

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN – León

Facultad de Ciencias y Tecnología

Ingeniería en Agroecología Tropical



Determinación de patogenicidad y virulencia de la cepa 114 de *Beauveria bassiana* vuill en diferentes concentraciones sobre larvas de *Plutella xylostella* en el Laboratorio de hongo entomopatógenos del Campus Agropecuario UNAN- León, del 2014.

PREVIO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
EN AGROECOLOGÍA TROPICAL

Presentada por:

Br. Gerald Antonio Álvarez García.

Br. Berna Priscila Rivera Pineda.

Tutores;

Ing. Luis Moreno

Lic. Marcia del Socorro Gómez

León, Febrero 2014

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Dedicatoria</b> .....	6
<b>Agradecimiento</b> .....	7
<b>Resumen</b> .....	9
<b>I. Introducción</b> .....	10
<b>II. Objetivos</b> .....	11
<b>III. Hipótesis</b> .....	12
<b>IV. Marco teórico</b> .....	13
4.1 Generalidades del cultivo .....	13
4.1.1 Taxonomía .....	13
4.1.2 Origen .....	13
4.2 Época de siembra .....	14
4.2.1 Densidad poblacional .....	14
4.3 Plagas del cultivo .....	14
▪ Plagas del follaje .....	14
4.4 Polilla del repollo .....	14
4.4.1 Taxonomía del repollo.....	14
4.4.2 Ciclo de vida del <i>Plutella xylostella</i> .....	15
▪ Los huevos y larvas .....	15
▪ Larvas .....	15
▪ Las pupas y palomilla adulta .....	15
4.5 Control .....	15
4.5.1 Control Químico.....	16
4.5.2 Manejo Integrado de Plagas.....	16
4.5.3 Control biológico .....	16
4.6 Hongo entomopatógenos .....	16

4.6.1 Historia de los hongos entomopatógenos.....	16
4.6.2 Uso de hongo entomopatógenos en Nicaragua.....	17
4.6.3 Uso de hongo entomopatógenos en repollo.....	17
4.7 <i>Beauveria bassiana</i> .....	18
4.7.1 Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i> .....	18
4.7.2 Características del hongo <i>Beauveria bassiana</i> .....	18
4.7.3 Uso de <i>Beauveria bassiana</i> .....	19
4.7.4 Condiciones en que puede actuar <i>Beauveria bassiana</i> .....	19
4.7.5 Ciclo de vida de <i>Beauveria bassiana</i> .....	20
• Fase patogénica .....	20
• Sintomatología .....	21
• Fase saprofítica .....	21
4.7.6 Modo de acción de <i>Beauveria bassiana</i> .....	21
4.7.7 Ventaja del uso del hongo entomopatógenos.....	21
4.7.8 Costo del uso del hongo entomopatógenos.....	22
<b>V. Materiales y método</b> .....	23
5.1 Ubicación del estudio .....	23
5.2 Recolección de muestra de <i>Plutella xylostella</i> .....	23
5.3 Desinfección del alimento .....	23
5.4 Preparación de la suspensión .....	23
5.5 Montaje de la prueba de mortalidad y esporulación de la cepa 114en	
Concentraciones 10 <sup>8</sup> 10 <sup>9</sup> 10 <sup>10</sup> .....	24
5.6 Montaje del bioensayo de patogenicidad .....	24
5.7 Mortalidad.....	25
5.8 Variable a medir .....	25
5.8.1 Tiempo de mortalidad .....	25

5.8.2 Porcentaje de mortalidad .....	25
5.8.3 Tiempo de esporulación .....	25
5.8.4 Porcentaje de esporulación .....	25
<b>VI. Resultado y discusión .....</b>	<b>26</b>
<b>VII Conclusión .....</b>	<b>36</b>
<b>VIII Recomendación .....</b>	<b>37</b>
<b>IX Bibliografía.....</b>	<b>38</b>
<b>X Anexos .....</b>	<b>41</b>
<b>Anexos de imágenes.....</b>	<b>41</b>
<b>Hoja de muestreos.....</b>	<b>43</b>
<b>Diseño de montaje del bioensayo.....</b>	<b>44</b>

## ÍNDICE DE GRAFICOS

<b>6.1 Grafica 1. Mortalidad concentración <math>10^8</math></b> .....	26
<b>6.2 Grafica 2. Mortalidad concentración <math>10^9</math></b> .....	27
<b>6.3 Grafica 3. Mortalidad concentración <math>10^{10}</math></b> .....	28
<b>6.4 Grafica 4. Promedio de Mortalidad concentración <math>10^8, 10^9, 10^{10}</math></b> .....	30
<b>6.5 Grafica 5. Esporulación concentración <math>10^8</math></b> .....	31
<b>6.6 Grafica 6. Esporulación concentración <math>10^8</math></b> .....	32
<b>6.7 Grafica 7. Esporulación concentración <math>10^8</math></b> .....	33
<b>6.8 Grafica 8. Promedio de Esporulación concentración <math>10^8</math></b> .....	34

## DEDICATORIA

Esta investigación se la dedicamos a **Dios** nuestro padre celestial, por darnos vida, sabiduría, fuerzas, y perseverancia y por habernos permitido finalizar nuestros estudios, y además lograr cumplir nuestros objetivos.

**A nuestras familias** por todo el apoyo incondicional que nos brindaron mientras nos educábamos profesionalmente, y al realizar esta investigación, así también por los ánimos que nos brindaron para poder seguir adelante con la presente investigación.

**A nuestros tutores** Ing. Luis Moreno y Lic. Marcia Gómez (Docentes de la carrera de Ingeniería en Agroecología Tropical) que brindaron confianza en nosotros y nos dieron su apoyo al realizar la presente investigación.

*Berna Priscila Rivera Pineda*

*Gerald Antonio Álvarez García*

## AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme dado la vida, la salud y sobre todo por permitirme finalizar mis estudios.

Les agradezco a mis padres María del Rosario García Montes y Lázaro Antonio Álvarez Bojorge por su amor, apoyo y esfuerzo durante mis estudios.

Le agradezco a mi esposa Yorlene Verónica Salgado Silva por su amor, comprensión, apoyo y motivación incondicional para culminar mis estudios.

A mis maestros Lic. Marcia del Socorro Gómez y el Ing. Luis moreno por su apoyo y motivación.

A mis maestros MSc. Miguel Bárcenas, MSc. Jorge Luis Rostran, Ing. Edwin Alemán y el Ing. José Ernesto Escobar por su apoyo, motivación y haberme mostrado el camino de la superación.

*Gerald Antonio Álvarez García*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a **Jehová Dios**, padre creador y dador de vida que me prestó tiempo, paciencia y salud para poder este trabajo investigativo.

A mi familia y en especial a **mis padres Marvin Rivera** por haberme apoyado a lo largo de toda mi vida para continuar mis estudios y así culminarlos, así como mi madre **Berna María Pineda Somarriba** que con paciencia y sabiduría me brindó apoyo y consejos que fueron de gran ayuda y fortaleza.

A **los docentes** que en el transcurso de mis estudios me brindaron apoyo y herramientas necesarias para enfrentar obstáculos en la formación profesional e integral.

A nuestros tutores **Lic. Marcia Gómez e Ing. Luis Francisco Moreno** por el tiempo, experiencia y conocimiento brindado durante este trabajo.

Al **Ing. Freddy Fuentes** por habernos apoyado al inicio para poder ejecutar el ensayo.

A mi directora **Ing. Eva Gutiérrez y el Ing. Mauricio Hernández** que me brindaron apoyo para generar más conocimientos y experiencias.

*Berna Priscila Rivera Pineda*



## RESUMEN

En Nicaragua los productores para el control de *Plutella xylostella* utilizan principalmente productos químicos, realizando de 8-15 aplicaciones, provocando de esta forma altos costo de producción en el cultivo y principalmente resistencias de las plagas hacia los productos químicos. La presente investigación se realizo con el objetivo de evaluar la patogenicidad y virulencia de la cepa 114 de *Beauveria bassiana* vuill en tres concentraciones  $10^8$   $10^9$   $10^{10}$  sobre larvas de *Plutella xylostella* en el laboratorio de hongo entomopatógenos del campus agropecuario UNAN- León 2012. La metodología del trabajo se realizo con la recolección de insecto en el departamento de Estelí, en el laboratorio Eco Posada Tisey, Recolectando 300 larvas. La técnica de reactivación de las cepa 114 consiste en someter al hospedero a una concentración del hongo utilizando la técnica de inmersión, se utilizaron 75 larvas por concentración. La cepa 114 de *Beauveria bassiana* causo mortalidad entre 81.33% y el 92% en *Plutella xylostella* iniciando esta mortalidad a los tres días y alcanzando los mayores porcentaje de mortalidad entre los 9 y 11 días después de inoculada, la esporulación alcanzada en los insectos expuestos es de 53.33% y 61.2 %, en conclusión la cepa 114 de *Beauveria bassiana* es patogénica a *Plutella xylostella* con una mortalidad del 87.99 % y una esporulación promedio de 58.17% estos resultados son satisfactorio por lo que puede ser utilizado como una opción de manejo en *Plutella xylostella*.

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo repollo *Brassica oleracea* var. *Capitata* pertenece a la familia de las *Cruciferas* (*brassicaceae* en la actualidad). Es producido por pequeños y medianos productores y sus mayores áreas de siembra se concentran en la zona norte del país, Jinotega, Matagalpa, Sebaco, Concepción, Estelí y Crucero, donde constituye una actividad de gran importancia económica. (CATIE 2002).

