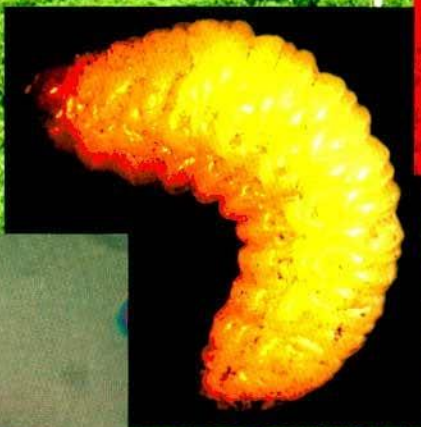


Desarrollo de un Insecticida Microbiano para el Control Biológico del Gusano Blanco de la Papa



22812

Corpoica
Centro de Investigación Agropecuaria



22872

Res, 56635

Desarrollo de un Insecticida Microbiano para el Control Biológico del Gusano Blanco de la Papa



Programa Nacional de Transferencia de Tecnología
PRONATTA

Autores

Investigadores

Lisette Torres Torres, Bióloga¹
Carlos Espinel Correal, Biólogo¹
Laura Villamizar Rivero, Q. F., M. Sc.¹
Martha Isabel Gómez Álvarez, Q. F.
María Victoria Zuluaga Mogollón, I. A.¹
Jacquelin López Gil, Q. F.¹
Alba Marina Cotes Prado, Ph. D.¹
Aristóbulo López Ávila, Ph. D.²

Estudiantes de pregrado

Carolina Valencia, Microbióloga Industrial
Magda García, Microbióloga Industrial

Auxiliares de Técnico

Jesús Gómez Benavides
Juan Alberto Arias
Gabriela Perdomo

Compilador:

Carlos Espinel Correal

ISBN 958-8210-61-5

Boletín Técnico

2 0 0 4

¹ Laboratorio de Control Biológico. Programa de Manejo Integrado de Plagas. C. I. Tibaitatá, K. 14 vía Mosquera (Cundinamarca). A. A. 240142. Las Palmas, Parque Central Bavaria, Bogotá.

² Laboratorio de Entomología. Programa de Manejo Integrado de Plagas. C. I. Tibaitatá, K. 14, vía Mosquera (Cundinamarca). A. A. 240142. Las Palmas, Parque Central Bavaria, Bogotá.

CONTENIDO

Introducción	7
Agradecimientos	11
1. Historia y Problemática del Gusano Blanco de la Papa en Colombia	13
1.1. Historia	13
1.2. Problemática	14
1.3. Daño	16
1.4. Alternativas de control	18
1.5. Control biológico	18
2. Control Biológico del Gusano Blanco de la Papa	19
2.1. Antecedentes	19
2.2. Generalidades y ecología del hongo <i>Beauveria</i> sp.	21
2.2.1. Morfología y mecanismo de acción de <i>Beauveria</i> sp.	21
2.2.2. Aspectos ecológicos de <i>Beauveria</i> sp.	23
3. Desarrollo Tecnológico de un Insecticida Microbiano	25
3.1. Colección de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos	25
3.2. Evaluación de la virulencia de las cepas nativas	26
3.3. Efecto de los pases sucesivos sobre las características microbiológicas y la virulencia de <i>B. bassiana</i>	32
3.4. Producción masiva del hongo <i>B. bassiana</i>	35
3.5. Formulación del insecticida microbiano	39
3.6. Determinación de las características físicas de los granulados	40
3.7. Compatibilidad de <i>B. bassiana</i> con insumos agrícolas utilizados en el cultivo de la papa	45
3.8. Determinación de la eficacia de los granulados bajo condiciones de casa de malla	50
3.9. Determinación de la estabilidad del granulado bajo condiciones de almacenamiento	51
4. Determinación de Dosis y Frecuencias de Aplicación de los Preformulados a Base de <i>B. bassiana</i> en Campo	53
4.1. Determinación de las dosis de aplicación los preformulados a base de <i>B. bassiana</i> en campo	53
4.2. Determinación de las frecuencias de aplicación de los preformulados a base de <i>B. bassiana</i> en campo	58
5. Recomendaciones y Perspectivas	67
6. Referencias Bibliográficas	71

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	A. Daño ocasionado por larvas de <i>P. vorax</i> en tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> . B. Larva de <i>P. vorax</i>	16
Fig. 2.	A. Características microscópicas de <i>Beauveria bassiana</i> B. Características macroscópicas de una colonia de <i>Beauveria bassiana</i>	21
Fig. 3.	Efecto biocontrolador de los aislamientos nativos aplicados a una concentración de 1×10^8 conidios.ml ⁻¹ sobre adultos de <i>P. vorax</i>	27
Fig. 4.	Efecto de las diferentes concentraciones de los aislamientos seleccionados sobre adultos de <i>P. vorax</i>	29
Fig. 5.	Eficacia biocontroladora obtenida al evaluar de forma combinada los aislamientos Bv025 y Mt.L1 de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> , sobre adultos de <i>P. vorax</i>	31
Fig. 6.	A. Adulto de <i>P. vorax</i> sano. B. Adulto de <i>P. vorax</i> infectado con el aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i>	32
Fig. 7.	Efecto de los subcultivos sucesivos de <i>B. bassiana</i> en su virulencia sobre el gusano blanco de la papa (PM: Medio de producción masiva a base de avena: SS: Medio semisintético)	34
Fig. 8.	Tasa de crecimiento de <i>B. bassiana</i> , Bv025 sometida a 4, 5, 6, 9, 12 y 15 subcultivos en agar PSA	35
Fig. 9.	Etapas de preformulación y formulación de insecticidas microbianos ...	36
Fig. 10.	Granulado no dispersable a base de <i>B. bassiana</i>	40
Fig. 11.	Efecto de los fungicidas en la germinación de <i>Beauveria bassiana</i> a las 96 horas de incubación	47
Fig. 12.	Efecto de los insecticidas en la germinación de <i>Beauveria bassiana</i> a las 96 horas de incubación	48
Fig. 13.	Compatibilidad <i>in vitro</i> de <i>Beauveria bassiana</i> con fertilizantes	49
Fig. 14.	Porcentaje de mortalidad acumulada de los tratamientos sobre adultos de <i>P. vorax</i> en condiciones de casa de malla	50
Fig. 15.	Estabilidad del granulado GR1 bajo condiciones de almacenamiento a tres temperaturas durante 24 meses	52
Fig. 16.	Producción promedio por parcela de tubérculos en los tratamientos del bioensayo preliminar en campo	55

Fig. 17. Comparación entre la equivalencia de la producción de tubérculos en las parcelas del bioensayo y la producción teórica en una hectárea de papa variedad Diacol-Capiro.	55
Fig. 18. Porcentaje de protección de tubérculos obtenidos en la evaluación de preformulados a base de <i>B. bassiana</i>	57
Fig. 19. Prototipos de insecticidas microbianos evaluados en campo. A. Granulado dispersable; B. Concentrado emulsionable (suspensión oleosa); C. Granulado no dispersable.	58
Fig. 20. Aplicación de los productos a base de <i>B. bassiana</i> . A. Concentrado emulsionable; B. Granulado no dispersable.	61
Fig. 21. Capturas semanales de <i>P. vorax</i> , <i>T. solanivora</i> y <i>P. operculella</i> en la finca del municipio de Chocontá.	63
Fig. 22. Capturas semanales de adultos de gusano blanco (<i>P. vorax</i>), <i>T. solanivora</i> y <i>P. operculella</i> , en la finca del municipio de Zipaquirá ...	64
Fig. 23. Porcentaje de daño causado por el gusano blanco de la papa en las parcelas experimentales ubicadas en Chocontá y Zipaquirá, Cundinamarca	65
Fig. 24. Porcentaje de protección de <i>B. bassiana</i> contra el gusano blanco de la papa. Parcelas Experimentales de Chocontá y Zipaquirá.	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas nativas de <i>Beauveria</i> spp. y de <i>Metarhizium anisopliae</i> provenientes de los muestreos realizados en los municipios de Motavita, Chocontá y Mosquera	26
Tabla 2. Concentraciones letales media (CL ₅₀) y 90 (CL ₉₀) para los aislamientos Bv025 de <i>Beauveria bassiana</i> y Mt.L1 de <i>Metarhizium anisopliae</i> evaluados sobre adultos de <i>Premnotrypes vorax</i>	29
Tabla 3. Efecto de varios medios de cultivo líquidos, semisólidos y de dos condiciones de luminosidad sobre el crecimiento de <i>B. bassiana</i>	38
Tabla 4. Porcentaje de peso retenido por cada tamiz en la prueba de gravimetría	41
Tabla 5. Características físicas de granulados	45
Tabla 6. Resumen de la compatibilidad de la cepa Bv025 de <i>Beauveria bassiana</i> con agroquímicos utilizados en el cultivo de la papa	49
Tabla 7. Descripción y distribución de los tratamientos en las parcelas establecidas en los dos municipios	60

Introducción³

La principal preocupación en los consumidores respecto al consumo de alimentos sanos, está relacionada con los residuos de plaguicidas presentes en estos. En consecuencia el manejo integrado de plagas es un área primordial para el desarrollo sostenible en la agricultura.

El manejo integrado de plagas (MIP) es visto como la principal vía para alcanzar producción sostenible en la producción agrícola. Su rápido desarrollo se debe principalmente a: (1) las limitaciones en la efectividad a largo plazo de los insecticidas químicos sintéticos (2) la preocupación sobre los efectos negativos que estos causan sobre la salud y el medio-ambiente.

El principal enfoque del MIP es el de mantener las plagas por debajo de niveles que causan daño económico. Pero para que esto ocurra es necesario: (1) disponer de diferentes componentes que puedan ser incorporados a esta estrategia; (2) adaptar las herramientas disponibles a las condiciones agroecológicas locales; y (3) disponer de información sobre las plagas, sus depredadores, los factores medio-ambientales y sus interacciones para determinar los factores que influyen el daño en el cultivo (Copping y Menn, 2000).

El control biológico constituye uno de los componentes más importantes en el MIP. Éste incluye el uso de enemigos naturales tales como parasi-

³ Alba Marina Cotes, Ph. D.

toides, depredadores y microorganismos para el control de insectos y de fitopatógenos. Algunas intervenciones ambientalmente amigables tales como el uso de semioquímicos que incluyen feromonas atrayentes también se contemplan dentro del control biológico (Schillhorn-Van Veen et al., 1997).

El mercado mundial de bioplaguicidas (insecticidas microbianos) representa alrededor del 1% del total del mercado total de plaguicidas. El bajo nivel de utilización de insecticidas microbianos puede atribuirse a varios factores, tales como las inadecuadas formulaciones comúnmente desarrolladas, la inconsistencia de los resultados obtenidos en campo, la corta vida útil de estos, su falta de competitividad económica en relación con los plaguicidas químicos y su alta especificidad, ya que en general los productos biológicos controlan un limitado número de plagas. Sin embargo, estos productos también presentan ventajas tales como su baja toxicidad sobre mamíferos y organismos no blanco y su relativa facilidad para registro. Cabe destacar que aunque la especificidad y baja persistencia en el ambiente de estos productos se muestran como desventajas desde el punto de vista práctico, las características mencionadas anteriormente representan ventajas desde el punto de vista medio-ambiental.

A pesar de estas circunstancias, en los últimos años se ha producido una gran aceptación de estos productos tanto por los agricultores que producen alimentos orgánicos como de aquellos convencionales, ya que en sistemas agrícolas convencionales, la alternancia de bioplaguicidas con plaguicidas químicos permite prevenir o retardar el desarrollo de resistencia por parte de las plagas a insecticidas químicos.

Los bioplaguicidas representan una oportunidad única para los países en vía de desarrollo como Colombia, ya que a través del desarrollo de nuevos productos derivados de la biodiversidad se exploran y utilizan los recursos naturales, ayudando además al desarrollo de una agricultura sostenible que garantice la protección del medio-ambiente, así como la protección de los consumidores y de los agricultores. Sin embargo, el desarrollo de estos productos debe hacerse bajo estrictos parámetros de seguridad, para garantizar que los microorganismos utilizados o sus metabolitos no generen riesgos para el medio-ambiente.

Dentro de los productos biológicos para el control de insectos del suelo se encuentran los constituidos por microorganismos. El control biológico mediante la adición de microorganismos biocontroladores al suelo representa una alternativa para el control de estos. Sin embargo, para que este control sea efectivo se requiere de grandes cantidades de inóculo; además, este control depende de varios factores tales como la temperatura, el pH, las condiciones fisicoquímicas del suelo, el tipo de inóculo usado (en el caso de hongos: micelio, conidios, clamidosporas), la densidad de inóculo del biocontrolador y el tiempo de introducción del microorganismo al suelo en relación con el tiempo de siembra.

Aunque en Colombia desde hace más de dos décadas se ha incurrido en el control biológico de insectos, son pocos los ejemplos en los cuales se ha profundizado en la generación de conocimientos científicos, en el desarrollo de tecnologías propias para el uso de esta alternativa y en su utilización a gran escala.

Es importante anotar que a pesar del escaso número de insecticidas microbianos registrados ante el ICA presentes en el mercado, empieza a ser creciente la oferta de bioplaguicidas no registrados, que en la mayoría de casos, no llenan los requisitos de calidad exigidos y cuya supuesta actividad biológica no está respaldada por resultados experimentales serios y representativos. Estos productos en general, no ofrecen el control esperado, generando en los agricultores desconfianza sobre la efectividad de todos los productos biológicos.

En la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA se han generado varios modelos de control biológico de plagas (insectos y fitopatógenos) mediante el uso de microorganismos en cultivos tales como tomate, fríjol, cebolla, lechuga, cilantro y papa. Para este último cultivo se desarrolló un insecticida microbiano a base de *Baculovirus phthorimaea* para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*; también se desarrollaron prototipos de insecticidas microbianos a base de *Beauveria bassiana* para el control del gusano blanco de la papa, tema que es objeto del presente documento. Sin embargo, en los sistemas de producción de papa aún no se han implementado comercialmente medidas de control biológico a base de microorganismos. Según lo expresan los

productores, las principales razones que no han permitido el ingreso de este tipo de tecnologías en estos sistemas de producción es la falta de disponibilidad de estos productos en el mercado, la aversión al riesgo y la sobre-utilización de plaguicidas químicos, que en la mayoría de los casos presentan incompatibilidad con los biocontroladores.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agrícola PRONATTA, por su apoyo financiero en la realización del presente trabajo.

De igual manera agradecemos al personal directivo y administrativo del Centro de Investigación Tibaitatá - Corpoica, por su apoyo durante el transcurso del trabajo.

Al personal del Programa de Manejo Integrado de Plagas, por su compañerismo y aportes permanentes que realizaron para enriquecer los resultados de este trabajo.

A los estudiantes participantes en la investigación, cuyos aportes, interés y dinamismo, contribuyeron al cumplimiento de los objetivos propuestos.

Por último, a las familias Bojacá y Gordillo, de los municipios de Chocotá y Villapinzón, respectivamente, y demás agricultores de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, por su hospitalidad, su apoyo y por la información de campo la cual fue de gran valor para la ejecución del trabajo.

1. Historia y problemática del gusano blanco de la papa en Colombia⁴

1.1. Historia

Comúnmente la especie *Premnotrypes vorax* (Hustache), es conocida con el nombre de “gusano blanco de la papa” por sus características morfológicas en estado larval, o “gorgojo de los Andes”, por su ubicación en las partes altas de los países que constituyen la zona Andina (Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela) (Torres *et al.*, 1993). En estos países también recibe los nombres de gorgojo de la papa, Ichu-kuro, Papa kuro y Gorgulho da batata (EPPO, 1984).

En Colombia el insecto se conoce desde 1920, cuando posiblemente ingresó de países del sur, en importaciones de semilla. Fue registrado en forma oficial por primera vez en 1925, en la Sabana de Bogotá, municipios de Funza, Mosquera, Cajicá y Chía. Posteriormente, su distribución se amplió a lo largo de la línea del ferrocarril involucrando principalmente a los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Nariño, mediante el cual se transportaba la semilla de papa a diferentes zonas del país, se seleccionaba durante el viaje y la semilla dañada por este insecto se arrojaba al camino. En 1932 se estableció el decreto presidencial 1414 de agosto 25, en el cual se ordenó no sembrar en lotes infestados, hacer rotación del

⁴ Lissette Torres Torres, B. Sc.; Carlos Espinel Correal, B. Sc.

cultivo, realizar tratamientos químicos y aplicar multas a quienes no denunciaron la presencia del insecto (Alvarado, 2000).

En 1940 se hizo el primer estudio biológico sobre el ciclo de vida de este insecto en laboratorio. Para el año 1946 aún no existía una identificación taxonómica del gusano blanco y ya se encontraba bien distribuido en varias zonas paperas (Alvarado, 2000; Zenner, 1986).

En 1968, Zenner y Posada llevaron a cabo la descripción de los estados de desarrollo de este insecto. En la década del 70 se continuaron los estudios y se dieron las primeras recomendaciones para su control (Alvarado, 2000).

El manejo tradicional del gusano blanco de la papa en Colombia durante las últimas cuatro décadas del siglo XX, ha consistido principalmente en el uso de insecticidas químicos, y la evaluación se realiza en cosecha, acarreado costos desde 2 a 6 millones de dólares. La investigación para su control se dedicó principalmente a evaluar productos y dosis en las aplicaciones calendario tradicionales como siembra, desyerba, aporque y floración, y esporádicamente la evaluación con agentes biológicos e inhibidores de síntesis de quitina (Alvarado, 2000).

1.2. Problemática

La producción de papa en Colombia entre los años 1961 y 2002, presentó una tasa de crecimiento anual promedio de 4,3%, de esta forma la producción pasó de 551.000 toneladas en 1961 a 2.840.926 toneladas en el 2002. El mayor nivel de producción en los últimos 42 años se presentó en el año 2000, cuando se produjeron 2.964.144 toneladas (Agrocadenas, 2003).

En el año 2001 el cultivo de la papa en Colombia ocupó el cuarto lugar en la producción agropecuaria nacional, con 2.87 millones de toneladas, fue el noveno cultivo en extensión con 172.439 Ha y el sexto en valor de la producción. En los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia se concentra en promedio el 89% del área y el 90% de la producción. El porcentaje restante se encuentra en los Santanderes, Tolima, Cauca, Caldas y Valle del Cauca (Agrocadenas, 2003).

Los mayores rendimientos se obtienen en Cundinamarca y Antioquia, siendo estos superiores a 21 toneladas por hectárea. Boyacá presenta uno de los rendimientos más bajos, con 16 toneladas por hectárea (Agrocadenas, 2003).

