



Universidad Nacional Agraria

Facultad de Agronomía

Trabajo de Graduación

Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base
de *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) con
materiales sólidos y líquidos

AUTORES

Br. Geysel Carolina Espinoza Ruiz
Br. Francys Lorena Vallejos Treminio

ASESOR

PhD. Arnulfo Monzón Centeno

Managua, Nicaragua
Agosto, 2016



Universidad Nacional Agraria

Facultad de Agronomía

Trabajo de Graduación

Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base
de *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) con
materiales sólidos y líquidos

AUTORES

Br. Geysel Carolina Espinoza Ruiz
Br. Francys Lorena Vallejos Treminio

*Presentado a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como
requisito para optar al grado de Ingeniero Agrónomo.*

Managua, Nicaragua – Agosto 2016



Universidad Nacional Agraria

Facultad De Agronomía

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la decanatura de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria como requisito parcial para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Miembros del tribunal examinador

Presidente

Secretario

Vocal

Lugar y Fecha (día, mes y año) _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3.1 Ubicación del área de estudio	5
3.2 Diseño metodológico	5
3.2.1 Etapa 1: Preparación y evaluación de formulaciones.....	5
3.2.1.1 Caracterización macroscópica de <i>Beauveria bassiana</i> cepa-114.....	5
3.2.1.2 Crecimiento radial de <i>Beauveria bassiana</i> cepa-114	5
3.2.1.3 Reproducción de <i>Beauveria bassiana</i> cepa-114.....	6
3.2.1.4 Elaboración de formulaciones	6
3.2.2 Etapa 2: Evaluación de la efectividad de <i>Beauveria bassiana</i> en las diferentes formulaciones.....	7
3.2.2.1 Establecimiento de Bioensayo.....	7
3.2.2.2 Aplicación de los tratamientos	7
3.3 Variables evaluadas	8
3.3.1 Crecimiento radial	8
3.3.2 Concentración de conidias por gramo de producto formulado	8
3.3.3 Viabilidad de las conidias.....	9
3.3.4 Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	9
3.4 Análisis de datos	10
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	11

4.1	Caracterización macroscópica de <i>Beauveria bassiana</i> cepa 114.....	11
4.2	Crecimiento radial.....	11
4.3	Concentración y viabilidad de conidias en formulaciones de <i>Beauveria bassiana</i>	13
4.4	Efectividad de formulados de <i>Beauveria bassiana</i> en larvas de <i>Galleria mellonella</i>	18
V.	CONCLUSIONES	20
VI.	RECOMENDACIONES	21
VII.	LITERATURA CITADA	22
VIII.	ANEXOS	26

DEDICATORIA

A **Dios**, por el maravilloso hecho de permitirme vivir, ser mi fuente de sabiduría y manantial de esperanza, por permitirme cumplir muchas metas en mi vida y llenarme de bendiciones a lo largo de ésta.

A mi familia,

En especial a mi madre y amiga, **Enma Ruiz Tórrez**, por traerme al mundo, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida y por sobre todas las cosas por creer en mí; gracias a ti mamá porque siempre luchaste incansablemente para que yo cumpliera mi sueño de ser profesional.

A mi abuelita **Cesarea Ruiz** (q.e.p.d), por su cariño y por instruirme en el camino de la vida, por compartir conmigo sus últimos años de vida.

A **Franklin Alexander Valdivia**, por estar conmigo en esta etapa de mi vida con amor, comprensión y apoyo incondicional, por motivarme a crecer y ser mejor cada día.

A mi gran amigo **N.A.R.P**, por ser la persona que tanto admiro y aprecio, gracias por considerarme una hija y sentir orgullo de mis logros, por sus oraciones y por sus consejos que siempre ha sido una gran motivación personal.

Br. Geysel Carolina Espinoza Ruiz

DEDICATORIA

A **Dios** por regalarme el don de vivir y permitirme cumplir cada uno de mis propósitos y metas, quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desvanecer en el intento.

A mis **padres** por ser las personas más importantes en mi vida, quienes estuvieron a mi lado brindándome su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi mamá *Esperanza de Jesús Treminio Centeno* por darme la vida, darme su cariño, amor incondicional. A mi papá *Ernesto Vallejos Espinoza* por aconsejarme, cultivarme con valores y siempre haciéndome reflexionar de la manera correcta para ser de mí una mejor persona.

A mi **esposo Joel Yamir Urroz Flores** por sus palabras y confianza, por su amor y brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, fuente calma y consejo en todo momento.

Br. Francys Lorena Vallejos Treminio

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirnos culminar este trabajo de tesis.

A nuestros padres, quienes con su esfuerzo nos han permitido desarrollarnos profesionalmente.

A la Universidad Nacional Agraria, en particular al Departamento de Protección Agrícola y Forestal, por la oportunidad brindada, en especial al Laboratorio de hongos entomopatógenos.

A nuestro asesor Dr. Arnulfo Monzón, por su tiempo y colaboración en la elaboración de este trabajo.

Al MSc. Víctor Ramón Monzón, por sus valiosos aportes y apoyo incondicional.

Al Ing. Markelyn Rodríguez, por apoyarnos en la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos UNAN-LEÓN por la colaboración brindada.

A nuestros docentes, quienes han contribuido a nuestra formación académica.

Br. Geysel Carolina Espinoza Ruiz

Br. Francys Lorena Vallejos Treminio

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Tipo de formulaciones evaluadas y materiales inertes utilizados.....	7
2	Concentración de conidias formuladas de <i>Beauveria bassiana</i> en diferentes periodos de almacenamiento a temperatura ambiente.....	17
3	Viabilidad de conidias formuladas de <i>Beauveria bassiana</i> en diferentes periodos de almacenamiento a temperatura ambiente.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Cámara de conteo y rayado Neubauer	9
2	Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> a 10 días de incubación.....	11
3	Velocidad de crecimiento radial de <i>Beauveria bassiana</i>	12
4	Crecimiento radial de <i>Beauveria bassiana</i> en tres medios de cultivo...	12
5	Efectividad de formulaciones de <i>Beauveria bassiana</i> en <i>Galleria mellonella</i>	18

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1	Análisis de varianza por fecha para la variable concentración de conidias.....	26
2	Análisis de varianza por fecha para la variable viabilidad de conidias.....	29
3	Análisis de varianza para la variable de mortalidad de larvas de <i>G. mellonella</i>	32
4	Foto de larvas muertas de <i>G. mellonella</i> cubiertas con micelio de <i>B. bassiana</i>	32
5	Foto de germinación de conidias de <i>B. bassiana</i> , 24 horas después de la inoculación en medio Agar-agua 2%.....	33

RESUMEN

Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos

El objetivo de este trabajo fue evaluar en diferentes periodos de almacenamiento la calidad, en términos de viabilidad y concentración de conidias, en formulaciones bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana*, elaboradas con diferentes materiales inertes. Los materiales inertes (tratamientos) evaluados fueron: harina de trigo, arcilla blanca, arcilla verde, sulfato de calcio, aceite de soya, aceite de maní y el testigo fue *B. bassiana* en sustrato (no formulado). La concentración del hongo, utilizada para las formulaciones fue 8.5×10^9 conidias por gramo. Se utilizó *B. bassiana* cepa 114, obtenida del cepario del laboratorio de hongos entomopatógenos de la UNA. La reproducción del hongo se hizo mediante el método de producción semi-industrial, utilizando arroz grano entero como sustrato. La caracterización se hizo mediante características macroscópicas y ritmo de crecimiento del hongo en los medios de cultivo: PDA, SDA y EMA. Luego de elaboradas las formulaciones, fueron almacenadas en condiciones de laboratorio (24 °C - 28°C, HR60%) durante seis meses se determinó la concentración y viabilidad de conidias. Para la evaluación de la concentración de conidias se prepararon diluciones seriadas y el conteo de conidias se realizó en una cámara con rayado Neubauer. La evaluación de viabilidad, se hizo en medio Agar-agua 2%. La evaluación de la concentración de conidias así como la evaluación de la viabilidad se hizo cada 15 días durante los primeros tres meses y luego cada 30 días durante los últimos tres meses. El efecto de los materiales inertes sobre la efectividad biológica de *B. bassiana* fue evaluado en un bioensayo con la especie *Galleria mellonella* la que se obtuvo del laboratorio de cría de la UNA, usando una suspensión del hongo a una concentración de 1.6×10^8 por ml. Se realizó Análisis de Varianza y separación de medias según Tukey, por cada fecha de monitoreo. Se concluye que el mejor material para formular *B. bassiana* es harina de trigo, ya que fue el material inerte que presentó menor disminución en la concentración y viabilidad de conidias durante el periodo evaluado. La mayor velocidad promedio de crecimiento se observó en el medio de cultivo PDA. En general, los materiales inertes no afectaron significativamente la efectividad biológica de *Beauveria bassiana* en larvas de *Galleria mellonella*.

