



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**DEPARTAMENTO DE PROTECCION  
AGRICOLA Y FORESTAL**

**EFFECTO DE CONCENTRACIONES DE ACEITE DE ALGODÓN  
SOBRE LA VIABILIDAD, PATOGENICIDAD, ESTABILIDAD DE LA  
CEPA CB-32 DE *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils).**

**Presentado por: *Br. María Auxiliadora Rodríguez Aburto***

**Asesores: *Ing. Hector Rodríguez.***

***M.Sc. Freddy Miranda.***

***Mayo del 2000.***

## **DEDICATORIA:**

***A Dios Todopoderoso, fuente de toda sabiduría.***

***A mis adorados padres: Héctor (Q.E.P.D.) y Lydia, Fuentes de vida, amor y enseñanza.***

***A mis hijas Lydia Jorenyma y Lydia Jorlenne, mis mayores alegrías y fuentes de motivación.***

***A mis queridos hermanos: Hector, Marilú, Jamileth, Johana y Winston, por su apoyo, alegría y solidaridad,***

## **AGRADECIMIENTO:**

*Les estaré eternamente agradecida:*

*A la Universidad Nacional Agraria por haberme brindado la oportunidad de profesionalizarme y facilitar el desarrollo de este trabajo.*

*A mis Asesores: Ing. Hector Rodríguez y MSc. Freddy Miranda por sus sugerencias, recomendaciones y colaboraciones para la finalización de este trabajo.*

*Al Dr. Falguny Guharay por su amistad y valiosas sugerencias para el término de esta tesis.*

*A Jossué Brenes muchísimas gracias.*

*A mis profesores, al personal del CENIDA en especial a Mireya, Maritza y Reyna.*

*Israel Quiroz y Mario Bustamante por su apoyo en el proceso de producción del hongo.*

*A mis grandes amigos Alvaro, Catalina, Joyce, Vanessa, Ned, Brigitte y Junior por su amistad incondicional.*

*A Doña Tere, Doña Ramona, Doña Rosalía Ramírez y Familia, a la Familia Velázquez Tiffer, por su apoyo y cariño.*

*A todas las personas que me apoyaron y que confían en mi.*

## INDICE

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimiento	ii
Contenido	iii
Indice de cuadros	iv
Indice de gráficas	v
Indice de anexos	vi
Resumen	viii
I. Introducción	1
II. Objetivos	4
III. Materiales y Métodos	5
IV. Resultados y Discusión	13
V. Conclusiones	18
VI. Recomendaciones	19
VII. Bibliografía	20
VIII. Anexos	24

## INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1	7

## INDICE DE FIGURAS

Gráfica N°	Página
1. Porcentaje de germinación de conidias de <i>Beauveria bassiana</i> Inoculadas en PDA en los diferentes niveles de la emulsión (0, 2, 4, 6, 8 y 10%) respectivamente.	13
2. Sedimentación de las diferentes emulsiones ( 0, 2, 4, 6, 8 y 10%) observada durante 2, 4 y 6 horas después de la preparación de las emulsiones.	14
3. Análisis de varianza y separación de medias (Tukey) realizado a porcentaje de germinación de conidias de <i>B. bassiana</i> en emulsiones de aceite en agua después de exposición a la Radiación Solar.	15
4. Análisis de varianza y separación de medias (Tukey 95%) para el porcentaje de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> inoculadas con las diferentes emulsiones.	16

## INDICE DE ANEXOS

Figura N°	Página
1. Ciclo biológico de <i>Plutella xylostella</i> .	25
2. Almácigos de Repollo Vr. Superette en el invernadero de la Universidad Nacional Agraria.	25
3. Producción de plantas de repollo Vr. Supertte en Invernadero de la Universidad Nacional Agraria.	26
4. Planta de repollo con el crecimiento adecuado para la introducción en la cría de <i>P. xylostella</i> en el invernadero de la Universidad Nacional Agraria.	26
5. Algunos instrumentos utilizados durante los bioensayos en el laboratorio de MIP/UNA.	27
6. Preparación de Discos foliares (20 cm de diámetro) de hojas de repollo para bioensayos.	27
7. Desinfección de discos foliares de repollo en hipoclorito de sodio al 2%.	28
8. Discos foliares de repollo listos para el montaje de los bioensayos.	28
9. Preparación de viales plásticos (1 onz.) para la realización de los bioensayos.	29
10. Prueba de germinación de <i>B. bassiana</i> en PDA.	29
11. Revisión al estereoscopio de esporulación de conidias de <i>B. bassiana</i> en larvas de <i>P. xylostella</i> .	30
12. Germinación de conidias de <i>B. bassiana</i> en PDA. (Fuente laboratorio de control microbioal de la Universidad Nacional Agraria)	30

13.	Producción de conidias de <i>B. bassiana</i> en arroz (Fuente laboratorio de control microbial de la Universidad Nacional Agraria	31
14.	Raquis conidiofórico, conidióforos y conidios de <i>B. bassiana</i> vistos al microscopio de barrido (Fuente Torres, H. et al 1993)	31
15.	Larva de <i>P. xylostella</i> afectada por el Hongo <i>B. bassiana</i> (Fuente. Díaz J et al 1999)	31

#### **Cuadro N°**

1.	Ingredientes utilizados para preparar las formulaciones.	32
----	--	----



## RESUMEN.

En Nicaragua, *Plutella xylostella* es la plaga que causa mayores daños al cultivo de repollo (*Brassica oleracea*) lo que implica una gran inversión en el control de la misma. Para contribuir a la búsqueda de alternativas para el Manejo Integrado de esta plaga se realizó este estudio en las instalaciones del Centro Nacional de Protección Vegetal (CENAPROVE) y en la Universidad Nacional Agraria durante el periodo comprendido entre Febrero 1991 y Febrero 1992.

Se evaluó la Cepa CB-32 del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) en 6 formulaciones conteniendo 0%, 2%, 4%, 6%, 8% y 10% de aceite de algodón en agua sobre larvas del segundo instar de *P. xylostella*. La concentración de conidias en las formulaciones fué de  $3.35 \times 10^8$ . En un rango de tiempo de 14-30 horas después de la inoculación en PDA se distinguieron con un mayor porcentaje de germinación de conidias las formulaciones con 0 y 2% de aceite de algodón. Las mismas demostraron mayor sedimentación reportando 0.2 y 0.5 ml seis horas después de ser sometidas a reposo.

Para la evaluación del efecto de la radiación solar sobre las conidias de *B. bassiana* se realizó un análisis de varianza y pruebas de Tukey con un 95% de confianza, las respaldan que las formulaciones pueden separarse en cuatro categorías estadísticas diferentes de las cuales en primer lugar tenemos las formulaciones con 0 y 2% de aceite que presentan el mayor porcentaje de germinación de conidias expuestas a 24 horas de radiación solar (86.61% y 80.36%) respectivamente. A la variable patogenicidad de las conidias de *B. bassiana* en huésped de *Plutella xylostella* se efectuó un análisis de varianza y prueba de Tuckey y resultó que las formulaciones pueden clasificarse en 3 categorías estadísticas, sobresaliendo la patogenicidad de las conidias de las formulaciones con 0 y 2% de aceite reportando 95 y 80% respectivamente.

El tiempo letal para las formulaciones no varió provocando la mortalidad dos días después de la inoculación de las larvas por el método de inmersión.

