

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

EFCO DE DOS AISLADOS DE *Beauveria bassiana* Y UNO DE *Metarhizium anisopliae* SOBRE *Plutella xylostella* BAJO CONDICIONES DE CAMPO Y LABORATORIO.

POR

HECTOR ENRIQUE DIAZ DIAZ

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE**

INGENIERO AGRONOMO



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C. A.

DICIEMBRE, 2012

EFFECTO DE DOS AISLADOS DE *Beauveria bassiana* Y UNO DE *Metarhizium anisopliae* SOBRE *Plutella xylostella* BAJO CONDICIONES DE CAMPO Y LABORATORIO

POR

HECTOR ENRIQUE DIAZ DIAZ

M Sc. JOSE ANDRES PAZ

ASESOR PRINCIPAL

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C. A.

DICIEMBRE, 2012

ACTA DE SUSTENTACIÓN

DEDICATORIA

A DIOS OMNIPOTENTE por iluminarme y estar a mi lado en todo momento de mi vida y darle la sabiduría para poder culminar mi carrera universitaria.

A MIS PADRES JOSE ISIDRO DIAZ Y MARIA DOMNIMA DIAZ MILLA por darme su apoyo incondicional minuto a minuto y confiar en mi persona.

A MIS HERMANOS: ORFILIA, ADILIO, AMINTA, ARACELY, GLADIS DIAZ por darme apoyo moral y ser la inspiración de estudiar

A MI HIJO HECTOR FERNANDO DIAZ AGUILAR por ser parte de mi alegría y con todo amor le dedico este triunfo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** todo poderoso porque siempre estuvo presente en los momentos difíciles, solo él fue capaz de darme paciencia, sabiduría y fuerzas cuando más lo necesite y así pude culminar mi carrera.

A **MIS PADRES JOSE ISIDRO DIAZ Y MARIA DOMNIMA DIAZ MILLA** y mis hermanos **DIAZ DIAZ** por darme su apoyo incondicional minuto a minuto y confiar en mi persona.

A mi Universidad Nacional de Agricultura por ser mi alma mater y acogerme en su seno para formarme como un profesional en las ciencias agrícolas.

A mis asesores **JOSÉ ANDRÉS PAZ** M Sc. por darme su apoyo como asesor principal en el trabajo profesional a nivel de campo así mismo al Ph. D. Roy Menjivar, Raúl Isaías Muñoz M Sc. y Héctor Fernández M Sc. que me apoyaron en el trabajo de laboratorio.

A Oscar Ovidio Redondo M. Sc. por ser más que un docente un buen amigo en orientarme en la parte disciplinaria durante la estadía en la Universidad Nacional de Agricultura.

A los asistentes de laboratorio Saddy Argeñal y Douglas Hernández por colaborar durante el trabajo de laboratorio

CONTENIDO

	Pág
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xii
I. INTRODUCCION.....	1
II OBJETIVOS	2
2.1 General	2
2.2 Específicos	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1 Descripción del repollo.....	3
3.2 La palomilla dorso de diamante (<i>Plutella xylostella</i>).....	3
3.3 Ecología de la plaga	4
3.3.1 Metamorfosis.....	4
3.3.2. Importancia de daño que ocasiona	5
3.4 Métodos de control.....	6
3.4.1 Control químico.....	6
3.4.2 Control cultural.....	7
3.4.3. Control biológico	7
3.5 Uso de hongos en el control de plagas	8
3.5.1 Descripción general	8
3.5.2 Condiciones climáticas	9
3.6 Descripción de <i>Beauveria bassiana</i>	10
3.6.1. Forma de vida.....	10

3.7 Descripción de <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
3.8 Infección de los hongos entomopatógenos	12
3.8.1 Modo de acción	12
3.8.2 Germinación de la espora.....	13
3.8.3 Mecanismo de acción	14
3.8.4 Penetración de la hifa dentro del hemocele	14
3.8.5 Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto	15
3.8.6 Antibiosis	16
IV. MATERIALES Y METODOS.....	17
4.1 Ubicación de la investigación	17
4.2 Materiales y equipo	17
4.3 Manejo de equipo	18
4.3.1 Asepsia.....	18
4.3.2 Lavado	18
4.4 Esterilización.....	18
4.4.1 Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento).....	19
4.5 Medios de Cultivo	20
4.5.1 PDA (Papa Dextrosa Agar) MERCK y SDA (Saboraud Dextrosa Agar) BIOTEC	20
4.6 Aislamiento de los hongos entomopatógenos.....	20
4.6.1 Reproducción	20
4.6.2 Aislamiento directo.....	21
4.7 Evaluación de rendimiento y viabilidad	22
4.7.1 Rendimiento de conidias / ml de solución	22
4.7.2 Viabilidad.....	23
4.7.3 Inoculación de <i>Beauveria bassiana</i> H ₃ , <i>Rhyssomathus sp</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> a <i>Plutella xylostella</i>	25
4.8 Variables a evaluadas en laboratorio	26
4.8.3 Tiempo y número de larvas parasitadas.....	27
4.9 Evaluación de las cepas a nivel de campo	28
4.9.1 Ubicación del experimento	28
4.9.2 Materiales y equipo	28
4.10 Diseño a utilizar en campo.....	28
4.10.1 Análisis estadístico	29
4.11 Manejo agronómico del cultivo	29

4.11.1 Establecimiento del semillero en el invernadero	29
4.11.2. Descripción de ensayo en campo	30
4.11.3 Preparación de suelo	30
4.11.4 Trasplante	30
4.11.5 Fertilización.....	31
4.11.6 Manejo de plagas y enfermedades	31
4.11.7 Aplicación de los aislados (cepas) en el campo	32
4.12 Variables evaluadas en campo	33
4.12.1 Mortalidad causada por las cepas	33
4.12.2 Peso comercial de la cabeza	33
4.12.3 Porcentaje dañado de la hoja	34
V RESULTADOS Y DISCUSION	34
5.1 Mortalidad causada por las cepas evaluadas.....	34
5.2 Determinación del TL ₅₀	35
5.3 Esporulación de las larvas	36
5.4. Variables evaluadas en campo	38
5.4.1 Sobrevivencia de larvas en el campo.....	38
5.4.3 Porcentaje de daño a la hoja.....	41
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. BIBIOGRAFIA.....	45
ANEXOS.....	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Dosificación de los tratamientos.	26
Cuadro 2. Distribución espacial de los tratamientos.	26
Cuadro 3. Descripción de los rangos utilizados para realizar muestro de daño foliar en el cultivo de repollo.	34
Cuadro 4. Numero de larvas muertas y esporuladas en laboratorio (%).	38
Cuadro 5. Número de larvas antes y después de los muestreos previo hacer la aplicación de soluciones (cepas).	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad diaria de <i>Plutella xylostella</i> provocada por los aislados <i>B. bassiana</i> , <i>Bb. Rhyssomathus</i> y <i>M. anisopliae</i> bajo condiciones de laboratorio.	34
Error! Marcador no definido.	
Figura 2. Mortalidad acumulada de <i>P. xylostella</i> , causadas por <i>B. bassiana</i> H ₃ , <i>Rhyssomathus sp</i> y <i>M anisopliae</i> en el laboratorio.....	35
Figura 3. Esporulación diaria de <i>P. xylostella</i> , causadas por <i>B bassiana</i> H ₃ , <i>Bb. Ryrhyssomathus sp</i> y <i>M anisopliae</i>	37
Figura 4. Sobrevivencia de larvas antes y despues de las aplicaciones.....	40
Figura 5. Distribución de lluvias desde junio a agosto durante el ensayo a nivel de campo evaluado en la Universidad Nacional de Agricultura 2012.....	39
Figura 6. Peso comercial de la cabeza de repollo del cultivar izalco (<i>brassica oleracea</i>) cosechadas 56 ddt.	40
Figura 7. Porcentaje de daño a la hoja en el cultivar repollo hibrido (<i>brassica oleracea</i>) izalco evaluado 68 ddt.....	41

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas antes de aplicación 1	52
Anexo 2. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas después de aplicación 1	52
Anexo 3. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas antes de aplicación 2	53
Anexo 4. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable después de aplicación 2	54
Anexo 5. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas antes de la aplicación 3	54
Anexo 6. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas después de la aplicación 3	55
Anexo 7. Análisis de varianza y pruebas de medias para la variable mortalidad día 1	56
Anexo 8. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad día 2	56
Anexo 9. Análisis de varianza y pruebas de medias para la variable mortalidad día 3	57
Anexo 10. Análisis de varianza y pruebas de medias para la variable TL_{50} 1	57

