



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA

*"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"*

Maestría en Agroecología y Desarrollo Sostenible

Trabajo de graduación

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

AUTOR

Ing. Víctor Ramón Monzón Ruíz

ASESOR

PhD. Arnulfo Monzón Centeno

Managua, Nicaragua - 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA

*"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"*

Maestría en Agroecología y Desarrollo Sostenible

Trabajo de graduación

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

AUTOR

Ing. Víctor Ramón Monzón Ruíz

*Presentado a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como
requisito para optar al grado de Maestro en Ciencias en Agroecología y
Desarrollo Sostenible*

Managua, Nicaragua – Febrero 2016

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por iluminarme en el camino de la vida en mi formación profesional.

A mi esposa Juana Leticia Gómez Castellón por su amor incondicional y comprensión.

A mis hijos Levic Josué Monzón Gómez y Leticia Mariam Monzón Gómez que han sido mi fuente de inspiración

A mi madre Mercedia Monzón Córdoba por su infinito amor y apoyo

A mis hermanos y hermanas por sus muestras de cariño

A mi abuela/o: Pilar Córdoba Centeno y Pilar Monzón Gómez (q.e.p.d.) por su ejemplo y sus valiosos consejos

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Agraria en particular a la Facultad de Agronomía por permitirme realizar mi estudio de posgrado

Al Departamento de Protección Agrícola y Forestal por brindarme todo su apoyo para iniciar y concluir este proceso en mi formación académica

Al PhD Arnulfo José Monzón Centeno por su tiempo, apoyo y asesoramiento requerido en la realización de esta investigación.

Al señor Dimas Cerrato, por su valioso apoyo y colaboración al permitir que realizáramos la investigación en su finca.

Al programa de Maestría en Agroecología y Desarrollo Sostenible y al organismo financiero (UNA/SLU-Suecia) que brindó su ayuda económica para que esta investigación se realizara.

A todos los profesores que han sido parte en mi formación profesional

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo general	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1. Ubicación del experimento.....	6
3.2 Fase de laboratorio.....	6
3.2.1 Obtención del hongo.....	6
3.2.2 Preparación y evaluación de formulaciones	7
3.2.3 Tratamientos evaluados	7
3.2.4. Variables evaluadas	8
3.3 Fase de campo	9
3.3.1 Preparación del semillero de repollo	9
3.3.2 Establecimiento y manejo del cultivo.....	9
3.3.3 Diseño experimental	10
3.3.4 Método de muestreo	10
3.3.5 Variables evaluadas	10

3.3.6 Cosecha.....	11
3.3.7 Análisis económico de los tratamientos evaluados (CYMMIT, 1988).....	11
3.4 Análisis de los datos	15
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
Fase de laboratorio.....	16
4.1 Concentración de conidias de <i>B. bassiana</i> en las formulaciones	16
4.2 Viabilidad de conidias de <i>B. bassiana</i> en las formulaciones.....	17
Fase de campo	19
4.3 Fluctuación poblacional de <i>Plutella xylostella</i>	19
4.4 Fluctuación poblacional de <i>Leptophobia</i> sp.....	21
4.5 Fluctuación poblacional de <i>Diabrotica</i> sp.....	23
Cuadro 7. Promedio de <i>Diabrotica</i> sp en los tratamientos evaluados.....	24
4.6 Fluctuación poblacional de Áfidos	25
4.7 Fluctuación poblacional de Arañas	26
4.8 Promedio de cabezas de repollo comerciables	27
4.9 Peso en kg de cabeza de repollo	28
V. CONCLUSIONES.....	30
VI. RECOMENDACIONES	31
VII. LITERATURA CITADA	32
XIII. ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Materiales inertes de formulaciones a base de conidias de <i>B. bassiana</i> evaluados en laboratorio.....	7
2. Cabezas de repollo comercializables de acuerdo a la descripción de la calidad propuesta por Garay y Rueda 2007.....	11
3. Presupuesto parcial (U\$) de los tratamientos <i>B. bassiana</i> +Arcilla verde, <i>B. bassiana</i> +Arcilla blanca, <i>B. bassiana</i> +Aceite sunspray 6E, <i>B. bassiana</i> +Talco, <i>B. bassiana</i> +Leche en polvo y Producto no formulado evaluados en el Tisey, Estelí.....	13
4. Análisis de dominancia de los tratamientos <i>B. bassiana</i> +Arcilla verde, <i>B. bassiana</i> +Arcilla blanca, <i>B. bassiana</i> +Aceite sunspray 6E, <i>B. bassiana</i> +Talco, <i>B. bassiana</i> +Leche en polvo y producto no formulado evaluados en el Tisey, Estelí.....	14
5. Promedio de <i>P. xylostella</i> en los tratamientos evaluados.....	21
6. Promedio de <i>Leptophobia</i> sp en los tratamientos evaluados.....	22
7. Promedio de <i>Diabrotica</i> sp en los tratamientos evaluados.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Concentración de conidias de <i>B. bassiana</i> formulados con materiales sólidos y líquido durante seis meses de evaluación.....	16
2. Viabilidad de conidias de <i>B. bassiana</i> formulados con materiales sólidos y líquido durante seis meses de evaluación.....	18
3. Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de <i>B. bassiana</i> sobre el número de <i>Plutella xylostella</i> en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí, 2009 – 2010.....	20
4. Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de <i>B. bassiana</i> sobre el número de <i>Leptophobia</i> sp en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí, 2009 – 2010.....	22
5. Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de <i>B. bassiana</i> sobre el número de <i>Diabrotica</i> sp en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí, 2009 – 2010.....	23
6. Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de <i>B. bassiana</i> sobre el número de áfidos en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí, 2009 – 2010.....	25
7. Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de <i>B. bassiana</i> sobre el número de arañas en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí, 2009 – 2010.....	27
8. Número de cabezas de repollo comerciables por tratamientos evaluados en el Tisey, Estelí 2009 - 2010.....	28
9. Peso promedio (kg) de cabeza de repollo por tratamientos evaluados en el Tisey, Estelí 2009 – 2010.....	29

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Generalidades del cultivo del repollo.....	40
2. Palomilla del repollo (<i>Plutella xylostella</i> L. Lepidoptera: Plutellidae).....	41
3. Hongo Entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> (Bals & Vuils).....	42
4. Formulaciones de hongos entomopatógenos	43
5. Guías para la reproducción de <i>B. bassiana</i> mediante el proceso de producción Semi.industrial.....	44
6. ANDEVA del número de <i>Plutella xylostella</i> en los tratamientos evaluados.....	54
7. Promedio de <i>P. xylostella</i> en diferentes fechas de muestreos.....	54
8. ANDEVA del número de <i>Leptophobia</i> sp en los tratamientos evaluados.....	55
9. Promedio de <i>Leptophobia</i> sp en diferentes fechas de muestreos.....	55
10. ANDEVA del número de <i>Diabrotica</i> sp en los tratamientos evaluados.....	56
11. Promedio de <i>Diabrotica</i> sp en diferentes fechas de muestreos.....	56
12. ANDEVA del Número de cabezas de repollo en los tratamientos evaluados.....	57
13. Promedio de número de cabezas por tratamientos evaluados.....	57
14. ANDEVA de peso de cabezas de repollo en los tratamientos evaluados.....	58
15. Promedio de peso en kg por cabeza de repollo por tratamientos evaluados.....	58
16. Hoja para el muestreo integrado de plagas aplicada en el cultivo del repollo.....	59
17. Plano de campo.....	60

RESUMEN

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

Con el objetivo de evaluar formulaciones de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas en el cultivo del repollo (*Brassica oleracea* L), se realizó el estudio en la finca El Tisey, Estelí. El estudio se estableció en la época de postrera de octubre 2009 a enero 2010. Se evaluaron seis tratamientos con tres repeticiones y fueron: *Beauveria bassiana* + arcilla blanca, *B. bassiana*+arcilla verde, *B. bassiana*+talco, *B. bassiana*+leche en polvo, *B. bassiana*+aceite sunspray 6E, *B. bassiana* en sustrato. Las aplicaciones se realizaron 20 días después del trasplante y la dosis de *Beauveria bassiana* fue de 1.7×10^{12} conidias/ha. Los muestreos fueron cada 8 días después del trasplante. Las variables evaluadas en laboratorio fueron: Viabilidad y concentración de conidias y en campo fue población de *Plutella xylostella*, *Leptophobia* sp y *Diabrotica* sp. La viabilidad y concentración de conidias de *B. bassiana* de los formulados fueron adecuados durante seis meses en almacenamiento. La formulación *B. bassiana*+aceite sunspray 6E presentó los mejores resultados manteniendo los niveles más bajos de incidencia de *P. xylostella*, *Leptophobia* sp y áfidos, pero menos efectiva para *Diabrotica* sp. La menor incidencia de *Diabrotica* sp se observó en los tratamientos *B. bassiana*+arcilla blanca, pero registró mayor incidencia de *P. xylostella* y *Leptophobia* sp. La menor incidencia de *P. xylostella* se observó en octubre y la mayor incidencia en noviembre. En cambio *Leptophobia* sp presentó niveles bajos en octubre y en noviembre la incidencia más alta. Para *Diabrotica* sp los niveles más bajos se observaron a inicios de octubre y los más altos a finales del mismo mes. La mejor formulación fue *B. bassiana*+aceite sunspray 6E para el manejo de *P. xylostella*, *Leptophobia* sp y áfidos. El producto sin formular, registró el mayor número de cabezas por ha y el producto formulado *B. bassiana* más Arcilla Blanca presentó el mayor peso por cabeza.

Palabras claves: Hongos entomopatógenos, formulaciones, *Beauveria bassiana*, *Plutella xylostella*

ABSTRACT

Formulations of *Beauveria bassiana* (Bals or Vuils) for pest control in cabbage (*Brassica oleracea* L capitata) in Tisey, Estelí

This study was conducted in order to evaluate different formulations of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* for pest management in cabbage (*Brassica oleracea*). The study was established since October 2009 to January 2010 in El Tisey, Estelí. Six plots were established with three replicates. *Beauveria bassiana* (1.7×10^{12} conidia / ha) as biological control agent was evaluated in one liquid and four solid formulations *B. bassiana* + white clay, *B. bassiana*+ green clay, *B. bassiana* + talc, *B. bassiana* + milk powder + *B. bassiana* oil Sunspray 6E, *B. bassiana* substrate. Samples were taken every 8 days after transplant. Ten plants per plot were sampled for a total of 180 plants. The applications were made 20 days after transplant. The laboratory variables evaluated were: viability and concentration was conidias and field population of *Plutella xylostella*, *Leptophobia* sp, *Diabrotica* sp. The viability and concentration of conidia of *B. bassiana* formulations were adequate for six months in storage. In general pest's occurrence was low during the crop cycle. The lowest incidence of *P. xylostella* and *Leptophobia* sp was found in the plots treated with *B. bassiana* + 6E Sunspray oil. The lowest incidence of *Diabrotica* sp was observed in *B. bassiana* + white clay, *B. bassiana* and green clay. The lower incidence of *P. xylostella* was observed in October and the highest incidence in November. Instead *Leptophobia* sp presented low levels in October and November highest incidence. *Diabrotica* sp lower levels were observed in early October and the highest at the end of the month. The best formulation was *B. bassiana* + Oil Sunspray 6E for handling *P. xylostella* and *Leptophobia* sp. The not formulated product, recorded the highest number of heads per hectare, and whereas the product made more white clay *B. bassiana* had the highest weight per head.

Key words: Entomopathogenic fungi, formulations, *Beauveria bassiana*, *Plutella xylostella*

I. INTRODUCCIÓN

El repollo (*Brassica oleracea* L) es una planta originaria de Europa, pertenece a la familia Brassicaceae. Su importancia radica en el aprovechamiento de las hojas para el consumo humano, las que tienen alto contenido de vitaminas A y C así como calcio y hierro, y pueden ser consumidas en estado fresco, cocinadas de diversas formas y encurtidas. En Nicaragua, la importancia económica del cultivo del repollo es principalmente por su constante demanda de consumo durante todo el año, así como generación de empleo. El cultivo del repollo está en manos de pequeños y medianos productores con pocos recursos económicos, los que siembran en parcelas de monocultivo o asociado con otros cultivos con un promedio de áreas sembradas entre 0.34 a 3.49 ha (CATIE/UNA, 1999). En cuanto a las áreas cultivadas en Nicaragua, existe mucha variabilidad de información, el Censo agropecuario (2011) reporta aproximadamente 850 ha cultivadas de repollo donde la mayor parte de siembra del cultivo está ubicada principalmente en los departamentos de Matagalpa, Jinotega, Estelí, una pequeña proporción en Masaya, Carazo (INTA, 2006) y pequeñas áreas cultivada en la Región Autónoma del Atlántico Norte (RAAN) y en la Región Autónoma del Atlántico Sur (RAAS) (CENAGRO, 2011).

La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola - FHIA (2012), afirma que según estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el 2010 se cosecharon a nivel mundial 2.08 millones de hectáreas de repollo, obteniéndose una producción de 57.96 millones de toneladas, con un rendimiento promedio mundial de 27.81 t/ha; y que en la región centroamericana, Nicaragua cosechó en ese mismo año la mayor área con 10,300 ha, pero obtuvo los rendimientos más bajos con 1.43 t/ha. Los costos de producción varían en los países centroamericanos y se destina del 20-38% del gasto para el control de plagas (CATIE, 1990). Siendo *Plutella xylostella* la plaga que mayormente ataca a este cultivo (Rao y Lal, 2004), afectando severamente el rendimiento y la calidad del producto (INTA, 2006). Otras plagas que afectan al cultivo de repollo, reduciendo su rendimiento y calidad son *Leptophobia* sp, *Diabrotica* sp y áfidos (INTA, 2002).

A nivel mundial *P. xylostella* se ha vuelto resistente a más de 50 insecticidas y cada año se reportan nuevos casos de resistencia. En Nicaragua algunos productos que tienen muchos años de uso han perdido efectividad como, Deltametrina (Decis®), Filitox®, Lannate®, Cipermetrina (Cymbush®) y a otros productos como Jupiter®, Dipel® y Evisect® (CATIE/UNA, 1999). Ante esta situación se hace necesario el desarrollo de opciones alternativas de manejo donde la protección ambiental es de fundamental importancia (Wai Hong *et al.*, 1999) y constituye una alternativa muy importante en el desarrollo de una agricultura sustentable que preserve los recursos naturales y el medio ambiente. En este enfoque de manejo, el uso de bioplaguicidas ha sido uno de los pilares fundamentales de exitosos programas de manejo integrado de plagas a nivel mundial, particularmente en el manejo de organismos plaga que se han dispersado a nuevas áreas geográficas donde sus enemigos naturales no están presentes para regular sus poblaciones.

En Nicaragua, se han evaluado bioplaguicidas para reducir el daño de *P. xylostella* en el cultivo de repollo (CATIE/UNA, 1999). En este sentido, Romero y Rojas en el (2004), realizaron un estudio de factibilidad del uso de bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas, indicando que constituyen una alternativa viable y factible desde el punto de vista de mercado, técnico-financiero, económico y ambiental, porque según los resultados estadísticos obtenidos, los valores de impacto estudiados son irrelevantes al no ocasionar efectos negativos sobre los componentes del ambiente, salud humana y la recuperación de la inversión se alcanza en corto tiempo.

Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de infectar activamente una gran diversidad de insectos, están ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas por lo que se pueden utilizar para el control de plagas insectiles, son inocuos para animales de sangre caliente, plantas y demás componentes del ecosistema y tiene la capacidad de desarrollar epizootias en la poblaciones de insectos plagas (España, 2000).

Existen dos órdenes de hongos entomopatógenos de importancia como controladores biológicos de plagas. El orden hipocreales, que pueden ser usados en estrategia de inundación o de inoculación. La estrategia por aumento (inundación), que es a corto plazo, donde un gran número de conidias son liberadas para controlar de manera relativamente rápida la población plaga. Estos hongos tienen un alto potencial como agentes de control biológico en forma inundativa, ya que por su hábito de nutrición y características reproductivas son fáciles de reproducir masivamente en medios naturales y de ser formulados para luego ser aplicados con equipos convencionales. Contrario a los hongos del orden Entomophthorales, que son relativamente difíciles de producir y las conidias tienen vida corta, por lo que su estrategia de uso es en control biológico por conservación. Esta estrategia, considera la manipulación del medio ambiente (manejo cultural) para favorecer la persistencia e incremento de microorganismos que ocurre en forma natural o introducidos (Alatorre, 2010).

En América Latina los hongos entomopatógenos (hipocreales) son usados mediante las estrategias de inoculación e inundación. El propósito de las aplicaciones aumentativas (inundativas) es inducir epizootias en el campo (Harper, 1987). Esta estrategia de uso hongos entomopatógenos implica que el agente de control tiene que ser producido y preparado masivamente de modo que pueda ser utilizado exitosamente como una medida efectiva de control en formulaciones comerciales. El uso de cepas nativas es importante, ya que son cepas adaptadas a las condiciones ambientales de la región para el control de una plaga determinada, siendo un factor fundamental para el éxito de este tipo de control (García y González, 2010). Además es necesario desarrollar formulaciones adecuadas para reducir la pérdida de viabilidad, aumentar la permanencia o estabilidad de los hongos entomopatógenos y permitir un fácil manejo y aplicación en el campo, ya que por su naturaleza los agentes microbiales pueden ser afectados por condiciones ambientales durante y después de la aplicación (Alatorre, 2010).

B. bassiana (orden hipocreales) ha sido encontrado atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de mucha importancia agrícola (Alves, 1998). Li (1988) afirma que *B. bassiana* es un hongo con amplio rango de infestación reportándose hasta 707 especies de insectos afectadas en cambio Carballo y Guaharay (2004) afirman que afectan a 700 especies de insectos reunidas en 100 géneros, siendo esta característica importante para ser usados en programas de control biológico. Este hongo entomopatógeno es el enemigo natural más conocido de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) principal plaga de este cultivo en todo el mundo y que ocasiona pérdidas millonarias (Neves & Hirose, 2005). También este hongo se ha encontrado infectando larvas, pupas y adultos de *P. xylostella* cuando las esporas entran en contacto con el insecto (CATIE/UNA, 1999). Además se ha encontrado atacando especies de insectos como: *Cosmopolita sordidus*, *Anthonomus eugenii*, *Bemisia tabaci* y plagas de suelo.

