 90 días de almacenamiento

Tabla 14. Eficacia (%) del bioplaguicida mixto y la formulación en polvo a base de *T. koningiopsis* (control) almacenados a 8ºC, 18ºC y 28ºC durante tres meses, frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento.

Bioplaguicidas	**Temperatura de Almacenamiento de los Bioplaguicidas**	**Tiempo de Almacenamiento de los Bioplaguicidas (días)**		
		0	**45**	**90**
Bioplaguicida Mixto	**8ºC**	80	80	80
	18ºC	80	80	60
	28ºC	80	60	60
Formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*	**8ºC**	80	80	80
	18ºC	80	60	60
	28ºC	80	60	40

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 18ºC, presentó una eficacia inicial del 80%, la cual se mantuvo constante hasta los 45 días y se redujo al 60% después de 90 días de almacenamiento. El tratamiento control (formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*), presentó una eficacia del 80% y ésta descendió al 60% a los 45 días manteniéndose en dicho valor hasta los 90 días de almacenamiento (Tabla 14).

A 28ºC, el bioplaguicida mixto presentó una eficacia inicial del 80% y del 60% después de 45 días de almacenamiento, valor que se mantuvo estable hasta los 90 días. El tratamiento control (formulación en polvo a base de *T. koningiopsis*) presentó a dicha temperatura de almacenamiento, una eficacia inicial del 80% que se redujo al 60% y luego al 40%,a los 45 días y 90 días de almacenamiento (Tabla 14)

Los valores de eficacia obtenidos a través del tiempo, permitieron evidenciar que cuando se utilizó la temperatura de almacenamiento alta (28ºC), se presentó una disminución de la eficacia del producto a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. Contrario a lo evidenciado a temperatura de refrigeración (8ºC), en la cual la eficacia del bioplaguicida mixto no disminuyó a través del tiempo.

El efecto que ejerce la temperatura de almacenamiento sobre la actividad biocontroladora, está directamente relacionado con la pérdida de viabilidad del principio activo, ya que a temperaturas altas el metabolismo celular del principio activo se activa, dando como resultado la disminución en la viabilidad, el agotamiento nutrientes y la producción de metabolitos tóxicos para la célula (Sabaratnam y Traquair, 2002).

Un ejemplo de lo anterior es el estudio realizado por Chen *et al.* (2008), quienes evaluaron la estabilidad de un bioinsecticida a base de *Lecanicillium lecanii* bajo condiciones de almacenamiento durante seis meses. Los autores observaron una disminución en la infección sobre *Trialeurodes vaporariorum* de 86,3% a 55,4% después de seis meses de almacenamiento a 35ºC. Estos resultados se atribuyeron a la disminución en la viabilidad de los conidios, debido a que en esta temperatura la germinación disminuyó drásticamente, a diferencias de los productos almacenados a temperaturas bajas (<15ºC).

Otros estudios confirman el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad biocontroladora, como el realizado por Contreras (2005), quien afirma que la temperatura de almacenamiento tuvo un efecto sobre la actividad biocontroladora de la levadura *Pichia onychis,* ya que la mayor eficacia después de 6 meses se presentó con el producto almacenado a temperatura de refrigeración (8ºC), y la menor cuando el almacenamiento se realizó a 28°C.

En el presente estudio, no se evidenció diferencia numérica entre las eficacias obtenidas con el bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo a base de *T. koningiopsis)* en cada tiempo y temperatura evaluada. Lo anterior sugiere que la mezcla de los bioplaguicidas, formulación en polvo a base de *T. koningiopsis* y formulación a base de Baculovirus, no afectó la actividad biocontroladora de *T. koningiopsis* durante el almacenamiento del producto. Este resultado está directamente relacionado con el obtenido en la evaluación de la estabilidad microbiológica, en donde no se evidenció diferencia significativa entre la pérdida de concentración y de germinación del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación a base de *T. koningiopsis*).

Además del efecto protector frente a *R. solani*, se evidenció un efecto de promoción de crecimiento sobre los brotes generados a partir de las semillas tratadas con el bioplaguicida mixto en cada tiempo evaluado. Cuando el bioplaguicida mixto fue aplicado a las semillas de papa inmediatamente después de manufacturar, éstas presentaron un peso promedio de brotes de 1,44 g, mientras que el testigo absoluto (semilla de papa no tratada) presentó un peso promedio de 0,18 g (Anexo 45).

Después de 45 días (1,5 meses) de almacenado el bioplaguicida mixto, las semillas de papa tratadas con este producto presentaron un peso promedio de 0,71 g, siendo un valor numéricamente superior al presentado por el testigo absoluto, el cual presentó un peso promedio de 0,1 g. En el último bioensayo realizado, a los 90 días de almacenamiento (3 meses) del producto la semilla tratada con éste presentó un promedio de peso de brotes de 1,1 g y el testigo absoluto de 0,14 g (Anexo 45).

En todos los bioensayos realizados a través de tiempo se observó que las semillas de papa tratadas con el bioplaguicida mixto presentaron un aumento importante en el crecimiento y en el desarrollo de los brotes, siendo éstas más vigorosas y con un

mayor número de brotes, a diferencia de las no tratadas. Lo anterior posiblemente se deba a la promoción de crecimiento vegetal inducida por *T. koningiopsis.*

Este comportamiento coincide con el trabajo realizado por Paris *et al.* (2003), en donde el mismo aislamiento de *T. koningiopsis* aplicado sobre tubérculos de papa con inóculo natural de *R. solani,* ejerció un efecto promotor, ya que los tubérculos tratados presentaron brotes sanos y raíces de mayor desarrollo y vigor en comparación con los tubérculos no tratados.

La acción promotora de *T. koningiopsis* sobre los brotes de la semilla de papa, probablemente se deba a la colonización de las raíces y brotes por parte de *Trichoderma* sp. Vinale *et al.* (2008) sustenta que las hifas de *Trichoderma* sp. penetran la corteza de la raíz hasta los depósitos de calosa que rodean los tejidos de las plantas. La presencia del hongo en las raíces promueve el crecimiento radicular, el sistema inmune y la disponibilidad de nutrientes en la planta (Yedidia *et al*., 2003; Hanson y Howell, 2004; Harman *et al*., 2004).

Es importante resaltar que en algunas de las semillas de papa tratadas con el bioplaguicida mixto, en todos los tiempos y temperaturas evaluadas, se observó el crecimiento del micelio del fitopatógeno, pero no se evidenciaron lesiones sobre el tejido. Estos resultados podrían indicar, que la aplicación del bioplaguicida mixto sobre la semilla de papa, posiblemente demoró la aparición de los síntomas, retardando el desarrollo de la enfermedad.

Este resultado es favorable en el ámbito económico del producto, ya que la aplicación del bioplaguicida mixto sobre la semilla de papa posiblemente disminuirá la germinación de los esclerocios y la propagación del patógeno en el suelo cuando la semilla de papa sea sembrada, y podría evitar la posible pérdida de la cosecha a causa de los daños causados por *R. solani* (Lewis *et al.,* 2001).

Finalmente, los resultados obtenidos demuestran que la actividad biocontroladora de *T. koningiopsis*, principio activo del bioplaguicida mixto, se mantuvo estable durante el almacenamiento a 8ºC, ya que se logró un control del patógeno (≥80%) durante los tres meses de almacenamiento. Limite establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica (2008) para este producto. Teniendo en cuenta esta variable, se recomienda el almacenamiento del prototipo

de bioplaguicida mixto a temperatura de refrigeración, para mantener la actividad frente al patógeno en condiciones de almacenamiento de semilla. Esta recomendación aumentaría los costos del transporte y la comercialización del producto. Sin embargo, se recomienda continuar con los estudios de estabilidad durante un período de tiempo mayor y determinar exactamente la vida útil del bioinsumo desarrollado.

7.7.3. Estabilidad de la eficacia del bioplaguicida mixto para el control de *Tecia solanivora* en condiciones de almacenamiento

Para la determinación de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto frente a *T. solanivora* en semilla de papa bajo condiciones de almacenamiento, se realizaron tres bioensayos en el tiempo: el primero se llevó a cabo inmediatamente después de la manufactura del producto, el segundo después de 45 días (1,5 meses) y el último a los 90 días (3 meses) de almacenamiento. Como control positivo se utilizó el producto comercial Baculovirus Corpoica, además de un testigo absoluto.

Cuando los bioplaguicidas se almacenaron a 8ºC, el producto mixto presentó una eficacia inicial del 90%, seguido de valores de eficacia del 96,55% y del 96,67% a los 45 días (1,5 meses) y 90 días (3 meses) de almacenamiento respectivamente. El producto Baculovirus Corpoica presentó una eficacia inicial del 90% y posteriormente del 93,10% durante los 45 y 90 días de almacenamiento del producto (Figura 25, Anexo 46).

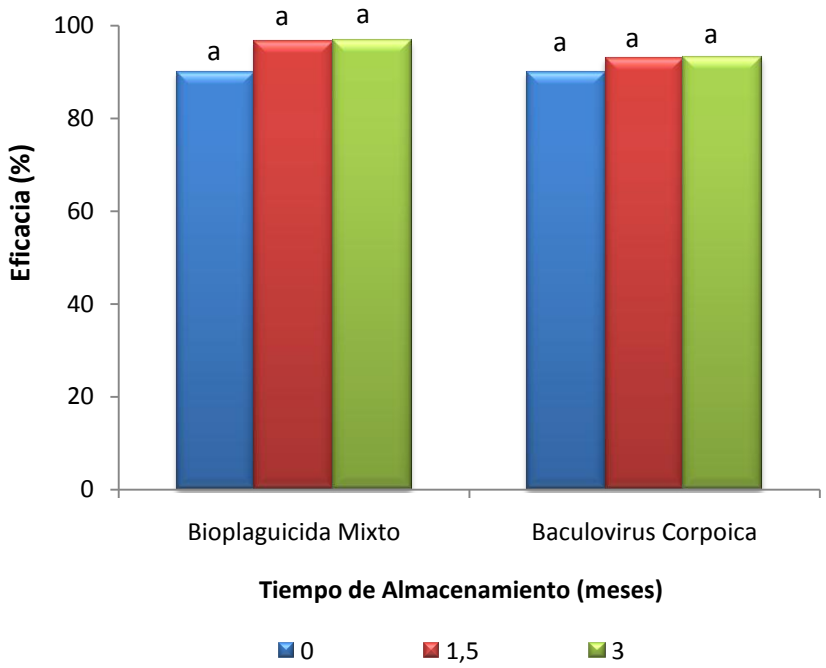

Figura 25. Eficacia del bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Corpoica almacenados a 8ºC durante tres meses.

El análisis de varianza (ANOVA) con una probabilidad del 95%, no detectó diferencias significativas (*P*>0,05) entre la eficacia inicial y final, después de tres meses de almacenamiento a 8ºC, tanto para el bioplaguicida mixto como para la formulación a base de Baculovirus (Figura 25, Anexo 47).