Palabras claves: Hongos entomopatógenos, formulaciones, *Beauveria bassiana*, concentración, viabilidad, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Solid and liquid formulations of biopesticides of *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils)

The aim of this study was to evaluate the shelf life of formulations of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using different inert materials. Inert materials evaluated were wheat flour, white clay, green clay, calcium sulfate, soybean oil and peanut oil. Non-formulated (Grown on rice grains) *B. bassiana* was used as control. *B. bassiana* strain Bb-114 at a concentration of 8.5×10^9 conidia per gram was used for formulations. The fungus was obtained in a semi- industrial process in laboratory of entomopathogenic fungi of Universidad Nacional Agraria. Prior to formulation *B. bassiana* was characterized based on macroscopic characteristics in potato dextrose agar, Sabouraud dextrose agar and malt agar culture media. Once prepared, formulations were placed in storage at environmental conditions (24 °C - 28°C, HR 60%) during six months. Quality of formulations was registered by measuring concentration of conidia per gram and germination of conidia. Germination of conidia was studied in 2% water-agar medium. Conidia concentration was determined using dilution method and Neubauer chamber. During the first three months, measurements were done every two weeks and every month during the last three months. Formulations were also evaluated on mortality of wax moth (*Galleria mellonella*) using a concentration of 1.6×10^8 conidia per ml, inoculated by immersion method. Analysis of variance and Tukey test was used for data analysis. Results show that concentration and conidia germination decrease over time and inert materials did not affect significantly biological activity of *B. bassiana* on *G. mellonella* and wheat flour was the inert material that showed less reduction of concentration and conidia germination during six months.

Key words: Entomopathogenic fungi, formulations, *Beauveria bassiana*, concentration and conidia germination, *Galleria mellonella*.

I. INTRODUCCIÓN

La pérdida en el rendimiento de muchos cultivos debido a las plagas, que alcanza entre un 20% al 30% en la mayoría de los cultivos, a pesar del incremento substancial en el uso de plaguicidas (cerca de 500 millones de kilogramos de ingrediente activo a nivel mundial), es un síntoma de la crisis ambiental que afecta a la agricultura (Altieri y Nicholls, 2000). Aunque se conocen muchas maneras de producir y formas de proteger los cultivos con excelentes resultados que han dado respuestas a las demandas del mercado, en su mayoría han provocado un desbalance entre el medio ambiente y los recursos utilizados en estos sistemas productivos (Argüello *et al.*, 2009).

El desarrollo de una agricultura eficiente y sustentable exige favorecer la opción de una agricultura que fomente prácticas y técnicas amigables con el medio ambiente. La creciente demanda de más y mejores alimentos de alta calidad para la salud humana, trajo consigo la búsqueda permanente de nuevas alternativas de manejo de plagas (Castillo *et al.*, 2012). Dentro de las alternativas que sugiere el MIP se destacan los siguientes métodos de control de plagas: control cultural, control físico, control biológico y control químico (Argüello *et al.*, 2009).

Uno de los métodos alternativos de manejo de plagas es el control biológico, el que consiste en la acción de parasitoides, depredadores, entomopatógenos y hongos antagonistas para mantener la densidad de la población de un organismo plaga a un promedio menor del que ocurriría en su ausencia (Debach, 1964).

En Centro América, la disponibilidad de bioplaguicidas para los agricultores es muy limitada en comparación a los plaguicidas sintéticos, para los que ya existe una cultura de uso que se remonta a muchas décadas y que afronta una serie de factores negativos como son los residuos de plaguicidas en los alimentos, en el agua y en el ambiente, que provocan contaminación ambiental y problemas de salud en la población. El fomento del control biológico y del uso de bioplaguicidas con los agricultores es vital si se quiere incrementar su utilización en los próximos años (Carballo *et al.*, 2004). El propósito no es que estos bioplaguicidas sustituyan a los plaguicidas químicos, sino buscar métodos más amigables con el ambiente, como un componente del manejo integrado de plagas (Carballo *et al.*, 2004).

La lucha biológica se plantea en la actualidad como una alternativa amigable con el medio ambiente, más favorable que el control químico. Actualmente los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga (Monzón, 2001). El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* está siendo estudiado de manera intensiva como agente de control biológico, para insectos y otras plagas artrópodos, por la amplia gama de especies que controla. El potencial de *B. bassiana* en el control biológico de insectos ha permitido su inclusión en diversos programas de manejo integrado de plagas que atacan cultivos de importancia económica en el mundo (Peteira *et al.*, 2011).

En Nicaragua se ha desarrollado una metodología para la producción semi-industrial de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. También se formulan productos elaborados a base de estos

hongos para el control de plagas en diversos cultivos como café, repollo, plátano y algodón. Además se ha desarrollado una tecnología de multiplicación artesanal de hongos entomopatógenos (Monzón, 2001). Sin embargo, pocas instituciones se dedican a la producción y multiplicación de estos hongos, por lo que la distribución, disponibilidad y costo del producto se ha convertido en una limitante de adquisición (Romero y Rojas, 2004), además que el desarrollo de formulaciones aún es incipiente en el país.

Representantes del sector agrícola en Nicaragua consideran que la poca disponibilidad, la ausencia de un organismo rector que avale su uso y el desconocimiento de su oferta evitan la masificación del producto (Baca, 2016). Para que las formulaciones estén disponibles para los usuarios, deben producirse en cantidades suficientes, es decir, se requiere implementar métodos de producción masiva que además de obtener buenos rendimientos, proporcionen un producto de buena calidad.

En Nicaragua se han seleccionado cepas de *Beauveria bassiana* efectivas para el control de plagas importantes como la broca del café (*H. hampei*), picudos de chiltoma (*A. eugenii*), palomilla del repollo (*P. xylostella*) colectados en diferentes localidades del país. Pese a esto no se han desarrollado formulaciones comerciales a partir de estas cepas, esto ha sido una limitante para la optimización de su uso (Monzón, 2016).

Según Mata (2008) el desarrollo de una adecuada formulación es esencial para obtener un bioplaguicida efectivo debido a que los elementos constituyentes de la formulación impactan directamente en la viabilidad de las conidias del hongo. En el proceso de formulación la condición de garantizar que las conidias sean almacenadas con el menor contenido de humedad permite prolongar la viabilidad del producto en condiciones de almacenamiento, además los materiales inertes empleados en la elaboración de las formulaciones protegen las conidias a condiciones ambientales desfavorables; la única forma de lograr mantener productos a temperatura ambiente sin afectar su viabilidad es mediante la preparación de formulaciones adecuadas.

Existen diferentes tipos de formulación, sólidas y líquidas, que pueden ser aplicadas al suelo en forma directa o previamente diluidas en agua (France y Urtubia, 2007). Según Monzón (2001) la formulación sólida ayuda a absorber la humedad de las conidias y mantiene la viabilidad por un tiempo considerable y la formulación líquida permite mantener suspendidas las conidias en el medio para lograr una mezcla homogénea que garantice una buena aplicación. Un aspecto importante a considerar es que las formulaciones por lo general son elaboradas en otros países y utilizan cepas o razas del hongo que no son nativos y por lo tanto su efectividad puede ser muy baja.

Con base en la demanda y creciente necesidad de contrarrestar los daños ocasionados por plaguicidas sintéticos, se necesita crear condiciones que permitan una mayor difusión del uso de hongos entomopatógenos como controladores biológicos. El desarrollo de nuevas formulaciones que presenten mayor viabilidad en la interacción con los factores medio ambientales, que su aplicación sea fácil y eficaz y que a su vez los costos de producción sean mínimos en comparación con otros productos formulados, es un factor determinante para lograr una mayor difusión de esta tecnología; por estas razones se pretende crear

distintas formulaciones de bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana* y evaluarlas en condiciones de laboratorio para posteriores estudios que puedan realizarse en condiciones de campo que permitan el control de diferentes plagas de importancia económica.

Este estudio se realizó con el propósito de evaluar la vida en estante de bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana*, formulados con materiales inertes sólidos y líquidos, y cómo estos pueden favorecer o no el potencial que tiene el hongo como agente de control biológico; de esta manera contribuir a la disponibilidad de información referente a la formulación de bioplaguicidas, que sirva de base para que las organizaciones que trabajan en producción masiva de hongos entomopatógenos puedan desarrollar sus propias formulaciones, empleando materiales locales de fácil adquisición y manipulación.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Contribuir al desarrollo de formulaciones eficientes de bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos, mediante la evaluación del efecto de materiales locales sobre la actividad biológica del agente de control microbial

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar macroscópicamente la cepa *Beauveria bassiana*-114 como agente potencial para formulación de bioplaguicidas.

Evaluar el efecto de materiales inertes sobre la viabilidad y concentración de conidias en formulaciones sólidas y líquidas en diferentes períodos de almacenamiento.

Evaluar el efecto de materiales inertes sólidos y líquidos sobre la efectividad biológica de *B. bassiana*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de hongos entomopatógenos, en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria, ubicada en el km 12 ½ carretera Norte, Managua, Nicaragua.

3.2 Diseño metodológico

El estudio se realizó en dos etapas, en la primera se caracterizó macroscópicamente el hongo entomopatógeno *B. bassiana* cepa-114, luego se hizo el proceso de formulación y las formulaciones obtenidas se evaluaron en términos de concentración y viabilidad del hongo *Beauveria bassiana*. En la segunda etapa se realizó un bioensayo para evaluar el efecto de materiales inertes sobre la eficacia biológica de *Beauveria bassiana* en larvas de *Galleria mellonella*.

