

Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones colombianas

Isolation, partial characterization and identification as potential biological agents of fungal isolates in some Colombian regions

ALBA MARY IBARRA¹, AMANDA VARELA R.²

Revista Colombiana de Entomología 28 (2): 129-137 (2002)

Resumen. Se inició una colección de hongos con potencial biocontrolador, aislados de diferentes regiones de Colombia, con fines docentes, investigativos y de servicio. Se colectaron 110 muestras de material vegetal, insectos muertos y suelo, bajo diferentes coberturas vegetales, desde bosque altoandino húmedo hasta páramo, en los departamentos del Meta, Cauca, Huila, Córdoba y Cundinamarca. Los aislamientos fúngicos se realizaron en medios de cultivo de composición definida y se identificaron 58 con potencial biocontrolador. Del total de aislamientos, el 3,2% fueron entomopatógenos primarios, 20,6% controladores de fitopatógenos, 28,6% entomopatógenos secundarios y 47,6% no biocontroladores. La mayoría de los hongos se aislaron en el departamento del Cauca (67% del total de las muestras), de los cuales el 38,7% provinieron de suelo, 28,6% de material vegetal y 32,7% entre insectos, frutos y hojarasca. Los aislamientos se conservaron en agua destilada y suelo, y se evaluaron a los 15, 45 y 90 días. Conservaron sus características morfológicas macro y microscópicas. La conservación en agua destilada es el método de elección por su economía, fácil manipulación y recuperación. Los aislamientos se evaluaron *in vitro* frente a los plaguicidas Furadan, Manzate, Malathion y Benlate a 25 y 250 ppm. Furadan y Manzate redujeron la tasa de crecimiento de todos los hongos significativamente ($p < 0.01$), con respecto al control negativo y Benlate lo inhibió completamente ($p < 0.01$), en las dos concentraciones. Esta colección servirá de base para posteriores estudios al nivel molecular y fisiológico y para el uso futuro de estos aislamientos como potenciales agentes de control biológico.

Palabras clave: Hongos. Control biológico. Caracterización. Conservación. Diversidad. Colombia.

Summary. We began a fungi culture collection isolated from different Colombian regions, for uses in education, research and as potential biological agents. We collected 110 samples of vegetal material, dead insects and soil, from different vegetation communities, in the departments of Meta, Cauca, Cordoba and Cundinamarca. The fungal isolates were treated in culture media of defined composition. We identified 58 isolates with biocontrol potential. Of all the isolates, 3,2% were primary entomopathogenic, 20,6% phytopathogen controllers, 28,6% secondary entomopathogens and 47,6% possessed no biocontrol potential. Most of the fungi were isolated in the Department of Cauca (67% of the total number). 38,7 were derived from soil, 28,6% from plant material and 32,7% from insects, fruits and litterfall samples. The isolates were preserved in both soil and distilled water. Their macroscopic and microscopic morphological characteristics were evaluated 15, 45 and 90 days after collection. The preservation in distilled water was found to be the best method due to its low cost, ease of manipulation and recuperation of isolates. The isolates were evaluated *in vitro* against pesticides such as Furadan, Manzate, Malathion and Benlate at concentrations of 25 and 250 ppm. Manzate reduced the growth rate of all isolates significantly ($p < 0.01$). With respect to the negative control, Furadan and Benlate inhibited the growth of all the isolates completely at both concentrations ($p < 0.01$). This collection will serve as an important reference for future studies of these biological control agents (isolates) at molecular and physiological levels.

Key words: Fungi. Biological control. Characterization. Conservation. Diversity. Colombia.

Introducción

Las numerosas especies de hongos biocontroladores, incluidas en los diferentes grupos taxonómicos, ofrecen amplias posibilidades de uso como agentes de regulación de poblaciones plaga y de enfermedades, presentándose nuevas perspectivas para la agricultura, debido a su facilidad de manejo,

capacidad de esporulación y persistencia (Rodríguez 1990). La aplicación de microorganismos combinados con otros sistemas tradicionales de control, contribuyen a recuperar y mantener, de una manera más eficaz, el equilibrio entre las poblaciones de organismos presentes en los ecosistemas en general y en particular en los agroecosistemas (Astudillo 1993).

Algunos de estos hongos biocontroladores, los entomopatógenos, se registran en condiciones naturales bajo la forma de enzootias y pueden ocasionar epizootias importantes (Rodríguez 1984). Los hongos entomopatógenos más comunes son los Hyphomycetes, que atacan diferentes especies de importancia económica, especialmente del orden Lepidoptera y Coleoptera (Rodríguez

1 Bacterióloga. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

2 Autor para correspondencia: Profesora Asistente. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Cra. 7ª No. 43-82, Ed. 53, Lab. 406 B. Bogotá, D.C., Colombia. E-mail: avarela@javeriana.edu.co

1990). La clase incluye géneros de hongos biocontroladores de enfermedades, como *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Fusarium* no patógeno.

Por otra parte, los agroquímicos tienen una actividad tóxica sobre animales, plantas y ecosistemas en general, y se ha visto la necesidad de evaluar el efecto que sobre el crecimiento y esporulación de estos hongos, tienen algunos fungicidas, herbicidas, insecticidas y fertilizantes, que se usan corrientemente en la práctica agronómica. Sería importante utilizar de forma combinada alguno de estos productos con agentes de control biológico (Rodríguez 1990; Astudillo 1993; Atehortúa y Londoño, 1994; Rivera *et al.* 1994).

Los objetivos de este estudio consistieron en buscar hongos biocontroladores de microorganismos fitopatógenos y de insectos, en algunas regiones del país, con el fin de conformar un banco de cepas. Y caracterizar este banco de cepas con base en su compatibilidad con algunos plaguicidas químicos comerciales de uso común.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras. Se colectaron muestras de suelo, insectos y material vegetal en diferentes grados de descomposición y no descompuesto, en varias localidades de los departamentos de Huila, Meta, Cundinamarca, Córdoba y Cauca. Las muestras se obtuvieron en diferentes ecosistemas naturales y agrícolas (Tabla 1). Éstas se depositaron en bolsas plásticas con cierre hermético o frascos plásticos tapa rosca estériles, de acuerdo con el tipo de

muestra, las cuales se rotularon con la fecha, sitio de colección, clase de sustrato y comunidad vegetal. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio.