## I. INTRODUCCION.

En Nicaragua, el repollo (*Brassica oleraceae* L. Crucíferas: *Brassicaceae*) es, después del tomate, una de las hortalizas más consumidas. Su producción está en manos de pequeños y medianos productores que lo siembran en parcelas de monocultivo dentro de un sistema diversificado de producción (Díaz J. et al, 1999). El costo de producción promedio por hectárea para la región Centroamericana oscila entre US.\$800.00 y US.\$1,342.00, de éstos se invierte entre el 20-38% en el control de plagas. Un alto porcentaje del costo del control se concentra en el combate de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: *Plutellidae*) (CATIE, 1990). Gurdian (1999) reporta costos de producción de C\$9,849.19 para el cultivo de repollo en Nicaragua, de éstos, entre el 10-20% es para el control de plagas .

*Plutella xylostella* es conocida comúnmente como palomilla del dorso de diamante, oruga verde del repollo, palomilla del repollo, polilla de la col. Su distribución es cosmopolita y sus huéspedes son: repollo, broccoli y otras plantas del género *Brassicaceae* (un gran número de crucíferas cultivadas). En los primeros estadios se alimentan en la superficie de las hojas dejando ventanas de la epidermis superior intactas, a veces pueden minar el tejido de la hoja. Las larvas mayores perforan las hojas haciendo muchos agujeros irregulares. De mayor importancia cuando las larvas penetran en el corazón y otras partes comerciables de la planta (King & Saunders, 1984).

En Honduras, los agricultores han reaccionado a las altas poblaciones de esta plaga con aplicaciones más frecuentes, mezclas de insecticidas y el reemplazo constante de productos que dejan de ser efectivos. Generalmente no rotan productos, sino que aplican el mismo insecticida una y otra vez en el mismo lote de repollo hasta que deja de ejercer un buen control (Rosset P. & Secaira E. 1989).

En Nicaragua, productos que tienen muchos años de uso como el Decis, Filitox, Lannate y Cimbush, ya no controlan *Plutella*. Algunos nuevos productos como Júpiter, Dipel y Evisect han bajado su efectividad contra *Plutella* en algunas Zonas. Entre los que controlan la plaga sin afectar a los enemigos naturales, el medio ambiente y la salud humana están: Semilla molida de Nim, Torta molida de Nim, Dipel y Javelin (Díaz B.J. et al. 1999).

La lucha biológica parece constituir una seria esperanza de mejoramiento de la situación fitosanitaria, la extensión más o menos rápida de sus utilidades depende de la profundidad de las investigaciones y su puesta en práctica debe acontecer dentro del marco general de la lucha integral en cuyo seno deberá ocupar un lugar muy importante (Meneses, et al 1981).

Después del primer experimento de Bassi en 1835 con *Beauveria bassiana* y el gusano de seda (*Bombyx mori*), más de 30 hongos entomopatógenos han sido experimentados como preparaciones para el control de varios insectos (Weiser, 1982). Sin embargo, solo unos pocos se han investigado intensivamente con el fin de usarlos en programas de control microbiano. Los hongos entomopatógenos más estudiados pertenecen a los géneros: *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Hirsutella* (Bustillo, 1989).

Los hongos patógenos penetran por la cutícula del huésped y se desarrollan dentro del cuerpo que se llena de micelios causando la muerte del huésped. El insecto enfermo pierde apetito, muchas veces cambia de color y la cutícula puede tener manchas que indican los lugares donde penetró el hongo. Después de la muerte, si las condiciones son óptimas, el cuerpo se cubre de micelios. El cadáver muchas veces toma una consistencia similar a la del queso (Poinar y Thomas 1978; citados por Schotman y Lacayo, (1989).

*B. bassiana* L es un Deuteromycete entomopatógeno que infecta una variedad de insectos principalmente de los Ordenes Lepidóptera y Coleóptero (Story, 1986).

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* es muy conocido por su amplio rango de huéspedes y distribución geográfica. Su patogenicidad se ha probado contra más especies de insectos que cualquier hongo, entre otros insectos: *Ostrinia nubilalis* (Lepidóptera: *Pyralidae*) (Fengz *et al.*, 1988), *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidóptera: *Pyralidae*) (M<sup>c</sup> Dowell, *et al.* 1990), *Pantorhytes plutus* (Coleóptera: *Curculionidae*) (Prior C and Jollands P, 1987), *Cylos formicarius* (Coleóptera: *Curculionidae*) (Broche R y Chang B, 1989), *Artipus floridanus* (McCoy *et al.* 1985), *Dendroctonus ponderosae* (Coleóptera: *Scolytidae*) (Hunt *et al.* 1984), *Curculio caryae* (Chaplin *et al.* 1981).

Este hongo (*B. bassiana*) ya es usado en gran escala en Europa del Este, URSS, China. Está siendo ampliamente estudiado en Estados Unidos por ser un potencial patógeno contra larvas del suelo y barrenadores del tallo (Gottwald & Tedders, 1983; Feng *et al.* 1985; M<sup>c</sup> Coy *et al.* 1985). Couch *et al.* en 1981, afirmó que un insecticida microbial puede ser producido, formulado y estabilizado de modo que las condiciones normales de almacenamiento no afecten las propiedades insecticidas del producto.

El aislado CB-32 de *B. bassiana* (Bals Vuill) en concentración de  $4.41 \times 10^6$  conidias/ml en larvas de *P. xylostella* se mostró como un aislado promisorio para el control de esta plaga (López, A. 1993).

Dada la importancia de la plaga *P. xylostella* en el cultivo de repollo en Nicaragua se realizó el presente estudio con el objetivo de contribuir al manejo de la plaga elaborando un formulado cuyo ingrediente activo sean conidias del hongo entomopatógeno *B. bassiana* en una emulsión de aceite de algodón en agua.

## **II. OBJETIVOS.**

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de aceite de algodón sobre la patogenicidad, viabilidad de conidias del hongo entomopatógeno *B. bassiana* CB-32.
2. Evaluar la estabilidad de las emulsiones con o sin exposición a radiación solar a través de porcentajes de germinación de conidias de *B. bassiana*.
3. Evaluar el comportamiento de las diferentes emulsiones en cuanto a sedimentación según los niveles de aceite de algodón.

### **III. MATERIALES Y METODOS.**

#### **3.1 Ubicación del Experimento:**

Los bioensayos se efectuaron en las instalaciones de la Universidad Nacional Agraria (UNA) ubicada en el Kilómetro 12 1/2 carretera norte. Este experimento se desarrolló en el período comprendido de Mayo de 1991 a Febrero de 1992.

#### **3.2 Descripción de los Tratamientos:**

Los tratamientos a evaluarse fueron seis concentraciones de aceite de algodón a 2%, 4%, 6%, 8% y 10% en emulsiones de conidias del hongo entomopatógeno *B. bassiana* en agua y un testigo el cual consistió en una emulsión sin aceite de algodón. La concentración de Conidias fue de  $1.42 \times 10^6$  Conidias/ml. Para la realización de los bioensayos se prepararon cien mililitros de cada emulsión, los Bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Control Microbial de la Escuela de Sanidad vegetal en la Universidad nacional Agraria.

#### **3.3 Producción de *B. bassiana*:**

##### **3.3.1 suministro de inóculo de *B. bassiana*.**

Se utilizó el inóculo de la Cepa CB-32 de *B. bassiana* que fue suministrado por el Proyecto de Hongos Entomopatógenos del CENAPROVE.

##### **3.3.2 Producción de *B. bassiana*.**

El proceso de producción de conidias de *B. bassiana* se desarrolló en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del CENAPROVE. Este proceso de producción constó de las siguientes etapas:

- a) Reproducción de conidias de *B. bassiana* en medio líquido.
- b) Producción de conidias de *B. bassiana* en arroz.
- c) Producción de crema de conidias de *B. bassiana*.

a) Reproducción de conidias de *B. bassiana* en Medio Líquido:

Los ingredientes del medio líquido (cuadro 1.), se fueron mezclando con el agua hasta formar 1000 ml de Medio Líquido, el cual fué distribuido en 20 erlenmayer de 500 ml, colocando 50 ml en cada uno. Los erlenmayer conteniendo medio líquido fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Una vez esterilizado el medio líquido en los erlenmayer, fueron sembrados en éstos inóculos del cultivo puro de *B. bassiana*, luego fueron colocados durante 15 días en un cuarto de crecimiento a temperatura ambiente.