3.2.1 Etapa 1: Preparación y evaluación de formulaciones

3.2.1.1 Caracterización macroscópica de *Beauveria bassiana* cepa-114

Para la caracterización macroscópica de *Beauveria bassiana* cepa-114 se prepararon platos Petri de 90mm de diámetro, con medios de cultivo PDA (papa dextrosa agar), SDA (saboraud dextrosa agar) y EMA (extracto de malta agar). Por cada medio de cultivo se prepararon 5 platos los cuales fueron inoculados a temperatura de 24°C a 25°C, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. A partir del tercer día de incubación se hicieron observaciones visuales y se registró aspecto de la colonia (esporulante, polvorienta), crecimiento vertical, crecimiento circular, color de la colonia al iniciar y finalizar el crecimiento, color de la colonia por la parte superior del plato y por la parte inferior.

3.2.1.2 Crecimiento radial de *Beauveria bassiana* cepa-114

Inicialmente se realizó un bioensayo para evaluar el crecimiento radial de la cepa *Beauveria bassiana* -114, en tres medios de cultivo, utilizando la metodología descrita por French y Hebert (1982). Para tal fin, se prepararon platos Petri de 90mm de diámetro, con medios de cultivo PDA (papa dextrosa agar), SDA (saboraud dextrosa agar) y EMA (extracto de malta agar). En el envés de los platos se dibujó una cruz proyectando cuatro radios de 45 mm y marcado en el centro del plato. Cada radio fue marcado con letras (A, B, C, D). Luego se depositó el inóculo de *B. bassiana* en el centro del plato Petri conteniendo el medio de cultivo. El inóculo del hongo consistió en un disco de 5 mm de diámetro de un crecimiento de 8 días del hongo en platos Petri con PDA, obtenido con un sacabocado. Por cada medio de cultivo se utilizaron 10 platos Petri, los que fueron considerados como repeticiones.

Las observaciones se realizaron cada 24 horas, en cada observación se marcó el punto de avance del hongo sobre los cuatro radios, midiendo con una regla milimetrada el crecimiento del hongo a partir del centro (punto de inoculación). Las observaciones se dejaron de realizar en cada plato, cuando el hongo alcanzaba su crecimiento en uno de los cuatro radios, hasta el borde del plato Petri. La variable que se midió fue ritmo de crecimiento promedio de *Beauveria bassiana* en mm/h y se calculó dividiendo el crecimiento total entre el tiempo transcurrido en horas. Asimismo se calculó la media de crecimiento radial acumulado en mm.

3.2.1.3 Reproducción de *Beauveria bassiana* cepa-114

La reproducción del hongo empleado para preparar las formulaciones, se hizo mediante el método de producción semi-industrial, utilizando arroz entero como sustrato. El inóculo se obtuvo del cepario del laboratorio de hongos entomopatógenos de la UNA, siendo este la cepa *B. bassiana*-114, la que fue colectada en la localidad de San Juan de Rio Coco, Departamento de Madriz.

El hongo fue sembrado en platos Petri conteniendo medio PDA (papa dextrosa agar), luego de ser inoculados se dejaron a una temperatura de 24°C a 28°C por 7 días. Una vez obtenido el cultivo puro se procedió a preparar una matriz líquida del hongo en un medio nutritivo a base de leche de soya en polvo, sacarosa y una fuente nutritiva a base de Nitrógeno. Estos se dejaron en agitación constante a 130 rpm durante 90 horas para la obtención de blastosporas, las que fueron utilizadas para la inoculación de las bolsas.

A partir del cultivo líquido (matriz) de *B. bassiana* se preparó una suspensión para inocular el sustrato sólido (arroz) contenido en bolsas de polipropileno de 8 por 12 pulgadas. En cada bolsa se depositaron 200 gramos de arroz pre-cocido y se sometieron a esterilización (Autoclave 120 °C, 1.2 bar). Después de esterilizadas, las bolsas se dejaron enfriar y se inocularon con 20 ml de la suspensión, y se pusieron en incubación por un periodo de 8 días. Luego el arroz colonizado por el hongo fue depositado en bandejas, para la etapa final de incubación y secado por un período de 15 días, posteriormente se procedió a la cosecha del hongo por el método de tamizado manual y luego el producto cosechado fue utilizado para la elaboración de formulaciones.

El control de calidad se llevó a cabo en todo el proceso de producción mediante la observación visual de aspectos como crecimiento y coloración propios del hongo. El control de calidad de los cultivos puros se realizó mediante la limpieza del cultivo eliminando las colonias del contaminante y realizando una nueva siembra, descartando los platos contaminados por otros microorganismos. En las bolsas se descartó aquellas que presentaron contaminantes y cuyo crecimiento no fue uniforme. El producto cosechado se evaluó mediante el rendimiento y viabilidad según se explica la metodología descrita (Acápites 3.3.2 y 3.3.3).

3.2.1.4 Elaboración de formulaciones

Los tratamientos que se evaluaron corresponden a las diferentes formulaciones (Cuadro 1). Los materiales inertes sólidos fueron sometidos a un proceso de secado durante 24 horas a temperaturas de 100°C y los materiales líquidos consistieron en aceites vegetales desnaturalizados. El ingrediente activo de estas formulaciones consistió en conidias de *B. bassiana*, en concentración de 8.5×10^9 conidias por gramo de producto formulado (1.7×10^{12} conidias/ha) equivalente a 10 gramos de hongo puro, que representaba aproximadamente el 20% en peso de la formulación.

Las formulaciones sólidas fueron empacadas en bolsas de papel con forro interno de aluminio en presentación de 200 gramos, y las formulaciones líquidas se envasaron en frascos plásticos de 200 ml, correspondiente a una dosis para una hectárea.

Cuadro 1: Tipo de formulaciones evaluadas y materiales inertes utilizados

Tratamiento	Formulación	Materiales inertes
1	Sólido	Arcilla blanca
2	Sólido	Arcilla verde
3	Sólido	Harina de trigo
4	Sólido	Sulfato de calcio
5	Líquido	Aceite vegetal soya
6	Líquido	Aceite vegetal maní
7	(Testigo)	Hongo en arroz

El hongo en arroz fue utilizado como referencia para comparar la concentración de esporas y la viabilidad de estas respecto a las formulaciones a evaluar. Para cada formulación se utilizaron tres repeticiones y cada repetición consistió en un producto empacado o envasado.

3.2.2 Etapa 2: Evaluación de la efectividad de *Beauveria bassiana* en las diferentes formulaciones

Se estableció un bioensayo en el laboratorio de hongos entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria para determinar el efecto de *Beauveria bassiana* formulado con diferentes materiales inertes sobre larvas de *Galleria mellonella*.

3.2.2.1 Establecimiento de Bioensayo

El bioensayo constó de 9 tratamientos los cuales consistieron en las mismas formulaciones evaluadas en el estudio de estabilidad (cuadro 1), incluyendo un testigo relativo Spintor™ 12 SC y un testigo absoluto que consistió en agua destilada. Por cada tratamiento se destinaron 4 grupos de cinco platos Petri cada uno para un total de 20 platos Petri por tratamiento conteniendo una larva cada plato y cada plato representó una repetición.

Las larvas fueron adquiridas en el laboratorio de cría de *Galleria mellonella* de la Universidad Nacional Agraria, en el tercer estadio, fueron sometidas a baño María a temperaturas de 55°C durante dos segundos con el objetivo de alargar el tiempo de empupado y como proceso de desinfección parcial.

3.2.2.2 Aplicación de los tratamientos

El método de inoculación empleado fue por inmersión. Las larvas fueron sumergidas durante 3 segundos en la suspensión de los productos formulados, la suspensión del hongo fue preparada a una concentración de 1.6×10^8 . La concentración fue determinada utilizando la metodología descrita en la sección de este documento correspondiente a la evaluación de concentración de conidias por gramo de producto formulado (Acápite 3.3.2). Luego del período de inmersión se extrajeron las larvas de dichas suspensiones y se colocaron en papel toalla para eliminar el exceso de agua de la suspensión. Posteriormente se ubicaron las larvas individualmente en cámaras húmedas, las cuales

consistieron en platos petri con papel filtro previamente esterilizados y humedecido; se realizó un monitoreo cada 24 horas.

Para el caso del testigo absoluto, las larvas fueron sumergidas durante 3 segundos en agua destilada y se colocaron individualmente en platos Petri con papel filtro humedecido.

El testigo relativo utilizado fue Spintor, un insecticida a base de Spinosad que penetra en el cuerpo de la larva por contacto (Dow AgroSciences, 2013). La dosis utilizada fue 1 ml de producto/litro de agua, equivalente a 1L por hectárea y fue aplicado por el método de aspersión utilizando un atomizador Devilbiss.

3.3 Variables evaluadas

- Color y forma de colonias de *B.bassiana*-114
- Crecimiento radial de *B. bassiana*
- Concentración de conidias de *B. bassiana* por gramo de producto formulado
- Viabilidad de conidias de *B. bassiana*
- Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella*

3.3.1 Crecimiento radial

Se realizó la medición de cuatro radios del plato en mm cada 24 horas, a partir del segundo día de siembra hasta que la colonia cubrió la superficie del medio de cultivo.

