

ARTÍCULO TÉCNICO

Sandra Jaqueline Mena¹,
Luis Alberto Peña²,
Ranulfo González³

Title: CL₅₀ and pathogenic power of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates infecting *Premnotrypes vorax* populations

ABSTRACT

In order to evaluate an "ecologic" alternative for the control of the white worm potato (*Premnotrypes vorax*), were studied six *Beauveria bassiana* and one of *Metarhizium anisopliae* isolates, native of Nariño, Colombia. Their pathogenicity and variability were observed under laboratory conditions using a concentration of 1×10^7 spores.ml⁻¹. All the bio-control densities evaluated were pathogenic to *P. vorax*; however, there were big differences among the mortality caused by the isolates ($F_{7,14} = 4.64$; $P < 0.0001$), they varied from 13.3% for Bb2 up to 96.6% for Bb5. Later, on lethal concentration made by Probit - Raymon's analysis (1985), was established for each isolate in two development phases of *P. vorax* (larve and adults). The results presented a positive relation concentration/mortality and the calculated X² proved that the data were homogeneous and adjusted to the linear regression with a 95% level of confidence. The higher mortality percentage was found in the two phases of the isolates Bb4, Bb5, Bb7 and Bb8, for that, there was security to establish the mortality base line; on the other hand, the CL₉₉ where smaller, reason why they were pre selected for a future field study.

Key words: Biological control, entomopathogenic fungi, *Premnotrypes vorax*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

1. Universidad de Nariño, Colombia. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología. Sede Torobajo. Tel. 7217569. e-mail: sajamena@udenar.edu.co

2. CORPOICA, C.I. Obonuco. Km 5, vía Obonuco, A.A. 339, Colombia. tel 7233532. e-mail: corpoica@pacto.cetcol.net.co

3. Universidad del Valle, Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología, Sección de Entomología. Ciudad Universitaria Meléndez. Telefax (092) 3393243. eE-Mail: ranulfo@biologia.univalle.edu.co

CL₅₀ y variación de la patogenicidad en aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* evaluados en poblaciones de *Premnotrypes vorax*

RESUMEN

Con el fin de evaluar una alternativa "ecológica" para el control de gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*), se trabajó con seis aislamientos de *Beauveria bassiana* y uno de *Metarhizium anisopliae*, nativos del departamento de Nariño, Colombia. Inicialmente se estudió su patogenicidad y variabilidad en condiciones de laboratorio usando una concentración de 1×10^7 esporas.ml⁻¹, observándose que todos los aislamientos fueron patogénicos para el gusano blanco. Sin embargo, se presentaron diferencias significativas entre la mortalidad causada por éstos ($F_{7,14} = 4.64$; $P < 0.0001$) pues la mortalidad varió desde 13.3% para Bb2 hasta 96.6% para Bb5. Posteriormente, se establecieron las concentraciones letales mediante Probit - Analysis de Raymons (1985), para cada aislamiento y en dos estadios de desarrollo de *P. vorax* (larvas y adultos). Los resultados obtenidos presentaron una relación positiva concentración/mortalidad, y los X² calculados demostraron que los datos fueron homogéneos y se ajustaron a la línea de regresión con un nivel de confianza del 95%. En ambos estadios, los aislamientos Bb4, Bb5, Bb7 y Bb8 presentaron los porcentajes de mortalidad más altos; por esto, la línea base de mortalidad pudo ser establecida con mayor confianza y las CL₉₉ fueron las más bajas, razón por la que fueron preseleccionados para un futuro estudio en campo.

INTRODUCCIÓN

EN NARIÑO, Colombia, se cultivan anualmente de 25.000 a 30.000 hectáreas de papa que generan una producción de 550.000 a 660.000 ton/año, que abastece el consumo de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda, Quindío y Caldas (Calvache y Alvarado, 1980; González, 1996; Peña y Bolaños, 1997). Generalmente, los daños que sufre el tubérculo son causados principalmente por *Premnotrypes vorax* y *Naupactus* sp., los cuales tienen un impacto negativo en la calidad del producto, pues deterioran y llegan a reducir la calidad del tubérculo hasta en un 40%, afectando su calidad y competitividad en los mercados regionales y nacionales. De ahí, la necesidad de continuar los estudios encaminados a ampliar las técnicas para el control de estas plagas (Cerón, 1990; González, 1996; Peña y Bolaños, 1997).

El gusano blanco de la papa *P. vorax* es un insecto difícil de manejar; para lograr reducir su población a niveles que no causen daño económico, se recomienda utilizar diferentes estrategias de manejo; sin embargo, el control químico es actualmente el método comúnmente utilizado por los productores nariñenses,

quienes realizan entre dos y cuatro aplicaciones de insecticidas (a base de carbofurán) para el control de la plaga, según la frecuencia e intensidad de las lluvias (Valencia y Bohórquez, 1994). Lo anterior ocasiona altos niveles de contaminación en el tubérculo, dañando también la salud humana, el medio ambiente, las fuentes de agua, la fauna, la microflora del suelo y generando incrementos en los costos de producción (Delgado y Aguilar, 1980). Los costos que implica este tipo de control representan alrededor del 8% de los costos directos del cultivo.