El cultivo de la papa se ha convertido en la principal actividad agrícola de las zonas andinas en Colombia. La gran cantidad de productores dedicados a su explotación en todo el país (cerca de 90.000 familias), la magnitud de la superficie dedicada a este cultivo, la mayor generación de empleos directos a nivel rural (100.000 empleos anuales), el papel como fundamental generador de ingresos agrícolas familiares y la condición de ser el precursor de la mayoría de los sistemas de producción de clima frío, la incidencia positiva en el crecimiento de la agroindustria nacional (productos procesados de papa, almidones, perfumes, medicamentos adelgazantes) y el creciente impacto esperado en la generación de divisas, son sólo algunos de los factores que califican a este tubérculo dentro de los primeros en la actividad agroeconómica nacional (Quijano, 1996; Agrocadenas, 2003).

En 1990 el costo de producción de una hectárea de papa fue de 5,5 millones de pesos y en el año 2000 alcanzó los 7,7 millones de pesos. En el 2002 se cultivaron 164.293 hectáreas, con unos costos de producción de 393.181 millones de pesos. El incremento en los costos totales de producción se explica principalmente por el aumento en los insumos agrícolas usados en el control fitosanitario debido a la alta incidencia de enfermedades y plagas. Dentro de estas últimas, el gusano blanco de la papa es considerado como uno de los factores limitantes en la producción en Colombia (Agrocadenas, 2003; Mendoza, 1996).

Según estudios realizados por Zenner (1986), se encontró que más del 75% de las áreas productoras de este tubérculo, estaban infestadas por el insecto y las pérdidas causadas por las larvas a los tubérculos alcanzaban hasta un 100%, porcentaje que concuerda con las pérdidas ocasionadas por el gusano blanco y por otras plagas en zonas endémicas en campo y almacenamiento, según estudios realizados por Mendoza (1996) y corroborados por FEDEPAPA en 1997 (Herrera 1997).

En un estudio que buscaba determinar la importancia relativa de las plagas que infestan la papa, el 91,5% de los agricultores entrevistados coincidieron en señalar al gusano blanco como la principal plaga insectil (Herrera, 1997).

1.3. Daño

Aunque el insecto en estado adulto se alimenta del follaje de la planta, este daño carece de importancia económica, ya que el principal es ocasionado por el estado larval.

Las larvas recién emergidas llegan fácilmente a los estolones y raicillas de la planta y luego a los tubérculos en formación. El orificio de entrada y el daño inicial se manifiesta tenuemente por pequeños puntos negros. A medida que la larva crece y se alimenta de la pulpa va construyendo galerías sinuosas que pueden alcanzar una profundidad de tres a cuatro centímetros y en algunas ocasiones pueden atravesar el tubérculo. Las galerías producidas por las larvas dan un aspecto desagradable principalmente por la presencia de excrementos, por la suberización de los tejidos afectados (es decir, una apariencia abultada del tejido, como el corcho) y la posterior pudrición de las partes afectadas (Calvache, 1980; Herrera, 1997) (Figura 1).

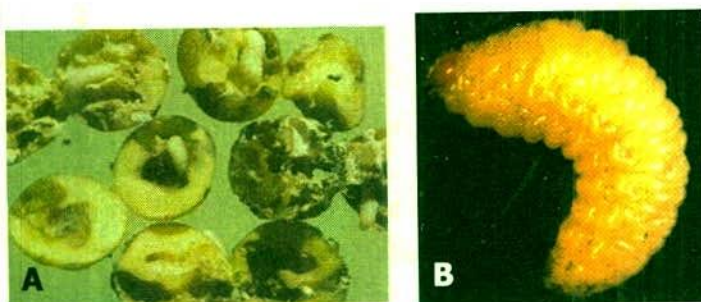


Figura 1. A. Daño ocasionado por larvas de *P. vorax* en tubérculos de *Solanum tuberosum*; B. Larva de *P. vorax*.

Fotografías: Aristóbulo López-Ávila y Carlos Espinel Correal.

1.4. Alternativas de control

El manejo de una plaga tan compleja no se puede limitar a una o dos estrategias, sino que requiere de una comprensión mayor de las interac-

ciones que están actuando en el agroecosistema. Esta visión se logra al incluir la filosofía del Manejo Integrado de Plagas, debido a que reúne los conceptos de agroecosistema, el control natural, la biología y ecología de los organismos, el muestreo y el uso de niveles críticos de infestación para toma de decisiones y la integración de diversas disciplinas.

Infortunadamente, muchas veces el agricultor se remite al uso indiscriminado del control químico tradicional, en el cual se aplican plaguicidas como carbamatos, piretroides, clorados y fosforados, debido a que existe la disponibilidad en el mercado, generando problemas de contaminación ambiental, salud pública y de disminución de la población de los enemigos naturales de la plaga hasta niveles en que éstos no pueden ejercer ningún control.

Es así como se plantea el uso de otras alternativas de control como la manipulación o aumento de enemigos naturales, el uso de agentes microbiológicos, la resistencia genética, el uso de técnicas etológicas, el uso racional de plaguicidas, la implementación de prácticas culturales y físicas y el control legal.

Para el manejo del gusano blanco de la papa se han establecido varias prácticas de manejo dirigidas al lote y a la poscosecha. Estas comprenden, la rotación de cultivos, es decir no sembrar papa en un mismo lote varias veces seguidas, también se puede dejar el terreno en barbecho; la recolección de los residuos de cosecha eliminando completamente los residuos de la cosecha anterior; hacer una buena selección de semilla sana, que además aumenta el rendimiento del cultivo; llevar a cabo un aporque adecuado, hacer una vigilancia sobre la presencia de adultos de *P. vorax*, mediante la recolección nocturna de individuos o la ubicación de trampas de costal envenenadas en la periferia y el interior del lote y por último hacer una cosecha oportuna cuando el tubérculo esté en su madurez fisiológica (Herrera, 1997).

En cuanto al manejo de poscosecha se recomienda que en el momento de hacer la selección de la semilla se haga sobre un plástico o costales de polipropileno, de este modo, las posibles larvas que salgan de los tubérculos se quedan en la superficie del plástico y se evita que se entierren. El almacenamiento de la semilla sana es vital importancia, además de la for-

ma de almacenarla, como el uso de silos rústicos y canastillas que permita la aireación del tubérculo.

El Centro Internacional de la Papa (CIP) menciona otras recomendaciones para el manejo integrado del gorgojo de los Andes en el Perú, tales como el uso de cultivos barrera sembrando alrededor del cultivo de papa unos surcos de oca, mashua (Izaño) y olluco. También recomiendan fumigar las plantas de hasta cinco surcos de los bordes del lote en cuanto se comience a evidenciar el daño por el insecto. De igual forma, el CIP recomienda remover el suelo en donde seleccionó la semilla y el del sitio del almacenamiento (CIP, 1995). Con la aplicación de estas medidas se logró una disminución de la infestación de tubérculos del 44% al 11% en una unidad piloto de Urubamba (Cuzco- Perú) (Medina *et al.*, 1999).

1.5. Control biológico

Dentro de las alternativas de manejo del gusano blanco de la papa existe el control biológico mediante el uso de microorganismos entomopatógenos incorporados al suelo en la preparación del terreno o durante alguna labor del cultivo.

Se han encontrado microorganismos entomopatógenos ejerciendo una eficiente actividad biocontroladora en sus diferentes estados. Se destacan los hongos Ascomycetes como *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) Brown & Smith, *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin, *M. anisopliae var. major* (Jonston), *Beauveria brongniartii* y *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vullemin. (Rodríguez, 1986).

2. Control biológico del gusano blanco de la papa⁵

2.1. Antecedentes

Como se mencionó anteriormente, la forma de control del gusano blanco más razonable es la combinación de estrategias dentro de un manejo integrado de la plaga. Una de estas estrategias es el control biológico, el cual pretende dar solución a las debilidades de los demás métodos de control dentro de una perspectiva ecológica. El uso de enemigos naturales ha contribuido de manera representativa en mantener reguladas las poblaciones de la plaga, debido a que al encontrarse establecidos en el medio, actúan de manera natural sobre sus hospederos (López-Ávila, 1996).

Específicamente para el gusano blanco se ha encontrado una serie de organismos entomopatógenos ejerciendo una eficiente actividad biocontroladora en sus diferentes estados de desarrollo. Así lo revelan los resultados obtenidos por muchos investigadores, entre ellos Rodríguez (1986), en su estudio de reconocimiento de microorganismos entomopatógenos que afectan al gusano blanco.

Por otra parte, el Centro Internacional de la papa, en el Perú, ha encontrado resultados satisfactorios en el control de larvas y pupas bajo condiciones de almacén tradicional, gracias a la eficiencia de *Beauveria brongniartii*, la cual no solo ocasionó un porcentaje de mortalidad de

⁵ Lissette Torres Torres, B. Sc.; Carlos Espinel Correal, B. Sc.

99%, sino que además se estableció en el suelo como consecuencia de su aplicación. De esta manera, el establecimiento del hongo en el suelo unido a las larvas y pupas parasitadas constituye un benéfico reservorio del inóculo (Torres *et al.*, 1993).

Según estudios realizados por Torres (1996), se obtuvo un porcentaje de mortalidad de adultos tratados con diferentes cepas de *Beauveria bassiana* a una concentración de 1×10^9 conidios mL^{-1} , entre el 97.5% y el 100% a los 21 días después de aplicados los tratamientos.

En estudios realizados en Venezuela por Fernández y Colmenares (1996) se encontró que el porcentaje de daño en tubérculos de *Solanum tuberosum* L., fue menor cuando un aislamiento de *Beauveria brongniartii* se evaluó bajo condiciones de campo, en comparación con el testigo, siendo estos porcentajes del 25.11 % y del 39.88 %, respectivamente.

Cisneros y Vera (2000), evaluaron diferentes dosis de aplicación de *Beauveria brongniartii* para el control de larvas de *P. vorax* bajo condiciones de almacenamiento rústico de papa, en la población de Cajamarca (Perú). La mejor dosis fue de $2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, la cual produjo una mortalidad que varió entre el 63 y el 92%.

En el 2001, Rivera y Pinto evaluaron la patogenicidad de 11 aislamientos de *Beauveria bassiana* y dos de *Metarhizium anisopliae* provenientes de diferentes hospederos obtenidos en áreas naturales y en bodegas de papa, en Colombia. Esta patogenicidad se evaluó sobre adultos de *P. vorax*, bajo condiciones de laboratorio. Se seleccionó un aislamiento de *B. bassiana* proveniente del estado larval de este insecto, el cual produjo el 100% de mortalidad, un tiempo letal 50 de 7.9 días y una concentración letal 50 de 7.03×10^4 conidios. mL^{-1} .

Posteriormente, Gallegos *et al.*, (2002) evaluaron 13 aislamientos de *Beauveria sp.* y cinco de *Metarhizium anisopliae* colectados de diferentes localidades de Ecuador sobre adultos de *P. vorax*. Sobresalió un aislamiento nativo de *Beauveria sp.* el cual ocasionó el 100% de mortalidad al día 10, con un tiempo letal medio de 6.6 días.

Todos estos resultados indican que el uso de hongos entomopatógenos, específicamente de *Beauveria spp.* es promisorio para el desarrollo

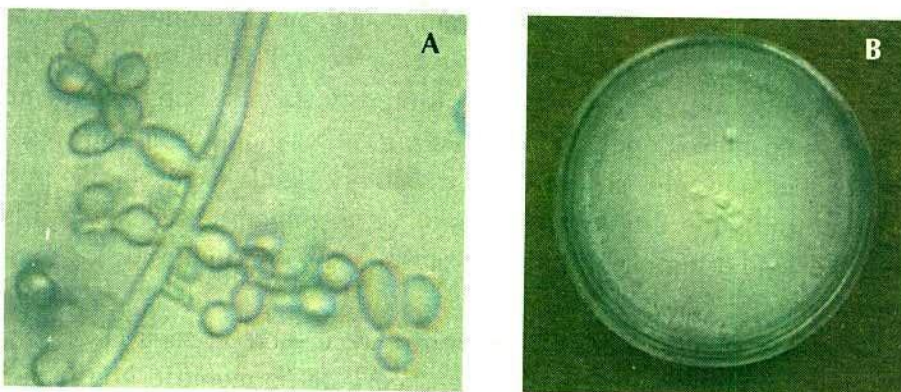
tecnológico de insecticidas microbianos eficientes para la reducción significativa del daño ocasionado por la plaga.

2.2. Generalidades y ecología del hongo *Beauveria* sp.

2.2.1. Morfología y mecanismo de acción de *Beauveria* sp.

Beauveria bassiana es un microorganismo patógeno para muchos tipos de insectos, su patogenicidad fue demostrada por primera vez por Agostino Bassi de Lodi en 1835, el precursor de los estudios de las enfermedades infecciosas en los animales. *Beauveria* sp. la describió Jean Beauverie en 1911, quien le denominó *Botrytis bassiana* (Mathias, 2001).

Las especies de *Beauveria* presentan una fase asimilativa típicamente filamentosa y no forma pseudoplasmodio, su micelio es de color blanco, forma conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies son hinchados en la base y se adelgazan hacia la porción que sostiene el conidio, los cuales presentan forma de zig-zag después de que varios conidios se producen. Los conidios son unicelulares, hialinos, redondeados a ovoides y nacen en pequeños esterigmas (Domsch et al., 1980) (Figura 2).



**Figura 2. A. Características microscópicas de *Beauveria bassiana*.
B. Características macroscópicas de una colonia de *Beauveria bassiana*.**

Fotografías: Lissette Torres y Magda García.

El crecimiento de *Beauveria bassiana* se caracteriza por la formación de micelio septado con producción de conidios de aproximadamente 2 a 3 micras de diámetro, en conidióforos que nacen a partir de hifas ramificadas.

La forma y tamaño de los conidios permiten distinguir las especies del género *Beauveria*; *Beauveria bassiana* de conidios esféricos y *Beauveria brongniartii* con conidios elípticos (Domsch *et al.*, 1980).

El mecanismo de acción de *B. bassiana* sobre el insecto blanco se inicia cuando éste se infecta al transitar sobre lugares colonizados por el hongo, que es un habitante del suelo. El hongo ataca al insecto a través de la cutícula, lugar donde germinan las esporas del hongo y se produce una hifa invasora que penetra los tejidos del hospedero. Estudios ultraestructurales e histoquímicos sugieren que en el proceso inicial de degradación de la cutícula actúan una serie de enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, en *B. bassiana* se han encontrado varias proteasas entre las cuales está la quimioelastasa (PR1), proteasa extracelular relacionada estrechamente con la patogenicidad y cuya máxima actividad catalítica se presenta a un pH entre 6.6 y 8.5 (Bidochka y Khachatourians, 1990).

El compuesto tóxico más estudiado ha sido el péptido Beauvericina, aislado de *B. bassiana*, este compuesto es una secuencia cíclica repetida de tres moléculas de N-metil-fenilalanina alternando con tres moléculas del ácido 2-hidroxiisovalérico, la toxina tiene efecto sobre larvas de mosquito, adultos de moscas caseras, crustáceos y bacterias, aparentemente es inocua para lepidópteros (Miller *et al.*, 1983). El modo de acción presumiblemente envuelve la característica ionofórica de la molécula que permite el transporte catiónico a través de las membranas celulares, con la especificidad de los cationes, siendo alterada con los cambios de los aniones presentes (Roberts 1981).

Una vez muerto el insecto, el hongo crece sobre el cadáver presentándose un color blanquecino característico. Posteriormente, el hongo pasa de su fase parasítica a la saprofítica, en la cual se producen gran cantidad de conidios capaces de iniciar nuevas infecciones (Torres *et al.*, 1993).

2.2.2. Aspectos ecológicos de *Beauveria* sp.

El género *Beauveria* y más exactamente sus especies entomopatógenas se consideran cosmopolitas, *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii*, han sido registradas en Norteamérica y en las islas británicas, lugares en los cuales se ha recopilado la lista más grande de hospederos. También han sido encontradas en el resto de América, Europa, Turquía, África, Las Bahamas, Nepal, Siberia, Nueva Zelanda, Japón, Hong Kong y Grecia. Se ha encontrado en suelos alpinos cubiertos de nieve, zonas pantanosas, suelos con vegetación típica de sabana, bosques y suelos cultivados, dunas y suelos desérticos. También ha sido aislado a partir de plantas, roedores, y de nidos de diferentes aves (Domsch *et al.*, 1980).

En Colombia este microorganismo se ha aislado a partir de insectos y suelo provenientes de diferentes regiones que incluyen entre otras, las zonas productoras de caña de azúcar (González, *et al.*, 1993), las zonas productoras de papa (Torres, 1996; Torres, 1998), áreas de la selva amazónica (Cabrera, 2000) y a partir de diferentes insectos plaga recolectados en los departamentos de Nariño, Magdalena, Antioquia, Risaralda, Valle del Cauca, Santander, Huila, Quindío y Caldas (Vélez *et al.*, 2001).

A pesar de su alta distribución, la actividad biocontroladora del género depende de su habilidad para sobrevivir y mantener su capacidad infectiva contra el insecto plaga por un tiempo relativamente largo y bajo un alto rango de condiciones tanto biológicas como físicas (Grodén y Lockwood, 1991). Dentro de las primeras se destaca la actividad antagonista ejercida sobre hongos entomopatógenos por algunas bacterias y hongos, afectando propágulos (Lingg y Donaldson, 1981).

Dentro de los factores físicos que afectan la viabilidad de los entomopatógenos en el suelo sobresalen el pH, la temperatura, la humedad, la disponibilidad de materia orgánica, la presencia de inhibidores volátiles, entre los cuales se encuentran el amonio, la metilamina y la etilamina, la presencia de monómeros de lignina, y algunos procesos de autólisis (Smith y Grula, 1985).

B. bassiana y *B. brongniartii*, tienen un rango de hospederos de 200 especies de insectos incluyendo los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Dip-

tera, Hemiptera, Orthoptera, Homoptera y otros insectos de zonas tropicales (Doberski, 1981).

En Colombia *B. bassiana* ha sido utilizada contra diferentes insectos, tal es el caso del cacaotero en que se ha evaluado contra ninfas y adultos de *Monalonia dissimulatus* (Hemiptera: Miridae). En plantaciones de banano en granada (Meta), se presentó una epizootia en poblaciones de *Matamasius hemipterus sericeous* (Coleoptera: Curculionidae), donde el hongo solo logró recuperar el equilibrio de la población de este curculiónido. Este microorganismo es un regulador de plagas de la palma africana de los Llanos Orientales, en donde ejerce control hasta del 100% de los insectos masticadores. En 1983 fue usado con excelentes resultados en el control del defoliador de la palma *Stenoma cecropia* (Lepidoptera: Stenomidae) (Guerra y Bernal, 1985). A partir de 1986 se registró nuevamente en *Brassolis sophorae lurida* (Lepidoptera: Brassolidae) en las plantaciones de palma en Cumaral (Meta) (ICA, 1986). Igualmente se tiene el registro de este hongo actuando sobre *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: Acrididae) (León y Rey, 1995), y en *Sibine* sp. y *Sibine fuisca* (Lepidoptera: Limacodidae) en el Meta, causando el 80% de mortalidad natural (ICA 1986).