Anexo 11. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable TL ₅₀ 2	58
Anexo 12. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable TL ₅₀ 3	58
Anexo 13. Análisis de varianza y prueba medias para la variable esporulación día 1	59
Anexo 14. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable esporulación día 3 ...	60
Anexo 15. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable esporulación día 4 ...	60
Anexo 16. Análisis de Varianza y prueba de medias para la variable peso comercial de la cabeza.....	61
Anexo 17. Cámara de neauber	62
Anexo 18. Distribución de los tratamientos en el cultivo repollo, híbrido izalco (<i>Brassica oleracea</i>)	63
Anexo 19. Registro de las variables de campo.....	64
Anexo 20. Registro de variables en el laboratorio.....	65
Anexo 21. Bitácora de campo	66
Anexo 22. Croquis de los tratamientos en campo (DBCA).....	67
Anexo 23. Insumos para laboratorio de entomopatógenos Universidad nacional de agricultura	68
Anexo 24. Costos para realización de tesis a nivel en la sección de hortalizas Universidad nacional de agricultura	69

Anexo 25. Cronograma de actividades en campo	70
Díaz Díaz H. 2012. Efecto de dos aislados de <i>Beauveria bassiana</i> y uno de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Plutella xylostella</i> bajo condiciones de campo y de laboratorio, Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras CA. 84 pp.	

RESUMEN

El estudio se realizó en dos fases: A) una en laboratorio para determinar la patogenicidad de las cepas de *Beauveria bassiana* H₃ de Honduras (T1), *Beauveria bassiana*, aislada de *Rhyssomathus* sp. (T2) proveniente de México, *Metarhizium anisopliae* de BATOVI, Uruguay (T3) y un testigo asperjado con agua destilada (T4), se expusieran 120 larvas del tercer estadio por tratamiento distribuidas en 12 placas petri por, se asperja a *Plutella xylostella* a una concentración de 5.5×10^3 conidios/ml con un asperjador manual. Se realizaron lecturas de mortalidad en el día uno, dos y tres después. En esporulación se realizaron lecturas en el día cuatro, cinco, seis y siete. Se utilizó el diseño DCA con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones, un ANAVA y una prueba de medias (LSD) al 0.05%, con el paquete estadístico SAS. Las variables evaluadas fueron: mortalidad diaria, TL₅₀, tiempo de esporulación. Los resultados muestran que de 120 larvas inoculados el T1 mató el 20.6 %, T2 el 12 % y T3 el 6 %, para la variable de TL₅₀ ningún tratamiento alcanzó mortalidad del 50 % de larvas inoculadas a los tres días. La esporulación presentada fue en T2 12.97 %, T3 4.27 % y T1 4.11 %, en el testigo (T4) no hubo mortalidad ni esporulación. La cepa que en laboratorio presentó mejor control de *Plutella xylostella* fue *Beauveria bassiana* (T2). B) Fase de campo: Bajo condiciones de 26.6 °C, y precipitación anual de 1350 mm. Se evaluó tres cepas patógenas a una concentración de 1×10^8 conidios/ha, los tratamientos fueron *Beauveria bassiana* H₃ (T1), *Beauveria bassiana* *Rhyssomathus* sp (T2), *Metarhizium anisopliae* (T3) y testigo sin aplicación (T4). Se utilizó el diseño DBCA con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones, para cada muestreo se realizó un análisis de varianza y pruebas de medias (LSD) al 0.05%, con el paquete estadístico SAS. Se hicieron tres aplicaciones, a los 48, 54 y 60 días después del transplante (ddt) Las variables evaluadas fueron: sobrevivencia de larvas, peso comercial de la cabeza y porcentaje de daño a la hoja. Los resultados muestran que ninguna de las cepas controló a *Plutella xylostella* bajo las condiciones de estudio, porque en ninguno de los nuestros efectuados de sobrevivencia de larvas se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$), de igual manera el peso comercial de la cabeza de repollo osciló entre 1.169 kg a 1.23 kg por cabeza y el porcentaje de daño a la hoja osciló entre rangos de 15.25% 20.1%, en ninguno de los muestreos realizados para pesos comercial de cabeza y porcentaje de daño no se encontró significancia entre tratamientos. Se concluye que *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en las dosis evaluadas y condiciones climáticas no ejerce ningún control sobre *Plutella xylostella*. No fue posible obtener el TL₅₀ debido a que después del tercer día de aplicación las larvas vivas empuparon, no se le dio seguimiento. Se recomienda continuar con la evaluación de éstos entomopatógenos en otros cultivos, otros insectos y otras condiciones climáticas.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Repollo, Control biológico, *Plutella xylostella*

I. INTRODUCCION

Para reducir el efecto negativo del uso indiscriminado de plaguicidas, se ha hecho necesaria la implementación de sistemas agrícolas sostenibles basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, el ambiente y los organismos que viven en el campo; es decir entender mejor la naturaleza. Esto permitiría obtener buenas cosechas, sin contaminación ambiental y sin daño a la salud humana.

La mayor parte de los insectos que atacan a las plantas cultivadas tienen enemigos naturales que los parasitan y matan, produciendo así una reducción considerable en su población. El uso de hongos entomopatógenos para la exterminación de tales insectos constituye, por lo tanto, un componente importante de control, siendo muchos los hongos mencionados en diversos estudios que se usan para este propósito (Ames *et al.* 2004).

Entre estos organismos encontramos los entomopatógenos, entre los cuales están hongos, bacterias, virus y nematodos. Algunos de microorganismos, principalmente los hongos, han sido manipulados y reproducidos masivamente para ser utilizados comercialmente en el control de importantes plagas agrícolas. Al uso de estos microorganismos para el control de plagas es lo que llamamos control microbial (FUNICA 2003).

Con uso de aislados se logró determinar que *Rhyssomathus sp* es el más efectivo en el control de *P. xylostella* bajo condiciones de laboratorio comparado *Beauveria bassiana* *Metarhizium anisopliae*. En campo en época lluviosa ninguno presentó efecto de control bioplaguicida sobre la plaga. El objetivo de este trabajo fue evaluar el control biológico de las cepas laboratorio y campo.

II OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar el efecto de dos aislados de *Beauveria bassiana* (H_3 y *Rhyssomathus sp*) y uno de *Metarhizium anisopliae* sobre *Plutella xylostella* bajo condiciones de laboratorio y campo.

2.2 Específicos

Determinar en laboratorio el potencial mortalidad diaria que causan dos aislados de *Beauveria bassiana* (H_3 y *Rhyssomathus sp*) y una de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas del tercer estadio de *Plutella xylostella*.

Identificar el tiempo letal medio de cada cepa evaluada.

Comparar el porcentaje de larvas parasitadas

Cuantificar el número de larvas vivas después de cada aplicación

Determinar el porcentaje de daño foliar provocado al cultivo por *Plutella xylostella*

Cuantificar la producción comestible en campo obtenida utilizando las cepas

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Descripción del repollo

El repollo (*Brassica oleracea* L. var. Capitata) es una de las hortalizas de mayor demanda durante todo el año en el mercado nacional. La siembra de este cultivo se concentra en los altiplanos de las zonas central y occidental de Honduras, donde las condiciones agroecológicas son adecuadas para su producción. 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, Honduras por su parte, cosechó 2,100 hectáreas con un rendimiento promedio de 30.81 toneladas métricas por hectaria (FAO 2010).

3.2 La palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*)

La palomilla dorso de diamante (PDD) *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) es una de las plagas más importantes de los cultivos de crucíferas (Talekar y Shelton 1993). Considerando el efecto negativo que significa la aplicación desmedida de plaguicidas para el control de esta plaga, es importante buscar alternativas de control natural que reduzcan las poblaciones de este insecto a niveles en donde el daño causado no sea económico (Fuentes *et al.* 1995) Esta plaga pertenece al orden Lepidóptera, familia Plutellidae. Se la conoce comúnmente con los rasquifia, polilla y plumilla (Trabanino 1997 citado Gonzalo 2000).