Procesamiento de las muestras. Las muestras de material vegetal se procesaron por el método de dilución en placa (Wollum 1982). Se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 10^{-3} en agua peptonada al 1% y se inoculó 0,1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} en la superficie de los medio de cultivo: Agar Sabouraud Dextrosa (ASD), Agar Papa Dextrosa (APD) y Agar Extracto de Levadura-Glucosa-Cloramfenicol (YGC). Las muestras de insectos muertos, que presentaron crecimiento micelial externo, se sembraron directamente sobre el medio de cultivo, tomando una muestra de crecimiento del hongo sobre el insecto. Todos los medios de cultivo inoculados se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 días.

Identificación de los aislamientos. Al cabo de los 5 días de incubación, se aislaron para su identificación las colonias que crecieron en las cajas en APD o ASD. Ésta se realizó con base en la morfología macroscópica y microscópica de la colonia, usando las claves y descripciones de Domsch *et al.* (1980), Barnett y Hunter (1972), Gilman (1963), Nelson *et al.* (1983) y Thom y Raper (1945). En el caso de no observarse inicialmente estructuras reproductivas, las colonias aisladas se transfirieron a otros medios de cultivo como Agar Extracto de Malta (AEM) o Agar Agar (AA), y/o se sometieron a diferentes condiciones de incubación: luz constante, choques de temperatura y otras, con el fin de inducir la producción de tales estructuras.

Conservación. Para la conservación de los aislamientos ya identificados se usaron tres métodos: 1) En tubos inclinados con ASD, los cuales, después de una incubación durante 7 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, se mantuvieron a 4°C. 2) En agua destilada estéril, en frascos de vidrio herméticamente cerrados. En 3 ml de agua destilada se suspendieron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro cada uno de los aislamientos crecidos previamente en ASD o APD, durante 7 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, se mantuvieron los frascos a 4°C, en oscuridad (Gilbert 1997, comunicación personal). 3) En suelo estéril. El suelo se esterilizó tres veces en autoclave a 110°C durante 1 h a 0,5 atm y se le realizó una prueba de esterilidad, sembrando varios granos de suelo sobre la superficie de ADS e incubando a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. Posteriormente, se depositaron 3 g de suelo en frascos de vidrio estériles a los cuales se inoculó 1 ml de una suspensión del aislamiento con una concentración de 1×10^6 conidios/ml. Los frascos se mantuvieron a 4°C.

La evaluación de estos métodos se hizo sembrando en la superficie de APD o ASD una porción de micelio del crecimiento en el tubo, una porción de suelo o uno de los discos de agar, de acuerdo con el método de conservación. Las cajas así inoculadas se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 días. Se evaluó cualitativamente la morfología macroscópica y microscópica de cada aislamiento.

Pruebas de compatibilidad con agroquímicos. Los aislamientos encontrados y registrados como potenciales biocontroladores se sometieron a una prueba de compatibilidad con 4 plaguicidas de uso común en la práctica agrícola. Para la prueba, la

Tabla 1. Características de los lugares en las diferentes regiones colombianas donde se tomaron las muestras

REGIÓN	DEPARTAMENTO	LOCALIDAD	TEMPERATURA MEDIA (°c)	ALTITUD (msnm)	VEGETACIÓN
PACÍFICA	CAUCA	Páramo de Las Papas Vía a Popayán	6 - 10 19	3500 1775	Bosque alto andino Cultivo (caña de azúcar)
ANDINA	CUNDINAMARCA	Zipaquirá	14	2600	Pasto natural - plantas ornamentales
		Fusagasugá	19	1728	Bosque secundario
		Facatativá	10	2600	Bosque alto andino
		Páramo de Cruz Verde	9	3360	Cuscal - frailejonal
		Cota	13	2400	Cultivo flores (siempreviva)
		Neusa	10	2960	Bosque de coníferas (<i>Pinus patula</i>)
	HUILA	San Agustín	19	1747	Bosque andino Cultivos (yuca, maíz, mora, arveja, tomate)
CARIBE	CÓRDOBA	Montería	28,3	49	Bosque seco Cultivos (yuca, plátano, habichuela, ají)
ORINOQUIA	META	Cumaral	25,5	467	Pasto - Palma de Cumare - Biojaguales Cultivos (yuca, café, plátano)

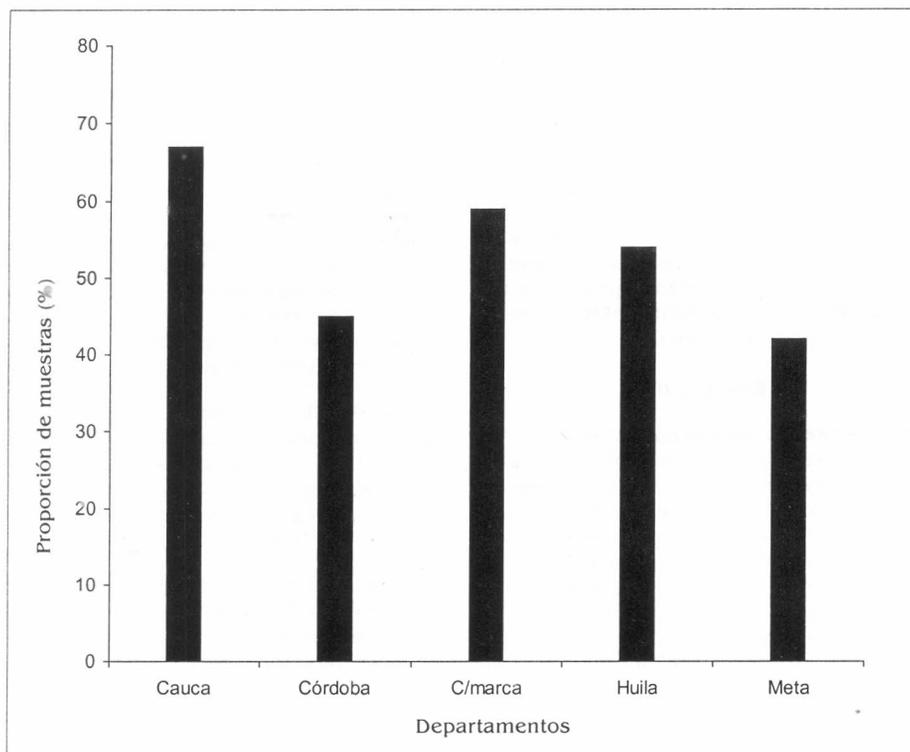


Figura 1. Proporciones de los aislamientos de hongos con potencial biocontrolados, en cada uno de los departamentos.

entre los demás sustratos. El tipo de vegetación donde se aisló la mayor parte, fue bajo bosque natural, con el 28,6%. La recuperación de entomopatógenos fue muy baja (3,17% de las muestras procesadas), encontrándose en muestras de suelo y sobre insectos que estaban en las hojas de plantas que componen la vegetación natural. Solamente se halló *Beauveria bassiana* como hongo entomopatógeno primario. El 28,6% fueron hongos entomopatógenos registrados como secundarios, encontrándose aislamientos de *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* sp., que se consideran de esta manera, ya que se han aislado de insectos pero no se ha determinado claramente su actividad patógena frente a éstos. El 20,6% del total de las cepas aisladas (Fig. 2) correspondió a hongos registrados como biocontroladores, entre los cuales están *Gliocladium* sp., *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp., predominando este último género con más de 5 morfotipos y el 47,6%, hongos sin potencial biocontrolador registrado.

