

Compatibilidad *in vitro* de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena

In vitro compatibility of the biopesticide based on *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) with agrochemicals used in cotton and eggplant crops

Adriana Santos*, Erika Grijalba**, María Victoria Zuluaga***, Martha Gómez****, Laura Villamizar*****

Resumen

El aislamiento colombiano de *Lecanicillium lecanii* VI026 formulado como un granulado dispersable WG, ha demostrado una alta eficiencia para el control de *Bemisia tabaci* en los cultivos de algodón y berenjena. Teniendo en cuenta el potencial de este bioinsumo, el objetivo del siguiente fue determinar la compatibilidad *in vitro* del bioplaguicida a base de *L. lecanii* con agroquímicos (insecticidas y fungicidas) que se utilizan con mayor frecuencia en dichos cultivos. La compatibilidad *in vitro* se estableció determinando el porcentaje de germinación (%) y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en presencia de los plaguicidas y estimando la concentración inhibitoria 10 (CI₁₀). Cada plaguicida se evaluó a la dosis recomendada, a la mitad y a un cuarto de ésta. Los fungicidas químicos (Benomil®, Vitavax®, Ridomil® y Manzate®) no fueron compatibles con *L. lecanii*, ya que inhibieron la germinación y las Unidades Formadoras de Colonia del hongo en las tres dosis evaluadas. En cuanto a los insecticidas químicos, el producto Confidor® no inhibió la viabilidad en comparación con el tratamiento control, considerándose compatible con el bioplaguicida. Cuando se evaluó la dosis completa de los demás insecticidas (Oportune®, Actara®, Match® y Malathion®) se obtuvieron germinaciones inferiores al 80%, por lo que dichos productos se clasificaron como no compatibles con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*. El único agroquímico que fue compatible en condiciones *in vitro* con *L. lecanii* fue el producto Confidor®. Sin embargo, se recomienda evaluar el efecto *in vivo* de los productos químicos habitualmente utilizados por los agricultores sobre *L. lecanii*, con el propósito de desarrollar y establecer estrategias de manejo integrado de la mosca blanca *Bemisia tabaci*.

Palabras clave: entomopatógeno. *Bemisia tabaci*. fungicidas, insecticidas.

Abstract

A Colombian isolate of *Lecanicillium lecanii* formulated as dispersible granules WG, has shown high efficiency to control *Bemisia tabaci* in cotton and eggplant crops. Considering that, the objective of this work was to determine the *in vitro* com-

* Microbióloga Industrial. Investigadora Profesional. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria. CORPOICA. asantos@corpoica.org.co.

** Química Farmacéutica. M.Sc. . Investigadora Master. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria. CORPOICA. egrijalba@corpoica.org.co.

*** Ingeniera Agrónoma. Investigadora Profesional. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria. CORPOICA. mzu-luaga@corpoica.org.co.

**** Química Farmacéutica. Investigadora Ph.D. Planta de Bioproductos. Centro de Biotecnología y Bioindustria. CORPOICA. mgomez@corpoica.org.co.

***** Química Farmacéutica. Investigadora Ph.D. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria. CORPOICA. llvillamizar@corpoica.org.co.

patibility of biopesticide based on *L. lecanii* with agrochemicals (insecticides and fungicides) that are most frequently used in tobacco and eggplant crops. *In vitro* compatibility of *L. lecanii* with agrochemicals was determined by germination (%) and Colony Forming Units (CFU) in the presence of pesticides and also estimating the inhibitory concentration 10 (IC₁₀). Each agrochemical was evaluated at the recommended dose, a half and a quarter of it. For the three doses tested (Benomyl®, Vitavax®, Ridomil® and Manzate®) were not compatible with *L. lecanii*, because these inhibited germination and Colony Forming Units of the fungus. Confidor® did not inhibit viability compared to control treatment, and it was considered compatible with the biopesticide. When the recommended dose (Oportune®, Actara®, Match® and Malathion®) was used, the germination of the *L. lecanii* was lower than 80%, then these products were classified as non-compatible with the biopesticide based on *L. lecanii*. The only agrochemical that was compatible *in vitro* with *L. lecanii* was Confidor®. However, is necessary to evaluate the *in vivo* effect of agrochemicals commonly used by farmers on *L. lecanii*, in order to develop and establish integrated management strategies for the control of the whitefly *Bemisia tabaci*.

Key words: entomopathogen, *Bemisia tabaci*, fungicide, insecticide.

Recibido: mayo 2 de 2013

Aprobado: noviembre 20 de 2013

Introducción

La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) es un insecto plaga de importancia en diferentes cultivos del mundo, en especial en el trópico y subtropico (López - Avila y Garcia, 2000). Su capacidad de adaptación, la presencia de cultivos hospederos durante todo el año y la habilidad de este insecto para colonizar nuevos hospederos ha resultado en una gran dispersión geográfica, facilitando su establecimiento y conduciendo a su sobrevivencia permanente (De Barro *et al.*, 2011). El daño más relevante causado por la mosca blanca es la transmisión de enfermedades causadas por virus, especialmente por los geminivirus o begomovirus (Geminiviridae) (Oliveira *et al.*, 2001; De Barro *et al.*, 2011). Mundialmente, las pérdidas económicas que causa este insecto como plaga directa o como vector alcanzan varios centenares de millones de dólares cada año (De Barro *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012).