Alternativas como el control biológico, mediante el uso de hongos entomopatógenos, es una medida complementaria importante en programas de manejo integrado de la plaga (Delgado y Aguilar, 1980). El uso de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como organismos entomopatógenos de *P. vorax*, puede representar una alternativa ecológica sostenible para el control del gusano blanco y mejorar la calidad del producto comercial (Rodríguez, 1984). Además, se considera de suma importancia, estudiar aislamientos de hongos entomopatógenos regionales, ya

que algunos estudios recomiendan utilizar aislamientos nativos extraídos del insecto, pues existen modificaciones específicas del hongo hacia el hospedero que pueden mejorar su acción patogénica (Roberts y Humbre, 1984).

En el presente estudio, a partir de recolecciones de material de campo, se obtuvieron seis aislamientos de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae*, los cuales ejercen control natural de *P. vorax*. Sin embargo, las concentraciones letales no habían sido investigadas como para pensar en dar recomendaciones a nivel comercial. Se evaluó la patogenicidad de siete aislamientos nativos en condiciones de laboratorio, y se estableció la concentración letal media para cada uno de ellos, seleccionando los que presentaron mayores tasas de mortalidad para una posterior evaluación en diferentes condiciones ambientales.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en Nariño, Colombia, en los laboratorios del Centro de Investigación Obonuco de CORPOICA, ubicado a una altura de 2710 msnm, con una temperatura promedio de 13°C, y una precipitación promedio anual de 840 mm. Los aislamientos Bb2, Bb3, Bb4, Bb5, Bb7, Bb8 de *B. bassiana* y Ma1 de *M. anisopliae*, purificados previamente de insectos infectados, así como los especímenes de *P. vorax* requeridos para el estudio, obtenidos de cultivos de papa infectados, fueron proporcionados por CORPOICA.

Biovaloración preliminar

Para determinar la variabilidad en la patogenicidad de los seis aislamientos de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae* en *P. vorax*, se utilizó, con algunas modificaciones, la metodología propuesta por González *et al.* (1993), y se usó un diseño completamente aleatorio. Se evaluaron ocho tratamientos y tres repeticiones; los tratamientos estuvieron formados por seis aislamientos de *B. bassiana* (Bb2, Bb3, Bb4, Bb5, Bb7, Bb8), uno de *M. anisopliae* (Ma1) y un testigo. La población de *P. vorax* fue constituida por 10 larvas por cada repetición para un total de 240 larvas evaluadas. Para realizar el experimento los insectos se desinfectaron con hipoclorito de sodio 0.5% (NaClO, 0.5%) durante dos minutos y lavados tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de hipoclorito.

El proceso utilizado para la inoculación con los aislamientos de hongos con-

sistió en colocar en inmersión el número total de larvas en una caja Petri (en la cual previamente se colocó una suspensión de 1×10^7 esporas.ml⁻¹), agitando durante cinco minutos. Al cumplir el tiempo de exposición se retiró de las larvas el exceso de suspensión mediante inversión de la caja de Petri sobre una toalla de papel seco. Cada insecto inoculado se colocó en un recipiente plástico previamente esterilizado, semitransparente, de 25 ml de capacidad, con tapa, y el fondo recubierto con papel filtro al que se le agregaron 500 µl de una solución de PDA (Papa-dextrosa-agar) + agua destilada estéril (ADE) 1:10000, favoreciendo el desarrollo del hongo, y se agregó una porción pequeña de papa para evitar la muerte de las larvas por inanición.

La evaluación de mortalidad de larvas de *P. vorax* se realizó cada 48 h. durante 20 días después de la inoculación, utilizando para esto un estereoscopio que permitió discriminar la mortalidad total y la mortalidad causada por el hongo; además, durante cada observación se adicionaron 0,5 ml de la solución PDA + Agua 1:10000 a cada uno de los frascos manteniendo así la humedad relativa alta ($T=15^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$; H.R.=90%). Finalmente, se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar, para determinar si existían diferencias significativas en la mortalidad total de larvas de *P. vorax*, la cual se obtuvo en cada uno de los aislamientos estudiados.

Establecimiento de la línea base de mortalidad

Se utilizó un diseño completamente al azar con ocho tratamientos y cinco repeticiones; los tratamientos estuvieron formados por seis aislamientos de *B. bassiana* (Bb2, Bb3, Bb4, Bb5, Bb7, Bb8), uno de *M. anisopliae* (Ma1) y un testigo. Cada aislamiento se evaluó en cinco concentraciones diferentes (con cinco repeticiones para cada concentración), y en dos estados diferentes de desarrollo de *P. vorax* (larvas y adultos), con cinco repeticiones cada una. Con base en trabajos previos, también realizados por CORPOICA, para el estudio con las larvas se utilizaron cinco concentraciones: 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 esporas.ml⁻¹, y para el caso de los adultos las concentraciones se ajustaron a 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} esporas.ml⁻¹, en cada uno de los aislamientos a evaluar. Cada concentración se probó con colonias de 10 individuos (larvas y adultos) de *P. vorax* con cinco repeticiones, para un total de

4000 individuos evaluados. Cada colonia se ubicó en una materia de barro de 1000 g de capacidad.