**Cuadro 1. Ingredientes que constituyen el Medio Líquido para la producción de *B. bassiana*. (Bustamante M, Quiroz I. 1999)<sup>1</sup>**

Ingredientes:	Cantidad:
Afrecho de arroz	25.0 gr.
Levadura de cerveza	10.0 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Hidrogeno fosfato de potasio)	13.6 gr.
CaCl <sub>2</sub> (Cloruro de potasio)	0.25 gr.
Agua destilada	1000.0 ml

pH=7.

b) Producción de conidias de *B. bassiana* en arroz:

Se prepararon 4000 gr. de arroz que fueron lavados y dejados en agua durante 30 minutos, secados a temperatura ambiente. Luego se a distribuyeron 200 gr. de arroz en 20 erlenmayer de 5000 ml y se esterilizaron en autoclave durante 15

<sup>1</sup> Comunicación Personal. Lic.Mario Bustamante, Ing. Israel Quiroz. CENAPROVE.

minutos a 120°C, luego se procedió al trasiego de medio líquido conteniendo conidias de *B. bassiana* en los 20 erlenmayer conteniendo el arroz esterilizado. Cada erlenmayer conteniendo arroz y conidias de *B. bassiana* fué agitado manualmente para garantizar la inoculación de conidias en todo el arroz. El trasiego se realizó en una cámara de transferencia. Al finalizar el trasiego, los erlenmayer conteniendo arroz y conidias de *B. bassiana* fueron transferidos al cuarto de crecimiento por cuatro semanas. (Bustamante M, Quiroz I. 1991<sup>2</sup>)

c) Producción de Crema de Conidias de *B. bassiana*:

Se cosecharon las conidias realizando un lavado de arroz con agua estéril más una gota del emulsificante químico Tween-80. Posteriormente tamizamos y obtuvimos Conidias con una concentración de  $3.35 \times 10^9$  Conidias / ml. Para el conteo de conidias utilizamos una cámara de Neubauer (de 0.1 mm de profundidad). Se realizaron pruebas de germinación de las conidias elaborando una solución de agua estéril más crema de conidias e inoculando en una gota de papa-dextrosa-agar (PDA) colocada en portaobjetos debidamente esterilizados.

### **3.4. Establecimiento de Cría y Multiplicación de *P. xylostella* en laboratorio:**

#### **3.4.1 Producción de plantas de repollo para cría de *P. xylostella*:**

En el invernadero de la UNA se estableció un almácigo de repollo variedad *superette*, cuyas plantas fueron sembradas en pequeñas maceteras. Estas plantas se utilizaron para oviposición de adultos y alimentación de larvas de *P. xylostella*.

---

<sup>2</sup> Comunicación Personal. Lic. Mario Bustamante, Ing. Israel Quiroz. CENAPROVE.



### 3.4.2 Establecimiento del Pié de Cría de *P. xylostella*:

Para la obtención del pié de cría se procedió a coleccionar en el Departamento de Jinotega, en San José de Las Latas insectos de *P. xylostella* en estado de pre-pupa, pupa y adulto, los que fueron trasladados posteriormente al laboratorio de cría de insectos.

### 3.4.3 Cría de *P. xylostella* en Laboratorio:

#### a) Preparación de Jaulas de Oviposición:

Las jaulas de Oviposición de *P. xylostella* eran de 50cm x 50cm x 50cm, éstas fueron forradas alrededor y la parte de arriba con malla fina de nylon y el fondo de madera. Antes de introducir el pié de cría en las jaulas, éstas fueron desinfectadas con formalina al 10%.

#### b) Preparación de alimentos de *P. xylostella* :

Los adultos de *P. xylostella* fueron alimentados con una solución de agua, miel de abeja y vitamina E. Con esta solución se humedeció un trozo de algodón que fue colocado en cada una de las jaulas de Oviposición y cambiadas cada dos días.

#### c) Multiplicación de *P. xylostella*:

En cada jaula fueron introducidas entre 20 a 30 adultos de *P. xylostella* y tres plantas de repollo. Las plantas fueron previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2% para evitar la contaminación de la cría con organismos nocivos. En estas jaulas el cambio de plantas de repollo se realizó cada cuatro días.

#### d) Crecimiento y Desarrollo de larvas de *P. xylostella*:

Se establecieron jaulas para el crecimiento y desarrollo de larvas de *P. xylostella*. En éstas se introdujeron las plantas de repollo procedentes de las jaulas de oviposición. Luego de la eclosión de huevos éstas plantas era sustituidas cada dos días por plantas frescas del invernadero, las cuales fueron igualmente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%.

Las larvas permanecían en estas jaulas hasta llegar al estado de pupa. Las pupas eran aisladas de las jaulas de crecimiento y desarrollo de larvas e introducidas en las jaulas de oviposición.

### 3.5 Variables a medir en la experimentación:

#### 3.5.1 Estabilidad de las emulsiones:

Una vez que se ha demostrado que un hongo es promisorio en el control de plagas de cultivos se hace necesario determinar la forma adecuada de aplicación del mismo, sin que su viabilidad sea afectada. Bustamante (1996) manifiesta que una formulación ayuda prolongar la vida de las conidias en el almacenamiento, posibilita una mejor distribución de las conidias sobre las plantas, ayuda a que las conidias se adhieran a las hojas o frutos y permanezcan vivas ahí por un buen tiempo, protege las conidias de los efectos nocivos de rayos solares, el calor o el viento.

El parámetro utilizado para medir la viabilidad de las conidias de *B. bassiana* en las emulsiones elaboradas es la germinación de las mismas a las 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 30 horas posteriores a la inoculación en PDA. Las pruebas de germinación se establecieron colocando papel filtro humedecido con agua estéril en el fondo de platos petri sobre los cuales fueron colocados dos portaobjetos en forma de cruz (para facilitar la manipulación de los mismos). En cada extremo del portaobjeto superior se colocó una gota de PDA, luego se procedió a esterilizar en

autoclave a 120°C por 15 minutos. Una vez realizada la esterilización de los platos petri conteniendo portaobjetos con PDA, éste fué inoculado con una gota de formulación en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación de otros microorganismos.

### 3.5.2 Sedimentación de las emulsiones:

Se prepararon 300 ml de cada una de las emulsiones y fueron distribuidos equitativamente en tres pipetas de 200 mililitros, de positanto 100 mililitros de la emulsión, realizándose tres repeticiones por cada una de las emulsiones elaboradas (2%, 4%, 6%, 8%, 10% y el, testigo), posteriormente se dejaron en reposo para determinar la sedimentación formada en cada pipeta y obtener así un promedio por cada formulación a las 2, 4 y 6 horas de reposo.

### 3.5.3 Efecto de la Radiación Solar sobre Conidias de *B. bassiana*:

Para evaluar el efecto de la radiación solar sobre las conidias se tomaron un total de 54 plantas cultivadas en maceteras plásticas las cuales fueron previamente lavadas con solución de hipoclorito de sodio al 2% y posteriormente inoculadas mediante aspersion con las emulsiones elaboradas. Se inocularon tres plantas por formulación y se realizaron tres repeticiones. Las plantas inoculadas fueron expuestas a radiación solar por 24 horas, (6:00 a.m. a 6:00 a.m), luego de pasadas las 24 horas después de la inoculación de las plantas con las conidias las plantas fueron enjuagadas con agua estéril con la cual fueron montadas pruebas de germinación para determinar la viabilidad de las conidias luego de la exposición a la radiación solar.