Para el control de la mosca blanca se han diseñado diferentes estrategias de manejo, siendo el control químico la herramienta más utilizada y en ocasiones la única, generando riesgos para la salud humana y para el medio ambiente (Espinel *et al.*, 2008). Además, el uso inadecuado de plaguicidas de síntesis química, ha generado el desarrollo de resistencia por parte de la mosca blanca, elevando los costos de producción de los cultivos y causando un impacto negativo sobre el ecosistema (Roditakis *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2012). Con miras a reducir el uso y la dependencia de agroquímicos para el control de este insecto se han desarrollado alternativas como el control biológico mediante el uso hongos entomopatógenos, microorganismos con un potencial interesante para ser incluidos en programas de manejo integrado de plagas, debido a que apa-

recen en condiciones naturales y no presentan riesgos para la salud animal y humana (Srivastava *et al.*, 2009).

Una de las especies promisorias para implementar en el control biológico de *B. tabaci* es el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare y Games (Shinde *et al.*, 2010). Este microorganismo está distribuido en amplios agroecosistemas y frecuentemente se encuentra causando epizootias naturales sobre este insecto y otras plagas de interés como *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) (Goettel *et al.*, 2008). Sin embargo, para la utilización de este hongo como agente de control biológico es necesario desarrollar sistemas de producción y formulación que permitan contar con productos de la misma o mayor eficacia que los productos químicos, característica que está directamente relacionada con el aislamiento y con el tipo de formulación desarrollada (Magan, 2001). Una formulación adecuada protege el principio activo de condiciones ambientales deletéreas como la luz ultravioleta, la actividad de agua, la temperatura y los productos químicos que se aplican en el cultivo, siendo esta última condición una de las principales limitantes para la aplicación de bioplaguicidas en campo (Asi *et al.*, 2010).

Debido a lo anterior, para la implementación de un bioplaguicida dentro de una estrategia de manejo integrado de plagas (MIP) es necesario determinar la compatibilidad de éste con los insumos químicos utilizados comúnmente por el agricultor. Se ha demostrado que productos químicos compatibles con hongos entomopatógenos pueden incrementar la eficiencia de los mismos, permitiendo disminuir las dosis de partículas de síntesis química favoreciendo la preservación de los enemigos naturales de la plaga y minimizando el impacto en el medio ambiente (Ambethgar, 2009; Asi

et al., 2010). Por el contrario, si se utilizan insumos químicos que no son compatibles, estos pueden afectar negativamente la viabilidad y la virulencia del microorganismo biocontrolador sobre el insecto plaga, disminuyendo la eficacia del bioproducto (Ambethgar, 2009).

Un aislamiento nativo de *Lecanicillium lecanii* VI026 (anteriormente *Verticillium lecanii*) con demostrada eficiencia para el control de *Bemisia tabaci*, (Espinell et al., 2008) fue utilizado como principio activo de un bioplaguicida que mostró resultados promisorios para el control de dicho insecto en un cultivo de tomate cherry (Cotes et al., 2009) y en cultivos de algodón (Zuluaga et al., 2010) y de berenjena (Jiménez et al., 2010). Sin embargo, para poder incorporar este bioproducto en un programa de manejo integrado del insecto, es necesario determinar su compatibilidad con los productos químicos generalmente utilizados por el agricultor, insumos que pueden afectar negativamente al agente biocontrolador en campo (Inglis y Kawchuk, 2002). Con el fin de generar recomendaciones para el uso de este bioplaguicida, el objetivo del presente trabajo fue establecer los parámetros de calidad y su compatibilidad *in vitro* con los productos químicos (insecticidas y fungicidas) que se utilizan con mayor frecuencia para el control de *B. tabaci* en los cultivos de algodón y berenjena, en los cuales este bioproducto tiene potencial para ser integrado en una estrategia de manejo del cultivo.

Materiales y métodos

Microorganismo

L. lecanii VI026 (aislado a partir de adultos de *Trialeurodes vaporariorum* recolectados en la región del Sumapaz, departamento de Cundinamarca, Colombia) fue suministrado por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de CORPOICA. La cepa de *L. lecanii* se reactivó en medio Agar Extracto de Malta (Agar EM) y se incubó 25°C durante 8 días.

Elaboración del bioplaguicida a base de *L. lecanii*

La producción masiva del microorganismo se realizó empleando un sustrato previamente estandarizado a base de cereales (Villamizar et al., 2009). Para la elaboración del bioplaguicida formulado como granulado dispersable (WG), la biomasa fue separada del sustrato y se mezcló con silicato de aluminio coloidal de calidad industrial (Bell-Chem International S.A.) utilizado como diluyente, almidón de calidad alimenticia (Bell-

Chem International S.A.) empleado como desintegrante, y una solución proteica utilizada como agente protector de secado. Una vez mezclada la biomasa con los excipientes se realizó su granulación vía húmeda por medio de una criba con poros de 1 mm de diámetro y el producto se secó en estufa a 25±1°C por 24 horas.

Control de calidad del bioplaguicida a base de *L. lecanii*

Una vez elaborado el bioplaguicida se determinó su concentración, el porcentaje de germinación, el contenido de contaminantes bacterianos y fúngicos y el porcentaje de humedad (%). Cada parámetro se determinó por triplicado (Santos et al., 2012).