A pesar de la importancia que tiene *B. bassiana* como agente de control biológico, su ocurrencia natural generalmente es endémica y no es suficiente para lograr un completo control de las plagas, de modo que la incidencia natural puede ser complementada con aplicaciones aumentativas de estos hongos. Se han desarrollado diversos métodos para la producción masiva de estos hongos, tanto a pequeña, como mediana y gran escala. Los métodos incluyen procesos de producción en medios líquidos, así como en sustratos sólidos, monofásicos y bifásicos, en la mayoría de los casos la meta es producir grandes cantidades de conidias de alta calidad y eficientemente; las cuales deben ser aplicadas directamente o ser formuladas adecuadamente para su posterior aplicación (Monzón, 2001).

Los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico al ser aplicados en el campo, son sensibles a la temperatura, humedad atmosférica y radiación solar, por ello deben ser formulados para proteger a las conidias y prolongar su persistencia en el campo. Los más utilizados para la fabricación comercial de micoinsecticidas son *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* (Faria y Wright, 2007). El desarrollo de una adecuada formulación es esencial para obtener un micoinsecticida efectivo debido a que los elementos constituyentes de la formulación impactan directamente en la viabilidad de las conidias del hongo (Mata, 2008). La longevidad de la conidia formulada depende del tipo de material utilizado y es más corta en la conidia seca no formulada (Morley-Davies, 1995, Hong et al., 2005). Se han desarrollado formulaciones sólidas y líquidas y normalmente están disponibles para insectos del follaje. En el caso de formulaciones sólidas las más comunes son polvos (10% de esporas y 90% de material sólido); gránulos, polvos mojables (Samson et al., 1988). El problema con estas formulaciones es que 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. Otro aspecto importante es que debido a que el ingrediente activo es un organismo vivo, el efecto de los componentes inertes de la formulación puede variar dependiendo del hongo a utilizar.

Samson *et al.*, (1988) afirman que un problema clave en la industria de productos a base de hongos entomopatógenos es su almacenamiento. En condiciones ambientales los hongos entomopatógenos pierden su viabilidad aproximadamente en un mes, sin embargo al elaborar productos a base de estos hongos se requiere almacenarlos por lo menos durante un año sin que se afecte su viabilidad. De modo que la única forma de lograr mantener productos a temperatura ambiente sin afectar su viabilidad es mediante la preparación de formulaciones adecuadas. Por tanto el desarrollo de sistemas de producción y formulación permiten contar con productos de la misma o mayor eficacia que los productos químicos, siendo uno de los requisitos para la aceptación y comercialización de un producto biológico su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento (Butt *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 2011). Esta característica se ve influenciada por factores externos como la temperatura, la humedad relativa y el tipo de empaque utilizado, lo que determina el tiempo durante el cual se mantienen las características iniciales del agente biológico y por lo tanto su actividad biocontroladora (Boyetchko & Hynes, 2006, Santos *et al.*, 2011).

Los agentes o componentes de la formulación deben tener propiedades adherentes y dispersantes y deben proteger al organismo de la disecación y de la degradación solar, antes y durante el proceso de germinación de la espora sobre el cuerpo del insecto a controlar (Most y Quinlan, 1986). Otros aspectos a considerar son aquellos relacionados a la relación costo-beneficio. Debido a estas consideraciones, para comercializar formulaciones de hongos entomopatógenos se requiere un adecuado control de calidad, tanto de las propiedades biológicas, como de las propiedades físicas. Para determinar la calidad de un producto elaborado a base de hongos entomopatógenos, es recomendable pruebas microbiológicas como: prueba de viabilidad, evaluación de concentración de conidias, así como la pureza del hongo.

En Nicaragua a pesar que se han seleccionado cepas de *Beauveria bassiana* efectivas para el control de plagas importantes como la palomilla del repollo (*P. xylostella*), la broca de café (*H. hampei*) picudos de chiltoma (*A. eugenii*) y picudos de plátano (*C. sordidus*), pero no se han desarrollado formulaciones comerciales a partir de dichas cepas, por lo que el uso de las mismas no se ha optimizado. Por lo tanto el propósito del presente trabajo es desarrollar formulaciones a base de *B. bassiana*, que garanticen la estabilidad y calidad de estos productos biológicos para ser comercializados, almacenados y usados exitosamente para el control de plagas.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Contribuir al desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana* usando materiales locales para el manejo de insectos plaga

2.2. Objetivos específicos

Determinar la viabilidad y concentración de conidias de *B. bassiana* en formulaciones bioplaguicidas durante seis meses de almacenamiento

Determinar la durabilidad de formulaciones a base de *B. bassiana*, utilizando materiales inertes sólidos y líquidos, almacenado en condiciones ambientales

Evaluar formulaciones a base de conidias de *B. bassiana* en campo sobre población de *Plutella xylostella*, *Leptophobia* sp y *Diabrotica* sp y áfidos en el cultivo de repollo

Evaluar el efecto que tienen los productos bioplaguicidas formulados, sobre el rendimiento y rentabilidad del cultivo de repollo

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

Este estudio se desarrolló en dos fases: Una fase de laboratorio durante seis meses de evaluación y que se ejecutó en el laboratorio de hongos entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria km 12 y ½ carretera norte y una fase de campo que se realizó en la finca El Tisey, del Sr. Dimas Cerrato, ubicada a 146 km al norte de Managua y a 14 km de la ciudad de Estelí carretera sur-oeste, La Estanzuela-San Nicolás. El experimento se estableció en la época de postrera durante los meses de octubre a diciembre 2009 a enero del 2010.

El estudio consistió en la preparación y evaluación de diferentes tipos de formulaciones a base del hongo *Beauveria bassiana*. En la fase de laboratorio se llevó a cabo la reproducción masiva del hongo, se determinó la viabilidad y concentración de las conidias para preparar las formulaciones y en la fase de campo se evaluó la efectividad de las formulaciones para el manejo de *Plutella xylostella*, *Leptophobia* sp, *Diabrotica* sp y áfidos en el cultivo del repollo.

3.2 Fase de laboratorio

Esta fase consistió en la reproducción masiva del hongo en arroz grano entero como sustrato, mediante el método de producción semi-industrial, realizando control de calidad en cada una de las fases del proceso de producción. Posteriormente se hizo la evaluación del efecto de diferentes materiales inertes sólidos y líquidos sobre la estabilidad de la formulación, la viabilidad y concentración de las conidias de *B. bassiana* en condiciones de temperatura ambiente aproximadamente de 24 a 28 °C y humedad relativa de 80 a 90 % aproximadamente.

3.2.1 Obtención del hongo

El hongo utilizado fue *B. bassiana* cepa 114. Esta cepa fue aislada de Broca del café (*Hypothenemus hampei*) procedente de San Juan de Rio Coco (Madriz) y se encuentra preservada en silica gel y en medios de cultivos conservada en refrigeración a 4 °C en el laboratorio de hongos entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Para la reproducción del hongo se desarrolló el sistema de producción semi-industrial, iniciando desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto. En la etapa de cepario se realizó el aislamiento de la cepa y la obtención del cultivo puro. En la etapa de producción se realizó la preparación del sustrato (arroz) en erlenmeyer de 500 ml y en bolsas de polipropileno de 20 cm por 33 cm, inoculación e incubación de matrices y bolsas del hongo, posteriormente el secado en bandeja, la cosecha (separación del hongo del sustrato) y la preparación de las formulaciones (Anexo 5).

3.2.2 Preparación y evaluación de formulaciones

En esta fase se prepararon las formulaciones y se evaluó el efecto de los componentes inertes utilizados en cada formulación sobre la viabilidad y concentración de las conidias de *B. bassiana* en condiciones de temperatura ambiente. Los tratamientos que se evaluaron fueron las diferentes formulaciones presentadas en el cuadro 1. Las proporciones de los materiales utilizados fueron de 1:10 (1g de conidias de *B. bassiana* por 9g de material inerte), similar a las proporciones utilizadas en un estudio por García y González (2010), donde utilizaron bioinsecticidas para el control de plagas en hortalizas.

3.2.3 Tratamientos evaluados

Los tratamientos evaluados consistieron en formulaciones a base de conidias de *B. bassiana* en dosis de 1.7×10^{12} conidias/ha, para formulación líquida y sólidas. Las formulaciones consistieron en la mezcla de conidias de *B. bassiana* con materiales inertes, para la formulación líquida (Aceite Sunspray 6E) y para la formulación sólida (arcilla verde, arcilla blanca, talco y leche en polvo) en iguales proporciones para cada tipo de formulación. La formulación líquida se preparó en presentación de 400 ml, en recipiente plástico, color oscuro. Las formulaciones sólidas se prepararon en presentación de 200 g en sobres de papel con forro interno de aluminio. Los productos formulados, se colocaron muestras de todos los tratamientos en condiciones de temperatura ambiente descrita anteriormente.

Cuadro 1. **Materiales inertes de formulaciones a base de conidias de *B. bassiana* evaluados en laboratorio**

Tratamiento	Formulación	Materiales inertes
1	Sólida	Arcilla Blanca
2	Sólida	Arcilla Verde
3	Sólida	Talco
4	Sólida	Leche en polvo
5	Líquida	Aceite Sunspray 6E
6 (Testigo)	Sólida	Hongo puro sin formular

Se establecieron tres repeticiones para cada formulación, cada repetición consistió en un envase/empaque. Para determinar la concentración y viabilidad de conidias se realizó dos lecturas por cada una de las repeticiones por cada tratamiento, posteriormente se promedió para obtener una lectura por cada tratamiento. Las lecturas o muestreos se realizaron mensual para cada tratamiento durante seis meses de evaluación.

3.2.4. Variables evaluadas

- Viabilidad de conidias (% de germinación)
- Concentración de conidias/g

La evaluación de la viabilidad y concentración de conidias se determinó a partir de las formulaciones preparadas, obteniendo un promedio de una lectura inicial y luego por promedios de lecturas mensuales durante seis meses. La lectura inicial se realizó al momento de empacar/envasar las formulaciones, posteriormente se realizó una lectura mensual durante seis meses para cada tratamiento.

La concentración de conidias se determinó mediante la metodología descrita por French & Hebert (1988). Se tomó un gramo de la formulación preparada, el cual se colocó en un tubo de ensayo con 9ml de agua destilada estéril, posteriormente se realizaron diluciones en serie hasta obtener la dilución 10^{-4} a partir de la cual se realizó el conteo de las conidias. El conteo se realizó utilizando un microscopio de luz y una cámara Neubauer, después de realizado el montaje en la cámara se dejó reposar durante cinco minutos. El número de conidias por ml se obtuvo multiplicando el total de conidias observadas por el factor de conversión de la cámara y por el factor de la dilución (Vélez *et al.*, 1997, Monzón, 2001).

$$\text{No. de conidias/g} = \text{No. de conidias} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Factor de cámara}$$

Para la prueba de viabilidad de las conidias, previamente se prepararon platos de Petri, colocando en el fondo papel filtro y sobre este se ubicaron dos porta objetos. Posteriormente se preparó el medio agar-agua (2%) y se esterilizaron en la autoclave a 1,2 bares de presión y 121 °C durante 20 minutos. Seguidamente con una micropipeta se depositaron dos gotas del medio en cada extremo del porta objeto, luego a partir de la dilución 10^{-4} con otra micropipeta se tomó una gota de la suspensión 10^{-4} y se depositaron sobre el medio de agar-agua. Después este montaje se colocó en cámara húmeda y se mantuvo a temperatura 24 - 28 °C. Las lecturas se realizaron a las 24 horas después de realizado el montaje (UNA, 2000).

El conteo de viabilidad se realizó utilizando un microscopio luz 40X. La viabilidad de conidias se determinó contando el número de conidias germinadas y el número de conidias no germinadas, observando al menos 200 conidias en tres repeticiones por muestra de cada producto formulado, considerando germinadas aquellas conidias cuyo tubo germinativo fuese al menos la mitad del diámetro de la conidia (Inglis y Goettel 1997; Velez *et al.*, 1997, Rosas, 1999). A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de conidias germinadas utilizando la siguiente fórmula: (Rivera 1993, Monzón, 2001).

$$\text{Viabilidad de conidias (\%)} = \frac{\text{Número de conidias germinadas}}{\text{Número total de conidias evaluadas}} \times 100$$

Las seis formulaciones elaboradas fueron evaluadas en campo para el manejo de *P. xylostella*, *Leptophobia* sp, *Diabrotica* sp y Áfidos en el cultivo del repollo.

3.3 Fase de campo

El experimento se realizó en época de postrera, en la finca El Tisey, ubicada a 146 km al norte de Managua y a 14 km de la ciudad de Estelí carretera sur-oeste, La Estanzuela-San Nicolás. La precipitación promedio anual fue de 1300 mm y altitud de aproximadamente 1200 msnm y con temperaturas de 22 a 28 °C y humedad relativa de 60 a 80 % donde se realizó el estudio.

3.3.1 Preparación del semillero de repollo

El semillero se estableció en invernadero con malla anti-áfidos; se utilizaron bandejas de 96 depósitos con medidas de 53 cm de largo, ancho 32 cm y 7 cm de alto, las que fueron colocadas en bancos con una altura de 0.5 m. El sustrato que se utilizó para la siembra fue lombri-humus y la variedad de repollo fue Green Boy. El manejo fitosanitario de plagas y enfermedades en invernadero fue muy bajo y no fue necesario aplicaciones de productos.

3.3.2 Establecimiento y manejo del cultivo

El manejo agronómico del cultivo se realizó de acuerdo a las prácticas de manejo que utiliza el productor, la que consiste en la preparación del suelo, mediante una limpieza manual (machete y azadón), se realizó un pase de grada y un pase de arado.

El trasplante se realizó a los 25 días después de la germinación en bandejas, seleccionando las plantas sanas y vigorosas. Se aplicó fertilizante completo 12-30-10 al momento del trasplante. Además se realizaron dos fertilizaciones edáficas con urea (46%), la primera aplicación fue a los 25 días después del trasplante (ddt) y la segunda aplicación fue a los 45 ddt. Se hicieron dos aplicaciones de fertilizante foliar con Foscal® en dosis de 3 L/ha a los 30 y a los 45 días después del trasplante. Todas estas prácticas se realizaron de igual forma para todas las parcelas a como lo hace tradicionalmente el productor.

El manejo fitosanitario de plagas, enfermedades fue mediante prácticas de manejo integrado que realiza el productor, principalmente basada en la aplicación de fertilizante completo y foliar además urea 46 % proporcionando a la planta los requerimientos nutricionales que la hacen más resistente al daño y el manejo de malezas en el cultivo fue mediante la preparación de suelo con un pase de arado y grada, posteriormente se realizaron limpieza manual en combinación con el aporque a los 25 y 45 días después del trasplante.

La distancia entre planta y entre surco fue de 0.5 m, obteniendo 108 plantas por parcela para un total de 40,000 plantas por ha.

3.3.3 Diseño experimental

El experimento se estableció en bloques completos al azar (BCA) con seis tratamientos y tres réplicas, para un total de 18 unidades experimentales de 27m² cada una. Los tratamientos evaluados fueron las mismas formulaciones evaluadas en la fase de laboratorio (Cuadro 1).

La dosis utilizada fue equivalente a 1.7×10^{12} conidias por hectárea. Se realizaron dos aplicaciones en serie, cada serie consistió en tres aplicaciones, con un intervalo de cuatro días entre cada aplicación. La primera serie de aplicación se realizó a los 20 días después del trasplante (CATIE/UNA, 1999) y la segunda aplicación seriada fue a los 45 ddt. Los tratamientos fueron aplicados sobre las parcelas respectivas, realizando las aplicaciones por la mañana usando una bomba de mochila de 20 litros.

3.3.4 Método de muestreo

En cada parcela experimental se muestrearon diez plantas seleccionadas al azar, utilizando el método de muestreo visual para un total de 180 plantas muestreadas en todo el experimento. Cada planta seleccionada para el muestreo fue revisada por completo, tanto en el haz como en el envés, registrando el número de insectos de cualquier estado de desarrollo encontrado (Anexo 16).

El muestreo se realizó semanalmente, iniciando una semana después del trasplante, finalizando una semana antes de la cosecha.

3.3.5 Variables evaluadas

- Número de *P. xylostella* por planta
- Número de *Leptophobia* sp por planta
- Número de *Diabrotica* sp por planta
- Número de Áfidos por planta
- Número de Arañas por planta
- Número de cabezas de repollo comerciables
- Peso de cabezas de repollo en kg

3.3.6 Cosecha

La cosecha fue manual y se realizó aproximadamente a los 105 días después del trasplante, cortando las cabezas que estaban firmes, compactas y que presentaran el color verde característico de la variedad y con una buena apariencia. La calidad del repollo se clasificó de acuerdo a la descripción de Garay y Rueda (2007) (Cuadro 2).

Cuadro 2: Cabezas de repollo comerciáveis de acuerdo a la descripción de la calidad propuesta por Garay y Rueda (2007).

Calidad	Descripción de la calidad
Repollo A	Excelente calidad: No es necesario deshojarlo para comercializarlo ya que no presentó daño visible por causa de plutella, con diámetro mayor a 20 cm.
Repollo B	Calidad media: Es necesario eliminarle algunas hojas que presentan agujeros causados por plutella, para poder comercializarlo. Diámetro menor a 20 cm. El precio es 20 – 30% menor que los repollos de calidad A.
Repollo C	Mala calidad: Diámetro menor a 15 cm después de eliminarle hojas dañadas por plutella. Repollos con esta calidad no tienen valor económico en el mercado

3.3.7 Análisis económico de los tratamientos evaluados (CYMMIT, 1988)

Presupuesto parcial de los tratamientos evaluados

Es un método que se utiliza para organizar los datos experimentales con el fin de obtener los costos y beneficios de los tratamientos evaluados. El presupuesto parcial es una forma de calcular el total de los costos que varían y los beneficios netos de cada tratamiento de un experimento en una finca, así mismo incluye los rendimientos medios, rendimientos ajustados y el beneficio bruto de campo (CIMMYT, 1988).