A 18ºC, el bioplaguicida mixto presentó una eficacia inicial del 90%, y posteriormente del 96,55% a los 45 días (1,5 meses) y del 93.33% a los 90 días (3 meses) de almacenamiento. La formulación a base de Baculovirus (Baculovirus Corpoica) presentó una eficacia del 90% inmediatamente después de su manufactura, del 89,66% a los 45 días (1,5 meses) y del 90% a los 90 días de almacenamiento (Figura 26, Anexo 48).

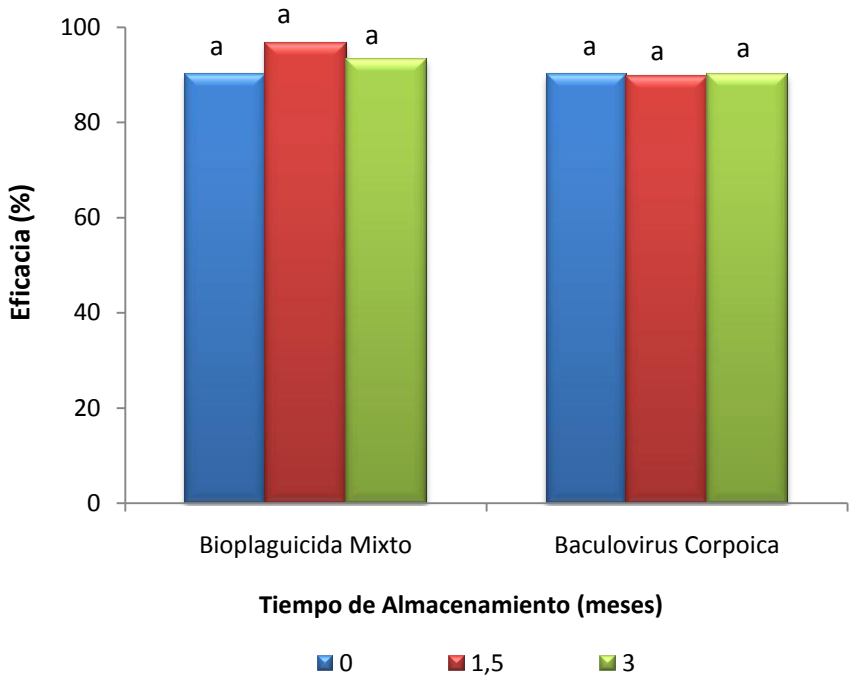

Figura 26. Eficacia del bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Corpoica almacenados a 18ºC durante tres meses.

El análisis de varianza (ANOVA) con una probabilidad del 95%, no detectó diferencias significativas (*P*>0,05) entre la eficacia inicial y final después de tres meses de almacenamiento a 18ºC, para el bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Copoica (Figura 26, Anexo 49).

Cuando el bioplaguicida mixto fue almacenado a 28ºC, presentó una eficacia inicial del 90% y posteriormente valores del 93,10% y del 96,33% a los 45 días (1,5 meses) y 90 días (3 meses) de almacenamiento respectivamente. La formulación a base de Baculovirus presentó una eficacia inicial del 90%, seguida del 93,10% y del 96,67% a los 45 días (1,5 meses) y 90 días (3 meses) de almacenamiento respectivamente (Figura 27, Anexo 50).

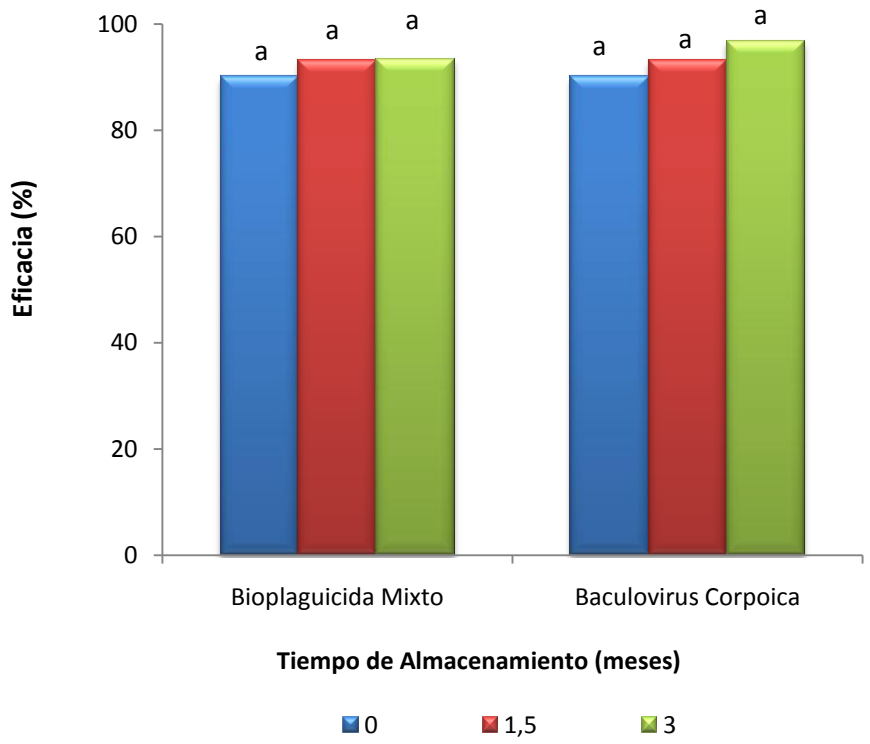

Figura 27. Eficacia del bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Corpoica almacenados a 28ºC durante tres meses.

El análisis de varianza (ANOVA) con una probabilidad del 95%, no detectó diferencias significativas (P>0,05) entre la eficacia inicial y la obtenida después de tres meses de almacenamiento a 28ºC, para el bioplaguicida mixto y el producto comercial Baculovirus Corpoica (Figura 27, Anexo 28).

Los resultados anteriormente descritos permiten sugerir que la temperatura de almacenamiento no afectó la actividad biocontroladora del granulovirus utilizado como principio activo de los dos productos, ya que en ninguna temperatura de almacenamiento se detectó una disminución significativa en la eficacia del producto.

Caballero *et al.* (2001), sugirió que la estabilidad frente a las altas temperaturas, es una de las ventajas en la comercialización de las formulaciones a base de Baculovirus, ya que facilita la aplicación del producto en países tropicales en donde

es común el almacenamiento de agroquímicos a temperaturas superiores a 25ºC y en donde potencialmente existe un mercado de comercialización del mismo.

Diferentes autores han evidenciado la estabilidad de las formulaciones a base de Baculovirus a diferentes temperaturas. Por ejemplo, el producto comercial TM BioControl-1® para el control de *Orgyia pseudotsugata* tiene una vida útil de cinco años en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente (Caballero *et al.*, 2001).

Támez-Guerra *et al.* (2002), evaluaron diferentes formulaciones a base del nucleopolyhedrovirus aislado de *Anagrapha falcifera* (A*f*MNPV), las cuales fueron almacenadas a temperatura ambiente (22ºC) durante un año, determinándoles la actividad insecticida contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni.* Los autores no evidenciaron una pérdida significativa en la actividad biocontroladora de las formulaciones en comparación con el control (virus sin formular), este resultado posiblemente se debió a la adición de azúcares como la sucrosa, la cual reduce la actividad del agua y de esta manera previene el crecimiento de contaminantes en el producto.

En otro estudio, Batista *et al.* (2001), establecieron la estabilidad de dos formulaciones (un polvo mojable y una emulsión) a base del nucleopolyhedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). Después de 20 meses de almacenamiento, el concentrado emulsionable presentó una pérdida de actividad del 18,3%, mientras que la formulación en polvo redujo su eficacia en un 11,7% después de 12 meses de almacenado el producto. Los autores atribuyeron la disminución en la actividad biocontroladora del producto en polvo, posiblemente al excipiente (caolin) utilizado en la formulación, el cual fue incompatible con el virus y podría haberlo desactivado durante el almacenamiento.

Cherry *et al.* (1994) evaluaron la estabilidad del virus de *Spodoptera littoralis* almacenado en diferentes aceites minerales y vegetales; y no evidenciaron diferencias significativas entre los dos grupos de aceites utilizados, aunque a 26ºC se observó una pérdida significativa en la actividad biocontroladora después de 15 meses de almacenamiento.

En el presente estudio, los resultados sugieren que la mezcla de los bioplaguicidas a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus para la producción del bioplaguicida mixto, no afecto la actividad insecticida del principio activo Baculovirus. Lo anterior posiblemente se debe a la baja humedad del producto (0,52%), la cual garantiza la estabilidad de las partículas virales del granulovirus. Esta baja humedad evita la producción de metabolitos tóxicos por parte de los microorganismos contaminantes, y disminuye la presencia de oxígeno que causa la oxidación de compuestos en la formulación y la formación de radicales libres que desactivan el virus (Caballero *et al.,* 2001).

Otra variable que posiblemente permitió la estabilidad de la actividad insecticida del bioplaguicida mixto son los excipientes utilizados en la formulación. Esta acción ha sido evidenciada por diferentes autores, ya que la utilización adecuada de éstos, puede potencializar o disminuir la actividad biocontroladora (Batista *et al.,* 2001; Batista *et al*. 1994). Por ejemplo, Ballard *et al.* (2000) evaluaron la adición de diferentes excipientes a la formulación del granulovirus de *Cydia pomonella*, encontrando que la incorporación de melaza de caña, sucrosa, fructuosa y sorbitol, disminuyeron la LD_{50} y por lo tanto la cantidad de virus necesaria para el control de la plaga.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, es posible almacenar el bioplaguicida mixto durante tres meses a las tres temperaturas evaluadas, sin que esto afecte su actividad biocontroladora sobre la polilla. Sin embargo, se recomienda el almacenamiento del producto a 18°C, ya que no se afecta la eficacia del Baculovirus, ni la actividad biocontroladora de *T. koningiopsis.* El almacenamiento a esta temperatura además resulta conveniente tanto para el productor como para el agricultor debido a que disminuyen los costos de producción y de comercialización.

8. CONCLUSIONES

El prototipo de bioplaguicida mixto fue caracterizado y cumplió con los límites de calidad establecidos por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica, para todas las características microbiológicas y físicoquímicas evaluadas.

El bioplaguicida mixto controló eficazmente al fitopatógeno *R. solani*, tanto en condiciones in planta como en condiciones de almacenamiento de semilla de papa, y además demostró su eficacia para el control de *T. solanivora*.

Las características microbiológicas y fisicoquímicas evaluadas fueron estables durante los tres meses de almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas, manteniéndose dentro de los límites de calidad establecidos para este tipo de producto.

La actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* y *T. solanivora* se mantuvo estable durante los tres meses a 8°C.

El prototipo de bioplaguicida mixto almacenado durante tres meses a 18ºC, mantuvo estables sus características microbiológicas y fisicoquímicas, así como su actividad biocontroladora de *R. solani* en condiciones *in planta* y de *T. solanivora* en condiciones de almacenamiento

9. RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de estabilidad en almacenamiento por lo menos durante 24 meses, para determinar la vida útil real del bioplaguicida mixto a las tres temperaturas evaluadas.