Concentración: Para la determinación de la concentración se adicionó 1 gramo del producto a 9 mL de Tween 80® al 0,1% y se realizaron diluciones decimales hasta 10⁻³. A partir de esta dilución se realizó el recuento de conidios empleando una cámara de Neubauer. Con el recuento obtenido y la dilución empleada se calculó la concentración del producto expresada como conidios por gramo de producto (conidios/g).

Germinación: Se adicionó 1 gramo del producto a un tubo de ensayo con 9 mL de Tween 80® al 0,1% y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻², de la última dilución se sembraron 100µL en cajas de Petri con medio Agar Sabouraud. Estas cajas se incubaron a 25±2°C durante 24 horas, tiempo después del cual se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos, por unidad experimental

Contenido de contaminantes fúngicos y bacterianos: Se tomó 1 gramo del producto que se adicionó a 9 mL de Tween 80 al 0,1% (v/v) y se realizaron diluciones decimales hasta 10⁻⁵. Posteriormente estas diluciones se sembraron en superficie en cajas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa Agar suplementado con Tritón (0.1%) (Agar PDA + Tritón) para la evaluación de hongos, en medio Agar Extracto de Levadura y Malta (YM) para la cuantificación de levaduras y en medio Agar Nutritivo para el recuento de bacterias contaminantes. Cada dilución se sembró por triplicado. El resultado se expresó como el recuento de Unidades Formadoras de Colonia de Contaminantes por gramo de producto (UFC/g).

Humedad: El porcentaje de humedad se determinó por medio de la técnica de pérdida de peso por secado en una balanza de humedad OHAUS MB, reali-

zando la determinación por triplicado a tres muestras diferentes de producto.

Evaluación de la compatibilidad *in vitro* de un bioplaguicida a base de *L. lecanii* con agroquímicos

La compatibilidad *in vitro* de los conidios formulados de *L. lecanii* con los agroquímicos seleccionados (tabla 1) se estableció mediante la evaluación del efecto de estas moléculas sobre la germinación (%) y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Para cada agroquímico se utilizó la dosis recomendada, la mitad y un cuarto de la misma (tabla 1).

Germinación (%): Una muestra de un gramo del bioplaguicida a base de *L. lecanii* se adicionó a 9 mL de una solución de Tween® 80 al 0,1% y a partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} . De las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se sembraron 100µL en cajas de Petri con medio Agar Sabouraud suplementado con el agroquímico a la concentración determinada. Estas cajas se incubaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, tiempo después del cual se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados mediante la metodología anteriormente descrita. Como tratamiento control se evaluó la germinación en medio Agar Sabouraud sin la adición de ningún producto. El diseño del estudio fue completamente al azar y se emplearon tres unidades experimentales por tratamiento.

Unidades Formadoras de Colonia (UFC): Un gramo del bioplaguicida a base de *L. lecanii* se adicionó a 9 mL de una solución de Tween® 80 al 0,1% y a partir de esta suspensión se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-8} . Las últimas tres diluciones (100 µL) se sembraron en cajas de Petri con medio Agar Papa Sacarosa suplementado con agroquímicos. Estas cajas se incubaron durante ocho días a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y transcurrido dicho tiempo se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g). El diseño del estudio fue completamente al azar y se emplearon tres unidades experimentales por tratamiento. Como tratamiento control se utilizó medio Agar Papa Sacarosa sin ningún agroquímico. Los resultados de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g) fueron transformados mediante el cálculo del logaritmo decimal para realizar los análisis estadísticos.

Análisis de resultados

La normalidad y homocedasticidad de los resultados se determinaron mediante las pruebas de Shapiro Wilks (95%) y Bartlett (95%) respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se procedió a un análisis de varianza ANOVA y a una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) utilizando el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, USA). Para la estimación de la concentración inhibitoria 10 (CI_{10}) se realizó un análisis de regresión lineal correlacionando las concentraciones evaluadas para cada agroquímico

Tabla 1. Fungicidas e insecticidas químicos seleccionados para estudiar su compatibilidad con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*. Concentración expresada en partes por millón (ppm).

Tipo de agroquímico	Producto (nombre comercial)	Ingrediente activo	Dosis completa (ppm)	Media dosis (ppm)	Un cuarto de dosis (ppm)
Fungicidas	Benomil®	Benlate	500	250	125
	Vitavax®	Carboxin-Captan	4000	2000	1000
	Ridomil®	Metalaxil-Mancozeb	8500	4250	2125
	Manzate®	Mancozeb	8000	4000	2000
Insecticidas	Confidor®	Imidacloprid	380	190	95
	Oportune®	Buprofezin	750	375	187,5
	Actara®	Tiametoxam	1875	937,5	468,8
	Malathion®	Malathion	5700	2850	1425
	Match®	Lufenuron	125	62,5	31,3

versus la germinación del hongo. Con la ecuación de la recta obtenida se estimó la concentración inhibitoria 10 (CI₁₀) definida como la concentración del agroquímico que reduce en un 10% la germinación del hongo. Como parámetro de compatibilidad se estableció que si la CI₁₀ es menor que la dosis recomendada del agroquímico, dicho producto no es compatible con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*.