Dentro de los hongos entomopatógenos, tanto primarios como secundarios, se obtuvieron dos aislamientos de *B. bassiana*, los cuales se denominaron *B. bassiana* I y *B. bassiana* II. Estos aislamientos se recuperaron en el municipio de San Agustín (Huila) y en Montería (Córdoba), en ambien-

Tabla 3. Hongos sin potencial biocontrolador encontrados en los sitios de muestreo

CATEGORÍA Y GÉNERO	SUSTRATO	VEGETACIÓN	LOCALIDAD	DEPARTAMENTO
SIN POTENCIAL BIOCONTROLADOR				
<i>Geotrichum</i> sp.	Hojas verdes	Arvejas	Vereda Saldaña	Huila
	Hojas	Maíz	Vereda Saldaña	Huila
	Tallo	Tomate	Vereda Saldaña	Huila
	Hoja	Yuca	Vereda Saldaña	Huila
	Suelo	Mora	Vereda Versalles	Huila
	Rama en descomposición	Bosque seco	Montería	Córdoba
	Suelo	Frailejónal-chuscal	Páramo de Cruz Verde	Cundinamarca
<i>Fusarium reticulatum</i>	Hoja	Arveja	Vereda Saldaña	Huila
<i>Fusarium decemcellulare</i>	* Insecto	Bosque secundario	Vereda Mesitas	Huila
<i>Aspergillus</i> grupo <i>fumigatus</i>	* Insecto	Bosque alto andino	Chicaque	Cundinamarca
	Hojarasca	Bosque alto andino	Chicaque	Cundinamarca
	Suelo	Maíz	Vereda Los Pantanos	Córdoba
	Frutos	Café	Vereda Saldaña	Huila
	Suelo	Maíz	Vereda Saldaña	Huila
	Suelo	Frailejónal-chuscal	Páramo de Cruz Verde	Cundinamarca
	Hojas verdes	Arveja	Vereda Saldaña	Huila
	Hojas verdes	Guamo	Vereda Quebradillas	Huila
	* Insecto	Maíz	Vereda Saldaña	Huila
	Hojarasca	Bosque secundario	Fusagasugá	Cundinamarca
	Hojas y tallo	Plátano	Fusagasugá	Cundinamarca
	Ramas	Bosque secundario	Fusagasugá	Cundinamarca
	Cáscara	Yuca	Vereda La Aguada	Huila
<i>Mycogone</i> sp.	Suelo	Bosque de galería	Vereda Chepero	Meta
	Suelo	Habichuela y ají	Vereda Mata de Plátano	Córdoba
	Suelo	Pasto	Chicaque	Cundinamarca
<i>Scopulariopsis</i> sp.	Hoja	Bosque seco	Montería	Córdoba
<i>Acremonium fusidiodes</i>	Rama en descomposición	Bosque seco	Montería	Córdoba
<i>Fusarium proliferatum</i>	* Insecto	Maíz	Vereda Saldaña	Huila
<i>Fusarium equiseti</i>	Suelo	Bosque secundario	Fusagasugá	Cundinamarca
<i>Botrytis</i> sp.	Suelo	Pasto	Vereda Chepero	Meta
<i>Cylindrocladium parvum</i>	Suelo	Palma de Cumare	Cumalar	Meta

*Los insectos no se pudieron identificar por el alto grado de descomposición que presentaban.

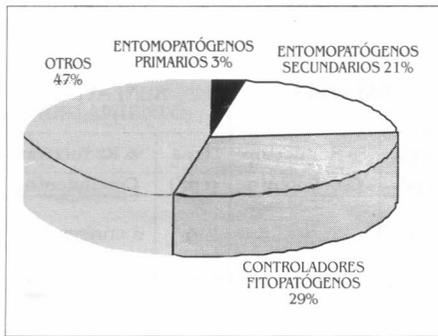


Figura 2. Distribución en porcentaje de cada uno de los grupos de hongos encontrados, de acuerdo con su capacidad controladora de fitopatógenos y de plagas de insectos o sin ninguna de estas actividades.

tes con temperaturas medias de 19 y 28,3°C. *Verticillium psalliotae* se encontró sobre una araña (Eumetazoa: Chelicerata), en Cundinamarca, con cobertura vegetal de bosque altoandino húmedo (Reserva Natural de Chicaque). Se halló *Penicillium* spp. en suelo. En el Chepero (Meta), Mata de Plátano (Córdoba) y Mesitas (Huila), se identificaron especies del género *Aspergillus* hasta el nivel de grupo: *clavatus*, *flavus-oryzae* y *niger*. *Fusarium oxysporum* se aisló de suelo de cultivo de maíz, sobre hojas secas de arveja en el municipio de San Agustín (Huila) y sobre un insecto adulto, muerto, no identificado hallado en suelo con vegetación de bosque altoandino húmedo en Cundinamarca. *Fusarium moniliforme* se aisló de un insecto muerto encontrado en bosque altoandino húmedo.

Con relación a los hongos controladores de fitopatógenos, se obtuvieron varios aislamientos de *Trichoderma* sp. tanto bajo vegetación nativa como de cultivos, *Mortierella* sp. en suelo, también bajo distintos tipos de vegetación en Córdoba y Meta. *Gliocladium roseum*, aislado de suelo superficial en cultivo de palma de Cumare en Cumaral (Meta).

Dentro de los aislamientos identificados sin potencial biocontrolador se encontró *Geotrichum* sp., *Fusarium reticulatum*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium equiseti*, *Aspergillus* del grupo fumigatus, *Micogone* sp., *Scopulariopsis* sp., *Acremonium fusidiodes*, *Botrytis* sp. y *Cylindrocladium parvum*. Todos éstos pertenecen al Phylum Ascomycota, Clase Ascomycetes, grupo Deuteromycetes, de acuerdo con Alexopoulos et al. (1996).