Se tomaron los datos de rendimiento promedio ($R\chi$) por tratamientos y se obtuvo el rendimiento ajustado ($R_{ajust}=10\%$ de $R\chi$), luego se calculó el beneficio bruto multiplicando, el R_{ajust} por el precio de venta en el campo. Para la sumatoria de los costos totales que varían, se estimó los costos de los bioplaguicidas evaluados más el costo de aplicación de los mismos. Para obtener el beneficio neto, se restó los costos totales que varían al beneficio bruto de cada tratamiento respectivamente.

Análisis de dominancia de los tratamientos evaluados

El análisis de dominancia se efectúa, primero, ordenando los tratamientos de menor a mayor total de costos que varían. Se dice entonces que un tratamiento es dominado cuando tiene beneficios netos menores o iguales a los de un tratamiento de costos que varían más bajos. Con los rendimientos obtenidos y el precio de la cosecha en el campo, se determinó el ingreso bruto y los costos reales específicos para cada tratamiento, se realizó el análisis económico para cada uno de los tratamientos.

Tasa de retorno marginal de los tratamientos evaluados

Resulta de la división del beneficio neto marginal (el aumento en beneficios netos) y el costo marginal (aumento de los costos que varían), expresada en porcentaje, la tasa de retorno marginal indica, que por cada unidad monetaria que se invierte en adquirir y aplicar un determinado producto en un determinado cultivo, el agricultor recupera la unidad monetaria invertida en dicha actividad, además de obtener unidades monetarias adicionales.

Comparación del rendimiento total (kg/ha) de las parcelas de repollo en los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla verde, *B. bassiana* +Arcilla blanca, *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E, *B. bassiana* +Talco, *B. bassiana* +Leche en polvo y producto no formulado evaluados en el Tisey, Estelí.

En la figura 8, se presentan los promedios de los rendimientos en kg/ha, donde *B. bassiana* +Arcilla verde obtuvo 32,933.32 kg/ha, *B. bassiana* +Arcilla blanca 25,814.50 kg/ha, *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E 33,295.55 kg/ha, *B. bassiana* +Talco 28,332 kg/ha, *B. bassiana* +Leche en polvo 19,562.86 kg/ha y el producto no formulado con 35,618.76 kg/ha,

Presupuesto parcial (U\$) de los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla verde, *B. bassiana* +Arcilla blanca, *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E, *B. bassiana* +Talco, *B. bassiana* +Leche en polvo y producto no formulado evaluados en el Tisey, Estelí.

A través de un análisis económico, se comparó los tratamientos evaluados para el manejo de *P. xylostella* y otras plagas que afectan al cultivo del repollo, aplicando la metodología CIMMYT (1988). En el cuadro siguiente, se presenta el presupuesto parcial, donde se observa que los mayores costos variables se obtuvieron en los tratamientos *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E con U\$/ha 11.24 y en el tratamiento *B. bassiana* +Talco con U\$/ha 10.34. El tratamiento con menor costo variable fue el producto no formulado con U\$/ha 7.35 seguido por los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla verde y *B. bassiana* +Arcilla blanca, con U\$/ha 7.41 respectivamente. Los mayores beneficios neto se obtuvieron en el producto no formulado con U\$ 23,394.18/ha.

Cuadro 3. Presupuesto parcial (U\$) de los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla verde, *B. bassiana* +Arcilla blanca, *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E, *B. bassiana* +Talco, *B. bassiana* +Leche en polvo y Producto no formulado evaluados en el Tisey, Estelí.

Conceptos	Arcilla verde	Arcilla blanca	Aceite sunspray	Talco simple	Leche en polvo	No formulado
Rendimiento						
Promedio kg/ha	32,933.16	25,814.50	33,295.55	28,332.00	19,562.86	35,618.76
Rend. Ajustado 10% kg/ha	29,639.84	23,233.05	29,966.00	25,498.80	17,606.57	32,056.88
Beneficio bruto U\$/ha	21,637.09	16,960.13	21,875.18	18,614.12	12,852.80	23,401.53
Precio de venta en el campo U\$/kg	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
Costo total de materiales usados en las formulaciones U\$/ha						
Cantidad utilizada kg/ha o litros/ha	0.18	0.18	0.4	0.18	0.18	0.2
Precio de material inerte U\$/kg o U\$/litro	1.5	1.5	10	20	15	1.03
Precio del empaque o envase U\$/ha	0.14	0.14	0.24	0.14	0.14	0.14
Precio de una dosis U\$/ha	7	7	7	7	7	7
Costos Variables Totales	7.41	7.41	11.24	10.74	9.84	7.35
Costos Fijos Totales U\$/ha	77	77	77	77	77	77
Costos Totales U\$/ha	84.41	84.41	88.24	87.74	86.84	84.35
Beneficio Neto U\$/ha	21,629.68	16,952.72	21,863.94	18,603.38	12,842.96	23,394.18
Precio oficial del dólar: 1 U\$ = C\$ 27.34 (Agosto, 2015). Fuente: Banco Central de Nicaragua.						
Precio promedio del producto en el campo (0.73 U\$/kg)						

Análisis de dominancia de los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla verde, *B. bassiana* +Arcilla blanca, *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E, *B. bassiana* +Talco, *B. bassiana* +Leche en polvo y Producto no formulado evaluados en el Tisey, Estelí.

Después de haber realizado el presupuesto parcial, para identificar los costos variables de los tratamientos evaluados, se procedió a ejecutar el análisis de dominancia. El ordenamiento de los tratamientos inició con el tratamiento producto No formulado ya que presentó el menor de costo variable y el más alto beneficio neto, luego los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla verde y *B. bassiana* +Arcilla blanca, *B. bassiana* +Leche en polvo, *B. bassiana* +Talco y *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E que presentaron los mayores costos variables. El análisis indicó que los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla blanca, *B. bassiana* +Aceite sunspray, *B. bassiana* +Leche en polvo y *B. bassiana* +Talco simple y *B. bassiana* +Arcilla verde resultaron dominados por el producto No formulado.

Cuadro 4. Análisis de dominancia de los tratamientos *B. bassiana* +Arcilla verde, *B. bassiana* +Arcilla blanca, *B. bassiana* +Aceite sunspray 6E, *B. bassiana* +Talco, *B. bassiana* +Leche en polvo y producto no formulado evaluados en el Tisey, Estelí.

Tratamientos	Costos Variables U\$/ha	Beneficio neto U\$/ha	Categoría
Producto No formulado	7.35	23,394.20	ND
<i>B.bassiana</i> +Arcilla Verde	7.41	21,629.68	D
<i>B.bassiana</i> +Arcilla Blanca	7.41	16,952.72	D
<i>B.bassiana</i> +Leche en polvo	9.84	12,842.96	D
<i>B.bassiana</i> +Talco simple	10.74	18,603.38	D
<i>B.bassiana</i> +Aceite Sunspray	11.24	21,863.94	D

ND: No dominado

D: Dominado

El análisis de dominancia de los tratamientos evaluados muestra que el producto no formulado es no dominado al presentar el menor costo variable con el más alto beneficio neto no siendo superado por ninguno de los otros tratamientos que fueron dominados, por lo tanto el análisis de dominancia excluye a los tratamientos dominados para el **Análisis tasa de retorno marginal (TRM)** debido a sus bajos beneficios netos.

En el cuadro 4 del análisis de dominancia muestra que entre los tratamientos dominados *B.bassiana* +Arcilla verde y *B.bassiana* +Aceite sunspray presentan mayores beneficios netos debido que el rendimiento obtenido es suficiente para compensar el incremento de los costos. Aunque para aumentar los ingresos del productor es importante centrarse en los beneficios netos y no en los rendimientos (CYMMIT, 1988). Es decir que el productor puede utilizar estos tratamientos para el manejo de plagas en el cultivo del repollo y que, en termino de durabilidad y viabilidad estos tratamientos formulados son mejores que el producto no formulado que presenta menor viabilidad y durabilidad.

Según CYMMIT, 1988; no tiene sentido hablar de la tasa de retorno marginal de un tratamiento en particular, ésta es más bien una característica de cambiar de un tratamiento a otro. Debido a que los tratamientos dominados no se incluyen en el análisis marginal y la tasa de retorno marginal siempre será positiva.

3.4 Análisis de los datos

Los datos de laboratorio (viabilidad, concentración de conidias) fueron analizados de forma descriptiva. Los datos de campo, incidencia de *P. xylostella*, *Diabrotica* sp, *Leptophobia* sp y peso de cabeza, número de cabezas comerciables, fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANDEVA) de acuerdo al diseño utilizado (BCA). Antes del análisis los datos fueron transformados mediante ($\sqrt{x + 0.5}$). Además se realizó separación de medias por Tukey ($\alpha=0.05$). Los datos fueron analizados mediante el programa SAS.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de laboratorio

4.1 Concentración de conidias de *B. bassiana* en las formulaciones

Los resultados obtenidos en laboratorio de las diferentes formulaciones bioplaguicidas para la concentración de conidias durante seis meses en condiciones de temperatura ambiente, muestran que en general la concentración de conidias es similar en todas las formulaciones y que se mantiene constante a través del tiempo.

Todas las formulaciones mantuvieron la concentración de conidias de manera constante, lo que indica que los materiales inertes no afectan significativamente la concentración de conidias. A los seis meses, el producto formulado con arcilla verde presentó la mayor concentración con $2,45 \times 10^{11}$ conidias/g de producto formulado en cambio el producto no formulado presentó la menor concentración con $2,39 \times 10^{11}$ conidias/g. El tratamiento *B. bassiana* sin formular inició a disminuir concentración a partir del segundo mes de evaluación, en cambio los productos formulados se observa disminución en la concentración a partir del tercer mes a excepción del formulado *B. bassiana* más arcilla verde. Posteriormente todos los productos formulados muestran ligera disminución de la concentración a partir de los meses cinco y seis. En relación al número de conidias/g iniciales, estos resultados obtenidos en los seis meses de evaluación, se consideran adecuadas para la formulación y aplicación del producto en el campo (**Figura 1**).

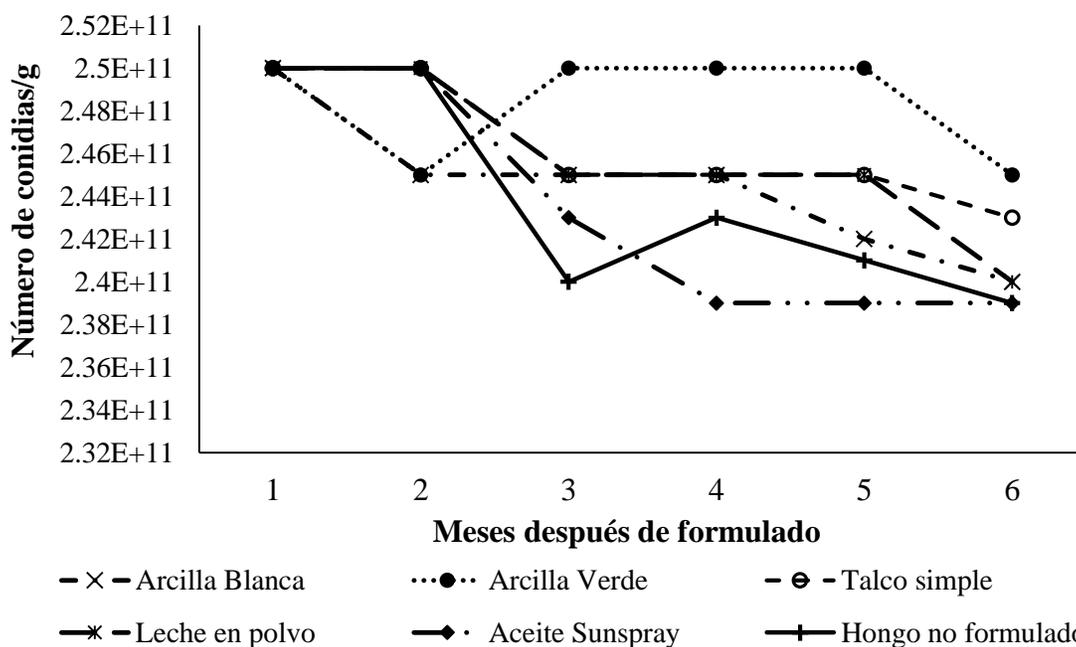


Figura 1: Concentración de conidias de *B. bassiana* formuladas con materiales inertes sólidos y líquido durante seis meses de evaluación

Estos resultados obtenidos de la concentración de conidias de *B. bassiana* en los productos formulados almacenado en laboratorio en condiciones ambientales, son similares con los resultados obtenidos por Harcourt *et al.*, (1990); McDonald y Nolan, (1995), afirmando que las condiciones ambientales son factores determinantes para la producción de conidias, aunque esto se menciona para aislamientos de otras especies de hongos entomopatógenos. Estos factores son confirmados por otros investigadores. Aliaga *et al.*, (2009) donde evaluaron en condiciones de laboratorio la cepa de *B. bassiana* CBLE-265, SENASA a una concentración de 7×10^9 y 2×10^{10} conidias/gramos de *B. bassiana* para el control de *S. frugiperda*, no tuvo ningún efecto sobre los primeros estadios larvales, por lo que la cepa no fue adecuada para la plaga. Sin embargo, investigación realizada por Cocom, *et al.*, (2006) donde evaluó cepas de *B. bassiana* (BAZAM®) para *S. frugiperda* lograron una mortalidad de 90 % con la concentración de 7×10^8 conidias/g, esto se debe a que la cepa utilizado era más patogénica y virulenta a *S. frugiperda*. Lecuona y Díaz (1996), afirma que el sustrato o insecto en el cual se reactiva el hongo entomopatógeno influye mucho en la virulencia hacia la plaga; mencionando que la cepa *B. bassiana* CBLE-265 no fue reactivada en *S. frugiperda*; mientras que la cepa de *B. bassiana* (BAZAM®) fue reactivada para *S. frugiperda*.

Los resultados obtenidos por estos investigadores confirman la importancia que tiene la reactivación del hongo en sustrato o en el insecto para obtener conidias de hongo que sea virulenta y patogénica y en nuestro estudio la selección del sustrato para la reproducción masiva del hongo *B. bassiana*, fue unos de los factores importantes para que la concentración del producto formulado se conservará la concentración por un periodo de seis meses de evaluación (**Figura 1**) aunque también fue determinante factores como la temperatura y humedad relativa.

4.2 Viabilidad de conidias de *B. bassiana* en las formulaciones

Los resultados obtenidos en laboratorio muestran que en general la viabilidad de conidias tiene un comportamiento similar en todas las formulaciones, y tiene una tendencia a disminuir en el tiempo manteniendo esa tendencia durante los seis meses de evaluación (**Figura 2**). Todas las formulaciones mantuvieron la viabilidad de conidias de manera constante durante tres meses excepto en el producto no formulado que empezó a disminuir la viabilidad a partir del segundo mes y posteriormente los formulados y el producto no formulado presentan una ligera disminución en los siguientes tres meses, lo que indica que los materiales inertes no afectan significativamente la viabilidad de conidias.

Los productos formulados con arcilla verde y aceite sunspray presentaron los mejores resultados con 82 % de viabilidad de conidias a los seis meses; en cambio el producto no formulado presentó la menor viabilidad de conidias con 76 %. El tratamiento *B. bassiana* sin formular empieza a disminuir la viabilidad a partir del segundo mes de estudio, en cambio los productos formulados se observa disminución en la viabilidad a partir de los meses cuatro, cinco y seis, pero se consideran adecuadas para la formulación, aplicación del producto y para

almacenamiento a temperatura ambiente de aproximadamente de 24 a 28 °C en laboratorio durante seis meses (**Figura 2**).

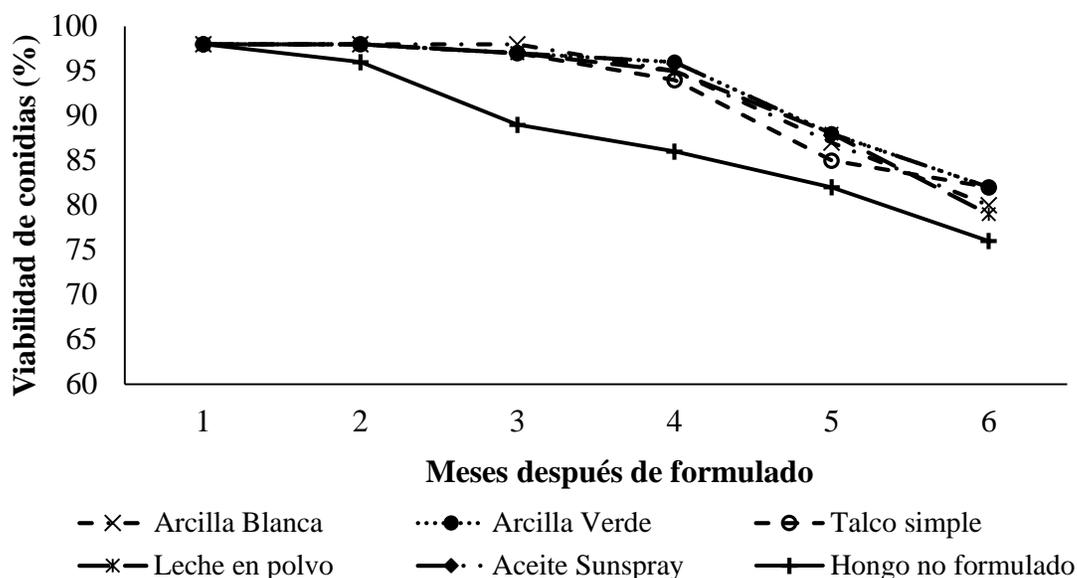


Figura 2: Viabilidad de conidias (%) de *B. bassiana* formuladas con materiales inertes sólidos y líquido durante seis meses de evaluación

Godoy *et al.*, (2007) realizó un estudio donde determina la temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* y encontró mayor cantidad de esporas a 100% de humedad relativa y mayor esporulación en los medios de cultivos a 25°C y 30°C. Además la germinación de esporas presentó el mayor porcentaje de germinación a 25°C y con diferencias significativas entre aislamientos. Por tanto, *Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que tolera un rango amplio de temperatura y humedad relativa, lo que explica la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes áreas edafo-climáticas. Un estudio realizado por Ortiz *et al.*, (2011), afirma que el sustrato como fuente de alimento es importante tanto en la velocidad de desarrollo como en la virulencia de los hongos. Al igual que la germinación, la formación de esporas (conidias), es importante para que los hongos se establezcan en un lugar y así propiciar una epizootia, aunque esto depende de varios factores, donde la temperatura juega un papel prioritario.