Resultados y discusión

Control de calidad del bioplaguicida a base de *L. lecanii*

La concentración promedio del bioplaguicida a base de *L. lecanii* fue de $3,64 \times 10^9$ conidios/g (tabla 2), valor adecuado para este tipo de bioinsumo, que normalmente es reconstituido en agua para su aplicación a concentraciones finales de 10^6 a 10^7 conidios/mL, sugiriendo que la dosis de aplicación estaría alrededor de 50 a 500 gramos de producto por hectárea (Goettel *et al.*, 2008). Además, esta concentración se encuentra dentro del rango descrito para la mayoría de bioinsumos comerciales registrados a base de *Lecanicillium* sp., los cuales presentan una concentración promedio de 10^9 conidios/g (Goettel *et al.*, 2008; Copping, 2009).

La viabilidad del principio activo del bioplaguicida determinada por la técnica de germinación fue del 93,50% a las 24 horas de incubación (tabla 2), lo que sugiere que más del 90% de los conidios del hongo son capaces de germinar rápidamente si se encuentran en condiciones de humedad y temperatura adecuadas. Esta capacidad garantiza que el producto tendrá un rápido efecto sobre la población del insecto

blanco. Cabe destacar que la germinación obtenida para el producto en este estudio, es superior al límite recomendado por Jenkins y Grzywacz (2000), quienes establecieron que para garantizar la calidad y eficacia de bioplaguicidas fúngicos durante el almacenamiento, se requiere una viabilidad mínima del 85%. De igual forma, la viabilidad evaluada mediante el recuento de colonias fue de $2,26 \times 10^9$ UFC/g (tabla 2), valor similar a la concentración expresada en conidios/g de producto. Teniendo en cuenta que los valores tanto de viabilidad, como de concentración del producto a base de *L. lecanii* son del orden de 10^9 y los coeficientes correspondientes son muy cercanos, es posible sugerir que la mayoría de las células presentes en el bioproducto son viables. Este resultado es de gran importancia, ya que si se obtiene una alta concentración de células pero éstas no son viables, el producto no será eficaz frente a la plaga a controlar y la vida útil del producto será menor (Elzein *et al.*, 2004).

La concentración de contaminantes de un bioplaguicida es de gran importancia, ya que estos pueden afectar negativamente la vida útil, la eficacia e incluso las propiedades físico-químicas del producto (Jenkins and Grzywacz, 2000). Además, puede representar un riesgo para la salud humana y para el medio ambiente (Ravensberg, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior, el contenido de contaminantes bacterianos del bioplaguicida fue del $5,78 \times 10^4$ UFC/g (tabla 2) y el de contaminantes fúngicos, incluyendo mohos y levaduras fue inferior a 10^3 UFC/g de producto. Al comparar los resultados con el contenido de contaminantes permitidos para otros productos a base de hongos, los cuales sugieren como límite de aceptación un valor máximo de $5,00 \times 10^6$ UFC/g o UFC/mL de producto (Jenkins and Grzywacz, 2000) se considera que el bio-

Tabla 2. Control de calidad microbiológico del bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii*

Control de calidad del bioplaguicida a base de <i>L. lecanii</i>						
Parámetro	Unidades	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Valor óptimo
Concentración	Conidios/g	$3,89 \times 10^9$	$3,08 \times 10^9$	$3,96 \times 10^9$	$3,64 \times 10^9$	$\geq 1,00 \times 10^9$
Germinación	%	92,30	93,20	95,00	93,50	$\geq 80,00$
Recuento de principio activo	UFC/g	$3,00 \times 10^9$	$2,45 \times 10^9$	$1,33 \times 10^9$	$2,26 \times 10^9$	$\geq 1,00 \times 10^9$
Recuento de contaminantes fúngicos	UFC/g	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	$\leq 5,00 \times 10^6$
Recuento de contaminantes bacterianos	UFC/g	$2,00 \times 10^4$	$1,33 \times 10^4$	$1,40 \times 10^5$	$5,78 \times 10^4$	$\leq 5,00 \times 10^6$
Humedad	%	3,79	2,28	4,56	3,54	≤ 10

plaguicida a base de *L. lecanii* cumple con este parámetro de calidad. La contaminación de bioproductos con microorganismos diferentes al principio activo, puede deberse a la introducción de estos durante las operaciones unitarias del proceso de manufactura (Ravensberg, 2011), por lo que se puede sugerir que el proceso utilizado para la elaboración del bioplaguicida a base de *L. lecanii*, se realizó bajo condiciones adecuadas de limpieza y sanitización de equipos y áreas y con materias primas de alta calidad.

El porcentaje de humedad del bioplaguicida a base de *L. lecanii* fue 3,54 % (tabla 2), valor considerado adecuado para asegurar la estabilidad y la viabilidad del principio activo, especialmente durante el almacenamiento del producto (Quiroga *et al.*, 2011), ya que como lo reportaron Lawrie y colaboradores (2001), humedades inferiores al 5% permiten que los microorganismos se conserven viables y virulentos durante su vida de anaquel, debido a que disminuye el metabolismo de los mismos. Dicha reducción en la tasa metabólica favorece la estabilidad de los microorganismos debido a que disminuye la acumulación de metabolitos tóxicos que afectan su viabilidad (Abadias *et al.*, 2003).

Todas las características del bioplaguicida se encontraron dentro de los límites de aceptación establecidos

(tabla 2) para garantizar la calidad del producto. Por tal razón, este lote de bioplaguicida fue utilizado para proseguir con el estudio de compatibilidad con diferentes agroquímicos.