Conservación de los aislamientos. La recuperación de los aislamientos, después de su conservación con el método de agua destilada y de suelo, arrojó como resultado que todos mantuvieron las características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas originales. Esto se presentó en todos los períodos de tiempo evaluados. Para el caso de la conservación en medio de cultivo, fue necesario realizar pases periódicos cada 30 - 40 días, con el fin de mantener la viabilidad de los aislamientos.

Compatibilidad con plaguicidas. Tanto el área de crecimiento de cada uno de los aislamientos después de 10 días frente a 25 ppm de los agroquímicos evaluados, como el porcentaje de reducción de su crecimiento con respecto al control negativo, se muestra en la Tabla 4. El rango de inhibición que presentaron los aislamientos frente al carbofuran estuvo entre el 11 y 30%, para el bis, ditiocarbamato de zinc entre el 0 y 87%, para el malation entre el 0 y 35% y para benomil entre el 21 y 100%. El compuesto que más afectó a los hongos aislados fue benomil, seguido por el bis, ditiocarbamato de zinc, el cual generó, además de un rango amplio de inhibición, una alta variabilidad en la tasa de crecimiento diametral de los aislamientos.

Frente a una concentración de 25 ppm de que con 250 ppm de los fungicidas y de los insecticidas, los aislamientos mostraron una menor inhibición en la tasa de crecimiento (Tablas 4 y 5). Con el bis, ditiocarbamato de zinc se presentó una gran variabilidad en el efecto de reducción de dicha tasa (Tabla 4). Por su parte, malation, a las dos concentraciones, redujo la tasa de crecimiento solamente del aislamiento *B. bassiana* I de manera muy significativa respecto al control ($p=0,001$ en ambas concentraciones). El bis, ditiocarbamato de zinc a 25 y 250 ppm redujo diferencialmente la tasa de crecimiento de las cepas, pero produciendo una reducción muy significativa sólo para *A. flavus*, *A. clavatus*, *F. moniliforme* y *Mortierella* sp. ($p=0,001$). La mayoría de los hongos alcanzaron el 100% de crecimiento (respecto al control negativo), a los 10 días, con las dos concentraciones empleadas de todos los plaguicidas, con excepción del benomil. En términos generales, los hongos presentaron una mayor inhibición con los insecticidas (en ambas concentraciones) que con los fungicidas.

Al comparar el área final de cubrimiento del crecimiento sobre el agar, de cada uno de los aislamientos enfrentados tanto a 25 como a 250 ppm de los plaguicidas, se encontraron diferencias altamente significativas entre los aislamientos ($p=0,0001$). Con respecto a los plaguicidas, benomil inhibió muy significativamente el área de crecimiento de todos los aislamientos ($p<0,01$), con respecto al control, en ambas concentraciones. El malation y el bis, ditiocarbamato de zinc a 25 y 250 ppm, redujeron ligeramente el área de crecimiento de todos los aislamientos con respecto al control negativo, pero de manera fue muy significativa ($p=0,001$); *F. oxysporum* fue la excepción con el malation. En contraposición, el carbofuran no redujo el área de cubrimiento de ningún aislamiento respecto al control ($p=0,72$).

Discusión

Aislamientos fúngicos. Las comunidades vegetales donde se encontró una mayor proporción de hongos entomopatógenos y de hongos controladores de fitopatógenos fue bajo vegetación natural (bosque altoandino húmedo y páramo) con 54%. El

hecho de encontrar una mayor proporción de hongos en bosque natural puede explicarse debido a que la vegetación en estos bosques ayuda a regular la humedad y temperatura, evitando de esta manera fluctuaciones bruscas de estos parámetros, crea hábitats variados por su complejidad estructural; además, no está sometida a la aplicación de agroquímicos. Todo esto hace que sea un ecosistema con condiciones apropiadas para el mantenimiento de la microbiota natural. La mayor recuperación de aislamientos fue bajo vegetación natural, pero bajo vegetación de diferentes cultivos hubo una recuperación relativamente alta (46%), lo que indicaría que a pesar del manejo cultural con frecuentes aplicaciones de fungicidas y otros productos químicos, que pueden afectar la supervivencia y el crecimiento de los hongos, hay todavía condiciones favorables que permiten su persistencia en estos ambientes, como por ejemplo restos vegetales e insectos.

En este mismo marco, aunque el número de muestras obtenidas en los departamentos de Córdoba, Meta y Cauca fue similar (entre 11 y 15), en las muestras de este último departamento fue donde se obtuvo una mayor cantidad de aislamientos con potencial biocontrolador (67%), respecto a 53% de Córdoba y 45% del Meta. Esto pudo deberse en parte, a que la mayoría de las muestras del Cauca provinieron de sustratos bajo vegetación natural y por el contrario, en Córdoba y Meta, éstas fueron de vegetación de cultivos.

Por otra parte, la mayor proporción de aislamientos se obtuvieron a partir de las muestras de suelo, lo cual no sólo podría reflejar que es un hábitat favorable para los hongos, sino que la mayor parte de las muestras colectadas eran de este sustrato y además hubo una buena recuperación de aislamientos. El caso de los insectos fue totalmente inverso, en el sentido que el número de muestras de este tipo fueron pocas y además la recuperación de aislamientos no fue fácil.

En general, la recuperación de hongos con potencial biocontrolador fue relativamente baja con respecto al total de hongos. Esto puede ser el resultado de la interacción de por lo menos tres factores: 1) el reflejo de la proporción de hongos con este potencial en los sustratos colectados bajo las condiciones prevalentes, 2) la utilización de medios de cultivo sintéticos que no favorecen su recuperación desde el punto de vista nutricional, y 3) el método empleado de diluciones seriadas. Con referencia particular a los cultivos de maíz, no se encontró ningún hongo entomopatógeno, en comparación con estudios de otros autores como Rodríguez (1984), quien registró especies como *Nomurae rileyi* en este tipo de cultivo.