3.3 Ecología de la plaga

3.3.1 Metamorfosis

El ciclo biológico se divide en huevo, larva, pupa y adulto, las hembras ponen 160 huevos en promedio, mismos que son depositados en el envés de las hojas. Tienen un diámetro de 0.5 mm y poseen un color amarillento. Su período de incubación es de cuatro a ocho días, mismo que varían con el clima. En el período de larva, estas tienen una coloración amarillenta con un color pardo en la cabeza. Este va aumentando de tamaño a medida que pasa el tiempo, empezando más o menos con 1.7 mm de largo y acabando más o menos con unos 11 mm de longitud (Andrews 1984).

Cuando la larva alcanza este tamaño, su color ha cambiado completamente tornándose en un verde claro y tiende a adelgazar en los extremos. Cuando las larvas se ven amenazadas, éstas, como acción de protección, tienden a retorcerse y dejarse caer en el suelo quedando sujetadas por un fino hilo de seda. Este periodo varía de 10 a 30 días, dependiendo, al igual que los huevos, del clima. El periodo de pupa toma entre cinco y 15 días. La larva se encarga de tejer una red de seda que sirve para sostener la pupa mientras se desarrolla el adulto (Trabanino 1997 citado por Gonzalo 2000).

Según Monroy (s.f) esta plaga se localiza en el envés de la hoja, cerca de la vena central. Al finalizar el periodo pupal, el adulto emerge de la redecilla. Este tiene entre 8 y 10 mm de longitud y posee un color marrón. (Al atardecer y durante la noche son muy activas, lo que les permite buscar pareja para la cópula (la cual dura una hora), y las feromonas producidas por la hembra atraen al macho. Tanto hembra como macho se alimentan del néctar de las flores de las plantas de la familia Brassicaceae.

Los adultos tienden a volar rápidamente cuando son molestados y son mucho más activos durante la noche. En este periodo es cuando las hembras depositan los huevos en las plantas. El ciclo en su totalidad varía de 15 a 40 días dependiendo de las condiciones climáticas (CATIE 1990).

Trabanino (1997) menciona que la lluvia y las bajas temperaturas son elementos climáticos que reducen significativamente las poblaciones de *P. xylostella*. Áreas cercanas a los lotes de producción con diversidad vegetativa son un refugio para los enemigos naturales.

3.3.2. Importancia de daño que ocasiona

Las larvas son masticadoras, por lo que se alimentan del follaje, causando gran daño al tejido vegetal, tanto el cogollo como la cabeza, siendo ésta última la más importante. El daño no es tanto por el área consumida sino más bien por los hoyos y excremento que le restan calidad a la cabeza, haciendo que su comercio sea imposible (Trabanino 1997).

La larva en su primer estadio se comporta como minadora, el daño que produce se observa como una pequeña región clorótica de forma alargada. Al ocurrir esto en las etapas tempranas de crecimiento del repollo, se reduce el área fotosintética y el vigor de la planta. Si el daño afecta el cogollo cuando se inicia la formación de la cabeza, éste proceso se puede detener. (Ochoa *et al.* 1989).

En el segundo estadio sale al exterior y se ubica principalmente en la cara inferior de las hojas y pueden observarse en la lámina orificios pequeños con la epidermis superior intacta; en el tercero y cuarto estadio se alimentan de la hoja completa. Los adultos de esta especie viven cerca de 23 días (Folcia *et al.* 1996).

El daño que causa *Plutella. xylostella*, como se ha mencionado anteriormente, es en forma de hoyos, conocidos también como ventanas, por donde luego, debido al viento y a daños adicionales, la hoja termina por agujerarse. Con una población abundante de esta plaga ya no solo se puede ver afectada la calidad, sino también el crecimiento y el rendimiento, dándose casos de hasta un 100% de pérdida (Asmtrong 1992).

Los adultos descansan durante el día debajo de las hojas de las plantas, al atardecer y durante la noche son muy activas, lo que les permite buscar pareja para la cópula, las feromonas producidas por la hembra atraen al macho y está asociado con ciclos lunares, donde los picos de actividad de vuelo son después de la luna nueva y alrededor de la luna llena. Ambos se alimentan del néctar de las flores de las plantas de la familia Brassicae. Debido al pequeño tamaño que poseen, el viento las puede transportar a grandes distancias y caer en cultivos o plantas silvestres e invernar en éstos y también lo puede hacer en plantas de cultivos abandonados. También puede desplazarse hasta tres metros en forma horizontal sin corrientes de aire y su sitio de descanso no es más alto a 1,5 m del piso. Esta especie es cosmopolita y de hábitos migratorios (Monroy s.f).

3.4 Métodos de control

3.4.1 Control químico

El repetido y continuo uso de insecticidas químicos ha resultado ahora en la resistencia hacia este método de control. Ya hay casos reportados de resistencia para malathion, methylparathion, DicloroDifenilTricloroetano (DDT), diazinon, mevinphos, dichlorvos y carbaryl. También se han reportado resistencia para nuevos grupos de insecticidas como piretroides y carbamatos (Hruska *et al.* 1997).

3.4.2 Control cultural

Dickson *et al.* (1985 citado por García 2000), la mejor arma cultural que poseemos es la resistencia o tolerancia varietal, ya que con esta herramienta le podemos dar un respiro a la alta presión de insecticidas para tratar de controlar *Plutella xylostella*.

Trabanino (1997) opina que entre las mejores prácticas culturales tenemos que ubicar semilleros lejos de las posibles fuentes de contaminación o áreas de producción. Se deben destruir posibles fuentes de contaminación cercanas a las áreas de producción. Es recomendable evitar cultivarlo en época seca que es cuando la plaga es más peligrosa, o hacerlo arriba de los 1000 msnm. El efecto de lluvia del riego por aspersión hace que exista menor población de la plaga. Tratar de hacer rotación de cultivo, evitando sembrar donde haya habido previamente un cultivo de la misma familia del repollo.

3.4.3. Control biológico

El control biológico viene dado generalmente por los enemigos naturales de *P. xylostella*, entre los principales enemigos naturales tenemos a *Diadegma insulare*, una Hymenóptera: ichneumonidae, la cual ataca a las larvas depositándose en sus huevos. Esto significa que *Diadegma* usa a la *Plutella xylostella* como nido para el desarrollo de sus crías. Al momento que los huevos eclosionan estos matan a su hospedero. *Cotesia plutellae*, una Hymenoptera, Braconidae, ataca también a la larva (Pastrana 2004; Sarfraz *et al.* 2006 citado por Montero *et al.* 2007).

Otra opción de control es el uso de insecticidas biológicos; como *Bacillus thuringiensis*, pese a que algunas cepas ya mostraron tolerancia sigue siendo una alternativa muy conveniente, incluso en mezclas con insecticidas que le dan mayor efecto (Taborra 2007 citado por Gurr *et al.*, 2000). Se han citado otros microorganismos que actúan sobre *Plutella xylostella*, tales como los hongos entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium amisopliae*,

Beauveria bassiana e *Hirsutilla* sp. Los virus poliédricos lograron controles con una efectividad del 70% en situaciones ambientales favorables (Blanco 2007).

3.5 Uso de hongos en el control de plagas

3.5.1 Descripción general

En la naturaleza los hongos entomopatógenos pueden controlar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos (Melo 1998).

Comprenden un grupo heterogéneo de más de 100 géneros, sin embargo, solamente un pequeño porcentaje de estos tienen que ser considerados por su potencial como agentes de control microbial; tomando en cuenta que algunos de estos géneros tienen un amplio espectro de hospederos y en muchos casos sus rangos geográficos son también amplios, contamos entonces con una gran diversidad genética entre aislamientos de la misma especie de diferentes hospederos y localidades, por lo que es prioridad que en programas de control biológico y manejo integrado de plagas (Berlaga 2006).

Estos hongos se encuentran en la naturaleza en rastros, estiércol, suelo y plantas, alcanzando un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con baja luminosidad. Los (HEP) son el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos-plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos. Se reconocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de HEP, entre los géneros más importantes están *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Erypniosis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* Y *Verticillium* (Monzón 2001).

Algunas investigaciones demuestran que algunos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. El crecimiento saprofita puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidios y desarrollo miceliano (Arrastia s.f citado por España 2010).

3.5.2 Condiciones climáticas

Este hongo que tiene buen comportamiento a una temperatura de 23 a 28 °C y una humedad relativa de 90 % (Alves 1986).