Las materas se llenaron hasta la mitad (500 g) con una mezcla estéril de suelo, arena y lombricompostos en partes iguales. En cada materia se sembraron tres tubérculos de *Solanum tuberosum* var. Parda pastusa de un peso aproximado de 150g. Las larvas se ubicaron junto a los tubérculos recién sembrados y se realizaron las respectivas aspersiones en la superficie, con 50 ml de la suspensión y con diluciones de los aislamientos en las concentraciones preestablecidas; después de ocho días se repitieron las aspersiones en cada materia usando la misma concentración inicial. En el caso de los adultos, se depositaron 10 individuos en cada materia después de que los tubérculos habían germinado, y se cubrieron con una manga entomológica para evitar que se trasladaran a otras plantas; la primera aspersión se realizó en el momento en que se depositaron los individuos, y se hizo una segunda aspersión cinco días después. Todos los individuos (larvas o adultos), fueron previamente desinfectados con una inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos, y luego lavados dos veces con ADE para remover el exceso de hipoclorito.

En el caso de las larvas, una vez que brotaron el 90% de los tubérculos, se destaparon los recipientes y se realizó la primera evaluación, repitiendo la evaluación quince días después, la cual consistió en el recuento de larvas discriminando aquellas que estuvieron afectadas por la acción del hongo entomopatógeno, y las que no presentaron daño. Con los adultos se realizó una primera evaluación a los quince días de la primera aplicación y se repitió nuevamente a los quince días. En cada ensayo realizado con los diferentes aislamientos, se incluyó un testigo en el cual se adicionó únicamente el sustrato (trigo precocido), con cinco repeticiones y en condiciones similares a las de los aislamientos estudiados. La construcción de la línea de regresión para establecer las concentraciones de mortalidad, así como las diferentes concentraciones letales, se calcularon por medio del programa Probit Análisis (Raymons, 1985). Este análisis es utilizado para la evaluación de insecticidas químicos, y en este caso, el objetivo principal fue el de calcular la concentración recomendada para cada uno de los diferentes aislamientos de estos entomopatógenos (Who, 1996).

Resultados

Variabilidad de la patogenicidad en larvas de *P. vorax*

En la bio-valoración preliminar, todos los aislamientos fueron patogénicos para larvas de gusano blanco; sin embargo, ésta fue variable a pesar de que las pruebas de viabilidad realizadas previamente a las suspensiones de conidias de todas las aislamientos de hongos entomopatógenos, mostraron porcentajes de viabilidad del 90%, lo cual, según González *et al.* (1993), indica una buena calidad biológica de los patógenos evaluados en el experimento. De otra parte, el porcentaje de mortalidad obtenido varió desde 16.6 % para Bb2, hasta 96.6 % para Bb5 (Tabla 1). El testigo presentó una tasa de supervivencia del 93.4%, la mortalidad atribuida a factores diferentes a la acción de los entomopatógenos evaluados que tuvieron una media de 4,4% para los tratamientos con los diferentes aislamientos y de 6.6% para el testigo. Las diferentes etapas de desarrollo de los hongos entomopatógenos, en larvas de *P. vorax* (inoculación a muerte, muerte a cubrimiento micelial, muerte a liberación de conidias), presentaron rangos entre 236 y 460 h, datos que se muestran en la Tabla 2.

El análisis de varianza para un diseño completamente al azar, con los datos correspondientes a la mortalidad total alcanzada por cada uno de los aislamientos estudiados, mostró diferencias significativas ($F_{7,14} = 4.64$; $P < 0.0001$); de otra parte, la prueba de medias de Tukey permitió establecer que los tratamientos

Bb5, Bb4, Bb8 y Bb7 diferían del testigo, mientras que los demás tratamientos fueron comparables con éste. De acuerdo a los resultados, los aislamientos Bb5, Bb7, Bb4 y Bb8 que fueron seleccionados para un posterior trabajo de campo, presentaron una mortalidad superior al 50% (Tabla 3).

Tabla 1. Mortalidad producida por siete aislamientos nativos de *B. bassiana* y una de *M. anisopliae* sobre larvas de *P. vorax* en el estudio de bio-valoración preliminar ($T=17^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$; H.R.=90%) con una concentración de 1×10^7 esporas.ml⁻¹

AISLAMIENTO	N	Mortalidad total	MORTALIDAD / REPETICION				
			Rango (No. individuos)	X	DS	C.V.	%
Ma1	30	6	1-3	2.00	0.40	20.00	20.0
Bb2	30	5	0-3	1.66	0.39	23.40	16.6
Bb3	30	13	3-6	4.33	1.02	23.50	43.3
*Bb4	30	23	6-9	7.66	1.24	16.19	76.6
*Bb5	30	29	9-10	9.66	0.47	4.87	96.6
*Bb7	30	16	4-8	5.33	0.88	16.51	53.3
*Bb8	30	16	3-7	5.33	0.69	12.94	53.3

* Aislamientos seleccionados para evaluaciones en campo

N Número total de individuos evaluados

X Media

DS Desviación estándar

C.V. Coeficiente de variación (Porcentaje)