Los insectos plagas pueden llegar a ser uno de los principales factores de la pérdidas económicas o bajos rendimientos, y como principal plaga de daño se clasifica la comúnmente llamada palomilla o polilla del repollo *Plutella xylostella*. En las zonas donde se produce este cultivo, los productores utilizan productos químicos de forma indiscriminada, para el control de *Plutella xylostella*, debido a que el objetivo del productor es poder alcanzar el máximo rendimiento de su cultivo, es por eso que hace uso de productos de forma indiscriminada.

Existen nuevas prácticas que pueden contribuir a los procesos productivo, utilizando tácticas como el uso de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, al igual que el uso de plaguicidas botánico, como aceite de neem. (INTA 2008).

En Nicaragua los productores utilizar grandes dosis para el control de *Plutella xylostella*. Es por ello que el INTA en el año 2008 realizo una investigación con el hongo entomopatógenos *Beauveria bassiana* donde probaron la efectividad del hongo contra *Plutella xylostella* (INTA 2008, Trabanino 1998).

Con este trabajo se pretendió investigar si el hongo entomopatógenos *Beauveria bassiana* y el producto botánico aceite de neem son alternativas eficientes para el manejo de *Plutella xylostella* ya que esta es la plaga principal que afecta el cultivo repollo así obtener buenos resultados en los rendimientos. De esta manera estaremos contribuyendo con los productores de repollo a obtener mejores resultados en sus cultivos con la disminución en los costos de producción y control de la *Plutella xylostella* de una forma inocua para el hombre y el medio ambiente.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la patogenicidad y esporulación de tres concentraciones de *Beauveria bassiana* ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ) en larvas de *Plutella xylostella*, en el laboratorio de hongo entomopatógenos, Campus Agropecuario de la UNAN – León 2012.

### Objetivos específicos

- Evaluar el tiempo de mortalidad causado por el hongo *Beauveria bassiana* en *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio.
- Comparar la patogenicidad de las concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ) del hongo *Beauveria bassiana* en *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio.
- Determinar las concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ) de *Beauveria bassiana* que provoca el mayor porcentaje de esporulación en larvas de *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio.

### III. HIPÓTESIS

$H_0$ : En todas las concentraciones  $10^8$   $10^9$   $10^{10}$  tendrán igual porcentaje de mortalidad y esporulación sin tener ninguna diferencia significativa en el bioensayo

$H_a$ : Al menos en uno de los tres concentraciones  $10^8$   $10^9$   $10^{10}$  se obtendrán diferencias significativas tanto en la mortalidad y esporulación.

## IV. MARCO TEORICO

### 4.1 Generalidades del cultivo

#### 4.1.1 Taxonomía

Nombre científico: *Brassica oleracea*.

Clase: *Dicotiledónea*

Subclase: *Dillenidae*

Familia: *Cruciferas (brassicaceae en la actualidad)*

Género: *Brásica*

Especie: *Olerácea*

Orden: *Caparales*

El repollo es una de las hortalizas que más se consume en Nicaragua, también es un cultivo que sufre del ataque de varias plagas y enfermedades. En Nicaragua, se han realizado investigaciones para desarrollar conceptos y tecnologías para el manejo integrado de plagas, mucho de los cuales están implementados por los productores en algunas comunidades donde se han desarrollado actividades dirigidas a mejorar el manejo de plagas en el cultivo de repollo (CATIE 1999).

#### 4.1.2 Origen

La mayoría de los miembros de la familia del repollo, tienen su origen en la zona del Mediterráneo, Así a menor, Inglaterra y Dinamarca. (Trabanino 1998).

### 4.2 Época de siembra

Por los requerimientos de temperaturas que tiene la planta de repollo en las diferentes etapas de su desarrollo es considerada para corrientes un cultivo de otoño invierno, finalizando la cosecha en noviembre diciembre para aquellas siembras realizadas durante el mes de julio.

Cuando no se dispone de riego, se cultiva durante la época de lluvias; si se dispone de riego se pueden trasplantar en cualquier época del año (INTA 2008).

#### **4.2.1 densidad poblacional**

Para el establecimiento de la plantación, ya sea en surcos o en eras, la distancia entre plantas es 25 cm y la distancia entre líneas de siembra varía entre 25 cm y 40 cm; en épocas con mucha humedad se prefiere 40cm de separación y entre camas es de 1,20 cm para una as densidad de 30,000 plantas por hectárea (INTA 2008).

### **4.3 Plagas del cultivo**

Las plagas del cultivo de repollo la podemos encontrar como insectos en distintas partes de la planta, estas se pueden clasificar como:

- **Plagas del follaje:** en las hojas de las plantas, como gusano grasiento, *Spodoptera* sp, Pulgón del repollo, Gusano del repollo.

**Polilla del repollo** es la plaga que ocasiona grandes pérdidas económicas su nombre científico es *Plutella xylostella* (Lepidoptera)

### **4.4 Polilla del repollo**

#### **4.4.1 Taxonomía**

Nombre científico: *Plutella xylostella*.

Nombre común: palomilla dorso de diamante, palomilla del repollo

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Plutellidae

#### **4.4.2 Ciclo de vida de la *Plutella xylostella***

##### **➤ Los huevos y lavas**

Estos huevos, a los tres días, revientan en unos gusanitos que bien pueden llegar a medir media pulgada. En los primeros días, son de color amarillo pálido y después cambian a un verde oscuro. En esta etapa es cuando se dedican a comer y comer las hojas y flores no sólo de repollo, sino también de brócoli y coliflor.

##### **➤ Larvas**

Las larvas pueden medir hasta 10 milímetros de largo, es de color verde claro y cuando se realizan movimientos en las hojas ella se mueve dando pequeños saltos. La presencia se puede dar en cualquier época del año aunque los ataques más intensos ocurren en los meses de mayores temperaturas. Las larvas se alimentan de las hojas y brotes tiernos, en las hojas siempre se ubican en la cara inferior y es allí donde se alimentan, dejando únicamente las nervaduras y quedando las hojas totalmente perforadas. En todas las zonas productoras de repollo es considerado el insecto que ocasiona las pérdidas económicas más importantes.

##### **➤ Pupas y palomillas adultas**

Entre los 12 y 18 días, los gusanos se envuelven en un capullo o pupa de seda, el adulto es una pequeña mariposita de color gris claro, que tiene un vuelo bajo y corto, deposita los huevos en la cara inferior de las hojas del repollo cinco días pasan en esta etapa porque después sale una palomilla de cada capullo. Son una miniatura de papalotitos, su tamaño es como el de un grano de arroz de color cafecito con manchas grises, que salen a buscar cómo emparejarse, y después poner huevos, allí inicia el ciclo de vida de nuevo.

### **4.5 Control**

#### **4.5.1 Químico**

La mayor parte de los productores de repollo toman la decisión de realizar numerosas aplicaciones de insecticidas, ya que tradicionalmente cuando se observan las primeras larvas sobre el cultivo se debe iniciar el control utilizando los siguientes productos y sus dosis:

- Carbaril 85 % 400 gramos en 100 litros de agua.
- Deltametrina 2,5% 60 c.c. en 100 litros de agua.
- Engeo 75cc en 100 litros de agua

#### **4.5.2 Manejo Integrado de Plagas**

En el cultivo de repollo el uso de hongos entomopatógenos se combina con muestreos y uso de productos botánicos como Neem, y microbiales como Dipel y control biológico con liberación de parasitoides de la plaga la plaga que afecta, El uso de este hongo constituyen alternativas eficientes de manejo de las plagas: si se usan adecuadamente pueden ser eficiente como cualquier otro insecticida. Se reducen los riesgos de contaminación al ambiente, el suelo, el agua, por ser productos elaborados a base de un organismo vivo no sintético, no contamina el ambiente; además se reducen los riesgos de intoxicaciones, ya que los hongos entomopatógenos no afectan la salud de los trabajadores, ni de los animales domésticos.

#### **4.5.3 Control biológico**

Se pueden utilizar los mismos productos *Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis* y hay otros productos que incluyen parasitoides, depredadores, indicados para el control del gusano del repollo, donde lo más importante es detectar a tiempo la presencia de la plaga para iniciar los tratamientos ya que se trata de un insecto muy voraz que en pocos días puede ocasionar daños significativos y pérdidas económicas (Trabanino 1998).

### **4.6 Hongo entomopatógenos**

#### **4.6.1 Historia**

El empleo de hongos entomopatógenos en campo comenzó a finales del siglo XIX. Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. El género más estudiado para el control de plagas es: *Beauveria bassiana*, el cual fue uno de los primeros hongos entomopatógenos en ser descritos. Este hongo es conocido desde 1836 como el agente causal de la “muscardina blanca” en los gusanos de seda *Bombix mori* L, desde entonces es considerado un organismo importante en el control biológico de insectos. El hongo fue descubierto por Bassi de Lodi, el que mostro a



la naturaleza patogénica y contagiosa del hongo, infestando al gusano de la seda y también desarrollo medida para controlar la enfermedad. *Beauveria bassiana* es conocido por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica. Su patogenicidad se ha probado contra más especies de insectos que cualquier otro hongo (Bustillo, 1991).

#### **4.6.2 Uso de hongos entomopatógenos en Nicaragua**

En Nicaragua se han alcanzado logros importantes en este campo, de manera que cada día la demanda de este tipo de productos aumenta debido a que los consumidores demandan cada vez más, productos de consumo, libres de residuos de plaguicidas.