3.3.2 Concentración de conidias por gramo de producto formulado

Las variables de concentración y viabilidad de conidias fueron evaluadas durante un periodo de seis meses. Durante los primeros tres meses las lecturas se realizaron con una frecuencia de dos veces por mes y los últimos tres meses de estudio las lecturas se llevaron a cabo cada 30 días.

Para el conteo de conidias se empleó la técnica de diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) de los diferentes productos formulados, hasta obtener una que permitió realizar el conteo utilizando la metodología sugerida por Monzón (2001).

La primera dilución se obtuvo colocando 1 g de producto formulado en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, la siguiente dilución se obtuvo transfiriendo con una micropipeta estéril 1 ml de la primera dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, este se agitó fuertemente durante 1 minuto, hasta que se obtuvo una tercera suspensión de 10^{-3} . Este procedimiento fue continuo hasta que se obtuvo la dilución 10^{-5} con la cual se procedió a realizar el conteo.

Usando una micro pipeta se tomó una alícuota de la suspensión de conidias y se depositó en la cámara de conteo (Neubauer) y luego a través de un microscopio de luz (objetivo de 40X) se realizó el conteo de conidias, dos lecturas por repetición de cada tratamiento.

La cámara de conteo es una lámina de vidrio que presenta una ranura en forma de H y contiene dos cámaras entre estas. Para facilitar el conteo, el fondo de la cámara tiene un rayado "Neubauer", que consiste de 9 cuadros principales (C.P) de 1 mm por lado (Figura 1). El CP central está dividido en 25 cuadrados secundarios (CS). Para propágulos

pequeños como el caso de *Beauveria bassiana* se usaron 5 cuadros secundarios del cuadro principal central.

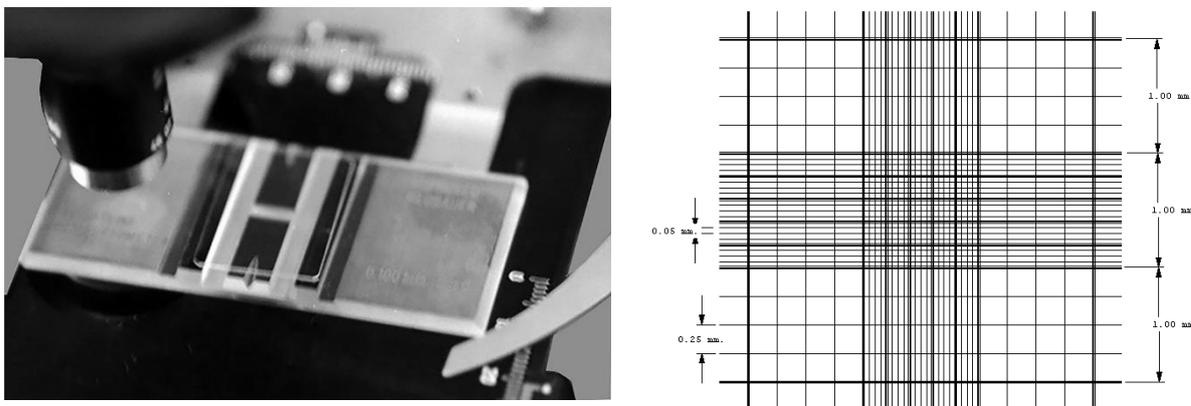


Figura 1. Cámara de conteo y rayado Neubauer utilizada para hacer el conteo para determinar la concentración de conidias por gramo de producto

Debido a que las conidias de *Beauveria bassiana* son pequeñas, se usaron cuadrados secundarios, cuyo factor de cámara corresponde a 250,000, seleccionando para conteo cinco cuadros secundarios del cuadro principal central, obteniendo luego el promedio. La dilución utilizada para el conteo fue 10^{-5} , por lo que el factor de dilución utilizado fue 10,0000.

Se calculó la concentración de conidias por gramo, utilizando la siguiente fórmula (French y Hebert 1982):

$$\text{Número de conidas/g} = \text{No. de conidas} \times \text{factor de cámara} \times \text{factor de dilución}$$

3.3.3 Viabilidad de las conidias

La evaluación de viabilidad de conidias se realizó en Agar-agua 2%, esterilizado en autoclave a 1.2 bar de presión y 120°C de temperatura. El medio fue vertido en platos Petri previamente esterilizados dejándose reposar durante un tiempo hasta lograr la solidificación, posteriormente se depositaron 5 alícuotas de la dilución 10^{-5} de la suspensión del hongo, en 5 puntos al azar de cada plato Petri.

El porcentaje de viabilidad se determinó contando el número de conidias germinadas y no germinadas, dividiendo las primeras entre el total de conidias observadas. La lectura se realizó 24 horas después de haber depositado las alícuotas en el medio, en microscopios de luz usando el objetivo 40X, contando al menos 200 conidias en cada montaje.

El cálculo se realizó empleando la siguiente fórmula (French y Hebert, 1982):

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{No. de conidias germinadas}}{\text{No. de conidias totales}} \times 100$$

3.3.4 Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella*

Se registró el número de larvas muertas después de 24, 48 y 72 horas, después de la inmersión en la suspensión de las formulaciones.

Se calculó el porcentaje de mortalidad empleando la siguiente formula:

$$Mortalidad (\%) = \frac{No. de larvas muertas}{No. total de larvas evaluadas} \times 100$$

Parámetros empleados para la confirmación de *Beauveria bassiana* como agente causal:

-Melanización y letargo.

-Ausencia de pudrición en las larvas muertas

-Presencia de micelio blanco inicialmente luego aparición de conidias que cubre totalmente el cuerpo del insecto.

3.4 Análisis de datos

El análisis de los datos fue sometido al programa estadístico SAS versión 9.1 y el análisis fue en dependencia de cada variable:

Caracterización macroscópica: se realizó un análisis descriptivo de las características macroscópicas y crecimiento del hongo.

Crecimiento radial: se calculó la velocidad promedio de crecimiento y fue registrada en (mm/ horas).

Viabilidad y concentración de conidias: fueron analizados mediante ANDEVA, así como las interacciones (formulación*tiempo). Se procedió a realizar separación de medias y análisis de varianza por cada fecha de muestreo.

Mortalidad de larvas: para los datos tomados en el bioensayo de mortalidad se realizó un análisis de varianza (ANDEVA).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización macroscópica de *Beauveria bassiana* cepa 114

La caracterización macroscópica de *Beauveria bassiana* cepa 114, utilizada en el estudio, indica que las colonias presentaron crecimiento vertical elevado de color blanco con apariencia algodonosa debido a la abundancia de conidias, luego las colonias se tornan ligeramente polvorientas, y color amarillo pálido al reverso del plato (Figura 2). Resultados similares fueron obtenidos por García *et al.*, (2011) y Castillo *et al.*, (2012) quienes reportan que la colonia de *B. bassiana* es de aspecto lanoso y en forma de polvo, de color blanco en un principio y luego amarillento en la parte del centro. El crecimiento de estas colonias fue circular, regular y con bordes definidos coincidiendo con lo observado por García *et al.*, (2006) y por Castillo *et al.*, (2012).

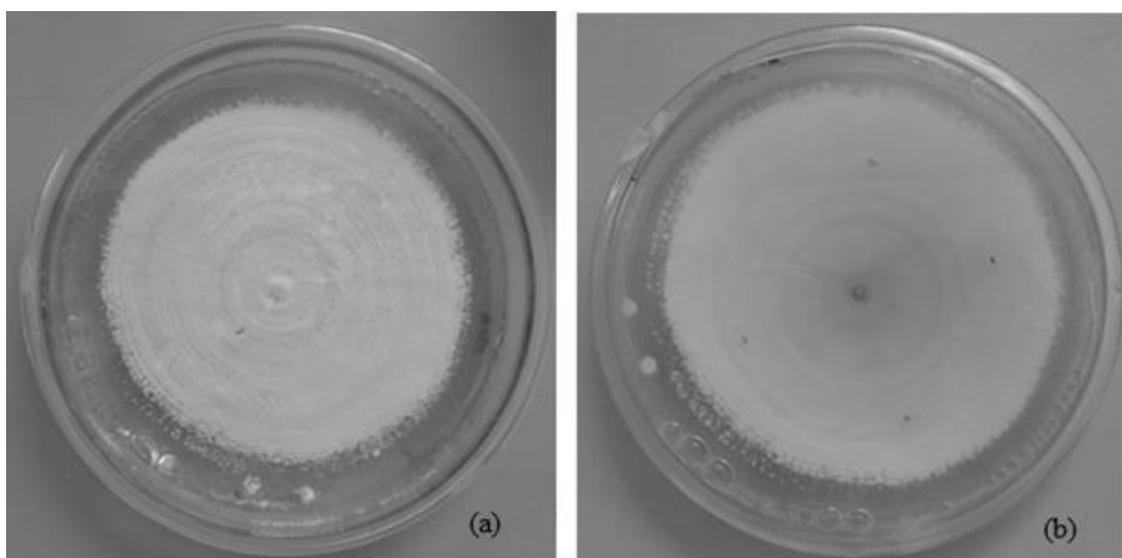


Figura 2. Crecimiento de *Beauveria bassiana*, a 10 días de incubación. Crecimiento por la parte superior del plato (a) y por la parte inferior (b).