Evaluación de la compatibilidad in vitro del bioplaguicida a base de *L. lecanii* con agroquímicos

Cuando se evaluó la compatibilidad de los agroquímicos con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*, se evidenció en todas las dosis evaluadas una disminución o inhibición de la viabilidad expresada como germinación.

Con los fungicidas benomil (Benlate®) y carboxin-captan (Vitavax®) se presentaron comportamientos similares, ya que a medida que aumentó la dosis de estos compuestos, la germinación de los conidios disminuyó. Con el ingrediente activo benomil (Benlate®) utilizando un cuarto, media y la dosis completa se presentaron germinaciones del 20,95%, del 37,75% y del 54,57% respectivamente, valores que fueron significativamente inferiores al observado en el tratamiento control (F=275, gl=6, P<0,0001) (tabla 3), sugiriendo un efecto negativo de este compuesto sobre la viabilidad del hongo. Sin embargo, este efecto fue menos drástico que el observado por García *et al.* (2007),

Tabla 3. Germinación (%) y Unidades Formadoras de Colonia (Log UFC) de *L. lecanii* en diferentes concentraciones de fungicidas químicos. N.A. No aplica. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey al 95%.

Producto (nombre comercial)	Ingrediente activo	Dosis	Germinación (%)	Unidades Formadoras de Colonia (Log UFC)
N.A.	Control	N.A	89,8 a	9,68 a
Benomil®	Benlate	1	21,0 d	0,0 b
		½	37,8 c	0,0 b
		¼	54,6 b	0,0 b
Vitavax®	Carboxin Captan	1	5,5 e	0,0 b
		½	6,1 e	0,0 b
		¼	10,1e	0,0 b
Manzate®	Mancozeb	1	0,0 f	0,0 b
		½	0,0 f	0,0 b
		¼	0,0 f	0,0 b
Ridomil®	Metalaxil-Mancozeb	1	0,0 f	0,0 b
		½	0,0 f	0,0 b
		¼	0,0 f	0,0 b

quienes evaluaron las mismas dosis de benomil sobre los conidios sin formular de *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003 (anteriormente *T. koningii*) y encontraron que después de 24 horas de incubación, la germinación fue inferior al 10% en las tres dosis evaluadas. Con la mezcla de compuestos carboxin-captan (Vita-vax®), la germinación fue igual o inferior al 10% en las tres dosis evaluadas (tabla 3), resultado que sugiere que este agroquímico a cualquier dosis evaluada afecta negativamente la viabilidad de *L. lecanii*. Para estos dos compuestos la variable UFC presentó un comportamiento diferente, ya que se observó una inhibición total del crecimiento del microorganismo (tabla 3). Lo anterior posiblemente se debe a que la molécula benomil, es un ingrediente activo perteneciente al grupo químico de los benzimidazoles, el cual inhibe la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio a bajas concentraciones, pero permite la germinación (De Liñan, 1997).

Los ingredientes activos mancozeb (Manzate®) y la mezcla de metalaxil-mancozeb (Ridomil®) inhibieron totalmente la germinación y la formación de colonias de *L. lecanii* (tabla 3), resultado que sugiere que el hongo no es compatible con estos fungicidas a ninguna de las dosis evaluadas. Lo anterior posiblemente se debe a que estos ingredientes activos pertenecen a los grupos químicos de las fenilamidas (metalaxil) y a los ditiocarbamatos (mancozeb), moléculas que afectan principalmente el crecimiento de hongos y la germinación de las esporas. Dicha incompatibilidad de los fungicidas mancozeb y metalaxil con el agente de control biológico evaluado *L. lecanii* VI026 ha sido descrita por varios autores para diferentes agentes biocontroladores (Todorova et al., 1999; Kouassi et al., 2003).

Los cuatro fungicidas evaluados redujeron la germinación de los conidios e inhibieron completamente el desarrollo de las hifas de *L. lecanii*, observándose un mayor efecto sobre el crecimiento micelial que sobre la germinación de los conidios. Estos resultados son similares a los obtenidos por Moorhouse et al. (1992) y Bruck (2009), quienes evidenciaron un mayor efecto sobre el crecimiento micelial que sobre la germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae*.

Con respecto a los insecticidas químicos, cuando se evaluó la compatibilidad del compuesto imidacloprid (Confidor®) con los conidios de *L. lecanii*, se presentaron germinaciones superiores al 80% a las tres dosis evaluadas, valores que no fueron significativamente diferentes con respecto a los obtenidos con el tratamiento control ($F=3,09$, $gl=3$, $P=0.0897$). Un comportamiento similar se obtuvo con la variable UFC, por lo que se podría sugerir que los conidios de *L. lecanii*

VI026 son compatibles con la molécula imidacloprid y que este compuesto no afecta negativamente el crecimiento del microorganismo. Cabe resaltar que para otros hongos entomopatógenos se ha demostrado que la combinación de estos con bajas concentraciones de imidacloprid, puede inclusive aumentar su acción y por lo tanto su eficacia (Santos et al., 2007; Brito et al., 2008). El imidacloprid es un insecticida sistémico del grupo de los neonicotinoides que actúa de forma oral o por contacto y su acción es sobre el receptor acetilcolina nicotínico del sistema nervioso central de los insectos (De Liñan, 1997). Este modo de acción posiblemente favorece un efecto sinérgico entre concentraciones bajas de imidacloprid (100 ppm) y hongos entomopatógenos, como lo reportaron Quintela y McCoy (1998) con los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). En dicho trabajo, las mezclas causaron mortalidades entre el 90% y el 100%, resultado significativamente superior a los obtenidos con los tratamientos individuales, los cuales causaron mortalidades del 40% y 55%.