Por otra parte, también se han realizado diversos estudios relacionados con el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en los cuales se ha evaluado la patogenicidad de diferentes aislamientos de *B. bassiana*. Los resultados obtenidos por Jiménez (1992) revelaron un control del 50% de adultos de la plaga en menos de 120 horas. También se ha encontrado una inhibición del brocado por adultos de la plaga al ser tratados con una concentración de 1×10^7 conidios.ml⁻¹ debido a que presentaron una menor actividad, pérdida de las patas y de las antenas (González et al., 1993).

El género *Beauveria* también se ha encontrado parasitando larvas de *Leptinotarsa undecemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) en cultivos de lulo, larvas de los lepidopteros *Glena bisulca* (Geometridae) en ciprés en Caldas; larvas de *Diatraea* sp. (Pyralidae) en cultivos de algodón en Bucaramanga y larvas y pupas de *Pnoquia* sp. (Hesperiidae) también en algodón, maíz y caña en el Norte de Santander (Rodríguez, 1984).

3. Desarrollo tecnológico de un insecticida microbiano⁶

3.1. Colección de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos

El primer paso para el desarrollo de un insecticida microbiano es la colección de aislamientos nativos de los hongos entomopatógenos que estén afectando al insecto en el campo. De este modo, se determinaron los lugares de muestreo del insecto, centrándose en los sitios de almacenamiento y áreas cultivadas con papa que presentaran un historial de alta incidencia de la plaga. Se trabajó en varias veredas de los municipios de Motavita (Boyacá), Mosquera y Chocontá (Cundinamarca). El aislamiento de las cepas nativas se hizo a partir de insectos muertos de *P. vorax* en diferentes instares, que se encontraron sobre la superficie del suelo o en una profundidad de hasta 25 cm.

También se colectaron muestras de suelo para la obtención de los mismos. Éstos se colocaron en cámara húmeda hasta observar algún crecimiento micelial. Posteriormente, se realizó el aislamiento del hongo en el medio de cultivo Rosa de Bengala; paralelamente se hicieron cultivos en Agar agua, con el fin de identificar el hongo mediante la observación de las características microscópicas y el seguimiento de claves taxonómicas (Torres, 1998).

⁶ Lissette Torres Torres, B. Sc.; Laura Villamizar, Q. F., M. Sc.; Jacquelin López, Q. F.; Carlos Espinel Correal, B. Sc.; Martha Gómez, Q. F.; María Victoria Zuluaga, I. A.; Carolina Valencia, Microbióloga Industrial; Magda García, Microbióloga Industrial; Alba Marina Cotes, Ph.D.; Aristóbulo López Ávila, Ph. D.

Las cepas aisladas e identificadas a nivel de especie provenientes de los sitios de almacenamiento, correspondieron a cuatro de *Beauveria bassiana*, tres de *Beauveria brongniartii* y una de *Metarhizium anisopliae* (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas nativas de *Beauveria* spp. y de *Metarhizium anisopliae* provenientes de los muestreos realizados en los municipios de Motavita, Chocontá y Mosquera.

Especie	Código	Procedencia
<i>Beauveria bassiana</i>	Bv.L1	Suelo Motavita
<i>Beauveria bassiana</i>	Bv02 5	Larvas, pupas, adultos Motavita
<i>Beauveria bassiana</i>	Bv.L3	Larvas, pupas Chocontá
<i>Beauveria bassiana</i>	Bv.L4	Pupas Mosquera
<i>Beauveria brongniartii</i>	Bv.L5	Adultos Motavita
<i>Beauveria brongniartii</i>	Bv.L6	Pupas, adultos Motavita
<i>Beauveria brongniartii</i>	Bv.L7	Larva Chocontá
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Mt.L1	Larva Chocontá

3.2. Evaluación de la virulencia de las cepas nativas

Una vez recolectados los aislamientos en campo, la siguiente etapa fue la de seleccionar aquel o aquellos con mayor virulencia sobre adultos de la plaga, con el fin de ser utilizado(s) como principio activo de un insecticida microbiano.

Para llevar a cabo las pruebas de virulencia se utilizaron cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bv.L1, Bv025, Bv.L3 y Bv.L4), tres de *Beauveria brongniartii* (Bv.L5, Bv.L6 y Bv.L7) y uno de *Metarhizium anisopliae* (Mt.L1), los cuales se evaluaron sobre adultos de *Premnotypes vorax* procedentes de una cría mantenida bajo condiciones de casa de malla. Los insectos previamente desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % se sumergieron durante un minuto y medio (1' 30") en 25 ml de una suspensión de cada una de los aislamientos nativos ajustados a la concentración de 10^8 conidios.mL⁻¹. Posteriormente, los adultos se ubicaron en cajas de Petri estériles que tenían en la base una toalla de papel húmeda y hojas de *Solanum tuberosum* para su alimentación. Se emplearon 40 insectos por tratamiento distribuidos en cuatro réplicas. Las cajas se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio a una temperatura promedio de 18°C.

Se hicieron observaciones diarias registrando la mortalidad del insecto ocasionada por cada aislamiento. Los adultos se montaron en cámara húme-

da para poder evidenciar la muerte del insecto por el hongo entomopatógeno.

Los insectos tratados con los aislamientos Bv.L1, Bv025 y Mt.L1 empezaron a presentar los primeros síntomas de la enfermedad a los tres días de inoculación.

Los aislamientos Mt.L1 y Bv025 produjeron los mayores porcentajes de mortalidad, alcanzando el 100% hacia los 24 y 25 días, respectivamente, mientras que el aislamiento Bv.L1 presentó el 100% de mortalidad a los 31 días después de haber iniciado el ensayo. Debido a la acción biocontroladora más rápida de los aislamientos Bv025 y Mt.L1, estos se seleccionaron para los posteriores ensayos (Figura 3).

Adicionalmente, se notó una deficiencia en la actividad biocontroladora de los aislamientos Bv.L5, Bv.L6 y Bv.L7, los cuales correspondieron a *Beauveria brongniartii*. Estos aislamientos fueron los que tardaron más tiempo en causar la muerte de los insectos tratados, ya que alcanzaron el 100% de la mortalidad entre los días 38 y 40.

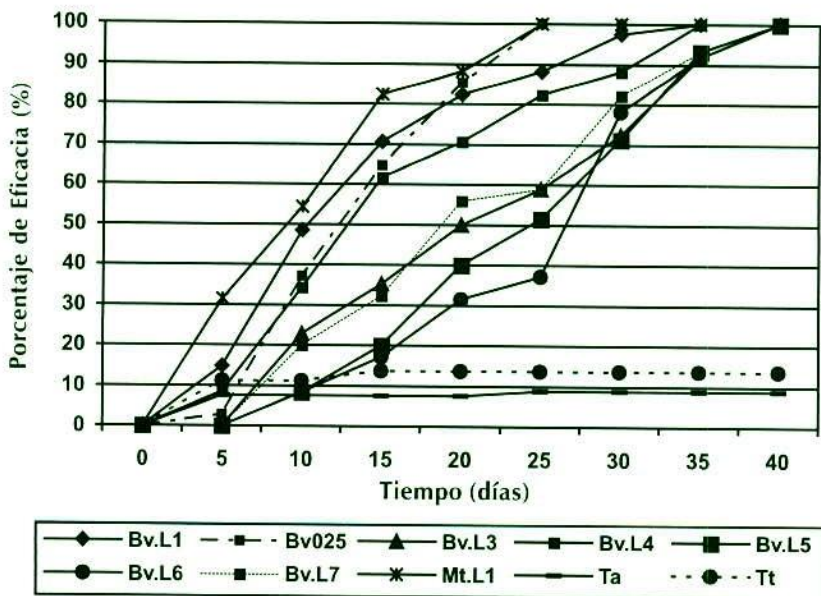


Figura 3. Efecto biocontrolador de los aislamientos nativos aplicados a una concentración de 1×10^8 conidios.ml⁻¹ sobre adultos de *P. vorax*.

Posteriormente, se llevó a cabo la determinación de las concentraciones letales 50 (CL_{50}) y 90 (CL_{90}) empleando el aislamiento de *Beauveria bassiana* (Bv025) y otra de *Metarhizium anisopliae* (Mt.L1) los cuales fueron seleccionadas por su actividad biocontroladora alta en un menor tiempo, respecto a las cepas restantes. De cada una de las dos cepas se hicieron diluciones seriadas ajustando las concentraciones desde 10^5 hasta 10^9 conidios.mL⁻¹. La infección de los adultos, su montaje, las observaciones y toma de datos diarios de mortalidad se llevaron a cabo del mismo modo descrito anteriormente. Luego de la muerte de los insectos y de su posterior montaje en cámara húmeda, se llevó a cabo un registro diario del crecimiento micelial sobre el cuerpo del insecto para cada cepa y en cada concentración. Para esto, se manejaron las categorías de uno (1), la cual correspondió a un porcentaje de cubrimiento entre el 1 % y 25 % del cuerpo del insecto, dos (2) a un porcentaje de cubrimiento entre el 26 % y el 50%, tres (3) a un porcentaje de cubrimiento entre el 51 % y el 75 % y cuatro (4) a un porcentaje de cubrimiento entre el 76 % y el 100 %. Este registro sirvió para determinar si el cubrimiento micelial de los dos aislamientos estaba relacionado con la cantidad de inóculo aplicado y con los porcentajes de mortalidad obtenidos para cada tratamiento.

Para llevar a cabo la determinación de las concentraciones letales 50 (CL_{50}) y 90 (CL_{90}) de los aislamientos seleccionados, se evaluaron 12 tratamientos y tres réplicas, cada una de ellas con 10 adultos. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Polo-Pc, con la prueba Probit.

Cuando se aplicó *B. bassiana* a una concentración de 1×10^9 conidios.mL⁻¹ se obtuvo el 100% de la mortalidad hacia el día 13 y a 1×10^8 conidios.mL⁻¹ se obtuvo una mortalidad de 69.22%. En contraste, con las concentraciones 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 conidios.mL⁻¹, se obtuvieron porcentajes de mortalidad de 0%, 46.1% y 50%, respectivamente (Figura 4).

Cuando se aplicó *M. anisopliae* a la concentración de 1×10^9 conidios.mL⁻¹ se obtuvo el 100% de mortalidad en el día 12. Las concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 conidios.mL⁻¹ produjeron una mortalidad de 80,7% y 88,4%, respectivamente (Figura 4). Se notó que la infección y posterior muerte de los adultos tratados, aumentó en proporción a la can-

tividad de conidios infectivos del inóculo aplicado. Explicación que concuerda con los estudios realizados por Storey y Gardner (1988).

Las concentraciones letales calculadas por medio del método Probit, se pueden observar en la tabla 2. De esta manera se pudo determinar que para obtener porcentajes satisfactorios de control, se requiere aplicar a los insectos una mayor cantidad de inóculo del aislamiento Bv025, que del aislamiento Mt.L1.

Tabla 2. Concentraciones letales media (CL_{50}) y 90 (CL_{90}) para los aislamientos Bv025 de *Beauveria bassiana* y Mt.L1 de *Metarhizium anisopliae* evaluados sobre adultos de *Premnotrypes vorax*.

Aislamientos	CL_{50} (Conidios.ml ⁻¹)	CL_{90} (Conidios.ml ⁻¹)
Bv025	5.5×10^6	4.6×10^8
Mt.L1	1.3×10^6	5×10^7

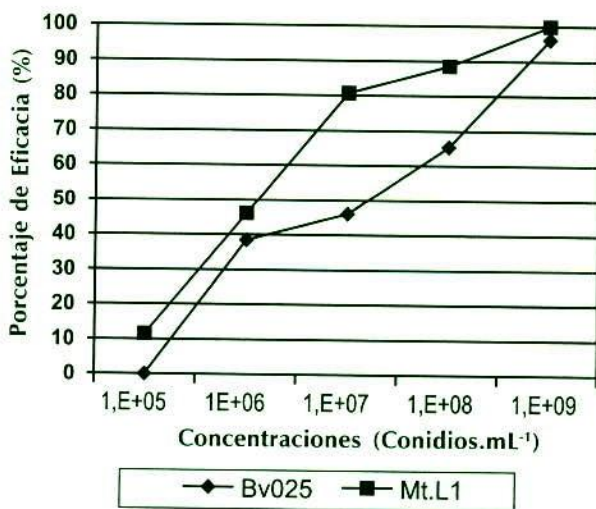


Figura 4. Efecto de las diferentes concentraciones de los aislamientos seleccionados sobre adultos de *P. vorax*.

Cuando los insectos se inocularon con el aislamiento Bv025 de *B. bassiana* se encontró que el inicio del crecimiento micelial ocurrió de manera rápida, ya que cuando fue evaluado a una concentración de 1×10^5 conidios.ml⁻¹, éste se observó a los ocho días de inoculación alcanzando la categoría 1, y aumentó progresivamente hasta llegar a la categoría 4 en el día 23.

A pesar de que se observó una mayor rapidez en el cubrimiento micelial de los dos aislamientos evaluados a la concentración de 1×10^9 conidios.mL⁻¹, en todas las concentraciones con el aislamiento Bv025 se obtuvo un cubrimiento hasta del 100%.

Adicionalmente, se evaluó la actividad biocontroladora de los dos aislamientos seleccionados al ser utilizados de manera combinada, ajustando cada uno de ellos a su respectiva concentración letal 50 (CL₅₀), la cual fue de 5.5×10^6 conidios.mL⁻¹ para el aislamiento Bv025 de *B. bassiana* y de 1.3×10^6 conidios.mL⁻¹ para el aislamiento Mt.L1 de *M. anisopliae*. Estos se mezclaron en un vaso de precipitado en el cual se sumergieron los adultos previamente desinfectados. También se emplearon controles de comparación, para poder realizar el análisis de la actividad biocontroladora de cada aislamiento de manera individual y combinada. Para ello, cada aislamiento se ajustó al doble de su respectiva CL₅₀ es decir, el aislamiento Bv025 se ajustó a una concentración de $1,1 \times 10^7$ conidios.mL⁻¹ y el aislamiento Mt.L1 a una concentración de $2,6 \times 10^6$ conidios.mL⁻¹. El montaje de los ensayos se realizó de la misma manera descrita anteriormente.

Se hicieron anotaciones de la mortalidad diaria de los insectos tratados durante 25 días. Luego de pasar los adultos muertos en cámara húmeda, se anotó el momento en que se observó el inicio del crecimiento micelial de cada aislamiento sobre el cuerpo del insecto. De igual manera, se manejaron las categorías tenidas en cuenta en la determinación de CL₅₀ y CL₉₀, registrando de ser posible para cada una de ellas, el porcentaje de cubrimiento correspondiente a cada aislamiento.

Para todos los casos se utilizó un diseño experimental completamente al azar y los datos de mortalidad obtenidos, fueron analizados mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple Duncan ($\alpha = 0.05$).

Al evaluar la actividad biocontroladora de los aislamientos Bv025 y Mt.L1 de manera combinada sobre adultos de *P. vorax*, se encontró un porcentaje de eficacia del 25% al día siguiente de inoculados. Éste aumentó rápidamente, hasta alcanzar un 51,84% y 100% de mortalidad hacia el cuarto y décimo día, respectivamente. En contraste, cuando se eva-

lugaron los aislamientos Bv.025 y Mt.L1 de manera individual, se observó al día siguiente de haber inoculado los insectos un porcentaje de mortalidad del 3,57% y 14,29%, respectivamente. Sin embargo, aunque dichos porcentajes aumentaron gradualmente, no fue posible alcanzar el 50% de la mortalidad al final del experimento (Figura 5).

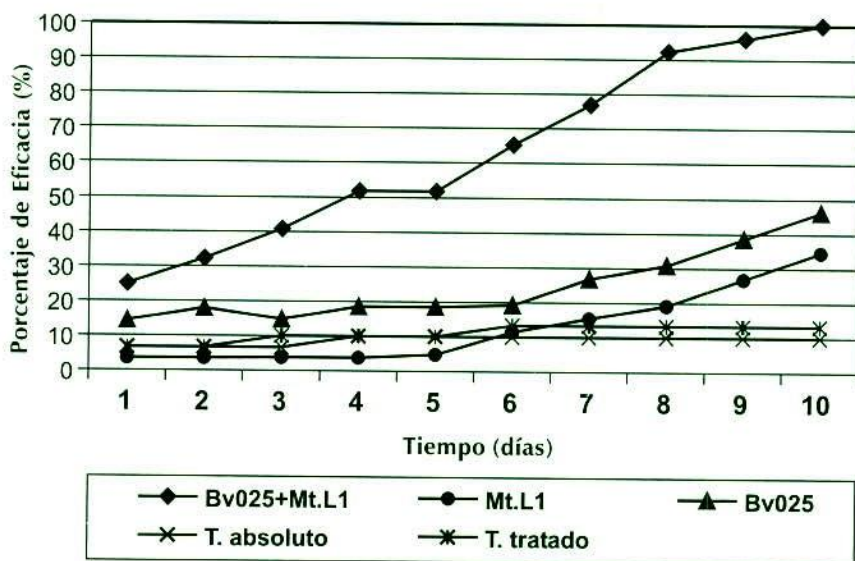


Figura 5. Eficacia biocontroladora obtenida al evaluar de forma combinada los aislamientos Bv025 y Mt.L1 de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, sobre adultos de *P. vorax*.

La disminución, en el tiempo, de la mortalidad de los insectos tratados con la mezcla de cepas con respecto a su utilización en forma individual, podría relacionarse con un efecto sinérgico de mecanismos de acción correspondientes a cada cepa. Estos resultados podrían explicarse en parte por la acción combinada de las toxinas de *B. bassiana* y de *M. anisopliae*, a la que se sometieron los insectos.

Al analizar los insectos infectados con la mezcla de aislamientos, se encontró la presencia de micelio y de conidios pertenecientes a *B. bassiana* y en ningún caso se observó *M. anisopliae*. Tal observación se llevó a cabo desde la aparición micelial que tuvo lugar el día 4, hasta obtener un cubrimiento casi total del cuerpo, el cual ocurrió en el día 12.