Entre los hongos entomopatógenos encontrados, *B. bassiana* ha sido uno de los más estudiados (Campbell et al. 1985; Rombach et al. 1986; Anderson et al. 1988; Ming-Guan y Jonson 1990; Leathers y Gupta 1993; Varela y Morales 1996). Es conocido

Tabla 4. Área y porcentaje de reducción de la tasa de crecimiento en área de cada uno de los aislamientos identificados con potencial biocontrolador, evaluados frente a 25 ppm de cada uno de los 4 plaguicidas

AISLAMIENTO	CONTROL		FURADAN		MANZATE		MALATION		BENLATE	
	* Área (cm ²)	* % Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento
<i>B. bassiana</i> I	5,4	0	2,3	57	3,3	39	4,0	26	0	100
<i>B. bassiana</i> II	6,3	0	4,5	29	0,8	87	4,3	32	0	100
<i>V. psalliotae</i>	5,7	0	4,5	16	3,1	46	4,0	30	0	100
<i>Penicillium</i> sp.	19,0	0	19,0	0	11,4	40	14,0	26	0	100
<i>A. g. clavatus</i>	21,5	0	20,0	12	11,4	48	14,0	35	0	100
<i>A. g. flavus</i>	32,0	0	28,4	11	30,4	5	32,0	0	0	100
<i>A. g. niger</i>	27,0	0	24,5	9	20,3	25	27,0	0	0,66	76
<i>F. oxysporum</i>	32,0	0	29,0	9	26,0	19	32,0	0	0	100
<i>F. moniliforme</i>	32,0	0	30,4	5	32,0	0	32,0	0	0	100
<i>Trichoderma</i> sp. 1	32,0	0	28,4	11	22,1	31	30,4	5	0	100
<i>Trichoderma</i> sp. 2	32,0	0	32,0	0	32,0	0	32,0	0	0	100
<i>Mortierella</i> sp.	19,0	0	18,0	5	13,0	32	17,0	11	15,1	21
<i>Gliocladium roseum</i>	11,5	0	11,0	4	9,0	22	9,8	15	0	100

* El área y el % de reducción del crecimiento corresponden al promedio de tres repeticiones.

agente causal de muscardinas en gusanos de seda; en las regiones cafeteras de Colombia es utilizado en el control biológico de broca del café, así como también contra especies de defoliadores como *Sibinefusca* sp., *Euprosteria eleasa*, *Osiphanes cassina* y *Oiketicus* sp. en cultivos de palma de aceite; también contra *Collaria columbiensis* (chinche de pastos) (Benavides, sf.; Rodríguez y Benavides 1994; Calvache 1995). Trabajos realizados en CENICAFÉ, en los cuales se han hecho aspersiones de este hongo en los cafetales, muestran la inducción de epizootias (Vélez 1996). También se ha registrado como agente de control biológico en otras especies de diferentes órdenes, que son plaga en diversos cultivos de importancia económica, entre las cuales se puede mencionar: *Manalio*

dissimulatum Distant (Hemiptera: Miridae), *Blissus insularis* Barber (Hemiptera: Lygaeidae), *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae), *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Sitophylus oryzae* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) y *Diatrea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) (Vélez 1985). En este estudio se encontró *B. bassiana* en bosque natural, lo cual indica que es un habitante normal de bosques, donde puede estar contribuyendo a la regulación de poblaciones de insectos.

Los dos aislamientos de *B. bassiana*, I y II, se encontraron en ambientes con temperaturas distintas (19 y 28°C). Esto concuerda con lo registrado por Domsch *et al.*

(1980), quien menciona que este género está en regiones tropicales a temperaturas muy variadas, aunque muestra mejor crecimiento en ambientes con clima cálido a templado. La especie hallada es la más extensamente distribuida del género y generalmente está formando ramilletes de conidios pulverulentos y blancos sobre diferentes clases de insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera (Domsch *et al.* 1980; Rodríguez 1984).

V. psalliotae mostró la capacidad que tiene para crecer en ambientes con una temperatura óptima de 23 – 24°C y mínima de 8 – 10°C, confirmando los registros de Domsch *et al.* (1980), quienes mencionan el hallazgo de esta especie en suelos de bosques naturales en Estados Unidos. Esta especie

Tabla 5. Área y porcentaje de reducción de la tasa de crecimiento en área de cada uno de los aislamientos identificados con potencial biocontrolador, evaluados frente a 250 ppm de cada uno de los 4 plaguicidas

AISLAMIENTO	CONTROL		FURADAN		MANZATE		MALATION		BENLATE	
	*Área (cm ²)	* % Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento	Área (cm ²)	% Reducción Crecimiento
<i>B. bassiana I</i>	5,4	0	2,3	57,0	3,3	39,0	4,0	26	0	100
<i>B. bassiana II</i>	6,3	0	4,5	29,0	0,8	87,0	4,3	32	0	100
<i>V. psalliote</i>	5,7	0	4,5	16,0	3,1	46,0	4,0	30	0	100
<i>Penicillium sp.</i>	19,0	0	19,0	0	11,4	40,0	14,0	26	0	100
<i>A. g. clavatus</i>	21,5	0	20,0	12,0	11,4	48,0	14,0	35	0	100
<i>A. g. flavus</i>	32,0	0	28,4	11,0	30,4	5,0	32,0	0	0	100
<i>A. g. niger</i>	27,0	0	24,5	9,0	20,3	25,0	27,0	0	6,6	76
<i>F. oxysporum</i>	32,0	0	29,0	9,0	26,0	19,0	32,0	0	0	100
<i>F. moniliforme</i>	32,0	0	30,4	5,0	32,0	0	32,0	0	0	100
<i>Trichoderma sp. 1</i>	3,02	0	28,4	11,0	22,1	31,0	30,4	5	0	100
<i>Trichoderma sp. 2</i>	32,0	0	32,0	0	32,0	0	32,0	0	0	100
<i>Mortierella sp.</i>	19,0	0	18,0	5,0	13,0	32	17,0	11	15,1	21
<i>Gliocladium roseum</i>	11,5	0	11,0	4,0	9,0	22,0	9,8	15	0	100

* El área y el % de reducción del crecimiento corresponden al promedio de tres repeticiones.

se ha registrado como controlador de royas y se ha aislado de ácaros del suelo, de chicharras y de insectos del orden Lepidoptera. Sin embargo, por el sustrato de donde se aisló en este estudio, podría estarse comportando como un patógeno secundario, dado que no hay literatura referente a su ataque sobre artrópodos, para producirles la muerte y el solo hecho de hallarlo en la araña no permite confirmar su carácter patógeno sobre artrópodos. Se sabe que las arañas son benéficas en la mayoría de los casos, por lo que se requeriría realizar bioensayos de patogenidad con este aislamiento, con el fin de confirmar su carácter patógeno sobre este artrópodo. Esto serviría como base para la utilización de esta especie como agente de control biológico, en casos de tener explosiones de poblaciones de arañas en cultivos. La araña sobre la que se encontró no pudo ser identificada dado su estado avanzado de descomposición. Esta especie de hongo ha sido registrada como micoparásito de *Rhopalomyces elegans* (Domsch *et al.* 1980), por lo que puede ser promisoría para el control de hongos fitopatógenos (Saksitirat y Hoppe 1991).

