

EVALUACIÓN DE FORMULACIONES DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL DE *Meloidogyne* spp.

Beatriz Elena Padilla-Hurtado*; Jairo Eduardo Leguizamón-Caycedo**;
Elena Trinidad Velásquez-Salamanca***

RESUMEN

PADILLA H., B.E.; LEGUIZAMÓN C., J.E.; VELÁSQUEZ S., E.T. Evaluación de formulaciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Meloidogyne* spp. Cenicafé 52(4):249-269. 2001.

Se estandarizó la metodología de formulación granular de las esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* utilizando alginato de sodio al 1% y se evaluó sobre *Meloidogyne* spp. El inóculo de los hongos se obtuvo siguiendo la metodología de siembra en dos fases y la cosecha de esporas por tamizado, optimizada en la planta piloto de control biológico de Cenicafé. Se utilizaron además las formulaciones Conidia® y Destruxin®. Se hizo una evaluación *in vitro* y se obtuvo parasitismo de huevos superior al 75%, con todos los tratamientos. *In vivo* se realizó un ensayo previo de establecimiento de las formulaciones en el suelo con pulpa, esterilizado con Dazomet®, con y sin hospedante y tiempos de evaluación 8 y 15 días. Todas colonizaron el suelo, con mejor establecimiento a los 15 días, independiente de la utilización de hospedante. Posteriormente se probó 1g/150g de suelo, de las formulaciones comerciales, hongos cultivados en arroz y diferentes concentraciones de las formulaciones en alginato y hongos molidos obteniéndose mortalidad del 45% con los hongos cultivados en arroz. Con *B. bassiana* hubo control del 27 al 35% y con *M. anisopliae* no, con la formulación en alginato pero sí con Destruxin® con 37,42% y el hongo molido en la concentración 5×10^9 esporas/gramo con mortalidad del 41,99%.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Meloidogyne* spp., nematodos, formulaciones biológicas, control biológico.

ABSTRACT

Microorganism's effectiveness as biological controllers depends mainly on their formulation. In this work, the methodology of granular formulation with *B. bassiana* and *M. anisopliae* spores, using sodium alginate 1%, was standardized for evaluating *Meloidogyne* spp control. The fungi inoculum was obtained by following the sowing methodology in two phases and the spores harvest by sifting was optimized in the biological control pilot plant of Cenicafé. Besides, the commercial formulations Conidia® y Destruxin® were used. These formulations and the fungi cultivated in rice were evaluated *in vitro*, obtaining a parasitized eggs percentage higher than 75 %, with all the treatments. For the evaluation *in vivo*, a previous test of the formulations establishment in soil with pulp, sterilized with Dazomet®, with and without host and evaluation times of 8 and 15 days was made. All the formulations presented soil colonization exhibiting the best establishment after 15 days independent from the host use. Later a soil concentration of 1g/150, of the commercial formulations, fungi cultivated in rice and different formulations concentrations in alginate and milled fungi were evaluated obtaining a mortality percentage of 45% with the fungi cultivated in rice. *B. bassiana* formulations presented a mortality percentage of 27 to 35%, with *M. anisopliae* formulated in alginate there was no control, but with Destruxin® formulation the control was 37.42%, the milled fungus (5×10^9 spores/gram) and the mortality percentage was 41.99%.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Meloidogyne* spp., nematodes, biological formulations, biological control.

* Bacterióloga en año rural. Universidad Católica de Manizales

** Investigador Principal I. Fitopatología, hasta marzo de 2000. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Investigator Científico II. Entomología Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia

En la actualidad se ha demostrado la efectividad en el uso de organismos vivos para el control de patógenos de plantas, utilizando sus enemigos naturales. Los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* se han usado a gran escala en el mundo como agentes de control.

En Colombia, estos hongos se han utilizado principalmente para reducir la población de la broca del café *Hypothenemus hampei*, dentro de un programa de manejo integrado (5), lo cual ha servido como modelo para desarrollar investigaciones no sólo con la broca, sino también, con enfermedades del café como es el caso del nematodo del nudo *Meloidogyne* spp, el cual ocasiona daño en el sistema radical, induciendo la formación de agallas o tumores que impiden la absorción de nutrimentos y agua por parte de la planta. La distribución amplia del nematodo del nudo radical en las zonas cafeteras del mundo y las cuantiosas pérdidas donde se ha registrado, con alta severidad, como es el caso de Africa, Centroamérica y Brasil, ha traído como consecuencia no sólo pérdidas directas en la producción, sino también la depreciación de los predios y cambio de actividad agrícola (3, 8).

Tradicionalmente se ha buscado solucionar el problema con el uso indiscriminado de nematicidas. No obstante, estudios recientes plantean los múltiples inconvenientes que ofrecen estos productos por su impacto nocivo al medio ambiente y los efectos tóxicos en el hombre. Esto, agregado al corto período de acción como nematicida, el alto costo y la poca respuesta que el cultivo presenta bajo condiciones de campo.

Existe entonces la necesidad de explorar nuevas alternativas de control que produzcan soluciones integrales y una de ellas es el control biológico, parte importante de un programa de manejo integrado de nematodos (27). Se han obtenido resultados promisorios en diferentes cultivos con los hongos *B. bassiana* y *M.*

anisopliae en el control biológico de *Meloidogyne* spp. (16, 19, 26). En el caso específico del cultivo del café se pretende controlar *Meloidogyne* spp, en la etapa de almácigo, ya que cuando una planta sana supera esta etapa los inóculos naturales del nematodo, presentes en el suelo, no afectaran la productividad final del cultivo (15).

El buen desempeño de estos organismos como controladores biológicos depende en gran medida de su formulación, con el fin de que su viabilidad se conserve a través de su procesamiento, almacenamiento y aplicación (9).

El alginato se ha usado para formular hongos biocontroladores con actividad contra nematodos e insectos. (6, 23, 28). La biomasa producida por fermentación líquida es fácilmente encapsulada en alginato y el producto final es granular, con buenas propiedades de manejo que permiten su aplicación al suelo (28). Cabanillas *et al.* (6), determinaron la influencia de varios transportadores de *Paecilomyces lilacinus* en la sobrevivencia y protección del tomate contra *Meloidogyne incognita*, indicando que con la utilización de pellets de alginato como transportador disminuye en un 62% el desarrollo de huevos de esta especie, con un 32% de masas de huevos infectados.

Estudios realizados por Stirling y Mani (28), demostraron que los hongos registrados como controladores de nematodos *Dactylella candida* y *Artrobotrys dactyloides*, pueden ser producidos masivamente e incorporados dentro de una formulación granular con alginato, con muy buenas propiedades de manejo, almacenamiento y con excelente actividad biológica contra estados juveniles de *Meloidogyne javanica*.

En la presente investigación se evaluó la utilización de formulaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, en condiciones *in vitro* e *in*

vivo, para el control preventivo del nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp en plantas de café, con el fin de incluirlos en un plan de manejo integrado en la etapa de almácigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en 4 etapas en las instalaciones de Cenicafé:

Etapa 1: Incremento del inóculo de *Meloidogyne* spp. El inóculo de *Meloidogyne* spp se incrementó en plantas de tomate variedad Rutgers y los huevos se extrajeron siguiendo la metodología descrita por Hussey y Barker, citada por Barker (4). En ésta, raíces de plantas de tomate infectadas se lavaron minuciosamente con agua y luego se cortaron en trozos de 1 a 2cm, para sumergirlos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%. Se agitaron de 4 a 5 minutos; posteriormente se tamizaron por mallas de 200 y 500 mesh, donde quedaron los huevos, los cuales se lavaron repetidamente con abundante agua destilada, para eliminar los residuos del desinfectante. En esta etapa se observó que las plantas sembradas en suelo estéril (esterilizado en autoclave a 121°C, 15psi, durante 1 hora), presentaban poco crecimiento y amarillamiento del follaje debido a la destrucción de la microflora del suelo durante este proceso, especialmente de las micorrizas. Por tanto, se sugirió realizar un ensayo aplicando solución nutritiva de Hoagland al suelo en el cual se sembraron plantas de café de la variedad Caturra.

La unidad experimental fue la planta, con 10 repeticiones en un diseño completamente al azar. Se evaluaron tres variables: longitud de la raíz, altura y peso fresco de la planta. Se plantearon 5 tratamientos: T1, agua; T2, solución de Hoagland 1 vez por semana a partir del transplante; T3, solución de Hoagland 2 veces por semana a partir del transplante; T4, solución de Hoagland 1 vez por semana dos meses

después del transplante y T5, solución de Hoagland 2 veces por semana después de dos meses del transplante. Las variables se estudiaron a través de análisis de varianza según el diseño especificado.

Etapa 2: Desarrollo de las formulaciones de *B. bassiana* y *M. Anisopliae*. Preparación del inóculo de *B. bassiana* y *M. Anisopliae*. Para la propagación de los hongos se utilizó cultivo en dos fases, sumergido y en superficie, metodología utilizada en la planta piloto de control biológico de Cenicafé para la producción de *B. bassiana*. (20):

Siembra en sumergido. Se preparó una suspensión de esporas de *B. bassiana* (Cenicafé 9205) y *M. anisopliae* (Cenicafé 9236), con una concentración de $1,9 \times 10^7$ esporas por mililitro. Estas suspensiones se inocularon en frascos que contenían 200ml de medio con base en soya, previamente esterilizado y se llevaron a un agitador rotacional a 110rpm, incubados a 27°C durante 72 horas, con el fin de obtener agregados miceliales.