La formación de conidias está estrechamente relacionado con la temperatura, entre más baja la temperatura mayor el tiempo para que ocurra la formación de conidias. Alatorre *et al.*, (2011) afirma que, la prontitud de la germinación de las esporas de los hongos patógenos de insectos es fundamental para el uso en el manejo integrado de plagas, ya que es una etapa crítica en el desarrollo de estos hongos y en este aspecto la temperatura juega un papel importante. Tanada y Kaya (1993) señalan que la germinación de las esporas depende en gran parte de la humedad

ambiental y temperatura y en menor grado a las condiciones de luz y nutricionales. Gillespie (1988) afirma que el nivel de agua es determinante en el crecimiento de los hongos, y pequeñas diferencias en los niveles de humedad relativa después de la aplicación de conidias, pueden determinar de un modo u otro el éxito del hongo en el control de insectos plaga en el campo.

Fase de campo

Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de *B. bassiana* sobre la fluctuación poblacional de *Plutella xylostella*, *Letophobia* sp y *Diabrotica* sp en el cultivo del repollo

4.3 Fluctuación poblacional de *Plutella xylostella*

El ANDEVA realizado indica que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.18$), pero si se encontraron diferencias significativas entre fechas de muestreos ($P<0.0001$). A pesar que no se encontraron diferencias entre tratamientos, la menor incidencia de la plaga se observó en el tratamiento *B. bassiana* más aceite sunspray 6E, que tuvo un promedio de 0.34 plutella por planta, seguido por el tratamiento *B. bassiana* más leche en polvo con un promedio de 0.44 plutella por planta. La mayor población de plutella se observó en el tratamiento *B. bassiana* más arcilla blanca con un promedio de 1.03 insectos por planta (**Figura 3**). Los resultados obtenidos demuestran que la incidencia de *P. xylostella* se mantuvo relativamente bajo en todo el ciclo del cultivo, esto se debió a que las aplicaciones de los formulados a base de *B. bassiana* se realizaron en el momento oportuno, el uso de barrera viva con zacate King grass alrededor de la parcela impidió la entrada de la plaga y otro factor fue la presencia de enemigos naturales principalmente depredadores y parasitoides (arañas y avispas).

Investigaciones realizadas por Garay y Rueda (2007), comparando sistemas de manejo de *P. xylostella* encontraron en el sistema de Manejo Integrado de Plagas un 30% de parasitismo con *Diadegma insulare*. En cambio, Andrews (1984) encontró en Honduras niveles de parasitismo del 40% cuando se hace uso limitado de insecticidas y Miranda (2006) reporta niveles de parasitismo, de hasta 60% en el campo, en la misma zona donde se estableció el experimento, lo cual influyó en los bajos niveles de *P. xylostella* en el cultivo y por tanto el criterio de las aplicaciones de los productos formulados fue por debajo al criterio que amerita o justifica la medida de manejo de la plaga. En un estudio realizado por Bertolaccini *et al.*, (2010) sobre la incidencia de algunos factores naturales de mortalidad de *P. xylostella* en Argentina, registró una mortalidad del 59.37 % con parasitoides mientras que con entomopatógenos la mortalidad de forma natural fue del 11,08 %, lo que indica que el uso de hongos entomopatógenos en una estrategia inundativa es necesario para incrementar los niveles de parasitismo y mantener niveles bajos de incidencia de la plaga.

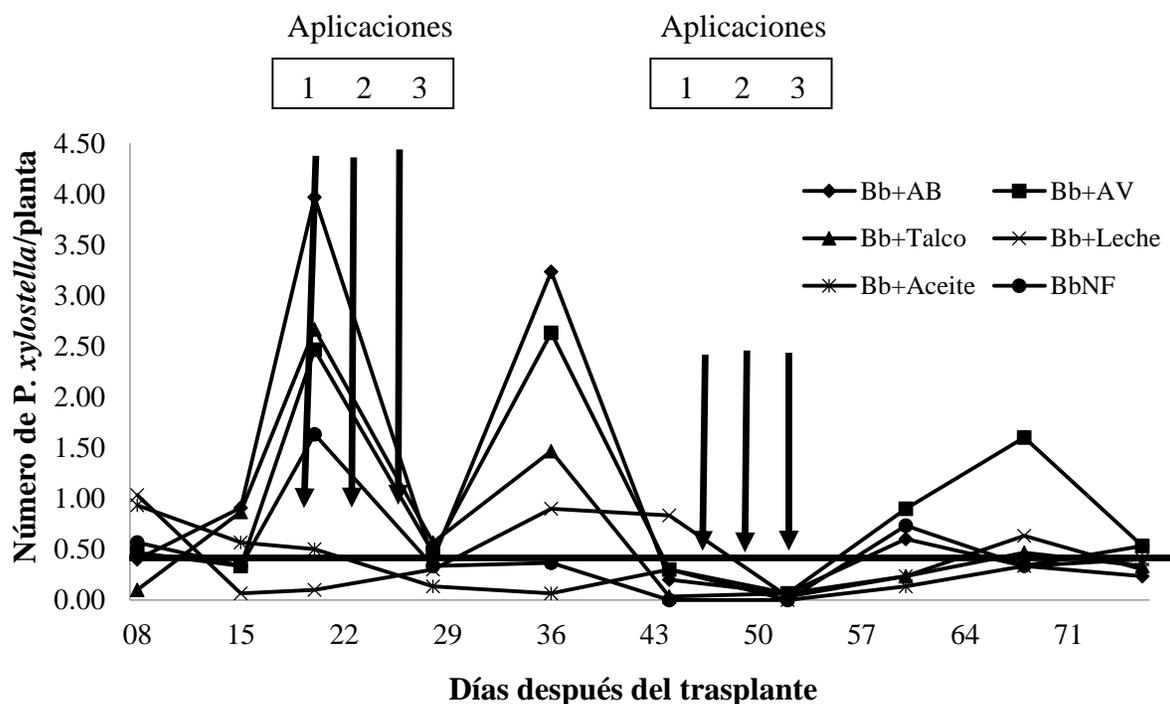


Figura 3: Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de *B. bassiana* sobre el número de *Plutella xylostella* en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí, 2009 – 2010

La mayor población de plutella se observó a los 20 y 36 ddt con un promedio de 1.88 y 1.44 plutellas por planta respectivamente. En cambio la menor población de la plaga se observó a los 52 ddt con un promedio de 0.03 insectos por planta (**Figura 3**). La mayor incidencia de *P. xylostella* a los 20 y 36 días después del trasplante ddt, se debió a la etapa fenológica del cultivo, ya que el crecimiento vegetativo, formación y llenado de cabeza, se considera el momento en que la plaga es más atraída por el cultivo, momento en el que además la consistencia de las hojas es suave siendo susceptible al daño por la plaga. Londoño y Jaramillo (1999) afirman que la incidencia de la palomilla del repollo aumenta en proporción directa con el desarrollo del cultivo y resultados encontrados por López (1997) observó que los incrementos en la población corresponden a las etapas de formación y llenado de cabeza.

La menor incidencia de la plaga se observó a los 52 ddt y esto se debió al momento de las aplicaciones que fueron iniciadas a los 20 días después del trasplante, momento antes a lo sugerido por López (1997), el cual sostiene que el manejo de la plaga deberá enfocarse a partir de la etapa de preformación de cabeza (28 días después del trasplante). Sánchez y Romero (2005) afirman que, en las primeras etapas de crecimiento del cultivo la plaga se encuentra en la fase de colonización y conforme aumentan los recursos disponibles se multiplica hasta alcanzar su población máxima durante la etapa del llenado de cabezas y por tanto la menor presencia de la plaga se registró a los 52 días después del trasplante.

Cuadro 5. Promedio de *P. xylostella* en los tratamientos evaluados

Tratamientos	Medias \pm ES	Categoría (Tukey, α: 0.05)
<i>B. bassiana</i> + Arcilla blanca	0.33 \pm 0.089	A
<i>B. bassiana</i> + Arcilla verde	0.44 \pm 0.118	A
<i>B. bassiana</i> + Talco	0.48 \pm 0.147	A
No formulado	0.68 \pm 0.261	A
<i>B. bassiana</i> + Leche	0.98 \pm 0.294	A
<i>B. bassiana</i> + Aceite sunspray	1.03 \pm 0.437	A

Error Estándar (**ES**):

Coefficiente de Variación (**C.V**): 34.95

R cuadrado (**R²**): 0.53

4.4 Fluctuación poblacional de *Leptophobia* sp

El ANDEVA realizado muestra que no existen diferencias significativas entre tratamientos (P : 0.1839), pero si hubo diferencias significativas entre fechas de muestreos ($P < 0.0001$). La menor incidencia de la plaga se presentó en el tratamiento *B. bassiana* + aceite sunspray 6E con un promedio de 0.03 insectos por planta, seguido por el tratamiento testigo (no formulado) con un promedio de 0.06. Los tratamientos que presentaron la mayor incidencia fueron *B. bassiana* más leche en polvo con un promedio de 0.61 insectos por planta, seguido por el tratamiento *B. bassiana* más arcilla blanca con un promedio de 0.49 insectos por planta (**Figura 4**). Jaramillo y Díaz (2006), afirman que los adultos de *Leptophobia* sp prefieren cultivos jóvenes para su colonización y establecimiento, por eso son plagas típicas en la etapa de desarrollo del cultivo donde la plaga alcanza la mayor población a como se aprecia en estos resultados (**Figura 4**).

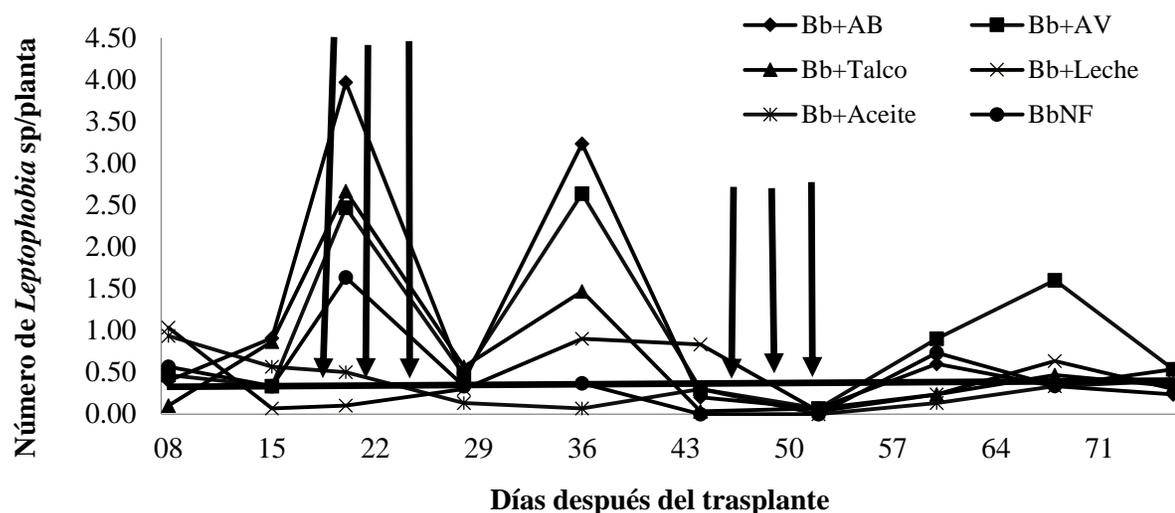


Figura 4: Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de *B. bassiana* sobre el número de *Leptophobia* sp en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí 2009 - 2010

Los niveles bajos de incidencia de la plaga se observó en los primeros 20 ddt y luego a 36 ddt con un promedio de 0.04 insectos por planta, y la mayor población de la plaga se registró a los 52 y 60 ddt con un promedio de 1.28 y 0.77 insectos por planta respectivamente (**Figura 4**). Según Sánchez y Romero (2005) el ataque de *Leptophobia* sp es más fuerte durante la época seca del año, el cual se asemeja con los resultados obtenidos en nuestro estudio donde la mayor incidencia ocurrió en la época seca. También afirma que en la etapa de establecimiento hasta la formación de la cabeza, el nivel crítico para tomar una medida de control es de una larva en 10 plantas de repollo, considerando otros aspectos como posibilidades de lluvia, bajas de temperatura, siendo similar al nivel crítico de incidencia tomado en nuestra investigación para realizar las aplicaciones de los tratamientos sobre la plaga.

Cuadro 6. Promedio de *Leptophobia* sp en los tratamientos evaluados

Tratamientos	Promedio ± ES	Categoría (Tukey, α : 0.05)
<i>B. bassiana</i> + Aceite sunspray	0.03 ± 0.018	A
No formulado	0.06 ± 0.020	A
<i>B. bassiana</i> + Arcilla verde	0.41 ± 0.345	A
<i>B. bassiana</i> + Talco	0.44 ± 0.173	A
<i>B. bassiana</i> + Arcilla blanca	0.49 ± 0.225	A
<i>B. bassiana</i> + Leche	0.61 ± 0.307	A

Error Estándar (ES):

Coefficiente de Variación (C.V): 28.48

R cuadrado (R²): 0.68

4.5 Fluctuación poblacional de *Diabrotica* sp

El ANDEVA realizado para la incidencia de la plaga *Diabrotica* sp muestra que existen diferencias significativas entre tratamientos (P: 0.0013) y entre fecha de muestreo (P<0.0008) lo que indica que al menos uno de los seis tratamientos evaluados difiere del resto. La menor incidencia de *Diabrotica* sp se registró en el tratamiento *B. bassiana* más arcilla blanca con un promedio de 0.06 insectos por planta seguido por el tratamiento *B. bassiana* más arcilla verde con un promedio de 0.14 insectos por planta. En tanto que la mayor incidencia se registró en el tratamiento *B. bassiana* más aceite sunspray 6E con un promedio de 0.26 insectos por planta seguido por el tratamiento *B. bassiana* más talco con un promedio de 0.19 insectos por planta (Figura 5).

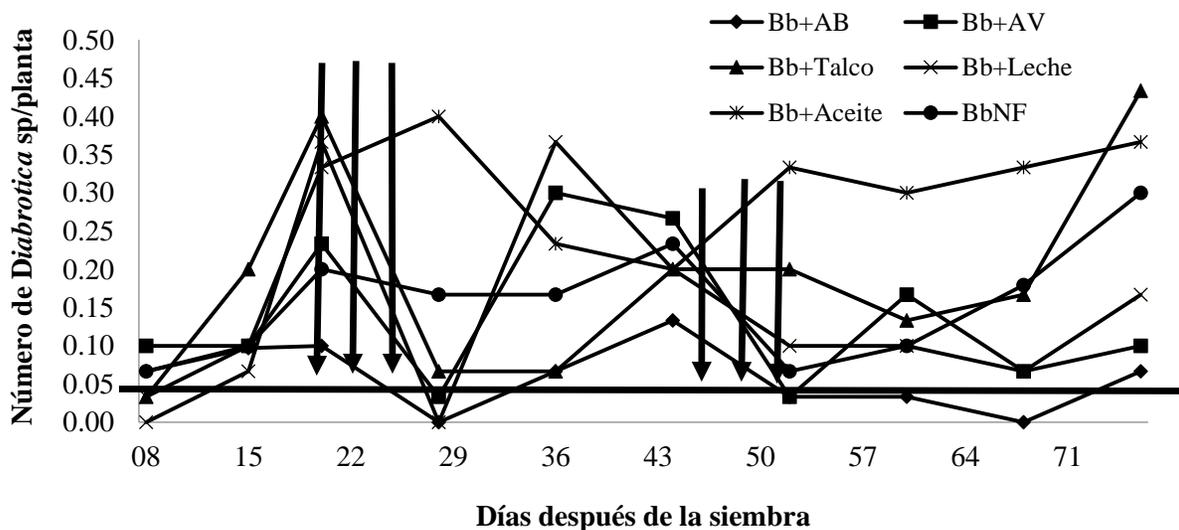


Figura 5: Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de *B. bassiana* sobre el número de *Diabrotica* sp en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí 2009 - 2010

La menor población de la plaga se observó a los 8 y 28 ddt con un promedio de 0.05 y 0.11 insectos por planta respectivamente y la mayor incidencia se presentó a los 20, 36 y 76 ddt con un promedio de 0.27, 0.20 y 0.23 insectos por planta respectivamente (Figura 5).

Los resultados de la formulación con aceite sunspray para el manejo de *Diabrotica* sp, resultó la menos efectiva debido a las características morfológica que presenta el adulto, como es la

curvatura y endurecimiento de los élitros impidiendo que las gotas del producto se adhieran y persistan sobre el insecto, contrario a los resultados obtenidos para el manejo de *Plutella* donde la formulación con aceite presentó los mejores resultados debido a las características morfológicas de la larva que facilita la adherencia y penetración de las gotas del producto sobre el cuerpo del insecto, además de influencia de factores ambientales y bióticos.

Estudio realizado con Alatorre (2006) que afirma que la protección de las conidias se logra mediante la mezcla de adherentes-dispersantes de tipo aceitoso o aquellos que facilitan que el ingrediente activo quede encapsulado, esto permite que las gotas finas impacten y persistan sobre los insectos; debido a que existen un complejo de procesos interactivos, tanto ambientales como bióticos que son necesarios para el desarrollo o inhibición de epizootias causadas por hongos entomopatógenos, incluyendo la sensibilidad a la radiación solar; antagonistas microbianos; comportamiento del hospedante, condiciones fisiológicas y edad; vigor y edad del patógeno; presencia de pesticidas; y temperatura, humedad y cantidad de inóculo apropiadas (Ferron *et al.*, 1991; Lacey y Goettel, 1995). Según estudio realizado por CESAVEQ (2013), afirma que en condiciones de temporal lluvioso hay mayor población porque el adulto emerge a los 6 a 10 días después que la larva empupa en la tierra, lo que se coincide con nuestro estudio donde las altas poblaciones se presentaron a los 20 y 36 ddt, también coinciden con la mayor población cuando no hubieron aplicaciones de los productos (**Figura 5**).