### 3.5.4 Evaluación de Patogenicidad:

#### a) Selección de larvas de *P. xylostella*:

Se seleccionaron de la cría de *P. xylostella* un total de 360 larvas correspondientes al segundo instar de desarrollo. Fueron utilizadas 60 larvas por tratamiento y 20 larvas por cada repetición.

#### b) Preparación de alimento y condiciones para las larvas de *P. xylostella* sometidas a bioensayos:

Para la alimentación de las larvas de *P. xylostella* se utilizaron discos foliares de repollo de 20 centímetros de diámetro previamente lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio al 2%. Los discos foliares fueron colocados en la solución de hipoclorito de sodio durante cinco minutos y luego se dejaron secar a temperatura ambiente para prevenir un exceso de humedad que pudiera causar daño a las larvas. Se utilizaron viales plásticos de una onza para ubicar individualmente a las larvas después de la inoculación. Estos viales antes de ser utilizados en los bioensayos se desinfectaron de igual forma que los discos foliares de repollo<sup>3</sup>.

#### c) Inoculación de conidias de *B. bassiana* en larvas de *P. xylostella*:

La inoculación de conidias de *B. bassiana* en larvas de *P. xylostella* se dió a través del método de inmersión de larvas en las emulsiones preparadas con conidias. Fueron utilizadas un total de 60 larvas por tratamiento designándose 20 larvas para cada una de las tres repeticiones que se realizaron de los bioensayos.

Cada larva inoculada con la emulsión a través del método de inmersión fue colocada individualmente en los viales plásticos previamente desinfectados. La evaluación de Patogenicidad de las diferentes emulsiones se midió basándonos

---

<sup>3</sup> Comunicación Personal Rodríguez, H. Universidad Nacional Agraria. Managua.

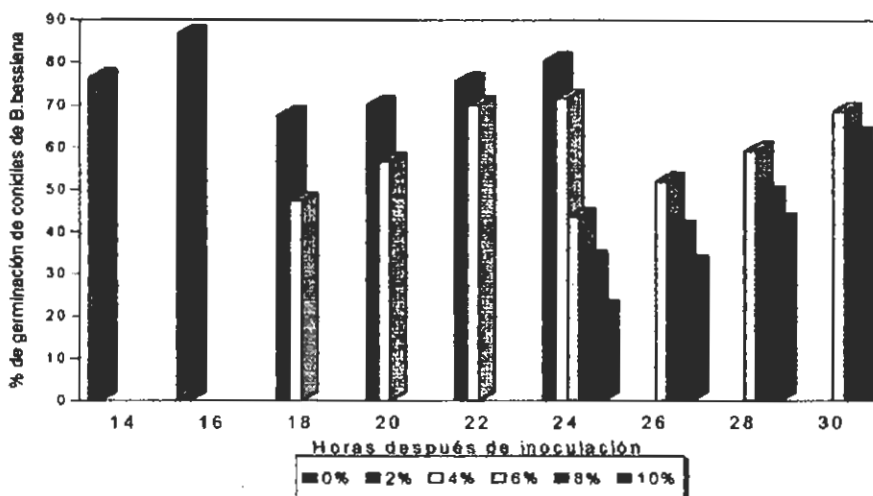
en el número de larvas muertas por el hongo. Para esto se revisaron diariamente los Bioensayos.

Las larvas muertas fueron colocadas en un plato petri donde igualmente se situó un trozo de algodón humedecido con agua estéril para mantener la humedad. Posteriormente las larvas muertas fueron revisadas de forma periódica y cuando se observó estructuras fungosas en su superficie con ayuda de un estereoscopio se verificó si estas estructuras fungosas correspondían al hongo *B. bassiana* ratificando así la patogenicidad del hongo en cada una de las emulsiones.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 4.1 Estabilidad de las emulsiones.

Al prepararse una emulsión con hongos se debe tomar en cuenta que los ingredientes de la misma ayuden a mantener la viabilidad de las conidias.



**Gráfica 1.** Porcentaje de germinación de Conidias de *Beauveria bassiana* Inoculadas en PDA en los diferentes niveles de la emulsión (0, 2, 4, 6, 8 y 10%) respectivamente.

En un rango de tiempo de 14-30 horas después de la inoculación de las conidias de *B. bassiana* en medio de cultivo PDA se obtuvieron porcentajes de germinación entre 38.78% - 81.42%, sobresaliendo las emulsiones con 0, 2 y 4% de aceite de algodón presentando un 81.42% 73.33% y 61.36% respectivamente.

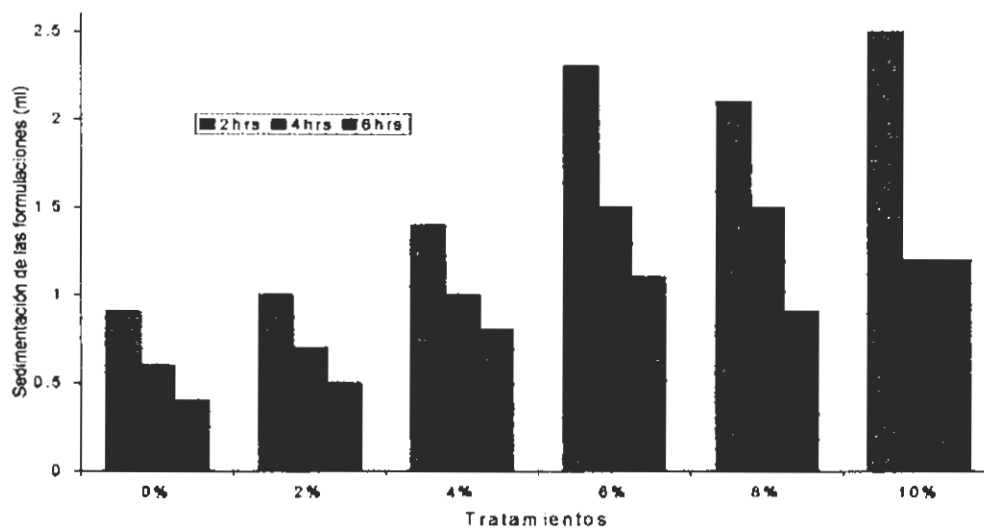
Para la emulsión del 0% el tiempo de germinación de las conidias estuvo entre las primeras 14 y 16 horas de la inoculación, en cambio las de 2% y 4% el tiempo de germinación osciló entre 18 y 24 horas, esto demuestra que entre mayor es la cantidad de aceite de algodón en la emulsión, menor es el porcentaje y más tardada la germinación de conidias.

Prior C. *et al* (1987) observó que la viabilidad conidial inmediatamente después de sumergirlas en aceite de coco o agua+Tween-80 fue de 97%.

En 1986 Rombach M.C *et al* obtuvo un porcentaje de germinación de conidias de 95% en 20 horas posteriores a la inoculación sobre caldo de dextrosa sabourand.

### 3.2 Sedimentación de las emulsiones:

Una de las cualidades que debe tener una emulsión con hongos entomopatógeno es la suspensión más o menos durable de las conidias. Bustamante (1996) manifiesta que una buena formulación debe facilitar la mezcla de las conidias con el agua para las aplicaciones. Garcia-Pelayo y Gross R. (1993) define sedimentación como la formación de sedimentos, progresión lenta de un depósito.