4.2 Crecimiento radial

Los resultados obtenidos en laboratorio con respecto a la velocidad de crecimiento radial de *Beauveria bassiana* -114 en los diferentes medios a una temperatura de 25°C durante doce días, muestran que el medio más adecuado fue Papa Dextrosa Agar (PDA), ya que en este medio se registró la mayor velocidad de crecimiento radial que fue de 0.32 mm/h, seguido por el medio SDA (agar papa sacarosa) con 0.23 mm/h, finalmente el medio que alcanzó el menor crecimiento radial fue el medio EMA (extracto de malta) con 0.15 mm/h (Figura. 3). El crecimiento radial alcanzado por el hongo 12 días posteriores a la inoculación fue de 45 mm en PDA, de 33 mm en SDA y de 21 mm en EMA (Figura. 4).

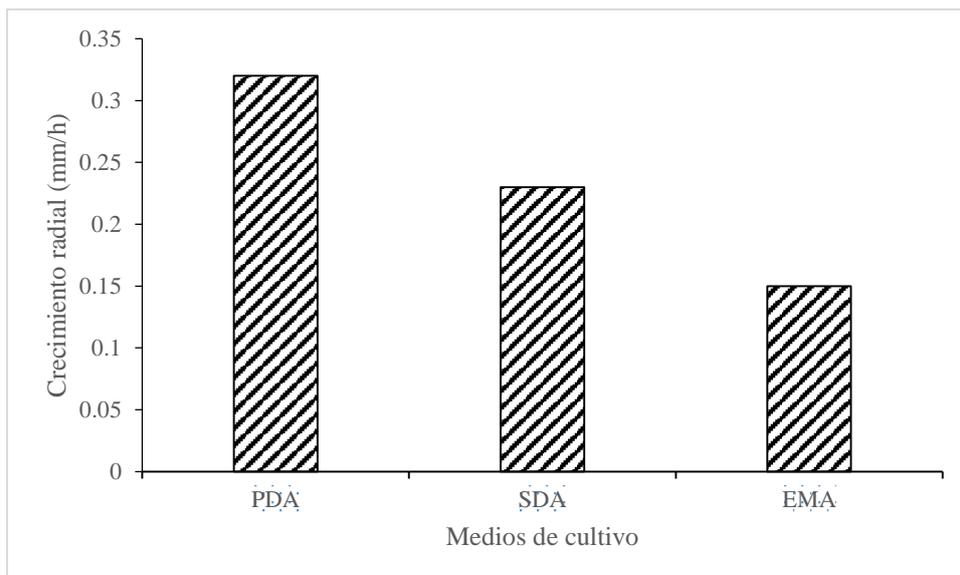


Figura 3. Velocidad de crecimiento radial promedio de *Beauveria bassiana* en tres medios de cultivos. 12 días después de la inoculación a ± 26 °C.

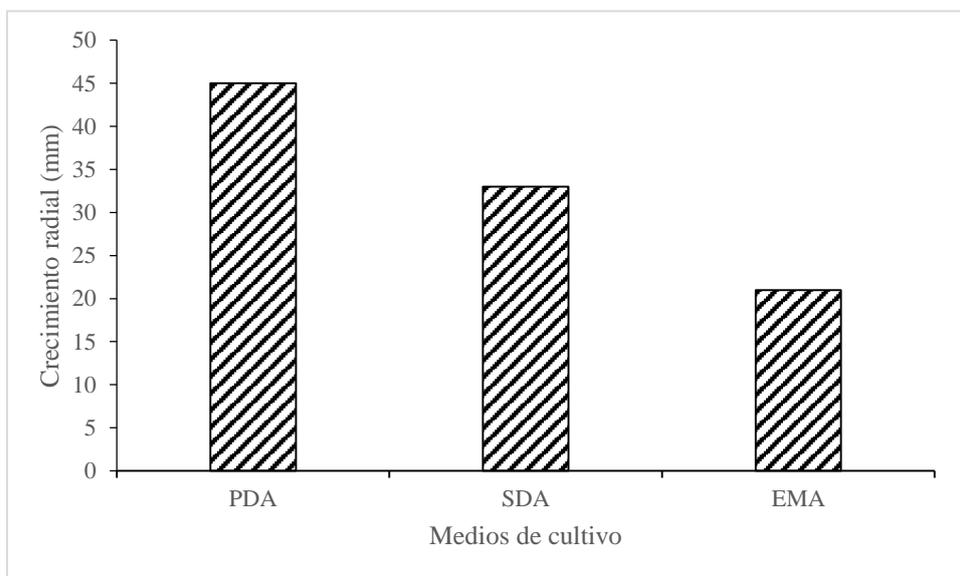


Figura 4. Crecimiento radial de *Beauveria bassiana* en tres medios de cultivos. 12 días después de la inoculación a ± 26 °C.

La velocidad de crecimiento de un hongo está determinada en gran parte por la capacidad del organismo de aprovechar las fuentes de nutrientes disponibles (carbohidratos y proteínas, entre otros), de degradar las sustancias presentes en el sustrato de crecimiento y por la habilidad del metabolismo de ese organismo de funcionar dentro del rango de temperatura ofrecido por el medio (Iskandarov *et al.*, 2006; Fargues *et al.*, 1992). En este sentido, Shah *et al.* (2005) y Safavi *et al.* (2007) afirman la tasa de crecimiento radial es una variable que depende de diversos factores, por ejemplo, el tipo de cepa utilizada, la naturaleza del sustrato donde crece el hongo, así como la relación C/N del sustrato usado, entre otros factores.

4.3 Concentración y viabilidad de conidias en formulaciones de *Beauveria bassiana*

Concentración de conidias

En general, la harina de trigo y las arcillas fueron los materiales inertes que mantuvieron la menor disminución de concentración de conidias a temperatura ambiente, durante los seis meses de estudio. La concentración inicial promedio de todos los tratamientos fue de 5.65×10^9 conidias por gramo de producto y la concentración final promedio fue de 2.09×10^8 , disminuyendo 3.7% de la concentración inicial, esto podría sugerir que los materiales inertes en general, no afectaron el hongo de manera sustancial con relación a la concentración de conidias por producto formulado en comparación con el testigo.

El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas entre materiales inertes y entre fechas de muestreo, se observó que la interacción entre estos, resultó significativa ($P:0.0001$), indicando que el efecto del material inerte sobre la concentración de conidias depende de la fecha, es decir, que la concentración de conidias, varía entre los materiales inertes de una fecha a otra. Por esta razón se procedió a realizar un análisis de varianza para cada fecha de muestro.

El ANDEVA realizado para los datos por fecha, indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos para las fechas 1 ($p: 0.0002$), 2 ($p: 0.0001$), 4 ($p: 0.0001$), 5 ($p: 0.0001$), 6 ($p: 0.0001$), 7 ($p: 0.0001$), 8 ($p:0.0004$) y 9 ($p:0.0014$). Solamente en la fecha 3 no se encontraron diferencias significativas ($p: 0.086$) entre los materiales evaluados.

En la primera y tercera fecha, así como en las últimas 4, el material inerte que presentó la menor disminución de concentración de conidias equivalente a 3.8% fue la harina de trigo, con un promedio que varió entre 8.3×10^9 y 3.2×10^8 . Este fue el material que mantuvo la mayor concentración de conidias durante los seis meses de evaluación.

En las fechas 2 y 4 la arcilla verde presentó la mayor concentración de conidias, es decir la menor disminución equivalente al 10% con un promedio de 7×10^9 y 7.1×10^8 , respectivamente. En cambio, la soya, el hongo en sustrato de arroz y maní presentaron la más alta disminución concentración en estas fechas, equivalente a 13%, 14% y 11%, respectivamente.

En las fechas 5 y 6 la arcilla blanca fue el material inerte que sobresalió con la menor disminución de concentración de conidias en estas fechas entre 6.08×10^8 y 5.16×10^8 , equivalente al 7% y 6.5% En cambio los materiales con la mayor disminución promedio fueron aceite de soya, aceite de maní y hongo en sustrato de arroz (testigo).

La mayor disminución en la concentración de conidias se presentó en aceite de maní en las fechas 3 y 5, así como en las últimas cuatro fechas, así como en el aceite de soya en las tres primeras fechas. El testigo mantuvo la concentración de conidias más baja en 7 de las 9 fechas en estudio y únicamente en las fechas 3 y 4 el testigo superó el promedio de concentración de conidias de los materiales inertes aceite de maní y aceite de soya (Cuadro 2).

Viabilidad de conidias

Los resultados obtenidos con relación a la estabilidad de las diferentes formulaciones en términos de viabilidad de conidias en condiciones de temperatura ambiente, muestran que en general, la viabilidad de conidias tiene una tendencia a disminuir en el tiempo en todas las formulaciones.

El análisis de varianza realizado para el análisis de viabilidad de conidias indica que entre materiales inertes y entre fechas de muestreo resultaron significativos asimismo la interacción entre estos resultó significativa ($P:0.0001$), indicando que el efecto del tratamiento sobre la viabilidad de las conidias varía de una fecha a otra, es decir, que el tratamiento que obtuvo la mayor viabilidad de conidias en una fecha no fue el mismo en otra fecha, por lo que para determinar que tratamiento mantuvo la mayor viabilidad de conidias en cada fecha, se procedió a realizar un ANDEVA para cada fecha de muestreo.