3.5.3 Ventajas del control microbiano

Según Burgues (1981) las ventajas de este tipo de combate son:

Especificidad al organismo foco o a un limitado número de especies hospederas, capacidad de multiplicarse y dispersarse en el ambiente a través de los individuos de la misma población, efectos secundarios sobre generaciones siguientes, además de causar mortalidad directa, los patógenos pueden afectar las generaciones siguientes disminuyendo la ovoposición, viabilidad de los huevos y aumentando la sensibilidad de la población a otros agentes biológicos y químicos, Control más duradero. Después del establecimiento del patógeno en una determinada área, este adquiere un carácter enzootico y la plaga puede mantener niveles no dañinos. Control asociado. Los patógenos son compatibles con muchos plaguicidas y su aplicación combinada puede dar mejor protección, se puede con máquinas convencionales y finalmente los insectos difícilmente desarrollan resistencia contra los patógenos.

3.6 Descripción de *Beauveria bassiana*

Es un hongo que pertenece a la clase Deuteromycete, orden Moniliales, familia Moniliaceae. Es el agente causal de la muscardina blanca de muchos insectos. Este hongo ha sido encontrando atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de mucha importancia agrícola (Alves 1986). Es un hongo filamentoso, eucariótico heterótrofo que posee células quitinizadas y parasita a otros insectos gracias a sus mecanismos físicos y químicos de infección. (Paredes 2007 citado por Aguilar 2010).

3.6.1. Forma de vida

Beauveria bassiana es un hongo que de manera natural, se localiza en el suelo, aunque se puede reproducir o cultivar en el laboratorio ya que es un hongo saprofita facultativo; su reproducción es asexual por conidios, presenta un micelio de color blanco cremoso quien produce las esporas: los insectos que atacan se tornan de color blanco (Arrastia s.f citado por España 2010).

Según Wong (2003) citado por Echeverría (2006) describe que *Beauveria bassiana* cuando se encuentra en el suelo en materia orgánica, su morfología micelial genera una red amplia y filamentosa originada a partir de un conidio; sin embargo, en presencia de un insecto huésped, el conidio germina y una vez dentro del insecto, pasa a formar una red de hifas, que una vez colonizada pasa nuevamente a una forma similar a la de levadura (blastóspora).

Se ha determinado que unos de los metabolitos secundarios que ocasiona la muerte *Beauveria bassiana* es el ácido oxálico, este compuesto ha sido descrito como uno de los responsables en la virulencia en los hongos entomopatógenos, y un elemento que coayugue la solubilización de la proteína cuticular. También se ha reportado compuestos como Beauvericina, que es un metabolito que en ocasiones puede ser mortal a los mamíferos, pero estos aislados de fusarium en trigo y maíz, también existe dos

ciclotetrapectidos muy parecidos denominados Beauverólidos H e I los cuales han sido aislados de *Beauveria bassiana* sp (Díaz *et al.* 2005).

Morfológicamente, *Beauveria bassiana* está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25 µm de diámetro, de donde se forma conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de formas impodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis. Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas. Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blancuzca para el ojo humano (Echeverría *et al.* 2006).

La virulencia de los conidios y la susceptibilidad del insecto hospedero, así como el desarrollo de la infección está relacionada con la efectividad de esporas, el estado fisiológico del huésped y las condiciones abióticas (Ferrán 1978) citado por Montero *et al.* (2007). Alves (1986) menciona que la virulencia puede ser expresada con el tiempo letal medio (TL₅₀) y la concentración letal media (CL₅₀).

Entre las plagas más importantes controladas por este hongo están la broca del café (*Hypothenemus hampei*), la palomilla del repollo (*Plutella xylostella*), picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*), así como el picudo de la chiltoma (*Anthonomuseugeni*). Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo. *Beauveria bassiana* ha sido muy estudiado y usado en el control de importantes plagas de insectos en muchos cultivos de todo el mundo (Andrade *et al.* 1990 citado por Cortés 2007). Este hongo después de colonizar el insecto crece dentro de su organismo hasta causar la muerte por toxinas producidas y finalmente las hifas del hongo salen al exterior del cuerpo del insecto adonde esporulan. El tiempo de colonización que se inicia a partir de la penetración de las hifas,

puede variar de tres a cinco días dependiendo del huésped, del patógeno y de las condiciones ambientales (Alves 1986).

3.7 Descripción de *Metarhizium anisopliae*

Al igual que *Beauveria bassiana*, este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, Familia Moniliaceae. Este patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamiaspp* y *Prosapia sp*) y chinches, plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Alves 1986).

En cuanto a metabolitos secundarios de *Metarhizium anisopliae*, son las llamadas destruxinas y las protodestruxina estas están relacionadas con la virulencia propias de este hongo entomopatógeno; las destruxinas son los compuestos mejor caracterizados, ya que su modo de acción también inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos, además también tiene la capacidad de inhibir la secreción de fluidos por el tubo de malpighi, las destruxinas A,B,E poseen capacidad insecticida y que han sido probadas en *Plutella xylostella* (Díaz *et al.* 2005).

3.8 Infección de los hongos entomopatógenos

3.8.1 Modo de acción

La enfermedad producida por hongos se llama micosis (Cañedo *et al.* 2004). La infección parasítica de los insectos es causado por las esporas y la ruta más común de penetración directa se realiza a través de la cutícula del insecto. Las conidias de *Beauveria bassiana*

ingresan a la cavidad del cuerpo del insecto donde se desarrollan produciendo micelios y blastosporas. En el cuerpo del insecto existen ciertas zonas preferidas para la adhesión, como son las regiones intersegmentales, en donde la composición y estructura son diferentes al resto del cuerpo del insecto (FUNICA 2004).

Posteriormente estas son transportadas por la hemolinfa hacia todas las partes del cuerpo, afectando todos los órganos principales para luego ocasionar la muerte del insecto. En condiciones favorables se desarrolla micelios, conidióforos y conidias sobre la cutícula del insecto proporcionando así una fuente de inóculo para afectar a otros insectos (Arrastia s.f, citado por España 2010).

3.8.2 Germinación de la espora

La espora que germina en el insecto forma un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda a la adhesión de la espora. El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad el hospedante. Los hongos, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas. Las esporas pueden terminar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. Cuando lo hacen en los fluidos digestivos, pueden destruir a la hifa germinativa. En este caso, el insecto no muere de micosis sino a causa de las toxinas (Samson *et al.* 1988).

3.8.3 Mecanismo de acción

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración (integumento) lo que facilita la penetración física (Acevedo 2008).

El proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer y alargarse da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. En menor grado la luz condiciona el ambiente alimenticio. La espora que germina en el insecto forma un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula (Samson *et al.* 1988).

3.8.4 Penetración de la hifa dentro del hemocele

Después de la germinación se producen una serie de transformaciones físicas y químicas, tanto en el insecto como en el hongo, que permiten al patógeno penetrar la cutícula de su hospedante. Un conidio puede germinar, sin embargo si no se dan las condiciones físicas y químicas y los estímulos correspondientes no logra penetrar. En el interior del insecto el hongo se multiplica, principalmente por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastosporas en los Deuteromycetes, también se pueden formar en el interior hifas, protoplastos y células sin pared (FUNICA 2004).

Esta penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo; además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización, presencia de sustancias nutricionales y antifúngicas y estado de desarrollo del insecto, cuando la hifa ha llegado al hemocele, se pueden producir diferentes reacciones de defensa del insecto frente a un cuerpo extraño: la

fagocitosis, encapsulación celular y la formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. En este caso, el hongo debe vencer el sistema inmunológico del hospedante antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto (Charnley 1984).

3.8.5 Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto

Según FUNICA (2004) La producción de toxinas es una característica de todos los hongos y cepas. Las toxinas producidas pueden ser de dos tipos: a) macromoléculas proteicas y b) sustancias de bajo peso molecular. Las primeras son enzimas secretadas en cantidades significativas tanto en medios de cultivo como en el cuerpo del insecto. La serilproteasa y sulfidrilproteasa, han sido aisladas de *Metarhizium anisopliae* otras enzimas encontradas son lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas. El segundo tipo corresponde a metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pero que puede ser afectada por factores como nutrientes, pH, temperatura. Las toxinas más comunes de este tipo son principalmente las destruxinas, demetildextruxina y protodextruxina.