% Porcentaje de mortalidad corregida

Tabla 2. Duración (en horas), de las etapas de desarrollo de la infección en la bio-valoración preliminar de seis aislamientos de *B. bassiana* y una de *M. anisopliae*, en larvas de *P. vorax* en condiciones de laboratorio ($T=17^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$; H.R.=90%). Los datos corresponden únicamente a los individuos que alcanzaron la mortalidad con los diferentes aislamientos

AISLAMIENTO	TIEMPO (HORAS)															
	Inoculación a Muerte				Muerte a Cubrimiento Micelial				Muerte a liberación de Conidias				TOTAL			
	Rango	X	DS	C.V	Rango	X	DS	C.V	Rango	X	DS	C.V	Rango	X	DS	C.V
Ma1	240-288	280,00	32,98	11,77	48-96	56,00	10,88	19,42	96-144	104,00	17,88	17,19	384-432	384,00	27,71	7,21
Bb2	240-288	249,60	19,20	7,69	48-96	57,60	11,20	19,44	96-144	115,20	23,51	20,40	336-384	364,80	23,51	6,44
Bb3	288-336	306,46	23,35	7,60	48-96	59,07	10,22	17,30	96-144	110,76	22,15	19,99	384-432	417,23	22,15	5,30
Bb4	288-336	308,86	23,79	7,70	48-96	56,34	12,19	21,63	96-144	116,86	23,79	20,35	384-432	425,73	16,16	3,79
Bb5	240-336	268,13	32,18	12,00	48-144	62,89	15,53	24,69	96-192	120,82	27,09	22,42	336-432	388,96	26,27	6,75
Bb7	288-336	303,00	22,24	7,33	48-96	57,00	12,73	22,33	96-144	111,00	22,24	20,03	384-432	414,00	23,23	5,61
Bb8	288-384	330,00	37,46	11,35	48-96	60,00	20,78	34,63	96-144	108,00	20,78	19,24	384-480	438,00	37,46	8,55

X Media

DS Desviación estándar

C.V Coeficiente de variación (porcentaje)

Tabla 3. Prueba de medias de Tukey sobre la mortalidad total causada por Ma1 (*M. anisopliae*), Bb2, Bb3, Bb4, Bb5, Bb7 y Bb8 (*B. bassiana*) en larvas de *P. vorax* en la bio-valoración preliminar ($T=17^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$; H.R.=90%) con una concentración de 1×10^7 esporas.ml⁻¹

TRATAMIENTO	MORTALIDAD (PROMEDIO INDIVIDUOS)	AGRUPACION SEGÚN TUKEY
Bb5	9.66	A
Bb4	7.66	AB
Bb8	5.33	BC
Bb7	5.33	BC
Bb3	4.33	BCD
Ma1	2.00	CD
Bb2	1.66	CD
Testigo	0.33	D

Mínima diferencia significativa (Valor Tukey)= 0.411

*Letras diferentes presentan diferencias significativas para $P < 0.05$

Establecimiento de la línea base de mortalidad

Los resultados obtenidos mostraron una relación positiva: concentración/mortalidad y permitieron establecer la línea base de mortalidad utilizando el programa Probit - Análisis (Raymons, 1985) (Figuras 1 y 2). Inicialmente se intentó establecer la línea base de mortalidad de adultos utilizando las mismas concentraciones empleadas para el estudio con larvas, sin embargo, después de realizar una prueba preliminar, se observó que la mortalidad causada con las concentraciones iniciales era mínima (alcanzaba una media total de 4/50 especímenes en las concentraciones mas elevadas), y no se podía establecer a partir de ellas una línea base de mortalidad, razón por la que las concentraciones se incrementaron a 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 y 1×10^{10} esporas.ml⁻¹.

Línea base de mortalidad para larvas de *P. vorax*. Al calcular las líneas base de susceptibilidad log. concentración/porcentaje de mortalidad para todos los aislamientos evaluados en el control de larvas de *P. vorax*, se observó que todos los datos se ajustaron a una línea de regresión, correspondiente a los valores con un nivel de confianza del 95%; entre tanto, según Raymond (1985), los X^2 calculados señalaron que los valores de mortalidad obtenidos experimentalmente, permitieron establecer una regresión lineal confiable con el programa utilizado (Figura 1). Bb2 y Ma1 lograron un porcentaje de mortalidad de 21.8% y 22.1% respectivamente, con la concentración más alta; los porcentajes de mortalidad alcanzados fueron muy bajos, lo que hace menos confiable el cálculo de las concentraciones letales. Los aislamientos Bb4, Bb5, Bb7 y Bb8 presentaron los porcentajes de mortalidad más elevados y sus CL₉₉ fueron las más bajas (Tabla 4). Estos resultados permitirán hacer más efectiva la aplicación de los insumos en el campo.

Línea base de mortalidad para adultos de *P. vorax*. Los X^2 obtenidos demostraron que en todos los casos, se presentaron datos homogéneos que se ajustaron a la línea de regresión con un nivel de confianza del 95%. En este caso, en las gráficas de susceptibilidad, las pendientes de Bb4, Bb8, Bb7 y Bb5 fueron las más elevadas; las pendientes de Ma1 y Bb2 fueron más bajas y representaron concentraciones medias letales más altas (Figura 2).