El uso de hongos entomopatógenos debe considerarse como parte de programas de Manejo Integrado de Plagas y no como una medida unilateral de manejo de las plagas. Además es importante tomar en cuenta que los productos a base de hongos son una medida de supresión directa, cuya efectividad depende del contacto con la plaga, si no se logra establecer dicho contacto no hay control, por lo que al momento de realizar una aplicación se debe garantizar la calidad de la misma, tomando en cuenta que factores son favorables para estos productos; además hay que considerar que por tratarse de organismos vivos, son afectados por los rayos ultravioleta, por lo que al ser expuestos al sol sufren degradación; además hay que estar claros que debido a la velocidad de su acción, su efecto inmediato y otras propiedades, estos productos no son sustitutos de los insecticidas químicos sintéticos (FUNICA 2001).

#### **4.6.3 Uso de hongos entomopatógenos en repollo**

Con el uso de hongos entomopatógenos se protegen los enemigos naturales, debido a que son productos bastante específicos y su acción no es inmediata. Los productos agrícolas se obtienen libres de residuos tóxicos: por tratarse de un organismo vivo no deja residuos en los cultivos, por lo tanto los consumidores pueden estar seguros que los productos que consumen no tienen problemas de residuos químicos.

Es el hongo más utilizado para el control de *Plutella xylostella* por su mejor eficiencia por lo cual, se recomienda hacer un tratamiento de *B. bassiana*, en este se puede recomendar hacer aplicaciones realizadas cada cuatro días, utilizando concentraciones de  $10^{12}$  conidias por hectárea, también se debe continuar los muestreos poblacionales y acompañarlos con otro tratamiento de 3 aplicaciones seguidas de la manera mencionada (UNA 2000).

Este tipo de aplicación asegura una mejor efectividad que las aplicaciones realizadas con dosis mayores pero calendarizadas o de la forma tradicional. En algunas de las técnicas de aplicación se utilizan los mismos equipos y boquillas usadas para hacer aplicaciones convencionales. Otras técnicas involucran la aplicación utilizando trampas atrayentes impregnadas con el hongo como es el caso de trampas de pseudotallo que son utilizadas para atraer al picudo del plátano (*Cosmopolites sordidos*) (INTA 2008)

## **4.7 *Beauveria bassiana***

### **4.7.1 Taxonomía**

Reino: *Fungi*

División: *Ascomycota*

Clase: *Hordariomycetes*

Orden: *Hipocreales*

Familia: *Clavicipitaceae*

Género: *Beauveria*

### **4.7.2 Características del hongo**

Este hongo presenta unas estructuras que son visibles al microscopio llamadas fiálidas o células conidiógenas que tienen una base globosa o sea en forma de botella y se extienden apicalmente en grupos densos. Estas fiálidas presentan un raquis que es denticulado en zig-zag y se extiende apicalmente con un conidio por denticulo.

El conidio es aceptado, globoso y menor a 3.5 mm para *B. bassiana* y ovoides a cilíndricos con 2.5 a 4.5 mm para *B. brongniarti*. El micelio es de color blanco y los conidios presentan una coloración blanca a crema. Los cadáveres de insectos infectados por *B. bassiana*, presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y esporulación del hongo. Generalmente, los cadáveres de insectos atacados se momifican quedando adheridos en la planta, principalmente en el envés de la hoja (Díaz 1999).

*Beauveria bassiana* produce varias toxinas siendo las principales los ciclo de psipeptidos entre los cuales están la Beauvericina, el beauverolide H e I, el bassianolide, el isarolide A, B y C. Todas estas son aisladas del micelio de *B. bassiana*. Beauvericina es el compuesto que ha recibido más atención. Ha demostrado ser tóxico a moscas y mosquitos en pruebas realizadas en laboratorio. Esta toxina ayuda a romper el sistema inmunológico del hospedante (INTA 2006).

#### **4.7.3 Uso de *Beauveria bassiana***

El uso de este hongo es ventajoso ya que controla otro tipo de plagas que puedan a llegar a hospedarse; *Beauveria bassiana* (muscardina blanca), infecta una gran diversidad de familias de insectos pero especialmente Coleópteros y Lepidópteros. Entre las plagas para las cuales se aplica más *B. bassiana*, están la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), el picudo del algodón (*Anthonomus grandis*), el picudo del chile (*Anthonomus eugenii*), el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), *Cydia pomonella* en manzana, el barrenador europeo del maíz (*Ostriniana bilialis*), un gusano de los pinos (*Dendrolimus spp.*), la broca del café (*Hypotenemus hampei*), el picudo de la caña de azúcar (*Metamazius hemipterus*), el gorgojo de la caña de azúcar (*Sphenophorus levis*), el barrenador gigante de la caña de azúcar (*Castnialicus*), el picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*) y diferentes especies de chinches y salta monte (INTA 2008).

#### **4.7.4 Condiciones en que puede actuar *Beauveria bassiana***

Las condiciones óptimas para la germinación son: temperatura de 23 a 25 °C y humedad del 92%. El conidio germina originando un tubo germinativo en cuyo extremo se diferencia un

apresorio cuya función podría ser debilitar la cutícula en los puntos de contacto o simplemente es una transición hacia la formación del pico o estaquilla de penetración (FUNICA 2001).

#### **4.7.5 El ciclo de vida de *Beauveria bassiana***

Comprende dos fases, una patogénica y la otra saprofítica.

##### **a) La fase patogénica**

Involucra cuatro pasos principales: adhesión, germinación, diferenciación y penetración. El proceso de infección se inicia con la unión de los conidios del hongo a la cutícula del insecto. Existen sitios preferenciales del tegumento del insecto hospedante donde los conidios se adhieren, germinan y penetran. Estos lugares corresponden a las regiones inter-segmentales del insecto donde la composición y estructura es sensiblemente diferente al resto del tegumento.

El hongo ingresa a través de la cutícula, principalmente por las partes frágiles con la participación de procesos físicos y químicos a través de las enzimas producidas durante la germinación y penetración como son quitinasas, proteasas y lipasas, que actúan en un orden determinado por el sustrato de la cutícula, primero sobre la porción cerosa de la epicutícula y luego sobre la matriz de proteína y quitina. Previo a la penetración del hongo, hay una actividad metabólica a nivel de apresorio que ayuda a degradar la capa cerosa de la epicutícula probablemente con enzimas proteasas, amilopeptidasas y estererasas que facilitan el proceso de penetración. Otra vía de entrada es a través del tracto digestivo, pero generalmente los conidios no pueden germinar en el intestino.

El modo de acción es por la multiplicación del hongo en el interior del hospedero conduce a la producción de hifas y blastosporas y a la producción de toxinas que en conjunto van a provocar la enfermedad y la muerte del insecto. Esta ocurre por la acción física del micelio mismo invadiendo los órganos y tejidos, comenzando por el tejido gástrico y también por la caída o desbalance de nutrientes y por la acción insecticida de los metabolitos tóxicos emitidos por el hongo, principalmente la Beauvericina.

## **Sintomatología**

Los insectos antes de sucumbir a la infección, exhiben varios síntomas incluyendo intranquilidad, cese de alimentación y pérdida de coordinación. Puede haber cambios en la coloración del tegumento. Los insectos enfermos, generalmente, se mueven hacia lugares altos como la vegetación o si son subterráneos, hacia la superficie del suelo donde van a permanecer hasta su muerte y luego como cadáveres adheridos a las hojas (UNA 2000).

### **b) En la fase saprofítica**

Ocurre dentro del hemocele, con un crecimiento prolífico del hongo. Esta multiplicación del hongo ocurre por gemación produciendo formas micelianas libres y unicelulares llamadas blastosporas y también la producción de hifas finalmente, el hongo invade los tejidos y como consecuencia ocurre la muerte del hospedante. Después de la muerte ocurre una fase de crecimiento micelial hacia el exterior que concluye con la producción de nuevas unidades reproductivas (conidios) sobre la superficie y rodeando el cadáver del insecto (FUNICA 2001).

#### **4.7.6 Modo de acción de *Beauveria bassiana***

Los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto, el hongo es capaz de penetrar dentro del insecto e invadirlo, provocándole la muerte por micosis. Estos hongos producen sustancias líticas y toxinas que ayudan a la penetración y a inhibir los mecanismos de defensa de los insectos aun cuando muchas de estas toxinas se producen solo en el interior del insecto. Se ha demostrado que muchas especies de hongos pueden producir durante su reproducción metabolitos bio - activos con efectos insecticidas, lo que potencia su acción. Alves (1986)

#### **4.7.7 Ventaja del uso de hongos entomopatógenos**

Los agentes microbiológicos en particular los hongos entomopatógenos ofrecen varias ventajas en el control de plagas: bajos costos de producción, bajo impacto ambiental, en particular no tienen efectos secundarios sobre organismos acuáticos y animales de sangre caliente son más selectivos que los productos químicos adecuados para usarse en áreas de producción orgánica y áreas protegidas, la eliminación de residuos es relativamente fácil,

basta con exponer el producto al sol para que las esporas se activen casi total mente. (Milner y hunter; 2001, Jenkin et, al 1998, citado por Barrientos 1998)

#### **4.7.8 Costo del uso de hongos entomopatógenos**

Los costos pueden resultar más bajos, tanto para el país como para los usuarios, debido a que si se usan correctamente se puede requerir de menor número de aplicaciones, además que no se requiere de inversión de divisas por que pueden ser producidos localmente (FUNICA 2001).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Ubicación del estudio**

El estudio se realizó en el laboratorio de hongos entomopatógenos del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos ubicado en el Campus Agropecuario de la UNAN- León, durante el periodo 2012.

El laboratorio presentó temperatura entre los 25- 27 °C y una humedad relativa de 80%. (Durante el tiempo que se estuvo evaluando la temperatura era regulada entre las horas de la 8 de la mañana hasta las 5:30 ó 6:00 de la tarde, durante los quince días que duró el ensayo.