Cuando la hifa llega al hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente, desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante y produciendo micotoxinas. La dispersión de éstos en el hemocele depende de la especie del hongo; Las toxinas producidas juegan un rol muy importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. La muerte del insecto se produce con mayor rapidez cuando es afectado por un hongo entomopatógeno que produce cantidades considerables de toxinas, ya que se adiciona la toxemia a la destrucción de los tejidos y a las deficiencias nutricionales (Tanada y Kaya 1993 citado por Cañedo y Ames 2004).

El crecimiento del hongo en el hemocele, se producen los síntomas fisiológicos del insecto afectado como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (deja de alimentarse, reduce su movimiento), entra en un estado letárgico y finalmente muere, lo que puede ocurrir relativamente rápido o en unos cuantos días. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. Los hongos pueden producir sustancias antibacterianas que alteran la coloración del cadáver (Ferrón 1978).

La muerte del insecto parasitado, ocurre generalmente antes que el hongo colonice totalmente el hemocele del insecto. Esto se debe en gran parte a la acción de las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la saprofítica. Cuando el insecto muere no se observa evidencia del hongo causante de la muerte, sino posteriormente. La duración de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales (FUNICA 2004).

3.8.6 Antibiosis

Luego de la muerte del insecto, el micelio invade todos los órganos y tejidos, iniciando generalmente por el tejido graso. Pueden existir órganos o tejidos que no son colonizados. Después de la colonización, el cadáver del insecto se transforma en una momia, la que es resistente a la descomposición bacteriana, aparentemente debido a la acción de antibióticos liberados por el hongo. (FUNICA 2004)

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Ubicación de la investigación

El lugar donde se llevó a cabo la investigación fue en el laboratorio de hongos entomopatógenos (L H E.), ubicado en la Universidad Nacional de Agricultura localizada a seis km de distancia de la ciudad de Catacamas Olancho, a una altitud de 350 msnm y una precipitación promedio anual de 1350 mm y una temperatura promedio de 28 °C.

4.2 Materiales y equipo

P.D.A. (Papa dextrosa agar) MERCK, SDA (Saboraud Destroxa Agar) BIOTEC, bisturís, papel manila, mechero de alcohol, papel parafina, alcohol de quemar, mascarilla con filtro, fósforos, atomizador, agua destilada, porta objetos, azul de metilo, cubre objetos, jeringas de 5 y 1 ml, contómetro (contador manual de esporas), placas petri de 100x15mm, ácido láctico, elenmeyer, beakers, tubos de ensayos, cámara de neuber, papel toalla, bisturis

Cámara de flujo Laminar (biosafety class 2 labconco)

Auto claves (All america model 25x)

Micro- pipeta 5µl a 50 µl (Transferpette)

Horno (Gallenkank)

Calentadores (fisher Scientific.)

Refrigeradora

Microscopio (Meiji)

Estereoscopio (Meiji)

4.3 Manejo de equipo

En este trabajo se utilizó la metodología desarrollada por Avila 2011 para la reproducción de hongos en este laboratorio, siendo la siguiente:

4.3.1 Asepsia

El LHE se sometió a procesos de limpieza general y desinfección, desde equipo e infraestructura; se utilizó como agente desinfectante el hipoclorito de sodio al 3.62 % concentración comercial, y este se disolvió hasta una concentración del 2 %.

4.3.2 Lavado

Se lavaron todo los materiales con agua destilada y detergente para remover cualquier residuo de materia orgánica, y luego se lavó con abundante agua para remover partículas del detergente.

4.4 Esterilización

Se esterilizó bajo dos métodos: la esterilización húmeda (Auto –clave) y esterilización con aire caliente (horno), la utilización de cada método dependió de los materiales a esterilizar. La esterilización de los materiales y cristalería por calor húmedo o a presión de vapor de agua, se llevó a cabo con la ayuda de un autoclave, el cual se manejó a una presión de 2 atmosferas o 15 libras de presión hasta alcanzar a una temperatura de 121.6 °C a 124 °C, la cual se mantuvo durante un tiempo de 15 minutos; por lo general se esterilizó los medios de cultivo, platos petri, tubos de ensayo, papel toalla.

La Esterilización con aire seco se llevó a cabo con el horno y lo cual consintió con la entrada de aire y calentamiento del mismo, a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 a 20 minutos este método se utilizó para equipo como ser beakers, elenmeyer, pipetas.

4.4.1 Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento)

La desinfección a nivel de laboratorio se hizo de manera muy exigente para evitar contaminación de otro microorganismo del cual no se está sometiendo a estudio. Toda área en la cual se llevó a cabo el trabajo de asilamiento fué desinfectado con hipoclorito de sodio al 2%, llevando a cabo esta labor 10 minutos y evitando aplicación lugares donde se encontraba inoculado el hongo entomopatígeno; esta labor se realizó diariamente y se intensificaba cuando se realizaban aislados.

La cámara de aislamiento fue desinfectó antes de cada aislamiento con alcohol al 70%, por dentro y afuera de la misma, se encendió el mechero y se mantuvo la cámara cerrada por termino de un minuto, el mechero se mantuvo encendido en todo el proceso de siembra, luego se procedió a realizar a cabo los aislamientos y siembra de las cepas evaluadas; la desinfección personal fue llevada a cabo siempre antes de realizar aislamientos y después de los mismos, y consistió con la aplicación por aspersión a la manos con alcohol al 70%.

Como último paso para la desinfección fue la utilización de la luz ultravioleta tipo C, con el objetivo de eliminar cualquier contaminante que haya ingresado, al momento de realizar el aislamiento.

4.5 Medios de Cultivo

4.5.1 PDA (Papa Dextrosa Agar) MERCK y SDA (Saboraud Dextrosa Agar) BIOTEC

Se pesaron 40 g de medio de cultivo P.D.A y 62 g de S.D.A cada producto en 1000 ml de agua esterilizada, luego se sometieron las soluciones en un calentador-agitador hasta que se disolvieron completamente; ya disueltas, se utilizó la técnica de siembra en tubos de ensayo, lo cual se vertió el medio en los tubos de ensayo y posteriormente fueron tapados o con algodón envuelto con tela de punto y masking tape para crear un tapón artesanal, luego se colocaron en forma ordenada en un elenmeyer de 500 ml y tapado con papel tapiz.

El montaje se sometió al auto-clave hasta alcanzar 121°C a 14 psi de presión durante 15 minutos, cuando se terminó la esterilización se procedió a trasladarlos a la cámara de flujo laminar donde se les dio una inclinación de manera que el medio pudiera cubrir una mayor área del tubo de ensayo, hasta que pudiera solidificarse y quedara listo para la siembra.

4.6 Aislamiento de los hongos entomopatógenos

4.6.1 Reproducción

Se realizó aislamiento a partir de insectos parasitados en *B. bassiana* H₃ cepa encontrada en los predios de la Universidad Nacional de Agricultura precisamente en los campos de musáceas de la sección de cultivos industriales posteriormente se reactivaron en *Atta cephalotes* , en el caso de *M. anisopliae* procedente del Instituto BATOVI de Uruguay, se utilizaron aislamientos provenientes del cepario del LHE-UNA luego reactivada en termitas

4.6.2 Aislamiento directo

La técnica de aislamiento directo consistió en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto, pasándolo luego a un medio nutritivo P.D.A. Se realizó una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio al 2 %, enjuagándose con agua destilada estéril debido a la contaminación que el insecto posee de otros microorganismos, este tipo de aislamiento se realizó de la siguiente manera:

Se sumergieron los insectos en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por un tiempo de 20 segundos, luego se sumergieron en ADE (agua destilada esterilizada) con una duración de 20 segundos, se repitió una vez más este último paso para asegurar la eliminación de moléculas del hipoclorito de sodio y se depositó en papel toalla para secarlo.

El cultivo que se utilizó para la siembra fue el P.D.A. acompañado con una dosis de 1cc de gentamicina / 1000 ml de solución de medio; el antibiótico se aplicó una vez ya esterilizado el medio y que su temperatura oscilaba en los 40 °C, para evitar la inactivación del mismo, este antibiótico de amplio espectro, y su aplicación fue con el objetivo de evitar el crecimiento de bacterias en el medio y así favorecer el crecimiento de las cepas en estudio.