El ANDEVA realizado para los datos por fecha de muestreo indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos en las fechas 1 ($p: 0.0007$), 2($p: 0.0001$), 3(0.0009), 4 ($p: 0.0004$), 5($p: 0.0002$), 6($p: 0.0001$), 7($p: 0.0001$), 8($p: 0.0001$) y 9 ($p: 0.0001$).

Los materiales inertes que presentaron los mejores resultados a los seis meses fueron harina de trigo (87.6%), arcilla blanca (86.5%) y arcilla verde (84.5%), en cambio los materiales inertes a base de aceite de maní (62.5%) y soya (67.1%) presentaron los promedios de viabilidad más bajos (Cuadro 3). Sin embargo, el producto no formulado presentó la menor viabilidad de conidias con 50.5% cumpliéndose lo sugerido por Monzón (2001) quien expresa que cuando el hongo ha sido formulado las conidias mantienen su viabilidad por más tiempo que cuando se almacena el polvo sin formular. Así mismo, France y Urtubia (2007) sugieren que la formulación asegura mayor permanencia del hongo. El producto formulado tiene mayor durabilidad, debido que para la elaboración de la formulación se debe garantizar que las conidias del hongo tengan el menor contenido posible de humedad, no así en productos no formulados, ya que en estos el hongo está sobre el sustrato y el tiempo de secado es mínimo, por lo que el producto queda con un considerable contenido de humedad.

La evaluación de la concentración de conidias, así como su viabilidad, es determinante en el proceso de evaluación de formulaciones de bioplaguicidas, ya que a partir de esa información se determina el tiempo que el producto puede durar en condiciones de almacenamiento. La concentración de conidias permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso (Mata, 2008), asimismo garantizar que la formulación contenga la cantidad de conidias necesarias para controlar en campo, respetando la concentración recomendada de 10^{12} conidias/ha (Monzón, 2001). La viabilidad es fundamental, pues el hongo al ser asperjado en el campo debe tener un rápido efecto sobre la población insectil objetivo para disminuir el tiempo de exposición a condiciones ambientales (Malpartida *et al.*, 2013).

Los resultados de esta investigación sugieren que el mejor material inerte para formular conidias de *Beauveria bassiana* es harina de trigo, debido a que fue el material en el que observó mayor concentración y viabilidad de conidias al final del periodo evaluado, esto indica que la harina de trigo permite su almacenamiento a temperatura ambiente con una pérdida mínima de las cualidades del producto, conforme lo sugerido por Alves y Batista (1998).

La cepa *B. bassiana* 114 presentó un alto porcentaje de germinación en la formulación harina de trigo con un promedio de 90.83% al quinto mes de ser formulado y finalizó con 87.66% en el sexto mes de estudio. Por lo que se considera una buena formulación, tomando en cuenta lo que plantean Vélez *et al.*, (1997) quienes señalan que una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Estudios realizados indican que las formulaciones de hongos entomopatógenos que contienen almidón duran mayor tiempo en almacenamiento (McGuire y Shasha, 1992) y según Bastidas (2009) el almidón se caracteriza por formar una suspensión coloidal o masa viscosa y elástica sobre la espora que la protege, además contribuye a la viscosidad de la suspensión final.

La harina de trigo es un material inerte de fácil acceso y con un costo de adquisición relativamente económico. Otro punto a considerar, son las características de la mezcla y la harina de trigo se mezcla fácilmente con el agua formando una solución homogénea la cual no se precipita al instante y se puede aplicar fácilmente con equipos de aspersión convencional.

Las arcillas cumplen la función de soporte sólido en la formulación del hongo, ya que estas son tierras inertes (Martínez, 2010) y por ende no tienen efectos negativos sobre la estabilidad del mismo; tanto la arcilla verde como arcilla blanca, disminuyeron un 3.1% la concentración inicial del producto formulado y figuran dentro de los mejores materiales inertes para formular después de la harina de trigo; según Caudwell y Moore (1997), Orestes (2006) y Moore & Higgins (1997) citados por Gato (2010) las arcillas se mezclan fácilmente con el agua son considerados tierras humectables, permitiendo la obtención de un producto más manipulable; las arcillas son materiales inertes empleados para incrementar la longevidad en almacenamiento ya que permiten el secado del conidio

En el sulfato de calcio se observó una disminución de 3.09% de la concentración inicial de conidias, asimismo la viabilidad se redujo un 16% finalizando con 79.1%, este valor está por debajo de lo sugerido por Vélez *et al.*, (1997). Este resultado sugiere, que el sulfato de calcio no es un material inerte recomendable para formular *Beauveria bassiana* a largo plazo, pues solo en los primeros 4 de los seis meses de estudio esta formulación mantuvo la viabilidad superior al 85%. A pesar de esto, este material, se mezcla fácilmente con el agua, siendo considerado por ello una sal soluble (Martínez, 2010). El sulfato de calcio podría emplearse como un aditivo para mejorar la mezcla en campo pero no para almacenar por más de 4 meses.

Los aceites vegetales se utilizan como materiales inertes para formular hongos entomopatógenos porque cumplen un papel de protectores ante condiciones ambientales desfavorables que puedan afectar la efectividad de las conidias retrasando la germinación según Alves. *et al.*, (1998) que evaluaron el efecto de la radiación solar simulada en conidias de *Metharhizium anisopliae* en diferentes formulaciones, resaltan que el aceite de maní protege significativamente las conidias del hongo durante 6 horas en exposición a luz UV. Asimismo los aceites son los materiales inertes más prometedores para formular hongos en relación a las técnicas de aplicación (Caudwell y Moore, 1997). Sin embargo, es necesario considerar los posibles efectos negativos que ejercen los aceites vegetales en particular con las conidias del hongo pues según Orestes (2006) y Jenkins y Grzywacz (2003) citados por Gato (2010) estos dañan la pared celular de la espora y la vuelven no viable en poco tiempo, considerando lo anterior, se sugiere la utilización de aceites

vegetales para formular *Beauveria bassiana* a plazo no mayor de 4 meses o para ser aplicado al momento, de igual manera que con el sulfato de calcio.

Cuadro 2. Concentración de conidias de *Beauveria bassiana* por gramo de producto formulado en diferentes periodos de almacenamiento a temperatura ambiente

Tratamiento	Fechas de monitoreo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Arcilla blanca	7.84x10 ⁹ (a)	5.11x10 ⁹ (ab)	1.33x10 ⁹ (a)	6.45x10 ⁸ (ab)	6.08x10 ⁸ (a)	5.16x10 ⁸ (a)	4.42x10 ⁸ (a)	3.50 x10 ⁸ (ab)	2.49x10 ⁸ (ab)
Arcilla verde	7.87x10 ⁹ (a)	7.03x10 ⁹ (a)	9.12x10 ⁸ (a)	7.18x10 ⁸ (a)	5.16x10 ⁸ (ab)	4.24x10 ⁸ (a)	3.78x10 ⁸ (ab)	3.13x10 ⁸ (abc)	2.49x10 ⁸ (ab)
Harina trigo	8.39x10 ⁹ (a)	4.39x10 ⁹ (b)	1.50x10 ⁹ (a)	6.08x10 ⁸ (ab)	5.71x10 ⁸ (a)	5.16x10 ⁸ (a)	4.51x10 ⁸ (a)	4.24x10 ⁸ (a)	3.22x10 ⁸ (a)
Sulfato calcio	7.45x10 ⁹ (a)	6.21x10 ⁹ (ab)	8.75x10 ⁸ (a)	5.06x10 ⁸ (bc)	4.05x10 ⁸ (bc)	3.04x10 ⁸ (b)	2.95x10 ⁸ (bc)	2.49x10 ⁸ (bc)	2.30x10 ⁸ (abc)
Aceite soya	2.61x10 ⁹ (b)	1.36x10 ⁹ (c)	4.60x10 ⁸ (a)	3.59x10 ⁸ (c)	3.13x10 ⁸ (c)	2.67x10 ⁸ (b)	2.30x10 ⁸ (c)	2.12x10 ⁸ (bc)	1.66x10 ⁸ (bc)
Aceite maní	3.0x10 ⁹ (b)	1.54x10 ⁹ (c)	4.33x10 ⁸ (a)	3.31x10 ⁸ (c)	2.76x10 ⁸ (c)	2.49x10 ⁸ (b)	2.15x10 ⁸ (c)	1.75x10 ⁸ (c)	1.38x10 ⁸ (bc)
Arroz	2.41x10 ⁹ (b)	9.02x10 ⁸ (c)	8.56x10 ⁸ (a)	3.50x10 ⁸ (c)	2.67x10 ⁸ (c)	2.39x10 ⁸ (b)	2.12x10 ⁸ (c)	1.75x10 ⁸ (c)	1.10x10 ⁸ (c)

*letras distintas significan diferencias significativas dentro de cada columna, según Tukey ($\alpha = 0.05$)

Cuadro 3. Viabilidad de conidias formuladas de *Beauveria bassiana* en diferentes periodos de almacenamiento a temperatura ambiente