Esta situación podría ser explicada si se tiene en cuenta que el aislamiento Bv025 de *B. bassiana*, cuando fue aplicado en forma individual, siempre tardó menos tiempo en expresarse (siete días) y en cubrir el cuerpo de los insectos tratados, llegando al 100% de cubrimiento. En contraste, el aislamiento Mt.L1 de *M. anisopliae* se expresó a partir de los 10 días y alcanzó en el día 24 su máximo porcentaje de cubrimiento, el cual nunca fue superior al 95%.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la actividad biocontroladora de estos aislamientos puede ser potencializada mediante su utilización de manera combinada presentándose cierta interacción entre ellos. Sin embargo, siguiendo el esquema de desarrollo de un insecticida microbiano, se seleccionó como principio activo el aislamiento Bv025 de *B. bassiana* debido a que presentó un mayor y más rápido cubrimiento micelial sobre el insecto.

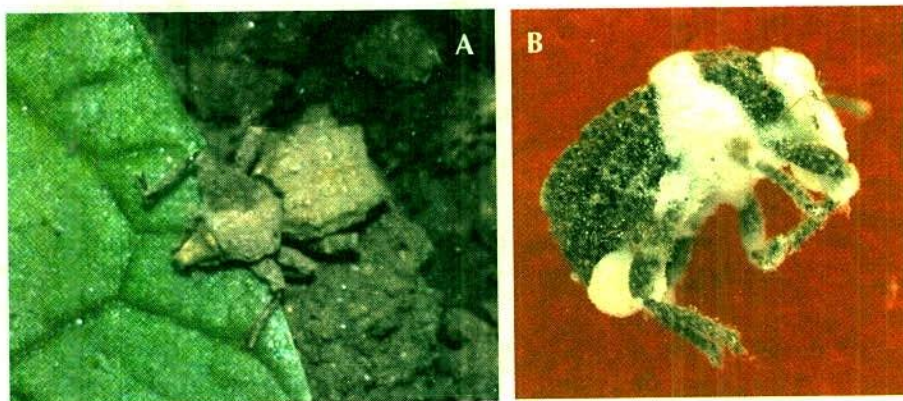


Figura 6. A. Adulto de *P. vorax* sano. B. Adulto de *P. vorax* infectado con el aislamiento de *Beauveria bassiana*. Fotografías: Carlos Espinel, Juan Alberto Arias.

3.3. Efecto de los pases sucesivos sobre las características microbiológicas y la virulencia de *B. bassiana*

Diferentes estudios han demostrado que los pases sucesivos sobre los medios de cultivo, sus constituyentes, el pH, la temperatura, la humedad relativa y el pase del patógeno sobre insectos no blanco, causan una pérdida gradual de sus características, repercutiendo en su patogenicidad y

virulencia. Con miras a producir biomasa de alta calidad con máxima actividad entomopatogénica, se desarrolló un estudio para determinar el efecto de los subcultivos sucesivos de *Beauveria bassiana* sobre su virulencia y sus características microbiológicas, para ello se realizaron 15 subcultivos sucesivos del hongo tanto en medio semisintético (SS) (Agar Papa Sacarosa, PSA) como en medio de producción masiva (PM) a base de avena.

Con los conidios de los subcultivos 4, 5, 6, 9, 12 y 15 provenientes de los dos medios de crecimiento se prepararon suspensiones ajustadas a una concentración de 10^8 conidios.mL⁻¹. Se sumergieron grupos de treinta insectos adultos de *P. vorax* en las suspensiones correspondientes a los diferentes subcultivos y se mantuvieron en tres unidades experimentales. Se registró la mortalidad de los adultos de gusano blanco de la papa y los insectos muertos se incubaron en cámara húmeda, con el fin de verificar la infección por *B. bassiana*.

Los mayores porcentajes de eficacia se obtuvieron con los conidios provenientes del subcultivo cinco en los dos medios, con un 96.4% de mortalidad de la plaga para los dos tratamientos, a partir de este subcultivo se observó una disminución gradual en los porcentajes de control de la plaga, obteniéndose el menor porcentaje de control con los conidios provenientes del subcultivo quince en medio semisintético con un valor del 57.1% (Figura 7).

El mayor porcentaje de eficacia fue obtenido con los conidios del pase cinco tanto en medio PSA como avena, los cuales según el análisis estadístico no presentaron diferencias estadísticas con el porcentaje de eficacia de los conidios provenientes de los pases 4, 6, 9 y 12 cultivados en los dos medios, pero sí con los resultados obtenidos con las esporas del subcultivo 15 tanto en medio de producción masiva como semisintético. Los resultados obtenidos indican que los subcultivos sucesivos del microorganismo afectaron su patogenicidad a medida que se avanzó en ellos. A pesar de no encontrarse diferencias significativas entre la mayoría de tratamientos, se observó una tendencia numérica a un mayor porcentaje de eficacia con los conidios de los primeros pases, la cual fue disminuyendo a medida que se avanzaba en las transferencias seriadas o subcultivos sucesivos.

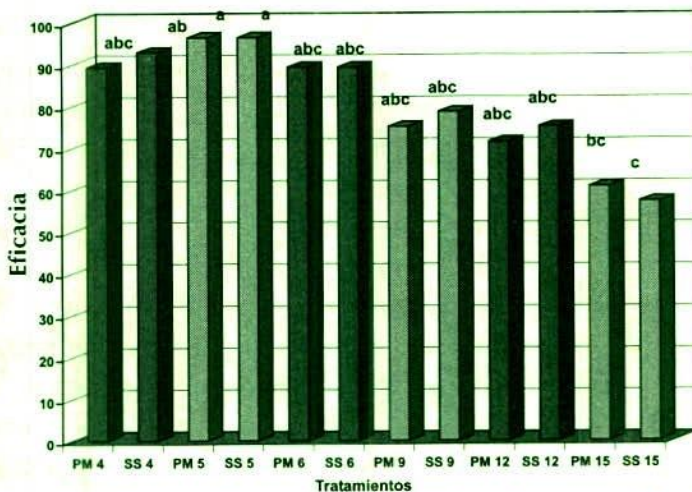


Figura 7. Efecto de los subcultivos sucesivos de *B. bassiana* en su virulencia sobre el gusano blanco de la papa (PM: Medio de producción masiva a base de avena; SS: Medio semisintético).

Para cada subcultivo no se encontraron diferencias en la actividad biocontroladora del microorganismo crecido en los dos medios de cultivo evaluados, resultado que sugiere que estos tuvieron el mismo efecto en la virulencia y se recomendaría en consecuencia emplear el medio avena en producciones masivas del, debido al menor costo del mismo.

Tasa de crecimiento diametral y características de crecimiento

Con el propósito de determinar el efecto de los pases sucesivos sobre la velocidad de crecimiento y las características morfológicas del microorganismo, se partió de los subcultivos 3, 4, 5, 8, 11 y 14, de los cuales se tomaron discos de 5mm de diámetro y se colocaron en el centro de cajas de Petri con Agar PSA, consistiendo estos en los subcultivos 4, 5, 6, 9, 12 y 15 correspondientes a los evaluados en los ensayos anteriores.

Las cajas se incubaron a 28°C y en los días 5, 8 y 10 se midió el diámetro de la colonia observándose el color y apariencia de la misma.

Las mayores tasas de crecimiento se observaron a menor número de pases, las cuales correspondieron a los subcultivos 5 y 4 con valores de 5.88 mm.día⁻¹ y 5.43 mm. día⁻¹ respectivamente, disminuyendo éstas al avanzar en los pases, estos resultados sugieren que los subcultivos sucesivos

vos del hongo afectaron su capacidad de crecimiento (Figura 8). Así mismo, se observó que el crecimiento del hongo cambió con sus subcultivos sucesivos, observándose abundante esporulación de color crema en los primeros pases, y a medida que se avanzó en ellos el crecimiento se tornó algodonoso y de color blanco.

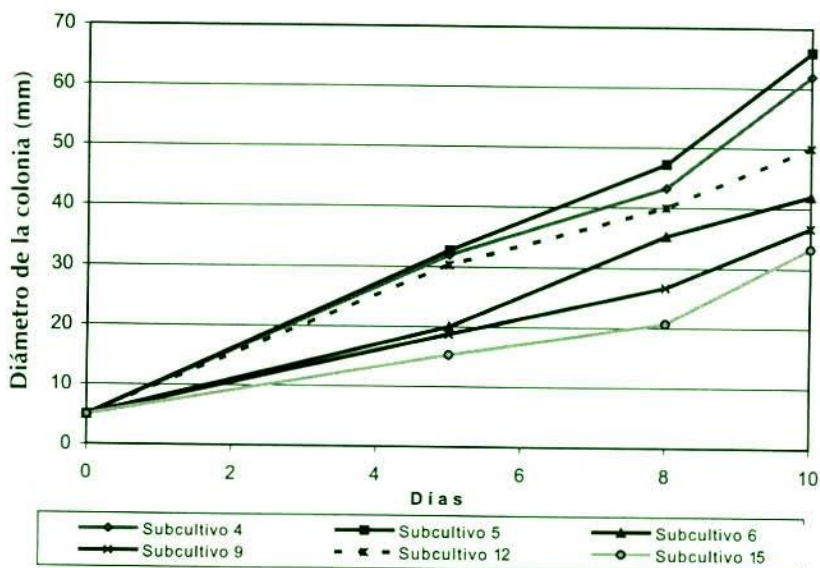


Figura 8. Tasa de crecimiento de *B. bassiana*, Bv025 sometida a 4, 5, 6, 9, 12 y 15 subcultivos en agar PSA.

3.4. Producción masiva del hongo *Beauveria bassiana*

El desarrollo de un insecticida microbiano implica el establecimiento de una metodología de producción masiva, de separación, de secado y de formulación la cual incluye etapas de preselección, selección y combinación correcta de auxiliares de formulación y principio activo, con el fin de obtener un producto estable, seguro, eficaz, confiable y de fácil aplicación. Para tal fin se desarrollaron secuencialmente las actividades descritas en la figura 9, correspondientes a las etapas de preformulación y formulación de insecticidas microbianos.

Para proceder a las etapas de preformulación y formulación se realizaron procesos de producción masiva, separación y secado del principio activo, conidios de *Beauveria bassiana* de acuerdo con procedimientos

previamente estandarizados, obteniéndose las cantidades y calidades requeridas.

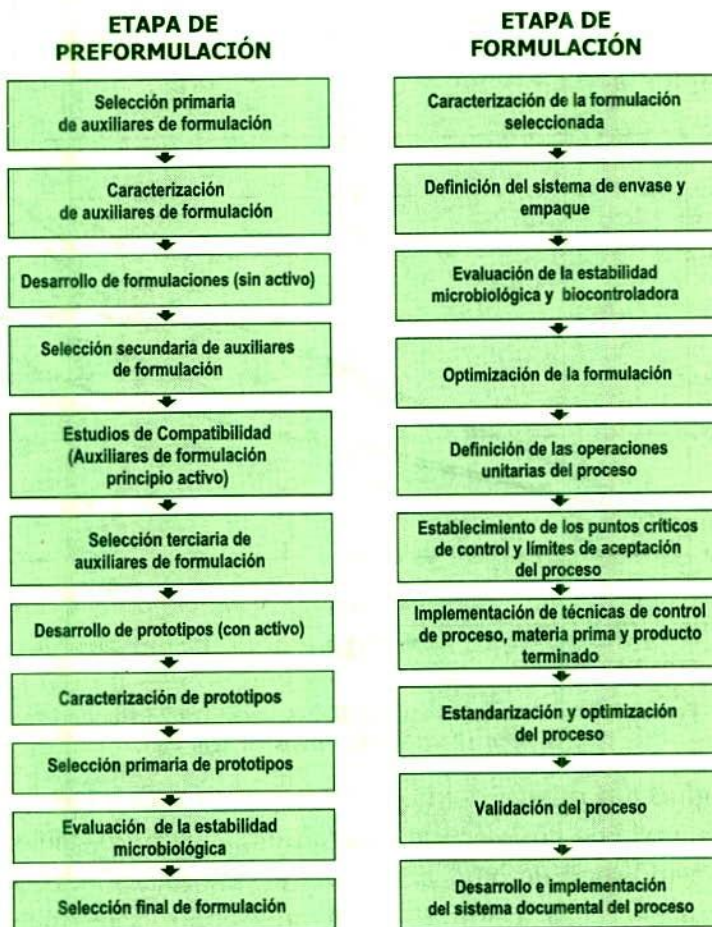


Figura 9. Etapas de preformulación y formulación de insecticidas microbianos.

El primer paso dentro del desarrollo tecnológico es la selección de un sustrato en el que el principio activo, en este caso el hongo, se desarrolle de la mejor forma. Se evaluaron los medios de cultivo avena precocida en hojuelas, zanahoria licuada, arroz cocido y combinaciones de estos en una proporción 1:1 contenidos en bandejas de aluminio de 14 cm x 20

cm. A partir de un cultivo del microorganismo crecido en medio Agar Papa Sacarosa (PSA) durante 7 días a 25°C, se preparó una suspensión en Tween 80 al 0.1% ajustada a una concentración de 2×10^7 conidios.mL⁻¹. Para inocular cada uno de los medios se utilizaron 1.5 mL de dicha suspensión.

Con cada medio de cultivo se inocularon 30 bandejas, de las cuales 15 fueron incubadas en condiciones de luz constante y 15 en oscuridad constante.

En todos los casos, el hongo creció como una capa en la superficie del medio. Al analizar los rendimientos obtenidos, se observó una tendencia a un mayor rendimiento en los medios incubados en presencia de luz, en relación con los incubados en presencia de oscuridad.

Cuando la avena se encontraba sola o en mezcla con los otros sustratos, tanto en luz como en oscuridad se obtuvieron los mayores rendimientos. En condiciones de luz, el rendimiento en el medio de avena fue de 40×10^7 ufc.cm⁻², cifra que representó el mayor rendimiento obtenido, mientras que la avena en mezcla con otros sustratos tales como el arroz y la zanahoria, los rendimientos fueron de 38×10^7 ufc.cm⁻² y de 29×10^7 ufc.cm⁻² respectivamente (Tabla 3). Esto podría deberse al alto contenido protéico presente en la avena, que pudo haber estimulado la esporulación. De otra parte, en los medios de cultivo de arroz y de zanahoria se encontraron los menores rendimientos que fueron de 52×10^5 ufc.cm⁻² y de 20×10^4 ufc.cm⁻² respectivamente (Tabla 3).

En condiciones de oscuridad, el rendimiento en el medio de avena como única fuente de carbono fue de 14×10^7 ufc.cm⁻², mientras que en los medios de arroz-avena y avena-zanahoria fueron 1×10^7 ufc.cm⁻² y 79×10^5 ufc.cm⁻² respectivamente, siendo este último rendimiento comparable con los obtenidos en el medio de arroz y en el de arroz-zanahoria, en donde los rendimientos fueron de 18×10^5 ufc.cm⁻² y 12×10^5 ufc.cm⁻² respectivamente, mientras que en el medio de zanahoria, éste fue de 40×10^3 ufc.cm⁻². Los resultados obtenidos en los medios de arroz y de zanahoria solos o en sus mezclas, incubados en presencia de luz o de oscuridad, mostraron que estos sustratos no son adecuados para la producción de conidios de *Beauveria bassiana*.

Tabla 3. Efecto de varios medios de cultivo líquidos, semisólidos y de dos condiciones de luminosidad sobre el crecimiento de *B. bassiana*.

Medio de cultivo	Consistencia	Condiciones de incubación	
		Luz (rendimiento en ufc.cm ⁻²)	Oscuridad (rendimiento en ufc.cm ⁻²)
Avena	semisólida	40 x 10 ⁷	14 x 10 ⁷
Arroz-avena	líquida	38 x 10 ⁷	10 x 10 ⁶
Avena-zanahoria	líquida	29 x 10 ⁷	79 x 10 ⁵
Arroz	líquida	52 x 10 ⁵	18 x 10 ⁵
Zanahoria	líquida	20 x 10 ⁴	40 x 10 ³
Arroz-zanahoria	líquida	37 x 10 ⁴	12 x 10 ⁵

Al evaluar el crecimiento del hongo durante 15 días de incubación tanto en condiciones de luz como de oscuridad, en estos medios de cultivo se encontró que se presentó una tendencia general al aumento de la biomasa a medida que transcurría el tiempo de incubación tanto en luz como en oscuridad constante. A los siete días de incubación en luz constante, se registró un crecimiento que correspondió a 45×10^5 ufc.cm⁻² para el medio de avena, de 30×10^5 ufc.cm⁻² y de 28×10^5 ufc.cm⁻² para los medios de avena-zanahoria y arroz-avena, respectivamente. Estos resultados contrastaron con los obtenidos a los 10 días de incubación en que hubo un mayor crecimiento del hongo, que correspondió a 85×10^5 ufc.cm⁻² cuando fue cultivado en el medio de avena, de 63×10^5 ufc.cm⁻² y de 69×10^5 ufc.cm⁻² cuando fue cultivado en los medios de avena-zanahoria y de arroz-avena, respectivamente. Al final del tiempo de evaluación, es decir a los 15 días, se obtuvieron crecimientos de 37×10^7 ufc.cm⁻² cuando el hongo fue cultivado en el medio de avena, de 24×10^7 ufc.cm⁻² y de 36×10^7 ufc.cm⁻² cuando fue cultivado en los medios de avena-zanahoria y arroz-avena, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento presentado en los tres medios de cultivo evaluados.

Los resultados de esporulación fúngica encontrados permitieron concluir que el factor luz incidió notablemente en la producción de esporulación pulverulenta de color beige.

Teniendo en cuenta que los mayores rendimientos del hongo fueron obtenidos en el medio de avena, se escogió éste para la producción de los conidios y luminosidad constante como condición de incubación. La separación de los conidios se realizó mediante barrido superficial con una brocha y las esporas consistieron en el principio activo para el concentrado emulsionable.

Con la cepa seleccionada de *Beauveria bassiana* (Bv025) también se estandarizó un sistema de producción masiva en sustrato sólido consistente en granos de arroz humedecidos estériles contenido en bolsas de polietileno de alta densidad, en el cual se alcanzó un rendimiento de 1×10^{10} conidios.g⁻¹. El sustrato esporulado fue molido y consistió en el principio activo con el cual se desarrollaron cuatro prototipos de insecticida microbiano granulado para aplicación directa al suelo, elaborados mediante la técnica de granulación vía húmeda. Los preformulados obtenidos presentaron aspecto uniforme, con superficies dentadas y con un tamaño homogéneo.

3.5. Formulación del insecticida microbiano

Se trabajó en el desarrollo de dos tipos de formulación, una sólida en forma de granulado para aplicación directa al suelo y otra líquida presentada como un concentrado emulsionable.