### **Recolección de muestra de *Plutella xylostella***

La recolección de insecto para evaluar, se efectuó en el departamento de Estelí, en el laboratorio Eco Posada Tisey. En el periodo de septiembre del 2012, recolectando 300 larvas colocándola en tasas plásticas con alimento (hojas de repollo), luego se trasladan al Campus Agropecuario donde se procede a la selección de larvas según el estado L2 (longitud de 2 mm) para montar el bioensayo.

### **Desinfección de alimento**

Para alimentar a las larvas se utilizaron hojas de repollo, desinfectados hipoclorito de sodio a razón de 2%, luego dejándolos secarse en papel toallas, y se colocaron en platos petri plásticos esterilizados y se les colocaron las larvas ya desinfectadas e inoculadas con el hongo preparado.

### **Preparación de la suspensión fungosa y conteo de conidias**

De la **cepa 114** de una bolsa de *Beauveria bassiana*, tomamos 10gr de esta y la diluimos con agua (250ml) en un beaker de 250 ml agitándolo previamente dentro de la cámara húmeda para que estos desprendieran las conidias.

Para realizar el conteo de conidias de la solución anterior se tomaron 10ml de la solución colocándose un ml en la cámara de Neubauer y utilizando el microscopio óptico, la cámara contiene una serie de cuadrantes, el conteo lo realizaremos en los cuadrantes más pequeños

que tienen un factor de  $4 \times 10^6$  se contaron 5 puntos de la cámara, los extremos y el centro para un total de 25 cuadros pequeños con cuatro repeticiones de cada muestra.

**La fórmula para determinar la concentración de conidias por ml de disolución** es dada por  $N \times 10 \times 25 \times 10,000$ , donde  $N$  = promedio de conidias encontradas de cada muestreo, 10 es el factor de disolución a utilizar, 25 es el número de cuadrante y 10,000 es una constante.

De acuerdo al tipo de concentración encontrada se determinará si se aumentará o bajarán el porcentaje de conidias.

### **Montaje de la prueba de mortalidad de la cepa 114 en concentraciones $10^8$ $10^9$ $10^{10}$**

La técnica de reactivación de la cepa 114 consiste en someter al hospedero a una concentración del hongo utilizando la técnica de inmersión, se evaluará la mortalidad causada en base a la esporulación del hongo en el cuerpo del insecto muerto, las larvas muertas por el efecto del hongo se separarán a esporulación en medios de cultivo con PDA (Papa Dextrosa Agar) para obtener inóculo primario reactivado en el hospedero y de esta manera pasar a la prueba de patogenicidad.

### **Montaje de bioensayo de patogenicidad**

Se utilizó la concentración  $10^8$ , pero para garantizar tener las concentraciones  $10^9$   $10^{10}$  en base a la concentración encontrada tomando en cuenta el resultado obtenido en el conteo de conidia se procederá a aumentar la dosis que se utilizó para la primera concentración.

El método que se utilizó para el bioensayo es el de inmersión de las larvas de *Plutella xylostella* en la suspensión de conidias durante dos a tres segundos, luego los insectos se escurrieron sobre papel toalla para eliminar el exceso de la suspensión sobre sus cuerpos y se trasladaron a las tasas plásticas transparentes de bioensayo colocando 5 larvas con alimento fresco, (trozos de hoja de repollo) libre de insecticidas. Luego se colocaron en un lugar favorable para el desarrollo del hongo.

Para esta concentración se realizó tres pruebas de patogenicidad, en el cual utilizó 25 larvas para cada prueba y teniendo en total 75 larvas por concentración.



## **Mortalidad**

La toma de datos se realizo cada dos días a partir del primer día hasta los 15 días después de la inoculación y se contabilizaron los insectos vivos y los muertos en base a la esporulación del hongo en el cuerpo del insecto.

Una vez hecha la infección se procedió a observar el tiempo de mortalidad y tiempo de esporulación del hongo en las larvas; ya muertas las larvas se trasladaron a cámara húmeda para observar su esporulación para evitar una contaminación del hongo.

## **Variables medidas**

### ➤ **Tiempo de mortalidad**

Esto se realizo desde el momento de inoculación de la larva hasta observar el último insecto muerto en cada una de las repeticiones. Se observo que a los tres días las larvas en cada una de las repeticiones iniciaban a morir, al igual que en todas las repeticiones se obtuvo el último dato de mortalidad al treceavo día.

### ➤ **Porcentaje de mortalidad:** Se calculo mediante la siguiente fórmula:

$M\% = \text{Número de larvas muertas por réplica} \times 100 / \text{larvas evaluada (25)}$ .

### ➤ **Tiempo de esporulación**

Se evaluó desde la mortalidad de las larvas hasta que las larvas estaban completamente esporulados en cada una de las concentraciones. (Desde que iniciaron las larvas a esporular, hasta que ya no haya presencia de larvas con germinación de hongos).

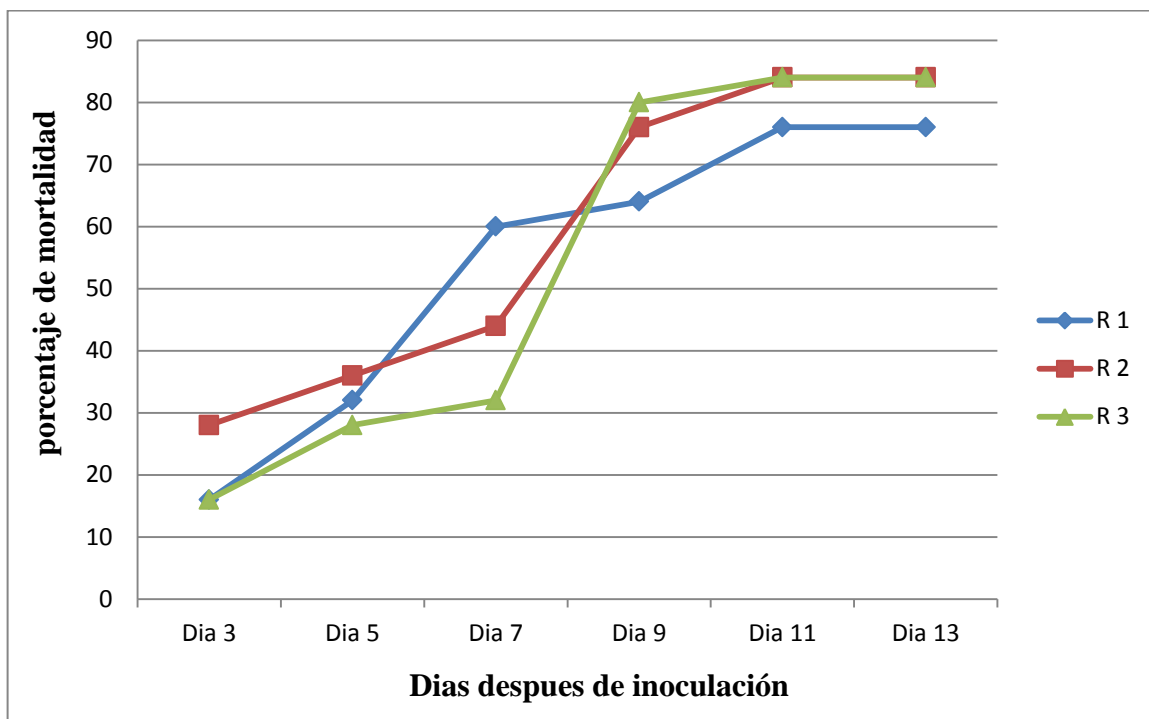
### ➤ **Porcentaje de esporulación**

En cada repetición se colocaron las larvas muertas en platos petri, colocado en la cámara humedad se observaron cuantos esporulan, este se medio en porcentaje en cada una de las repeticiones.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

El ensayo de patogenicidad y virulencia fue montado en el Campus Agropecuario, en el laboratorio de hongos entomopatógenos en el periodo de quince días del cuatro al 18 de noviembre 2012

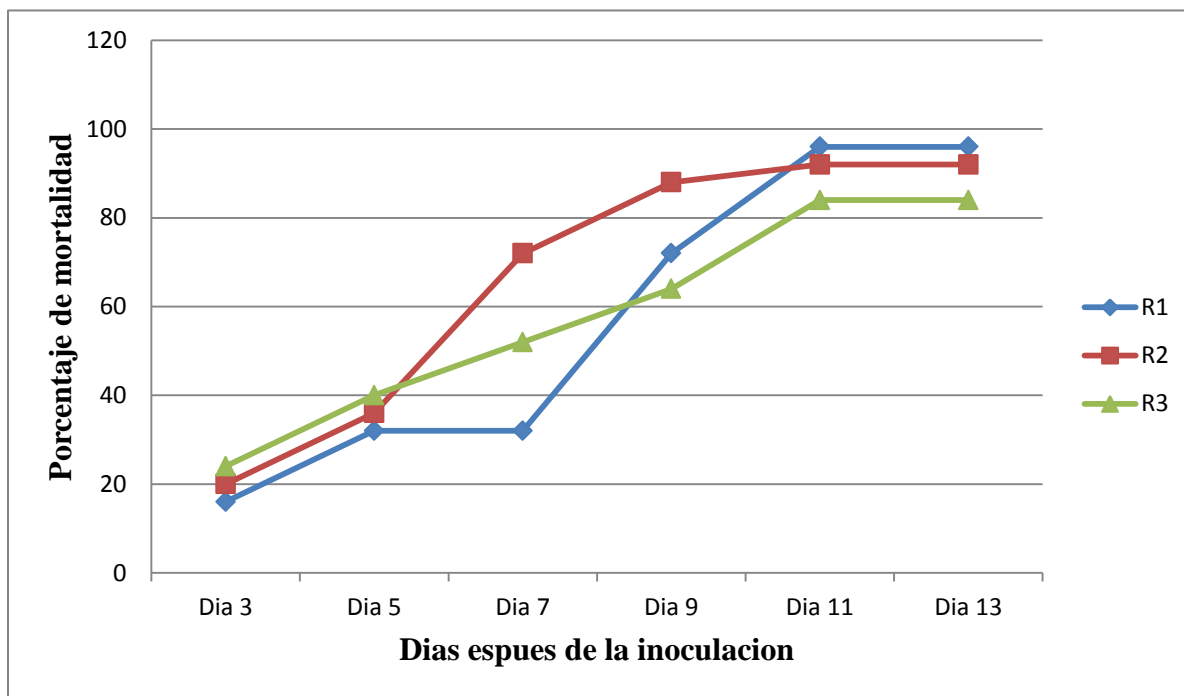
Los rangos de temperatura correspondiente al periodo de evaluación era de 26-27 °C y la variación de temperatura eran solo de un grado. Se considera que los rangos de desarrollo del hongo es de Las condiciones óptimas para la germinación son: temperatura de 23 a 25 °C y humedad del 80% (FUNICA 2006).