Con los ingredientes activos buprofezin (Oportune®) y thiamethoxam (Actara®) a la mitad de la dosis y un cuarto de ésta, se presentaron germinaciones superiores al 70%, las cuales no fueron significativamente inferiores con respecto a la germinación presentada por el control (89,89%). Sin embargo, cuando se evaluó la dosis completa de thiamethoxam, se presentó una reducción significativa de la germinación que fue inferior al 10% (tabla 4). Con el compuesto buprofezin (Oportune®) se evidenció que la dosis completa recomendada inhibe la germinación de *L. lecanii*, sin embargo cuando se evaluó la compatibilidad por medio de las UFC no se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento control (tabla 4). Este resultado sugiere que dicho insecticida puede actuar como un agente fungistático sobre el microorganismo, comportamiento similar al encontrado por Cuthbertson et al. (2005) al evaluar la dosis recomendada de buprofezin sobre la germinación y el crecimiento micelial de *L. muscarium*; razón por la cual, los autores sugirieron que este ingrediente activo es compatible y puede ser incluido en un programa de manejo integrado de la mosca blanca *B. tabaci*. El thiamethoxam (Actara®) ha sido ampliamente descrito como compatible con diferentes microorganismos entomopatógenos, sin embargo esta compatibilidad depende de la dosis de aplicación y de la sensibilidad del microorganismo (Batista et al., 2001). Por ejemplo, De Oliveira et al. (2003) encontraron que la mitad de la dosis de thiamethoxam no causa un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *B. bassiana*. Resultado similar se obtuvo en el

Tabla 4. Germinación (%) y Unidades Formadoras de Colonia (Log UFC) de *L. lecanii* en diferentes concentraciones de insecticidas químicos. N.A. No aplica. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey al 95%.

Producto (nombre comercial)	Ingrediente activo	Dosis	Germinación	Unidades Formadoras de Colonia (Log UFC)
N. A	Control	N.A	89,8 ab	9,68
Confidor®	Imidacloprid	1	81,7 abcd	9,14
		½	88,4 ab	9,19
		¼	89,1 ab	9,19
Oportune®	Buprofezin	1	76,5 bcd	9,67
		½	84,7 abc	9,68
		¼	90,3 a	9,67
Malathion®	Malathion	1	5,0 e	9,18
		½	71,1 cd	9,40
		¼	80,2 abcd	9,62
Actara®	Tiamethoxam	1	5,0 e	9,18
		½	70,8 d	9,52
		¼	81,2 abcd	9,70
Match®	Lufenuron	1	71,9 cd	9,61
		½	80,0 abcd	9,60
		¼	86,3 ab	9,61

presente estudio, ya que cuando se evaluó la mitad de la dosis, el recuento de UFC no fue significativamente diferente del obtenido con el control (tabla 4).

Con el insecticida malathion a la mitad y la dosis completa se obtuvieron germinaciones significativamente inferiores a la del tratamiento control ($F=106$, $gl=15$, $P<0,0001$), comportamiento diferente al presentado con la variable UFC en donde no se presentaron diferencias significativas (tabla 4), lo que sugiere un efecto fungistático por parte de esta molécula. Dicho efecto de los compuestos organofosforados también fue sugerido por Estrada, (2006), quien mencionó que pueden interferir en la formación de la pared celular de los hongos entomopatógenos ya que inhiben la enzima que interviene en la polimerización de la quitina. Finalmente, con el insecticida lufenuron (Match®) cuando se evaluó un cuarto de la dosis recomendada, se presentó una reducción significativa en la germinación con respecto al tratamiento control ($F=106$,

$gl=15$, $P<0,0001$), comportamiento diferente al observado con las UFC, ya que para ninguna de las dosis utilizadas se obtuvieron resultados significativamente diferentes del obtenido cuando no se utilizó ningún agroquímico (tabla 4).

Teniendo en cuenta que el producto recién manufacturado presentó una germinación del 93,50% (tabla 4) y que estándares internacionales establecen como límite de viabilidad una germinación del 80%, en el presente trabajo se estimó la concentración inhibitoria 10 (CI_{10}), con la cual se garantiza que la germinación del bioplaguicida sea mayor al 80% y éste mantenga una adecuada eficacia en campo. Para estimar dicha concentración inhibitoria, se realizó un análisis de regresión correlacionando las concentraciones evaluadas de cada insecticida y la germinación del hongo (tabla 5), generándose un modelo matemático con cuya ecuación se estimó la concentración inhibitoria 10 (CI_{10}). Como parámetro de compatibilidad se esta-

Tabla 5. Ecuación del modelo de regresión y estimación de la concentración inhibitoria 10 (CI₁₀) de los insecticidas químicos sobre el Bioplaguicida a base de *L. lecanii*.