Con los conidios puros separados del medio a base de avena se elaboraron diferentes prototipos de un insecticida biológico formulado como un concentrado emulsionable, el cual consistió en una suspensión de las células en una base oleosa autoemulsificable. El vehículo oleoso se elaboró utilizando aceites vegetales, emulgentes y emulsificantes que mostraron compatibilidad con el microorganismo; todos ellos inocuos y comúnmente empleados en la industria cosmética y de alimentos. Este prototipo presentó una concentración de 10^{10} conidios.mL⁻¹ y una germinación del 90% a las 24 horas de incubación.

Con la biomasa obtenida de la producción en bolsas con arroz se desarrollaron cuatro diferentes prototipos de granulados no dispersables, mediante la utilización de un agente aglutinante y mezclas de diluentes, sustancias que también demostraron ser compatibles con el hongo.

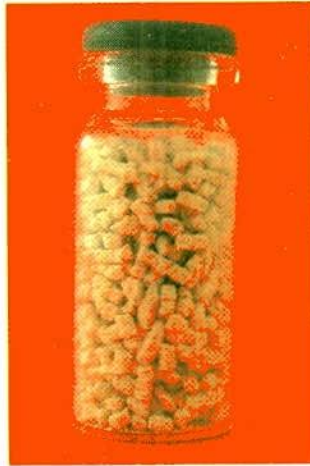


Figura 10. Granulado no dispersable a base de *B. bassiana*.

Fotografía: Juan Alberto Arias.

3.6. Determinación de las características físicas de los granulados

1. Tamaño de partícula. Dentro del proceso de manufactura de los granulados se incluyeron dos etapas, la granulación y la regranulación. En la primera etapa la pasta fue pasada por un tamiz cuyo tamaño de poro fue de $2.000\ \mu\text{m}$. Sin embargo, en esta fase del proceso la pasta permaneció húmeda, lo que generó la formación de aglomerados que produjeron heterogeneidad en el tamaño de partícula. Por lo tanto, se hizo necesario regranular los productos después del secado, pasándolos por un tamiz de poro de $1.500\ \mu\text{m}$.

El tamaño de partícula se determinó por la técnica de gravimetría, utilizando una columna de tamices de diferentes tamaños de poro ubicados en forma ascendente de arriba hacia abajo, a través de los cuales se dejó caer un peso conocido de material y posteriormente se pesó el material retenido en cada tamiz. Los resultados obtenidos (Tabla 4), mostraron que en todos los granulados el mayor porcentaje de peso retenido se presentó en el tamiz nº 1 de $1.500\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, con porcentajes de 80.41%, 91.51%, 87.6%, 77.31% para los granulados GR1, GR2, GR3, GR4 respectivamente, seguido por el tamiz nº 2 de tamaño de poro de $1.000\ \mu\text{m}$, el cual retuvo porcentajes de peso de 11.03%, 2.67%, 4.46%,

8.07% para los granulados GR1, GR2, GR3 y GR4 respectivamente. Esos resultados permitieron afirmar que el tamaño de partícula de los granulados osciló entre 1.000 μm y 1.500 μm .

El producto comercial utilizado como control fue Furadan 3GR®, presentó un tamaño de partícula que osciló entre 35 μm y 50 μm , este tamaño se puede deber posiblemente al método de granulación utilizado y a los equipos en los cuales se desarrolló el proceso.

Los granulados GR1, GR2 y GR3 presentaron porcentajes de polvos finos bajos con valores de 3.03%, 2.66%, 4.38%, respectivamente y el granulado GR4 presentó el mayor porcentaje de polvos finos con un valor de 8.37%. Este resultado podría deberse a la baja proporción de agente aglutinante utilizado en la manufactura del preformulado, lo que generó una consistencia más frágil en el gránulo. Esta característica sumada al uso de un solo tipo de diluyente (Diluyente A) el cual es una arcilla fina, provocó la ruptura de las partículas, generando mayor proporción de polvos finos en el proceso de regranulación.

La alta proporción de polvos finos podría ocasionar compactación cuando el producto sea almacenado por períodos de tiempo prolongados; así mismo en el momento de la aplicación en campo, podría presentarse una pérdida de producto causada por la deriva del viento.

Tabla 4. Porcentaje de peso retenido por cada tamiz en la prueba de gravimetría.

Tamiz Nº	Tamaño de Poro	Peso retenido (%)			
#	μm	GR1	GR2	GR3	GR4
1	1500 μm	80.40	91.51	87.6	77.31
2	1000 μm	11.03	2.67	4.46	8.07
3	840 μm	5.50	3.13	3.53	6.21
4	590 μm	1.50	1.73	3.33	5
5	500 μm	0.61	0.20	0.6	0.64
6	300 μm	0.30	0.40	0.26	1.77
7	250 μm	0.21	0.13	0.13	0.64
Base	-250 μm	0.41	0.20	0.06	0.32
% de polvos finos		3.03	2.66	4.38	8.37

2. Voluminosidad. La voluminosidad de un material es el volumen ocupado por unidad de peso y es de gran importancia considerarla durante los procesos de diseño y compra de equipos de manufactura, además para las etapas de envasado y empaque del producto. Los valores de voluminosidad de los granulados están directamente relacionados con las características de voluminosidad propias de los excipientes utilizados en cada caso y con el método de granulación empleado. De igual manera la granulación por vía húmeda por forzado manual da como resultado granulados con un mayor volumen aparente, ya que los espacios interparticulares son ocupados por agua, que en el proceso de secado se evapora, dejándolos libres y aumentando la voluminosidad de los granulados.

Los granulados GR1, GR2 y GR3 presentaron bajas voluminosidades con valores de 1.68, 1.65 y 1.86 ml/g. respectivamente y la voluminosidad más baja (1.55 mL.g^{-1}) fue presentada por el GR4.

Se encontraron diferencias entre los distintos granulados y el tratamiento control (Furadan 3GR®), ya que este último presentó una voluminosidad de 0.72 mL.g^{-1} , valor considerablemente más bajo que los presentados por los granulados desarrollados. Esto podría ser debido a que la voluminosidad está determinada por la forma y el tamaño de las partículas y este producto posee características de forma homogénea y un tamaño de partícula muy pequeño que oscila entre 35 y 50 μm , lo que le permite que las partículas se ordenen más fácilmente y se disminuya el espacio interparticular, trayendo como consecuencia una disminución en la voluminosidad del producto.

Los cuatro granulados presentaron características adecuadas de voluminosidad, para garantizar que no se presenten problemas en el envase y empaque del insecticida microbiano a escala industrial.

3. Porosidad. La porosidad es la medida de los espacios intra e interparticulares en un material y determina su capacidad de absorción de agua y su fragilidad. Los granulados GR1, GR2 y GR3 mostraron porcentajes de porosidad similares con valores de 6.68%, 6.28% y 5.62% respectivamente. Esto podría ser debido a que en los tres granulados se utilizaron los mismos tipos de diluentes.

El GR4 presentó la mayor porosidad de todas las preformulaciones (9.31%). No se detectaron diferencias significativas entre todos los granulados y el tratamiento control, permitiendo concluir que estos no presentan problemas de excesiva absorción de agua por poseer porcentajes de porosidad bajos.

4. Fluidéz. La fluidez es la capacidad que tiene un material sólido de fluir y juega un papel determinante durante la manufactura de un producto, ya que determina que tipo de sistemas de alimentación mecánica son requeridos para realizar eficientemente el proceso. Los resultados de fluidez obtenidos para los diferentes preformulados mediante la técnica de ángulo de reposo mostraron ángulos inferiores a 35°; lo que permite afirmar que todos los granulados fluyen fácilmente. El GR2 presentó el mayor ángulo de reposo (32.55°) y por consiguiente una menor fluidez 1.57 g.seg⁻¹, seguido del GR1, el cual presentó un ángulo de reposo de 31.32° y una fluidez de 1.64 g.seg⁻¹.

Los GR3 y GR4 presentaron un comportamiento similar con valores de fluidez de 1.74 g.seg⁻¹ y 1.73 g.seg⁻¹ respectivamente, y con ángulos de reposo de 29.98° y 29.99° respectivamente.

El tratamiento control Furadan 3GR® mostró el menor ángulo de reposo 20.62° y una fluidez de 2.69 g.seg⁻¹, este resultado pudo ser debido a la uniformidad en el tamaño y a la forma de las partículas que conforman el granulado, lo que permite que se deslice fácilmente.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que permitió concluir que ninguno de los cuatro granulados presentará problemas de fluidez, favoreciendo el proceso de llenado de los recipientes en una producción a nivel industrial.

5. Humedad. La humedad de los productos biológicos determina su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento, siendo recomendable una humedad inferior al 5% para permitir que los microorganismos se conserven viables y virulentos en un estado de latencia. De las cuatro preformulaciones evaluadas, el GR4 presentó el mayor porcentaje de humedad (14%). Esto fue posiblemente debido al tipo de diluyente utilizado. Este diluyente presenta un porcentaje de humedad del 13.06%, que influye directamente en la humedad del granulado y hace que el tiempo de

secado necesario para mantener el granulado en una humedad igual o inferior al 10% aumento.

Los granulados GR1, GR2 y GR3 presentaron humedades del 10.84%, 10.52% y 11.16% respectivamente, las cuales son ligeramente superiores al límite recomendado para este tipo de productos (<5%). Por lo tanto, es necesario realizar estudios con el fin de verificar diferentes temperaturas y tiempos de secado que permitan llegar a una humedad inferior sin que se vea afectada la viabilidad y la germinación del hongo en los productos.

El porcentaje de humedad determinado en el producto Furadan 3GR® fue bajo (2.33%), posiblemente porque al ser el principio activo una sustancia química, puede ser sometido a tiempos y temperatura de secado mayores, lo que hace que pierda mayor cantidad de agua, obteniendo un menor porcentaje de humedad.

6. Humectabilidad. La humectabilidad es la capacidad de un sólido de mojarse y por ende su habilidad para absorber agua. Todos los granulados presentaron tiempos de humectabilidad entre 2 y 3 segundos, estos resultados permiten clasificar a los granulados como productos de alta humectabilidad, ya que se encuentran dentro del límite registrado en la literatura, el cual equivale a tiempos de humectación inferiores a 20 seg. Estos resultados indican que los auxiliares de formulación utilizados fueron adecuados y que podrían permitirle al producto absorber agua fácilmente del medio ambiente, una vez sea aplicado en condiciones de campo, favoreciendo así el proceso de germinación y por ende el establecimiento del hongo en el suelo.

7. pH. El prototipo GR4 presentó el pH más alto con un valor de 8.95, posiblemente debido a que en su manufactura se utilizó únicamente un tipo de diluyente cuyo pH es de 9.3, los granulados GR1, GR2, GR3 presentaron pH de 8.62, 8.46 y 8.58, respectivamente.

El control Furadan 3GR® presentó un pH de 8.58, el cual fue similar a los pH obtenidos en los preformulados, este valor puede estar relacionado con el pH del principio activo y de los excipientes utilizados en su manufactura.

Teniendo en cuenta que estudios previos mostraron que la germinación de *B. bassiana* no se ve afectada por pH entre 5-10, se podría sugerir

que el pH de estas preformulaciones posiblemente no afectarán la viabilidad del microorganismo y no influirán en el proceso de infección sobre el insecto plaga.

Teniendo en cuenta todas las características físicas evaluadas y la actividad biocontroladora de los preformulados (Tabla 5), y aunque en la mayoría de los ensayos no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, se seleccionó el granulado GR1 para continuar con el trabajo.

Tabla 5. Características físicas de granulados.

Característica	GR1	GR2	GR3	GR4	Control (Furadan 3GR®)
pH	8.62	8.46	8.58	8.95	8.58
Humedad (%)	10.84	10.52	11.16	14.00	2.33
Voluminosidad (ml.g ⁻¹)	1.68	1.65	1.86	1.55	0.72
Porosidad (%)	6.68	6.28	5.62	9.31	8.8
Polvos finos (%)	8.23	2.66	4.38	8.37	1.12
Ángulo de reposo (grados)	31.32°	32.55°	29.98°	29.99°	20.62°
Fluidez (g.seg ⁻¹)	1.64	1.57	1.74	1.73	2.69
Humectabilidad (seg)	3"	2"	3"	2"	2"

3.7. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* con insumos agrícolas utilizados en el cultivo de la papa

Con el propósito de generar recomendaciones del uso del hongo en cultivos de papa se seleccionaron los agroquímicos más comúnmente utilizados en éste, se preparó una suspensión de conidios de la cepa Bv 025 de *B. bassiana*, ajustada a una concentración de 10^8 conidios.ml⁻¹; a partir de ésta se realizaron diluciones seriadas y se inocularon las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} por triplicado en el medio de cultivo sólo y con el producto adicionado en tres concentraciones, la recomendada por el productor para su aplicación en campo, la mitad de la dosis y media dosis por encima de

la recomendada, para el caso de los insecticidas, y la recomendada por el productor, la mitad de la dosis y la cuarta parte de la dosis, para el caso de los fungicidas y los fertilizantes. Estas muestras se incubaron a 27°C por 24 horas. Al cabo de este tiempo se determinó la germinación de los conidios de *Beauveria bassiana* mediante la observación al microscopio.

Los productos evaluados fueron los fungicidas: combinación de Metalaxil + Mancozeb, Benomyl, combinación de Carboxim + Captam, Penciclorón, Oxicloruro de cobre y Fosetyl de aluminio; los insecticidas Clorpirifos, Profenofos, Permetrina Carbofurán y Carbosulfán; y los fertilizantes Úrea, NPK 10 - 30 - 10 y Superfosfato triple.

Se observó incompatibilidad del microorganismo con los fungicidas (Tabla 6): Benomyl, Carboxim + Captam, Metalaxyl+ Mancozeb y Fosetil Al, con los cuales la germinación a las 96 horas de incubación no superó el 5% mientras que en el tratamiento control se obtuvo entre un 95 y un 100% de germinación a las 24 horas de incubación (Figura 11). En cuanto a las pruebas viabilidad y crecimiento radial, éstas confirmaron la incompatibilidad al no observarse ningún crecimiento del hongo pasados los nueve días de incubación. Los resultados sugieren que estos productos afectan drásticamente la viabilidad del microorganismo, posiblemente debido a la inespecificidad de los mismos a causa de su mecanismo de acción. Por ejemplo, el Benomil interfiere con la síntesis de DNA y la mitosis, Captan + Carboxin interfieren la respiración celular y Mancozeb + Metalaxyl actúan inhibiendo las enzimas sulfidrílicas bloqueando la síntesis de ATP, todos estos procesos fisiológicos que se presentan en los hongos, incluyendo los agentes de biocontrol, razón por la cual dichos productos químicos afectaron a *Beauveria bassiana* en el presente estudio. A partir de estos resultados, se recomienda la utilización de los mencionados productos fungicidas considerando períodos de tiempo de aproximadamente cuatro a cinco días entre su utilización y la aplicación del insecticida microbiano, con miras a disminuir el riesgo de incompatibilidad en campo. De ninguna manera se deben emplear estos fungicidas en mezcla directa con el insecticida microbiano y en caso de haber utilizado el producto biológico y de requerirse una aplicación del químico sin cumplir con el tiempo sugerido entre aplicaciones, se recomienda aplicar un re-

fuerzo del insecticida microbiano para asegurar su efectividad. Al fungicida Pencycuron, no se le conoce su mecanismo de acción, sin embargo en el presente estudio se le determinó su efecto inhibitorio del desarrollo micelial, si se tiene en cuenta que causó una disminución en la germinación del 44% al usar la dosis comercial y del 24% al utilizar la mitad y el cuarto de la dosis, disminución que con la dosis completa fue significativa, sin embargo, podría ser manejada con períodos de carencia entre las aplicaciones. El Oxicloruro de cobre, mostró un efecto fungistático mas no fungicida, ya que causó un retardo el germinación del hongo, presentándose a las 24 horas de incubación, un porcentaje de germinación superior al 80% en el tratamiento control, mientras con las tres dosis del tratamiento con el fungicida, la germinación a este tiempo fue inferior al 50%. Sin embargo, a las 96 horas de evaluación, la germinación del hongo en presencia del plaguicida fue superior al 80%, permitiendo recomendar su uso en cultivos en los que se aplique el producto biológico.

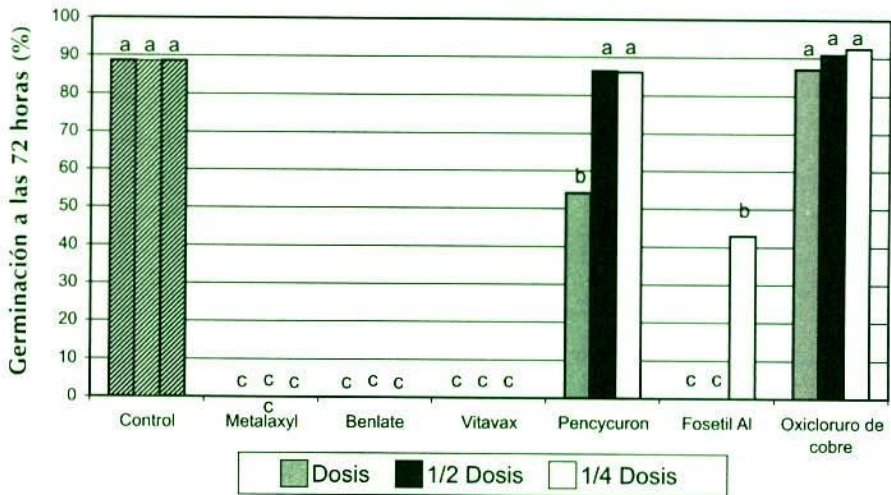


Figura 11. Efecto de los fungicidas en la germinación de *Beauveria bassiana* a las 96 horas de incubación.

En cuanto a los resultados obtenidos con los insecticidas, los productos, Carbosulfán y Permetrina, mostraron ser compatibles con el microorganismo (Figura 12) utilizando la mitad de la dosis recomendada, al no causar pérdidas significativas de la germinación a las 24 horas de incubación.

Cuando se empleó la dosis completa y una y media dosis, la prueba estadística de Tukey con una significancia del 5% detectó diferencias estadísticas, lo que sugiere que a estas concentraciones sí hubo un efecto negativo sobre la germinación de *B. bassiana*. Sin embargo, la disminución en la germinación de estos tratamientos y para todas las dosis de Carbofurán, no superó el 17% de pérdida, valor que a pesar de ser significativo, es bajo si consideramos que con algunos productos se pierde hasta el 100% de la germinación. Este comportamiento podría deberse a que el modo de acción de estos agroquímicos se da cuando la molécula en animales interfiere los impulsos nerviosos al inhibir la Acetilcolinesterasa, causando acumulación de acetilcolina en las terminales nerviosas. Razón por la cual este mecanismo no se desarrolla en los hongos que carecen de sistema nervioso. Los productos Clorpirifos y Profenofos sí afectaron negativamente al microorganismo cuando se utilizó la dosis completa y una y media dosis, a pesar de ejercer estos productos su actividad insecticida por el mismo mecanismo mencionado anteriormente; en este caso, se podría sugerir que el efecto deletéreo en el hongo, no fue causado por la molécula activa sino por alguno de los solventes de los plaguicidas formulados. Estos resultados permiten recomendar el uso combinado del insecticida microbiano a base de *Beauveria bassiana*, en programas de manejo integrado de plagas, con los insecticidas Carbofurán, Carbosulfán y Permetrina, manejando períodos de carencia entre las aplicaciones de cada tipo de producto y evitar la utilización de Clorpirifos y Profenofós (Tabla 6).