Cuadro 7. Promedio de *Diabrotica* sp en los tratamientos evaluados

Tratamientos	Promedio ± ES	Categoría (Tukey, α: 0.05)
<i>B. bassiana</i> + Arcilla blanca	0.06 ± 0.014	A
<i>B. bassiana</i> + Arcilla verde	0.14 ± 0.031	BA
<i>B. bassiana</i> + Leche	0.14 ± 0.042	BAC
No formulado	0.15 ± 0.024	BC
<i>B. bassiana</i> + Talco	0.19 ± 0.042	BC
<i>B. bassiana</i> + Aceite sunspray	0.26 ± 0.038	C

Error Estándar (**ES**):

Coefficiente de Variación (**C.V**): 11.18

R cuadrado (**R²**): 0.51

4.6 Fluctuación poblacional de Áfidos

Los datos obtenidos de incidencia de áfidos no fueron analizados estadísticamente por los niveles bajos presentados en todo el ciclo del cultivo. A pesar de la baja incidencia de áfidos, el tratamiento *B. bassiana* más aceite Sunspray presentó la menor incidencia con un promedio de 0.03 insectos por planta, en cambio la mayor incidencia se observó en el tratamiento *B. bassiana* más talco con un promedio de 0.27 insectos por planta. La menor incidencia presentada en la formulación con aceite sunspray muestra la efectividad de esta formulación contra áfidos y que se relaciona con un estudio realizado en México por Hernández (2007) donde evaluó formulaciones de hongos entomopatógenos en el pulgón café de los cítricos encontrando mortalidad altamente significativas donde los mejores tratamientos fueron los que incluyeron el aceite mineral (citrolina) y el polvo humectable, ya que causaron 95 y 94% de mortalidad, respectivamente, en condiciones de temperatura promedio de 29°C y humedad relativa promedio fue de 96%. Además encontró que los aceites tienen un efecto sinérgico cuando se combinan con microorganismos patógenos, incrementando su eficacia contra el insecto plaga en comparación con aplicaciones en agua (Womack *et al.*, 1996; Prior *et al.*, 1988).

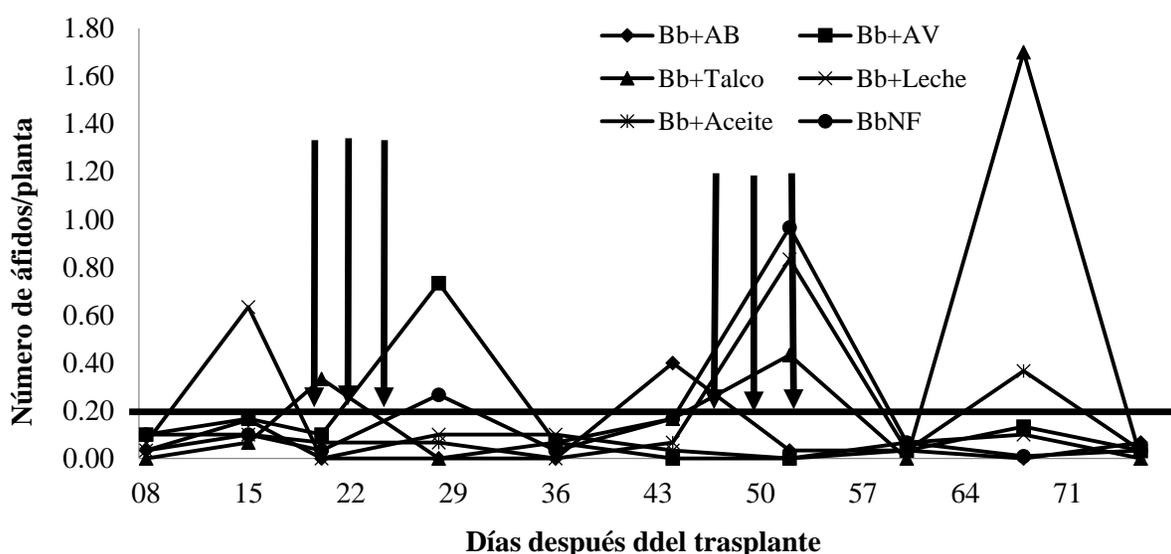


Figura 6: Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de *B. bassiana* sobre el número de Áfidos en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí 2009 - 2010

Las formulaciones con aceites emulsificables protegen a las conidias de la radiación UV y contra la desecación en condiciones de baja humedad relativa (Alatorre, 2006), durante y después de la aplicación en campo, lo cual es elemental para el éxito de los hongos entomopatógenos en el control de plagas (Daoust *et al.*, 1983; Bateman *et al.*, 1993; Geden *et al.*, 1995; Inglis *et al.*, 1995; Carballo, 1998; Ibrahim *et al.*, 1999; Lacey *et al.*, 2001; Shah y Pell, 2003). Además, el aceite asperjado fluye y se extiende sobre la cutícula del insecto, a diferencia de la aspersión en agua donde el hongo permanece en forma de gotas (Ibrahim *et al.*, 1999), permitiendo que las conidias del hongo sean depositadas en sitios donde se favorece su germinación e infección, lo

que posteriormente se reflejara en una mayor mortalidad del insecto (Geden *et al.*, 1995; Inglis *et al.*, 1995; Ibrahim *et al.*, 1999).

La menor incidencia de la plaga se presentó a los 36 y 60 ddt producto del efecto de las aplicaciones, en cambio la mayor incidencia se observó a los 52 y 68 ddt. Según Sánchez y Romero (2005), durante la etapa de establecimiento a preformación de cabeza, se recomienda que al encontrar 0,5 pulgones alados por planta o 0,4 colonias por planta es necesario aplicar medidas de control.

4.7 Fluctuación poblacional de Arañas

Los resultados obtenidos de incidencia de arañas no fueron analizados estadísticamente por los bajos niveles presentados en todo el ciclo del cultivo. Los tratamientos evaluados no tuvieron un efecto negativo sobre el número de controladores naturales (arañas) ya que las poblaciones se mantuvieron presentes (promedio de 0.10 arañas / planta) en los tratamientos evaluados, durante toda la fase de estudio. La baja presencia de arañas a los 60 ddt posiblemente se deba por la poca incidencia de presas para alimentarse y no por efecto de *B. bassiana* ya que no se encontró ninguna evidencia (arañas colonizadas con hongo) del efecto de los tratamientos a base de *B. bassiana* sobre la incidencia de arañas (**Figura 7**). Estos resultados obtenidos son similares a la investigación realizada por Delgado (2001) el cual usó productos botánicos y microbiológicos para el manejo de *P. xylostella* en el cultivo del repollo, donde no encontró diferencias significativas al analizar estadísticamente los datos obtenidos, indicando que los productos insecticidas a base de nim y microbiológico (Dipel) no afectaron las poblaciones de arañas en el cultivo, las cuales actúan como un mecanismo de amortiguación y que contribuyen a evitar desequilibrios que pudieran conducir al incremento de algunas especies plagas. Estudio realizado BioWorks (2006) afirma que se ha encontrado efecto de *B. bassiana* sobre abejas domésticas pero no es significativo, por los mecanismos de defensa que presentan las abejas contra este tipo de microorganismos.

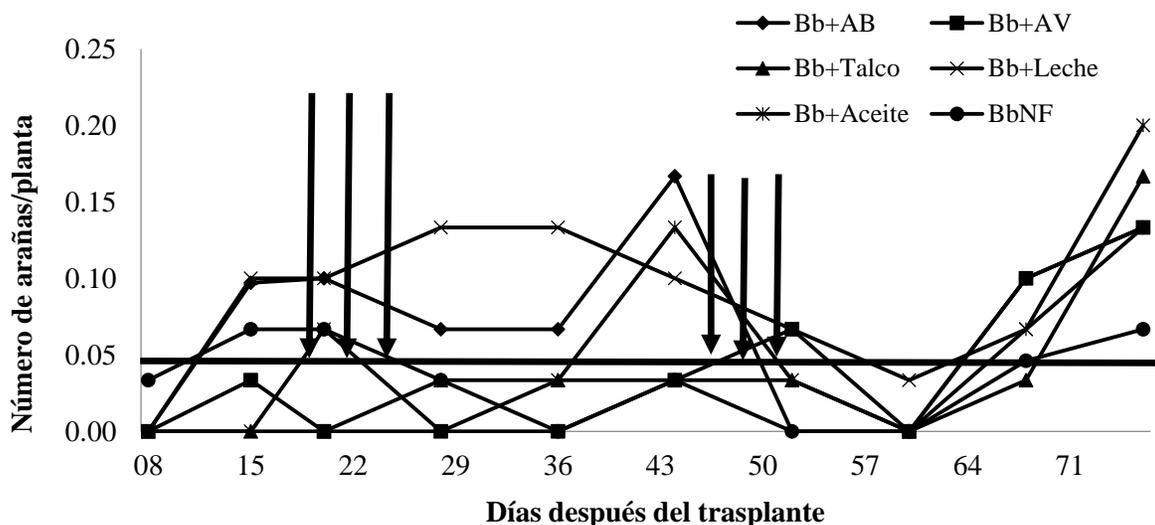


Figura 7: Efecto de formulaciones bioplaguicidas a base de *B. bassiana* sobre el número de Arañas en el cultivo del repollo en el Tisey, Estelí 2009 – 2010

4.8 Promedio de cabezas de repollo comerciales

El ANDEVA realizado para el número de cabezas comerciales indica que no existen diferencias significativas entre tratamientos. A pesar de esto, se encontró que el tratamiento sin formular (hongo en arroz), registró el mayor número de cabezas con un promedio 21852 cabezas/ha, en cambio el tratamiento *B. bassiana* más leche en polvo registró el menor número de cabezas comercializables con un promedio de 14074 cabezas/ha, lo que indica que el daño por *P. xylostella* fue mayor en este tratamiento y que este formulado no es efectivo para el manejo de esta plaga (**Figura 8**). Según Chalfans y Brett (1965), la calidad del producto se determina por el peso y presentación física (grado de daño foliar) que presenta la cabeza de repollo al momento de la cosecha y según el aspecto que presente el producto, éste tendrá un valor económico diferente al producto que tenga mayor o menor daño foliar causado por la plaga lo que significa pérdidas económicas para el productor.

La evaluación de la producción de cabezas comerciales se clasificó por calidad de acuerdo a la descripción de Garay y Rueda (2007). Los repollos que se obtuvieron fueron con calidad A y B considerados comerciales (**Cuadro 2**).

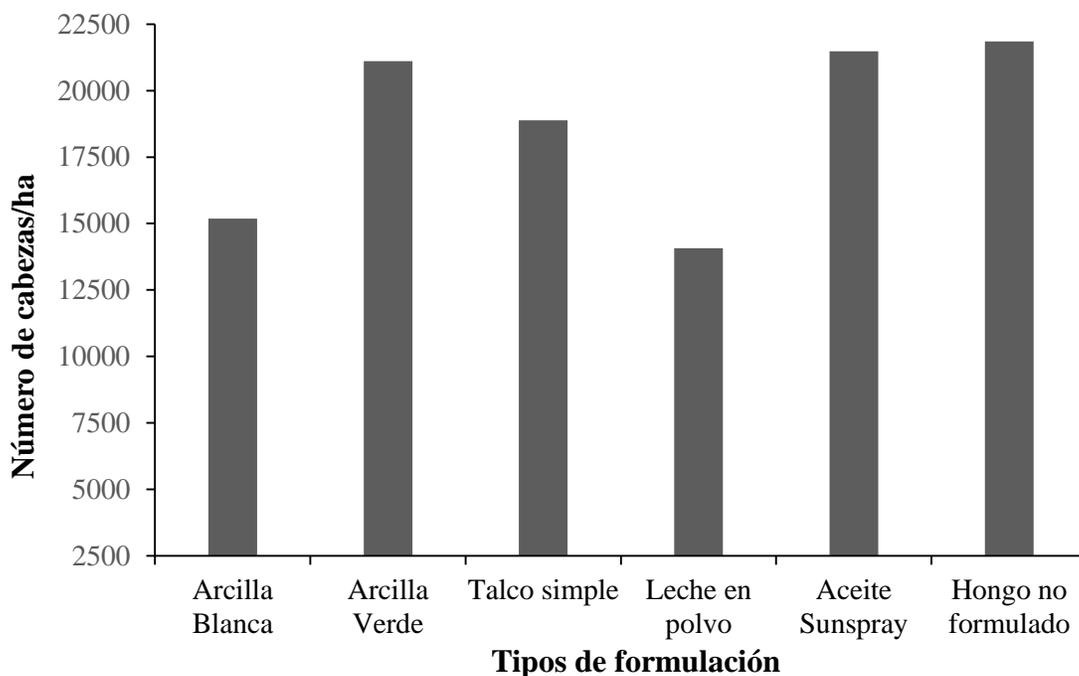


Figura 8: Número promedio de cabezas de repollo comerciables por tratamientos evaluados en el Tisey, Estelí 2009 – 2010

4.9 Peso en kg de cabeza de repollo

El ANDEVA realizado para la variable peso de cabezas comerciables indica que existen diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.0228$), lo cual demuestra que al menos uno de los seis tratamientos evaluados presenta diferencias reales entre sí, además hubo diferencias significativas al realizar la separación de medias Tukey ($\alpha= 0.05$). El tratamiento formulado *B. bassiana* más Arcilla blanca presentó el mayor peso de cabeza con 1.70 kg, en cambio el tratamiento *B. Bassiana* más leche en polvo registró el menor peso de cabezas comerciables con un promedio de 1.39 kg.

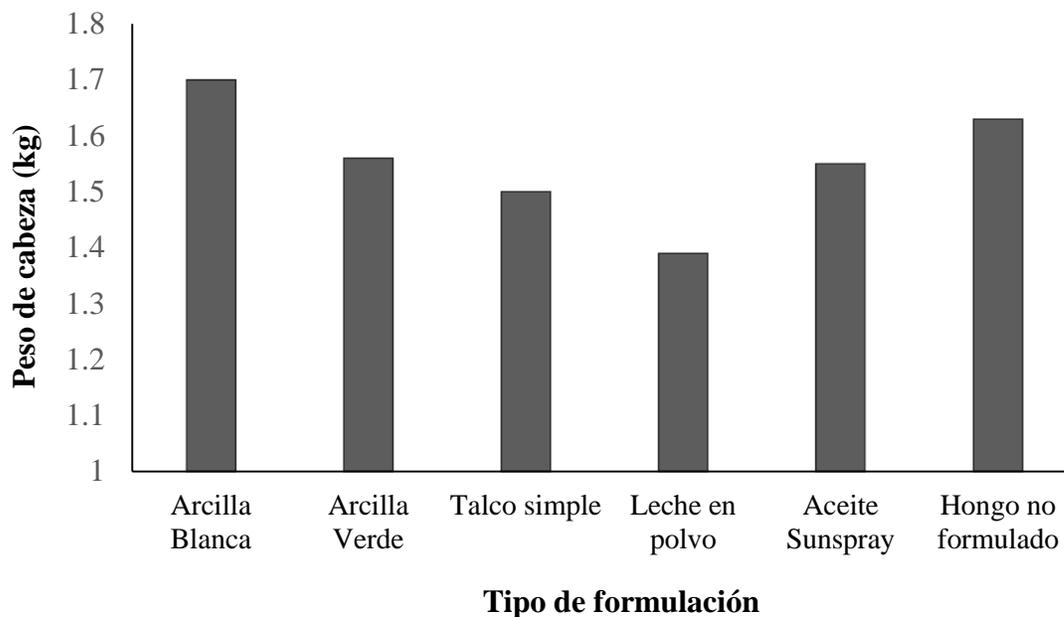


Figura 9: Peso promedio en kg de cabeza de repollo por tratamientos evaluados en el Tisey, Estelí 2009 - 2010

Estos resultados obtenidos en el peso kg por cabeza son bajos comparados con el peso por cabeza obtenido por la FHIA, 2012 (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola), donde evaluaron 17 cultivares de repollo durante tres ciclos, incluyendo la variedad Green Boy obteniendo un peso promedio de 3.02 kg/cabeza y un rendimiento comercial de 63 toneladas por ha.