Modificar el pH de la formulación del bioplaguicida mixto, para disminuir el posible efecto negativo sobre los principios activos (*T. koningiopsis* y Baculovirus)

Evaluar la estabilidad bajo condiciones de almacenamiento del prototipo de bioplaguicida mixto teniendo en cuenta parámetros como tipo y atmósferas de empaque.

Realizar estudios de factibilidad económica para la producción del bioplaguicida mixto.

Integrar el uso del bioplaguicida mixto a base de *T. koningiopsis* y Baculovirus en un Programa de Manejo Integrado de Plagas en la semilla de papa.

10. REFERENCIAS

ABADÍAS, M., TEIXIDÓ, N., USALL, J., BENABARRE, A., VIÑAS, I. 2001. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agente *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of food protection*. 64(6):856-861.

ABADÍAS, M., USALL, J., TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I. 2003. Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* cpa-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*. 93: 436-442.

AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology. Five Edition. Elservier Academic. Amsterdam. 594-596.

ALLEN, L.; POPOVICH, N.; ANSEL, H. 2005. Ansel´s pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. Octava edición. Lippincott Williams and Wilkins.

ALMEIDA, F.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.; LIMA, C.J. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters.* 29:1189–1193.

ALVARADO, L.F. 1998. Producción y manejo de la semilla de papa. En Manejo Integrado del Cultivo de Papa. Comité de sanidad de la papa departamento de Nariño. 32-42

ANDERSON, N.A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology*. 20: 329-347.

ARAQUE, C.; GARCIA,J. 1999. Manual integrado de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. CRECED. Provincia de Pamplona. Santander. Colombia. Pág: 34-43.

ARTHURS, S.; LACEY, L.; DE LA ROSA, F. 2008. Evaluation of a Granulovirus (PoGV) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for control of the potato tuberworm (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored tubers. *Journal of Economic Entomology.* 1540-1546.

AULTON, M. 2004. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmaceúticas. Elservier. España. Segunda edición. 203-207.

AVILA, M.C.; SANABRIA, J.; BURITICA, P. 1994. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* en papa. Aplicaciones en campo. *Revista ICA.* 29: 115-120

BALLARD, J.; ELLIS, D.J; PAYNE, C.C. 2000. The role of formulation additives in increasing the potency of *Cydia pomonella* Granulovirus for codling moth larvae, in Laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology* 10: 627- 640.

BARKER, K.F.; COOK, R.J. 1982. Biological control of plant pathogens. *American Phytopatholgical Society*. USA.

BATISTA FILHO, A.; S.B. ALVES, N.T.; CRUZ, B. 1994. Estabilidade de *Baculovirus anticarsia* formulado como pó molhável. *Ecossistema.* 19: 30-39.

BATISTA, A.; ALVES, S.; AUGUSTO, N.; PEREIRA, R. 2001. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology.* 30(3) 411-416.

BATTA, Y. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *Internacional Journal of Food Microbiology*. 96: 281-288.

BEGOUDE, B.; LAHLALI, R.; FRIEL, D.; TONDJE, P.R.; JIJAKLI, M.H. 2007. Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and Aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum. Journal of Applied Microbiology*. 103: 845-854.

BELTRÁN, C. 2004. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp*. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa bajo condiciones de casa de malla. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología: Universidad Nacional de Colombia. 52-56.

BETANCOUR, J.C. 1997. Evaluación de una técnica de pregerminación controlada en matriz sólida en combinación con los agentes de control biológico *Trichoderma koningii* y *Pseudomona fluorescens* para el control del marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxusporium*. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. 25-45.

BIOTÉCNICA, 2003. Laboratorio De Control Biológico Corpoica. 2004. Manual de Procedimientos Operativos Estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas. Análisis Microbiológicos de Bioplaguicidas. Bogotá. Colombia.

BIOTÉCNICA, 2004. Laboratorio De Control Biológico Corpoica. 2004. Manual de Procedimientos Operativos Estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas. Análisis Físico-Químico de *Baculovirus*. Bogotá. Colombia.

BIOTÉCNICA, 2008. Laboratorio De Control Biológico Corpoica. 2004. Manual de Procedimientos Operativos Estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas.Prueba de eficacia frente a R.solani en condiciones in planta y en condiciones de almacenamiento. Bogotá. Colombia.

BOYETCHKO, S.; HYNES, R. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology & Biochemistry*. 38: 845-849.

BOYLAND, J.; COOPER, J.; CHOWHAN, Z.; LUND, W.; WADE, A.; WEIR, R.; YATES, B. 1986. Handbook of Pharmaceutical Excipients. *American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Society of Great Britain.* Washington-London. 36-38.

BREWER, M.T.; LARKIN, R.P. 2005. Efficacy of several potencial biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection*. 24: 939-950.

BURGES H.D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. Dordrecht: Kluwer. 2-26

CABALLERO, P.; LOPEZ- FERBER,M.; WILLIAMS, T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. 50-70, 320-350.

CAI –YUN, S.; QING –TAO, S.; SHU –TAO, X.; XIAU –YAN, S.; XIU –LAN, C.; YU – ZHONG, Z. 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. 260: 119-125.

CANDELA, M. E.; EGEA- GILABERT, C.; EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E. 2007. Biological control of *Phytophtora* root of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology*. 155: 342-349.

CARDENAS, A. 1998. Control biológico bajo condiciones de invernadero de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate *Lycopersicon esculetum* empleando pregerminación controlada de semillas y los agentes biocontrolador *Trichoderma koningii* y *Pseudomonas fluerenscens*. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pag 53.

CARLING, G.; KUNINAGA, S.; BRAINARD,K. 2002. Hyphal anastomosis reaction, rDNA – Internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia sola*ni Anastomosis Group – 2 and AG- B1. *Phytopathology*. 95(1): 43-50.

CENICAFÉ. 1997. Técnicas para el Control de Calidad de Formulaciones de Hongos Etomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchina. Caldas. Colombia. Pág. 1-31.

CEVIPAPA. 2004. Centro virtual de la investigación de la cadena agroalimentaria de papa. www.cevipapa.com. Fechas de consulta 9 de Febrero de 2008.

CHAVEZ, B.; LEDEBOER, A.M. 2007. Drying of Probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*. 25: 1193–1201.

CHEN, A.; ZHANGYAN, S.; ZHANG L. 2008. The effects of some storage conditions on viability of *Lecanicillium lecanii* conidia to whitefly (Homoptera: *Trialeurodes vaporariorum*). *Biocontrol Science and Technology.* 18 (3): 267-278.

CHERRY, A.J. 1994. Oil formulation of insect viruses. En resumen: European meeting: Microbial control of pests. OILB.

CIP. 1992. Control biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus phtorimaea. Boletín de capacitación.* 1-30.

CONTRERAS, A. 2005. Evaluación de la estabilidad en almacenamiento de preformulados a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha de tomate. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia.

COOK, R.J.; BRUCKART, W.L.; COULSON, J.R.; GOETTEL, M.S.; HUMBER, R.A.; LUMSDEN, R.D.; MADDOX, J.V.; MCMANUS, M.L.; MOORE, L.; MEYER, S.F.; QUIMBY, P.C.; STACK, J.P.; VAUGHN, J.L. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. *Biological Control* 7 :333-351.

COPPING L, 2001. The Biopesticide Manual. Second Edition. *The British Crop Protection Council.* Gran Bretaña. Pág: 147-156.

CORPOICA. 1998. Fisiología y Manejo de tubérculos semilla de papa. Obonuco, Nariño. 46-50.

CORREDOR, D.; FLORES, E. 2003. Estudios básicos de biología y comportamiento de la polilla guatemalteca de la papa en un área piloto del municipio de Villapinzón. En: *Memorias II Taller Nacional Tecia solanivora.*

CORY, J.; EVANS, H. Viruses. 2007. En *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 149–174*.*

CORY, J.; MYERS, J. 2003. The ecology and evolution of insect Baculoviruses. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 34: 239-237.

COSTA, J.; TEIXIDO, U.; TORRES, R.; VIÑAS, I. 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology.* 92:873–878.

COTES, A. 2001. Utilización combinada de técnicas de pregerminación controlada de semillas y del agente de control biológico *Trichoderma sp*. para el control de patógenos radicales. En: *I curso taller Internacional Control Biológico. Programa nacional de Manejo Integrado de Plagas*. Corpoica. Bogotá. 137-141.

CRIPPA, M. PASOLINI, G. 1997. Allergic reactions due to glove lubricant powder in health care workers. *International Archives of Occupational Environmental Health*. 70(6): 399-402.

DÄRR, A. 1981. Tecnología Farmacéutica. Escuela de Ingenieria farmaceutica. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 50-70.

DE CAL, A.; GUIJARRO, B.; MELGAREJO, P. 2007. Effect of stabilizers on the shelf- life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot. *International Journal of Food Microbiology*. 113: 117-124.

DOMSH, K.H.; GAMS, O.W.; YERSSON, T.H. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press. Vol 4. Pág: 465.

EL BAKALI, A.; MARTIN, M. 2006. Black scurf of potato. *Mycologist*. 20: 130–132.

ELZEIN, A.; KROSCHEL, J.; MÜLER-STÖVER, D. 2004. Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of "Pesta" formulation of *Fusarium oxysporum* "Foxy 2", a potencial mycoherbicida for striga: effects of temperatura, granule size and water activity. *Biocontrol Science and Technology*. 14: 545-559.

FAOSTAT. 2004 Database online. www.faostat.fao.org. Fecha de consulta 20 de febrero de 2008.

FOX, R. 2006. Rhizoctonia stem and stolon canker of potato. *Mycologist*. 20: 116–117.

FRANK, J.A. 1981, Rhizoctonia Canker. En Compendium of Potato disease. *American Phytopathological Society*. 52-54.

FRAVEL, D.R. 2005. Comerzalization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 337-359.

FRIESEN, T.; HOLLOWAY, G.; HILL, G.; PUGSLEY, T. 2006. Effect of conditions and protectants on the survival of *Penicillium bilaiae* during storage. *Biocontrol Science and Technology*. 16: 89-98.

GALÁN, L. 2002. Estudio tecnológico para la formulación del hongo biocontrolador *Trichoderma sp*, cepa 004 para el control biológico de *Botrytis cinerea* Pers. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia. 25-45.

GARZÓN, C. 2002. Desarrollo y caracterización microbiológica y física de preformulados en polvo a base del hongo *Trichoderma koningii* para el control de fitopatógenos. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia. 39-45.

GAUGLER, **R.; GREWAL, P.; KAYA, H.; SMITH-FIOLA, D.** 2000. Quality assessment of commercial produced entomopathogenic nematodes. *Biological Control*. 17 (1) 100- 109.

GENNARO, A. 1995. Remington Pharmacy. Editorial *University of the Sciences in Philadelphia.* 650-680

GILLIGAN, C.A.; SIMONS, S.A.; HIDE, G.A. 1996. Inoculum density and spatial pattern of *Rhizoctonia solani* in field plots of *Solanum tuberosum*: effects of cropping frequency. *Plant pathology*. 45: 232-244.