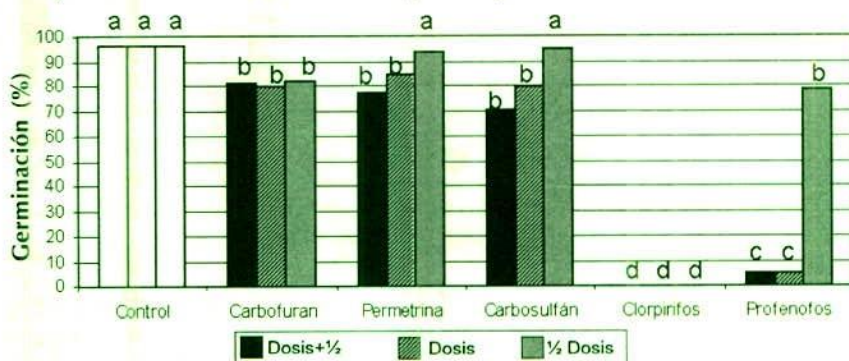


Figura 12. Efecto de los insecticidas en la germinación de *Beauveria bassiana* a las 96 horas de incubación.

La viabilidad de *B. bassiana* sembrada en presencia de las dosis de los fertilizantes tuvo una disminución máxima del 8%, no encontrándose diferencias estadísticas entre ningunos de los resultados según la prueba de Tukey con una significancia del 5%, resultado que permite concluir que todos los fertilizantes fueron compatibles con el microorganismo (Figura 13).

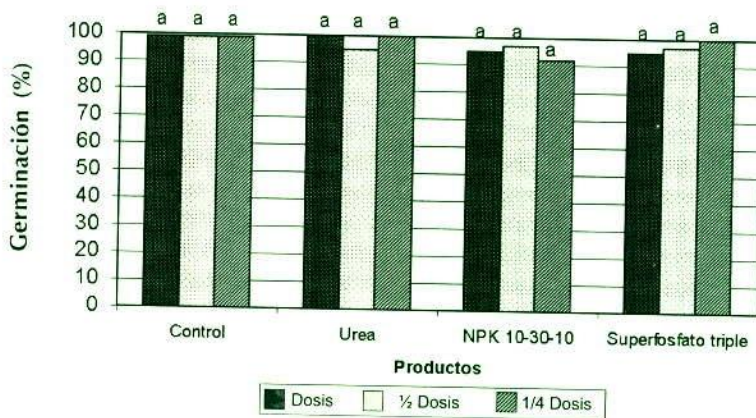


Figura 13. Compatibilidad in vitro de *Beauveria bassiana* con fertilizantes usados en el cultivo de papa.

Tabla 6. Resumen de la compatibilidad de la cepa Bv025 de *Beauveria bassiana* con agroquímicos utilizados en el cultivo de la papa.

Producto	Compatibilidad
Pencycuron	Compatible
Benomil	Incompatible
Vitavax	Incompatible
Metalaxyl	Incompatible
Fosetil aluminio	Incompatible
Carbofurán	Compatible
Oxicloruro de cobre	Compatible
Carbosulfán	Compatible
Permetrina	Compatible
Clorpirifos	Incompatible
Profenofos	Incompatible
Úrea	Compatible
NPK 10-30-10	Compatible
Superfosfato triple	Compatible

3.8. Determinación de la eficacia de los granulados bajo condiciones de casa de malla.

Conjuntamente con la caracterización física de los granulados se llevó a cabo la evaluación de la actividad biocontroladora de estos, bajo condiciones de casa de malla, como un paso siguiente de evaluación posterior a los bioensayos realizados bajo condiciones de laboratorio. Para tal fin se determinó la unidad experimental que consistió en una materia de capacidad de 5 kg de suelo con una planta de *Solanum phureja*. A cada materia se hizo la aplicación de cada preformulado en forma de corona alrededor de la planta, a una dosis de 1 g/planta. Posteriormente, cada materia se infestó con 10 adultos del gusano blanco de la papa a los cuales se les llevó el registro de mortalidad diaria. Se tuvieron tres repeticiones por tratamiento distribuidos en un diseño experimental completamente al azar.

Los resultados obtenidos en los bioensayos realizados con insectos adultos de *P. vorax* mostraron que los preformulados GR2 y el GR4 produjeron mortalidades acumuladas del 100% al final del bioensayo (día 20), mientras que a este mismo tiempo los prototipos GR1 y el GR3 produjeron mortalidades del 96.55% y 89.65% respectivamente (Figura 14). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad ocasionados por los cuatro granulados después de 20 días de ser aplicados los tratamientos, pero sí entre los tratamientos de control biológico y los tratamientos testigo.

El testigo absoluto (Ta), al finalizar el ensayo presentó una mortalidad acumulada del 9.37%, lo que corroboró que la muerte de los insectos cuando se aplicaron las cuatro preformulaciones fue causada por la acción biocontroladora del hongo entomopatógeno.

El testigo tratado (Tt), ocasionó una mortalidad del 12.5% y presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos GR1, GR2, GR3 y GR4. Este hecho permitió confirmar que los excipientes utilizados en las preformulaciones no provocaron la muerte del insecto plaga y por lo tanto se puede concluir que son aptos para ser utilizados en la manufactura de los granulados.

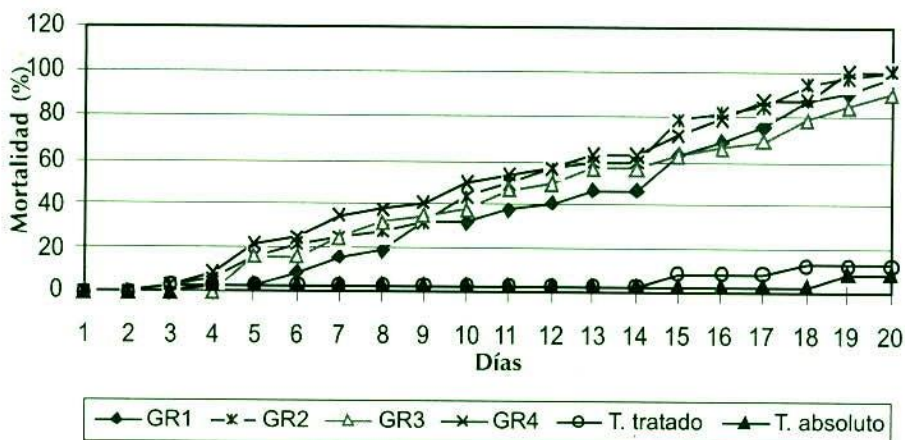


Figura 14. Porcentaje de mortalidad acumulada de los tratamientos sobre adultos de *P. vorax* en condiciones de casa de malla. GR = Granulado, T = Testigo

Debido a que no se presentaron diferencias significativas en la mortalidad producida en los insectos por los granulados GR1, GR2, GR3 y GR4, se concluyó que todos tienen la misma actividad biocontroladora del gusano blanco de la papa.

Teniendo en cuenta las características físicas de los granulados evaluados y su actividad biocontroladora y aunque el análisis estadístico realizado a cada una de las pruebas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, se seleccionó el prototipo GR1 por presentar excelentes características físicas y de actividad, y por resultar más económico debido a que incluye menos excipientes en la formulación con respecto a los demás.

3.9. Determinación de la estabilidad del granulado bajo condiciones de almacenamiento.

Para determinar la vida útil del granulado, se realizó un estudio de estabilidad en almacenamiento a tres temperaturas (8°C, 18°C y 28°C). Para tal fin se realizó una producción masiva, a partir de la cual se elaboró un lote de granulado y se obtuvieron conidios secos sin formular; tratamientos a los cuales se les determinó su viabilidad mediante la técnica de recuento en placa en medio Saboureaud-Rosa de Bengala. Se almacenaron 90 muestras de 0,1g del granulado y de los conidios secos del hongo

sin formular en viales de vidrio estériles y se taparon con un tapón de caucho asegurado con un agrafe. Lotes de 30 viales de cada tratamiento fueron almacenados bajo las tres condiciones de temperatura y mensualmente durante 24 meses fue evaluada su viabilidad.

Los resultados mostraron un efecto de la temperatura en la estabilidad del microorganismo, ya que las mayores pérdidas se presentaron para los dos tratamientos cuando estos se almacenaron a 28°C, seguidas de las pérdidas a 18°C y por último, los tratamientos más estables fueron aquellos que se almacenaron a temperatura de refrigeración, siendo dicha condición recomendable para obtener la mayor vida útil del producto. También se observó que a las tres temperaturas de almacenamiento, el granulado siempre presentó menores pérdidas que los conidios puros, sugiriendo que los componentes del granulado podrían brindar cierta estabilidad a las células durante el almacenamiento. El granulado almacenado a 8°C no presentó pérdidas significativas de la viabilidad hasta el mes 19 de almacenamiento, no superando éstas el 10%, resultado que indica que la vida de anaquel de este granulado almacenado bajo condiciones de refrigeración es de 19 meses, un tiempo promisorio si se considera que la mayoría de productos biológicos no reportan vidas útiles superiores a un año (Figura 15).

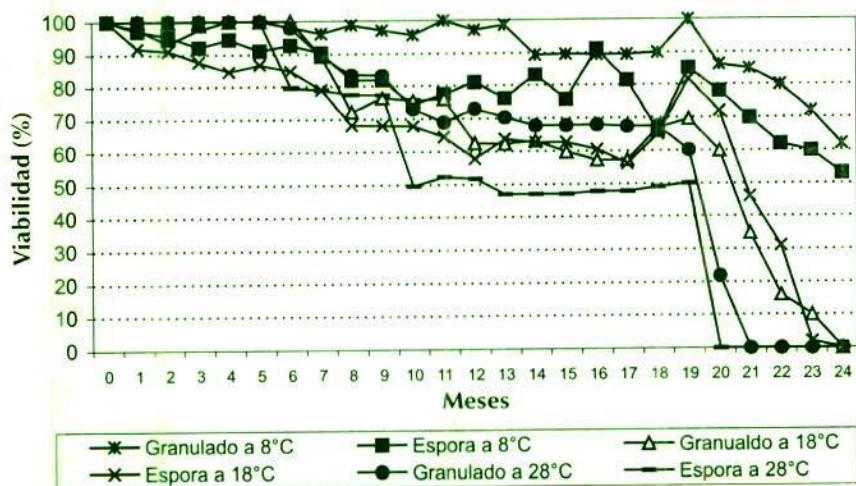


Figura 15. Estabilidad del granulado GR1 bajo condiciones de almacenamiento a tres temperaturas durante 24 meses.

4. Determinación de dosis y frecuencias de aplicación de los preformulados a base de *B. bassiana* en campo⁷

4.1. Determinación de dosis de aplicación de los preformulados a base de *B. bassiana* en campo.

Con el propósito de seleccionar una dosis de aplicación y un granulado no dispersable para las pruebas de campo con agricultores, se realizó un bioensayo preliminar en una parcela experimental de 1.200 m² ubicado en un lote del Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica. El ensayo se llevó a cabo sobre papa variedad Diacol - Capiro sobre la cual se evaluaron dos preformulados de granulados no dispersables y dos dosis de aplicación de dichos granulados.

Tratamientos

T1 = Granulado #1 (GR1):	Dosis 0.5 g / planta
T2 = Granulado #1 (GR1):	Dosis 1 g / planta
T3 = Granulado #2 (GR2):	Dosis 0.5 g / planta
T4 = Granulado #2 (GR2):	Dosis 1 g / planta
T5 = Testigo Comercial:	Carbofurán 1 g/planta
T6 = Testigo Absoluto	

⁷ Carlos Espinel Correal, B. Sc.; María Victoria Zuluaga, I. A.; Laura Villamizar, Q. E, M. Sc.; Jacquelin López, Q. E.; Alba Marina Cotes, Ph. D.; Aristóbulo López Ávila, Ph. D.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones, cada repetición consistió en una parcela de 50 m² de área, que contenía tres surcos de 10 m de longitud, separados entre sí por 1 m. Cada parcela se separó por un surco sin sembrar, con el propósito de evitar algún efecto de borde.

Se llevaron a cabo las labores del cultivo y dentro de éstas se realizaron las tres aplicaciones de los preformulados granulados: En la siembra, en la brotación completa y en el aporque. La primera aplicación se realizó distribuyendo el granulado en forma de corona sobre la semilla y cubriéndolo con suelo. Las otras aplicaciones se realizaron de igual forma distribuyendo el granulado sobre la base de la planta.

Durante el ciclo del cultivo se ubicó una trampa de caída en el surco central de cada tratamiento, con el propósito de observar la presencia del insecto en las parcelas experimentales.

La evaluación del daño efectuado por el gusano blanco de la papa se realizó sobre los tubérculos cosechados. Se recolectaron todos los tubérculos de cada parcela, en donde se midió el peso total de la producción por parcela. La revisión del daño del gusano blanco de la papa se llevó a cabo haciendo un muestreo en el que se tomó un número de tubérculos equivalentes al 10% del peso total de la producción.

Se procesaron los datos en porcentaje de daño y en porcentaje de protección según la fórmula:

$$\% \text{ protección} = \frac{\%dT - \%dT_o}{\%dT} \times 100$$

donde:

%dT: porcentaje de daño encontrado en el testigo absoluto

%dT_o: porcentaje de daño encontrado en el tratamiento

Al cabo de la cosecha de todas las parcelas del bioensayo se encontró que en el tratamiento de granulado #1(GR1) con una dosis de 0.5 g/planta, la producción en la parcela fue de 66.9 kg en promedio; en el tratamiento con el GR 1 con una dosis de 1g/planta, la producción fue de 68.5

kg. Para el caso del granulado #2 (GR2), la producción fue de 60.2 kg y 69.6 kg, respectivamente. El tratamiento químico y el testigo absoluto presentaron una producción de 49.8 kg y 50.3 kg, respectivamente. A pesar de que cuantitativamente se observaron diferencias en los rendimientos obtenidos en los diferentes tratamientos, según la prueba de comparación múltiple de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 16).

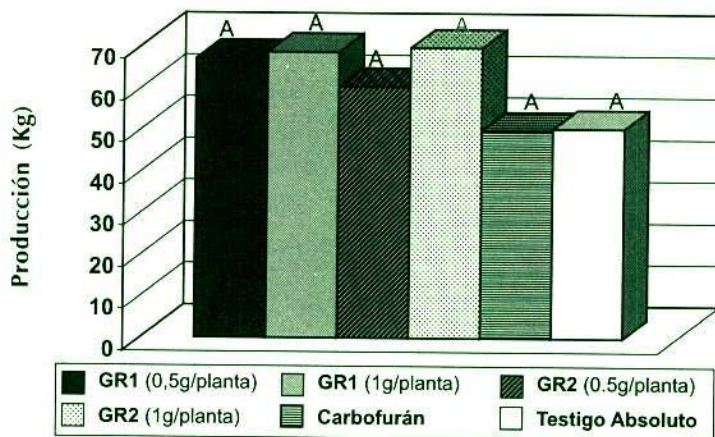


Figura 16. Producción promedio por parcela de tubérculos en los tratamientos del bioensayo preliminar en campo.

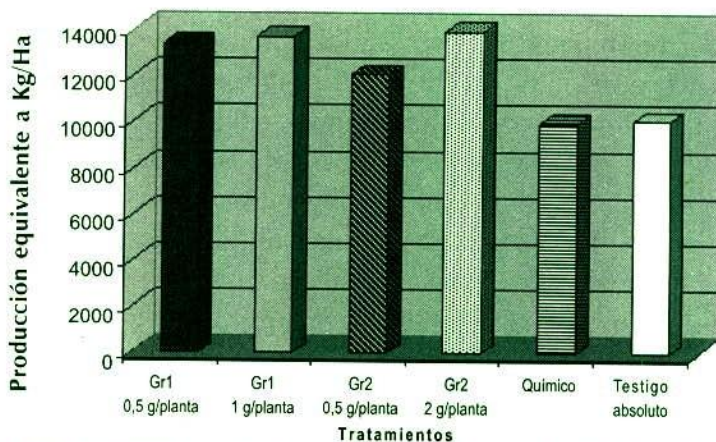


Figura 17. Comparación entre la equivalencia de la producción de tubérculos en las parcelas del bioensayo y la producción teórica en una hectárea de papa variedad Diacol-Capiro.

Al calcular la equivalencia en producción de los tratamientos del ensayo, partiendo de que en promedio la producción de la variedad Diacol-Capiro es de 18 toneladas por hectárea (18.000 kg) y que el área de cada parcela del ensayo fue de 50 m², se tiene que para el tratamiento GR1 con dosis de 0.5 g/planta, la producción equivaldría a 13.390 kg de papa. Para el tratamiento GR1 con dosis 1 g/planta, la producción equivaldría a 13.700 kg de papa. En el tratamiento GR2, con dosis 0.5 g/planta, la producción equivaldría a 12.040 kg de papa. Para el mismo granulado 2, con dosis de 1 g/planta, la producción equivaldría a 13.920 kg de papa. En el caso del tratamiento con Carbofurán y el testigo absoluto, la producción equivaldría a 9.970 kg y 10.060 kg, respectivamente (Figura 17). Esta baja producción se pudo deber a condiciones ajenas a los tratamientos involucrados; tal es el caso de que no se presentaron lluvias que permitieran la adecuada tuberización, etapa del cultivo en que es muy necesario este factor para una mayor producción y un mayor engrosamiento del tubérculo.

Al aplicar la fórmula de porcentaje de protección, el preformulado Gr1 con las dosis 0.5 g/planta y 1 g/planta protegió contra gusano blanco al 70.3% y 62.1% de los tubérculos de la parcela, respectivamente. El preformulado Gr2 con 0.5 g/planta y 1 g/planta protegió al 68.4% y 73%, respectivamente, mientras que Furadán solamente ejerció una protección al 37.8% de los tubérculos de la parcela (Figura 18).