En el gráfico 1. La mortalidad de los insectos con la concentración  $10^8$  ml. Inicia a los 3 días después de la inoculación, la repetición 1 obtuvo una mortalidad de 16% al igual que la repetición 3, mientras que la repetición 2 obtuvo una mortalidad de 28%, obteniendo así una mayor mortalidad en los primeros 3 días después de inoculación, luego a los 9 día después

de la inoculación, se observó que la mortalidad de la réplica 3 presentaba 80% de mortalidad de larvas, siendo esta mayor en comparación con la repetición 1 y 2, luego al 11 día después de la inoculación la réplica 3 alcanzó una mortalidad del 84% al igual la réplica 2 siendo estas mayores en comparación con la réplica 1 que una mortalidad del 76%.

Estos resultados se relacionan con los encontrados por Ferrán (1978), en la cual afirma que existe una correlación positiva entre el número de esporas infectivas y la mortalidad, además menciona que las concentraciones  $10^8$  y  $10^7$  conidias/ml es efectivo y se podría usar, lo que permite gastar menor cantidad de polvo de conidias para obtener un alto porcentaje de mortalidad de larvas esto significa cien veces menos peso del polvo de conidias a las concentraciones  $10^8$  y  $10^7$ , con respecto a las concentraciones  $10^9$  y  $10^{10}$ .



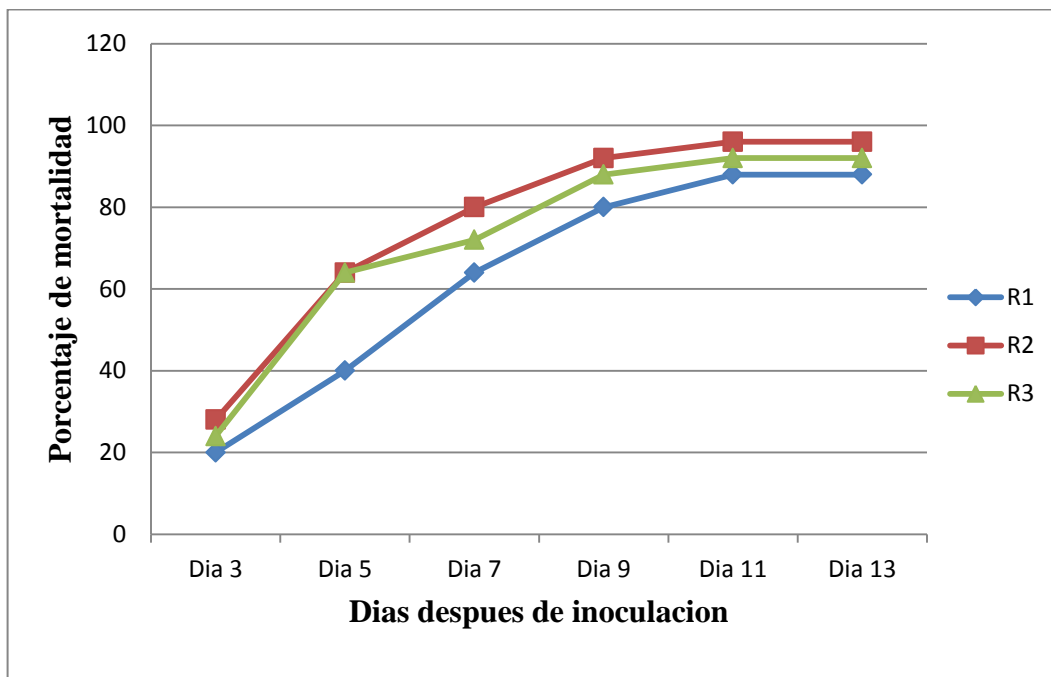
**Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* inoculadas con *Beauveria bassiana*, concentración  $10^9$  conidias/ml. cepa 114, en condiciones de laboratorio.**

El gráfico 2. Muestra la diferencia de porcentaje de mortalidad en cada uno de las replicas de la concentración  $10^9$  en esta gráfica se observar que a los tres el día de inoculación las larvas

de *Plutella*, iniciaron a morir las larvas con una mortalidad del 24%, en la réplica 3 seguida de la réplica 2 con un 20 %, y la réplica 1 con un 16%, luego en el día 7 de inoculación la mortalidad de la réplica 2 presento una incrementación al 72% de mortalidad, a diferencia de las otras réplicas que presentaban solo el 52% en la réplica 3 y 32% en la réplica 1.

Posteriormente en el día 11 de inoculación la réplica 1 concluyo el periodo de mortalidad teniendo en total 96% de las larvas muertas mientras que las otras dos réplicas obtuvieron mortalidad del 92% la réplica 2 y un 84% la réplica 3. En esta gráfica se puede observar que la réplica 1 fue mejor que las otras dos réplicas debido a que obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad en la finalización del periodo de experimentación del en su duración de 15 días.

Según Alves (1986), la patogenicidad está afectada por el estado de susceptibilidad del hospedero y a las condiciones ambientales del bioensayo, por lo que se pueden tener respuestas de mortalidad diferentes con el mismo hospedero y la misma cepa de *Beauveria*.

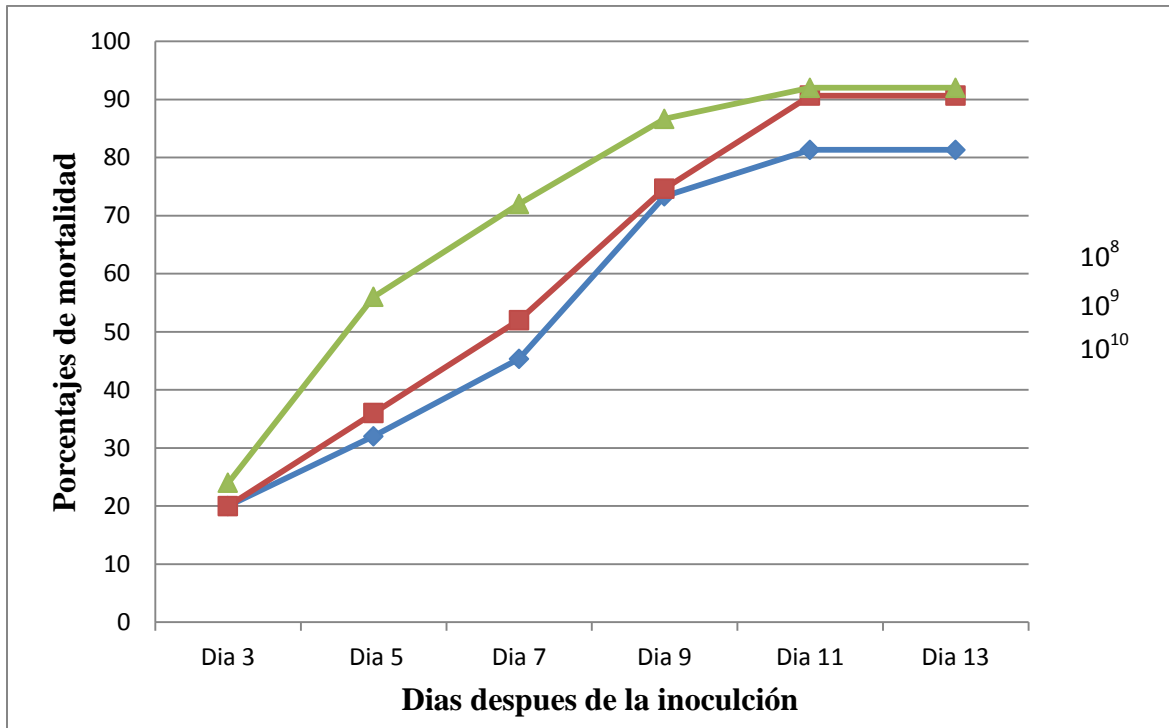


**Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* inoculadas con *Beauveria bassiana*, concentración  $10^{10}$  conidias/ml. cepa 114, en condiciones de laboratorio.**

El gráfico 3, Podemos observar el comportamiento de la mortalidad de larvas en el ensayo de la concentración  $10^{10}$ , se observa que en las tres réplicas la mortalidad inicia a los tres días después de inoculadas las larvas de *Plutella xilostella*, en la cual se observa mortalidad del 28% en la réplica 2, seguida de la réplica 3 con el 24% y la réplica 1 con un 20% de mortalidad, posteriormente en el día 9 después de inoculadas las larvas, se observa que entre las replicas de acuerdo a sus porcentajes de mortalidad no tienen mucha diferencia significativa ya que en la réplicas 1 y 3 presentaron mortalidad de 80% al 88%, mientras que la réplica 2 en ese periodo presento el 92% de mortalidad,

A partir del día 9 después de inoculación, la réplica 2 fue mejor con el 92% ya que su aumento fue constante, en comparación a las replicas 1 y 3 que siempre se mantuvieron por debajo de la réplica 2. Luego en los 11 días de inoculadas las larvas, las réplicas 1 y 3 aumentaron 8% mas, en cambio la réplica 2 solo aumento el 4%, encontrándose estas con poca diferencia significativa al finalizar el bioensayo experimental.