GÓMEZ, J. 2006. Búsqueda y selección de aislamientos nativos de granulovirus para el control de *Tecia solanivora* en cultivos de papa en Cundinamarca. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia.

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. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 2000. Producción masiva, separación, secado y formulación de microorganismos biocontroladores. En *Memorias de I Taller de Control Biológico- MIP*. 108-112.

GUERRERO, O. 1998. Principales enfermedades de la papa causadas por hongos y bacterias transmitidas por semilla. En: *Manejo sanitario del cultivo de papa.* Comité de sanidad de la papa departamento de Nariño. 10-35.

GUIJARRO, B.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. 2007. Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot. *International Juornal of Food Microbiology.* 113(2): 117-124

HANSON, L.E.; HOWELL, C.R. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 94: 171–176.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I., LORITO, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts._*Nature Reviews Microbiology* 2: 43–56.

HELMAN, H. 1982. Farmacotécnica teórica y práctica. Editorial de Continental. México. 1680-1692.

HERRERA, F. 1998. La polilla guatemalteca de la papa Biología, Comportamiento y prácticas de Manejo Integrado. Fedepapa. Editorial Produmedios. 1-15.

HILJE L. 1994. Caracterización del daño de las polillas de la papa, *Tecia solanivora* y *Pthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), en Cartajo, Costa Rica. *Revista Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 31:43-46.

HONG, T.D.; JENKINS, N.E.; ELLIS, R.H. 2000. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research*. 104: 662-665.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87: 4-10.

HOYOS, L.; SZEWCZYK, B.; PALUSZEK M. 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 24 : 143– 160.

JACKSON, M.; POPRAWSKI, T. 2007. Influence of formulation additives on the desiccation tolerante and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology*. 16: 61-75.

JACKSON, M.; SHASHA, B.; SCHISLER, D. 1996. Formulation of *Colletotrichum truncatum* microsclerotia for improved biocontrol of the weed hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). *Biological Control*. 7: 107–113.

JAYARAJ, J.; RADHAKRISHNAN, N.; VELAZHAHAN, R. 2006. Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomate caused by *Pythium aphanidermatum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 39: 1-8.

JENKINS, N. GRZYWACZ. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents- Assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology.* 10: 753-777.

JENKINS, N.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, G.; ANDREW, J.; LOMER, J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 19 (1) 21-31.

KARABULUT, O.; BAYKAL, N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection.* 23 (5): 431-435.

KHAVAZI, K.; REJALI, F.; SEGUIN P.; MIRANSARI, M. 2007. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max L.*) inoculants. *Enzyme and Microbial Technology.* 41: 780–784.

KINAY, P.; YILDIZ, M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control*. 45:433–440.

KREDICS, L.; MANCZINGER, L.; ANTAL, Z.;. PÉNZES, Z.; SZEKERES, A.;. KEVEI, F., NAGY, E. 2004. In vitro water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 491-498.

KÜÇÜK, Ç.; KIVANÇ, M. 2005. Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* conidia. *African Journal of Biotechnology*. 4: 438-486.

LAWRIE, J.; DOWN, J.M.; GREAVES, M.P. 2001. Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola. Biocontrol Science and Technology.* 11: 283-295.

LELAN J. 2001. Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of african desert locust (*Schistocerca gregaria*). *Faculty of Virginia Polytechnic Institute. Blacksburg Virginia*. 42-49.

LEWIS, J.A.; LUMSDEN, R.D. 2001. Biocontrol of damping-off greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma spp*. *Crop Protection*. 20: 49-56.

LI, B.Q.; TIAN, S.P. Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii. Journal of Applied Microbiology* 100(4): 854-861

LIÑAN,C. 1997. Farmacología vegetal. Ediciones Aerotécnicas S.L. Madrid.

LO, C.; HAYES,C.; HARMAN, C. 1998. Ecological studies of transformes *T. harzianum* in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentrass. *Phytopathology*. 88 (2) 129-136.

LÓPEZ- ÁVILA, A.; ESPITIA E. 2000. Plagas y beneficios del cultivo de papa en Colombia. *Boletín divulgativo*. Editorial Produmedios. 1-30.

MARIÑO, P. 2001. Caracterización y evaluación de la estabilidad biocontroladora y microbiologica de preformulados granulados a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control de la chiza *Ancognatha scarabaeoides* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE). Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia. 49.

MARTIN, A.; SINKO, P. 2005. Physical and pharmaceutical sciences. Quinta Edición. Editorial Lippinocott Williams and Wilkins.

MARTÍNEZ, H.; BARRIOS, C.: ACEVEDO, X. 2003. Características y Estructura de la Cadena de la Papa en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Informe de Trabajo Nº 3. http://www.agrocadenas.gov.co

MAUSAM, V.; SATINDER, K.; BRAR, R.D.; TYAGI, R.Y.; SURAMPALLI, J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1–20.

MEJIA, L. 2000. Estudio de las enfermedades de la papa para uso industrial en las etapas de pre y post cosecha en Colombia. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia. Pág: 10-15.

MELIN P., HAKANSSON S., EBERHARD T., SCHNURER J. 2006. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology* 100: 264-271.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2006. Coordinación Grupo de Bioinsumos Agrícolas. Productos Registrados. www.agronet.gov.co. Fecha de consulta: 6 de Febrero de 2008.

MOORE D.; DOURO-KPINDOU O.K.; JENKINS N.E.; LOMER C.J. 1996. Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology.* 6(1): 51-62.

MORA, S; MOSQUERA, M. 2002. Papa transgénica en Colombia ¿una alternativa?. *Economía Colombiana y Coyuntura política*. Junio. 89-92.

MORALES, G. 1993. Formulación de bioinsecticidas, biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *B. thuringensis.* Universidad Autónoma de México. 85-89.

MORENO, C. 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) con énfasis en mildeo polvoso (O*idium* sp.).Tesis de Pregrado. Carrera de Ingeniería Agrónoma. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional De Colombia. Bogotá D.C. Colombia.

MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annual Review of Entomology. 44: 257-289

MURCIA, G.; BARRETO, N. 2002. Evaluación de parámetros para el almacenamiento de semilla de papa (*Solanum tuberosum*) y mecanismos de control de la polilla guatemalteca *(Tecia solanivora)* durante el mismo. *Redepapa***.** 1-17

NIÑO, L. 2004. Revisión sobre la Polilla de la Papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. S*uplemento Revista Latinoamericana de la papa.* 1- 40.

ÑUSTEZ, C. 2002. Efecto de diferentes niveles de inoculo de *Rhizoctonia solani* en semilla y dos sistemas de manejo, sobre el rendimiento y sanidad del tubérculo cosechado. Informe Técnico. Convenio 094 de 200. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. CORPOICA.

PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potencial for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 23:23-54.

PARÍS, A.; COTES, A.M. 2002. Biological Control of Sclerotium cepivorum in Onion with a Yeast and bacteria. En: *Program and Abstract. Influence of Abiotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents*. Edit: Y. Elad, J. Köhl. Turkia. Pág: 100.

PARÍS. A.; BELTRÁN. C.; COTES. A.M. 2003. Informe Final. Proyecto: Selección de cepas de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* en diferentes variedades de papa. Colciencias.

PAULITZ, T.; BELANGER, R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*. 39:103-133.

PENA, L. 2000. Fisiología y manejo de tubérculos - semilla de papa. *Boletín de la papa*. 2 (3).

PÉREZ. A. 1986. Almacenamiento de Papa. En: *Cuarto Curso de Actualización de conocimiento en el cultivo de la Papa. Federación Colombiana de Productores de Papa.* Medellín, Antioquia. 156-154.

PORRAS, D. 1999. La papa en Colombia: desarrollo de una cadena agroalimentaria. *Revista papa*. 16: 10-21

PORRAS, D. 2002. Producción y manejo de postcosecha de semilla de papa. *Revista papa*. 21: 1- 10

REINO, J.; GUERRERO, R. 2007. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*. 7:89–123.

ROMERO, F. 2004. Manejo Integrado de plagas. Las bases, sus conceptos y comercialización. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. Mexico

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

SALDAMANDO, B. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate (*Lycopersicum sculentum*) mediante una combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Los Andes. Bogotá. Colombia.

SAMUELS, G.; DODD, S.; LU, B. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species . *Studies in Micology*.56(1) 67 – 133.

SCHWARZ, R.: ESCASA, S.; ARIF, B. 2007. Inhibition of programmed Cell Death by *Baculoviruses:* Potential. En: *Pest-Management Strategies Insecticides Design Using Advanced Technologies*.217-233.

SHABANA, Y.; MULLER-STUOVER, D.; SAUERBORNB, J. 2003. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. orthoceras for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biological Control*. 26: 189–201.

SIMONS, S.A.; GILLIGAN, C.A. a. 1997. Factors affecting the temporal progress of stem canker (*Rhizoctonia solani*) on potatoes (*Solanum tuberosum). Plant pathology*. 46: 642-650. **b.** Relationships between stem canker, stolon canker, black scurf (*Rhizoctonia solani*) and yield of potato (*Solanum tuberosum*) under different agronomic conditions. *Plant pathology*. 46: 652-658.

SNECH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. 1998. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, Minnesota, USA. Pág: 5-24,

SOTELO, G. 1997. La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) y su control con baculovirus. En *Manejo integrado de plagas de la papa: memorias. 2. Curso-Taller Manejo Integrado de Plagas de la Papa.* Centro Internacional de la Papa. Bogotá Colombia. Pág: 32-34.

SPORLEDER, M.; KROSCHEL, J.; HUBER, J.; LAGNAOUI, A. 2005. An improved method to determine the biological activity (LC 50) of the granulovirus PoGV in its host *Phthorimaea operculella. Entomologia Experimentalis et Applicata.*116: 191–197

STRASSER, H.; KIRCHMAIR, M. 2006. Potential health problems due to exposure in handling and using biological control agents. En: An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Pág. 275–293.

TÁMEZ-GUERRA, P.; MCGUIRE, M.; BEHLE, R.; PINGELE, R. 2002 Storage stability of Anagrapha falcifera nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. *Journal of Invertebrate Pathology.* 79(1): 7-16.

TESHLER, M.; ASH G.; ZOLOTAROV, Y.; WATSON, A. 2007. Increased shelf life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures. *Biocontrol Science and Technology.17(4): 387-400*

THANGAVELU, R.; PALANISWAMIB, A.; VELAZHAHAN, R. 2004. Mass production of Trichoderma harzianum for managing fusarium wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 103(1): 259-263.

THORNTON, C. 2004. An immunological approach to quantifying the saprotrophic growth dynamics of *Trichoderma* species during antagonistic interactions with *Rhizoctonia solani* in a soil-less mix. *Environmental Microbiology.* 6 (4): 323–334.

TORRES, F.; NOTZ, A.; VALENCIA. L. 1997. Ciclo de vida y otros aspectos de la biología de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el Estado Táchira, Venezuela. *Boletín Entomología Venezolana*. 12 (1): 95-106.