Los aislamientos Bb2, Ma1 y Bb3 presentaron porcentajes bajos de mortalidad con la concentración más alta, razón por

la cual se descartaron para posteriores estudios en campo. En su orden, los aislamientos Bb8, Bb4, Bb7 y Bb5 presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 70% y la línea base de mortalidad pudo ser establecida con mayor confianza (Tabla 4).

Discusión

En la bio-valoración preliminar, la supervivencia en el testigo fue alta, lo que demuestra que la práctica de desinfección superficial de las larvas mediante el tratamiento con hipoclorito de sodio no causó su mortalidad, ni inhibió los procesos de germinación de las esporas en los tratamientos, esto coincide con lo observado por Jiménez (1992) y González *et al.*, (1993). Las posibles causas de esta mortalidad son atribuidas por los autores mencionados, a la manipulación de las larvas y a problemas fisiológicos como la inanición.

Las diferentes etapas de desarrollo de los hongos entomopatógenos en larvas de *P. vorax*, (inoculación a muerte, muerte a cubrimiento micelial, muerte a liberación de conidias), presentaron rangos más amplios (entre 14 y 20 días), (Tabla 2), que los reportados por Reyes en 1995 (citado por Torres y López, 1997), respecto al parasitoides de la broca del café *Cephalonomia stephanoderis*, usando los mismos hongos entomopatógenos, cuando todas la etapas se cubrieron en un promedio de 11.11 días, y el caso de *B. bassiana* para el control de *Hypothenemus hampei*, donde el desarrollo total de estas etapas se realizó en un promedio

de 8.2 días (González *et al.*, 1993). La tardanza podría deberse al tiempo requerido por estos hongos entomopatógenos para lograr el desarrollo del ciclo normal de la infección en larvas de *P. vorax*, y no a la calidad del insumo biológico, ya que los datos obtenidos coinciden con los reportes de Torres y López (1997), quienes en un estudio realizado en laboratorio con *B. bassiana* y larvas de *P. vorax*, observaron que el período de iniciación de los síntomas de ataque del entomopatógeno osciló entre cinco y siete días, y de ahí a la esporulación, hubo un período de ocho a trece días, para un total de 20.5 días.

A pesar de que todas los aislamientos fueron purificados de individuos de *P. vorax* infectados y resultaron patogénicos para las larvas de gusano blanco, se observó una amplia variabilidad en la tasa de mortalidad, fenómeno que puede ser atribuido a componentes de origen genético, el cual permite la variación en la eficacia entre los diferentes aislamientos de los entomopatógenos.

De esta manera, se confirma la necesidad de realizar estudios mas amplios para encontrar el aislamiento más agresivo para el manejo de *P. vorax*. Por otro lado, pese a que las condiciones de humedad y temperatura en laboratorio fueron aparentemente "ideales" para el desarrollo de estos hongos (González *et al.*, 1993; Sañudo y Castillo, 1994; Sañudo *et al.*, 1994; Torres y López, 1997), posiblemente no sean las más adecuadas para todos los aislamientos y algunos requieran condiciones diferentes de humedad y temperatura, que dependerán de las con-

Tabla 4. Concentración letal 50 y 99, calculadas por medio del análisis Probit para el estudio con larvas y adultos de *P. vorax* en condiciones de invernadero. (T=18°C±2°C; H.R.=88%).

LARVAS					
Aislamientos	Porcentaje de mortalidad corregida	Mortalidad esperada	X^2 calculado	CL ₅₀ (esporas/ml)	CL ₉₉ (esporas/ml)
Ma1	22.10*	13.50	6.5495	2.54946×10^9	2.93539×10^{13}
Bb2	21.80*	10.94	2.3794	2.55345×10^{10}	1.37034×10^{17}
Bb3	72.40	36.89	1.0151	4.77886×10^6	1.17354×10^{10}
Bb4	87.30	40.41	6.8607	1.16179×10^7	4.76425×10^9
Bb5	85.20	42.35	0.7740	7.81919×10^6	3.14436×10^9
Bb7	87.20	43.13	0.5179	7.66316×10^6	2.23265×10^9
Bb8	95.70	46.30	4.7097	4.69652×10^6	7.20673×10^8
ADULTOS					
Ma1	30.60*	14.81	0.41141	1.3628×10^{11}	5.0603×10^{15}
Bb2	22.50*	12.00	0.20194	1.3879×10^{12}	5.3295×10^{18}
Bb3	34.80*	18.69	2.8633	3.1344×10^{10}	5.7594×10^{13}
Bb4	93.90	44.68	1.0022	1.2841×10^9	6.1639×10^{10}
Bb5	76.70	36.78	3.4150	2.5809×10^9	5.6814×10^{11}
Bb7	93.90	46.21	2.9614	1.1830×10^{11}	3.8918×10^{12}
Bb8	89.80	45.00	3.7556	1.0818×10^9	6.3547×10^{10}

* Los porcentajes de mortalidad alcanzados fueron muy bajos por lo que el cálculo de las concentraciones letales (CL) es menos confiable