V. CONCLUSIONES

- Los productos formulados a base de *B. bassiana* con materiales sólidos y líquidos mejoran la durabilidad del producto durante seis meses de almacenamiento en comparación con el producto no formulado.
- La concentración de conidias de *B. bassiana* en todas las formulaciones se mantuvo estable durante seis meses en todas las formulaciones.
- La viabilidad de conidias de *B. bassiana* en todas las formulaciones se mantuvo estable, con 97% a los tres meses y disminuyendo a 82% a los seis meses.
- El efecto de las formulaciones sobre las plagas de repollo fue variable, *B. bassiana* en aceite tuvo el mejor efecto sobre *P. xylostella*, *Leptophobia* sp y áfidos; en cambio el mejor efecto sobre *Diabrotica* sp se registró en la formulación con arcilla blanca.
- Las formulaciones no tuvieron efecto sobre el número de arañas ya que las poblaciones se mantuvieron presentes en los tratamientos evaluados, durante toda la fase de estudio.
- El producto sin formular, registró el mayor número de cabezas por ha con 21852, presentando la mayor rentabilidad en comparación con los productos formulados.
- *B. bassiana* formulado en arcilla blanca presentó el mayor peso de cabeza con promedio de 1.70 kg.
- *B. bassiana* formulado en leche registró el menor número de cabezas comercializables con 14074 cabezas por ha, así como el menor peso de cabeza con 1.39 kg.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar la formulación a base de *B. bassiana* con aceite sunspray para el manejo de plagas en cultivos con productores convencionales en cambio las formulaciones a base de *B. bassiana* con arcillas utilizarlas con productores agroecológicos u orgánicos.
- Producto no formulado a base de *B. bassiana* no utilizarlo después de un mes de estar almacenado en condiciones ambientales y los productos formulados a base *B. bassiana* no usarlo después de seis meses en almacenamiento.
- Realizar control de calidad (concentración mínima de 1.7×10^{12} conidias por ha y viabilidad mínima de 80%) de formulaciones bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos antes de realizar aplicaciones en el campo.
- Realizar investigación para determinar el efecto de factores (temperatura, luz y humedad) sobre la viabilidad y concentración de conidias en formulaciones bioplaguicidas

VII. LITERATURA CITADA

- Andrews, K. 1984. El Manejo integrado de plagas invertebradas en los cultivos agronómicos, hortícolas y frutales en la Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. EAP-Offset. 85 p.
- Alatorre R. 2006. Insecticidas microbianos en el manejo de insectos plaga. In: Memorias del Taller de Hongos entomopatógenos [Ascomycetes anamorficos (Deuteromycota: Entomophthorales)]: Control de calidad. SMCB. Manzanillo, Colima, Mexico. 1-9 pp.
- Alatorre R. 2010. Hongos entomopatógenos, alternativa en el manejo de insectos plaga. En línea. Instituto de Fitosanidad. México. Consultado el 7 de Abril 2010. Disponible en:<http://entomologiaforestalraquel.blogspot.com/2010/11/hongos-entomopatogenos-alternativa-en.html>
- Alatorre R; Valdivia R; Ortiz A; Medina R, Alejo G. 2011. Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. Revista Biociencias. Enero 2011 Vol. 1. Universidad Tecnológica de la Costa. México. 53 p.
- Aliaga JC, Fuentes, JS Gutiérrez C. 2009. Determinación de las CL50 y CL90 del hongo *Beauveria bassiana* CBLE-265 para EL control de las plagas *Spodoptera frugiperda* y *Aphis craccivora*. Lima, Perú 43 p.
- Alves, SB. 1998. Fungos entomopatógenos. In: Alves, SB. (Ed.) Controle microbiano de insectos. FEALQ. pp. 289-370. Alves, SB. 1986. Controle microbiano de insectos. Sao Paulo, Brasil, Ed. Manole. 407 p.
- Bateman, R. P., M. Carey, D. Moore, and C. Prior. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology* 122: 145-152 pp.
- Bertolaccini, I.; Sánchez, D. Arregui, C. 2010. Incidencia de algunos factores naturales de mortalidad de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), en el área centro-este de Santa Fe, Argentina. *Rev. Horticultura* 29(68) Ene-Abr.2010. Universidad Nacional del Litoral. 20-24 pp.
- BioWorks. 2006. Introducción (BotaniGard ES, Mycoinsecticide). Laverlam International Corporation. Jul. 2006. USA, NY. 5 p.
- Boyetchko S, Hynes R. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Bio Biochem.* 38:845 pp.

- Butt TM, Jackson C, Magan B. 2001. Fungi as biocontrol agent: progress, problems and potential. Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Carballo, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Rev. Manejo Integrado de Plagas 47: 1-4 pp.
- Carballo, M., Guaharay, F. 2004. Control Biológico de Plagas Agrícolas. Serie Técnica. Manual Técnico N° 53/CATIE. Managua, NI. 232 p.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de repollo. Informe Técnico N°.150. Costa Rica 80 p.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza)/UNA. 1999. Manejo Integrado de Plagas en el cultivo de repollo. Serie Técnica, Manual Técnico n° 38. Managua, NI. 101 p.
- Chalfant, RB, Brette, CH. 1965. Cabbage looper and imported cabbage worms; feeding damage and control on cabbage in western North Carolina. Journal of Economic Entomology (EE.UU). 58 p.
- CENAGRO IV (Censo Nacional Agropecuario). 2011. Informe final. Consultado 12 de feb. 2015. 70 p.
 Disponible en: <http://www.inide.gob.ni/Cenagro/INFIVCENAGRO/informefinal.html#1>
- CYMMYT (Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo), 1988. La formulación de recomendaciones a partir de datos Económicos. Un manual metodológico de evolución económica. ME. DF. CIMMYT. 86 p.
- Cocom, B. Erlindo, M. Trabanino, R. 2006. Evaluación de la susceptibilidad de Spodoptera frugiperda a BAZAM (*Beauveria bassiana*) en Zamorano. Tegucigalpa, Hon.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Querétaro (CESAVEQ). 2013. Campaña de Manejo Fitosanitario del Maíz, Verifica que tu cultivo no tenga plagas de suelo. México. 12 p. En línea. Consultado el: 20 agost. 2014. Disponible en: <http://www.cesaveq.org.mx/cesa3/page/publicaciones/2013/rizofagas/pdf/Rizofagas.pdf>
- Daoust, R. A., M. G. Ward, and D. W. Roberts. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. J. Invertebrate Pathology 41: 151-160 pp.

- Delgado P, OM. 2001. Manejo de la palomilla del repollo *Plutella xylostella* en el cultivo del repollo *Brassica oleracea* a través del uso de insecticidas Nim 20, Dipel (*Bacillus thuringiensis*) y Evisect (Thiociclam). Tesis. Ing. Agro. Universidad Nacional Agraria (UNA). Managua, Nicaragua. 45 p.
- España, P. 2000. Caracterización de las plagas enzimática de aislados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Hyphomycetes), y su virulencia sobre *Epilahna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Tesis. Tecoman. México. 104 p.
- Faria MR, Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237-256 pp.
- Ferron, P., Fargues, J., Riba, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. En: Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G. (eds.) *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 2: *Humans, Animals and Insects*, Marcel Dekker, New York. 665-706 pp.
- FHIA (Fundación Hondureña de Investigación). 2012. Repollo de invierno: Alternativa para diversificar la producción en el valle de Comayagua, Honduras. Hoja Técnica. No. 16, Jun. 2012. Tegucigalpa, Hond. 6 p.
- French, E., T. Hebert. 1988. Métodos de Investigación fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. 289 p.
- Garay, E; Rueda, A. 2007. Comparación Agroeconómica de dos Sistemas de Manejo de *Plutella xylostella* (L.) en Repollo en Estelí, Nic. Ceiba. Vol. 48(1-2), Ene-Dic 2007. 83-87 pp.
- García, G; González, M. 2010. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. *Rev. Ra Ximhai*, enero-abril, Vol. 6, Número 1. Universidad Autónoma Indígena de México. Mochicahui, Sinaloa. 17-22 pp.
- Geden C. J., D. A. Rutz, and D. C. Steinkraus. 1995. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. *Biological Control* 5: 615-621 pp.
- Godoy JC, Valera, RE, Guédez C, Cañizalez LM, Castillo C. 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Rev. Fac. Agron.* v.24 n.3, sep. 2007. Caracas, Venezuela. 7 p.

- Guillespie, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. p. 269 In: Burge, M. (Ed) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England
- Harcourt DG, Guppy JC, Tyrrell D. 1990. Phenology of the fungal pathogen *Zoophthora phytonomi* in Southern Ontario Populations of the Alfalfa Weevil (Coleoptera: Curculionidae). Environmental Pathology. 612-617 pp.
- Harper, JD, 1987. Applied epizootiology: Microbial control of insects. In: Fuxa, J.R., Tanada, Y. (Eds.), Epizootiology of Insect Diseases. John Wiley & Sons, New York. 473–496 pp.
- Hernandez-Torres, I., A. Berlanga P., J. I. Lopez A., J. Loera G. y E. Acosta D. 2007. Evaluacion de Hongos Entomopatogenos para el Control del Pulgon Cafe de los Citricos, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), en Mexico. INIFAP. CIRNE. Campo Experimental General Teran, Nuevo Leon, México. Folleto Científico No. 1. 19 p.
- Hong, DT. Edgington, S; Ellis, LH; Aquino, De Muro, M; Moore, D. 2005. Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations de *Beauveria bassiana* conidia. Journal of invertebrate pathology 89. 136-146 pp.
- Ibrahim, L., T. M. Butt, A. Beckett, and S. J. Clark. 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen *M. anisopliae*. Mycological Research 103: 901-907 pp.
- Inglis, GD., Goettel, MS., Butt, TM. Strasser, H. 1995. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. CABI Publishing, Oxon, UK. 23-69 pp.
- Inglis, GD.; Goettel, MS. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L.A. (ed). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, Inc., San Diego. 213—249 pp.
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 2002. Cultivo del Repollo. Guía Tecnológica No 23. Managua, NI. 42 p.
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 2006. Guía Técnica. Manejo integrado de plagas del cultivo de repollo. Managua, NI. 36 p.
- Jaramillo, J; Díaz, C. 2006. El cultivo de las crucíferas (Brócoli, Coliflor, Repollo, Col china). Manual Técnico 20. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Bogotá, Co. 176 p.

- Lacey, L. A., R. Frutos, H. K. Kaya, and P. Vail. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* 21: 230–248 pp.
- Lacey, L.A. y Goettel, M. 1995. Current developments in microbial control of insects pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*, 40: 3-27pp.
- Lanteren, JC. Bueno, HP. 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *BioControl* 48. 123–139 pp.
- Lecuona, R., Papierok, B., Riba, G. 1996. Hongos entomopatógenos. En: Lecuona, R. (Ed.) *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas*. Mariano Talleres Gráficos, Buenos Aires. 35-60 pp.
- Lecuona, R.; Díaz, A. 1996. Técnicas empleadas para el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. 4 p.
- Li ZZ. 1988. List on the insects of *Beauveria bassiana*. In: Study and application of entomogenous fungi in China, Vol. 1. Beijing: Academic Periodical Press. 241-255 pp.
- Londoño, ME. Jaramillo, J. 1999. Control Biológico de la Polilla Dorso de Diamante *Plutella xylostella*. (Lepidoptera Yponomeutidae). Antioquia, Col. MIP- CORPOICA. 125-136 pp.
- López, A. 1997. Manejo de *Plutella xylostella* L. en el cultivo de repollo (*Brassica oleraceae* var. capitata) en dos sistemas de producción. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana.
- Mata, T. 2008. Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base de esporas del hongo *Beauveria bassiana*. Tesis MSc. CIBA-IPN TLAXCALA. México. 98 p.
- Mcdonald DM, Nolan RA. 1995. Effects of relative humidity and temperature on *Entomophaga aulicae* conidium discharge from infected eastern hemlock Looper Larvae and subsequent conidium development. *Journal of Invertebrate Pathology*; 83-90 pp.
- Medina, TM. 2003. Eficacia de *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* aplicados a tres concentraciones en dos formulaciones para el control de *Spodoptera frugiperda* en jilote y *Aphis* spp en pepino. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. 20 p.
- Miranda, F. 2006. Control biológico de *Plutella xylostella* en fincas semi-orgánicas comparados con sistemas convencionales de producción en el cultivo de repollo Estelí, Nicaragua.

- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. MIP.103 p.
- Morley, DJ. Moore, D; Prior, C. 1995. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria bassiana* conidia with exposure to simulated sunlight and range of temperatures. Mycol. Res. 100. 31-38 pp.
- Most, BH. Quinlan, RJ. 1986. Formulation of biological pesticides. In: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology (Eds. R.A. Samson, J.M. Vlask, D. Peters). The Netherlands. 624-627 pp.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genome: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11740> (consultado el 22 de Enero de 2014).
- Neves, M; Hirose, E. 2005. *Beauveria bassiana* strains selection for biological control of the coffee berry *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Neotropical Entomology. Vol 34.
- Ortiz, M; Alatorre, R; Valdivia, B; Medina, R; Alejo, G. 2011. Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. Rev. Biociencias. Enero 2011; Núm 2. Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de México. 42-53 pp.
- Prior, C., P. Jollands and G. le Patourel. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest (*Pantorhytes plutus*). J. Invertebrate Pathol. 52: 66-72 pp
- Rao, RK; Lal, OP.; 2004. Insect pests complex of cabbage under Delhi conditions. Journal of Applied Zoological Researches, 15(1):67 pp.
- Rivera, M. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *B. bassiana* (Bals.) Vuill.con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. Rev. Col. Entomol. 19(4):151-158 pp.
- Roberts DW, Humber RA. 1981. Entomogenous fungi. In: G.T. Cole & B. Kendrick (Eds.), Biology of Conidial Fungi, Vol. 2. New York: Academic Press. 201-236 pp.
- Romero, D; Rojas, J. 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. Agro. Managua, NI. 158 p.

- Rosas G, N. 1999. Desarrollo de formulados asperjables de *Beauveria bassiana* (Balsamo Vuillemin) utilizando diversos polímero. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.86 p.
- Rueda, A.; Shelton, AM. 1996. Palomilla Dorso de Diamante (DDM). (En línea). Consultado 8 de oct. 2009. Disponible en <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/spanish/dbm.html>
- Samson, RA.; Evans, HC. Latgé, Jean-Paul. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, The Netherlands, 187 p.
- Sánchez, L.; Santos, BM.; Reyes, M.; Pérez, Q.; Castillo, M. 2000. Acciones MIP en hortalizas: Parasitoides de *Plutella xylostella* en República Dominicana. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). No 58 .76-77 pp.
- Sánchez, M; Romero, R. 2005. Manejo de las principales plagas del repollo, brócoli y coliflor Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Rev. 5 (3). 2005. Venezuela. CENIAP. Disponible en:http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/Divulgativo_Ceniap/brocoli.ht
- Sarria, M. 2005. Evaluación de dos cepas de *Bacillus thuringiensis* y Neem para el control de *Plutella xylostella* en repollo (*Brassica oleracea*), informe Técnico, INTA/CEVAS.
- Shah, P. A., and J. K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotech. 61: 413-423 pp.
- Santos, A. García, M. Cotes, AM. Villamizar, L. 2011. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034 Revista Iberoamericana de Micología. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corporación colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA. Bogota, Col. 7 p.
- Tanada, Y.; Kaya, K. 1993. Insect pathology. Academic Press, INC. San Diego USA. Wai Hong, L., Sastroutomo, S., Caunter, G., I., Ali, J., Keng Yeang, L., Vijaysegaran, S., Hoi Sen, Y., 1999. Biological control in the tropics. CABI Publishing, Malaysia, 155 p.
- Universidad Nacional Agraria. 2000. Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos para el control de plagas agrícolas. Managua, Ni. En prensa.49 p.

Vélez, PE; Posada, FJ; Marín, P; González, MT; Osorio, E; Bustillo, AE. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No. 17, CENICAF.

Vigo, A. 2011. Hongos Entomopatógenos. (En línea). Consultado el 2 de jun. 2014. Disponible en:http://www.slideshare.net/alfvigo/hongos-entomopatgenos?utm_source=slideshow02&utm_medium=ssemail&utm_campaign=share_slideshow_loggedout.

Wai Hong, L., Sastroutomo, S., Caunter, G., I., Ali, J., Keng Yeang, L., Vijaysegaran, S., Hoi Sen, Y., 1999. Biological control in the tropics. CABI Publishing, Malaysia, 155 p.

Womack, J. G., G. M. Eccleston and M. N. Burge. 1996. A vegetable oil-based invert emulsion for mycoherbicide delivery. Biol. Control 6: 23-28 pp.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Generalidades del cultivo de repollo (*Brassica oleracea* L var *capitata*)

El repollo (*Brassica oleracea* L) es una planta originaria de Europa, Asia Occidental y las Costas del Mediterráneo y su cultivo se remonta por lo menos a 2.500 años A.C., siendo el repollo, la col crepsa y el col rábano las primeras variedades en ser domesticadas y pertenece a la familia Brassicaceae (Crucíferas) (Jaramillo y Díaz 2006). En el repollo se consideran algunas variedades botánicas que se diferencian de acuerdo a claves taxonómicas. Esta familia está compuesta por 375 géneros y más de 3.000 especies, siendo el género *Brassica* el de mayor número de especies (Jaramillo y Díaz 2006). La Clasificación botánica y taxonómica:

Reino: Vegetal

Phylum: Traqueofitas

Subphylum: Pteropsidas

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Subclase: Diapétala (Arquiclamideas)

Orden: Papaverales (Roedales)

Familia: Cruciferae (Brassicaceae)

Las especies cultivadas están clasificadas botánicamente como:

Género: *Brassica*

Especie: *Brassica oleracea* L.

Variedad: *capitata* (Repollo blanco), *acephala* (Col), *gemmífera* (Col de brúselas), *botrytis* (Coliflor), *itálica* (Brócoli), *pekinensis* (Col china), *rubra* (Col lombarda), *caulo-rapa* (Col rábano), *rubra* (Repollo morado).

Según Jaramillo y Díaz 2006, los estados de desarrollo del repollo comprende: Etapa de Semillero (Vo) que se extiende desde la siembra de la semilla hasta el trasplante (plántula) cuando están presentes cinco hojas verdaderas, la Etapa de establecimiento o postrasplante (V1) que comprende el trasplante, cuando las plantas tienen entre seis y ocho hojas hasta el estado de 9 a 12 hojas; la Etapa de preformación de cabeza (R1) que comprende dos estados de crecimiento, uno es el de preformación de copa y el total de hojas en este estado oscila entre 13 y 19. El estado de formación de copa se inicia cuando la planta tiene 20 hojas hasta alcanzar 26; Etapa de formación de cabeza (R2) que se inicia cuando ésta tiene entre cinco y ocho centímetros de diámetro. En este estado, las hojas internas del corazón se desarrollan rápidamente, formando una estructura semejante a una bola de hojas superpuestas llamada también el estado de llenado de la cabeza, cuando ésta tiene entre 8 y 15 centímetros de diámetro, todavía sin una consistencia firme, finalmente, comprende el estado de madurez, cuando la cabeza adquiere la máxima

dureza y tamaño, de aproximadamente 12 a 18 cm. Al final de esta etapa, la cabeza adquiere la consistencia ideal y está lista para cosechar

Anexo 2. Palomilla del repollo (*Plutella xylostella* L. Lepidoptera: Plutellidae)

P. xylostella es una especie que tiene un ciclo de vida corto de 25 días y alta capacidad de reproducción. Las palomillas ponen hasta 300 huevos sobre las hojas. Las larvas tienen un tamaño de 8 a 12 mm de largo cuando están bien desarrolladas, varían en coloración de amarillo claro cuando recién nacen a verde oscuro cuando están bien desarrollados, se localizan debajo de las hojas entre las venas. Las pupas miden de 10 a 12 mm, son de color verde oscuro dentro de un capullo de seda blanco, se localizan en el envés de las hojas. El adulto mide de 8 a 10 mm, es de color café con manchas grises. Las palomillas son reconocidas por poseer en su dorso marcas con forma de diamante, de donde se origina su nombre. Las palomillas son más activas y visibles al atardecer, volando alrededor de las plantas buscando compañeros para cruzarse. Los machos son atraídos a las hembras por medio de feromonas. Los huevos son muy pequeños de menos de 1 mm de diámetro, son de color amarillo, se localizan debajo de las hojas cerca de la vena central y son ovipositados individualmente o en pequeños grupos (Rueda y Shelton, 1996; CATIE, 1999).