Al terminar el paso anterior en la cámara de aislamiento se procedió a raspar con un asa bacteriológica las partículas del hongo en el insecto desinfectado, pasándola luego mediante la técnica de rayado a un medio de cultivo, se etiquetó debidamente cada tubo de ensayo como F₁.

4.6.3 Reproducción a partir del aislamiento directo

Se escogieron los tubos que presentaban mayor porcentaje de pureza (5 % de contaminante) los que se escogieron, etiquetándose como un F₁, esta fue la fuente de inóculo. Las posteriores siembras de tubos en la cámara de aislamiento se etiquetaron como F₂ con su fecha respectiva, a los seis días se observó crecimiento del hongo en toda la superficie del

medio, el tiempo total de incubación de la F₂ fue durante los 14 días siguiente en el espacio de la cámara de cría del laboratorio, donde prevaleció una temperatura que entre en 24 - 28 °C. a partir de estas se obtuvo la solución madre con la que se inocularon los *Cosmopolites sordidus* y la solución utilizada en el arroz.

4.7 Evaluación de rendimiento y viabilidad

4.7.1 Rendimiento de conidias / ml de solución

Se determinó, la concentración de conidias por ml de solución a los 21 días después de la siembra del F₂, realizando el conteo utilizando la cámara de Neubauer modificada.

A partir de los cultivos puros, se preparó diluciones en serie de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del entomopatógeno, hasta que obtuvo una dilución que permitió realizar el conteo. Las diluciones se prepararon de la siguiente manera:

Colocamos un ml de la solución de 10 ml del cultivo puro en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril ADE con INEX 27.9 SL al 0.001%.

Se transfirió con una pipeta estéril un 1ml de la primera dilución a un tubo que contenía nueve ml de agua destilada estéril con 0.001% de INEX 27.9 SL, éste se agitó fuertemente durante un minuto, hasta que se logró obtener una tercera dilución de esta manera se procedió hasta que se encontró la dilución adecuada (10^{-4} , 10^{-5}), de la dilución que se seleccionó, se utilizó la dilución 10^{-4} , se tomó con una micropipeta la cantidad de 5µl de solución de 10^{-4} y se depositó en la cámara de Neubeaur.

El conteo de conidias se realizó a través del microscopio mediante un aumento de 40 X, se utilizando se el cuadro principal (c.p) central, el cual está dividido en 25 cuadritos

secundarios con la ayuda de un contómetro se realizó el conteo, luego se calculó la cantidad de conidias / ml solución de la siguiente manera:

El número de conidias que se observaron en los cuadrados de la esquinas y del centro sacándose un promedio de los mismos, este valor multiplicado por el factor de cámara, dividido luego por el factor de dilución. El factor de cámara que se utilizó es de 10,000 por los cuadrados principales se recomienda la utilización de los cuadrados principales para esporas pequeñas, tales como *B bassiana* y *M anisopliae*, en promedio se observaron 120 conidias en la cámara Neubeaur.

$$\text{Nº de conidias/g} = \frac{\text{Nº de conidias/g de la cámara} \times \text{factor de la cámara}}{\text{Factor de dilución}}$$

$$\text{Nº de conidias/g} = \frac{120 \text{ conidias} \times 10,000}{10^{-4}} = 28,196 \text{ conidias}$$

4.7.2 Viabilidad

Las cámaras de incubación fueron esterilizadas junto con los platos petri, junto con papel filtro y porta objeto, en el autoclave a 1.2 bares de presión y 121 C° por un tiempo de 20 minutos.

Se preparó el medio de cultivo (P.D.A) esterilizado en el auto clave, posteriormente con una pipeta pasteurs se depositó dos alícuotas de P.D.A. en un porta objeto a cada extremo del mismo, luego se procedió a depositar con una pipeta pasteur sobre las mismas alícuotas del medio, dos alícuotas de la suspensión del hongo y se colocó el montaje en una cámara húmeda, la cual consistió en un plato petri con papel toalla humedecida esterilizada, con la finalidad de favorecer la germinación del entomopatógenos.

Los porta objetos inoculados se incubaron en un sitio de crecimiento a temperatura de un rango de 24 - 26 °C, dejándolos un tiempo de cinco horas, tiempo suficiente para determinar los porcentajes de germinación, posteriormente transcurrido el tiempo se realizó el montaje en un microscopio a un aumento de 40X, para poder observar la cantidad de esporas geminadas y no germinadas y así determinar los porcentajes de germinación de ambas cepas, para determinar si una espora germinó se midió que los tubos de germinación tuviera dos veces el diámetro de la conidia.

Se hicieron cuatro repeticiones para obtener un promedio de conidias germinadas por cada montaje para posterior obtener el número de conidias por solución madre (25,940 conidias).

Germinadas 92 % = 25940 conidias

No germinadas 8 % = 2255 conidias

Para obtener el número de esporas utilizadas en la parcela en el campo por aislado se procedió a calcularlos en base a 1×10^8 equivalente a 100 1 000,000 esporas / hectaria (10,000 m²), el área utilizada por aislado fue de 105 m².

100,000,000 conidias	10,000 m ²
----------------------	-----------------------

1,050,000 conidias	105 m ²
--------------------	--------------------

25,940 conidias	1 gramo
-----------------	---------

1,050,000 conidias	40 gramos de producto por aplicación.
--------------------	---------------------------------------

4.7.3 Inoculación de *Beauveria bassiana* H₃, *Rhyssomathus* sp y *Metarhizium anisopliae* a *Plutella xylostella*.

Inicialmente se intentó confinar insectos adultos en macrotuneles cubiertos con agrivon a una altura de 1.58 metros con el fin de obtener huevos para reproducirlos en laboratorio, sin embargo las elevadas temperaturas (28 - 34 °C) y la alta humedad relativa causó mortalidad de adultos., posteriormente se intentó reproducirlos en maceteras con plantas de repollo y bajo jaulas de malla metálica de 0.5x0.5x0.5 metros y también afectó el fenómeno de las altas temperaturas y el cambio de hábitat, por lo que los adultos perecieron.

Dadas las circunstancias se procedió a recolectar larvas del segundo estadio larval en el cultivo de repollo híbrido Izalco ubicado en la sección de hortalizas del departamento de producción vegetal, se hicieron las búsquedas minuciosas en las hojas en campo definitivo para capturar 480 inmaduros, todos del tercer estadio larval, se sometieron a una desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 2% en un tiempo de cinco segundos debido a la contaminación que poseían del campo, luego se colocaron en otro recipiente con agua ADE por un tiempo de ocho segundos, para la eliminación de moléculas de cloro y por último se colocaron en papel toalla para su secado, una vez en laboratorio se incubaron en las placas petri con papel toalla y hojas de repollo (*Brassica oleraceae*) como fuente alimenticia atractiva del fitófago. Se colectaron 480 larvas distribuidas en 120 por tratamiento (30 unidad experimental).

Se vertieron 10 ml de ADE con INEX 27.9 SL al 0.001%, como surfactante para el desprendimiento de las conidias en los tubos de ensayo, esta es la solución madre que partió de la F₂, de la cual se inoculó a la *Plutella xylostella*.

Para cada aislamiento de prepararon las soluciones por cepa (Cuadro 1) con agua destilada. La técnica de aplicación del inóculo fue la aspersión cada cepa por separado, los insectos fueron colocados en platos petri con papel toalla y trozos de hojas de repollo como fuente alimenticia atractiva a las larvas, estos fueron etiquetados y ubicados en estantes de la

sección de cámara de cría del LHE a una temperatura que oscilo de 23 - 28 °C, distribuidas según espacialmente (Cuadro 2)

Cuadro 1. Dosificación de los tratamientos.

Tratamiento	Dosificación
T1 (<i>Beauveria bassiana</i> H ₃)	1X 10 ⁸ conidias/hectaria
T2 (<i>Beauveria bassiana</i> <i>Rhyssomathus</i> sp)	1X 10 ⁸ conidias/hectaria
T3 (<i>Metarhizium anisopliae</i>)	1X 10 ⁸ conidias/hectaria
T4 (Testigo) agua destila	0

Cuadro 2. Distribución espacial de los tratamientos.