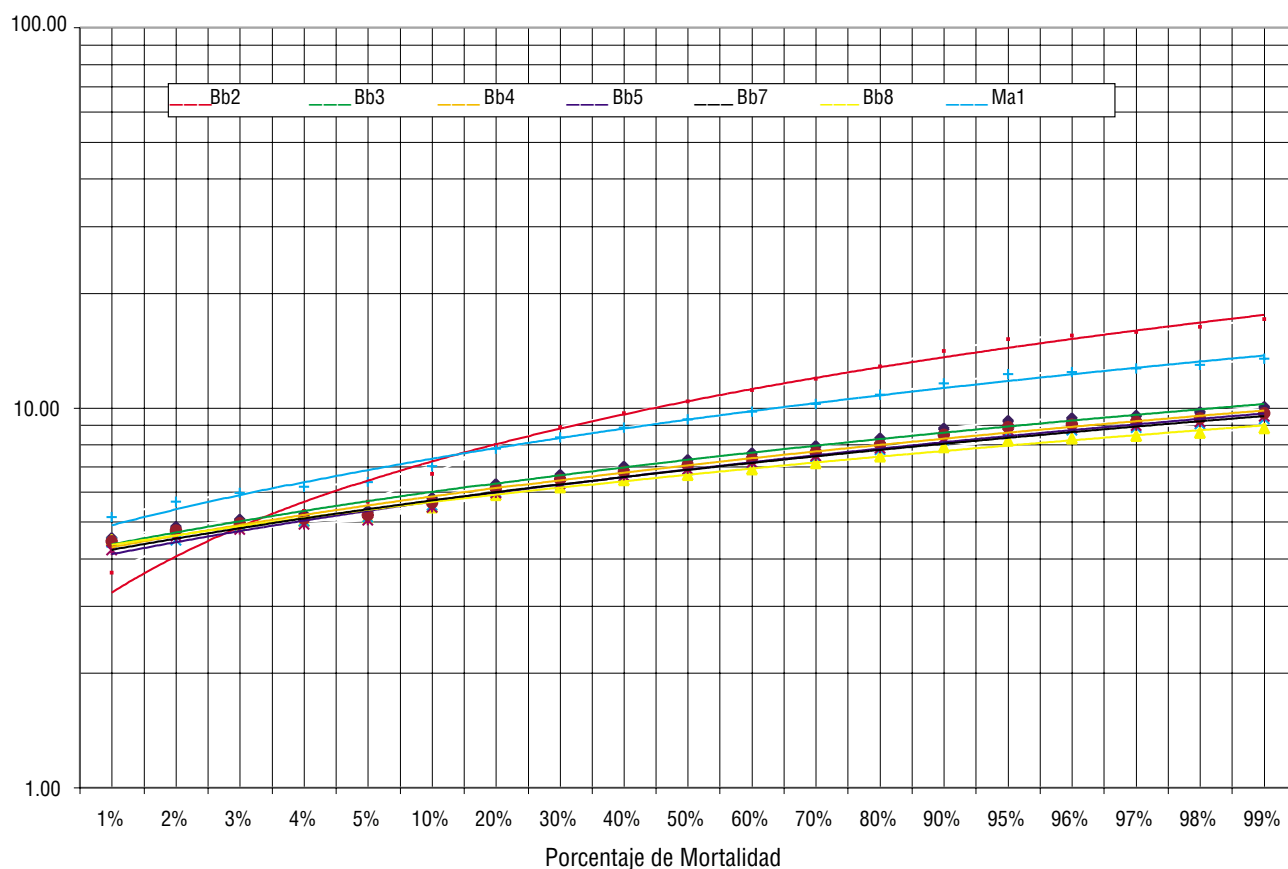


Figura 1. Línea base de mortalidad de las cepas Ma1 de *M. anisopliae*, Bb2, Bb3, Bb4, Bb5 y Bb8 de *B. bassiana* estudiadas en el control de larvas de *P. vorax* en condiciones de invernadero ($T = 18^{\circ}\text{C}$; H.R. 88%).