TSROR, L.; BARAK, R.; SNEH, B. 2001. Biological control of black scurf on potato under organic management. *Crop Protection*. 20:145-150

TSROR, L.; Y ALON P. 2005. The Influence of the Inoculum Source of *Rhizoctonia solani* on Development of Black Scurf on Potato. *Journal of. Phytopathology* 153: 240–244.

VALENCIA, C. 2000. Control de Calidad, Físico, Biológico y Microbiológico de Preformulados a Base del Hongo Entomopatogeno *Beaveria bassiana* utilizados a nivel experimental para el control del gusano blanco de la papa. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. Colombia. Pag. 45.

VALKONEN, J. P. 2008. Dynamics of soilborne *Rhizoctonia solani* in the presence of *Trichoderma harzianum*: effects on stem canker, black scurf and progeny tubers of potato. *Plant Pathology.* 57: 152–161.

VERMA, M.; A, BRAR, K.; TYAGI, R.D. SURAMPALLI, T.Y.; VALERO, J.V. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal.* 37: 1–20

VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; GÓMEZ, J.; COTES, A. 2006. Reconocimiento, selección y evaluación de aislamientos nativos de virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa. Boletín técnico divulgativo. Editorial Produmedios. Colombia. Pág. 5-9.

VILLAMIZAR, L.; GÓMEZ, M.; COTES, A.; LOPEZ, J. 2003. Desarrollo tecnológico de un bioplaguicida con base en baculovirus para el control de la polilla guatemalteca. En: *Memorias II taller nacional de Tecia solanivora*. CEVIPAPA. 132-136.

VILLAMIZAR, L.; MORENO, C.; PARIS, A.; COTES, A. 2004. Development of biopesticide prototypes for controling pathogens in vegetables. En: *Diseases Biocontrol*. International Workship. Ediciones de UdL. Pág: 136.

VILLAMIZAR, L.; ZEDDAM, J.; ESPINEL, C.; COTES, A. 2005. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella PhopGV. Revista Colombiana de Entomologia.* 31(1): 127-132.

VINALE, F.; D'AMBROSIO, G.; ABADI, K.; SCALA, F.; MARRA, R. TURRA, D.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E.L.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different Phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology.* 43:143–148.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTIC, E.; MARRA, R.; WOO, L.; LORITO, M. 2008. *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1–10.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. 2007. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 549–556.

VOIGHT & BORNSCHEIN. 1982. Tratado de Tecnología Farmacéutica. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 66-75;163-175.

WHARTON, P.; WILLIAM, K. 2007. *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. Michigan. *Extension Bolletin:* 25-35.

WILSON, P. S.; KETOLA, E. O.; AHVENNIEMI P. M.; LEHTONEN, M. J.; WINSTANLEY, D.; O'REILLY, D. 1999. Baculoviruses (Baculoviridae) *Granuloviruses.* En: *Encyclopedia of Virology.140-146*

WOHLFORD, C.; DEETZ, D.; SCHWARTZ, D. 1999. Cytokine gene expression after inhalation of corn dust. *American Journal of Physiology*. 276: 736-743.

WOO.; LORITO, M. 2004. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma* atroviride (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *Journal of Zhejiang University Science* 30: 2–8.

WOODHALL, J. W.; LEES, A.K.; EDWARDS, S.G.; JENKINSON, P. 2008. Infection of potato by *Rhizoctonia solani*: effect of anastomosis group. 57(5): 897-905

WRAIGHT, S.; LACEY, L.; SPORLEDER, M.; POPRAWSKI, T. 2007. Application and evaluation of entomopathogens in potato. En: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.* Pág: 329–359*.*

WRAITH, S.P.; JACKSON, M.A.; KOCK,S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: *Fungi as Biocontrol Agent: Progress, Problems and Potential*. 253-263.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 7343–7353.

ZEDDAM, J.; LAGNAOUI, A.; VARGAS, Z.; VASQUEZ, R. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*. 29: 659-667.

ZHANG, S.; SCHISLER, D.; JACKSON, M.; BOEHM, M.; SLININGER, P.; LEWIS L. 2006. Cold shock during liquid production increases storage shelf-life of *Cryptococcus nodaensis* OH 182.9 after air-drying. *Biocontrol Science and Technology.* 16(3): 281-293.

ZIMMERMANN, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii. Biocontrol Science and Technology.* 17(5/6): 553-596.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Medios de Cultivo

Para preparar Un (1) litro

PDA + TRITON X 100 al 0.1%:

Papa: 200 g.

Agar: 18 g.

Sacarosa: 2 g.

Tritón al 0.1%. (1mL)

Agar Extracto de Malta:

Extracto de Malta: 3 g.

Peptona: 3 g.

Agar: 18 g

Agar Nutritivo:

Caldo Nutritivo: 8 g.

Peptona de Carne: 5 g

Extracto de Carne: 3 g.

Agar: 18 g.

ANEXO 2. Resultados de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Rh176 en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*.

Peso seco promedio de las plantas sembradas en presencia del aislamiento RH176 a las diferentes concentraciones después de 30 días.

RH 176	Control	RH176 (4 Discos)	RH176 (8 discos)	RH176 (16 Discos)
R1	0,7	0,88	0,93	0,37
R2	0,96	0,91	0,98	0,39
R3	0,94	0,89	0,92	0,24
R4	1,02	0,78	0,92	0,37
R5	0,96	0,83	0,57	0,27
R6	0,74	0,83	0,98	0,29
R7	0,98	0,98	0,75	0,31

ANEXO 3. Análisis estadístico de la prueba de patogenicidad con el aislamiento RH176 en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*.

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	1.64301	0.54767	47.37	0.0000
WITHIN	24	0.27746	0.01156		
TOTAL	27	1.92047			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
C	0.9000	7	0.1260
T1	0.8714	7	0.0652
T2	0.8643	7	0.1511
T3	0.3200	7	0.0574
TOTAL	0.7389	28	0.1075

CASES INCLUDED 28 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
C	0.9000	I
T1	0.8714	I
T2	0.8643	I
T3	0.3200	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 3.902 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.1586
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0575

ANEXO 4. Resultados de la prueba de patogenicidad con el aislamiento RH200 en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*.

Peso seco promedio de las plantas sembradas en presencia del aislamiento RH200 a las diferentes concentraciones después de 30 días.

RH200	CONTROL	RH200 (4 Discos)	RH200 (8 Discos)	RH200 (16Discos)
R1	2,32	2,36	2,17	1,58
R2	2,29	2,4	2,26	1,54
R3	2,18	2,12	2,23	1,5
R4	2,28	2,16	2,27	1,41
R5	2,3	2,29	2,13	1,42
R6	2,46	2,17	2,19	1,57
R7	2,38	2,36	2,27	1,38

ANEXO 5. Análisis estadístico de la prueba de patogenicidad con el aislamiento RH200 en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*.

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	3.23201	1.07734	142.02	0.0000
WITHIN	24	0.18206	0.00759		
TOTAL	27	3.41407			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
C	2.3157	7	0.0872
T1	2.2657	7	0.1140
T2	2.2171	7	0.0550
T3	1.4857	7	0.0820
TOTAL	2.0711	28	0.0871

CASES INCLUDED 28 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
C	2.3157	I
T1	2.2657	I
T2	2.2171	I
T3	1.4857	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 3.902 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.1285
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0466

ANEXO 6. Resultados de la prueba de patogenicidad (Incidencia) con los aislamientos RH176 y RH200 en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*.

	Control	**RH176 4Discos**	**RH176 8discos**	**RH176 16discos**	**RH200 4discos**	**RH200 8discos**	**RH200 16 discos**
1	28,57	28,57	42,85	42,85	42,85	71,42	100
2	14,28	42,85	57,14	71,42	28,57	42,85	100
3	28,57	28,57	42,85	42,85	28,57	42,85	85,71
Promedio	23,81	33,33	47,61	52,37	33,33	52,37	95,24

ANEXO 7. Análisis Estadístico la prueba de patogenicidad (Incidencia) con los aislamientos RH176 y RH200 en *Solanum phureja* para la prueba de eficacia *in planta*.

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	6	9854.49	1642.42	13.00	0.0001
WITHIN	14	1768.63	126.330		
TOTAL	20	11623.1			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
C	23.807	3	8.2503
R1761	33.330	3	8.2446
R1762	47.613	3	8.2503
R1763	52.373	3	16.495
R2001	33.330	3	8.2446
R2002	52.373	3	16.495
R2003	95.237	3	8.2503
TOTAL	48.295	21	11.240

CASES INCLUDED 21 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
R2003	95.237	I
R1763	52.373	.. I
R2002	52.373	.. I
R1762	47.613	.. I
R1761	33.330	.. I
R2001	33.330	.. I
C	23.807	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.832 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 31.354
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 9.1772

ANEXO 8. Resultados de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones *in planta.*

Porcentaje de eficacia e incidencia:

TRATAMIENTO	% Eficacia	% Incidencia
CONTROL	85,72	14,28
T. PATOGENO	0	100
Bioplaguicida Mixto	85,72	14,28

Peso seco de las plantas:

Replicas	Control	T. Patogeno	Bioplaguicida Mixto
R1	0,73	0,56	1,38
R2	0,49	0,39	0,81
R3	0,66	0,58	1,59
R4	0,74	0,52	1,87
R5	0,68	0,53	0,69
R6	0,79	0,57	1,04
R7	0,55	0,42	0,99

ANEXO 9. Análisis estadístico de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones *in planta* (Peso seco)

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	1.81418	0.90709	13.40	0.0003
WITHIN	18	1.21871	0.06771		
TOTAL	20	3.03290			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
BM	1.1957	7	0.4311
C	0.6629	7	0.1077
TP	0.5100	7	0.0753
TOTAL	0.7895	21	0.2602

CASES INCLUDED 21 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
BM	1.1957	I
C	0.6629	.. I
TP	0.5100	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 3.611 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.3551
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1391

ANEXO 10. Resultados de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones de almacenamiento.

Porcentaje de eficacia e incidencia:

TRATAMIENTO	% Eficacia	% Incidencia
T. Patógeno	0	100
Bioplaguicida Mixto	80	20

Peso de brotes de las semillas tratadas con el bioplaguicida mixto y no tratadas:

REPLICAS	Tratamientos	
	T. Patógeno	**Bioplaguicida mixto**
R1	0,37	1,44
R2	0,16	1,15
R3	0,23	1,78
R4	0,13	1,25
R5	0	1,59

ANEXO 11. Análisis estadístico de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones de almacenamiento (peso brotes)

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	1	3.99424	3.99424	96.20	0.0000
WITHIN	8	0.33216	0.04152		
TOTAL	9	4.32640			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
C	0.1780	5	0.1359
T1	1.4420	5	0.2541
TOTAL	0.8100	10	0.2038

CASES INCLUDED 10 MISSING CASES 0

Comparación de medias de DMS (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
BM	1.4420	I
C	0.1780	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.306 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.2972
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1289

ANEXO 12. Resultados de la caracterización biológica del prototipo de bioplaguicida mixto frente a *Tecia solanivora* en condiciones de almacenamiento.