R1	R4	R3	R4
T1	T4	T2	T4
T2	T3	T1	T3
T3	T2	T3	T2
T4	T1	T4	T1

4.8 Variables a evaluadas en laboratorio

4.8.1 Mortalidad provocada por las cepas

Se tomaron datos diarios de la mortalidad de las larvas por cada cepa. Se revisaron todas las placas petri para verificar las larvas muertas y vivas después de asperjar, se registró a diario de mortalidad en todas las repeticiones de cada tratamiento durante los tres días evaluados para posteriormente obtener un porcentaje de mortalidad total diario. Además se observó el tiempo de esporulación dentro del insecto durante el periodo de evaluación los cuales fueron expuestos a 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

Los insectos muertos se trasladaron una cámara húmeda, separado para cada día, con el objetivo de observar el tiempo de colonización del hongo, apuntando la fecha en que se encontró muerto, como también el tratamiento y repetición de procedencia, todo esto por

razones de registros de muertes diarias y para brindarle las condiciones requeridas para que el hongo colonizara y se observó con un estereoscopio el avance en la *P. xylostella*.

4.8 2 Determinación de TL₅₀

Esta variable de laboratorio se determinó llevando registros diarios de mortalidad, iniciando 48 horas después de haber asperjado las larvas por los hongos, se revisaron todas las placas petri en todas las repeticiones por tratamiento en las que se inocularon con los hongos, dicho proceso se realizó para medir el día y que aislado logró matar el 50 % de las larvas inoculadas por cada aislado (120 larvas por cepa), se llevó este registro por tres días que fue lo que duró el proceso de mortalidad. Se realizó un ANAVA con el paquete estadístico SAS al 5% de significancia y para medir si existió diferencia estadística se utilizó la prueba de medias (LSD).

4.8.3 Tiempo y número de larvas parasitadas

Esta variable se determinó contabilizando el número de insectos que presentaron el hongo micosado sobre cuerpo cada día y en todas repeticiones de cada hongo, iniciando en el día cuatro y finalizando en el día siete, con el propósito de cuantificar el porcentaje de insectos diarios que reavivaron el hongo, por lo que se llevó a cabo un seguimiento una vez muerto el insecto y este discontinuó cuando se presentó los primeros esporas sobre larvas de *P. xylostella*; este tiempo se determinó observando el insecto en el estereoscopio diariamente hasta que se observó el indicio del crecimiento.

Cuando se encontró presencia de micelio se trasladó la larva a un cuarto de cría en una cámara húmeda para favorecer el crecimiento del mismo, apuntando la fecha en que se encontró con esporas, como también el tratamiento y repetición de procedencia, todo esto por razones de registros.

4.9 Evaluación de las cepas a nivel de campo

4.9.1 Ubicación del experimento

El ensayo se realizó sección de hortalizas de la Universidad Nacional de Agricultura, localizada a seis kilómetros de distancia de la ciudad de Catacamas, carretera a Culmí en el departamento de Olancho, a una altitud de 350 msnm y una precipitación promedio anual de 1350 mm, una humedad relativa de 74 % y una temperatura promedio de 28 °C (Departamento de RR NN 2012).

4.9.2 Materiales y equipo

Se utilizó bomba de mochila, cubeta plástica, machete, cinta métrica, cuchillo, probeta, bandejas plásticas de 162 alveolos, fertilizantes, sustrato sintético (promix), semilla certificada del híbrido Escazú, estacas, cabuya, detergentes, calculadora, hipoclorito de sodio, agua destilada y libreta de campo

4.10 Diseño a utilizar en campo

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos fueron *Beauveria bassiana* H₃ (T1), *Beauveria bassiana Rhysomathus* sp. (T2), *Metarhizium anisopliae* (T3), y sin aplicación (T4).

Modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + e_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = es la lectura del tratamiento i-ésimo en el j-ésimo bloque.

m = es el promedio poblacional de la variable respuesta

t_i = es el efecto del tratamiento “i”, con $i = 1, 2, \dots, t$

b_j = es el efecto del bloque ‘j’, con $j = 1, 2, \dots, r$

e_{ij} = es el error asociado con la lectura del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo bloque

4.10.1 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza a cada una de la variables y pruebas de separación de medias (LSD) al 0.05 de probabilidad en las variables que presentaron significancia para lo cual se utilizó el paquete estadístico SAS.

4.11 Manejo agronómico del cultivo

4.11.1 Establecimiento del semillero en el invernadero

Se lavaron bandejas y luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio a una dosis de 0.3 kg por 100 litros de agua por 15 minutos después de lavaron con agua limpia, posteriormente se sembró el híbrido Escazú utilizando sustrato promix, se estibarón las bandejas cubriéndolas con plástico de color negro para homogenizar la germinación, se colocaron en lugar fresco y ventilado por dos días y se realizaron monitoreos de humedad, germinación y plagas.

Una vez emergieron fueron trasladarlas al invernadero en horas de la tarde, nueve días después de germinadas se aplicó un fungicida previcur (propanocard), una copa por bomba de 17 litros de agua para prevenir ataque hongos que causan el mal de talluelo (*pythium sp*), 11 días después se fertilizaron con una dosis 1.36 kg de 18-46-0 en un volumen de 200

litros de agua, a los 25 días se hizo la última fertilización con 18-46-0, bajo estas condiciones permanecieron 31 días.

4.11.2. Descripción de ensayo en campo

El ensayo estuvo compuesto por cuatro tratamientos y cuatro repeticiones para un total de 16 unidades experimentales cada una compuesta por 75 plantas distribuidas en tres camas (25 por cama) separadas entre ellas a una distancia de 1.50 m, cultivadas a doble hilera a 0.40 m entre planta y distribución tres bolío, en donde en la cama del centro se realizaron los muestreos al azar. El área útil fue de 56 m², el área total fue de 414.0 m².

4.11.3 Preparación de suelo

Las parcela se preparó 30 días antes de la siembra haciendo un pase de arado, dos rastrados, camado y colocación de un sistema de riego por goteo, con distanciamientos de 1.50 metros de ancho de cama, una altura del suelo de 0.30 metros, con distancia entre planta de 0.40 metros y 0.40 y dos hileras por cama.

4.11.4 Trasplante

Se realizó a los 32 días después de la siembra, se tomó como indicador el desprendimiento del pilón completo, otro indicador fue cuando la planta tenía tres o cuatro hojas verdaderas, se realizó un riego profundo previo, se trasplantó en horas de la tarde y se utilizó una solución arrancadora a dosis de 1.36 kilogramos de 18-46-0 en 200 litros de agua.

4.11.5 Fertilización

Se realizó nivel de fertilización granulada a los siete días ddt con 18-46-0 aplicando cuatro gramos por planta alrededor de la misma, 23 ddt se aplicó una mezcla de 4 g de 18-46-0 y dos g de calcio y uno de sulfato de magnesio, a los 35 ddt siete g de urea 46% y dos g de 0-0-60, finalmente a los 45 días se fertilizó con cinco gramos de urea. Para coadyuvar la parte foliar se hicieron dos aplicaciones de Bayfolan forte una dosis de 3 copas Bayer por bomba de 17 litros 30, la segunda a los 40 ddt.

4.11.6 Manejo de plagas y enfermedades

A los cinco días después del trasplante se aplicó al pie del cultivo vidate a una dosis de una copa bomba para controlar gusanos cortadores, nocheros y diabroticas, ocho días después de hizo la segunda aplicación debido que el estado de las plántulas eran susceptibles a un ataque de gusano, sin embargo con el fin de evitar mortalidades de la plaga a evaluar (*Plutella xylostella*). Para contrarrestar los niveles de lepidópteros ovipositando en las plántulas de repollo se elaboraron trampas en recipientes conteniendo melaza con proporción de un litro de melaza mezclados con 10 de agua a una altura de un metro con el objetivo de atrapar plagas principalmente lepidópteros con habito alimenticio nochero, dicha método de control duro 20 días, posteriormente se quitaron con el fin de no afectar la población de *Plutella xylostella*.

Se hicieron muestreos para detectar enfermedades en el ensayo y fueron insignificativas los hallazgos por lo que no se hicieron aplicaciones, se detectaron plantas con síntomas bacterianos por lo que se exterminaron del lote. A los 45 días se detectó alta presencia de leptofobia en las cuatro primeras hojas bajas contadas de abajo hacia arriba y se eliminaron reduciendo la incidencia de larvas ajenas a evaluar, también para controlar humedad propicia para hongos y bacterias, con ello evitando la aplicación de insecticidas principalmente nocivos a las larvas de *Plutella xylostella*.