Siembra en superficie. En bandejas de 60 x 40cm, desinfectadas previamente con cloruro de benzalconio y alcohol del 70%, se depositaron 250g de arroz esterilizado y sobre éste se agregó el cultivo en sumergido y se cubrió con papel plástico Vinipel. Posteriormente se realizó la selección de esporas para su formulación, mediante tamizado, mediante tamices colocados en el siguiente orden: 850, 600, 425 y 180 micras de apertura. Las esporas recuperadas en el fondo, se ajustaron a una concentración de 1×10^{10} esporas/g, mezclándolas con arroz remanente (obtenido del cultivo luego de la remoción de esporas, el cual fue molido utilizando un molino PROBAT EMMERICH, dotado de una malla de 1000 micras). Para el análisis de la patogenicidad *in vivo* se ajustaron las concentraciones a 5×10^7 , 5×10^8 y 5×10^9 esporas/g.

Proceso de Formulación. Metodología de encapsulación en alginato de sodio al 1% (28). Se mezclaron 7,5g de caolín y 1,5g de alginato de sodio en 150ml de agua y se homogeneizó en un agitador magnético. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C, 15psi durante 15 minutos. Cuando la solución estaba a temperatura ambiente se le adicionaron 2g de esporas del hongo *M. anisopliae* y enseguida se le agregaron, con agitación constante, 6 gotas de Tween 80 al 1%.

Para la formación de los gránulos, la suspensión obtenida se depositó en un embudo de decantación y se dejó gotear sobre 200ml de cloruro de calcio 0,1M en constante agitación. Posteriormente se filtro al vacío y los gránulos se secaron en lecho fluidizado durante 20 minutos.

Para observar el crecimiento de los hongos formulados en el laboratorio se sembraron en cajas de SDA (Sabraud Destroxa Agar) 5 gránulos por cada una y también se realizó una suspensión de 0,1g de la formulación en 10ml de agua destilada estéril para sembrar 0,1ml por caja. Para evaluar el establecimiento en el suelo del producto formulado, se aplicó 1g por vaso (150g de suelo esterilizado en autoclave) y se replicó 10 veces, realizando las lecturas a los 7 y 15 días.

Con base en los resultados obtenidos con la metodología de encapsulación en alginato (28), se decidió realizar modificaciones empleando alginato de sodio al 1% y sin la utilización de cloruro de calcio, estandarizando la siguiente metodología para cada hongo evaluado: Se mezclaron durante 5 minutos 100g de esporas de *M. anisopliae* de un 10% de humedad y una concentración de 1×10^{10} esporas/g, con 53ml de alginato de sodio al 1%. De igual forma se mezclaron 100 gramos de esporas de *B. bassiana* de un 1,10% de humedad y una concentración de 1×10^{10} esporas/g con 50ml de alginato de sodio al 1%. Posteriormente, se granuló a presión por medio de un tamiz de 1600 micras y se llevaron

esparcidos en bandejas a una estufa de secado Telco a 25°C, hasta obtener un 10% de humedad.

Para el análisis de la patogenicidad *in vivo* se formularon las esporas con concentraciones de 5×10^7 , 5×10^8 y 5×10^9 esporas/g, utilizando la metodología de formulación con alginato de sodio al 1%, estandarizada para cada hongo.

Etapa 3. Control de calidad de las formulaciones preparadas y comerciales Conidia® y Destruxin®. Antes de estudiar su efecto en el control de *Meloidogyne* spp, se evaluaron las propiedades biológicas y fisicoquímicas de las formulaciones, mediante la metodología descrita por Vélez *et al.* (29). El control de calidad para las formulaciones comerciales Conidia® (Agrevo) y Destruxin® (Laverlam), se realizó en el momento de recibir las formulaciones y para el montaje de cada uno de los pasos de la etapa 4 (Pruebas de patogenicidad *in vitro* e *in vivo*). Para las formulaciones preparadas se realizó un control en el momento de formulación y al igual que las comerciales para el montaje de la Etapa 4.

Etapa 4. Evaluación de la efectividad de las formulaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* preparadas y comerciales, en el control del nematodo del nudo radical del café *Meloidogyne* spp. Pruebas de Patogenicidad *in vitro* (11). Se utilizaron las formulaciones comerciales Conidia® y Destruxin®, las formulaciones preparadas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en alginato de sodio al 1% y estos hongos cultivados en arroz mediante la metodología propuesta por Cenicafé (1).

De cada una de estas formulaciones se tomó 1g y se suspendió en 10ml de agua destilada estéril. Los huevos necesarios se obtuvieron por medio de la técnica de Hussey y Barker, citada por Barker (4), ajustando a una concentración de 200 huevos de *Meloidogyne* spp en 10 microlitros de agua destilada estéril. Se prepararon cajas de petri con agar agua al 1,5% y se señaló un punto en el centro de cada caja,

sitio en el cual se depositaron 10 microlitros de la suspensión de esporas del hongo y 10 microlitros de la suspensión de huevos; se agitaron manualmente y se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 7 días.

La unidad experimental fue la caja de petri con 20 repeticiones y se evaluaron 6 tratamientos constituidos por: cuatro formulaciones, una preparada y una comercial para cada uno de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, cada uno de estos hongos cultivados en arroz y un testigo constituido por 200 huevos de *Meloidogyne* spp.

Los tratamientos para su estudio se distribuyeron en un diseño completamente al azar, se midió la variable porcentaje de huevos parasitados en microscopía óptica de luz, con los objetivos de 20X y 40X, con previa aplicación de azul de lactofenol.

Se efectuó análisis de varianza y se compararon los promedios con una prueba múltiple de Tukey al 5%.

Evaluación *in vivo* de las formulaciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control del nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp. Se utilizó el sustrato suelo más pulpa en proporción en volumen de 3:1, esterilizado con el producto químico Basamid® (Dasomet) para llenar con 150g, vasos plásticos de 16 onzas de capacidad. Según las recomendaciones de aplicación del producto se utilizaron 60g/m² de suelo, se dejó cubierto con plástico durante un mes al cabo del cual se removió durante 3 días y se realizó una prueba de germinación con semillas de rábano, lechuga, pepino y tomate. De igual manera se efectuó la recuperación de formas activas de nematodos mediante la metodología del tamiz plástico -papel facial doble modificada del método del filtro de algodón de Oostenbrink modificado (2). Posteriormente, se realizó un ensayo de establecimiento de las formulaciones comercia-

les, preparadas y los hongos cultivados en arroz en el sustrato suelo más pulpa. La unidad experimental fue un vaso plástico dispuesto en un diseño completamente al azar y 3 repeticiones. Se evaluaron 6 tratamientos constituidos por 1g de las formulaciones comerciales Conidia® y Destruxin®, 1g de las formulaciones preparadas en alginato de sodio al 1% de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y de estos hongos cultivados en arroz. La variable de respuesta estuvo constituida por las UFC (unidades formadoras de colonia) de *B. bassiana* y *M. anisopliae* por gramo de suelo, con y sin hospedante (planta de café variedad Caturra) y en dos tiempos de evaluación, a los 8 y 15 días.

La variable UFC se sometió al análisis de varianza para cada tratamiento. Los promedios de los tratamientos con y sin hospedante en los dos tiempos de evaluación se compararon con una prueba LSD (Least Significant Difference) al nivel de 0,05. Estos análisis se realizaron para cada tratamiento con el objetivo de observar las mejores condiciones de establecimiento de cada formulación.

Inóculo de las formulaciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para la evaluación *in vivo*. Con base en trabajos anteriores y ensayos previos se determinó que las formulaciones en altas concentraciones (1 x 10¹⁰ esporas/gramo) aplicadas en un solo sitio pueden sufrir un proceso de autoinhibición, sin observar germinación, ni colonización de los hongos en el sustrato. Por tanto, se decidió evaluar por cada vaso contenedor de 150g de suelo con pulpa, 1g de las formulaciones en alginato de sodio al 1% en concentraciones de 5x10⁷, 5x10⁸ y 5x10⁹ esporas/gramo para cada hongo, y estas mismas concentraciones de cada hongo molido sin formular. También se evaluó 1g de los hongos cultivados en arroz y 1g de las formulaciones comerciales Conidia® y Destruxin® de *B. bassiana* y *M. Anisopliae*, respectivamente. Las dosis se inocularon el día del trasplante de la planta de café variedad

Caturra, mezclando con el suelo de la rizosfera y se dejaron 15 días para su establecimiento. El tiempo de establecimiento y la utilización de hospedante se determinaron en el ensayo anterior.

Inóculo de *Meloidogynespp.* Se aplicaron 2500 huevos de *Meloidogyne spp* por vaso, obtenidos de las raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) según la metodología de Hussey y Barker citada por Barker (4).

Descripción de tratamientos. Para cada hongo se realizó el montaje de los siguientes tratamientos aplicando 1g por vaso de:

- T1, hongo cultivado en botellas con arroz cocido (1) (*M. anisopliae*, concentración $9,7 \times 10^7$ esporas/g y *B. bassiana*, concentración $3,3 \times 10^8$ esporas/g)
- T2, hongo formulado con alginato de sodio al 1% (concentración 5×10^9 esporas/g)
- T3, hongo formulado con alginato de sodio al 1% (concentración 5×10^8 esporas/g)
- T4, hongo formulado con alginato de sodio al 1% (concentración 5×10^7 esporas/g)
- T5, hongo en arroz molido (concentración 5×10^9 esporas/g)
- T6, hongo en arroz molido (concentración 5×10^8 esporas/g)
- T7, hongo en arroz molido (concentración 5×10^7 esporas/g)
- T8, formulación comercial (Destruxin®, 2×10^8 esporas/g y Conidia®, 1×10^{10} esporas/g)
- T9, testigo huevos (2500)
- T10, testigo alginato - arroz.