En Colombia, el género *Penicillium* se ha registrado en la región panelera del Río Negro (Cundinamarca), en larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, del cual se consideró como patógeno secundario (López *et al.* 1983). En la localidad de Villeta (Cundinamarca) se registró atacando especies de Lepidoptera: Pyralidae en caña panelera (Rodríguez 1984). Este género ha sido considerado en la literatura como biocontrolador pues posee, además de su capacidad parasitaria, la capacidad de producir com-

puestos o metabolitos de carácter tóxico (antibióticos, nematocidas y fungistáticos). Sin embargo, en este estudio se consideró al género *Penicillium* como un saprófito y no como entomopatógeno, dado que se aisló de las muestras de suelo tanto bajo vegetación nativa como de cultivos agrícolas en localidades del Huila, Cauca, Cundinamarca, Meta y Córdoba, pero nunca de insectos. Dada la amplia distribución de este género, se comprueba así su gran capacidad de adaptación a diversos climas y condiciones. En el departamento del Cauca se encontró al nivel de páramo, lo que indica que este género puede persistir a temperaturas bajas (6 - 10°C), aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C. Las especies del género predominan en suelos de regiones templadas y tropicales, han sido detectadas a grandes profundidades y están en pequeñas concentraciones en la rizosfera (Domsch *et al.* 1980). Muchas especies de *Penicillium* han sido estudiadas al nivel de control biológico. Entre ellas está *P. brevicompactum*, la cual presentó antagonismo tanto *in vitro* como *in vivo* frente a *Botrytis fabae* en cultivo de habas, por producir antibióticos (Jackson *et al.* 1997).

El género *Aspergillus* del grupo *clavatus* ha sido aislado de insectos, particularmente de abejas adultas muertas y de panales; también en plumas y excrementos de pájaros de vida libre. Se ha encontrado en almacenamiento de varios productos alimenticios, incluyendo semillas de sorgo, arroz, productos de harina y pastas (Domsch *et al.* 1980). Se presenta más como parásito que como entomopatógeno; además en este estudio se halló en suelo con un alto contenido de

humedad, en la vereda Chepero, municipio de Cumaral (Meta), mostrando así su capacidad de crecer y permanecer en regiones tropicales y subtropicales (Domsch *et al.* 1980). Las especies de *Aspergillus*, del grupo *flavus* tienen una distribución amplia en regiones tropicales y subtropicales; no se han registrado como entomopatógenos, pero sí se han aislado en diferentes insectos del orden Lepidoptera, en Cundinamarca (Rodríguez 1984). Este hongo produce aflatoxinas, que comúnmente se encuentran en productos alimenticios y que, al ser ingeridas, producen intoxicaciones graves en animales y en el hombre (Samson *et al.* 1984; Scott 1989) y enfermedades cancerígenas a nivel hepático (Giral *et al.* 1989). Por esta razón, se necesitaría evaluar minuciosamente este hongo antes de ser utilizado en programas de control biológico. Sin embargo, se han registrado estudios de formulaciones con alginato de cepas atoxigénicas de *A. flavus* (Daigle y Cotty 1995), como una buena alternativa para su uso al nivel de campo, puesto que el alginato estimula la esporulación e impide el antagonismo. Haría falta evaluar la formulación y las cepas bajo condiciones que favorezcan epidemias de contaminación por aflatoxinas en diferentes suelos, con el fin de evaluar su eficacia. En este estudio, se encontró en suelo con cultivos de maíz y yuca en Montería, confirmando así su presencia en localidades de temperaturas cálidas. Las del grupo *niger* presentan una distribución mundial restringida a la región tropical; tienen gran capacidad de producción de metabolitos tóxicos y poseen un efecto inhibitorio ante especies como *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma polysporum* y *Penicillium nigricans*, entre otros. En este

estudio se aisló de diferentes muestras y en localidades de los departamentos de Huila, Cauca y Cundinamarca, lo que confirma que tienen una amplia distribución en distintos ambientes. Sería importante comprobar su actividad controladora y tóxica para emplearse en control biológico.

F. oxysporum se encontró sobre sustratos en los que se puede estar comportando como saprófito y sobre un insecto que no pudo ser identificado. Ya que se ha registrado esta especie como patógeno de insectos del orden Lepidoptera y a pesar de ser fitopatógeno se ha encontrado parasitando huevos, hembras y quistes de *H. glycinis* (Cotes 1997; Rodríguez 1984), es posible que su papel en el insecto hubiese sido como entomopatógeno primario. Adicionalmente tiene buenas perspectivas para usarse como controlador biológico, ya que ha mostrado que puede causar la muerte de algunos insectos plaga como *Diatrea saccharalis* (Fabricius) y *Antigastra catalanalis* (Duponchel) (Rodríguez 1984). En el reconocimiento de enemigos naturales de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), realizado por la Disciplina de Entomología de CENICAFÉ, se ha observado la presencia de *F. oxysporum* y *F. solani* sobre la broca, en diferentes localidades de la zona cafetera (Pérez *et al.* 1996). Sin embargo, en este último caso, no ha establecido su carácter entomopatógeno primario. Su uso como controlador biológico debe evaluarse cuidadosamente debido a que es fitopatógeno de varias plantas de cultivo.

Fusarium moniliforme se aisló a partir de un insecto muerto no identificado, en el cual puede estar actuando como saprófito, ya que no se ha registrado como entomopatógeno. Habría que establecer esta capacidad con pruebas de patogenicidad y en caso dado, definir su implementación en programas de control biológico dada su patogenicidad para plantas de maíz y su toxicidad para patos, embriones de pollo, gallo y algunos mamíferos (Domsch *et al.* 1980).

Trichoderma sp. es uno de los hongos más utilizados como agente de control biológico de fitopatógenos, a través de la producción de sustancias tóxicas, de la competencia por nutrientes, espacio u oxígeno, o del parasitismo. Se han registrado resultados positivos en el control de enfermedades en pimiento, tomate y tabaco en Cuba (López y Rijo 1994). En Colombia se han realizado varios ensayos demostrando su capacidad antagonista contra *F. oxysporum*, que ocasiona marchitamiento vascular del clavel, entre otros cultivos (Ochoa 1996).