Eficacia

Tratamiento	Réplicas	Larvas Vivas	Larvas Muertas	Eficacia (%)
CONTROL	R1	10	0	-
	R2	10	0	-
	R3	10	0	-
Bioplaguicida Mixto	R1	1	9	90
	R2	0	10	100
	R3	2	8	80

ANEXO 13. Resultados de la estabilidad de la concentración del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC

	Mes	RÉPLICAS						X
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
B. Mixto	0	5,00E+08	4,00E+08	3,40E+08	4,20E+08	4,00E+08	3,90E+08	4,08E+08
	1	4,40E+08	3,80E+08	3,40E+08	3,40E+08	3,80E+08	3,90E+08	3,78E+08
	2	4,20E+08	3,50E+08	3,10E+08	3,30E+08	3,60E+08	3,75E+08	3,58E+08
	3	4,50E+08	3,40E+08	3,00E+08	3,20E+08	3,50E+08	3,70E+08	3,55E+08
F. en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	0	4,50E+08	4,60E+08	3,60E+08	3,80E+08	4,30E+08	4,50E+08	4,22E+08
	1	4,20E+08	4,20E+08	3,30E+08	3,20E+08	4,10E+08	4,30E+08	3,88E+08
	2	4,20E+08	4,40E+08	3,40E+08	2,90E+08	3,90E+08	3,80E+08	3,77E+08
	3	3,90E+08	3,90E+08	3,30E+08	2,80E+08	3,80E+08	3,50E+08	3,53E+08

ANEXO 14. Resultados de la estabilidad de la concentración del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC

Tratamiento	Mes	RÉPLICAS						Promedio
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
B. Mixto	0	5,00E+08	4,00E+08	3,40E+08	4,20E+08	4,00E+08	3,90E+08	4,08E+08
	1	4,30E+08	3,80E+08	3,40E+08	3,90E+08	3,40E+08	3,50E+08	3,72E+08
	2	4,00E+08	3,70E+08	3,03E+08	3,80E+08	3,30E+08	3,40E+08	3,54E+08
	3	3,90E+08	3,50E+08	2,90E+08	3,70E+08	3,20E+08	3,30E+08	3,42E+08
F. en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	0	4,50E+08	4,60E+08	3,60E+08	3,80E+08	4,30E+08	4,50E+08	4,22E+08
	1	4,00E+08	3,50E+08	3,10E+08	3,75E+08	4,00E+08	4,20E+08	3,76E+08
	2	3,90E+08	3,30E+08	3,00E+08	3,50E+08	3,80E+08	4,00E+08	3,58E+08
	3	3,60E+08	3,20E+08	2,90E+08	3,20E+08	3,60E+08	3,80E+08	3,38E+08

ANEXO 15. Resultados de la estabilidad de la concentración del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 28ºC

Tratamiento	Mes	RÉPLICAS						Promedio
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
B. Mixto	0	5,00E+08	4,00E+08	3,40E+08	4,20E+08	4,00E+08	3,90E+08	4,08E+08
	1	4,10E+08	3,40E+08	3,20E+08	3,40E+08	3,20E+08	3,70E+08	3,50E+08
	2	3,90E+08	3,30E+08	2,90E+08	3,20E+08	3,10E+08	3,30E+08	3,28E+08
	3	3,10E+08	2,60E+08	1,50E+08	2,70E+08	2,80E+08	2,50E+08	2,53E+08
F. en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	0	4,50E+08	4,60E+08	3,60E+08	3,80E+08	4,30E+08	4,50E+08	4,22E+08
	1	3,20E+08	4,00E+08	2,60E+08	3,30E+08	3,70E+08	4,10E+08	3,48E+08
	2	3,10E+08	3,90E+08	2,50E+08	3,20E+08	2,00E+08	4,00E+08	3,12E+08
	3	2,50E+08	3,20E+08	2,40E+08	2,50E+08	1,90E+08	2,90E+08	2,57E+08

ANEXO 16. Resultados de la reducción de la concentración o viabilidad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C.

	B. Mixto (8º C)	**Control (8º C)**	**B. Mixto (18º C)**	**Control (18º C)**	**B. Mixto (28º C)**	**Control (28º C)**
R1	18,00	13,33	22,00	20,00	24,00	44,44
R2	15,00	15,22	12,50	30,43	20,00	30,43
R3	11,76	8,33	14,71	19,44	17,65	33,33
R4	23,81	26,32	11,90	15,79	28,57	34,21
R5	12,50	11,63	20,00	16,28	30,00	55,81
R6	5,13	22,22	15,38	15,56	35,90	35,56

ANEXO 17. Análisis estadístico de la reducción de la concentración o viabilidad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C.

Analisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	4007.42	801.484	15.76	0.0000
WITHIN	30	1525.29	50.8431		
TOTAL	35	5532.72			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
T118	16.082	6	4.0760
T128	38.415	6	8.9590
T18	14.367	6	6.2988
T218	19.583	6	5.6450
T228	38.963	6	9.5135
T28	16.175	6	6.7922
TOTAL	23.931	36	7.1304

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
T228	38.963	I
T128	38.415	I
T218	19.583	.. I
T28	16.175	.. I
T118	16.082	.. I
T18	14.367	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.301 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 12.521
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.1168

ANEXO 18. Análisis estadístico del comportamiento de la concentración o viabilidad del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), durante tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	19	0.37971	0.01998	5.13	0.0000
WITHIN	100	0.38923	0.00389		
TOTAL	119	0.76895			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
B0	8.6050	6	0.0517
B181	8.5650	6	0.0399
B182	8.5417	6	0.0436
B183	8.5267	6	0.0463
B281	8.5383	6	0.0417
B282	8.5100	6	0.0434
B283	8.3883	6	0.1121
B81	8.5717	6	0.0412
B82	8.5250	6	0.0333
B83	8.5200	6	0.0727
C0	8.6183	6	0.0467
C181	8.5700	6	0.0482
C182	8.5467	6	0.0501
C183	8.5217	6	0.0417
C281	8.5317	6	0.0747
C282	8.4783	6	0.1162
C283	8.3983	6	0.0788
C81	8.5817	6	0.0598
C82	8.5683	6	0.0655
C83	8.5400	6	0.0580
TOTAL	8.5323	120	0.0624

CASES INCLUDED 120 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
C0	8.6183	I
B0	8.6050	I I
C81	8.5817	I I
B81	8.5717	I I
C181	8.5700	I I
C82	8.5683	I I
B181	8.5650	I I
C182	8.5467	I I
B182	8.5417	I I
C83	8.5400	I I
B281	8.5383	I I
C281	8.5317	I I
B183	8.5267	I I I
B82	8.5250	I I I
C183	8.5217	I I I
B83	8.5200	I I I
B282	8.5100	I I I I
C282	8.4783	.. I I I
C283	8.3983	.... I I
B283	8.3883	 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.
CRITICAL Q VALUE 5.140 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.1309
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0360

ANEXO 19. Resultados de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC.

Tratamiento	Mes	RÉPLICAS			Promedio
		R1	R2	R3	
Bioplaguicida Mixto	**0**	97,06	97,45	98,11	97,54
	1	97,20	97,26	97,28	97,25
	2	97,50	97,04	97,26	97,27
	3	96,95	94,67	96,67	96,09
Formulación en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	**0**	98,10	97,24	96,27	97,20
	1	96,52	96,45	96,69	96,56
	2	96,52	96,45	96,69	96,56
	3	95,83	95,17	95,07	95,36

ANEXO 20. Análisis estadístico de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC.

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	7	11.3608	1.62297	4.44	0.0065
WITHIN	16	5.85305	0.36582		
TOTAL	23	17.2138			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
C0	97.204	3	0.9166
C1	96.557	3	0.1237
C2	96.553	3	0.1234
C3	95.357	3	0.4130
T10	97.541	3	0.5326
T11	97.245	3	0.0435
T12	97.266	3	0.2316
T13	96.094	3	1.2434
TOTAL	96.727	24	0.6048

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
T10	97.541	I
T12	97.266	I
T11	97.245	I
C0	97.204	I
C1	96.557	I I
C2	96.553	I I
T13	96.094	I I
C3	95.357	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.
CRITICAL Q VALUE 4.903 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.7121
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4938

ANEXO 21. Resultados de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC.

Tratamiento	Mes	RÉPLICAS			Promedio
		R1	R2	R3	
Bioplaguicida Mixto	**0**	97,06	97,45	98,11	97,54
	1	96,50	96,92	97,39	96,94
	2	96,85	96,62	95,35	96,27
	3	95,60	93,84	94,84	94,76
Formulación en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	**0**	97,06	97,45	98,11	97,54
	1	96,50	96,92	97,39	96,94
	2	96,85	96,62	95,35	96,27
	3	95,60	93,84	94,84	94,76

ANEXO 22. Análisis estadístico de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	7	11.3608	1.62297	4.44	0.0065
WITHIN	16	5.85305	0.36582		
TOTAL	23	17.2138			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
C0	97.204	3	0.9166
C1	96.557	3	0.1237
C2	96.553	3	0.1234
C3	95.357	3	0.4130
T10	97.541	3	0.5326
T11	97.245	3	0.0435
T12	97.266	3	0.2316
T13	96.094	3	1.2434
TOTAL	96.727	24	0.6048

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
T10	97.541	I
C0	97.204	I
T11	96.937	I
T12	96.274	I I
T13	95.495	I I
C1	95.360	I I
C2	95.360	I I
C3	94.526	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.
CRITICAL Q VALUE 4.903 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 2.3350
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.6735

ANEXO 23. Resultados de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 28ºC.

Tratamiento	Mes	RÉPLICAS			Promedio
		R1	R2	R3	
Bioplaguicida Mixto	**0**	97,06	97,45	98,11	97,54
	1	96,67	96,88	96,68	96,74
	2	94,62	95,42	95,59	95,21
	3	81,96	82,90	81,01	81,96
Formulación en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	**0**	98,10	97,24	96,27	97,20
	1	96,43	95,92	95,97	96,11
	2	96,43	95,92	95,97	96,11
	3	79,80	80,36	79,90	80,02

ANEXO 24. Análisis estadístico de la estabilidad de la germinación del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 28ºC.

Análisis de Varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	7	1103.05	157.579	420.75	0.0000
WITHIN	16	5.99231	0.37452		
TOTAL	23	1109.04			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
C0	97.204	3	0.9166
C1	96.165	3	0.2553
C2	95.500	3	0.7715
C3	80.017	3	0.2996
T10	97.541	3	0.5326
T11	96.741	3	0.1161
T12	96.091	3	0.4704
T13	81.956	3	0.9420
TOTAL	92.652	24	0.6120

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
T10	97.541	I
C 0	97.204	I I
T11	96.741	I I
C1	96.165	I I
T12	96.091	I I
C2	95.500	.. I
T13	81.956	 I
C3	80.017	 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.903 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.7323
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4997

ANEXO 25. Resultados de la reducción de la germinación del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C.