Evaluación de tratamientos. Esta se realizó a los 15 días de ser inoculados los nematodos, tomando el contenido de cada vaso por tratamiento, extrayendo y contando los estadios juveniles presentes, empleando la metodología de Jenkins, para la separación de nematodos del suelo, por

centrifugación y flotación en azúcar (2). Sobre el tamiz de cocina se depositó el suelo contenido en cada vaso y con un chorro de agua a presión se hizo pasar a una jarra y se completó la suspensión de suelo a 2 litros; se agitó durante 20 segundos y se dejó decantar 10 segundos. El sobrenadante se hizo pasar a través de un tamiz de 38 micras. Los residuos acumulados sobre el tamiz se llevaron en su totalidad a dos tubos, por medio de un chorro de agua a presión, para ser centrifugados a 3200rpm, durante 5 minutos.

Inmediatamente se eliminó el sobrenadante de cada uno de los tubos, se llenaron con la solución de azúcar al 50% y se centrifugaron nuevamente, durante 5 minutos. El sobrenadante que contenía los nematodos, se hizo pasar por el tamiz de 38 micras para eliminar el exceso de azúcar; se dirigió suavemente un chorro de agua de abajo hacia arriba del tamiz llevando el contenido a un beaker, para efectuar el análisis de la población de los nematodos, realizando dos lecturas por mililitro.

Para su estudio los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones. Se midió la variable número de estados juveniles (J2), calculando con esta la variable la mortalidad corregida por mortalidad natural en el testigo, determinada mediante la fórmula de Schneider Orelli.

$$MC = \frac{\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \times 100$$

<< 1 >>

Las variables número de estados juveniles y mortalidad corregida se estudiaron a través de análisis de varianza, según el diseño experimental especificado. La comparación de los tratamientos se realizó a través de una prueba de Tukey al 5%. A la variable mortalidad corregida se le realizaron las transformaciones necesarias para su normalización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1: Incremento del inóculo de *Meloidogyne* spp. Experimento con Solución de Hoagland. El análisis estadístico no mostró efecto de los tratamientos para las tres variables evaluadas, longitud de la raíz, peso fresco y altura de la planta (Tabla 1). Lo anterior, indicó que la aplicación de la fertilización con la solución de Hoagland se comportó en forma similar al tratamiento con sólo aplicación de agua y no reemplazó el efecto biológico de las micorrizas destruidas en el proceso de esterilización. La aplicación al suelo esterilizado de los elementos que componen la solución nutritiva de Hoagland para mejorar el desarrollo de las plantas, no fue suficiente, debido al importante papel que desempeña la flora microbiana en la absorción de nutrimentos por parte de éstas.

Las micorrizas contribuyen en la absorción de iones que se difunden lentamente y están presentes en bajas concentraciones en el suelo, como es el caso del fósforo, amonio, potasio, zinc y cobre (25). Al destruir las micorrizas en el proceso de esterilización del suelo en autoclave, resulta difícil la absorción de algunos nutrientes necesarios para su desarrollo.

Etapa 2: Desarrollo de formulaciones para los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium*

***anisopliae*. Preparación del inóculo de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.** Uno de los aspectos importantes en el desarrollo de formulaciones es la producción masiva de los hongos. Goettel y Roberts (13), proponen el cultivo en sumergido y el cultivo en fase sólida como un método conveniente para la producción masiva de hongos entomopatógenos.

La metodología optimizada en la planta piloto de control biológico de Cenicafé para la producción de *B. bassiana* y también aplicada en este trabajo para *M. anisopliae* es considerada de alta eficiencia y bajo costo, la cual permite establecer así una metodología a escala industrial. (20).

Para la obtención de los inóculos se determinaron las siguientes condiciones. En la Tabla 2 y la Figura 1, se observa cómo la producción de esporas de *M. anisopliae* en las bandejas con sustrato arroz se estabiliza a partir de 18 días con una concentración de $1,34 \times 10^9$ esporas/g y una humedad del 11%. Por tal motivo, se seleccionó este tiempo como el óptimo para la cosecha de esporas.

En la selección de partículas del material cosechado, empleando la serie de tamices de 20, 30, 40 y 80 que corresponden a 850, 600, 425 y 180 micras, respectivamente, se determinó que 30 minutos de tamizado es el tiempo adecuado para

Tabla 1. Promedio de las variables longitud de la raíz, altura y peso fresco de plantas variedad Colombia, después de la aplicación de solución nutritiva de Hoagland en diferentes tratamientos.

Tratamiento	Altura (cm)	Longitud Raíz (cm)	Peso (g)
1. agua	7,58	15,32	1,73
2. Sln Hoagland 1 vez/ semana, a partir del transplante	7,36	13,02	1,72
3. Sln Hoagland 2 veces/semana, a partir del transplante.	7,36	11,98	1,58
4. Sln Hoagland 1 vez/ semana, a partir 2 de meses del transplante.	7,19	14,32	1,73
5. Sln Hoagland 2 veces/semana, a partir de 2 meses del transplante.	7,56	13,41	1,87
Promedio	7,41	13,61	1,72
R²	0,024	0,235	0,034
Pr > F	0,885	0,015	0,802
C.V %	12,90	15,89	29,14

lograr una buena recuperación de esporas, sin observar aumento considerable con los recuentos a los 60 y 90 minutos de tamizado (Tabla 3, Figura 2).

Para *B. bassiana* ya están estandarizadas las condiciones de cosecha, en la planta piloto de control biológico de Cenicafé (7), considerándose el momento ideal entre 12 a 15 días después de la siembra en las bandejas, con una concentración del orden de 10^9 esporas/g y una humedad entre 8 y 12%. Para la selección de partículas con un tiempo de tamizado de 30 minutos se logra la máxima recuperación de esporas. Posterior a la obtención de esporas se realizó el ajuste de la concentración a 1×10^{10} , 5×10^7 , 5×10^8 , 5×10^9 esporas/gramo, mezclando las esporas puras recuperadas con remanente de arroz. Luego se realizó el proceso de formulación con la metodología estandarizada para *B. bassiana* y *M. anisopliae*, mencionada anteriormente.

Proceso de formulación. Los gránulos obtenidos por la metodología de encapsulación en alginato de calcio propuesta por Stirling y Mani (28), sembrados en condiciones de laboratorio en medio de cultivo SDA y en el suelo, no presentaron crecimiento del hongo *M. anisopliae* en las cajas con SDA y no se estableció en el suelo en ninguno de los tiempos evaluados. El resultado anterior pudo ser causado por la compactación y la no humectabilidad de los gránulos, que no permitió su desagregación, para que el hongo germinara (Figura 3). Por tanto, se repitió el proceso de formulación con una modificación en la etapa de secado que consistió en que esta no se realizó en el lecho fluidizado sino al aire durante 48 horas, obteniéndose gránulos igualmente compactos, sin crecimiento del hongo en SDA ni establecimiento en el suelo.

Una de las propiedades del alginato consiste en formar geles al reaccionar con sales de calcio y el cloruro de calcio causa la formación

Tabla 2. Concentración de esporas/ gramo, % humedad y % de viabilidad de *Metarhizium anisopliae* en diferentes tiempos después de la siembra bandejas con sustrato arroz.

Días	Concentración esporas/g	% Humedad	% Viabilidad
8	$3,6 \times 10^8$	27,5	93
12	$9,19 \times 10^8$	16	95
15	1×10^9	14	95
18	$1,3410^9$	11	95
21	$1,3810^9$	9	94
25	$1,3710^9$	7	94

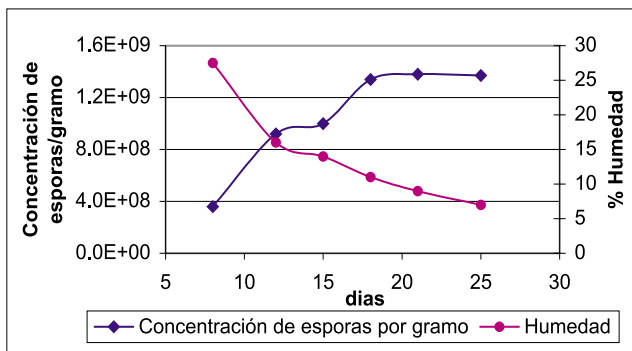
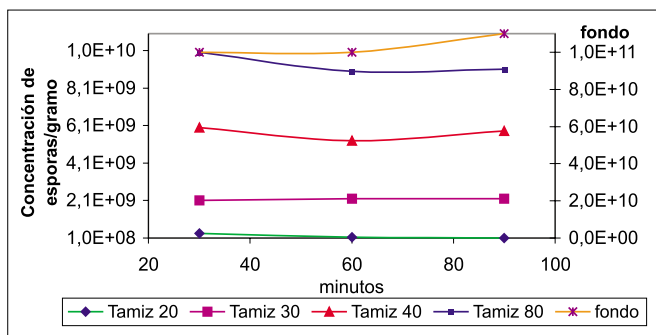


Figura 1. Concentración (esporas por gramo) y porcentaje de humedad de *Metarhizium anisopliae* en diferentes tiempos después de la siembra en bandejas con arroz.