Haciendo referencia con los resultados obtenidos por Badilla y Alves (1991) sobre la alta patogenicidad de la concentración de  $10^{10}$  se asemejan a los a los obtenidos en esta investigación, ya que ellos afirman que la mortalidad presentara el mayor porcentaje de mortalidad después de los 7 días, ya que la aplicación y efecto transcurrido tiene que ser muy corto, por el rápido desarrollo larval que presenta esta plaga, y la concentración alta de conidias/ml, (esto se debe a que las concentraciones altas no difieren significativamente en su virulencia), dando resultados en cual en esta concentración todas las réplicas tienen un alto porcentaje de mortalidad.

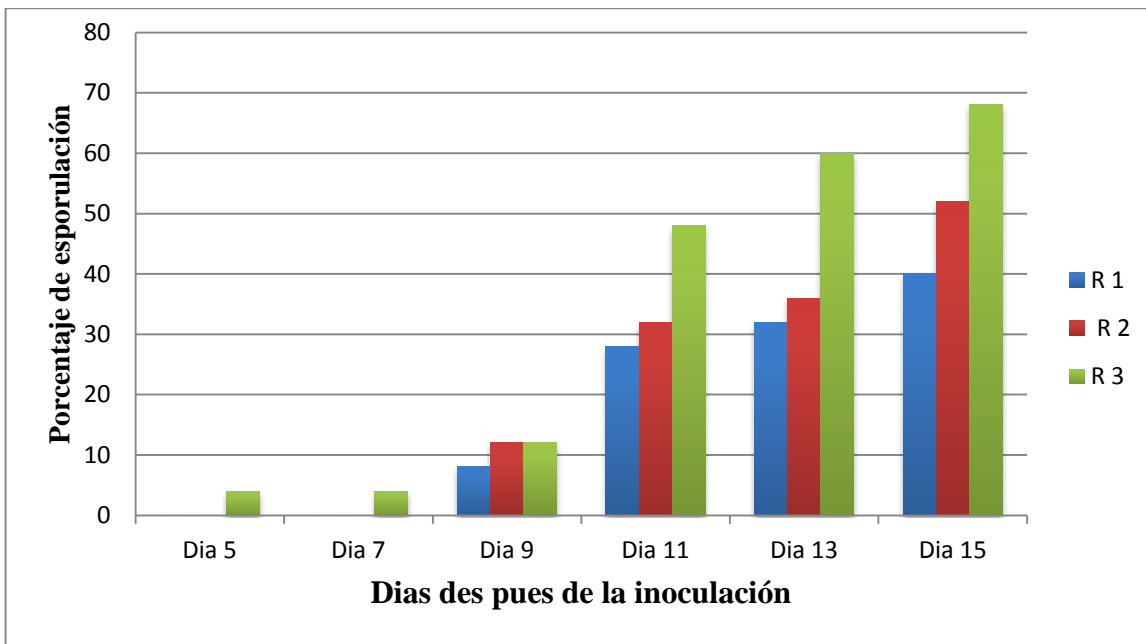


**Promedio de los porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* inoculadas con *Beauveria bassiana*, concentración  $10^8$   $10^9$  y  $10^{10}$  conidios/ml. cepa 114, en condiciones de laboratorio.**

El gráfico 4. Muestra la diferencia de porcentaje de mortalidad en cada uno de los tratamientos donde se observa el efecto de las concentraciones de dosis  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  de la cepa 114. En la gráfica podemos observar que en el día de inoculación número tres iniciaron a morir las larvas de los tres tratamientos sin embargo las concentraciones  $10^8$ ,  $10^9$  iniciaron con igual porcentaje de mortalidad 20% a diferencia de la concentración  $10^{10}$  que obtiene mayor porcentaje de mortalidad al inicio, siendo esta de 24%, posteriormente a los 9 días de inoculación las concentraciones se encontraban con el mayor porcentaje de mortalidad alcanzado, sin embargo en este periodo transcurrido se observa que la mortalidad aumentan gradualmente de acuerdo al nivel de concentración/ml en la que fueron inoculadas, destacándose que las concentraciones que poseen mayor cantidad de conidios por mililitro, obtienen un mayor porcentaje de mortalidad.

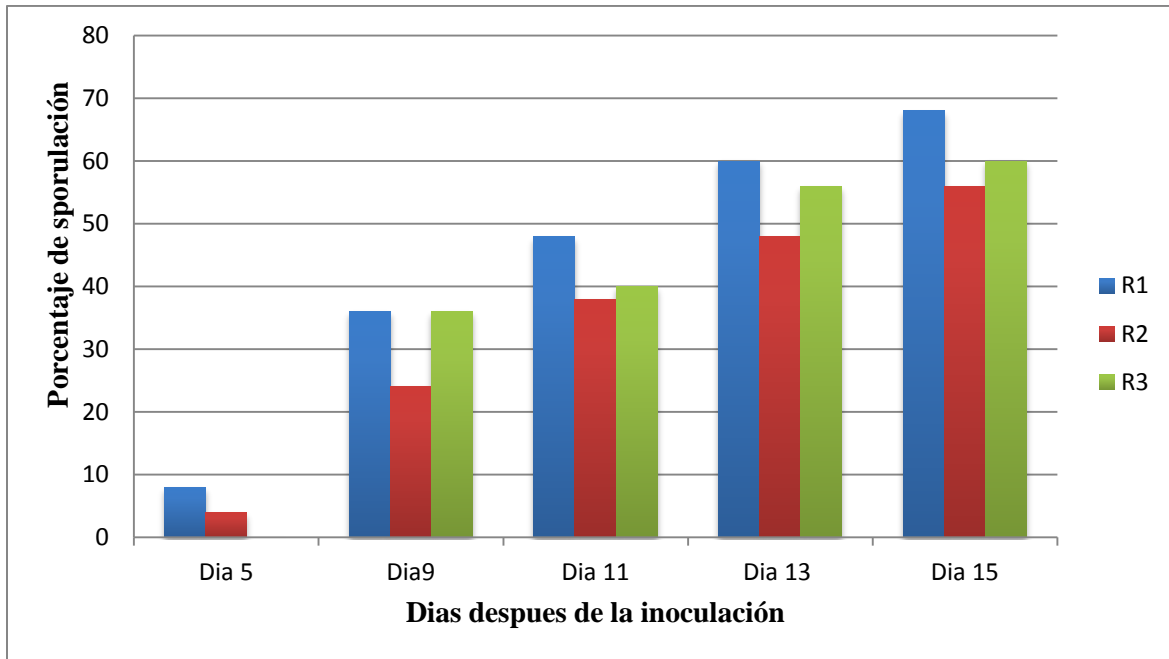
Según Badilla y Alves (1991) en estudio realizados en picudo de la caña, determinaron que cuando las concentraciones de conidios aumentaban, las incrementaba el porcentaje mortalidades (cuando las concentraciones eran mayores de  $10^7$ ). Datos que se relacionan a los resultados obtenidos por Gutiérrez (1991), en la cual determina que al aumentar las concentraciones de *Beauveria b* por mililitro aumentaban la mortalidad de *Plutella xilostella*, por lo que determino que las concentraciones  $10^7$   $10^8$   $10^9$   $10^{10}$ , no difieren significativamente

en cuanto a mortalidad lo que sigue es que las concentraciones superiores a  $10^7$  son altamente patogénica.