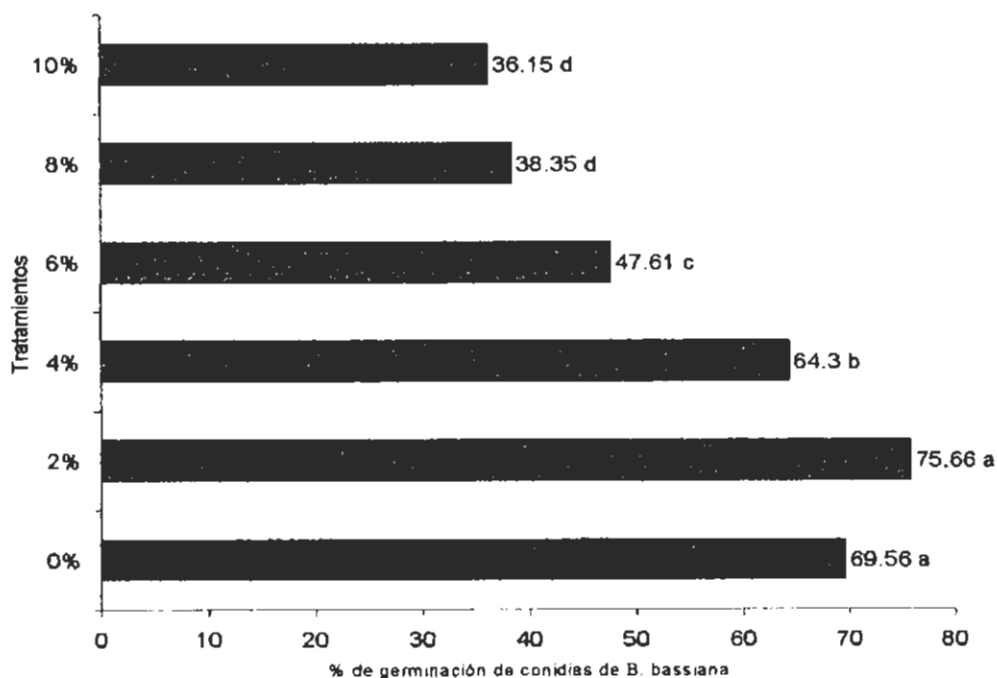
**Gráfica 2.** Sedimentación de las diferentes emulsiones ( 0, 2, 4, 6, 8 y 10%) observada durante 2, 4 y 6 horas después de la preparación de las emulsiones.

Los ensayos establecidos para conocer la sedimentación de las emulsiones a las 2, 4 y 6 horas después de sometidas a reposo demuestran que la menor

concentración de sedimento (0.4 ml y 0.5ml) se observó a las 6 horas de reposo en las emulsiones con 0 y 2% de aceite de algodón. Podemos aseverar que a las 6 horas de reposo, la cantidad de conidias suspendidas en estas emulsiones fué menor, también se observó que a medida que el porcentaje de aceite aumentó en las emulsiones, la sedimentación fué mayor con respecto a las formulaciones con menor cantidad de aceite.

### 3.3 Efecto de la Radiación Solar sobre Conidias de *B. bassiana* en cada una de las emulsiones.

Al momento de ser aplicada en los cultivos las conidias pierden viabilidad drásticamente debido a la desecación causada por radiación solar y el viento. Esto obliga a que las emulsiones deban contener ingredientes que protejan a las conidias del efecto de factores ambientales adversos a la germinación y patogenicidad de las mismas.



**Gráfica 3.** Análisis de varianza y separación de medias (Tukey) realizado a porcentaje de germinación de conidias de *B. bassiana* en emulsiones de aceite en agua después de exposición a la Radiación Solar.

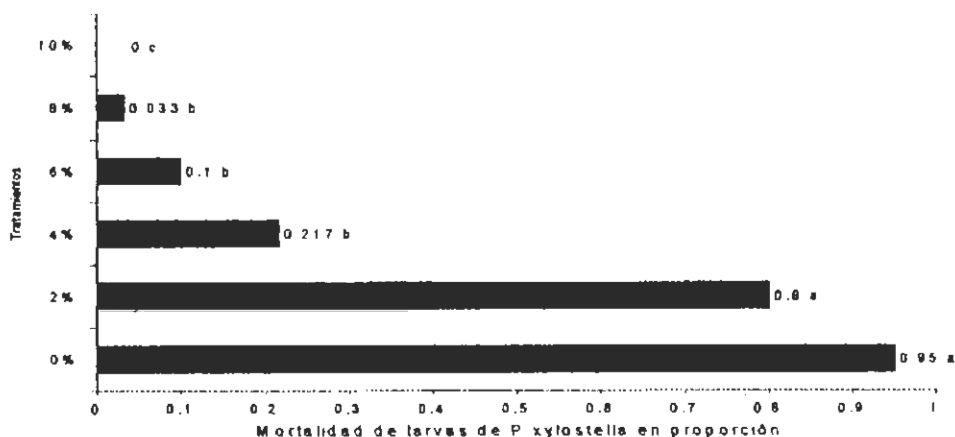


El análisis de varianza fué significativo a un 99% de confiabilidad en el porcentaje de germinación de las conidias y las Pruebas de separación de medias (Tukey) con un 95% de confianza muestran que las emulsiones expuestas a 24 horas de radiación solar pueden separarse en cuatro categorías estadísticas diferentes de las cuales en primer lugar tenemos las emulsiones con 0 y 2% de aceite que presentan el mayor porcentaje de germinación de conidias (69.56% y 75.66%) respectivamente y la emulsión con 4% que reportó un 64.3%.

Story en 1986 afirmó que las conidias expuestas a la luz directa del sol pierden un 50-100% de su viabilidad original con uno o dos días de exposición.

### 3.2 Evaluación de Patogenicidad de conidias de *B. bassiana* en cada una de las emulsiones.

El uso de una formulación depende en gran medida del control que pueda ejercer sobre alguna plaga, por lo que la evaluación de la patogenicidad es una prueba obligatoria al momento de elaborar una formulación.



**Gráfica 4.** Análisis de varianza y separación de medias (Tukey 95%) para el porcentaje de mortalidad de larvas de *P. xylostella* inoculadas con las diferentes emulsiones.

El análisis de varianza fue significativo con un 95% de confiabilidad y la separación de medias por Tukey al 95% estableció tres categorías estadísticas para la variable de patogenicidad, sobresaliendo en la primera los tratamientos con 0 y 2% de aceite reportando 95% y 80% respectivamente, estos presentaron los más altos porcentajes de mortalidad en larvas de *P. xylostella*.

Esto se asemeja a los resultados reportados por Contreras et al, 1997, que observaron un 74.8% de mortalidad un día después de aplicadas conidias de *B. bassiana* en emulsión de aceite. Este resultado es similar al obtenido por Carballo M, en 1998 al evaluar formulaciones con aceite de soya en adultos de *Cosmopolites sordidus* reportando una mortalidad de 85%.

Igual que en la germinación, a medida que se incrementó el nivel de aceite en la emulsión fueron menos larvas las que murieron por el hongo, observándose que las larvas que murieron por otras causas presentaron una gran flexibilidad en su cuerpo, lo que hace suponer que sus muertes fueron debidas a intoxicación por el nivel de aceite dado que al examinarlas al estereoscopio no se observó el crecimiento de otros microorganismos en su cutícula.

El tiempo letal ( $TL_{50}$ ) para los tratamientos fue dos días después de la inoculación de las larvas por el método de inmersión.

## V. CONCLUSIONES.

El 2% de aceite de algodón en formulaciones con conidias de *B. bassiana* demostró que tiene poco efecto negativo sobre la germinación de conidias con un promedio de 73.33% de germinación y 80% de mortalidad en larvas de *P. xylostella*.

- El aumento de aceite de algodón en una formulación provoca menor germinación de conidias, disminuye la patogenicidad del hongo en condiciones de laboratorio.

Al aumentar la concentración de aceite en las emulsiones de conidias de *B. bassiana* se presenta mayor sedimentación en la formulación.

A 24 horas de exposición a la radiación solar el 2% de aceite de algodón en una formulación denota protección a las conidias contra la desecación, por efecto de la radiación solar,

Al aumentar la concentración de aceite en las emulsiones se da una disminución de la germinación de las conidias de *B. bassiana*.