Tabla 3. Concentración de esporas por gramo de *Metarhizium anisopliae* en diferentes tamices a los 30, 60 y 90 minutos.

Minutos	Tamiz 20	Tamiz 30	Tamiz 40	Tamiz 80	Fondo (<180µ)
30	3,5x10 ⁸	2,1x10 ⁹	6,0x10 ⁹	1,0x10 ¹⁰	1,0x10 ¹¹
60	1,5x10 ⁸	2,2x10 ⁹	5,3x10 ⁹	9,0x10 ⁹	1,0x10 ¹¹
90	9,7x10 ⁸	2,2x10 ⁹	5,8x10 ⁹	9,1x10 ⁹	1,1x10 ¹¹

Figura 2. Concentración (esporas por gramo) de *Metarhizium anisopliae* en diferentes tamices a los 30, 60 y 90 minutos



instantánea del gel y la precipitación del alginato. Con el fin de evitar que los gránulos quedaran tan compactos se realizó un ensayo del proceso de formulación, utilizando solo alginato de sodio.

Para este ensayo se evaluaron dos concentraciones de alginato de sodio al 1 y 2%. Se mezclaron durante 5 minutos las esporas de los hongos con alginato, hasta lograr una concentración uniforme en toda la preparación. Para obtener el granulado se utilizaron los tamices: 1600, 1180, 1000 y 500 micras. Se hizo recuento de esporas para observar diferencias entre las dos concentraciones de alginato utilizadas, 1 y 2%, en los diferentes tamices. Como se observa en la Tabla 4 y la Figura 4, el número de esporas con las dos concentraciones de alginato de sodio utilizadas fue muy similar; por tanto, se decidió trabajar con alginato de sodio al 1% y el tamiz de 1600 micras. Se seleccionó esta apertura teniendo en cuenta la porosidad del suelo para la adecuada dispersión de los gránulos (Figura 5). El producto formulado mostró crecimiento de *M. anisopliae* en SDA pero no se estableció en el suelo estéril.

Con los resultados anteriores se realizaron modificaciones en el proceso de formulación: no se utilizó el cloruro de calcio para la encapsulación de las esporas, se utilizó alginato de sodio al 1% y se granuló por medio de un tamizado a presión con una apertura de 1600 micras. En las Figuras 6 y 7 se presenta el tipo de gránulos obtenidos con el proceso de formulación en alginato de sodio al 1%.

Etapas 3: Control de calidad de las formulaciones preparadas y comerciales Conidia® y Destruxin® (29). En las pruebas microbiológicas se determinó una concentración del orden de 10¹⁰ esporas/g para las formulaciones en alginato de sodio al 1% y para Conidia®. Con Destruxin® se observaron concentraciones del orden de 10⁹ esporas/g y en el último lote recibido se determinó una concentración del orden de 10⁸ esporas/g. En la última fecha de evaluación del control de calidad de las formulaciones en alginato de sodio al 1% se encontraron concentraciones del orden de 10⁷, 10⁸ y 10⁹ esporas/g. Por tanto, se corroboró que las formulaciones comerciales presentan la concentración de esporas/g que registran los

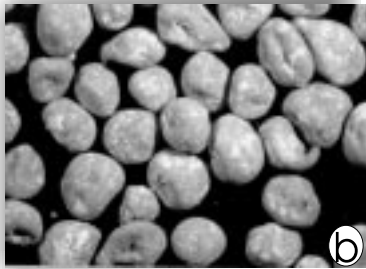
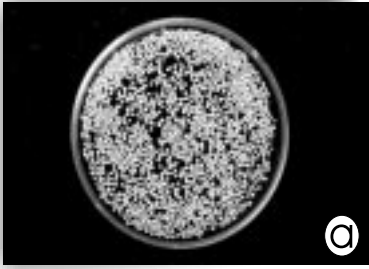


Figura 3. Gránulos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos utilizando la metodología de encapsulación en alginato. **a.** Gránulos de un tamaño de 0,9x0,6mm, aproximadamente **b.** Gránulos observados en el estereoscopio a un aumento de 8X.

Tabla 4. Recuento de esporas por gramo en los diferentes tamices, con dos concentraciones de alginato de sodio al 1 y 2%.

Tamiz	Esp/g alginato 1%	Esp/g alginato 2%
Fondo (< 500 μ)	9,80 x 10 ⁸	9,35 x 10 ⁸
500 micras	6,40 x 10 ⁸	6,65 x 10 ⁸
1000 micras	5,25 x 10 ⁸	5,80 x 10 ⁸
1180 micras	6,65 x 10 ⁸	6,00 x 10 ⁸
1600 micras	8,10 x 10 ⁸	7,40 x 10 ⁸

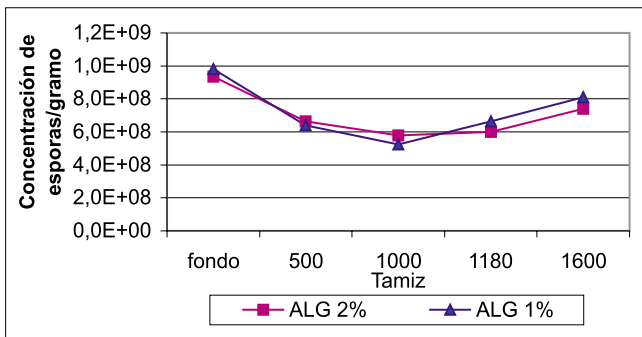


Figura 4. Esporas por gramo en los diferentes tamices, con dos concentraciones de alginato de sodio al 1 y 2%.

fabricantes y las preparadas en alginato de sodio al 1%, las propuestas anteriores para su formulación (Tabla 5). La germinación de esporas para las formulaciones comerciales debe ser superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Las formulaciones Conidia® y de alginato de sodio al 1%, presentaron un mayor porcentaje de germinación entre el 82,3±2,75 al 95±0,1% y entre el 89,8±0,95 al 92,04±0,04 respectivamente, con respecto a las formulaciones de *M. anisopliae* en las cuales el porcentaje de germinación varió entre el 75,89 ± 1,40 al 83,47 ± 2,17 % para Destruxin® y entre el 81,22± 1,82 al 88,90±0,14%, para la formulación de alginato de sodio al 1%. La pureza para todas las formulaciones fue superior

al 94% en todos los controles de calidad evaluados, siendo el rango óptimo superior al 90% (Tabla 5).

En las pruebas fisicoquímicas de las formulaciones el valor del pH, influye en la germinación del hongo, retardándola en un pH extremo; los intervalos óptimos se consideran entre 5,5 a 7,0, encontrándose entre estos intervalos las formulaciones en alginato de sodio al 1% y con valores más altos de 7,0 las formulaciones Conidia® y Destruxin®.

Los intervalos de humedad en productos formulados con sustancias inertes se presentan

Figura 5.
Granulado obtenido en los diferentes tamices, de izquierda a derecha desde el tamiz de 1600, 1180, 1000, 500 micras hasta el fondo.

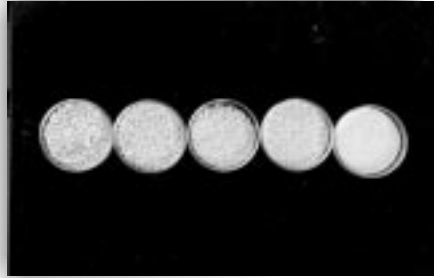


Figura 6.
Gránulos de *Metarhizium anisopliae* formulado con alginato de sodio al 1%. Metodología estandarizada.
a. Gránulos de un tamaño aproximado de 1x0,7mm.
b. Gránulos observados en estereoscopio a un aumento de 8X.

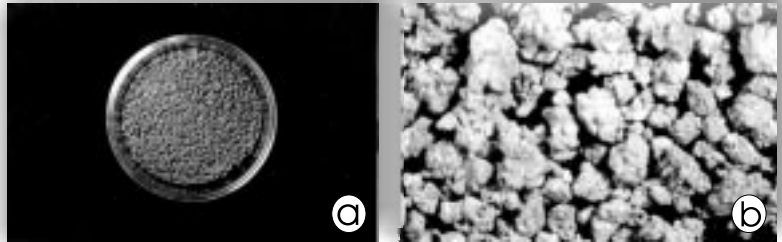
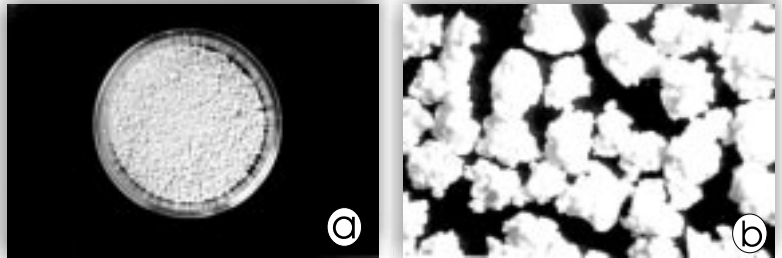


Figura 7.
Gránulos de *Beauveria bassiana* formulado con alginato de sodio al 1%. Metodología estandarizada.
a. Gránulos de tamaño aproximado de 1x0,7mm.
b. Gránulos observados en estereoscopio a un aumento de 20X.



entre el 3 y 15%. Todas las formulaciones evaluadas se encontraron dentro de este rango, observando con las formulaciones en alginato de sodio al 1% una humedad alrededor del 10% y con las formulaciones comerciales alrededor del 5% (Tabla 5). Tal como se aprecia en la Tabla 6, el control de calidad de los hongos en arroz molido no presentó cambios considerables en sus propiedades biológicas con el proceso de formulación en alginato de sodio al 1%.