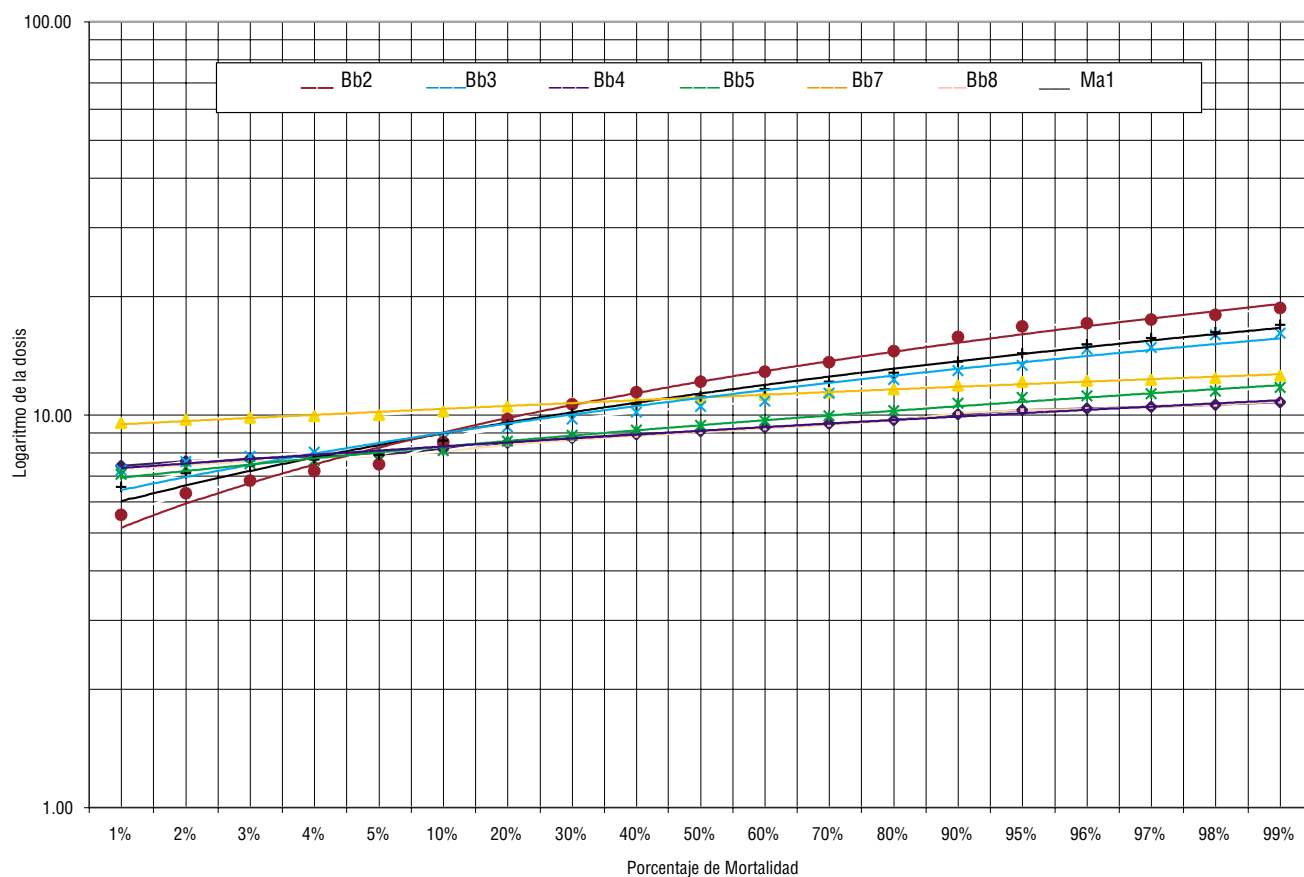


Figura 2. Línea base de mortalidad de las cepas Ma1 de *M. anisopliae*, Bb2, Bb3, Bb4, Bb5 y Bb8 de *B. bassiana* estudiadas en el control de adultos de *P. vorax* en condiciones de invernadero ($T = 18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; H.R. 88%).

diciones ambientales del lugar de procedencia de cada uno de ellos, viéndose afectada, por consiguiente, la efectividad del control de larvas.

Con relación al tiempo requerido para causar mortalidad en larvas de *P. vorax*, Agarwal (1990), en un estudio similar para determinar la CL_{50} de *B. bassiana* sobre *H. armigera*, observó que al incrementar la concentración del insumo, el tiempo requerido para causar la mortalidad del insecto disminuye; sin embargo ese fenómeno no se observó en este estudio, y para todos los aislamientos en las diferentes concentraciones, el tiempo requerido para causar mortalidad a los insectos y el consecuente cubrimiento micelial y conidiogénesis, se mantuvo entre los 15 y 23 días. Esto puede confirmar la calidad biológica de los aislamientos aplicados, pues se vio que todas las esporas pudieron desarrollar la infección efectivamente en un rango de tiempo más o menos similar y coincidiendo con los resultados obtenidos previamente en laboratorio.

Respecto a la relación concentración/respuesta, se observó una respuesta directamente proporcional entre el incremento de la concentración del insumo y la mortalidad de los individuos en estudio, de manera similar a lo planteado por Agarwal (1990). Esto confirma nuevamente la calidad del insumo biológico, ya que al incrementar las concentraciones, el medio adquiere mayor cantidad de esporas viables capaces de causar infección y la probabilidad de que los insectos plaga se infecten, lógicamente aumenta.

Con relación al incremento de las concentraciones requeridas en adultos para poder establecer una línea base de mortalidad adecuada, es importante recordar que las larvas de *P. vorax* poseen una cubierta delgada integumentaria, que además en condiciones favorables de humedad (similares a las que se presentaron en laboratorio), se torna más fácil de ser penetrada por las esporas de hongos entomopatógenos; por otro lado, el adulto posee una cubierta quitinizada que le proporciona una barrera de protección adicional, dificultando la fijación de esporas y la posterior formación del tubo germinativo de los diferentes aislamientos evaluados. Esto confirmó la observación de Agarwal (1990), quien afirma que la susceptibilidad al ataque de hongos en diferentes estados del ciclo de vida del insecto difiere considerablemente.