	B. Mixto (8º C)	**Control (8º C)**	**B. Mixto (18º C)**	**Control (18º C)**	**B. Mixto (28º C)**	**Control (28º C)**
R1	0,12	2,31	1,51	5,16	15,56	18,66
R2	2,86	2,13	3,71	1,99	14,94	17,36
R3	1,47	1,24	3,34	1,07	17,43	17,01

ANEXO 26. Análisis estadístico de la reducción de la germinación del bioplaguicida mixto y el tratamiento control (formulación en polvo de *T. koningiopsis*), después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	859.050	171.810	96.89	0.0000
WITHIN	12	21.2781	1.77317		
TOTAL	17	880.328			

SAMPLE GROUP

VARIABLE	MEAN	SIZE	STD DEV
T118	2.8467	3	1.1816
T128	15.967	3	1.2962
T18	1.4767	3	1.3700
T218	2.7400	3	2.1457
T228	17.677	3	0.8694
T28	1.8900	3	0.5709
TOTAL	7.0994	18	1.3316

CASES INCLUDED 18 MISSING CASES 063 6 9.5135
T28 16.175 6 6.7922
TOTAL 23.931 36 7.1304
CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
T228	17.677	I
T128	15.967	I
T118	2.8467	.. I
T218	2.7400	.. I
T28	1.8900	.. I
T18	1.4767	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.
CRITICAL Q VALUE 4.751 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 3.6525
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 1.0873

ANEXO 27. Resultados de la estabilidad del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 8ºC.

	Mes	RÉPLICAS						Promedio
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
B. Mixto	0	2,00E+04	2,20E+04	2,40E+04	1,80E+04	2,40E+04	2,20E+04	2,17E+04
	1	2,10E+04	2,20E+04	2,50E+04	2,00E+04	2,80E+04	2,80E+04	2,40E+04
	2	2,50E+04	4,30E+04	5,00E+04	5,00E+04	3,20E+04	2,10E+04	3,68E+04
	3	2,00E+04	2,20E+04	2,40E+04	1,80E+04	2,40E+04	2,20E+04	2,17E+04
Control (Th003)	0	1,60E+04	2,00E+04	5,00E+04	3,40E+04	3,50E+04	1,20E+04	2,78E+04
	1	2,00E+04	3,00E+04	5,10E+04	3,50E+04	3,90E+04	2,60E+04	3,35E+04
	2	5,60E+04	6,80E+04	5,40E+04	4,70E+04	4,50E+04	5,10E+04	5,35E+04
	3	1,60E+04	2,00E+04	5,00E+04	3,40E+04	3,50E+04	1,20E+04	2,78E+04
Baculovirus Corpoica	0	2,00E+02	1,00E+02	4,30E+02	5,20E+02	1,00E+02	1,40E+02	2,48E+02
	1	3,00E+02	1,50E+02	5,00E+02	6,00E+02	1,80E+02	2,00E+02	3,22E+02
	2	2,00E+02	3,38E+02	4,90E+02	6,50E+02	5,00E+02	6,00E+02	4,63E+02
	3	2,00E+02	1,00E+02	4,30E+02	5,20E+02	1,00E+02	1,40E+02	2,48E+02

ANEXO 28. Resultados de la estabilidad del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento a 18ºC.

Tratamiento	Mes	RÉPLICAS						Promedio
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
Bioplaguicida Mixto	0	2,00E+04	2,20E+04	2,40E+04	1,80E+04	2,40E+04	2,20E+04	2,17E+04
	1	2,10E+04	2,40E+04	2,60E+04	2,00E+04	2,90E+04	2,40E+04	2,40E+04
	2	6,70E+04	8,90E+04	9,00E+04	8,70E+04	6,10E+04	4,50E+04	7,32E+04
	3	2,00E+04	2,20E+04	2,40E+04	1,80E+04	2,40E+04	2,20E+04	2,17E+04
Formulación en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	0	1,60E+04	2,00E+04	5,00E+04	3,40E+04	3,50E+04	1,20E+04	2,78E+04
	1	2,90E+04	2,50E+04	5,60E+04	3,70E+04	4,10E+04	3,00E+04	3,63E+04
	2	7,80E+04	9,80E+04	7,90E+04	8,99E+04	9,30E+04	7,80E+04	8,60E+04
	3	1,60E+04	2,00E+04	5,00E+04	3,40E+04	3,50E+04	1,20E+04	2,78E+04
Baculovirus Corpoica	0	2,00E+02	1,00E+02	4,30E+02	5,20E+02	1,00E+02	1,40E+02	2,48E+02
	1	2,80E+02	2,00E+02	5,20E+02	7,00E+02	9,00E+02	5,00E+02	5,17E+02
	2	9,00E+02	4,50E+02	1,00E+02	9,00E+02	3,60E+02	9,00E+02	6,02E+02
	3	2,00E+02	1,00E+02	4,30E+02	5,20E+02	1,00E+02	1,40E+02	2,48E+02

ANEXO 29. Resultados de la estabilidad del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de a 28ºC

Tratamiento	Mes	RÉPLICAS						Promedio
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
Bioplaguicida Mixto	**0**	2,00E+04	2,20E+04	2,40E+04	1,80E+04	2,40E+04	2,20E+04	2,17E+04
	1	4,50E+02	5,40E+04	6,40E+04	3,90E+04	5,90E+04	4,70E+04	4,39E+04
	2	5,90E+04	1,20E+05	9,00E+04	1,20E+05	9,90E+04	1,20E+05	1,01E+05
	3	2,00E+04	2,20E+04	2,40E+04	1,80E+04	2,40E+04	2,20E+04	2,17E+04
Formulación en polvo de *T. koningiopsis* (Control)	**0**	1,60E+04	2,00E+04	5,00E+04	3,40E+04	3,50E+04	1,20E+04	2,78E+04
	1	3,40E+04	3,30E+04	6,20E+04	4,60E+04	4,50E+04	3,00E+04	4,17E+04
	2	9,00E+04	8,90E+04	9,80E+04	2,00E+05	1,00E+05	9,80E+04	1,13E+05
	3	1,60E+04	2,00E+04	5,00E+04	3,40E+04	3,50E+04	1,20E+04	2,78E+04
Baculovirus Corpoica	**0**	2,00E+02	1,00E+02	4,30E+02	5,20E+02	1,00E+02	1,40E+02	2,48E+02
	1	3,00E+02	9,00E+02	9,90E+02	1,00E+03	9,10E+02	7,90E+02	8,15E+02
	2	9,80E+02	9,00E+02	9,00E+02	7,80E+02	8,70E+02	6,50E+02	8,47E+02
	3	2,00E+02	1,00E+03	4,30E+02	5,20E+02	1,00E+03	1,40E+03	2,43E+03

ANEXO 30. Resultados del porcentaje de incremento del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto después de tres meses de almacenamiento a de 8ºC, 18ºC y 28ºC.

	B. mixto (8ºC)	***T. koningiopsis* (8ºC)**	**B. Corpoica (8ºC)**	**B. mixto (18ºC)**	***T. koningiopsis* (18ºC)**	**B. Corpoica (8ºC)**	**B. mixto (28ºC)**	***T. koningiopsis* (28ºC)**	**B. Corpoica (28ºC)**
R1	10,12	14,62	0,91	15,32	15,05	22,48	19,78	17,22	23,29
R2	10,81	10,87	29,06	18,4	14,68	27,62	23,18	28,26	33,13
R3	5,46	4,96	11,00	14,34	5,68	16,29	20,43	14,64	14,47
R4	10,08	7,87	0,00	14,82	12,92	3,44	23,07	15,48	10,69
R5	6,43	7,11	30,97	12,24	8,62	28	20,43	16,33	28,72
R6	9,77	11,56	28,25	12,43	16,71	6,73	21,67	27,84	46,1

ANEXO 31. Análisis estadístico del porcentaje de incremento del contenido de contaminantes del prototipo de bioplaguicida mixto después de tres meses de almacenamiento a de 8ºC, 18ºC y 28ºC.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	8	1550.70	193.838	3.06	0.0078
WITHIN	45	2852.78	63.3951		
TOTAL	53	4403.48			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
B18	14.592	6	2.2518
B28	21.427	6	1.4514
B8	8.7783	6	2.2419
BC18	17.427	6	10.513
BC28	26.067	6	12.938
BC8	16.698	6	14.495
T18	12.277	6	4.2526
T28	19.962	6	6.3252
T8	9.4983	6	3.5019
TOTAL	16.303	54	7.9621

CASES INCLUDED 54 MISSING CASES 0

Comparación de medias de TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
BC28	26.067	I
B28	21.427	I I
T28	19.962	I I
BC18	17.427	I I
BC8	16.698	I I
B18	14.592	I I
T18	12.277	I I
T8	9.4983	.. I
B8	8.7783	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.
CRITICAL Q VALUE 4.606 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 14.971
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.596

ANEXO 32. Resultados de la estabilidad de la porosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Almacenamiento a 8ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	39,48	41,03	39,48	39,99
1	39,24	40,65	40,23	40,04
2	40,32	39,86	39,99	40,06
3	39,21	41,23	40,12	40,19

Almacenamiento a 18ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	39,48	41,03	39,48	39,99
1	40,05	40,35	39,53	39,98
2	40,12	39,99	40,02	40,04
3	39,81	40,41	40,15	40,12

Almacenamiento a 28ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	39,48	41,03	39,48	39,99
1	40,73	39,97	39,51	40,07
2	40,67	39,38	40,24	40,10
3	40,15	40,99	39,41	40,18

ANEXO 33. Análisis estadístico de la estabilidad de la porosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	0.16859	0.01533	0.03	1.0000
WITHIN	24	11.4191	0.47579		
TOTAL	35	11.5877			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
V180	39.997	3	0.8949
V181	39.977	3	0.4149
V182	40.043	3	0.0681
V183	40.123	3	0.3009
V280	39.997	3	0.8949
V281	40.070	3	0.6161
V282	40.097	3	0.6568
V283	40.183	3	0.7905
V80	39.997	3	0.8949
V81	40.040	3	0.7239
V82	40.057	3	0.2371
V83	40.187	3	1.0116
TOTAL	40.064	36	0.6898

ANEXO 34. Resultados de la estabilidad de la fluidez estática del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Almacenamiento a 8ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	45,3	42,08	44,08	43,82
1	43,45	45,23	42,71	43,80
2	45,8	42,14	43,83	43,92
3	42,53	44,96	43,97	43,82

Almacenamiento a 18ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	45,3	42,08	44,08	43,82
1	44,54	43,23	43,71	43,83
2	43,98	43,25	44,34	43,86
3	44,67	42,67	44,15	43,83

Almacenamiento a 28ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	45,3	42,08	44,08	43,82
1	42,54	46,34	42,84	43,91
2	41,98	44,57	45,49	44,01
3	42,25	45,13	44,35	43,91

ANEXO 35. Análisis estadístico de la estabilidad de la fluidez estática del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	0.07043	0.00640	0.00	1.0000
WITHIN	24	51.7214	2.15506		
TOTAL	35	51.7918			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
V180	43.820	3	1.6257
V181	43.827	3	0.6627
V182	43.857	3	0.5554
V183	43.830	3	1.0377
V280	43.820	3	1.6257
V281	43.907	3	2.1127
V282	43.913	3	1.7028
V283	43.910	3	1.4896
V80	43.820	3	1.6257
V81	43.797	3	1.2953
V82	43.923	3	1.8318
V83	43.820	3	1.2219
TOTAL	43.854	36	1.4680