Gilman (1963) registró aislamientos de *Mortierella* sp. de suelos de diferentes partes del mundo, considerándolo como un buen biocontrolador de fitopatógenos. Para su utilización práctica en este sentido, habría que explorar más sus propiedades y capacidades biocontroladoras de fitopatógenos, ya que poco se sabe de este género en ese sentido. *Gliocladium roseum* se ha presentado como biocontrolador, específicamente como parásito de hongos fitopa-

tógenos como *Botrytis* sp., *Ceratocystis* sp. y *Trichotecium* sp., por lo cual tiene gran importancia para aplicaciones en control biológico (Cotes 1997).

Métodos de conservación. El método de conservación en agua destilada se ha empleado para la preservación de hongos, ofreciendo muy buenas perspectivas para su uso, ya que es un método muy económico, fácil de mantener, práctico para el almacenamiento y la recuperación, y favorable para el mantenimiento de aislamientos fúngicos. Se ha registrado que este método es adecuado para el mantenimiento de aislamientos de hongos provenientes de material vegetal y del suelo, hasta por 7 años (Gilbert 1997, comunicación personal). Es necesario evaluar el método para hongos con potencial biocontrolador por un período más prolongado de tiempo, con el fin de determinar su eficacia para este tipo de aislamientos. El método de conservación en suelo también es bastante económico, aunque un poco más dispendioso que el anterior. Esto último se debe a la esterilización previa que debe hacerse del suelo con el fin de eliminar por completo la microbiota nativa de éste y a las pruebas de esterilidad que deben practicarse antes de la inoculación del aislamiento fúngico.

Compatibilidad con plaguicidas. La compatibilidad que presentan algunos productos agroquímicos con hongos que poseen potencial biocontrolador, es de gran ayuda para la incorporación del control biológico con hongos, dentro de programas de manejo integrado de plagas (MIP). Los plaguicidas evaluados Carbofuran, Malation, Bis, ditiocarbamato de zinc y Benomil, son usados en el campo en diferentes dosificaciones, dependiendo de varios factores, entre los que se incluyen: el tiempo a partir de la siembra, el grado de infestación por la plaga y el cultivo que se desea asperjar. Estos productos son utilizados en cultivos de papa, arroz, plátano, banano y algodón, entre otros. Aunque las concentraciones evaluadas son, en términos generales, entre 10 y 4000 veces menores que las usadas en campo, éstas fueron escogidas con base en estudios previos (Astudillo 1993; Atehortúa y Londoño 1994; Rivera *et al.* 1994; Rivera 1993), en los cuales concentraciones más altas de Benomil y Malation inhiben completamente la esporulación en algunos géneros fúngicos usados también en este estudio. La concentración más baja utilizada (25 ppm) es 10 veces menor que la más alta (250 ppm), pero el porcentaje de inhibición del crecimiento no fue proporcionalmente mayor, lo cual señala que no hay una relación lineal entre la concentración de estos plaguicidas y el efecto de reducción o inhibición que causan sobre el crecimiento de los aislamientos fúngicos.

Los insecticidas usados atacan principalmente las células nerviosas de los insectos, pero como se demostró en este estudio, pueden presentar actividad negativa contra los hongos, reduciendo su tasa de crecimiento. Adicionalmente, dada la respuesta diferencial de aislamientos de la misma

especie (*B. bassiana*, en este caso particular), frente a estos insecticidas, en particular al Malation, se propone su uso como herramienta dentro de la caracterización de aislamientos fúngicos con miras a su utilización en control biológico. Habría que probarlo con otras especies para establecer con seguridad esta posibilidad.

El Benomil y el bis, ditiocarbamato de zinc tienen efectos fungicidas comprobados, pero no todos los hongos responden de la misma manera, como se vio en este estudio. El Benomil es un fungicida más efectivo, dado que inhibió completamente el crecimiento de todos los aislamientos o lo redujo de manera muy significativa. El bis, ditiocarbamato de zinc, por su parte, redujo la tasa de crecimiento de algunos: *A. flavus*, *A. clavatus*, *F. moniliforme* y *Mortierella* sp., pero sólo con respecto al control negativo.

En general, carbofuran, malation y bis, ditiocarbamato de zinc ejercieron solamente un efecto inhibitorio sobre los aislamientos usados, mientras que benomil sí tuvo un efecto biocida sobre grupos de hongos taxonómica y fisiológicamente diferentes. La evaluación realizada en este estudio fue al nivel del crecimiento de los hongos (tasa de crecimiento y área final de cubrimiento), pero puede hacerse a otros niveles como de esporulación, de germinación, genético o de producción enzimática, lo que daría una indicación de los niveles al que están actuando los productos.

Conclusiones

- En general, los hongos identificados en este estudio se determinaron como entomopatógenos primarios o secundarios, y como controladores de fitopatógenos, con base en los registros existentes en la literatura sobre el género o la especie en particular. Así, es necesario comprobar su capacidad patogénica haciendo bioensayos, utilizando incluso diferentes aislamientos de un mismo género. Independientemente de la controversia acerca de si usar aislamientos de una región para ser aplicados en la misma o más bien usar los de otra región, se sugiere probar inicialmente con aislamientos de la misma región o cultivo, dado que estarían más adaptados a las condiciones medio ambientales prevalentes.
- De acuerdo con los resultados encontrados en este estudio, se sugiere el empleo de malation, carbofuran y bis, ditiocarbamato de zinc conjuntamente con hongos agentes de control biológico, con diferencias temporales de aplicación y/o en dosis más bajas, con el fin de reducir el impacto sobre los hongos. Necesariamente habría que realizar evaluaciones previas para determinar estos tiempos y concentraciones.

- La colección intensiva de hongos con potencial biocontrolador es esencial para rescatar y mantener *ex situ* el germoplasma de éstos, sobre todo el proveniente de ecosistemas naturales, donde existe una regulación natural de las poblaciones plaga. De

esta manera se tendrá la fuente para la implementación en agroecosistemas. Tal colección es el punto inicial para una futura selección y establecimiento de su potencial biocontrolador con miras a implementarlos en control biológico. Además hay que considerar la posibilidad de que sirvan como fuente de metabolitos que pueden ser usados con estos y otros fines.