Etapas 4: Evaluación de la efectividad de las formulaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el control del nematodo del nudo radical del café

Meloidogyne spp. El potencial de *B. bassiana* y *M. anisopliae* como controladores de *Meloidogyne spp.*, se había registrado en trabajos anteriores (16, 19) y se corroboró con las etapas desarrolladas en esta investigación.

Pruebas de Patogenicidad *in vitro*. El análisis de varianza para la variable porcentaje de huevos parasitados detectó diferencias significativas al 5% entre tratamientos. En todos se observó un porcentaje de huevos parasitados de *Meloidogyne spp.* superior al 75%. Los mejores tratamientos fueron Destruxin® y *M. anisopliae* en arroz, que no fueron significativamente

Tabla 5. Control de calidad de las formulaciones comerciales y en alginato de sodio al 1% de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

Formulación	Fecha	Pruebas Microbiológicas			Pruebas Físicoquímicas	
		Concentración de esporas	% Germinación	% Pureza	pH	% Humedad
Conidia®	04-03-99	4,90 x10 ¹⁰ ±0,33 x 10 ¹⁰	82,30 ± 2,75	100,00	7,9	5,30
	11-08-99	1,06 x10 ¹⁰ ±0,02 x10 ¹⁰	95,00 ± 0,10	100,00	7,9	5,10
	30-09-99	1,18 x10 ¹⁰ ±0,021 x10 ¹⁰	93,50± 0,48	100,00	7,8	4,91
	06-01-00	1,0 x10 ¹⁰ ±0,051 x10 ¹⁰	90,60± 0,88	98,00	7,8	5,00
Destruxin®	24-03-99	1,24 x10 ⁹ ±0,09 x 10 ⁹	83,47 ± 2,17	100,00	7,4	5,62
	11-08-99	2,14 x10 ⁹ ±0,12 x10 ⁹	79,80 ± 1,35	99,90	7,3	5,61
	30-09-99	2,66 x10 ⁸ ± 0,17 x10 ⁸	75,89 ± 1,40	99,30	7,3	5,50
	06-01-00	2,02 x10 ⁸ ± 0,37 x10 ⁸	81,67 ± 0,97	98,40	7,3	5,48
<i>M. anisopliae</i> formulado con alginato de sodio 1%	05-04-99	1,10x10 ¹⁰ ±0,06 x 10 ¹⁰	81,22 ± 1,82	99,90	6,5	10,10
	11-08-99	1,36 x10 ¹⁰ ±0,11 x10 ¹⁰	85,25 ± 0,1	100,00	6,5	10,13
	30-09-99	1,05 x10 ¹⁰ ± 0,015x10 ¹⁰	82,51 ± 2,07	98,11	6,6	10,00
	07-01-00	5,05 x10 ⁹ ± 0,15x10 ⁹	88,90 ± 0,14	95,30	6,4	10,00
	07-01-00	5,09 x10 ⁸ ± 0,48x10 ⁸	85,89 ± 1,10	96,00	6,4	10,50
	07-01-00	5,1 x10 ⁷ ± 0,053x10 ⁷	86,30 ± 0,98	94,90	6,5	10,20
<i>B. bassiana</i> formulado con alginato de sodio 1%	29-07-99	1,00 x10 ¹⁰ ±0,039 x 10 ¹⁰	0	0	5,7	10,20
	11-08-99	1,04 x10 ¹⁰ ±0,015 x10 ¹⁰	90,80 ± 1	99,00	5,6	10,00
	30-09-99	1,02 x10 ¹⁰ ±0,024 x10 ¹⁰	92,04 ± 0,04	97,90	5,7	9,90
	07-01-00	5,21 x10 ⁹ ± 0,55x10 ⁹	90,50± 0,55	94,70	5,6	10,15
	07-01-00	5,09 x10 ⁸ ± 0,62x10 ⁸	89,80± 0,95	95,80	5,7	10,00
	07-01-00	5,1 x10 ⁷ ± 0,083x10 ⁷	91,60 ± 1,31	97,00	5,6	10,50

Tabla 6. Control de calidad de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en arroz molido.

Hongos en arroz molidos	Pruebas Microbiológicas		Pruebas Físicoquímicas		
	Concentración de esporas	% Germinación	% Pureza	PH	% Humedad
<i>M. anisopliae</i>	5,09 x10 ⁹ ±0,35x10 ⁹	89,77±0,54	96,9	5,9	10,9
	5,12 x10 ⁸ ±0,38x10 ⁸	87,35± 1,07	95,7	6,0	11,3
	5,14 x10 ⁷ ±0,15x10 ⁷	85,99± 1,18	95,3	6,0	11,9
<i>B. bassiana</i>	5,21 x10 ⁹ ±0,29x10 ⁹	91,4± 1,51	93,9	5,4	11,15
	5,14 x10 ⁸ ±0,12x10 ⁸	90,5± 0,79	95,3	5,6	11,6
	5,20 x10 ⁷ ±0,18x10 ⁷	91,9± 1,16	96,5	5,6	11,8

diferentes con la variable huevos parasitados perodifirieron estadísticamente (P>0,05) del resto de tratamientos, seguidos por Conidia® estadísticamente diferente ((P>0,05) de los demás tratamientos. *B. bassiana* cultivado en arroz y formulado en alginato de sodio al 1% no presentó diferencias significativas al 5% entre ellos. El menor porcentaje de huevos parasitados

se observó con los hongos formulados en alginato de sodio al 1% y no fueron estadísticamente diferentes entre ellos (Tabla 7). Los resultados corroboran estudios realizados por Leguizamón y Padilla 1997 (16), quienes encontraron aplicando la misma metodología, valores de patogenicidad *in vitro* del 63,3% y 75,5% para *B. bassiana* y *M. anisopliae*

respectivamente, sobre huevos de *Meloidogyne* spp, indicando así que el proceso de formulación no disminuye la patogenicidad en estas condiciones. Igualmente, con todos los tratamientos, se encontró patogenicidad *in vitro* superior al 76%, resultado comparable con la patogenicidad *in vitro* alrededor del 70% del hongo *Verticillium chlamydosporium* sobre huevos de *Meloidogyne* spp, hongo registrado como enemigo natural de *Meloidogyne* spp (14).

Observación del parasitismo *in vitro*. En esta etapa se tomaron registros fotográficos con el fin de observar el parasitismo que ejercen los hongos formulados comercialmente, formulados con alginato de sodio al 1% y cultivados en arroz, sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Esta metodología permitió observar en detalle las características del parasitismo que realiza cada hongo sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Con el hongo *M. anisopliae* cultivado en arroz y en la formulación Destruxin®, se observó abundante proliferación de micelio y estructuras de reproducción en los huevos afectados, corroborando el parasitismo de este hongo observado en trabajos anteriores (16). Con *M. anisopliae* formulado en alginato de sodio al 1% se observaron huevos colonizados con micelio del hongo, pero una menor germinación de esporas, comparado con la formulación comercial Destruxin® y cultivado en arroz (Figura 8).

En las pruebas de patogenicidad *in vitro* se observó con *B. bassiana* cultivado en arroz y en la formulación Conidia®, abundante producción de esporas y micelio. En la Figura 9 se observa cómo el micelio emerge del tejido interno del huevo a través de la membrana y en forma periférica. Esta forma de parasitismo de *B. bassiana* no se había observado en trabajos anteriores (16). Con la formulación de *B. bassiana* en alginato de sodio al 1%, se observó germinación del hongo y algunos huevos invadidos de micelio y otros de forma atípica aparentemente vacuolizados.

Tabla 7. Porcentaje de huevos de *Meloidogyne* spp parasitados por *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Tratamiento	Porcentaje de huevos parasitados
Destruxin® (2,14 x 10 ⁹ esp/g)	89,961 a*
<i>M. anisopliae</i> en arroz (2 x 10 ⁸ esp/g)	88,913 a
Conidia® (1,06 x 10 ¹⁰ esp/g)	84,505 b
<i>B. bassiana</i> en arroz (8,3 x 10 ⁸ esp/g)	80,314 c
<i>B. bassiana</i> formulado (1,04 x 10 ¹⁰ esp/g)	76,735 cd
<i>M. anisopliae</i> (1,36 x 10 ¹⁰ esp/g) formulado	76,116 d

En esta prueba se observó con los hongos formulados comercialmente y cultivados en arroz, abundante producción de micelio e invasión de los huevos de *Meloidogyne* spp, parasitismo similar al observado con hongos registrados como controladores de nematodos *V. chlamydosporium* y *P. lilacinus*, los cuales inhiben la eclosión de los huevos destruyendo sus elementos estructurales por mecanismos físicos y bioquímicos (10, 14). Con las formulaciones en alginato de sodio al 1%, además del parasitismo de los huevos, se observaron huevos con morfología atípica, aspecto que se debe tener en cuenta por la diversidad de adaptaciones en el modo de parasitar de los hongos antagonistas de *Meloidogyne* spp. (18, 27).