**Porcentaje de esporulación de larvas de *Plutella xylostella* inoculadas con *Beauveria bassiana*, en la concentración  $10^8$  conidias/ml. cepa 114, en condiciones de laboratorio.**

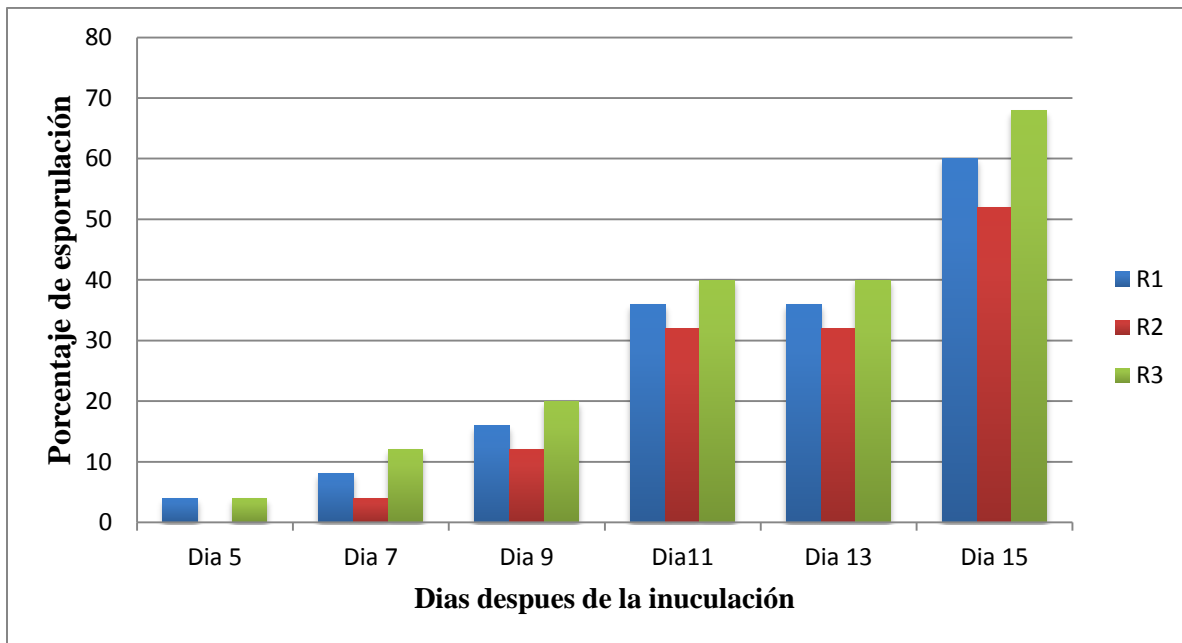
En el grafico 5. Se puede observar que la concentración  $10^8$  conidias por ml inicio esporulación de los insectos en el 5 día después de la inoculación, encontrando que la repetición 3 presentó una esporulación de 4% mientras que la repetición 2 y 1 no presentaron esporulación; luego hasta el día 11 presentaron un aumento en la esporulación obteniendo que la réplica 3 tuvo una esporulación de 48% siendo este mayor, en comparación a la réplica 2 y 1 esto se mantuvo en porcentaje de 32-36, hasta el día 15 donde se observa claramente que la réplica 3 fue mejor en comparación a las otras dos.



**Esporulación de las larvas de *Plutella xylostella*, con la concentración  $10^9$  conidias/ml en condiciones de laboratorio, durante el año 2012 Campus agropecuario, UNAN-LEON**

En el gráfico 6. Se puede observar que la concentración  $10^9$  conidias por ml inicio esporulación de las larvas en el 5 día después de la inoculación, presentando la repetición 1 como la mejor, ya que presentó esporulación de 8% mientras que la repetición 2 presentó una esporulación de 4% y la repetición 1 no presentaron esporulación; luego hasta el día 11 aumentó el 40% en esporulación la réplica, mientras que la réplica 2 que obtuvo un 38% y con una mayor esporulación la réplica 1, con un 48% luego el día 15 después de la inoculación se observa claramente que la réplica 1 fue mejor con un 68% seguido de la réplica 3 con un 60 % y por último la réplica 2 con un 58% de esporulación.

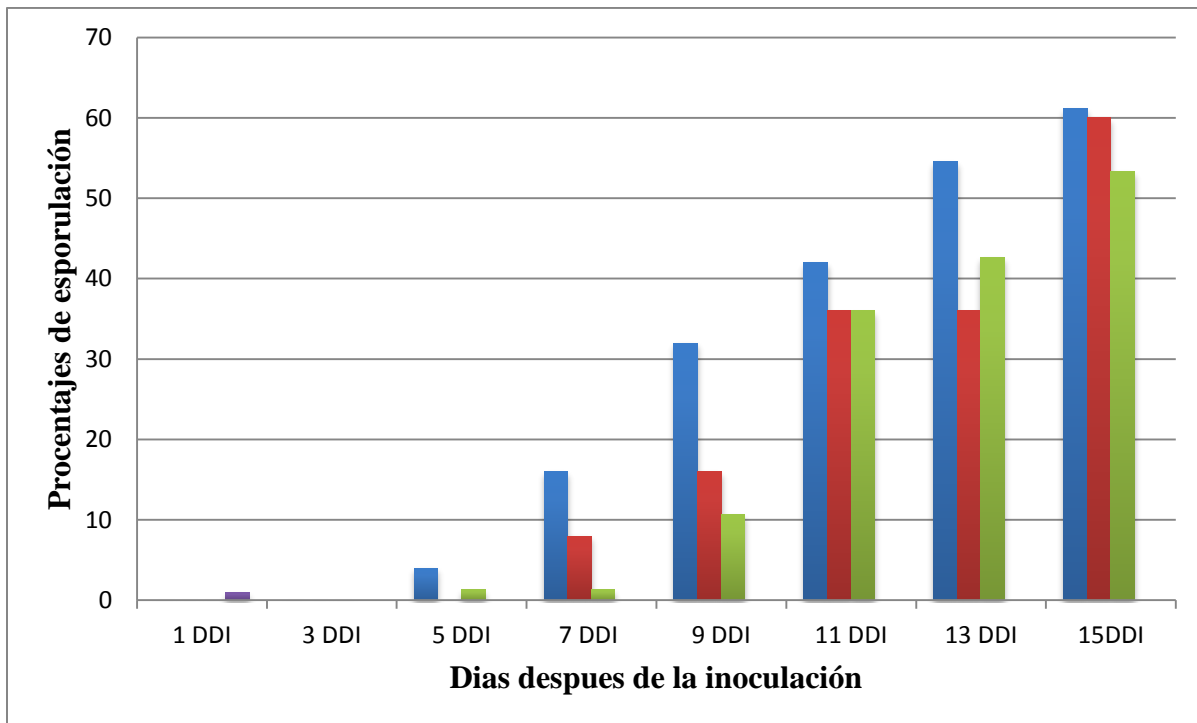




**Esporulación de las larvas de *Plutella xylostella*, con la concentración  $10^{10}$  conidias/ml en condiciones de laboratorio durante el 2012, Campus Agropecuario, UNAN-León.**

En el gráfico 7. se puede observar que la concentración  $10^{10}$  conidias por ml inicio esporulación de los insectos en el 5 día después de la inoculación, encontrando que la repetición 1 y 3 presento una esporulación de 4% mientras que la repetición 2 todavía no presentaban esporulación; luego para el día 7 se observo que aumento a 12% la esporulación de la réplica 3, siendo este mayor que la réplica 1 que tuvo un leve aumento al 8% de esporulación, al igual manera que la réplica 2 con un 4 % de esporulación.

En la presente gráfica se puede observar que la réplica que obtuvo mayor porcentaje de esporulación consecutivamente fue la R3, ya que siempre presento porcentaje más alto que la réplica 1 y la réplica 2.



**Porcentaje de Esporulaci3n de las larvas de *Plutella xylostella*, con la concentraci3n 10<sup>10</sup> conidias/ml en condiciones de laboratorio durante el periodo de noviembre 2012 Campus Agropecuario, UNAN-Le3n.**

El gr1fico 8 Muestra la diferencia de porcentaje de esporulaci3n en cada uno de los tratamientos donde se observa el efecto de las concentraciones de dosis 10<sup>8</sup> 10<sup>9</sup> 10<sup>10</sup> de la cepa 114. En la gr1fica podemos observar que en el d1a de inoculaci3n n1mero cinco todos los tratamientos iniciaron a esporular a partir del d1a cinco despu3s de inoculadas, iniciando con un mayor porcentaje la concentraci3n 10<sup>10</sup> con un 4%, continuando la concentraci3n 10<sup>9</sup> con 2% y al final 10<sup>8</sup> con 1.3%, a los nueve d1as de inoculaci3n se pudo observar que la concentraci3n 10<sup>10</sup> superaba el porcentaje de las dem1s concentraciones duplicando la concentraci3n 10<sup>9</sup> con un 16% m1s y a la concentraci3n 10<sup>8</sup> con 21.34. A los quince d1as despu3s de inoculados, se observ3 que la concentraci3n de mayor porcentaje de esporulaci3n fue la de 10<sup>10</sup> con 61.2%, seguido de la concentraci3n 10<sup>9</sup> con un 60% y la concentraci3n 10<sup>8</sup> que obtuvo el 53.33% de esporulaci3n, alcanzado 7.87% menos que la concentraci3n 10<sup>10</sup>.

Entendemos que la esporulaci3n de un insecto es la evidencia de la mortalidad de un agente causal, pero que esta esporulaci3n est1 afectada principalmente por temperatura y humedad

relativa, por lo que puede influir en el porcentaje de esporulación (tanto en campo como en laboratorio). Los datos obtenidos son satisfactorios ya que los porcentajes van sobre 20% de de esporulación en las tres bioensayos a distintas concentraciones, puesto que según Leucuona (1995) los resultados de un bioensayo son aprobado a partir del 20% de esporulación.

Según los datos obtenidos aceptamos la hipótesis alternativa, ya que encontramos diferencia significativa de casia 10% menos en los resultados de mortalidad y esporulación de la concentración  $10^8$  con respecto al las concentraciones  $10^9$  y  $10^{10}$ .

## VII. CONCLUSIÓN

Según resultados obtenidos en el ensayo realizado en laboratorio de Hongo Entomopatógenos de la UNAN- León concluimos que:

- El hongo *Beauveria bassiana* cepa 114 provoca la mortalidad total en las larvas de *Plutella xylostella* a los 11 días después de la inoculación.
- En las tres réplicas usadas de *Beauveria bassiana* en diferentes concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ) obtuvimos que es altamente patógena contra las larvas aisladas de *Plutella xylostella* debido a que causó mortalidad en laboratorio es 87.99%.
- En el laboratorio de hongo entomopatógenos se determinó que la concentración  $10^{10}$  presentó un mayor porcentaje de esporulación en comparación a las otras dos concentraciones obteniendo un 61.2% de esporulación seguido de la concentración  $10^9$  con un 60 % de esporulación y un 53.33% de esporulación  $10^8$  obteniendo que la concentración  $10^{10}$  obtuvo un mejor resultado en relación a las otras dos concentraciones.