## VI. RECOMENDACIONES.

Se debe continuar la realización de bioensayos con la formulación del 2% de aceite de algodón en otros estadios de larva, prepupa y pupa para conocer posible patogenicidad sobre *P. xylostella*.

Evaluar el efecto de *B. bassiana* en emulsión con el 2% de aceite de algodón sobre *P. xylostella* a nivel de campo.

También es importante que los bioensayos puedan evaluarse distintos horas de toman datos para determinar el  $TL_{50}$ .

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- BROCHE, R. y CHANG, B. (1989). Cienc. Tec. Agric. Protección de plantas: Reporte de *Beauveria bassiana* como enemigo natural del Tetuan del Boniato *Cylas formicarius elegantulus* (Coleoptera: Curculionidae). Vol. 12 No.3 pag. 103-105. Cuba.
- BUSTAMANTE, M. (1996). Formulación de las conidias de los hongos entomopató-genos para manejo de plagas. Managua, Nic. Folleto 4p.
- BUSTILLO, A. (1989). Manejo Integrado de plagas insectiles en la agricultura: Utilización de agentes microbiológicos. Honduras Keith L. Andrews y J. Rutilio Quezada.
- CARBALLO, V.M. (1998). Manejo Integrado de Plagas: Mortalidad de *Cosmopolites sordidus* con diferentes formulaciones de *Beauveria bassiana*. Costa Rica. No.48. p.45-48.
- CATIE. (1990). Guía para el manejo integrado del cultivo del repollo. CATIE. Proyecto Regional MIP, Turrialba, Costa Rica, pag. 80
- CONTRERAS, T. *et al.* (1997). Manejo Integrado de Plagas: Evaluación de trampas de pseudotallo y formulaciones de *Beauveria bassiana* (Bals) en el combate del Picudo del Plátano *Cosmopolites sordidus* en Costa Rica. Costa Rica. No. 46. P.44-49.
- COUCH, T. L. *et al* (1981). Formulation of insect pathogens. Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980 pag.621-634.

- CHAMPLIN, F. R. *et al* (1981). Journal of economic entomology, virulence of *B. bassiana* mutants for the pecan weevil. Pag. 617-621.
- DÍAZ, B.J. *et al*. (1999). Manejo Integrado de Plagas en el cultivo de repollo. CATIE. Managua, Nicaragua. 103p.
- FENG, Z. *et al* (1988). The Canadian entomologist: Aphenology model and field evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) mycosis of the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis* (H.B.N.) (Lepidóptera: *Pyralidae*). Vol. 120. Pag. 133-144.
- GARCIA-PELAYO y GROSS, R. (1993). Pequeño Larousse ilustrado. Ed. Larousse. México. 1663p.
- GOTTWALD, T.R. *et al* (1983). Environmental Entomology: Suppression of Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Populations with Entomopathogenic Fungi. Georgia USA. Vol.12. No.2.
- GURDIAN, M.F. (1999). Diagnostico de producción, consumo y comercialización de hortalizas en Nicaragua. IICA, Nicaragua: 47p.
- HUNT, D.W.A. *et al* (1984). Journal of invertebrate pathology: Nutrient mediated germination of *B. bassiana* conidia on the integument of the Bark Beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleóptero: *Scolytidae*) N° 44 pag. 304-314.
- KING, A.B.S. y SAUNDERS, J.L. (1984). Las plagas invertebradas en cultivos anuales alimenticios en América Central. Londres, Overseas development administración pag. 182.
- LITTLE T.M, JACKSON H.F. (1982). Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. 2da. Edición. Ed. Trillas. México D.F. 270p.

- LOPEZ, L. M. (1993). Evaluación de la susceptibilidad relativa de *Plutella xylostella* (L) (Lepidoptera: Plutellidae) a tres aislados de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Tesis Ing. Agr. UNA. Managua, Nicaragua. 24p.
- MCCOY C.W. et al (1985). Florida Entomologist: Susceptibilidad of *Artipus floridanus* to different isolates of *Beauveria bassiana*. P.402.
- MCDOWELL J.M. et al (1990). Environmental entomology: Biological activity of *Beauveria bassiana* against *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on leaf substrates and soil. Vol.19. No.1. pag. 137-141.
- MENESES, R. et al (1981). Viabilidad de las esporas de *Beauveria bassiana* y *Metarrhizum anisopliae* en agua y su virulencia sobre *Lissorhoptrus brevisrostris* (Coleoptera: Curculionidae). Agrotecnia de Cuba. Vol.13. Pag. 53-67.
- MIP-REPOLLO ESAVE, MIP-CATIE Nicaragua (1990). Manejo del cultivo del repollo con énfasis en Manejo Integrado de Plagas. Pag.32.
- MOORE K.C. and ERLANDSON M.A. (1988). The Canadian entomologist: Isolation of *Aspergillus parasiticus* speare and *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin from *Melanoplina* grasshoppers (Orthoptera: Acridae) and demonstration of their pathogenicity in *Melanoplus sanguinipes* (Fabricius). Vol.52. Pag.989-991.
- PRIOR, C. et al (1987). Infestivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hiphomycete) to the cocoa weevil pest *Panthorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of invertebrate pathology. Vol. 52. Pag.66-72.

- ROMBACH, M. C. *et al* (1986). Journal of Invertebrate Pathology: Entomopathogenic Fungi (Deuteromycotina) in the Control of the Black Bug of Rice, *Scotinophara coarctata* (Hemiptera:Pentatomidae). No.48. Pag.174.179.
- ROSSET, P. y SECAIRA, E. (1989). Manejo Integrado de Plagas Insectiles en la Agricultura: Cultivos Horticolas. El Zamorano, Honduras. Cap.32. Pag.507-521.
- SCHOTMAN CH Y LACAYO P.L. (1989). Manejo de plagas insectiles en la agricultura: El control natural. Honduras. Keith L. Andrews y J. Rutilio Quezada.
- STOREY G.K. *et al* (1986). Applied and Environmental Microbiology : Sensitivity of the Entomogenous Fungus *Beauveria bassiana* to Selected Plant Growth Regulators and Spray Additives. Universidad de Georgia. Julio 1986. Vol.52. No.1. pag.1-3.
- TORRES H. *et al*. (1993). Control biológico del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes spp.*) con *Beauveria brongniartii*. Guía de Investigación CIP 8. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 37p.
- VARELA O.G. (1991). Policultivos (repollo-tomate, repollo-zanahoria) y la incidencia de *Plutella xylostella* (L) y sus enemigos naturales en el repollo. Tesis MSc. CATIE. 122p.
- WEISER, J. 1982. Microbial and Viral pesticides: persistencia of fungal insecticides: influence of enviromental factors and present and future applications. Dekker. New York. p.531-557.



# **ANEXO**

Figura 1. Ciclo biológico de *Plutella xylostella*.