Producto (nombre comercial)	Ingrediente activo	Ecuación	Coefficiente de determinación R ²	Concentración Inhibitoria (CI ₁₀) (ppm)	Dosis recomendada (ppm)	Compatible
Confidor®	Imidacloprid	y=-0,027x+92,5	0,9439	462,96	380	Si
Oportune®	Buprofezin	y=-0,024x+94,4	0,9928	599,58	750	No
Malathion®	Malathion	y=-0,018x+113,2	0,9511	1884,4	5700	No
Actara®	Tiamethoxam	y=-0,056x+114,0	0,9576	607,14	1875	No
Match®	Lufenuron	y=-0,149x+90,3	0,9856	69,19	125	No

bleció que si la CI₁₀ es menor que la dosis recomendada por el fabricante para la aplicación del agroquímico, dicho producto no es compatible con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*. Caso contrario, si la CI₁₀ es mayor que la dosis recomendada, se sugiere que dicho producto es compatible con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*. La concentración inhibitoria 10 (CI₁₀) sólo se determinó para los insecticidas químicos, ya que en el caso de los fungicidas, todas las dosis evaluadas inhibieron completamente la germinación, concluyendo que estos productos son incompatibles con el hongo.

El único insecticida compatible con el bioplaguicida a base de *L. lecanii* fue el producto Confidor® (imidacloprid), el cual presentó una CI₁₀ de 462,96 ppm, valor superior a la concentración de aplicación recomendada para dicho producto que es de 380 ppm (tabla 5). Lo anterior sugiere que este producto químico puede ser utilizado en conjunto con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*, ya que la dosis máxima que se recomienda para su aplicación en campo no afecta drásticamente la viabilidad del hongo. Resultado similar obtuvieron Alizadeh *et al.* (2007), quienes determinaron que el compuesto imidacloprid es compatible con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*, por no afectar ni la germinación, ni el crecimiento micelial del mismo en condiciones de laboratorio. Con respecto a los insecticidas Oportune®, Malathion®, Actara® y Match® las concentraciones inhibitorias (CI₁₀) fueron inferiores a la dosis recomendada para cada producto (tabla 5), resultado que sugiere que la aplicación conjunta de estos agroquímicos a su dosis recomendada con el bioplaguicida a base de *L. lecanii*, podría afectar negativamente la viabilidad de los conidios y por lo tanto la eficacia del hongo. Sin embargo, para los productos Oportune® y Match®, sería posible su utilización en conjunto con el bioplaguicida utilizando

la mitad de la dosis recomendada, la cual fue inferior a la CI₁₀. En el caso de los insecticidas Malathion® y Actara®, productos con mayor toxicidad sobre *L. lecanii*, sólo fueron compatibles con éste al utilizarse a un cuarto de la dosis recomendada.

Una alternativa para neutralizar el efecto negativo que tienen los agroquímicos sobre el principio activo del bioplaguicida, puede ser la implementación de frecuencias de aplicación distanciadas en el tiempo. Lo anterior con el fin de disminuir el tiempo de contacto entre el agroquímico y el hongo entomopatógeno. Además, los resultados de compatibilidad *in vitro* de agroquímicos con el bioplaguicida son la base para la selección de moléculas que pueden aplicarse de manera simultánea con este agente de control biológico o de forma alternada en programas de manejo integrado de plagas MIP. Sin embargo, es necesario validar dicha compatibilidad en condiciones reales de campo, ya que en algunas ocasiones se han evidenciado diferencias entre lo determinado en laboratorio en caja de Petri y lo que pasa en ensayos *in vivo* (Ambethgar, 2009).

Tal es el caso de Cuthbertson *et al.* (2005), quienes evaluaron la compatibilidad de *L. muscarium* con imidacloprid, buprofezin y teflubenzuron, encontrando que la germinación fue altamente afectada por estos compuestos en pruebas de laboratorio, pero cuando evaluaron la compatibilidad *in vivo* en un cultivo de tomate no se afectó la eficacia del hongo biocontrolador Cuthbertson *et al.* (2005). Teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo, se recomienda evaluar el efecto *in vivo* de los productos químicos habitualmente utilizados por los agricultores sobre *L. lecanii*, con el propósito de desarrollar y establecer estrategias

de manejo integrado de la mosca blanca *Bemisia tabaci*.