El parasitismo de estos hongos sobre huevos de *Meloidogyne* spp parece ser de naturaleza enzimática, ya que poseen mecanismos especiales que les facilitan la penetración de la cutícula de insectos utilizando enzimas extracelulares como lipasas, proteasas y quitinasas. La pared de los huevos del nematodo esta constituida por lípidos, proteínas y quitinas (24), por lo cual las enzimas ya indicadas pueden degradarla.

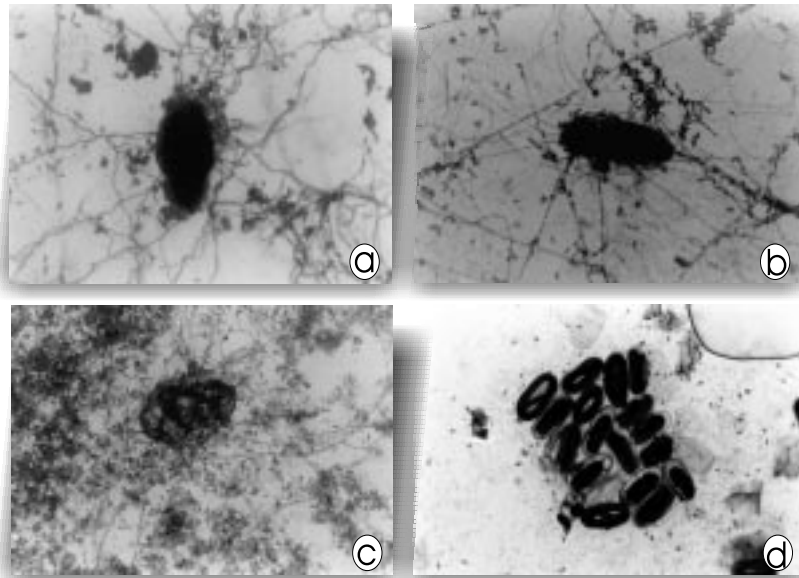


Figura 8. Huevos de *Meloidogyne spp.* parasitados por *Metarhizium anisopliae* a. formulación comercial Destruxin® a 40X, b. cultivado en arroz a 40X, c. formulado con alginato de sodio al 1% a 40X y d. Testigo a 20X .

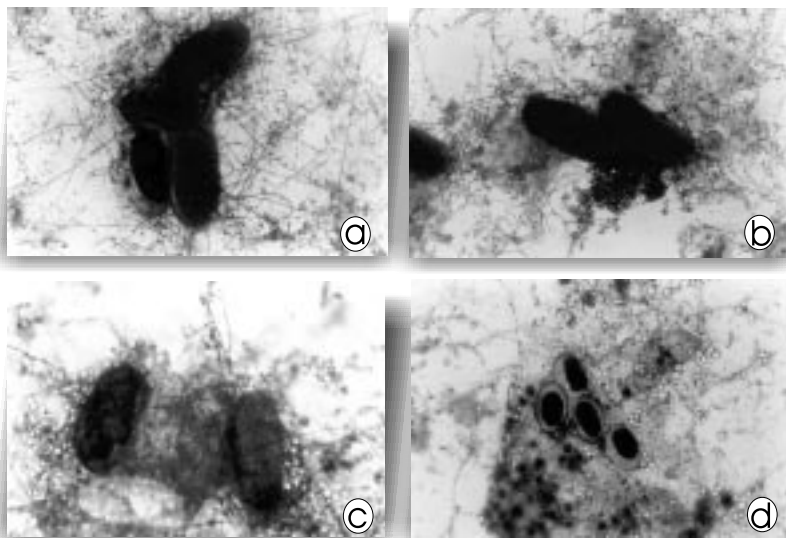


Figura 9. Huevos de *Meloidogyne spp.* parasitados por *Beauveria bassiana* a. formulación comercial Conidia® a 40X, b. cultivado en arroz a 40X, c. formulado en alginato de sodio al 1% a 40X y d. huevos con forma atípica, aparentemente vacuolizados por el efecto de *Beauveria bassiana* formulado en alginato de sodio al 1% aumento 20X.

Evaluación *in vivo* de las formulaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el control de *Meloidogyne* spp. Experimento sobre el establecimiento de los hongos formulados en suelo esterilizado con Basamid® (Dazomet). Después de la esterilización del sustrato suelo con pulpa, con Basamid® (Dazomet), se observó a los tres días la germinación de las semillas de rábano, lechuga, pepino y tomate. En la determinación de formas activas de nematodos no se recuperaron juveniles de *Meloidogyne* spp., lo cual indicó que se podía usar esta forma de esterilización del sustrato para las pruebas de patogenicidad *in vivo*.

En el establecimiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, en el sustrato suelo con pulpa esterilizado con Basamid®, la mayor cantidad de UFC/g de suelo, se obtuvo con hongos cultivados en arroz, seguida por Conidia® y Destruxin® y por último, los hongos formulados con alginato de sodio al 1%.

Lo anterior indica que la aplicación del hongo en el suelo con base alimenticia en gran cantidad y alta humedad, favoreció la colonización más rápida del sustrato. Aunque las formulaciones en alginato tienen una base alimenticia, su porcentaje de humedad probablemente no permitió la eficaz colonización del sustrato o toma un mayor tiempo hasta que el gránulo se desintegre, comparada a la observada con los hongos cultivados en arroz (Tabla 8).

El suelo desinfectado posteriormente inoculado con el agente biológico permite que este se establezca cuando la interacción competitiva en el sustrato sea mínima (17). En todas las formulaciones evaluadas hubo establecimiento, dando mejores resultados los hongos cultivados en arroz, debido a que la adición de nutrimentos puede mejorar la colonización del suelo por el hongo. Pero el establecimiento puede no ocurrir, posiblemente porque los sustratos orgánicos presenten una colonización más rápida por hongos saprófitos o patógenos, que

poseen alta competitividad con la habilidad antagonista del agente de control biológico (6).

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas al 5%, para la variable UFC con y sin planta hospedante, lo cual indicó que para esta metodología de evaluación se podría utilizar o no la planta. Sin embargo, al considerar el inóculo del nematodo es conveniente la utilización del hospedante, ya que *Meloidogyne* spp es un parásito obligado. El análisis de varianza para la variable UFC mostró diferencias significativas al 5% en los dos tiempos de evaluación, 8 y 15 días, mostrando mayor establecimiento a los 15 días con la mayoría de los tratamientos evaluados, excepto con Conidia® con la cual no se encontró diferencia significativa al 5% con los dos tiempos evaluados, es decir, que se podría dejar 8 días para su establecimiento (Tabla 9).

Los resultados indicaron que hubo mayor establecimiento de las formulaciones comerciales, con alginato de sodio al 1% y cultivados en arroz, a los 15 días de inoculación, independiente de la utilización o no de la planta hospedante. Por tanto, se decidió realizar el montaje de la prueba de selección de dosis *in vivo* con la metodología descrita anteriormente, utilizando suelo esterilizado con Basamid®, dejando las formulaciones 15 días para su establecimiento y con utilización de la planta.

Evaluación *in vivo*. En ésta, los juveniles recuperados en la extracción determinaron el grado de parasitismo de huevos, efectuado por los hongos al ser comparados con los juveniles del testigo. El análisis de varianza para la variable número de estadios juveniles detectó diferencias significativas del 5% entre tratamientos de cada uno de los hongos evaluados.

Para *B. bassiana* todos los tratamientos fueron significativamente diferentes del testigo inoculado solamente con huevos de *Meloidogyne* spp, lo cual indicó que los trata-

mientos donde se inoculó el hongo redujeron significativamente ($P>0,05$) el número de estados juveniles por 150g de suelo. Los mejores tratamientos fueron: el hongo cultivado en arroz con $3,3 \times 10^8$ esporas/g, formulado en alginato de sodio al 1%, concentración 5×10^9 esporas/g y el molido a la misma concentración, los cuales no fueron significativamente diferentes entre ellos ($P>0,05$). Estos dos últimos tratamientos no fueron significativamente diferentes del hongo formulado en alginato de sodio al 1% y molido a las concentraciones de 5×10^8 y 5×10^7 esporas/g, ni con la formulación comercial Conidia®. El hongo cultivado en arroz, aunque no fue diferente al hongo formulado en alginato y molido a una concentración de 5×10^9 esporas/g, si difirió significativamente en el número de estados juveniles con el resto de tratamientos (Tabla 10).

Para *M. anisopliae* la mayor reducción de juveniles se obtuvo con el hongo cultivado en arroz con una concentración de $9,7 \times 10^7$ esporas/g,

molido a una concentración de 5×10^9 esporas/g y formulado como Destruxin®, siendo estos los únicos tratamientos estadísticamente diferentes a nivel del 5% con el testigo inoculado con 2.500 huevos de *Meloidogyne* spp. Estos tratamientos también fueron diferentes ($P>0,05$) con el hongo formulado en alginato de sodio al 1% en las tres concentraciones evaluadas 5×10^7 , 5×10^8 y 5×10^9 esporas/g y molido en una concentración 5×10^8 esporas/g. Los tratamientos del hongo molido a una concentración de 5×10^9 esporas/g y formulado como Destruxin® no fueron diferentes estadísticamente ($P>0,05$) al hongo molido en una concentración de 5×10^7 esporas/g, siendo este tratamiento igual al testigo (Tabla 11).