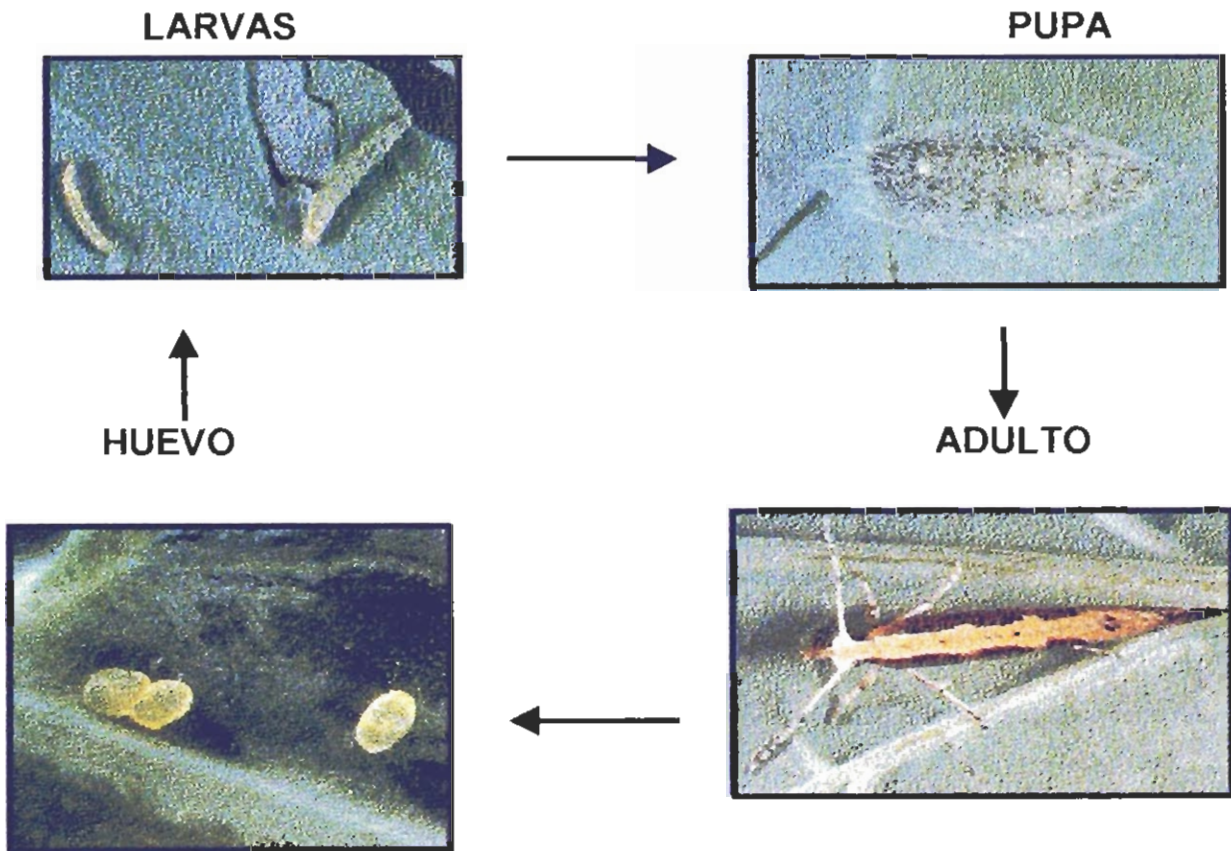


Figura 2. Almácigos de Repollo Vr. Superette en el invernadero de la Universidad Nacional Agraria.



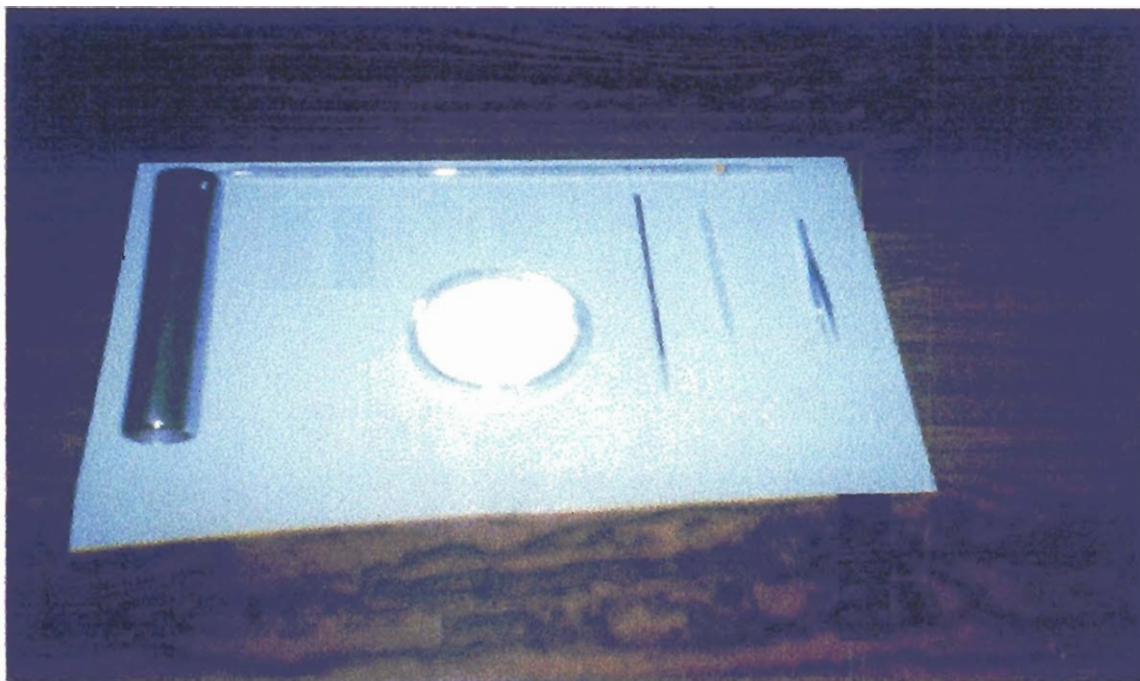
**Figura 3.** Producción de plantas de repollo Vr. Superte en Invernadero de la Universidad Nacional Agraria.



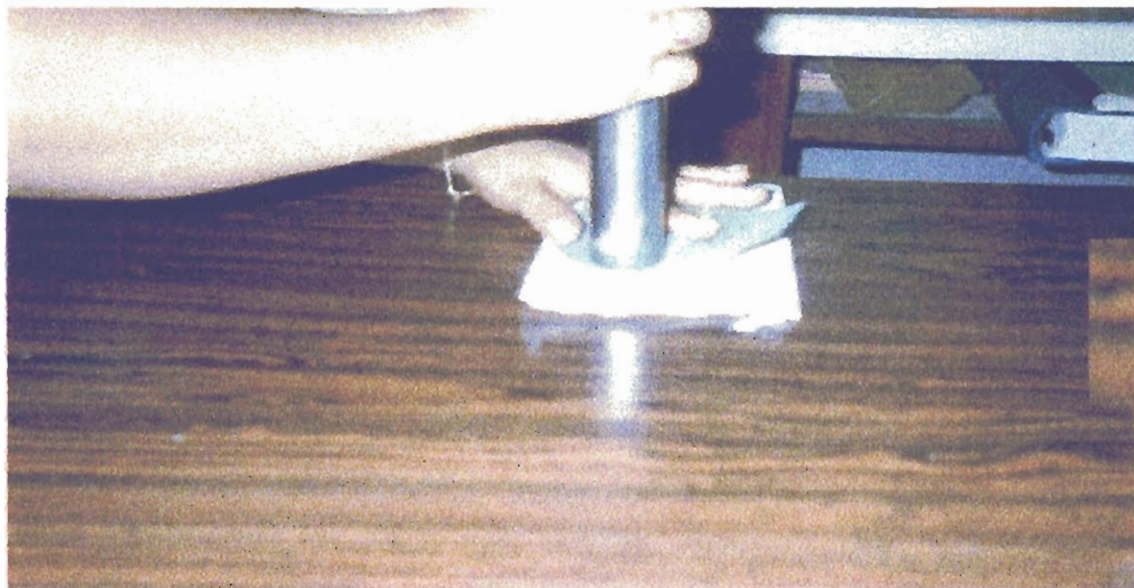
**Figura 4.** Planta de repollo con el crecimiento adecuado para la introducción en la cría de *P. xylostella* en el invernadero de la Universidad Nacional Agraria.