Literatura citada

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory mycology. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc. New York (U.S.A.). 869 p.
- ANDERSON, T.E.A.; ROBERTS, D.W.; SOPER, R.S. 1988. Use of *Beauveria bassiana* for suppression of Colorado potato beetle populations in New York State (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology* 17: 140-145.
- ASTUDILLO, A.M. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* con formulaciones comerciales con fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19 (4): 255-260.
- ATEHORTÚA, M.; LONDOÑO, M. 1994. Efecto de algunos agroquímicos en el crecimiento y esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae*. *Revista Colombiana de Entomología* 4 (2): 255-260.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis (U.S.A.). 241 p.
- BENAVIDES, M. s.f. Incidencia de chupadores en pasturas de la Sabana de Bogotá. ICA. Noticias Regional 1. 12 p.
- CALVACHE, H. 1995. Manejo integrado de plagas de palma de aceite. En: Manejo integrado de plagas y medio ambiente. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia. 130 p.
- CAMPBELL, R. R.; ANDERSON, T. E.; SEMEL, M.; ROBERTS, D. W. 1985. Management of the Colorado potato beetle using the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *American Potato Journal* 61: 29-37.
- COTES, A. M. 1997. Control biológico de fitopatógenos. En: Seminario Internacional. CORPOICA. Centro de Investigaciones Tibaitatá, Cundinamarca, Colombia. Febrero 24, p. 13-30.
- DAIGLE, D. J.; COTTY, P. J. 1995. Formulating atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release. *Biocontrol Science and Technology* 5: 175-184.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. 1980. Compendium of soil fungi. First edition. Academic Press. Londres. Volumen 1. 859 p.
- GILMAN, J.C. 1963. Manual de los hongos del suelo. Segunda edición. Compañía Editorial Continental, S.A. México, México. 572 p.
- GIRAL, J.; JAVIERRE, J.; PIÑOL, J.; RAVALLÓ, T. 1989. El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos. Editorial LUCTA, S.A. Segunda edición. Montañas del Valle (Barcelona, España). 117 p.
- JACKSON, A. J.; WALTERS, D. R.; MARSHALL, G. 1997. Antagonistic interactions between the foliar pathogen *Botrytis fabae* and isolates of *Penicillium brevicompactum* and *Cladosporium cladosporioides* on faba beans. *Biological Control* 8: 97-106.
- LEATHERS, T. D.; GUPTA, S. C. 1993. Susceptibility of the eastern tent caterpillar (*Malacosoma americanum*) to the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 61 (2): 217-219.
- LÓPEZ, M.; RIJO, E. 1994. Manual de control biológico de enfermedades y plagas en cultivos. Memorias Curso. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia. 70 p.
- LÓPEZ, D.; LÓPEZ, A.; LUQUE, J. E. 1983. Reconocimiento y evaluación de entomopatógenos nativos de *Diatrea saccharalis* en la región panelera del río Negro, Cundinamarca. *Revista Colombiana de Entomología* 9 (1): 5-8.
- LÓPEZ, J. C.; RIVERA, A.; BUSTILLO, A.; CHÁVEZ, B. 1995. Persistencia de *B. bassiana* (Bals.) Vuill. en el suelo con el transcurso del tiempo. *Revista Colombiana de Entomología* 21 (4): 173-176.
- MING-GUANG, F.; JOHNSON, J. B. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 19 (3): 785-790.
- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. 1983. *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. United States of America. First edition. 193 p.
- OCHOA, V. 1996. Control biológico vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp. y *Fusarium dianthi* mediante el uso de microorganismos potencialmente antagonistas *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicor* y *Trichoderma hamatus*. Trabajo de grado para optar al título de Biólogo. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.. 124 p.
- PÉREZ, E. J.; POSADA, F. J.; GONZÁLEZ, M. T. 1996. Patogenicidad de un aislamiento de *Fusarium* sp. encontrado infectando la broca del café, *Hypothenemus hampei*. *Revista Colombiana de Entomología* 22 (3): 105-111.
- RIVERA, A. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *B. bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19 (4): 151-158.
- RIVERA, A.; BUSTILLO, A.; MARÍN, P. 1994. Compatibilidad en mezcla de dos aislamientos de *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin con insecticidas usados en el control químico de la broca del café, *H. hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología* 20 (4): 209-214.
- RODRÍGUEZ, D. A. 1984. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 10 (1-2): 57-64.
- RODRÍGUEZ, D. A. 1990. Uso de patógenos para el manejo de insectos plaga. *Colombia Ciencia y tecnología* 8 (3): 19-21.
- RODRÍGUEZ, D. A.; BENAVIDES, M. 1994. Insectos plaga afectan los pastos de la Sabana de Bogotá. ICA. Subgerencia de Prevención y Control. Diagnóstico Vegetal. El Tiempo.
- ROMBACH, M. C.; AGUDA, R. M.; SHEPARD, B. M.; ROBERTS, D. W. 1986. Infection of rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environmental Entomology* 15: 1070-1073.
- SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. 1991. Degradation of uredospores of the soybean rust fungus (*Phakospora pachyrhizi* Sdy.) by cell-free culture filtrates of the mycoparasite *Verticillium psalliotae* Treschow. *Journal of Phytopathology* 132: 33-45.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; VAN OORSCHOT, C. A. 1984. Introduction to food borne fungi. Second Edition. Institute of the Royal Netherland. Academy of Arts and Sciences 73 p.
- SCOTT, P. M. 1989. Control of mycotoxins. A collection of invited papers presented at the seventh international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins. Tokyo, Japón. 134 p.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. 1981. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman and Company. New York, U.S.A. 859 p.
- THOM, C.; RAPER, K. 1945. A Manual of the *Aspergilli*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore (U.S.A.). 285 p.
- VARELA, A.; MORALES, E. 1996. Caracterización de algunos *Beauveria bassiana* aislados y their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 14-52.
- VÉLEZ, R. 1985. Notas sinópticas de entomología económica colombiana. Universidad Nacional de Colombia, Seccional Medellín. Santafé de Bogotá, D.C.. 258 p.
- VÉLEZ, P.E. 1996. Evaluación en campo de formulaciones en aceite del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Revista Colombiana de Entomología* 22 (3): 137-42.
- WOLLUM II, A.G. 1982. Cultural Methods for soil microorganisms. En: Page, A.L., Miller, R.H. and Keeny, D.R. (eds.). Methods for soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Second edition. American Society of Agronomy. Madison Wisconsin, U.S.A. 1159 p.