Tratamiento	Fechas de monitoreo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A. blanca	97.3 (a)	96.0(a)	95.0(a)	94.5(ab)	93.3(a)	91.3(a)	90.1(a)	88.5(a)	86.5(a)
A. verde	96.5 (a)	95.1(ab)	93.8(a)	92.5(ab)	91.1(a)	89.1(a)	87.8(a)	86.5(a)	84.5(a)
Harina trigo	97.6 (a)	96.6(a)	96.1(a)	95.1(a)	94.5(a)	93.8(a)	92.6(a)	90.8(a)	87.6(a)
Sulfato calcio	95.1 (a)	94.8(ab)	92.1(ab)	90.6(abc)	88.8(ab)	87.1(a)	84.8(ab)	82.3(a)	79.1(a)
Aceite de soya	92.8(ab)	89.3(bc)	83.8(bc)	81.3(c)	76.6(bc)	73.8(b)	71.6(bc)	68.8(b)	67.1(b)
Aceite de maní	87.5 (b)	85.1(c)	82.5(c)	80.8(c)	74.6(c)	71.1(b)	66.6(c)	64.6(bc)	62.5(b)
Arroz	92.1(ab)	89.6(bc)	87.8(abc)	84.6(bc)	72.8(c)	67.0(b)	58.8(c)	55.3(c)	50.5(c)

*letras distintas indican diferencias significativas dentro de cada columna,según (Tukey ($\alpha = 0.05$))

4.4 Efectividad de formulados de *Beauveria bassiana* en larvas de *Galleria mellonella*

En el bioensayo de efectividad todas las formulaciones causaron alta mortalidad a las 48 horas después de la inoculación. En las primeras 24 horas no se observó mortalidad de larvas en ninguna de las formulaciones. La mayoría de larvas murió a las 72 horas en todas las formulaciones a excepción del testigo absoluto, en este último no se observó mortalidad mientras duró el bioensayo.

El análisis de varianza indica que hubo diferencias significativas (P:0.001) entre las formulaciones de *B. bassiana* y el producto no formulado, así como el testigo absoluto. Las formulaciones en harina de trigo y aceite de maní presentaron la mayor mortalidad, inclusive sobre el testigo relativo Spintor™ 12SC. Las formulaciones en aceite de soya y arcilla verde fueron las que causaron la menor mortalidad, de 85 y 80% respectivamente (Figura 5).

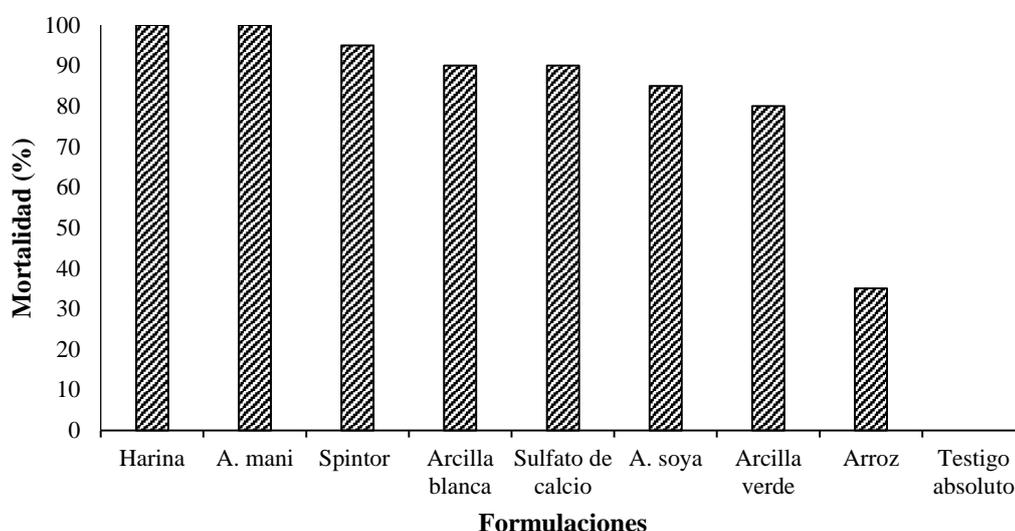


Figura 5. Efectividad de formulados de *B. bassiana* en *G. mellonella*

En general, estos resultados sugieren que los materiales inertes utilizados en las formulaciones no tienen efecto sobre la efectividad biológica de *B. bassiana*, se obtuvieron porcentajes de mortalidad de 80 al 100% a una concentración de 1.6×10^8 . Se observó que después de la inmersión de las larvas a las diferentes suspensiones de las formulaciones estudiadas y posterior al escurrimiento, solo en la suspensión de arroz no se observó adherencia de hongo al cuerpo de las larvas de la misma manera que en los materiales inertes, probablemente se explica que por la naturaleza de la mezcla de todos los materiales inertes en general, se adhieren con facilidad al cuerpo de las larvas, esta condición aumenta la posibilidad de adquisición de esporas. Se obtuvo porcentajes de mortalidad similar a estudios realizados por Bautista *et al.*, (2011) quienes evaluaron cepas de *B. bassiana* a una concentración de 1×10^9 obtuvieron una mortalidad del 93.3% y una mortalidad del 98% utilizando una concentración de 10^8 en larvas de *Tuta absoluta* 12 días posterior a la inoculación (Rodríguez *et al.*, 2006).

Galleria mellonella es muy utilizada en bioensayos por su alta susceptibilidad a muchos patógenos fúngicos (Zimmermann, 1986), por tal razón esta especie fue utilizada para la

realización del presente estudio, ya que la condición de susceptibilidad permitió evaluar el efecto de los materiales inertes sobre la acción patogénica de *Beauveria bassiana*.

Todas las larvas muertas y mantenidas en cámara húmeda, presentaron micelio entre el tercer y cuarto día después de muertas, confirmando a la especie *Beauveria bassiana* como agente causal, a excepción del testigo relativo que no presentó micelio, sino una pudrición generalizada de las larvas, asimismo el testigo absoluto en el cual no se registró muerte. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que, la mortalidad observada en condiciones de laboratorio, no siempre son los que se obtienen en condiciones de campo, donde la cantidad de conidias que logran llegar al insecto es generalmente menor, además se deben considerar otros factores que pueden inhibir el efecto de las conidias del hongo en tales condiciones.

V. CONCLUSIONES

En general, todas las formulaciones favorecieron la vida en estante del hongo, presentando menor disminución de la concentración y viabilidad de conidias en comparación con los promedios obtenidos del hongo no formulado (testigo).

La harina de trigo y las arcillas son los materiales inertes que presentaron la menor disminución de la concentración de conidias y viabilidad.

La mayor tasa promedio de crecimiento radial de *B. bassiana*, previo a la producción masiva se observó en el medio PDA a los 12 días de crecimiento, presentando colonias blanquecinas, luego ligeramente polvorizadas y color amarillo ligero al reverso del plato.

La harina de trigo es el mejor material inerte para formular conidias de *Beauveria bassiana*, fue el material en el que se observó mayor estabilidad de la formulación en términos de concentración y viabilidad de conidias durante el periodo evaluado.

Los materiales inertes no ocasionaron efectos negativos sobre la estabilidad del hongo y la efectividad biológica en *Galleria mellonella*.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar estudios similares que contemple el uso de otros materiales inertes disponibles, asimismo evaluar diferentes temperaturas de almacenamiento.

Efectuar pruebas de efectividad de conidias del hongo formulados en ensayos de campo, sobre plagas de importancia económica.

Si el interés es formular *Beauveria bassiana* a plazo no mayor de 4 meses se pueden emplear los materiales inertes aceites vegetales a base de soya y maní, asimismo sulfato de calcio.

VII. LITERATURA CITADA

- Altieri, M; Nicholls, CI. 2000. AGROECOLOGÍA: Teoría y práctica para una agricultura sustentable. 1a edición. Distrito federal, MX. 257 p.
- Alves A, LF; Batista Filho, A.1998. Formulação de entomopatógenos. Biotecnología, Ciência & Desenvolvimento 1(5): 32-34. Consultado el 26 de marzo 2015. Disponible en: www.biotecnologia.com.br/.../entomopatogenos.pdf
- Alves, RT; Bateman, RP; Prior, C; Leather, SR. 1998. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. Crop Protection. 17(8): 675-679 p.
- Arguello, H; Pilarte, F; Gómez, C; Vallecillo, R; López, J; Vásquez, M; Zeledon, I; Zapata, G. 2009. Manejo integrado de plagas: Producir con sano juicio. Revista Enlace. Año 19: 1-64.
- Baca C, L. 2016. Un hongo puede ser la solución a la broca del café. La Prensa, Managua, NI, jun. 23:1A.
- Bastidas, A; Velasquez, E; Marín, P; Benavides, P; Bustillo, A; Orozco, F. 2009. Evaluacion de preformulados de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. Revista Agronomia. 17(1): 44-61.
- Bautista, MN; García, GC; González, MB. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodóptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Revista Colombiana de Entomología 37 (2): 217-222.
- Carballo, M; Guaharay, F. 2004. Control Biológico de Plagas Agrícolas. Serie Técnica. Manual Técnico No 53/CATIE. Managua, NI. 232p.
- Castillo, CE; Cañizalez, LM; Valera, R; Godoy, JC; Guedez, C; Olivar, R; Morillo, S. 2012. Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en TRUJILLO-VENEZUELA. Revista ACADEMIA. 11(23): 275-281.
- Castillo, P; Moreno, LF; Gómez, M. 2012. Guía técnica de hongo entomopatógenos: *Beauveria bassiana* para el manejo de plagas. UNAN León, NI. 11 p.