El daño de *P. xylostella* ocurre cuando las larvas eclosionan y perforan las hojas externas y luego penetran la cabeza donde se alimentan de los tejidos tiernos, dejando los repollos inservibles para la comercialización. Debido a la naturaleza del daño causado y al hábito de la plaga, las medidas de control del insecto representan un desafío para investigar, ya que no solo es difícil la penetración de insecticidas hacia el interior de las cabezas, sino que la plaga tiene gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y de presión de selección, altamente prolifero, generaciones sucesivas cortas y múltiples hospedantes alternos (CATIE, 1999; Sánchez *et al.*, 2000).

El uso de plaguicidas químicos y biológicos constituyen los métodos más comunes de control de *P. xylostella*. Sarria (2005), plantea que en ensayos experimentales realizados, *Bacillus turingiensis* presentó los mejores resultados en el control de palomilla dorso de diamante en repollo. El autor recomienda, además, que para el manejo de esta plaga se deben integrar alternativas de manejo en el cultivo, tales como: preparación de almácigos en bandejas, manejo de malezas a los 25 y 45 ddt para reducir las fuentes hospederas de la plaga, la realización de recuentos semanales para mantener un adecuado monitoreo de la palomilla, y la aplicación formulaciones a base de *B. bassiana*; ya que el producto formulado favorece el desarrollo y longevidad del hongo, ya sea protegiéndolo del medio ambiente, aumentando el tiempo de vida útil o viabilidad y/o favoreciendo su crecimiento y desarrollo una vez aplicados.

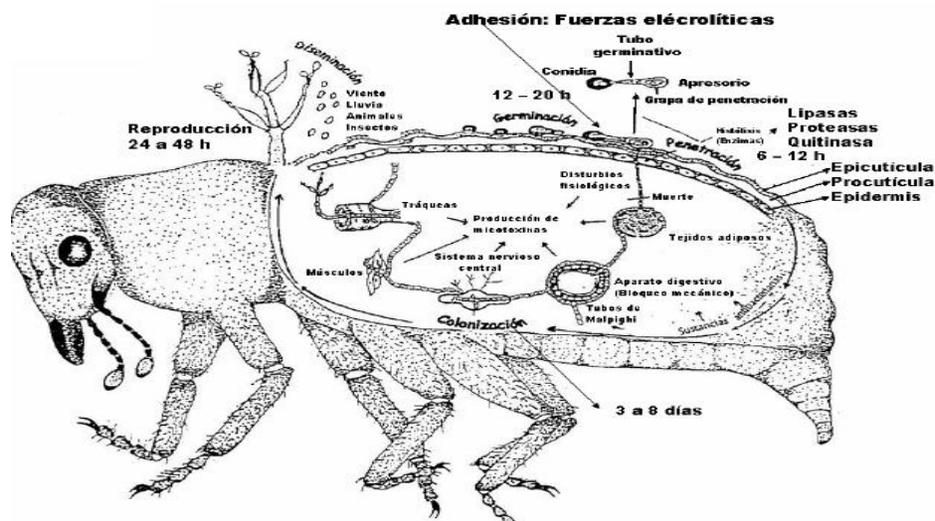
El uso irracional de los plaguicidas en el manejo de la palomilla dorso de diamante en repollo, nos exige plantearle a los productores de repollos nuevas alternativas que conduzcan a reducir

el uso de plaguicidas químicos sintéticos altamente contaminantes en el manejo de *P. xylostella*, que sean amigables con el medio ambiente, de bajo costo, accesible a los pequeños y medianos productores y lo más importante inocuas para los seres humanos.

Anexo 3. Hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals y Vuils)

Respecto a los hongos entomopatógenos, se sabe que existen entre 750-1000 especies, distribuidos en 100 géneros (Roberts y Humber, 1981). Entre ellos, los más utilizados para la fabricación comercial de micoinsecticidas son *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* (Faria y Wright, 2007). Los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados taxonómicamente en el phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina de la clase Sordariomycetes, subclase Hipocreomycetidae. *Beauveria bassiana* pertenece al orden Hypocreales de la familia Cordycipitaceae (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2014)

Mecanismo de infección de Hongos Entomopatógenos (Tomado de Vigo, 2011)



En los últimos años se han presentado cambios importantes en la producción y consumo de alimentos a escala mundial. Esta tendencia se debe por una fuerte preocupación por la salud y una mayor concientización por la protección del medio ambiente. Esto ha obligado a productores a buscar otras alternativas para el control de plagas dentro de sus cultivos, evitando el uso de químicos (Medina, 2003), siendo el control biológico una de las alternativas más adecuadas.

Los agentes de control biológico más utilizados están los hongos entomopatógenos, principalmente los pertenecientes al orden Hypocreales (Alves, 1998), constituyendo el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos, ya que virtualmente todos los insectos

son susceptibles a las enfermedades causadas por hongos. Existen más de 700 especies pertenecientes a 100 géneros. Ellos ocurren frecuentemente en la naturaleza y a menudo causan reducciones significativas en poblaciones de insectos incluyendo especies plaga. Se conocen alrededor de 100 especies de hongos con efectos insecticidas, sin embargo, solamente cerca de 20 especies han sido estudiadas como agentes de control biológico y su desarrollo comercial ha sido lento (Carballo y Guharay, 2004).

Entre los hongos entomopatógenos más utilizados están *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales), estos hongos ocurren de forma natural en el campo afectando especies de insectos en casi todos los órdenes, pero principalmente Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera e Hymenoptera (Tanada y Kaya, 1993; Alves, 1998; Inglis *et al.*, 2001).

De todos los hongos entomopatógenos conocidos por su efecto sobre plagas, en Nicaragua y en toda la región los más utilizados corresponden a las especies *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, de las cuales se han evaluado muchas cepas contra plagas de importancia agrícola (Carballo y Guharay, 2004). Una de las estrategias de uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas es en forma de aplicaciones inundativas (control biológico aumentativo). A nivel mundial, el control biológico aumentativo, donde los enemigos naturales son introducidos periódicamente, es aplicado comercialmente en grandes áreas de diversos cultivos (Lenteren y Bueno, 2003). El propósito de las aplicaciones aumentativas es inducir epizootias en el campo (Harper, 1987), entendiendo estas como ocurrencia de alta mortalidad de la plaga, causada por el controlador biológico.

Anexo 4. Formulaciones de hongos entomopatógenos.

Típicamente una formulación es una mezcla de varios productos, los que tienen que ser compatibles. Estos incluyen al ingrediente activo, normalmente constituido por las estructuras infectivas del hongo (esporas), un diluyente o dispersante, un agente humectante y un adherente (Samson *et al.*, 1988).

Los materiales utilizados en la formulación deben cumplir con ciertos requisitos, tales como no afectar la actividad del hongo, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con las conidias, no tener actividad biológica sobre animales, plantas o insectos benéficos, ser inocuos para el medio ambiente y económicamente rentables. Estos materiales favorecen el desarrollo y longevidad del hongo, ya sea protegiéndolo del medio ambiente, aumentando el tiempo de vida útil o viabilidad y/o favoreciendo su crecimiento y desarrollo una vez aplicados.

Para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95% y el contenido de humedad debe estar lo más bajo posible, preferiblemente entre 4 y 6% (Monzón, 2001), ya que la supervivencia de las esporas está asociada directamente a su contenido de humedad (Samson *et al.*, 1988).

Anexo 5. Guías para la reproducción de *B. bassiana* mediante el proceso de producción Semi-industrial (UNA, 2000; modificado por Monzón 2013)

Aislamiento y siembra de *B. bassiana*

El Aislamiento e inoculación consiste en la obtención del inóculo (hongo) a partir de la fuente (insectos con hongos, medios de cultivo con hongos, preservaciones, etc.) y colocarlo en un medio de cultivo para su crecimiento. Aunque existen varios métodos para hacer aislamientos los más utilizados son:

Aislamiento por dilución seriada

1. Preparar 6 tubos de ensayo con rosca. Agregar a uno de los tubos diez ml de agua destilada y a los 5 tubos restantes agregar 9 ml de agua destilada.
2. Esterilizar los tubos en Baño María en olla de presión o porra de aluminio por 2.5 horas
3. Colocar un insecto momificado (muerto por el hongo) en el tubo de ensayo que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de tween - 80 y agitar durante 1 minuto.
4. Con una micropipeta transferir 1 ml del tubo 1, a un segundo tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de tween - 80 y agitar fuertemente durante 1 minuto.
5. Repetir el paso 3 hasta lograr obtener una tercera dilución de 10^{-3} y repetimos nuevamente la operación durante tres veces más (hasta lograr obtener un total de seis diluciones en serie).
6. Sembrar a partir de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en platos petri con medio de cultivo (en un total de 3 a 5 platos petri por cada dilución). La siembra del hongo se hace tomando de la dilución, una gota (0.1 ml) con una micropipeta y depositándola sobre el medio de cultivo.
7. Sellar los platos con cintas de parafilm después de ser sembrados o inoculados y guardarlos en una sala a 25 °C, durante un periodo de incubación aproximado de 3 a 4 días, hasta obtener el crecimiento característico del hongo.
8. Posteriormente se realiza un re-aislamiento a partir de las colonias en crecimiento, tomando el inóculo y sembrándolo nuevamente en platos petri, los cuales serán luego incubados para su crecimiento. Hasta obtener el cultivo puro.

Aislamiento directo del hongo a partir del insecto

1. Tomar un insecto momificado con el hongo y desinfectarlo superficialmente con hipoclorito de sodio (2%) o alcohol.

2. Raspar partículas del hongo del insecto momificado utilizando un pincho, espátula o un asa bacteriológica e inocular en el medio de cultivo usando el método de rayado o colocando la partícula del hongo en el centro del medio de cultivo
3. Sellar con cintas de parafilm y Rotular los platos inoculados (nombre del hongo, cepa, origen y fecha) ponerlos en incubación a 25 °C y observarlos diariamente durante los primero seis días.
4. Cuando aparecen las colonias características del hongo, identificar el hongo y realizar un re-aislamiento, tomando el inóculo y sembrándolo nuevamente en platos petri, los cuales serán luego incubados para su crecimiento.

Aislamiento de silica gel

Cuando el hongo se encuentra preservado en seco (silica gel), el aislamiento se puede hacer a partir del hongo preservado, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Preparar el medio de cultivo y verter en platos petri luego esperar 12 horas para sembrar en el medio.
2. Tomar del tubo de ensayo donde se encuentra el hongo preservado los cristales de silica gel y colocarlos en el medio de cultivo. Sembrar en cada plato, aproximadamente 15 cristales de silica gel y distribuirlos en toda la superficie del medio.
3. Sellar con cintas de parafilm y rotular los platos petri inoculados (nombre del hongo, cepa, origen y fecha), colocarlos en incubación y observarlos diariamente durante 5 días.
4. Posteriormente se realiza un re-aislamiento a partir de las colonias en crecimiento, tomando el inóculo y sembrándolo nuevamente en platos petri, los cuales serán luego incubados para su crecimiento. Hasta obtener el cultivo puro

Control de calidad de Cultivos Puros

El control de calidad en los platos, consiste en la revisión constante de los cultivos puros, para detectar contaminantes, principalmente hongos y bacterias, así como detectar crecimiento deficiente del hongo, con el fin de seleccionar los platos que garanticen inóculo de calidad para la inoculación de matrices.

El control de calidad de cultivos puros incluye la siembra en agar nutriente para la detección de bacterias.

Procedimiento para el Control de calidad de cultivos puros

1. Preparar un medio de cultivo AN (Agar Nutriente) y verterlo en platos petri.
2. Con un asa bacteriológica tomar la muestra de cepa del hongo de cultivo puro, inocularla en AN.
3. Sellar los platos y etiquetarlos con la información de la cepa y la fecha del control de calidad; posteriormente colocarlos en incubación.
4. Revisar los platos 24 y 48 horas después de la siembra en Agar-Nutriente y registrar el crecimiento de hongos y/o bacterias.
5. Descartar los platos de cultivo puro, si en el AN se observa crecimiento bacteriano.
6. Limpiar los platos de cultivo puro si en el AN se observa crecimiento localizado de hongos contaminantes; si el crecimiento es generalizado en el plato, descartarlo.

Preparación e inoculación de matrices

Preparación de la matriz

1. Pre-cocer el arroz a ser utilizado en las matrices. Colocar en la cocina un recipiente con agua potable, cuando el agua comienza a hervir depositar el arroz que se usará en las matrices y dejarlo cocer por 5 minutos, hasta que presente una consistencia suave pero no masoso (pre-cocido). La cantidad de arroz depende del número de matrices que se van a preparar.
2. Retirar el arroz de la estufa y escurrirlo en una mesa con papel kraft hasta que esté totalmente frío y seco.
3. Preparar la matriz colocando 100 gramos del arroz pre-cocido en un frasco Erlenmeyer de 500 ml.
4. Sellar el frasco Erlenmeyer (Matriz) con tapones de algodón o con papel aluminio y masking-tape.
5. Colocar los frascos en ollas de aluminio y hervir por un tiempo de 2 a 2.5 horas.
6. Dejar enfriar las matrices y agitar vigorosamente su contenido (arroz) con el objetivo de evitar aglomeraciones.

Inoculación e incubación de matrices

1. Seleccionar un cultivo puro del hongo, al cual se le debió haber hecho el control de calidad, para estar seguros de que se encuentra libre de contaminantes.
2. Obtener el inóculo (conidias) a partir del cultivo puro, mediante un raspado del plato. Preparar una suspensión depositando las conidias en agua destilada estéril. De un cultivo puro con buen crecimiento se puede preparar 60 ml de suspensión, lo cual es suficiente para inocular 4 matrices.
3. Agitar la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea del inóculo y luego proceder a inocular cada matriz con 15 ml de la suspensión de conidias. La inoculación de las matrices se puede hacer con jeringa veterinaria u otro tipo de jeringa debidamente esterilizada.
4. Una vez inoculadas, las matrices se colocan en un cuarto oscuro a temperatura de 23 °C a 28 °C, por un período aproximado de 8 días, hasta que el hongo colonice completamente el sustrato.

Control de calidad de matriz

Una vez inoculada la matriz, durante el proceso de incubación se debe revisar la matriz diariamente a partir del tercer día después de la inoculación, para la detección de contaminantes, principalmente bacterias.

Las características de una matriz de buena calidad son las siguientes:

- a. Crecimiento visible del hongo, tres días después de la inoculación
- b. Crecimiento uniforme
- c. Color del crecimiento fungoso característico del hongo
- d. Color uniforme
- e. Consistencia no acuosa del arroz colonizado
- f. Ausencia de olores
- g. Ausencia de líquidos amarillentos, verdosos o rosados

Si una matriz no presenta estas características, debe ser descartada y esterilizarla para destruir el inóculo contaminante.

Preparación e inoculación de bolsas

Preparación de bolsas

1. Depositar 200 gramos de arroz entero en bolsas de polipropileno, agregar 50-60 ml de agua destilada o potable y sellar las bolsas, doblando el borde y engrapar con aproximadamente 5 grapas.
2. Esterilizar las bolsas que contienen el arroz, con calor húmedo en Baño María en olla de presión o porra de aluminio por 2 a 2.5 horas
3. Después de esterilizar las bolsas, dejar enfriar y agitarlas para evitar aglomeraciones en el arroz y dejar enfriarlas.

Inoculación e incubación de las bolsas

1. La inoculación de las bolsas se hace con el inóculo reproducido en las matrices. Agregarle a cada matriz del hongo entre 250 y 300 cc de agua estéril; la cantidad de agua depende del número de bolsas que van a ser inoculadas.
2. Agitar el contenido hasta obtener una suspensión homogénea de conidias y filtrar la suspensión utilizando un filtro de tela y un embudo estéril, para separar las partículas sólidas del arroz y evitar taponamiento de la jeringa.
3. Inocular cada bolsa con 20 cc de la suspensión conidial utilizando una jeringa veterinaria (o de otro tipo) debidamente esterilizada. Con la suspensión preparada a partir de una matriz se pueden inocular aproximadamente de 20 a 30 bolsas.
4. Una vez inoculadas las bolsas, proceder a la inoculación, colocándolas en un cuarto oscuro a temperatura de 24 a 28 °C, durante un periodo de 4-5 días y revisándolas diariamente.
5. Después de este período, el hongo habrá crecido y reproducido en suficientes cantidades para ser utilizado, por lo que las bolsas pueden ser distribuidas a los usuarios.

Control de calidad de bolsa

Los problemas de contaminación en bolsa son similares a los que ocurren en la fase de matriz, pero se pueden presentar con mayor frecuencia, debido a problemas de humedad o problemas en la inoculación, por lo que se debe realizar control sistemático, a partir del segundo día después de la inoculación, para evitar problemas de contaminación y seleccionar adecuadamente el material, este control se realiza mediante la observación del crecimiento.

Un crecimiento disparejo es localizado sobre diferentes puntos del sustrato. Este tipo de crecimiento puede deberse a la presencia de contaminantes y/o a una mala manipulación al momento de la inoculación. El crecimiento lento puede estar asociado a una mala agitación del sustrato después de efectuada la inoculación, factores ambientales, estado de la cepa, presencia

de contaminantes o calidad del inóculo. El crecimiento homogéneo y rápido, es el tipo de crecimiento apropiado para la selección de la bolsa que entrará en producción.