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

ANEXO 36. Resultados de la estabilidad de la humedad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Almacenamiento a 8ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	0,59	0,6	0,39	0,53
1	0,72	0,45	0,67	0,61
2	0,86	0,34	0,74	0,65
3	0,45	0,69	0,89	0,68

Almacenamiento a 18ºC

Tiempo	R1	R2	R3	Promedio
0	0,59	0,6	0,39	0,53
1	0,78	0,56	0,48	0,61
2	0,57	0,79	0,56	0,64
3	0,89	0,76	0,59	0,75

Almacenamiento a 28ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	0,59	0,6	0,39	0,53
1	0,68	0,76	0,69	0,71
2	0,77	0,74	0,82	0,78
3	0,82	0,87	0,73	0,81

ANEXO 37. Análisis estadístico de la estabilidad de la humedad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	0.30963	0.02815	1.31	0.2775
WITHIN	24	0.51527	0.02147		
TOTAL	35	0.82490			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
V180	0.5267	3	0.1185
V181	0.6067	3	0.1553
V182	0.6400	3	0.1300
V183	0.7467	3	0.1504
V280	0.5267	3	0.1185
V281	0.7100	3	0.0436
V282	0.7767	3	0.0404
V283	0.8067	3	0.0709
V80	0.5267	3	0.1185
V81	0.6133	3	0.1436
V82	0.6467	3	0.2723
V83	0.6767	3	0.2203
TOTAL	0.6503	36	0.1465

ANEXO 38. Resultados de la estabilidad de la voluminosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Almacenamiento a 8ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	1,25	1,2	1,23	1,23
1	1,2	1,26	1,22	1,23
2	1,25	1,23	1,24	1,24
3	1,25	1,2	1,26	1,24

Almacenamiento a 18ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	1,25	1,2	1,23	1,23
1	1,21	1,24	1,26	1,24
2	1,24	1,23	1,24	1,24
3	1,26	1,2	1,25	1,24

Almacenamiento a 28ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	1,25	1,2	1,23	1,23
1	1,22	1,25	1,24	1,24
2	1,2	1,26	1,24	1,23
3	1,25	1,24	1,24	1,24

ANEXO 39. Análisis estadístico de la estabilidad de la voluminosidad del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	0.00112	1.020E-04	0.18	0.9975
WITHIN	24	0.01373	5.722E-04		
TOTAL	35	0.01486			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
V180	1.2267	3	0.0252
V181	1.2367	3	0.0252
V182	1.2367	3	5.774E-03
V183	1.2367	3	0.0321
V280	1.2267	3	0.0252
V281	1.2367	3	0.0153
V282	1.2333	3	0.0306
V283	1.2433	3	5.774E-03
V80	1.2267	3	0.0252
V81	1.2267	3	0.0306
V82	1.2400	3	0.0100
V83	1.2367	3	0.0321
TOTAL	1.2339	36	0.0239

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

ANEXO 40. Resultados de la estabilidad del pH del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Almacenamiento a 8ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	9,06	9,44	9,14	9,21
1	8,86	9,42	8,9	9,06
2	9,32	8,72	8,86	8,97
3	9,21	8,54	8,67	8,81

Almacenamiento a 18ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	9,06	9,44	9,14	9,21
1	9,12	8,82	8,98	8,97
2	8,76	8,71	8,96	8,81
3	8,74	8,52	8,86	8,71

Almacenamiento a 28ºC

Tiempo (meses)	R1	R2	R3	Promedio
0	9,06	9,44	9,14	9,21
1	8,92	8,58	8,67	8,72
2	8,63	8,76	8,64	8,68
3	8,39	8,45	8,67	8,50

ANEXO 41. Análisis estadístico de la estabilidad del pH del prototipo de bioplaguicida mixto bajo condiciones de almacenamiento.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	1.18459	0.13162	2.68	0.0316
WITHIN	20	0.98053	0.04903		
TOTAL	29	2.16512			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
V181	8.9733	3	0.1501
V182	8.8100	3	0.1323
V183	8.7067	3	0.1724
V281	8.7233	3	0.1762
V282	8.6767	3	0.0723
V283	8.5033	3	0.1474
V80	9.2133	3	0.2003
V81	9.0600	3	0.3124
V82	8.9667	3	0.3139
V83	8.8067	3	0.3553
TOTAL	8.8440	30	0.2214

CASES INCLUDED 30 MISSING CASES 0

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY (95%)

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
V80	9.2133	I
V81	9.0600	I I
V181	8.9733	I I
V82	8.9667	I I
V182	8.8100	I I
V83	8.8067	I I
V281	8.7233	I I
V183	8.7067	I I
V282	8.6767	I I
V283	8.5033	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.
CRITICAL Q VALUE 5.007 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.6401
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1808

ANEXO 42. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (Eficacia) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta*

Almacenamiento a 8ºC

Tiempo (meses)	Bioplaguicida Mixto	Formulación en polvo de *T. koningiopsis*
0	85,72	71,43
1.5	85,72	71,43
3	85,72	71,43

Almacenamiento a 18ºC

Tiempo (meses)	Bioplaguicida Mixto	Formulación en polvo de *T. koningiopsis*
0	85,72	71,43
1.5	85,72	71,43
3	85,72	57,15

Almacenamiento a 28ºC

Tiempo (meses)	Bioplaguicida Mixto	Formulación en polvo de *T. koningiopsis*
0	85,72	71,43
1.5	85,72	57,15
3	71,43	57,15

ANEXO 43. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (Peso seco) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones *in planta*

Almacenamiento a 8ºC

Tiempo (meses)	T. patogeno	Bioplaguicida mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
Tiempo 0	0,51	1,2	0,82
Tiempo 1.5	0,72	1,1	0,97
Tiempo 3	0,63	0,94	0,81

Almacenamiento a 18ºC

Tiempo (meses)	T. patogeno	Bioplaguicida mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
Tiempo 0	0,51	1,2	0,82
Tiempo 1.5	0,72	1,5	1,32
Tiempo 3	0,63	1,45	0,95

Almacenamiento a 28ºC

Tiempo (meses)	T. patogeno	Bioplaguicida mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
Tiempo 0	0,51	1,2	0,82
Tiempo 1.5	0,72	1,03	1,01
Tiempo 3	0,63	0,89	0,68

ANEXO 44. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (Eficacia) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento

Almacenamiento a 8ºC

TIEMPO (MESES)	Bioplaguicida Mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
0	80	80
1,5	80	80
3	80	80

Almacenamiento a 18ºC

TIEMPO (MESES)	Bioplaguicida Mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
0	80	80
1,5	80	60
3	60	60

Almacenamientos a 28ºC

TIEMPO (MESES)	Bioplaguicida Mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
0	80	80
1,5	60	60
3	60	40

ANEXO 45. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora (Peso promedio de brotes) del bioplaguicida mixto frente a *R. solani* en condiciones de almacenamiento

Almacenamiento a 8ºC

TIEMPO (meses)	T. Patógeno	Bioplaguicida Mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
0	0,178	1,442	1,432
1,5	0,106	0,71	0,626
3	0,146	1,1	0,584

Almacenamiento a 18ºC

TIEMPO (meses)	T. Patógeno	Bioplaguicida Mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
0	0,178	1,442	1,432
1,5	0,106	0,646	0,732
3	0,146	0,834	0,638

Almacenamiento a 28ºC

TIEMPO (meses)	T. Patógeno	Bioplaguicida Mixto	Formulación a base de *T.koningiopsis*
0	0,178	1,442	1,432
1,5	0,106	0,85	0,602
3	0,146	1,254	0,748

ANEXO 46. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC frente a *T. solanivora*

	Mes 0		Mes 1,5		Mes 3	
	Bioplaguicida mixto	**Baculovirus Corpoica**	**Bioplaguicida mixto**	**Baculovirus Corpoica**	**Bioplaguicida mixto**	**Baculovirus Corpoica**
R1	90	80	100	100	100	100
R2	100	100	89,65	89,65	100	90
R3	80	90	100,00	89,65	90	90
	90,00	90,00	96,55	93,10	96,67	93,33

ANEXO 47. Análisis estadístico de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 8ºC frente a *T. solanivora.*

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	131.143	26.2286	0.47	0.7948
WITHIN	12	676.163	56.3469		
TOTAL	17	807.306			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
T10	90.000	3	10.000
T12	96.550	3	5.9756
T13	96.667	3	5.7735
T20	90.000	3	10.000
T22	93.100	3	5.9756
T23	93.333	3	5.7735
TOTAL	93.275	18	7.5065

CASES INCLUDED 18 MISSING CASES 0

ANEXO 48. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 18ºC frente a *T. solanivora*

	Mes 0		Mes 1,5		Mes 3	
	Bioplaguicida mixto	**Baculovirus Corpoica**	**Bioplaguicida mixto**	**Baculovirus Corpoica**	**Bioplaguicida mixto**	**Baculovirus Corpoica**
R1	90	80	89,66	79,31	90	100
R2	100	100	100,00	100,00	100	80
R3	80	90	100,00	89,66	90	90
	90,00	90,00	96,55	89,66	93,33	90,00

ANEXO 49. Análisis estadístico de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 18ºC frente a *T. solanivora.*

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	116.988	23.3976	0.29	0.9066
WITHIN	12	951.982	79.3318		
TOTAL	17	1068.97			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
T10	90.000	3	10.000
T12	96.553	3	5.9698
T13	93.333	3	5.7735
T20	90.000	3	10.000
T22	89.657	3	10.345
T23	90.000	3	10.000
TOTAL	91.591	18	8.9068

CASES INCLUDED 18 MISSING CASES 0

ANEXO 50. Resultados de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 28ºC frente a *T. solanivora*

	Mes 0		Mes 1,5		Mes 3	
	Bioplaguicida mixto	**Baculovirus Corpoica**	**Bioplaguicida mixto**	**Baculovirus Corpoica**	**Bioplaguicida mixto**	**Baculovirus Corpoica**
R1	90	80	89,65	100,00	100	100
R2	100	100	89,65	79,31	100	90
R3	80	90	100,00	100,00	80	100
	90,00	90,00	93,10	93,10	93,33	96,67

ANEXO 51. Análisis estadístico de la estabilidad de la actividad biocontroladora del bioplaguicida mixto almacenado a 28ºC frente a *T. solanivora*.

Análisis de varianza (ANOVA)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	93.1147	18.6229	0.20	0.9541
WITHIN	12	1090.13	90.8444		
TOTAL	17	1183.25			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
T10	90.000	3	10.000
T12	93.100	3	5.9756
T13	93.333	3	11.547
T20	90.000	3	10.000
T22	93.103	3	11.945
T23	96.667	3	5.7735
TOTAL	92.701	18	9.5312

CASES INCLUDED 18 MISSING CASES 0