Referencias bibliográficas

- Abadias M., Usall J., Teixidó N., Viñas I. 2003. Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* cpa-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*. 93: 436-442.
- Alizadeh A., Samih M., Khezri M., Riseh R. 2007. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals) with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology*. 9: 31-34.
- Ambethgar V. 2009. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. *Journal of Biopesticides*. 2: 177-193.
- Así M., Bashir M., Afzal M., Ashfaq M., Sahi S.T., 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. *Pakistan Journal of Botany*. 42: 4207-4214.
- De Barro P., Liu S., Boykin L.M., Dinsdale A.B., 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual review of entomology*. 56: 1-19.
- Batista A., Almeida J., Lamas C. 2001. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*. 30: 437-447.
- Brito E., Paula A., Vieira L., Dolinski C., Samuels R. 2008. Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*. 18: 665-673.
- Bruck D.J. 2009. Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil and *in vitro*. *BioControl*. 54: 597-606.
- Copping L. 2009. The manual of biocontrol agents, the biopesticide manual. Hampshire, Reino Unido, p 425.
- Cotes A.M., Villamizar L., Espinel C., Garcia J., Jiménez L., Garzón I., López-Avila A. 2009. Bioplaguicida con base en *Lecanicillium lecanii* para el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*. Innovación y Cambio Tecnológico. 4: 17 - 23.
- Cuthbertson A., Walters K., Deppe C., 2005. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Mycopathologia*. 160: 35-41.
- Elzein A., Kroschel J., Müller-stöver D., Elzien A., Dorette M. 2004. Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of "pesta" formulation of *Fusarium oxysporum* "foxy 2", a potential mycoherbicide for Striga: Effects of temperature, granule size and water activity. *Biocontrol Science and Technology*. 14: 545-559.
- Espinel C., Lozano M.D., Villamizar L., Grijalba E., Cotes A.M. 2008. Estrategia MIP para el control de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en melón y tomate. *Revista Colombiana de Entomología*. 34: 163-168.
- Espinel C., Torres L., Grijalba E., Villamizar L., Cotes A.M. 2008. Preformulados para control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*. 34: 22-27.
- Estrada M. 2006. Variabilidad de las isoenzimas esterases de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Fitosanidad*. 10: 279-283.
- García M., Villamizar L., Cotes A.M. 2007. Compatibility of *Trichoderma koningii* with chemical fungicides. *Biological control of fungal and bacterial plant pathogens IOBC/wprs Bulletin*. 30: 441-445.
- Goettel M.S., Koike M., Kim J.J., Aiuchi D., Shinya R., Brodeur J. 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal Of Invertebrate Pathology*. 98: 256-261.
- Inglis G.D., Kawchuk L.M. 2002. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 70: 60-70.
- Jenkins N.E., Grzywacz D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents - assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*. 10: 753-777.
- Jiménez N., Pastrana J., Zuluaga M., Rivera H., Gómez M., 2010. Evaluación de *Lecanicillium lecanii* incorporado a una estrategia de manejo integrado de cultivo sobre *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera:Aleyrodidae) en berenjena. *Resúmenes XXXVIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN*. p 111.
- Kouassi M., Coderre D., Todorova S.I. 2003. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). *Journal of Applied Entomology*. 127: 421-426.
- Lawrie J., Down V.M., Greaves M.P. 2001. Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Science and Technology*. 11: 283-295.
- De Liñan, V. 1997. Farmacología vegetal. Compendium de las sustancias activas, insectos y ácaros utilizados en la prevención y control de plagas, enfermedades y plantas no deseadas así como en la regulación de la fisiología de los vegetales cultivados. Editorial Litofinter S.A. Madrid, España.
- López-Avila A., Garcia J. 2000. Manejo integrado sostenible de Moscas Blancas como plagas y vectores de virus en los trópicos. En: Reconocimiento, diagnóstico y caracterización de moscas blancas como plagas en el trópico alto de America Latina. Convenio Danida-Corpoica CIAT, p. 43.
- Magan N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. En: Butt T., Jackson C., Magan N. (Eds.). Fungi as biocontrol agent: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, Oxon, Reino Unido, p. 239.
- Moorhouse E.R., Gillespie A.T., Sellers E.K., Charnley A.K. 1992. Influence of fungicides and insecticides on the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*, a pathogen of the vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*. *Biocontrol Science and Technology*. 2: 49 - 58.
- De Oliveira C., Neves P. 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*. 60:663-667.
- Oliveira M., Henneberry T.J., Anderson P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*. 20: 709-723.
- Quintela E., McCoy C. 1998. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaeprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72:220-230.
- Quiroga I., Gómez M., Villamizar L. 2011. Estabilidad de formulaciones a base de granulovirus para controlar *Tecia solanivora*

- (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología*. 37: 27–35.
- Ravensberg W. 2011. Progress in biological control: A roadmap to the successful development and comercialization of microbial pest contro products for control of arthropods. London, U.K, p 383.
- Roditakis O., Tsag N., Karakou A. 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Management Science*. 61: 577–582.
- Santos A., García M., Cotes A.M., Villamizar L. 2012. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*. 29: 150–156.
- Santos A.V., De Oliveira B.L., Samuels R.I. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia*. 163: 233–240.
- Shinde S.V., Patel K.G., Purohit M.S., Pandya J.R., Sabalpara A.N., 2010. *Lecanicillium lecanii* (zimm.) Zare and Games, an important biocontrol agent for the management of insect pests – a review. *Agricultural reviews*. 31: 235–252.
- Srivastava C.N., Maurya P., Sharma P., Mohan L. 2009. Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomological Research*. 39: 341–355.
- Todorova S.I., Coderre D., Duchene R., Cote J. 1999. Compatibility of *B. bassiana* with selected fungicides and herbicides. *Environmental Entomology*. 27: 427–433.
- Villamizar L., Grijalba E., Zuluaga M., Gómez M., Cotes A.M. 2009. Evaluation of some parameters influencing the activity of a fungal biocontrol agent used for *Bemisia tabaci* control. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin*. 43: 327–330.
- Yuan L., Wang S., Zhou J., Du Y., Zhang Y., Wang J. 2012. Status of insecticide resistance and associated mutations in Q-biotype of whitefly, *Bemisia tabaci*, from eastern China. *Crop Protection*. 31: 67–71.
- Zuluaga M., Jimenez N., Rodríguez M., Gómez M. 2010. Evaluación de dos bioplaguicidas para el manejo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) en algodón. *Resúmenes XXXVIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN*, p 94.