Las características de una bolsa de buena calidad al igual que las de las bolsas, son las siguientes:

- a. Crecimiento visible del hongo, tres días después de la inoculación
- b. Crecimiento uniforme
- c. Color del crecimiento fungoso característico del hongo
- d. Color uniforme
- e. Consistencia no acuosa del arroz colonizado
- f. Ausencia de olores
- g. Ausencia de líquidos amarillentos, verdosos o rosados

Si una bolsa no presenta estas características, debe ser descartada y esterilizarla para destruir el inóculo contaminante.

Incubación y Secado del hongo

Esta etapa solamente se considera si el hongo será extraído puro es decir cosechado (separado del arroz) para fines de preparar formulaciones, para lo que se requiere extraer toda la humedad del sustrato.

El arroz contenido en las bolsas es depositado en bandejas plásticas con orificios en el fondo, las que se colocan en un local a temperatura ambiente para que se sequen. Al inicio las bandejas se mantienen selladas y posteriormente se abren. Inicialmente las bandejas se limpian, se humedecen con alcohol y se flamean con el mechero. Luego se seleccionan las bolsas de mejor calidad, se abren y el contenido de 10 bolsas es depositado en cada bandeja.

El período de incubación tarda aproximadamente 15 días y se desarrolla en 2 fases, que son la incubación y el secado: La incubación de la bandeja dura aproximadamente 6 días, durante este tiempo el hongo crece y se reproduce en condiciones de oscuridad y alta humedad relativa. Para ello, una vez depositado el arroz en las bandejas, estas se apilan y se sellan con masking-tape, tapando los orificios con el objetivo de formar una cámara oscura dentro de la bandeja, para que el hongo continúe su proceso de crecimiento y esporulación.

Una vez que el hongo coloniza completamente el arroz se procede a abrir las bandejas para tener una rápida pérdida de humedad y acelerar el proceso de secado el cual ocurre aproximadamente de 12 a 15 días. El hongo está listo para cosecha cuando frotamos el arroz con el hongo entre

los dedos y ocurre desprendimiento de conidias en forma de polvo. El tiempo de secado puede ser menor, si en el cuarto de secado se coloca un extractor de humedad.

Cosecha manual de hongos entomopatógenos

La cosecha como el paso final del proceso de producción semi industrial, consiste en separar del sustrato (arroz) las estructuras del hongo (conidias y/o esporas) y recolectarlas, las cuales son obtenidas en forma de polvo. Para realizar la cosecha, la humedad del hongo no debe exceder de 4 a 6%. El polvo que se obtiene en la cosecha de hongos entomopatógenos contiene esporas y/o conidias y micelio, que son estructuras del hongo, más las partículas del sustrato de arroz.

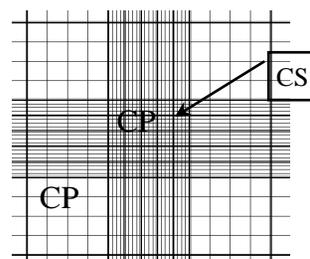
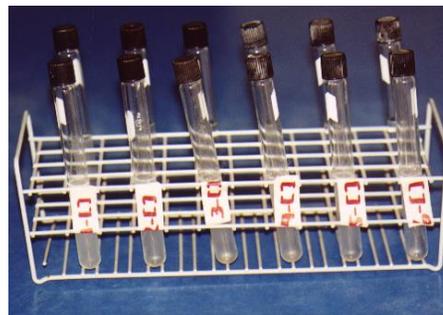
1. Preparar todos los utensilios y materiales (tamices, guantes, mascarillas, recipientes, etc) para realizar la cosecha del hongo.
2. El sustrato colonizado (arroz con el crecimiento del hongo) se coloca en un tamiz con orificios de 1mm de diámetro, para separar el polvo (conidias) del hongo de los granos de arroz.
3. El tamiz es colocado en un recipiente hermético, para facilitar la recolección del polvo del hongo. Agitar fuertemente por varios minutos para tamizar el producto y obtener las conidias del hongo.
4. Dejar reposar por espacio de unos cinco minutos, con el propósito de que las conidias se asienten en el fondo del recipiente y luego recolectar el polvo cosechado.
5. Al polvo cosechado se le realiza la evaluación de rendimiento y viabilidad del producto, para su debida formulación.
6. Pesar el hongo cosechado (en forma de polvo) y colocarlo en un recipiente limpio y completamente oscuro para evitar la entrada de luz. Etiquetar el recipiente (número de lote, cepa, fecha de cosecha, etc.).
7. El hongo cosechado puede utilizarse inmediatamente para preparar formulaciones o puede ser almacenado en refrigeración a temperatura de 5 a 6 °C.

Control de calidad del producto cosechado

El control de calidad del producto cosechado se realiza mediante la evaluación de rendimiento en número de conidias por gramo de polvo cosechado y la viabilidad de las conidias (porcentaje de germinación). Se considera bueno aquel rendimiento que no sea inferior al rendimiento promedio de la cepa y que la viabilidad no sea menor al 95 %. Las evaluaciones de rendimiento, se deben de realizar al momento de la cosecha y antes de la preparación de la formulación.

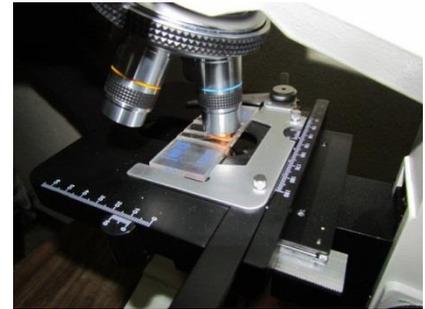
Guía para evaluar el rendimiento de *Beauveria bassiana*

1. Pesar la cantidad total de hongo cosechado por bolsa, por bandeja o por kilogramo de arroz que fue inoculado.
2. Determinar la concentración de conidias del hongo cosechado, para lo cual se debe contar el número de conidias por gramo de hongo cosechado utilizando una cámara de conteo Neubauer.
3. Preparar diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) del hongo, hasta obtener una dilución que permita realizar el conteo. Las diluciones se preparan de la siguiente manera:
4. Preparar seis tubos de ensayo con 9ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.01% y rotularlos debidamente indicando la dilución correspondiente (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).
5. En el primer tubo (10^{-1}) agregar un gramo del hongo cosechado y agitar la mezcla, obteniendo así la primera dilución.
6. En el segundo tubo (10^{-2}) agregar un ml de la mezcla del primer tubo y agitar la mezcla, obteniendo así la segunda dilución, rotulada como 10^{-2} .
7. Para obtener la tercera dilución (10^{-3}), se selecciona el tercer tubo (10^{-3}) y se le agrega un ml de la segunda dilución (10^{-2}). De esta manera se va procediendo hasta preparar la dilución adecuada 10^{-6} .
8. Para hacer el conteo de conidias se usa una cámara de conteo con rayado Neubauer. La cámara está dividida en 9 cuadros principales (CP) y el CP central está dividido en 25 cuadros secundarios.
9. Seleccionar la dilución 10^{-3} , agitarla vigorosamente, y con la ayuda de una micropipeta o de una pipeta Pasteur, colocar una gotita de la dilución en una cámara de conteo con rayado Neubauer.
10. Observar al microscopio si la cantidad de esporas es suficiente y si puede ser contada. Si se observan muchas esporas de modo que se dificulta el conteo, seleccionar la siguiente dilución 10^{-4} , repetir este paso hasta encontrar la dilución más adecuada para el conteo.



Cuadros principales (CP) y cuadros secundarios (CS) en el rayado Neubauer en la cámara de conteo

11. De la dilución seleccionada, con ayuda de una micropipeta o con una pipeta Pasteur, tomar una gotita de la suspensión y llenar la cámara de conteo con rayado Neubauer.
12. Haciendo uso del microscopio realizar el conteo de conidias, ubicándose en el cuadro principal (C.P) central, el cual está dividido en 25 cuadrillos secundarios.
13. Seleccionar cinco cuadrillos secundarios (las 4 esquinas y el central). Cada cuadrillo secundario está subdividido en 16 cuadrillos más pequeños. Estos cuadrillos sirven de guía al momento de ir contando las conidias del hongo. Contar el número de conidias en cada cuadrillo secundario, anotar la cantidad observada y obtener el promedio de conidias por CS. Es decir, sumar el número de conidias encontradas en los cinco CS observados y dividir entre cinco.
14. Realizar al menos 5 conteos para promediar el número de conidias observadas en cada conteo.
15. Para encontrar la cantidad de conidias por gramo, multiplicar el número promedio de conidias por cuadro secundario, por el factor de cámara (250,000 para CS), y al final multiplicar por el factor de dilución (1000 para la dilución 10^{-3} y 10,000 para la dilución 10^{-4}).



$$\text{No. de conidias/g} = \text{No. de conidias observada} \times \text{factor de cámara} \times \text{factor dilución}$$

Ejemplo: Si para el conteo se utilizó la dilución 10^{-4} y el promedio de conidias por CS encontrado fue de 50 conidias, entonces el número de conidias por gramo se obtiene de la siguiente forma:

$$\text{No. de conidias/g} = 50 \times 250,000 \times 10,000 = 1.25 \times 10^{11} \text{ conidias por gramo.}$$

Evaluación de viabilidad

1. Preparar cinco platos petri con papel filtro y junto con porta objetos, ponerlos a esterilizar.
2. Elaborar un medio de cultivo de agar-agua y esterilizarlo. Posteriormente con una pipeta pasteur depositar dos gotas del medio de cultivo en un porta objeto (una en cada extremo del porta-objetos).

3. Depositar con una pipeta pasteur una gota de la suspensión del hongo sobre cada gota del medio, y colocar el montaje en una cámara húmeda, colocando el papel filtro en el plato Petri y humedeciéndolo con agua estéril.
4. Colocar el montaje a temperatura entre 24 y 26 °C.
5. De 20 a 24 horas después de realizado el montaje, contar las conidias totales (germinadas y las no germinadas). Se deben observar como mínimo un total de 200 conidias por cada montaje.
6. Calcular el porcentaje de germinación, dividiendo el número de conidias germinadas entre el número de conidias totales y multiplicar por 100.

Elaboración de formulaciones

1. Pesar la cantidad de hongo (polvo cosechado), equivalente a un mínimo de 1×10^{12} conidias por manzana, dependiendo del área para la que vamos a formular ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, 1 mz, etc.).
2. Mezclar la cantidad de hongo pesado con el vehículo utilizado o con solvente emulsificante, en proporción 1:5 si es formulación sólida o 1:10 si es formulación líquida; agitar hasta homogenizar la mezcla. Esta proporción puede variar de acuerdo al rendimiento (conidias/g) del hongo, lo que se quiere es que el hongo quede bien distribuido en toda la formulación y que no afecte su aplicación.
3. Colocar etiquetas conteniendo: hongo, cepa, fecha de elaboración, fecha de vencimiento, indicaciones de uso, plaga y cultivo en que se debe utilizar.

Anexo 6. ANDEVA del número de *Plutella xylostella* en los tratamientos evaluados

Variable Dependiente: <i>Plutella xylostella</i> ($\sqrt{x + 0.5}$)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F	Pr > F
Trat	5	1.43565972	0.28713194	1.87	0.1873
Rep	2	0.1073031	0.05365155	0.35	0.7136
Trat*Rep (error a)	10	1.53721112	0.15372111	1.26	0.2643
Fec	9	5.57383025	0.61931447	5.06	<.0001
Trat*Fec	45	6.49676894	0.14437264	1.18	0.2421
Error	108	13.21235067	0.12233658		
Corrección total	179	28.36312381			
	R²	Coef. Var			
	0.534172	34.95365			

Anexo 7. Promedio de *P. xylostella* en diferentes fechas de muestreos

Fechas de muestreo cada 8 días	Promedio (Insectos por planta)	Categoría (Tukey, α: 0.05)
Muestreo 7	0.0389	A
Muestreo 6	0.2778	BA
Muestreo 4	0.3667	BAC
Muestreo 10	0.3889	BC
Muestreo 8	0.4722	BC
Muestreo 2	0.5111	BC
Muestreo 1	0.5833	BC
Muestreo 9	0.6167	BC
Muestreo 5	1.4444	C
Muestreo 3	1.8889	C

Anexo 8. ANDEVA del número de *Leptophobia* sp en los tratamientos evaluados

Variable Dependiente: <i>Leptophobia</i> sp ($\sqrt{x + 0.5}$)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F	Pr > F
Trat	5	1.47077136	0.29415427	1.87	0.1839
Rep	2	0.72751601	0.363758	2.33	0.1475
Trat*Rep (error a)	10	1.55983715	0.15598371	2.63	0.0066
Fec	9	4.26440824	0.47382314	8.00	<.0001
Trat*Fec	45	5.82481397	0.12944031	2.19	0.0005
Error	108	6.39714685	0.05923284		
Corrección total	179	20.24449358			
	R²	Coef. Var			
	0.684006	28.47922			

Anexo 9. Promedio de *Leptophobia* sp a en diferentes fechas de muestreos

Fechas de muestreos cada 8 días	Promedio (insectos por planta)	Categoría (Tukey, α : 0.05)
Muestreo 2	0.0000	A
Muestreo 1	0.0000	A
Muestreo 3	0.0056	A
Muestreo 5	0.0444	A
Muestreo 10	0.1833	AB
Muestreo 4	0.2889	AB
Muestreo 9	0.3611	AB
Muestreo 6	0.4889	AB
Muestreo 8	0.7722	B
Muestreo 7	1.2833	BC

Anexo 10. ANDEVA del número de *Diabrotica* sp en los tratamientos evaluados

Variable Dependiente: <i>Diabrotica</i> sp ($\sqrt{x + 0.5}$)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F	Pr > F
Trat	5	0.2392056	0.04784112	9.79	0.0013
Rep	2	0.00204089	0.00102044	0.21	0.8149
Trat*Rep (error a)	10	0.04885078	0.00488508	0.6	0.8088
Fec	9	0.25368225	0.02818692	3.48	0.0008
Trat*Fec	45	0.35204284	0.00782317	0.96	0.5428
Error	108	0.87575363	0.00810883		
Corrección total	179	1.77157599			
	R²	Coef. Var			
	0.505664	11.17741			

Anexo 11. Promedio de *Diabrotica* sp en diferentes fechas de muestreos

Fechas de muestreo cada 8 días	Promedio (insectos por planta)	Categoría (Tukey, α: 0.05)
Muestreo 1	0.0500	A
Muestreo 4	0.1111	A
Muestreo 2	0.1111	AB
Muestreo 7	0.1277	AB
Muestreo 9	0.1333	AB
Muestreo 8	0.1388	AB
Muestreo 5	0.2000	AB
Muestreo 6	0.2055	AB
Muestreo 10	0.2388	AB
Muestreo 3	0.2722	B

Anexo 12. ANDEVA del Número de cabezas de repollo en los tratamientos evaluados

Variable Dependiente: ($\sqrt{x + 0.5}$)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F	Pr > F
Trat	5	6.686137906	1.33722758	3.75	0.0549
Bloque	2	0.57179200	0.28589600	0.80	0.4757
Error	10	3.56870037	0.35687004		
Corrección total	17	10.82663027			
	R²	Coef. Var			
	0.670378	8.414846			

Anexo 13. Promedio de número de cabezas por ha en los tratamientos evaluados

Tratamientos	No. de cabezas/ha ± ES	Categoría (Tukey, α : 0.05)
No formulado	21852 ± 2.96	A
<i>B. bassiana</i> + Aceite sunspray	21481 ± 8.11	A
<i>B. bassiana</i> + Arcilla verde	21111 ± 1.53	A
<i>B. bassiana</i> + Talco	18888 ± 5.61	A
<i>B. bassiana</i> + Arcilla blanca	15185 ± 5.36	A
<i>B. bassiana</i> + Leche	14074 ± 0.67	A

Anexo 14. ANDEVA de peso de cabezas de repollo en los tratamientos evaluados

Variable Dependiente: ($\sqrt{x + 0.5}$)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F	Pr > F
Trat	5	0.05634173	0.01126835	4.37	0.0228
Bloque	2	0.02020334	0.01010167	3.92	0.0554
Error	10	0.02579208	0.00257921		
Corrección total	17	0.10233715			
	R²	Coef. Var			
	0.747970	2.554101			

Anexo 15. Promedio de peso por cabeza de repollo en los tratamientos evaluados

Tratamientos	Peso en kg por cabeza \pm ES	Categoría (Tukey, α : 0.05)
<i>B. bassiana</i> + Arcilla blanca	1.73 \pm 0.038	A
No formulado	1.63 \pm 0.113	AB
<i>B. bassiana</i> + Arcilla verde	1.56 \pm 0.139	AB
<i>B. bassiana</i> + Aceite sunspray	1.55 \pm 0.148	AB
<i>B. bassiana</i> + Talco	1.53 \pm 0.075	AB
<i>B. bassiana</i> + Leche	1.39 \pm 0.232	B

Anexo 16. Hoja para el muestreo integrado de plagas aplicada en el cultivo del repollo

Nombre del productor:											
Nombre de la finca:											
Edad del cultivo:						Clima:					
Tratamiento						Fecha:					
Bloque	Número de plantas										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Plutella x.											
Larvas											
Pre-Pupas											
Pupas											
Adultos											
Huevos											
Gusano rayado											
Larvas											
Pupas											
Huevos											
Spodoptera											
Larvas											
Áfidos											
Colonias											
Diabrotica											
E. Naturales											
Diadegma											
Mariquitas adultos											
Larvas											
Avispas											
Arañas											
Enfermedades											
X. campestri (Chamusco)											
Sclerotinia (Pudrición blanca)											
Alternaria											
Malezas											
TOTAL											
Observación											

Anexo 17. Plano de campo

T1	T2	T4	T6	T3	T5	Bloque I
----	----	----	----	----	----	----------

T2	T6	T1	T4	T5	T3	Bloque II
----	----	----	----	----	----	-----------

T4	T1	T6	T3	T5	T2	Bloque III
----	----	----	----	----	----	------------

Tratamiento	Formulación
1	Conidias de <i>B. bassiana</i> + Arcilla Blanca
2	Conidias de <i>B. bassiana</i> + Arcilla Verde
3	Conidias de <i>B. bassiana</i> + Talco
4	Conidias de <i>B. bassiana</i> + Leche en polvo
5	Conidias de <i>B. bassiana</i> + Aceite Sunspray 6E
6 Testigo)	Producto sin formular