Aunque no se podrían dar resultados definitivos en cuanto a los datos de producción, debido a las condiciones adversas a que fue expuesto el cultivo en las primeras etapas de desarrollo (deficiencia de riego), se puede observar una tendencia en este importante factor. Los resultados mostraron que en general los preformulados granulados son promisorios factores de control contra el ataque del gusano blanco de la papa, debido a que existieron diferencias significativas entre estos preformulados con el testigo químico y con el testigo absoluto. A su vez, se evidencia una mayor producción en estos tratamientos, aunque no necesariamente se podrían relacionar estos resultados únicamente con el uso del insecticida microbiano, debido a que en la producción pueden intervenir otros factores durante el ciclo del cultivo.

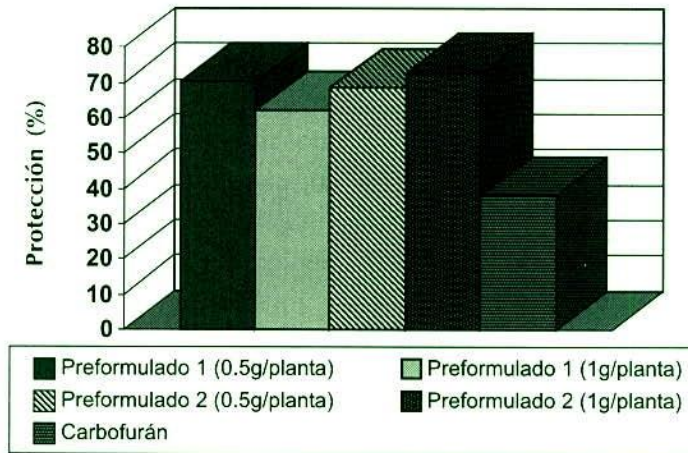


Figura 18. Porcentaje de protección de tubérculos obtenidos en la evaluación de preformulados a base de *B. bassiana*.

Durante el ciclo del cultivo se observó una presencia constante del adulto de gusano blanco evidenciado en los individuos encontrados en las trampas de caída ubicadas en el surco central de cada parcela. Aunque presentó una disminución de la presencia del insecto en las trampas a medida que las plantas se desarrollaban. Esto pudo deberse a que ya no tuvieron que movilizarse tanto para buscar su alimento y se establecieron en una o dos plantas vecinas, evitando su caída en las trampas. También se observó la germinación de *B. bassiana* proveniente de los granulados, evidenciado por el micelio colonizando el suelo alrededor del tallo de la planta de papa.

En conclusión, se destacaron el preformulado granulado 1 con la dosis de 0.5 g/planta y el preformulado granulado 2 con la dosis de 1 g/planta. Esto indicaría que puede utilizarse cualquiera de estos dos granulados con las dosis de 0.5 g/planta ó 1g/planta. Vale la pena mencionar que una limitante importante de estos granulados fue la dificultad en la aplicación del producto en las etapas avanzadas de desarrollo del cultivo, tales como brotación completa y aporque. Debido a que la planta tiene un follaje denso y los surcos se encuentran “cerrados” por este follaje, se requiere la aplicación manual del mismo para que el granulado llegue a la base de la planta.

Hay que tener en cuenta que las aplicaciones del insecticida microbiano deben realizarse de forma tal que el efecto de éste no se vea afectado negativamente por otras prácticas del cultivo, como puede ser el caso de la aplicación de fungicidas u otros insecticidas. En este caso, y en razón de la incompatibilidad con los fungicidas y con los otros agroquímicos evaluados, se recomienda esperar un tiempo prudencial para hacer la aplicación del insecticida microbiano, teniendo en cuenta la residualidad de los productos químicos.

4.2. Determinación de frecuencias de aplicación de los preformulados a base de *B. bassiana* en parcelas experimentales.

Con el propósito de evaluar uno de los granulados a base de *B. bassiana* seleccionado en la etapa anterior (Gr 2) se llevaron a cabo ensayos en dos fincas de municipios de Cundinamarca. En vista de las dificultades mencionadas anteriormente en relación con la aplicación del granulado en estados avanzados del cultivo, conjuntamente con el granulado se evaluaron dos prototipos de insecticida microbiano de aplicación líquida también desarrollados en el laboratorio. Estos se desarrollaron a base de la misma cepa de *B. bassiana*, con el fin de brindar alternativas al agricultor teniendo en cuenta los parámetros de mayor facilidad de aplicación y por ende, una mayor eficiencia en el tiempo utilizado para esta labor.

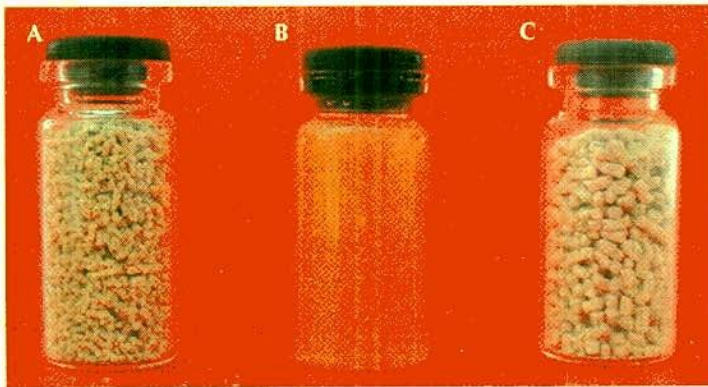


Figura 19. Prototipos de insecticidas microbianos evaluados en campo.
A. Granulado dispersable. B. Concentrado emulsionable (suspensión oleosa).
C. Granulado no dispersable. Fotografía: Juan Alberto Arias.

El primer municipio seleccionado fue Chocontá, vereda El Tejar, finca Laguneta, a una altura de 2.680 msnm. El uso actual de los lotes es para cultivos de papa y potreros para pastoreo. El lote del ensayo provino de potrero, encontrándose rodeado por cultivos de papa. Se seleccionó debido a que en proyectos anteriores se había trabajado en esta finca, la cual había presentado niveles altos de población del insecto plaga.

El segundo municipio fue Zipaquirá, vereda Páramo de Guerrero, finca El Chorro, ubicada a una altura de 3.240 msnm. El lote en donde se estableció el ensayo, provino de cultivo de papa y fue cosechado a mediados del mes de febrero. Además, según información dada por profesionales de FEDEPAPA, esta región es una de las que presenta mayor incidencia del gusano blanco de la papa.

Los tratamientos empleados en los ensayos correspondieron al granulado no dispersable (Ga), gránulos dispersables (Gl) y concentrado emulsionable, también definido como suspensión oleosa (So). Al tiempo se evaluaron dos frecuencias de aplicación; la primera constó de tres aplicaciones en las etapas de siembra (S), brotación completa (Bc) y aporque (A); la segunda, estuvo constituida por cuatro aplicaciones en las etapas de siembra (S), brotación completa (Bc), aporque (A) y pos-aporque (Pa) (Tabla 7).

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones. La unidad experimental fue una parcela de cinco surcos de 10 m de longitud, separados entre sí por 1 m. Cada parcela se separó por un surco sin sembrar, con el propósito de evitar algún efecto de borde.

La primera aplicación con los tres productos a base de *Beauveria bassiana*, se llevó a cabo en los dos municipios ocho días antes de la siembra, acorde con las especificaciones de los tratamientos. Las dosis empleadas correspondieron a 33kg/Ha⁻¹ de formulación del granulado no dispersable, 1 L.Ha⁻¹ de suspensión oleosa suspendida en 200 L de agua y 1kg/Ha⁻¹ de gránulos dispersables suspendidos en 200 L de agua. En todos los casos a pesar de que los productos tenían concentraciones diferentes, (10⁸ conidios.g⁻¹ para el granulado y 10¹⁰ conidios.mL⁻¹ para la suspensión oleosa) la concentración aplicada fue equivalente (10⁸conidios.g⁻¹) para los diferentes prototipos de insecticida microbiano. En el caso de las suspensiones, se emplearon fumigadoras de presión constante a 60 psi y boquillas de cono abierto y baja descarga (figura 20).

Tabla 7. Descripción y distribución de los tratamientos en las parcelas establecidas en los dos municipios.

MUNICIPIO DE CHOCONTÁ				
Tratamiento	Descripción	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	Ga / (S-Bc-A)	108*	212	309
2	Ga / (S-Bc-A-Pa)	109	208	311
3	Gl / (S-Bc-A)	103	202	308
4	Gl / (S-Bc-A-Pa)	106	203	310
5	So / (S-Bc-A)	112	207	306
6	So / (S-Bc-A-Pa)	101	205	302
7	Ga(S) / So(Bc-A)	105	206	301
8	Ga(S) / So(Bc-A-Pa)	102	210	303
9	Ga(S) / Gl(Bc-A)	104	204	307
10	Ga(S) / Gl(Bc-A-Pa)	111	207	304
11	Testigo químico	107	201	312
12	Testigo absoluto	110	209	305
MUNICIPIO DE ZIPAQUIRÁ				
Tratamiento	Descripción	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	Ga / (S-Bc-A)	105*	204	306
2	Ga / (S-Bc-A-Pa)	110	203	308
3	Gl / (S-Bc-A)	111	201	303
4	Gl / (S-Bc-A-Pa)	109	207	302
5	So / (S-Bc-A)	108	212	310
6	So / (S-Bc-A-Pa)	106	211	304
7	Ga(S) / So(Bc-A)	112	206	301
8	Ga(S) / So(Bc-A-Pa)	103	209	311
9	Ga(S) / Gl(Bc-A)	107	208	307
10	Ga(S) / Gl(Bc-A-Pa)	101	205	312
11	Testigo químico	104	202	309
12	Testigo absoluto	102	210	305

(*) Corresponde a la numeración dada al azar para su distribución en cada bloque.
Ga: gránulos no dispersables; **Gl:** gránulos dispersables; **So:** suspensión oleosa o concentrado emulsionable; **S:** Siembra; **Bc:** Brotación completa; **A:** aporque; **Pa:** Pos aporque.



Figura 20. Aplicación de los productos a base de *B. bassiana*. A. Concentrado emulsionable; B. Granulado no dispersable.

Fotografías: Carlos Espinel y Juan Alberto Arias.

La siembra de la parcela de Chocontá se efectuó con material de papa criolla, la distancia empleada entre plantas fue de 30 centímetros, utilizando uno o dos tubérculos por sitio, según su tamaño. Al fondo del surco se aplicó fertilizante 10-30-10, en dosis de 600 kg.Ha⁻¹, en las parcelas de tratamiento del agricultor, además se aplicó cal dolomítica, en relación 1:1 y Profenofos (Curacron), en dosis de 20 cm³ de producto comercial/ 20 L de agua al suelo y la semilla.

La parcela en Zipaquirá, también se sembró con papa criolla, las especificaciones de siembra fueron las mismas que en Chocontá, a excepción de la aplicación de cal dolomítica y de Profenofos.

Para determinar la presencia o ingreso de gusano blanco a las parcelas, se instalaron en cada uno de los lotes 10 trampas de caída en la periferia, junto con las trampas de feromonas para captura de machos de *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella*, de las cuales se instalaron cinco de cada una, distribuidas en cada uno de los lotes. Estas fueron evaluadas semanalmente. Simultáneamente, se llevó el registro de precipitación acumulada semanal.

Con la brotación completa de los cultivos, se procedió a realizar la segunda aplicación del insecticida microbiano, empleando la misma dosis

aplicada a la siembra para los tres productos. Posteriormente, se efectuaron las aplicaciones en aporque y posaporque, de acuerdo con las especificaciones de los tratamientos.

La cosecha de los cultivos en las fincas de los dos municipios consistió en recolectar todos los tubérculos producidos por siete plantas escogidas al azar del surco central de cada parcela. Así se tuvo un total de 36 muestras por cultivo. Estos tubérculos se llevaron al laboratorio para su evaluación.

La evaluación consistió en la revisión de la presencia o ausencia de daño por gusano blanco en cada tubérculo. Se tomaron mediciones de número total de tubérculos sanos y afectados, peso total de tubérculos sanos y afectados y se determinó la severidad mediante una división de cada tubérculo en cuatro partes. Se estableció la escala de severidad 1 para la presencia de daño en un cuarto del tubérculo; severidad 2 para la mitad del tubérculo con daño; severidad 3 para las tres cuartas partes del tubérculo con daño y severidad 4 para las cuatro partes del tubérculos con presencia del daño de gusano blanco. Todos los datos se registraron en una tabla diseñada para tal fin.

A lo largo del ciclo del cultivo, semanalmente se efectuaron evaluaciones sanitarias, y registros de captura de *Premnotrypes vorax*, *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella*, encontrando para el ensayo en Chocontá, que las mayores capturas de adultos de *P. vorax* expresadas como "número de insectos por trampa", ocurrieron durante las primeras dos semanas de establecido el cultivo, descendiendo sustancialmente en las semanas siguientes (figura 21). Entre tanto, las capturas de *T. solanivora*, paulatinamente ascendieron, alcanzando un máximo de captura de 33 adultos hacia la semana décima después de la siembra; posteriormente, se presentó un descenso en la captura, éste probablemente relacionado con el aumento en la precipitación y con una aplicación de un insecticida piretroide, a pesar de que el objetivo de esta aplicación fue el de disminuir la elevada población de *Epitrix sp.*, pero debido a que este producto también se recomienda para el control de la polilla guatemalteca, pudo efectuar una reducción en la población de este insecto. La presencia de *Phthorimaea operculella* durante todo el ciclo del cultivo no fue significativa, presentándose

seis adultos en total en la séptima semana de lectura, por lo que se considera que no hubo incidencia de este insecto (figura 21).

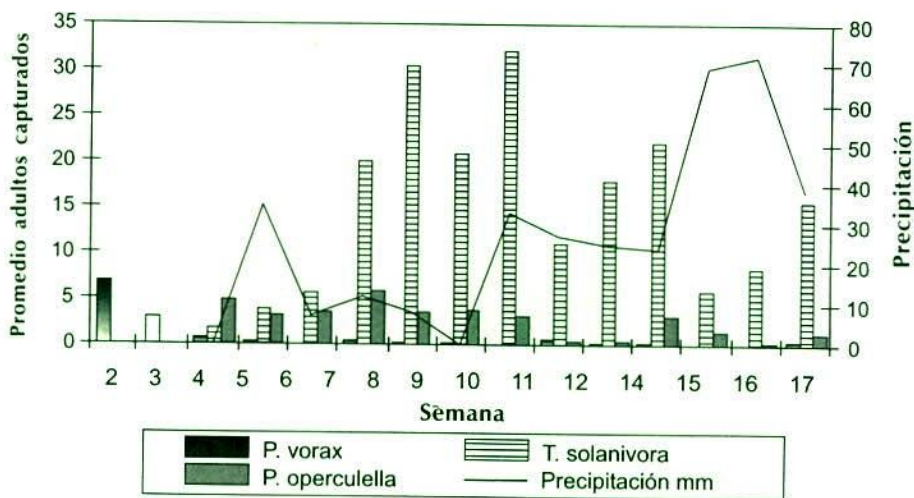


Figura 21. Capturas semanales de *P. vorax*, *T. solanivora* y *P. operculella* en la finca del municipio de Chocontá.

En el ensayo en Zipaquirá, las mayores capturas de gusano blanco (dos individuos en promedio) se presentaron en las primeras semanas de establecido el cultivo, posteriormente descendió presentado un comportamiento más estable a lo largo de nueve semanas. Sin embargo, en las 17 semanas evaluadas el promedio de captura en las trampas no superó 2 adultos/trampa por semana, debido posiblemente, a la elevada población de plantas toya alrededor del cultivo, en donde se evidenció la existencia de adultos del insecto. Tras la eliminación de toyas en el lote vecino hacia la semana 15, se registró un aumento en la captura de adultos en las trampas, ya que se encontraron hasta 2 adultos por trampa en promedio, indicando posiblemente el ingreso al cultivo de los insectos que se encontraban en el lote vecino (figura 22).

En cuanto a la población de *T. solanivora* y *P. operculella*, se mantuvieron bajas (inferiores a cinco y a dos insectos en promedio, respectivamente) a lo largo de todo el período vegetativo, no representando riesgo para la producción.

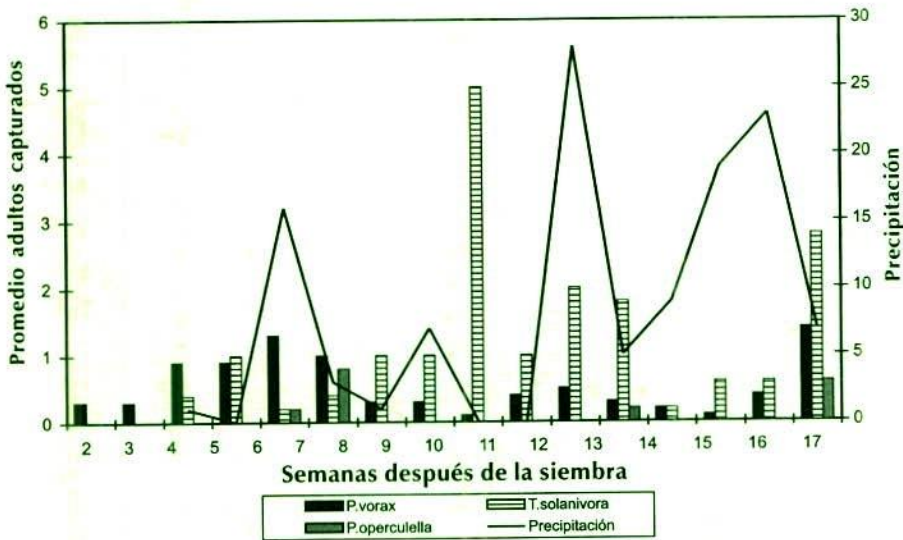


Figura 22. Capturas semanales de adultos de gusano blanco (*P. vorax*), *T. solanivora* y *P. operculella*, en la finca del municipio de Zipaquirá.

Al analizar estadísticamente los resultados de control, no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo el daño ocasionado por gusano blanco en cada una de las Parcelas Experimentales, fue analizado porcentualmente, encontrando para el caso de la parcela ubicada en Chocontá que los tratamientos que presentaron menor porcentaje de daño correspondieron a los tratamientos T1 (aplicación de gránulos no dispersables a la siembra, brotación completa y aporque) y T6 (Suspensión oleosa a la siembra, brotación completa, aporque y posaporque), con el 28 % de daño, seguido del T9 (aplicación de gránulos no dispersables a la siembra, y gránulos dispersables a la brotación completa y aporque) con 29% de daño (figura 23). En los resultados del ensayo en Zipaquirá, el menor porcentaje de daño se presentó en el testigo químico con el 2% de material afectado, seguido de los tratamientos T6 y T8 con el 6% de daño, correspondientes a la aplicación del concentrado emulsionable en cuatro etapas del cultivo y aplicación de gránulos no dispersables a la siembra y de concentrado emulsionable en emergencia completa, aporque y posaporque, respectivamente (figura 23).