En el recuento de juveniles se pudo observar la diversidad de microorganismos que presentó el sustrato suelo:pulpa, entre ellos micorrizas, nematodos saprofíticos, protozoarios, rotíferos, bacterias y hongos, los cuales aumentan la competencia de los biocontroladores en el suelo. Esta biodiversidad en el sustrato pudo impedir que el

Tabla 8. Promedio de UFC de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por gramo de suelo en la dilución 10^{-4} de las formulaciones comerciales, preparadas y los hongos cultivados en arroz.

Tratamiento	UFC/g de suelo	CV (%)
<i>Beauveria bassiana</i> en arroz ($5,6 \times 10^8$ esp/g).	45,91	13,26
<i>Beauveria bassiana</i> formulado ($1,02 \times 10^{10}$ esp/g).	11,58	26,72
Conidia® ($1,18 \times 10^{10}$ esp/g)	22,41	27,61
<i>Metarhizium anisopliae</i> en arroz ($1,14 \times 10^8$ esp/g)	36,91	17,09
<i>Metarhizium anisopliae</i> formulado ($1,05 \times 10^{10}$ esp/g).	9,33	25,31
Destruxin® ($2,66 \times 10^8$ esp/g).	22,83	13,96

Tabla 9. Comparación de promedios con la prueba LSD (Least Significant Difference) al 0,05 de las UFC de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por gramo de suelo en la dilución 10^{-4} con dos tiempos de evaluación y con y sin hospedante para cada formulación evaluada.

Tratamiento	Tiempo (UFC)		Hospedante (UFC)	
	8 días	15 días	Con	Sin
<i>B. bassiana</i> en arroz	37,83 b *	54,00 a	46,83 a	45,00 a
<i>B. bassiana</i> formulado	8,16 b	15,00 a	11,50 a	11,66 a
Conidia	18,50 a	26,33 a	22,00 a	22,83 a
Destruxin	16,83 b	28,83 a	21,83 a	23,83 a
<i>M. anisopliae</i> en arroz	30,50 b	43,33 a	38,83 a	35,00 a
<i>M. anisopliae</i> formulado	6,00 b	12,66 a	8,16 a	10,50 a

*Promedios identificados por la misma letra no difieren estadísticamente según LSD al 5%.

potencial de control de *B. bassiana* y *M. anisopliae* demostrado *in vitro* fuera expresado suficientemente, observando menor eficiencia en el suelo. Con el recuento de estados juveniles de *Meloidogyne* spp se generó la variable mortalidad corregida con el testigo inoculado con 2.500 huevos de *Meloidogyne* spp. El análisis de varianza para esta variable mostró diferencias entre tratamientos al nivel de significancia del 5% para cada uno de los hongos evaluados *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Con *B. bassiana* todos los tratamientos presentaron diferencias significativas al 5% con el testigo solamente inoculado con los huevos de *Meloidogyne* spp. Con el hongo cultivado en arroz en concentración de $3,3 \times 10^8$ esporas/g se obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad del 49% significativamente diferente al 5% que el resto de tratamientos evaluados, seguido por las formulaciones en alginato de sodio al 1% y hongo molido en las concentraciones 5×10^7 , 5×10^8 , 5×10^9 esporas/g y la formulación Conidia® que fueron estadísticamente diferentes al testigo ($P > 0,05$), presentando entre el 27% al 35% de mortalidad corregida (Tabla 12). Es importante resaltar que sigue siendo mejor la aplicación del hongo en arroz que el resto de tratamientos como las formulaciones en alginato y comerciales, teniendo en cuenta que estas también presentaron un

porcentaje de control al compararlas con el testigo, sin observar diferencias en la concentración de esporas del hongo aplicada.

Mosquera y Murcia (19), encontraron una reducción del 38% de la población de *Meloidogyne* spp en raíces de guayaba tratadas con el hongo *B. bassiana*, resultando este control más rentable que el control químico tradicional. Estos porcentajes encontrados por estos autores son comparables a los obtenidos en esta investigación con el hongo *B. bassiana*.

Con *M. anisopliae* los mejores tratamientos fueron el hongo cultivado en arroz con una concentración de $9,7 \times 10^7$ esporas/g, el hongo molido con una concentración de 5×10^9 esporas/g y Destruxin®, con una mortalidad del 44,43%, 41,99% y 37,42%, respectivamente. Estos tratamientos fueron estadísticamente iguales entre si ($P > 0,05$) y diferentes a nivel del 5% de significancia con el testigo, con el hongo molido a una concentración de 5×10^8 esporas/g y con el hongo formulado en las tres concentraciones evaluadas, siendo estos iguales estadísticamente (Tabla 13).

La literatura registra como medida de control de nematodos el uso del manejo integrado, en el

Tabla 10. Número de estadios juveniles de *Meloidogyne* spp recuperados del suelo después del tratamiento con *B. bassiana* cultivado en arroz y en diferentes concentraciones 5×10^9 , 5×10^8 , 5×10^7 esporas/g del hongo formulado en alginato de sodio al 1%, molido y formulado comercialmente.

Tratamiento	Número de estadios juveniles
Testigo alginato – arroz	180,40 a*
Testigo (2500 Huevos de <i>Meloidogyne</i> spp)	127,15 b
Conidia, 1×10^{10} esporas/g.	92,40 c
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^7 esporas/g.	89,50 c
Hongo molido, 5×10^7 esporas/g.	86,80 c
Hongo molido, 5×10^8 esporas/g.	84,35 c
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^8 esporas/g.	83,15 c
Hongo molido 5×10^9 esporas/g.	82,35 cd
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^9 esporas/g.	81,80 cd
Hongo cultivado en arroz, $3,3 \times 10^8$ esporas/g.	64,45 d

* Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%. Coeficiente de variación experimental 12,80%.

cual se incluye: control biológico, hospedantes genéticamente resistentes, modificación del ambiente, prácticas culturales y rotacionales. Cuando es necesario y apropiado se utilizan los nematocidas químicos (27). Teniendo en cuenta que el control biológico nunca ha sido utilizado como un único procedimiento para el control de nematodos, las mortalidades encontradas en la evaluación *in vivo* con los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, alrededor del 45%, podrían sumarse como un complemento de manejo integrado en almácigos de café. Por tanto, se debe realizar la evaluación de estas formulaciones en la etapa de almácigo y ensayos para la mejorar

las formulaciones presentadas buscando mayor persistencia de estos hongos en el suelo.

La disminución de la población de *Meloidogyne* spp obtenida con los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en esta investigación, es comparable a la lograda por Giraldo y Leguizamón (12) con el hongo *P. lilacinus*, quienes obtuvieron entre 32 y 52% de disminución de estados infectivos de *Meloidogyne* spp en almácigos de café. Leguizamón y Padilla (16), obtuvieron porcentajes de mortalidad del 64,28% y 52,24% con *B. bassiana* y *M. Anisopliae*, respectivamente, aplicando 2g de los hongos

Tabla 11. Número de estadios juveniles de *Meloidogyne* spp recuperados del suelo después del tratamiento con *Metarhizium anisopliae* cultivado en arroz y en diferentes concentraciones 5×10^9 , 5×10^8 , 5×10^7 esporas/g del hongo formulado en alginato de sodio al 1%, molido y formulado comercialmente.

Tratamiento	Número de estadios juveniles
Testigo alginato – arroz	207,85 a*
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^7 esporas/g.	189,20 ab
Testigo Huevos	167,65 abc
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^9 esporas/g.	152,90 bc
Hongo molido, 5×10^8 esporas/g.	146,25 c
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^8 esporas/g.	145,90 c
Hongo molido 5×10^7 esporas/g.	135,40 cd
Destruxin, 2×10^8 esporas/g.	104,90 de
Hongo molido, 5×10^9 esporas/g.	97,25 de
Hongo cultivado en arroz, $9,7 \times 10^7$ esporas/g.	93,15 e

* Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.
Coeficiente de variación experimental 19,50%.

Tabla 12. Mortalidad corregida *in vivo* sobre huevos de *Meloidogyne* spp del hongo *Beauveria bassiana* cultivado en arroz, en diferentes concentraciones 5×10^9 , 5×10^8 , 5×10^7 del hongo formulado en alginato de sodio al 1% y molido.

Tratamiento	Mortalidad corregida %
Hongo cultivado en arroz, $3,3 \times 10^8$ esporas/g.	49,31 a*
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^9 esporas/g.	35,66 b
Hongo molido 5×10^9 esporas/g.	35,23 b
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^8 esporas/g.	34,60 b
Hongo molido, 5×10^8 esporas/g.	33,66 b
Hongo molido, 5×10^7 esporas/g.	31,73 b
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^7 esporas/g.	29,61 b
Conidia, 1×10^{10} esporas/g.	27,33 b
Testigo: 2500 huevos de <i>Meloidogyne</i> spp	0,00 c

* Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.
Coeficiente de variación experimental 14,61%. Datos transformados con $(\text{Log } 10 (\text{PMC } 5))^2$

cultivados en arroz por 150g de suelo estéril, con una concentración de $2,4 \times 10^9$ esporas/g para *B. bassiana* y de $8,6 \times 10^8$ esporas/g para *M. anisopliae*. En esta investigación empleando la misma metodología de evaluación *in vivo* y con la aplicación de 1g de las formulaciones/150g del sustrato suelo con pulpa, se obtuvieron para *B. bassiana* cultivado en arroz a una concentración de $3,3 \times 10^8$ esporas/g, una mortalidad del 49%. Con la formulación comercial, el hongo molido y formulado en las concentraciones 5×10^7 , 5×10^8 , 5×10^9 esporas/g, se encontró mortalidad entre el 27 al 35%. Con *M. anisopliae* en arroz con una concentración de $9,7 \times 10^7$, molido en la más alta concentración 5×10^9 y formulación comercial presentó mortalidad alrededor del 40%. Por tanto, estos resultados corroboran trabajos anteriores que indican el potencial de estos hongos para el control de *Meloidogyne* spp, en almácigo.