Al graficar las líneas para las CL_{50} , en el caso de las larvas, se observó un grupo conformado por los aislamientos Bb8,

Bb5, Bb4, Bb7 y Bb3 (Figura 1), que presentaron pendientes más elevadas, lo que hizo que los rangos de las concentraciones medias y letales fueran estrechos, aportando una varianza baja a la CL_{50} ; lo que además indicó que los resultados fueron homogéneos. Para el caso de Ma1 y Bb2, las pendientes fueron más bajas, pero los datos siguieron siendo homogéneos a pesar de que los rangos de confianza fueron más amplios. Para adultos, en las gráficas de susceptibilidad las pendientes de Bb4, Bb8, Bb7 y Bb5 fueron las más elevadas, y correspondieron a los aislamientos seleccionados para el estudio en campo. Las pendientes de Ma1 y Bb2 fueron más bajas y representaron concentraciones medias letales más altas (Figura 2).

Los resultados obtenidos en los ensayos de invernadero (larvas y adultos), coinciden con los generados previamente en la fase de laboratorio, donde Bb2, y Ma1 presentaron las tasas más bajas de mortalidad. Este caso podría estar evidenciando que, a pesar de que fueron aislados de individuos de *P. vorax* infectados y recolectados en campo, esa infección podría haber sido eventual, teniendo en cuenta que las larvas o adultos de *P. vorax* podrían haber estado en contacto con otros insectos que también son susceptibles al ataque de los mismos entomopatógenos, y haberse contaminado accidentalmente. Al respecto, Bolaños *et al.* (1998), en un estudio realizado en trigo encontraron que diferentes especies de chizas (*A. scarabaeoides*, *Phillophaga sp.*, *Astaena sp.*), presentaron infecciones naturales de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Estas especies igualmente, se encuentran en las mismas zonas agroecológicas de *P. vorax* en el Departamento de Nariño.

De otra parte, tanto en el caso de larvas como en el de adultos, no se debe descartar la posibilidad de realizar pruebas con el aislamiento Bb3, ya que sus pendientes fueron elevadas a pesar de que su CL_{99} fue más alta, y de que en la bio-valoración preliminar no alcanzó un 50% de mortalidad, las pruebas en invernadero superaron este porcentaje.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, G. P. 1990. Entomogenous fungi in India and management of insect pest. In: *Dian Phytopathology*. 34(2):131-142.
- Bolaños, A.; Campuzano, L.F.; Merchancano, J.D. y Brito, R. 1998. Obonuco Obando 98. Nueva variedad mejorada de trigo para la zona de modernización del cultivo en el departamento de Nariño. Boletín divulgativo No. 7.

C.I. Obonuco CORPOICA Regional 5, Pasto, Nariño, Colombia.

Calvche, H. y Alvarado, L. 1980. El gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) y su control. Boletín informativo, ICA. Pasto, Nariño, Colombia.

Cerón, S. 1990. Efecto de los cultivos trampa sobre el control del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. Tesis Ingeniero Agrónomo. Pasto, Nariño, Colombia.

Delgado, M.J. y Aguilar, P.G. 1980. El cultivo de la papa. Revista Peruana de Entomología. 23(1):102-104.

González, B. 1996. Evaluación y cuantificación de daños y pérdidas de papa en pre-cosecha y cosecha en la zona productora de Nariño. Revista Papa. (15): 5-20

González, M.T.; Posada, F.F. y Bustillo, A. E. 1993. Bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre la Broca del Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Revista Colombiana de Entomología. 19(4): 123-130.

Jiménez, L. 1992. El control microbiológico dentro del manejo integrado de insectos plaga. Control Microbiano de Insectos. CENIPALMA. Bogotá, Colombia.

Peña, L.A. y Bolaños, M.A. 1997. Manejo integrado del gusano blanco de la papa. Boletín divulgativo No.1 CORPOICA Regional 5. Centro de Investigación Obonuco. Pasto, Nariño, Colombia.

Raymons, M. 1985. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORSTOM, serie Entomologie medique et parasitologie. 23(2): 117 - 121.

Roberts, D.W. y Humber, R. A. 1984. Entomopathogenic fungi. In: Roberts, D.W and James R. (Ed). *Infection processes of fungi*. Conference report. The Rockefeller Foundation.

Rodríguez, D. A. 1984. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. Revista Colombiana de Entomología. 10(1-2): 57-64.

Sañudo, B.; Castillo, G.A. y Ramírez, B.R. 1994. Principios de control biológico de fitopatógenos. Universidad de Nariño, Colombia.

Sañudo, B. y Castillo, G.A. 1994. Papel de los microorganismos en el control biológico de las plagas. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Torres, P.R. y López, A. 1997. Estudios Básicos sobre el control microbiológico del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) con *Beauveria spp.* y *Metarhizium sp.* Revista Colombiana de Entomología. 23(1-2): 83 - 88.

Valencia, V.L. y Bohórquez, C. 1994. Tamizado de clones de papa por resistencia genética al gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache). Revista Colombiana de Entomología. 20 (1): 7-14.

Who. 1996. Insecticide susceptibility test. Statistical methods in malaria eradication. Entomophaga 42 (1):44-52.