**Figura 5.** Algunos instrumentos utilizados durante los bioensayos en el laboratorio de MIP/UNA.



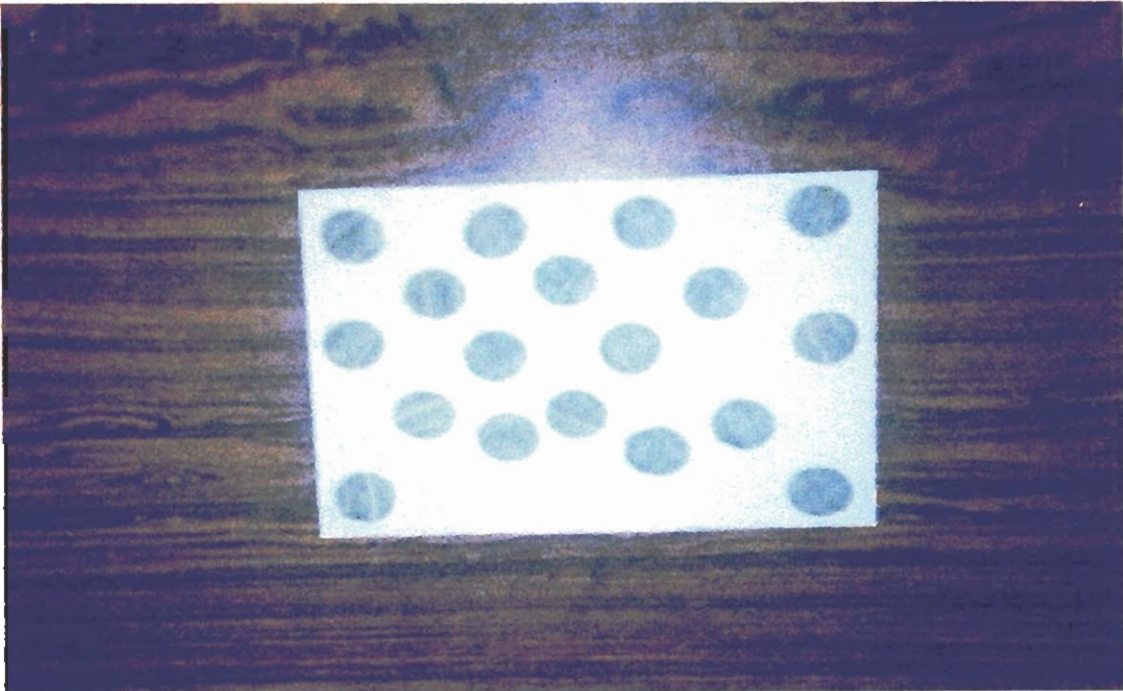
**Figura 6.** Preparación de Discos foliares (20 cm de diámetro) de hojas de repollo para bioensayos.



**Figura 7.** Desinfección de discos foliares de repollo en hipoclorito de sodio al 2%.



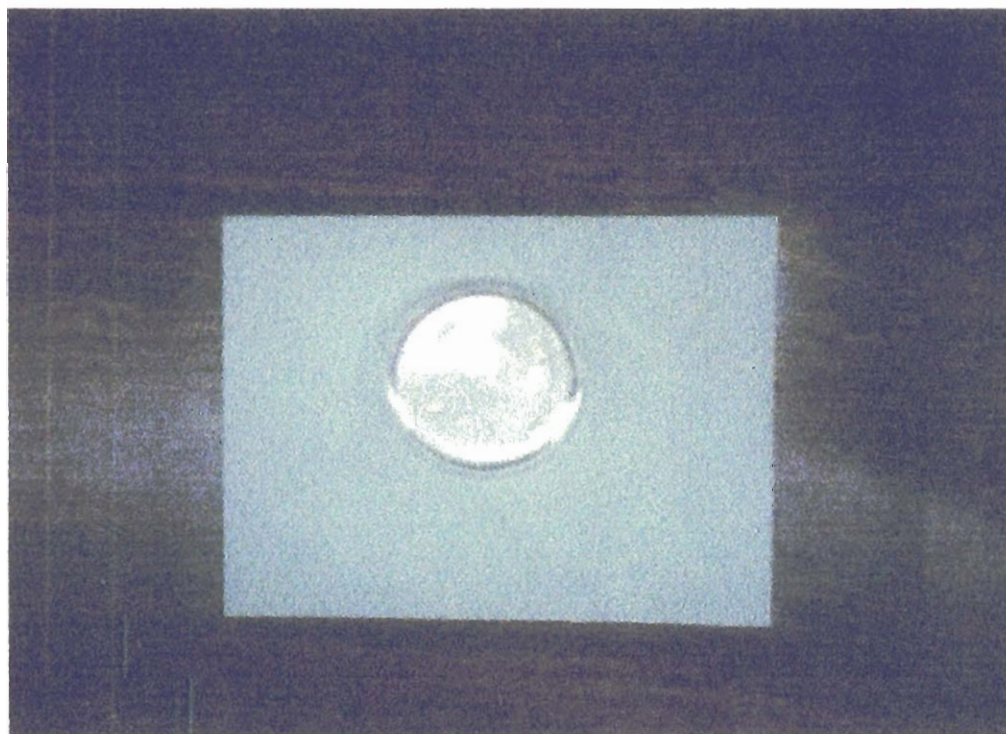
**Figura 8.** Discos foliares de repollo listos para el montaje de los bioensayos.



**Figura 9.** Preparación de viales plásticos (1 onz.) para la realización de los bioensayos.



**Figura 10.** Prueba de germinación de *B. bassiana* en PDA.



**Figura 11.** Revisión al estereoscopio de esporulación de conidias de *B. bassiana* en larvas de *P. xylostella*.



**Figura 12.** Germinación de conidias de *B. bassiana* en PDA. (Fuente laboratorio de control microbial de la Universidad Nacional Agraria)

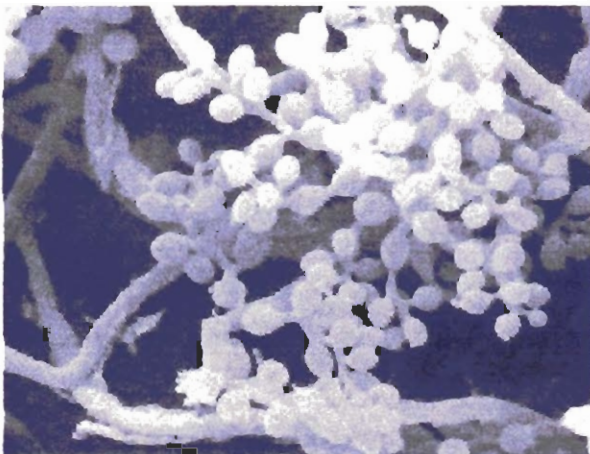


**Figura 13.** Producción de conidias de *B. bassiana* en arroz (Fuente laboratorio de control microbial de la Universidad Nacional Agraria)



**Figura 14.** Raquis conidiofórico, conidióforos y conidios de *B. bassiana* vistos al microscopio de barrido (Fuente Torres, H. et al 1993)

**Figura 15.** Larva de *P. xylostella* afectada por el Hongo *B. bassiana* (Fuente. Díaz J et al 1999)





**Cuadro 1. Ingredientes utilizados para preparar las formulaciones.**

<b>Porcentaje de Aceite de Algodón</b>	<b>Proporción de Ingredientes</b>					<b>Cantidad de Formulación elaborada</b>
	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	
<b>%</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>
10	12.35	4.67	0.3	3	79.68	100.0
8	9.87	4.67	0.3	3	82.16	100.00
6	7.40	4.67	0.3	3	84.63	100.00
4	4.39	4.67	0.3	3	87.63	100.00
2	2.47	4.67	0.3	3	89.56	100.0
0	0	4.67	0.3	3	92.02	100.00