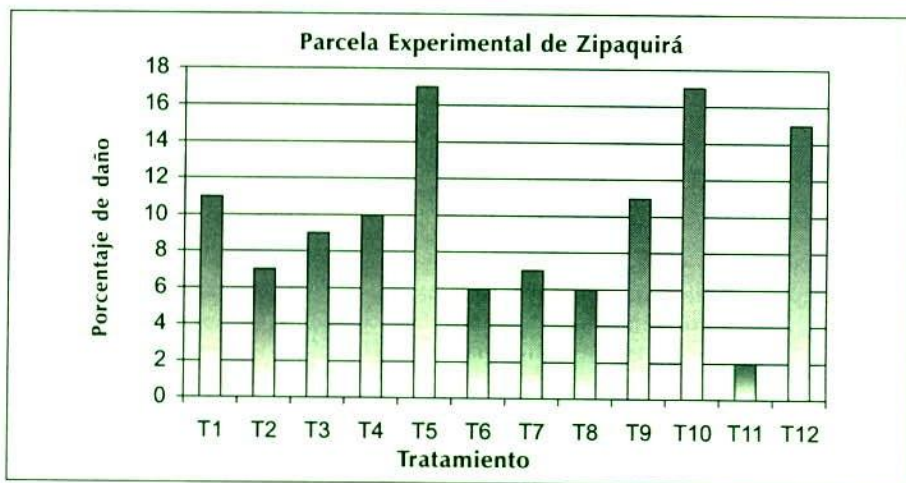
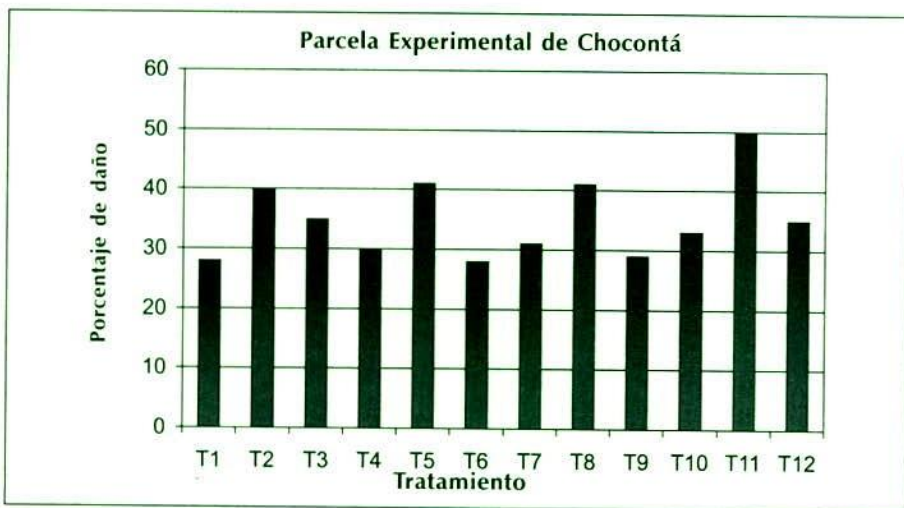


Figura 23. Porcentaje de daño causado por el gusano blanco de la papa en las parcelas experimentales ubicadas en Chocontá y Zipaquirá, Cundinamarca. La descripción de los tratamientos aparece en la Tabla 7.

En la evaluación del porcentaje de protección ofrecida por el insecticida biológico contra el gusano blanco de la papa, se encontró que el tratamiento que brindó mayor protección fue el T6, correspondiente a la aplicación de concentrado emulsionable en cuatro etapas del cultivo, con el 20 y 60% de protección, en Chocontá y Zipaquirá, respectivamente (Figura 24).

El tratamiento T5, correspondiente al empleo de concentrado emulsionable o (suspensión oleosa) en tres etapas del cultivo, no presentó protección ni en la parcela experimental de Chocontá ni en la de Zipaquirá, indicando con esto la importancia de la aplicación en la etapa de posaporque.

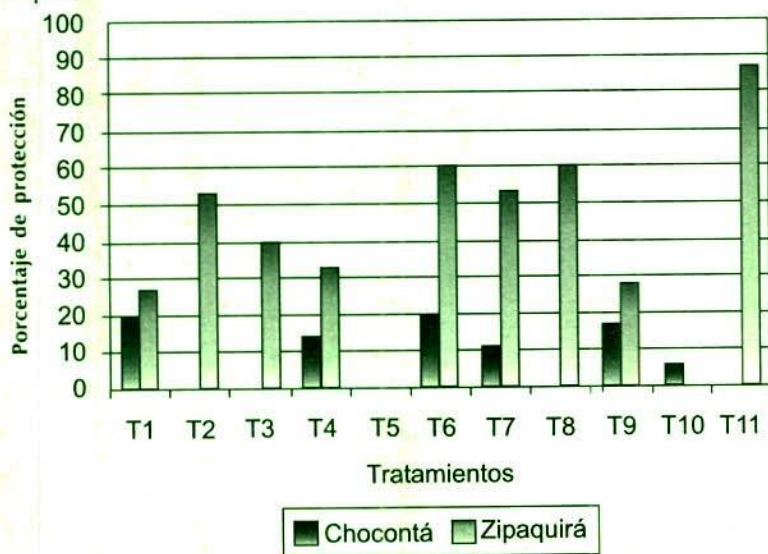


Figura 24. Porcentaje de protección de *B. bassiana* contra el gusano blanco de la papa. Parcelas Experimentales de Chocontá y Zipaquirá. La descripción de los tratamientos aparece en la Tabla 7.

Al analizar los rendimientos obtenidos por tratamiento por hectárea, se detectó una reducción sustancial en la producción de la Parcela Experimental de Chocontá, debido posiblemente a un ataque severo de *Phytophthora infestans* en etapas iniciales del cultivo, en donde el rendimiento máximo fue de 11.5 T.Ha⁻¹; entre tanto en la parcela experimental de Zipaquirá, la máxima producción fue de 26 toneladas/Ha.

5. Recomendaciones y perspectivas

A partir de las observaciones y de los resultados obtenidos en campo, se han generado recomendaciones técnicas, fundamentales para la incorporación del insecticida microbiano para el control de gusano blanco mediante un esquema de manejo integrado del cultivo de la papa.

Recomendaciones para el control del gusano blanco de la papa con *B. bassiana*, dentro de un esquema de manejo integrado del cultivo.

1. Aplicación de la formulación gránulos no dispersables a base de *B. bassiana* ocho días antes de la siembra. Debido a que dentro de la rutina de tratamiento de semillas, se efectúa la desinfección de éstas con productos químicos que pueden afectar el desarrollo del hongo entomopatógeno. Es importante realizar la aplicación del insecticida microbiano ocho días previos a la siembra, para permitir el establecimiento del mismo organismo en el suelo, empleando una dosis de 33 kg de producto por hectárea.

2. Semilla certificada. El empleo de semilla sana y de buena calidad, es esencial para un manejo integrado del cultivo, ya que así se reduce la probabilidad de introducir al cultivo problemas fitosanitarios que implicarían una mayor utilización de plaguicidas químicos.

3. Fertilización acorde con los requerimientos del suelo y del cultivo. En la medida en que se apliquen solamente los fertilizantes necesarios, teniendo en cuenta los análisis del suelo, se reducen costos y se obtendrán plantas vigorosas y menos afectadas por problemas fitosanitarios.

4. Instalación de trampas de caída para gusano blanco. Las trampas de caída son un componente para la detección de sitios de ingreso de adultos del insecto, siendo un componente que facilita el manejo del mismo, ya que permite ejercer medidas de control, de manera localizada.

5. Instalación de trampas de feromonas. Las trampas de feromonas para *Phthorimaea operculella* y para *Tecia solanivora* permiten desarrollar un sistema de vigilancia de la plaga, desde antes de establecer el cultivo hasta la cosecha. Este seguimiento permite detectar su incremento y recomendar su control cuando se encuentren capturas promedio por trampa semanales de más de 50 individuos a partir de floración.

6. Aplicación del concentrado emulsionable a base de *B. bassiana* en emergencia completa del cultivo. Debido a que durante esta etapa del cultivo es cuando se ha detectado el mayor ingreso de adultos de gusano blanco al cultivo, se recomienda el empleo del concentrado emulsionable en dosis de seis litros por hectárea. Aplicación que se realiza reconstituyendo el producto en agua y asperjándolo con bomba, lo que facilita su distribución.

7. Evaluaciones fitosanitarias. Éstas se constituyen en una de la principales labores de rutina en el cultivo, consisten en identificar los problemas y niveles de insectos y de enfermedades que afectan al cultivo, permitiendo tomar en forma oportuna decisiones de manejo.

8. Manejo de gota. El control de enfermedades en el cultivo, en especial de la gota, debe dirigirse a la implementación de inspecciones regulares, en las que se identifica la presencia de patógenos, efectuando la aplicación de productos preventivos y curativos de ser necesario, rotando los ingredientes activos, teniendo en cuenta los períodos de descanso entre aplicaciones de fungicidas y del insecticida microbiano, siendo estos de al menos cinco días entre una y otra aplicación.

9. Deshierba. Dentro de los componentes culturales de manejo, la deshierba en forma oportuna es una de las labores que cumple con la remoción de material vegetal indeseable que pueda ejercer competencia para el cultivo y convertirse en hospedero de plagas, además de proporcionar condiciones de microclima, óptimas para el desarrollo de patógenos.

10. Aporque adecuado y oportuno. Dentro del manejo integrado del cultivo, el aporque representa una herramienta valiosa en la protección de los tubérculos a la acción de plagas, es así como un aporque oportuno que se efectúe preferiblemente de manera "apisonada", es decir adicionando suficiente cantidad de suelo a la base de la planta, se constituye en una barrera física para algunos insectos y patógenos.

11. Utilización del concentrado emulsionable a base de *B. bassiana*, en aporque y posaporque. Este producto es de fácil aplicación, ya que se reconstituye en agua, formando una emulsión que se asperja con bomba. Éste permite una distribución homogénea del hongo en el lote. Quince días después de realizar la aplicación de aporque se debe realizar una última aplicación del insecticida microbiano que garantice la permanencia del hongo en el suelo y su acción sobre estados inmaduros y adultos de la plaga.

12. Cosecha oportuna. La cosecha oportuna de la producción, permite evitar el daño que puedan causar plagas sobre los tubérculos fisiológicamente maduros, que de permanecer por más tiempo en el suelo, están expuestos a la acción negativa de los mismos, afectando la calidad y disminuyendo los rendimientos del cultivo.

13. Incorporar los insecticidas microbianos y las recomendaciones para su uso en programas de manejo integrado del cultivo y transferir dicha tecnología a los agricultores utilizando la metodología de las escuelas de campo de agricultores ECAs, las cuales han demostrado su efectividad en la transferencia de metodologías a los productores mediante el desarrollo de investigación participativa de manera continua.

Como se pudo observar a lo largo del documento, el desarrollo de un insecticida microbiano seguro, eficaz y confiable demanda muchos esfuerzos, así como recursos humanos y económicos. Este insecticida microbiano se encuentra en etapa de desarrollo y por ende, aún se puede someter a mejoras y estudios que proporcionen un conocimiento mayor del mismo; como última reflexión y concientes que la búsqueda del conocimiento aún continúa, se plantean algunos temas en los que se debe trabajar con el fin de lograr el objetivo propuesto:

- Realizar un estudio de estabilidad de los insecticidas microbianos seleccionados (granulado y concentrado emulsionable) utilizando otros sistemas de empaque como recipientes plásticos y bolsas de Tetrafold de aluminio.
- Evaluar la compatibilidad de los insecticidas microbianos a base de *Beauveria bassiana* con otras alternativas de control biológico de los problemas fitosanitarios del cultivo de la papa como el insecticida microbiano a base de *Trichoderma koningii* para el control de la viruela de la papa y el uso de *Baculovirus phthorimae* para protección de la semilla de papa contra la polilla guatemalteca de la papa. De igual forma, estudiar la compatibilidad con otras medidas de control de plagas como el empleo de feromonas y kairomonas.
- Evaluar la eficacia de los prototipos de insecticida microbiano en diferentes zonas productoras de papa del país y en diferentes variedades de papa.
- Estudiar el efecto de los sistemas de aplicación y los factores involucrados durante este proceso como la presión estática, la presión hidráulica y la temperatura, sobre las características microbiológicas de *Beauveria bassiana*.
- Desarrollar estudios tendientes a evaluar el efecto de la aplicación del insecticida biológico sobre procesos fisiológicos de la planta y en general del cultivo.

6. Referencias Bibliográficas

AGROCADENAS, 2003. On line: www.agrocadenas.gov.co/papa/papa_descripcion.html (Consulta: enero 19 de 2004).

**VELEZ, P.; ESTRADA, M.; GONZÁLEZ, M.; VALDERRAMA, A., BUS-
TILLO, A.**, 2001. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Manejo integrado de plagas (Costa Rica). N° 62. pp. 38-53.

ALVARADO, A., 2000. On line: <http://redepapa.org/alvarado.pdf> (Consulta: enero 19 de 2004).

BIDOCHKA, M.; KHACHATOURIANS, H., 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular proteasa as virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshoper *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology. 56:362-370.

CABRERA, T., 2000. Aporte al conocimiento de la microbiota fúngica del suelo de la amazonía colombiana, con énfasis en tres grupos funcionales. Tesis de la Facultad de Ciencias. Carrera de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 353 p.

CALVACHE, H., 1980. El gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*. En: Memorias del curso sobre el control integrado de plagas de la papa. Bogotá: CIP, pp.18-24.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA, 1995. Así se controla el gorgojo de los Andes. Folleto divulgativo. BID-CIP. 8 pp.

CISNEROS Y VERA, 2000. On Line: www.cipotato.org/market/pgmr-prts/pr99/2000/17bauver.pdf. (Consulta: enero 22 de 2004).

COPPING, L. y MENN, J., 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest management Science*, vol. 56: 651-676.

DOBERSKI, J., 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of temperatures and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol 37, pp. 195-200.

DOMSCH, K.; GAMS, W.; ANDERSSON, T., 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press. London, vol. 1. pp. 136-140.

EPPO. 1984. On line: www.30.brinkster.com/cosave/ipcPremnotrypesspp.html (Consulta: 15 de enero de 2004).

FERNANDEZ, C.; COLMENARES, 1996. On Line: www.redpav-fpolar-info.ve/agrotrop/v47_3/0473a001.html. (Consulta: enero 22 de 2004).

GALLEGOS et al., 2002, On Line: www.ag.vt.edu/ipmcrsp/annrepoz/ecuadortopic2.pdf. (Consulta: enero 22 de 2004).

GONZÁLEZ, G.; POSADA, F.; BUSTILLO, A., 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé*: vol. 44 N° 3, pp. 93-101.

GRODEN, E.; LOCKWOOD, J., 1991. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 57, pp. 7-16.

GUERRA, A.; BERNAL, F., 1985. Algunas observaciones sobre el control biológico y mecánico de *Stenoma cecropia* Meyrick, defoliador de la palma de aceite (*Elaeis guineense*). En: Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Colombia. 72 p.

HERRERA, F., 1997. El gusano blanco de la papa. Biología, comportamiento y prácticas de manejo integrado. Programa Regional Agrícola. Corpoica. Produmedios. 14 pp.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 1986. "Se vuelve a presentar". Sección de Entomología. Notas y noticias entomológicas. (Colombia). 43 p.

JIMENEZ, J., 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Cenicafé: vol 43, N° 3, pp. 84-92.

LEON, M.; REY, V., 1995. Pruebas preliminares de patogenicidad de *Metarhizium spp.* y *Beauveria bassiana* sobre el grillo *Rhammatocerus schistocercoides*. En: Resúmenes XXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología.

LINGG, A.; DONALDSON, M., 1981. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 38, pp. 191-200.

LÓPEZ-ÁVILA, A., 1996. Insectos plaga del cultivo de la papa en Colombia. Papas colombianas con el mejor entorno ambiental, pp. 146 -154.

MATHIAS, K., 2001. Les possibilites de la lutte microbiologique, emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. La revue en sciences de l'environment sur le web. 2 :2-10.

MEDINA, C.; CATALÁN, W.; CRUZ, J. L.; PUMACAHUA, H., 1999. El manejo Integrado de plagas en el cultivo de la papa: avances y dificultades. En: Memorias del Seminario Taller Internacional. Cuzco-Perú, pp. 55-60.

MENDOZA, J., 1996. Problemática en el cultivo de la papa en Cundinamarca y Boyacá. En: Las papas colombianas, pp. 93-102.

MILLER, L.; LINGG, B.; MULLA, I., 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. Science. 219: 715-721.

QUIJANO, P., 1996. La papa y el desarrollo económico en Colombia. En: Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 114 p.

RIVERA Y PINTO, 2001. Evaluación de la patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache). Revista Colombiana de Entomología, vol. III. N° 2, pp. 53-65.

ROBERTS, D., 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. Microbial control of pest and plant disease. 45:441-464.

RODRÍGUEZ, D., 1984. Hongos entomopatógenos. En: Seminario sobre patología de insectos. Medellín. Socolen, pp. 51-93.

RODRÍGUEZ, D., 1986. Entomopatógenos registrados en el gusano blanco y pruebas de patogenicidad. En: Memorias sobre el curso de control integrado de plagas de Papa. Bogotá: ICA-CIP, pp.11-17.

SCHILLHOM-VAN VEEN, T. W.; D. A. FORNO; S. JOFFE; D. L. UMALI-DEININGER., S. COOKE, 1997. Integrated Pest Management: Strategies and policies for effective implementation. World Bank.

SMITH, R.; GRULA, E., 1985. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology: Vol 37. pp.222-230.

STOREY, K.; GARDNER, A., 1988. Movement and aqueous spray of *Beauveria bassiana* into the profile of four Georgia soil. Environ. Entomol, vol. 17, pp. 135-139.

TORRES, H.; ORTEGA, A.; ALCÁZAR, J.; AMES, T., 1993. Control biológico del gorgojo de los Andes (*Premnotrypes vorax*) con *Beauveria brongniartii*. CIP. Guía de Investigación 8. Perú. 37 p.

TORRES R. Y., 1996. Estudios básicos para el control microbiano del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) con *Beauveria spp.* y *Metarhizium sp.* Tesis de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 109 p.

TORRES, L., 1998. Evaluación de la actividad biocontroladora de cepas nativas de hongos entomopatógenos contra el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) mediante su utilización individual o combinada. Tesis de la Facultad de Ciencias. Carrera de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 121 p.

ZENNER, I. 1986. Guía general de manejo de plagas en el cultivo de la papa. Boletín Técnico. Bogotá (ICA). 36 p.

* * *