## VIII. RECOMENDACIÓN

Recomendamos a los pequeños y medianos productores que como una medida de prevención y control de *Plutella xylostella* se debe utilizar *Beauveria bassiana* debido a que es altamente patogénica, causando altos porcentajes de mortalidad, es una alternativa sana para la salud de los seres vivos y muy rentables ya que este hongo después de aplicado permanece en la superficie (área) aplicada, continuando así su reproducción y su efecto por lo que es una alternativa patogénica.

Que estudiantes tesistas continúen con la investigación en campo, así tomando referencias de los resultados de esta investigación, así mismo el cultivo evaluado y preparado en el laboratorio de hongos entomopatógenos de la UNAN - León.

Utilizar concentraciones de  $10^{10}$  ó  $10^9$  ya que sus porcentajes de mortalidad, virulencia y esporulación son muy similares con respecto a los resultados obtenidos en la investigación, en el cual se demostró que ambas concentraciones son altamente patogénicas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alves, S.B. 1986. Control microbiano de insectos. Primera edición., editora manole. Ltda Sao Paulo (Brasil). 99-144p.
- Badilla, F, Alves, S.B.1991. Manejo Integrado de Plagas, Control de Picudo de la Caña de Azúcar. *Sphenophorus levis*, (Col.: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniarti* en condiciones de laboratorio y campo (Costa Rica) N° 20-21: 34-38.
- CATIE. 2002. Manejo integrado de plagas en hortalizas, Centro Agropecuario Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa
- CATIE, Gutiérrez. 1991. Control de larvas de *Plutella xylostella* (L) con la mezcla de *Beauveria bassiana* vaill. Mas, N° - film 17. Tesis, mag. SC. Turrialba, Costa Rica. 73 pág.
- CATIE, 1899. Revista "Manejo Integrado de Plagas". Edición 51.
- Diaz J, et al, diciembre 1999, Manejo Integrado de Plagas (MIP) en cultivo de repollo, Managua, Nicaragua, impresión – IMPASA, 100 ejemplares.
- Ferrán, 1978, Biological. Control of insect pest, by entomogenous fung; ann. Rev. Entomol. 23. 409- 442. p.
- Fuente G, Carballo M 1995, evaluación de aislados de *Beauveria bassiana* (Bals) Vull, para el control de *Plutella xylostella* (L) (lepidoptera, plutellidae) Turrialba, Costa Rica 12 pág.

- FUNICA, CATIE, 2001. Manejo Integrado de Plagas, Producción y Uso de Control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. N° 63. P. 95-103.
- Gallego G. et al. Entomopatógenos, trillas, México. 2003. 141pag.
- INTA, Goites Enrique, 2008. Manual de cultivos para la huerta orgánica familiar. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires. 1a edición - 136 p.
- Gómez VM, Jiménez C. CM. 1995. Patogenicidad de Beauveria Bassiana, sobre adultos de picudo de chile (*Anthonomus eugenii*) En taller nacional de Control Biológico, 95 P.
- INTA, Rodolfo. Pletsch. Noviembre 2006. Proyecto Regional de Pequeños y Medianos Productores. El Cultivo del Repollo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Agencia de Extensión Rural Corrientes.
- Jorge E, Jaramillo N. et al, 2006, El cultivo de las Crucíferas. Corporación Colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA- Rio negro, Antioquia, Colombia, manual técnico N° 20.
- Leucuona R. 1995 microorganismos patógenos, empleados en el control microbiano de insectos plagas. 338 pág.
- P Rodolfo, et al. Noviembre 2008 Pletsch, Proyecto Regional de Pequeños y Medianos Productores. El Cultivo del Repollo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Estación Experimental Agropecuaria Corrientes – Agencia de Extensión Rural Corrientes.
- R José, Laguna G. 2005. Guía MIP en el cultivo de repollo. INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 28p.

- Segura R, Lardizabal R, febrero 2008, Manual de producción de repollo, proyecto de diversificación económica rural USAID - RED.
- Trabanino, R. 1998. Guía para el Manejo Integrado de Plagas Invertebradas en Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 156 p.
- UNA, Universidad Nacional Agraria, 2000. Producción y Uso de hongos entomopatógenos, Hongos entomopatógenos para el uso de plagas Agrícolas, Managua-Nicaragua, edición. Arnulfo Moran. 49 p.
- En línea. Agronomía Tropical.  
[http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_ci/Agronomia%20Tropical/at3846/Arti/fernandez\\_s.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at3846/Arti/fernandez_s.htm)
- En línea.  
<http://corpoica.org.co/BACFILES/BAC DIGITAL/25480/25480.pdf>
- En línea. Hortalizas.  
[http://www.infoagro.com/hortalizas/palomilla\\_dorso\\_diamante.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/palomilla_dorso_diamante.htm)
- En línea. El manejo integrado de *Plutella xylostella* en brócoli - Zamorano-bdigital.  
<http://zamorano.edu/bitstream/11036/635/1/T3033.pdf>
- En línea.  
<http://.catie.ac.cr/información/rmip/rmip51/redca2.html>.



## ANEXOS. 1

### Desinfección de alimento e insectos.



## ANEXOS



**Preparación  
Suspensión fungosa**



**Conteo de conidias**



**Montaje de la prueba de bioensayo**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA**

**HOJA DE MUESTREO – LABORATORIO DE HONGO ENTOMOPATOGENOS**

Realizado por \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Nº de muestra \_\_\_\_\_

Nº de muestreo \_\_\_\_\_

DD de la inoculación \_\_\_\_\_

Nº Concentración \_\_\_\_\_

**REPLICA 1**

Nº de la taza	Nº Larvas evaluadas	Nº Larvas vivas	Nº Larvas muertas	Nº Larvas esporuladas	Nº de larvas
1					
2					
3					
4					
5					
<b>Total</b>					

**REPLICA 2**

Nº de la taza	Nº Larvas evaluadas	Nº Larvas vivas	Nº Larvas muertas	Nº Larvas esporuladas	Nº de larvas
1					
2					
3					
4					
5					
<b>Total</b>					

**REPLICA 3**

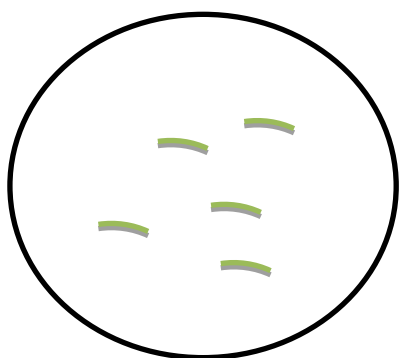
Nº de la taza	Nº Larvas evaluadas	Nº Larvas vivas	Nº Larvas muertas	Nº Larvas esporuladas	Nº de larvas
1					
2					
3					
4					
5					
<b>Total</b>					

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN LEÓN

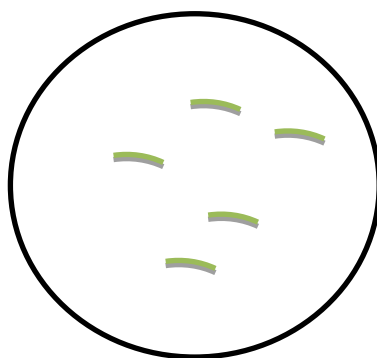
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

DISEÑO DE DISTRIBUCIÓN DE LAS LARVAS A MUESTREAR POR REPLICAS Y CONCENTRACIONES

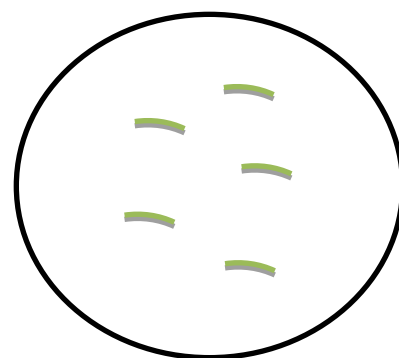
LABORATORIO DE HONGO ENTOMOPATOGENOS



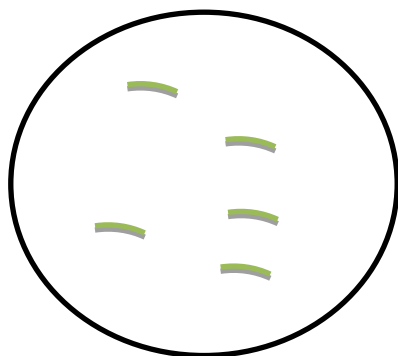
Plato 1.



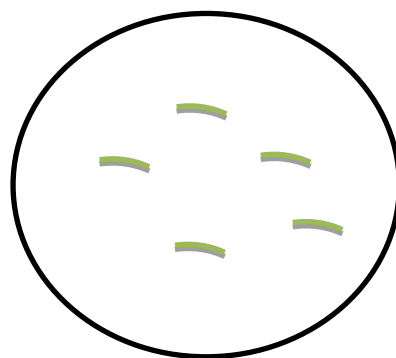
Plato 2.



Plato 3.



Plato 4.



Plato 5.

En cada plato Petri se colocaron 5 larvas de *Plutella xilostella* inoculadas con *Beauveria bassiana*, en cada un réplica se utilizaron 25 larvas (lo que equivalen a 5 platos Petri por réplica). Por cada concentración se evaluaron tres réplicas. Teniendo en total 75 larvas evaluadas por cada concentración.