Tal como lo indican los resultados obtenidos en el proceso de formulación de los hongos, se disminuyó la patogenicidad *in vivo* sobre huevos de *Meloidogyne* spp, comparados con los hongos cultivados en arroz, aspecto que fue más evidente con *M. anisopliae*, ya que la mortalidad corregida no se diferenció del testigo ($P > 0,05$). Los mayores contenidos de nutrimentos y humedad de los hongos en arroz comparados con los de las formulaciones en alginato y comerciales, permi-

tieron una colonización más rápida del sustrato y por tanto, mayor control de *Meloidogyne* spp. Tal como lo indican Papavizas *et al.* (21), la suma de nutrimentos junto con los propágulos de los controladores biológicos puede mejorar la germinación de esporas y por consiguiente, la colonización del suelo.

Cabanillas *et al.* (6), sugieren que la utilización de nutrimentos para la aplicación de *P. lilacinus* al suelo en el control de *M. incognita*, puede aumentar la supervivencia y actividad antagónica del hongo. Patrick *et al.* (22), indican que la descomposición de los nutrimentos del arroz contribuye a la disminución de la población de nematodos, ya que durante este proceso se pueden producir sustancias nematocidas. Además, la materia orgánica estimula el crecimiento de la planta y compensa el daño ocasionado por el nematodo (6).

Es muy importante continuar con estudios para mejorar la formulación de los hongos y permitir que el potencial de control de estos hongos sea aprovechado al máximo; así mismo, el mayor conocimiento sobre la ecología y el comportamiento biocontrolador bajo condiciones de suelo permitirá la introducción de estos hongos en el programa de manejo integrado de *Meloidogyne* spp en almácigos de café.

Tabla 13. Mortalidad corregida *in vivo* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. del hongo *Metarhizium anisopliae* cultivado en arroz y en diferentes concentraciones 5×10^9 , 5×10^8 , 5×10^7 del hongo formulado en alginato de sodio al 1% y molido.

Tratamiento	Mortalidad corregida %
Hongo cultivado en arroz, $9,7 \times 10^7$ esporas/g.	44,43 a*
Hongo molido 5×10^9 esporas/g.	41,99 ab
Destruxin, 2×10^9 esporas/g.	37,42 ab
Hongo molido, 5×10^7 esporas/g.	19,23 bc
Hongo molido, 5×10^8 esporas/g.	12,97 c
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^8 esporas/g.	12,76 c
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^9 esporas/g.	8,78 cd
Testigo: 2500 huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.	0,00 c
Hongo formulado en alginato de sodio 1%, 5×10^7 esporas/g.	12,00 d

* Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.

Coefficiente de variación experimental 36,58%. Datos transformados con $\sqrt{(PMC + 5)}$

AGRADECIMIENTOS

A las Doctoras Lucelly Orozco y Esther Cecilia Montoya de la Disciplina de Biometría. Al personal de la Disciplina de Fitopatología y de la Planta Piloto de control biológico de Cenicafé.

LITERATURA CITADA.

1. ANTÍA L., O.P.; POSADA F., F.J.; BUSTILLO P., A.E.; GONZÁLEZ G., M.T. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avances Técnicos Cenicafé No 182: 243-254. 1992.
2. BAEZA A., C.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Evaluación de cuatro métodos de extracción de formas activas de nematodos del suelo. Cenicafé 24 (4): 90-99. 1973.
3. BAEZA A., C.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Evaluación de nematocidas para el control de *Meloidogyne exigua* en plantas de café var. Caturra. Cenicafé 28 (3): 108-116. 1977.
4. BARKER, K.R. The application of microplot technique in nematological research. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 2. Raleigh, N.C, North Carolina State University Graphics, 1985. p.127-134.
5. BUSTILLO P., A. E.; POSADA, F. J. El desarrollo y uso de entomopatógenos en el control de la broca del café en Colombia. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 23. Cartagena, Julio 17 - 19, 1996. Memorias. Cartagena, Socolen, 1996. p. 232-253.
6. CABANILLAS, E.; BARKER, K.R.; NELSON, L.A. Survival of *Paecilomyces lilacinus* in selected carriers and related effects on *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 21 (1):121-130. 1989.
7. CALDERÓN V., E.; CORTÉS S., L.F. Producción de un bioinsecticida de uso en el control de la broca del café. Santafé de Bogotá, Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería Química, 1993. 167 p. (Tesis: Ingeniero Químico)
8. CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P.; GNAPRAGASAM, N. C. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R.; BRIDGE, J. (eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, CAB International, 1990. p. 387-430.
9. CONNICK, W.J.; LEWIS, J.A.; QUIMBY, P.C. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. (eds). New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. New York, Alan R. Liss, 1990. p. 345-372.
10. GIRALDO F., M.A. LEGUIZAMÓN C., J.E. Evaluación de *Paecilomyces lilacinus* en el control de *Meloidogyne spp* en almácigos de café (*Coffea arabica*). Manizales, Universidad de Caldas, 1996. 102p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
11. GIRALDO F., M.A. LEGUIZAMÓN C., J.E. Aislamiento y evaluación *in vitro* de hongos a partir de estados de *Meloidogyne spp*. infectados naturalmente. Cenicafé 48 (3):195-203. 1997.
12. GIRALDO F., M.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Control de *Meloidogyne spp* en almácigos de café con el hongo *Paecilomyces lilacinus*. Cenicafé 49 (2):85-101. 1998
13. GOETTEL, M.S.; ROBERTS, D.W. Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C.W. (eds). Biological control of locust and grasshoppers. Oxon, CAB International, 1992. p. 230-238.
14. HINCAPIÉ R., D. Efecto de *Verticillium chlamydosporium* Goddar, en el control de *Meloidogyne spp*. Goeldi en almácigos de café. *Coffea arabica*. Manizales, Universidad Católica de Manizales, 1998. 118p. (Tesis: Especialista en Microbiología).
15. LEGUIZAMÓN C, J.E. Efecto de *Meloidogyne spp*. en plantaciones establecidas de café var. Caturra. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ, Cenicafé. Informe Anual de actividades, Disciplina de Fitopatología 1993-1994. Chinchiná, Cenicafé, 1994.
16. LEGUIZAMÓN C., J.E.; PADILLA, B.P. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

- en el control del nematodo del nudo radical *Meloidogyne spp.* Cenicafé 52 (1):29-41. 2001.
17. LUMSDEN, R.D.; LEWIS, J.A.; FRAVEL, D.R. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. *In:* HALL, F.R.; BARRY, J.W. (eds). Biorational pest control agents: formulation and delivery. Washington, American Chemical Society, 1995. p.166-182. (ACS Symposium Series N° 595).
 18. McCLURE, M. Biological control of nematodes *In:* BAKER, R.R.; DUNN, P.E. (eds). New directions in biological control, alternatives for suppressing agricultural pest and diseases. New York, Alan R. Liss, 1990. p. 255-269.
 19. MOSQUERA E., A.T.; MURCIA R., N. Efectos de extractos vegetales y hongos patógenos en la población de nematodos en guayaba *Psidium guajava* L. Revista Fitopatología Colombiana. 21: 25-29. 1997.
 20. OLARTE O., D.E. Optimización de un medio de cultivo para la producción en superficie del hongo *Beauveria bassiana*. Santafé de Bogotá, Corporación Tecnológica de Bogotá. 1993. 137p.
 21. PAPAVIDAS, G.C.; FRAVEL, D.R.; LEWIS, J.A. Proliferation of *Talaromyces flavus* in soil in alginate pellets. *Phytopathology* 77: 131-136. 1987.
 22. PATRICK, Z.A.; SAYRE, R.M.; THORPE, H.J. Nematocidal substances selective for plant - parasitic nematodes in extracts of decomposing rye. *Phytopathology* 55:702-704. 1965.
 23. PEREIRA, R.M.; ROBERTS, D.W. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology* 84 (6):1657-1661. 1991.
 24. SASSER, J.N.; CARTER, C.E. An Advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol 1. Raleigh, North Caroline State University, 1985. p. 303-308.
 25. SCHÖNBECK, F.; DEHNE, H. V.A. Mycorrhiza and plant health. *In:* VANCURA, V.; KUNC, F. (eds). Interrelationships between microorganisms and plants in soil. Amsterdam, Elsevier, 1989. p. 83-91 (Developments in Soil Science N° 18).
 26. SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi. A review. *Bioresource Technology* 58:229-239. 1996.
 27. STIRLING, G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. Progress, problems and prospects. Wallingford, CAB International, 1991. pp.137-142, 146-150, 166-175.
 28. STIRLING, G.R.; MANI, A. The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate. *Nematologica* 41:240-250. 1995
 29. VÉLEZ A., P.E.; POSADA F., F.; GONZÁLEZ G., M.T.; MARÍN G., P.; BUSTILLO P., A.E. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Boletín Técnico Cenicafé* 17: 1-34. 1997.