- Caudwell, RW; Moore, D.1997. Formulation of entomopathogens for the control of grasshoppers and locust. *Memoirs of the Entomological Society Canada*. 129(171): 49-67.
- DeBach, P. 1964. *Biological control of insect pests and weeds*. Reinhold, N.Y. 844 p.
- Dow AgroSciences. 2013. SpinTor™. Etiqueta comercial. México. Consultado 18 Junio 2015. Disponible en: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_08e2/0901b803808e2f32.pdf?filepath=es/pdfs/noreg/011-04699.pdf&fromPage=GetDoc
- Fargues, J., N. K. Maniania, J. C. Delmas, y N. Smits. 1992. Influence de température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes (en línea), *Agronomie* 12: 557–564p. Consultado el 21 octubre 2015. Disponible en: http://www.agronomy-journal.org/articles/agro/pdf/1992/07/Agronomie_0249-5627_1992_12_7_ART0008.pdf
- France, A; Urtubia, HI. 2007. Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. *INIA Tierra adentro*.46-49.
- French, ER; Hebert, TT. 1982. *Metodología de investigación fitopatología*. ed. M de la Cruz. San José, CR. IICA. 290p.
- García, MA; Cappello, S; Leshner, JM; Molina, RF. 2011. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*. 10(2): 21-28.
- García, XM; Villamizar, FL; Torres, LA; Cotes, AM. 2006. Efecto de subcultivos sucesivos de *Beauveria bassiana* sobre sus características y actividad contra *Premnotrypes vorax*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*.CR. No. 77:50-56.
- Gato Cárdenas, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *FITOSANIDAD*. 14(3):189-195.
- Iskandarov, U., Guzalova, A., y Davranov, K. 2006. Effects of Nutrient Medium Composition and Temperature on the Germination of Conidia and the Entomopathogenic Activity of the Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*(en línea). *Applied Biochemistry and Microbiology*. Rusia. 42(1): 72-76p.

Consultado el 21 de octubre 2015. Disponible en:
<http://link.springer.com/article/10.1134%2FS000368380601011X>

Malpartida, J; Narrea, M; Dale, W. 2013. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*. 12(2): 75-81.

Martínez Castrillón, LM. 2010. Desarrollo de un prototipo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de *Demotispa neivai* Bondar (Coleoptera: Chrysomelidae). Tesis Mag.Sc. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, CO. 121 p.

Mata Villegas, T. 2008. Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Tesis Mag.Sc. Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala, MX. 97 p.

McGuire, M; Shasha, B. 1992. Adherent Starch Granules for Encapsulation of Insect Control Agents. *Journal of economic Entomology* .85(4):1425-1433.

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua (en línea). Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos, CATIE. no. 63: 95-103. Consultado el 30 de marzo 2015. Disponible en: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>

Monzon, V. 2016. Formulaciones de *Beauveria bassiana* (Bals y Vuils) para el manejo de plagas en el cultivo del repollo (*Brassica oleracea* L. var *capitata*) en el Tisey, Estelí. Tesis Mag. Sc. Managua, NI, UNA. 71p.

Peteira, B; González, I; Arias, Y; Fernández, A; Miranda, I; Martínez, B. 2011. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Vol. 26 N°1. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Mayabeque, CU. 16-22 p.

Rodríguez, 2006. Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta*.

Romero, OD; Rojas Espinoza, JL. 2004. Estudio de factibilidad para el establecimiento de un taller de multiplicación artesanal del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill) para el manejo de la broca del café *Hypothenemus hampei*

(Ferrari) en la comunidad de San Buenaventura, municipio de Boaco. Tesis Ing. Agr. Managua, NI. Universidad Nacional Agraria. 170 p.

Safavi, S. A., F. A. Shah, A. K. Pakdel, G. R. Rasoulilian, A. R. Bandani, and T. M. Butt. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence off the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*(en linea). FEMS Microbiol. Lett. 270: 116-123p. Consultado el 22 de octubre 2015. Disponible en: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/270/1/116.full>

Shah, F. A., C. S. Wang, and T. B. Butt. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (en linea). FEMS Microbiol. Lett. 251: 259- 266p. Consultado el 22 de octubre 2015. Disponible en: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/251/2/259.long>

Vélez, P. Posada, F; Marín, P; Bustillo, A; González, M; Osorio, D. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Revista CENICAFE. N° 17. 1- 37.

Zimmermann, G. 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. Institut für biologische. 213-215.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza por fecha para la variable concentración de conidias

Fecha 1

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	1.4165343E20	2.3608905E19	9.81	0.0002
Error	14	3.3678287E19	2.4055919E18		
Total	20	1.7533172E20			
R²: 0.807917		Coefficiente de variación: 27.43952			

Fecha 2

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	1.1315007E20	1.8858344E19	36.53	<.0001
Error	14	7.2274953E18	5.1624967E17		
Total	20	1.2037756E20			
R²: 0.939960		Coefficiente de variación: 18.95252			

Fecha 3

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	2.8685705E18	4.7809508E17	2.37	0.0860
Error	14	2.8239478E18	2.0171056E17		
Total	20	5.6925183E18			
R²: 0.503919		Coefficiente de variación: 49.41027			

Fecha 4

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	4.5269503E17	7.5449172E16	18.71	<.0001
Error	14	5.6468782E16	4.0334844E15		
Total	20	5.0916382E17			

R²: 0.889095 **Coefficiente de variación: 12.63886**

Fecha 5

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	3.6853693E17	6.1422821E16	19.66	<.0001
Error	14	4.3750588E16	3.125042E15		
Total	20	4.1228751E17			

R²: 0.893883 **Coefficiente de variación: 13.23896**

Fecha 6

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	2.7369554E17	4.5615923E16	25.11	<.0001
Error	14	2.5436388E16	1.8168849E15		
Total	20	2.9913192E17			

R²: 0.914966 **Coefficiente de variación: 11.86949**

Fecha 7

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	2.0011025E17	3.3351708E16	20.15	<.0001
Error	14	2.3177637E16	1.6555455E15		
Total	20	2.2328788E17			
R²: 0.896198		Coefficiente de variación: 12.81340			

Fecha 8

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	1.6119403E17	2.6865671E16	8.80	0.0004
Error	14	4.2733132E16	3.0523666E15		
Total	20	2.0392716E17			
R²: 0.790449		Coefficiente de variación: 20.38835			

Fecha 9

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	9.9056563E16	1.6509427E16	6.99	0.0014
Error	14	3.3067305E16	2.3619503E15		
Total	20	1.3212387E17			
R²: 0.749725		Coefficiente de variación: 23.23642			

Anexo 2. Análisis de varianza por fecha para la variable de viabilidad de conidias

Fecha 1

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	236.8333333	39.4722222	7.91	<.0007
Error	14	69.8333333	4.9880952		
Total	20	306.6666667			
R²: 0.772283		Coefficiente de variación: 2.371757			

Fecha 2

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	341.8095238	56.9682540	11.82	<.0001
Error	14	67.5000000	4.8214286		
Total	20	409.3095238			
R²: 0.835088		Coefficiente de variación: 2.376258			

Fecha 3

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	543.4047619	90.5674603	7.55	<.0009
Error	14	167.8333333	11.9880952		
Total	20	711.2380952			
R²: 0.764027		Coefficiente de variación: 3.838967			

Fecha 4

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	677.9047619	112.9841270	8.87	<.0004
Error	14	178.3333333	12.7380952		
Total	20	856.2380952			

R²: 0.791725 **Coefficiente de variación: 4.031737**

Fecha 5

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	1606.142857	267.690476	10.69	<.0002
Error	14	350.500000	25.035714		
Total	20	1956.642857			

R²: 0.820867 **Coefficiente de variación: 5.916384**

Fecha 6

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	2142.642857	357.107143	19.96	<.0001
Error	14	250.500000	17.892857		
Total	20	2393.142857			

R²: 0.895326 **Coefficiente de variación: 5.163028**

Fecha 7

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	3108.285714	518.047619	21.38	<.0001
Error	14	339.166667	24.226190		
Total	20	3447.452381			

R²: 0.901618 **Coefficiente de variación: 6.234151**

Fecha 8

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	3389.952381	564.992063	26.12	<.0001
Error	14	302.833333	21.630952		
Total	20	3692.785714			

R²: 0.917993 **Coefficiente de variación: 6.062637**

Fecha 9

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	6	3633.500000	605.583333	50.92	<.0001
Error	14	166.500000	11.892857		
Total	20	3800.000000			

R²: 0.956184 **Coefficiente de variación: 4.660273**

Anexo 3. Análisis de varianza para la variable de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	8	37800	4725	38.66	<.0001
Error	27	3300	122.22		
Total	35	41100			

R²: 0.919708 **Coefficiente de variación: 14.74055**

Anexo 4. Larvas muertas de *Galleria mellonella* cubiertas de micelio de *B. bassiana*.



Anexo 5. Germinación de conidias de *Beauveria bassiana*, 24 horas después de la inoculación en medios Agar. agua 2%.