El control de malezas se realizó desde la preparación del terreno en los días previos al trasplante dejando las semillas de las malezas expuestas al sol, cada ocho días se hicieron limpiezas manuales. Las malezas que predominaron fue gramíneas y verdolaga (*Portulaca oleracea*).

4.11.7 Aplicación de los aislados (cepas) en el campo

Se utilizó agua destilada con pH de 5.8 y para lograr una mayor dispersión de las esporas se agregó INEX 27.9 SL al 0.001, se hicieron las soluciones vertiendo 10 ml en cada tubo de ensayo para desprender las conidias hasta obtener una solución madre, posteriormente se hizo el cálculo por área de acuerdo a los pasos de rendimiento y viabilidad (metodología laboratorio). Se utilizó una bomba de mochila de 17 litros por aislado previamente lavada y desinfectada con hipoclorito de sodio al 5 %, detergente y urea para eliminar microorganismos y moléculas químicas que llegaran a causar inhibición en el efecto del entomopatógeno.

Se diluyeron las soluciones madres concentradas por separado en 10 litros de agua destilada a un pH de 5.8 (se hizo una calibración previa en la parcela experimental), en un la bomba se aplicó homogéneamente en el mismo tiempo y por cada tratamiento en el momento que el repollo inició a formar cabeza (48 ddt) momento oportuno donde la larva inicio a causar daño. Las aplicaciones se realizaron en horas de tarde para proteger las esporas de los rayos solares y lograr mayor efectividad. Se hicieron tres aplicaciones, la segunda aplicación se hizo 54 ddt y la tercera a los 60 ddt con los mismos pasos anteriores.

4.12 Variables evaluadas en campo

4.12.1 Mortalidad causada por las cepas

Esta variable se determinó realizando muestreos a los 48 ddt considerando que en este tiempo el cultivo presentaba una etapa fenológica propicia para ser atacada, se observaron poblaciones de adultos y larvas de *Plutella xylostella* invadiendo las plantas de repollo, paralelo a la infestación se registraron datos de lluvia sobre el ensayo (Figura 4). Los muestreos se efectuaron un día antes de la aplicación y tres días después, tomando en cuenta la parcela útil eligiendo 10 plantas por repetición (cinco plantas consecutivas por hilera) en donde se revisó minuciosamente las hojas contando las larvas existentes en cada cabeza para obtener un promedio por repetición. Cada aplicación se hizo con intervalos de seis días.

4.12.2 Peso comercial de la cabeza

Se cosecharon a los 72 ddt, tiempo en que el cultivar de repollo presentó características de consumo, por tanto se procedió a cortar las 10 cabezas más uniformes de la parcela útil (cinco plantas consecutivas de cada hilera) de todas repeticiones incluyendo el testigo, se quitó la parte dañada y se pesó la parte comestible o comercial luego obtener un promedio por tratamiento. Los resultados se expresaron en tm ha^{-1} y así se logró determinar que aislado aplicado que presentó los mejores resultados en relación al testigo.

El cálculo se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Rdto tm/ha} = \frac{(\text{Peso de campo en kg} \times 10,000 \text{ m}^2)}{\text{Área útil en m}^2} \times 1000\text{kg}$$

4.12.3 Porcentaje dañado de la hoja

Esta variable se midió cuatro días después de la última aplicación de aislados (68 ddt), considerando características fenológicas del cultivar próximas a cosecha, además que la plaga evaluada había expresado su potencial de daño sobre su hospedero. Se realizaron muestreos de daño de hojas en 10 plantas al azar en la parcela útil, (cinco plantas consecutivas por hilera), contabilizadas de abajo hacia arriba tomando la tercera y cuarta hoja. Debido a las complejas galerías de daño que hace la larva al alimentarse se dificultó utilizar un instrumento de medición precisa para registrar el daño por lo que se procedió a cuantificarlo visualmente el porcentaje de daño, evaluando de acuerdo a las siguientes escalas en grados:

Cuadro 3. Descripción de los rangos utilizados para realizar muestro de daño foliar en el cultivo de repollo.

Grado	Escala de daño en porcentaje
0	0 daño
1	1-10 daño
2	11-20 daño
3	21-30 daño
4	>31 daño

V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Mortalidad causada por las cepas evaluadas

Resultados evaluados por la siguiente variable para el primer día muestran que existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados ($p < 0.005$) en donde todos los aislados muestran un efecto bioplaguicida superior y diferenciado con respecto al testigo. Diferencias entre los aislados sobresalen *Beauveria bassiana* H₃ con 2.25 % y *Bb. Rhyssomathus* sp. en 3.45 % con un mayor y diferenciado porcentaje de mortalidad al mostrado por *Metarhizium anisopliae* con 2.23% . Mientras que entre ambos aislados de Bb y Ma. no se encontró diferencias significativas entre ellos de acuerdo a la prueba de medias.(LSD).

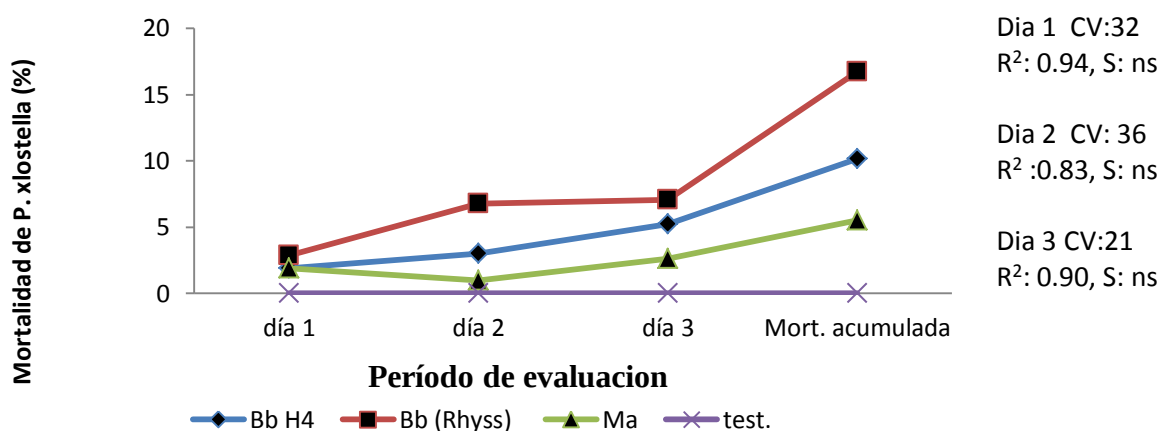


Figura 1. Mortalidad diaria de *Plutella xylostella* provocada por los aislados *B. bassiana* H₃, *Bb. Rhyssomathus* sp y *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio

Nuevamente en el segundo día el Deuteromicetes *Bb. Rhyssomathus* sp mostró mayor virulencia ascendente, sobre las larvas comparado con el día uno, diferenciando en un 5.51 % de mortalidad a *B. bassiana* y 7.90 % a *M. anisopliae*, con los resultados obtenidos se

caracteriza como un hongo promisorio para parasitar insectos, al realizar la prueba de medias se encontró que existen diferencias significativas entre los aislados evaluados. En el tercer día *Bb. Rhyssomathus sp.* siguió su tendencia parasitaria positiva, mostrándose como el aislado más virulento respecto a los dos restantes, sin embargo comparado con el total de insectos inoculados (120) fue baja su mortalidad numéricamente (Figura 1).

Estos resultados son similares a los reportados por Franco (2001) y Wildin (1986) en un estudio similar de laboratorio de la EARTH Costa Rica, comprendido entre los meses de junio y septiembre del 2001. En este ensayo realizado, del total de larvas evaluadas, el 38.85 % de ellas resultaron infectadas, las que murieron a consecuencia de hongo, el restante no fue contagiado y llegaron a pupa y adulto.

5.2 Determinación del TL₅₀

Ninguna cepa evaluada alcanzo el TL₅₀ en el tiempo de tres días, véase en la Figura 2 que la evaluación del día dos fue el más representativo causando mortalidad del 8.45 % del total inoculado. En consecuencia el aislado *Bb. Rhyssomathus sp.* puede categorizarse como la cepa promisorio para control biológico.

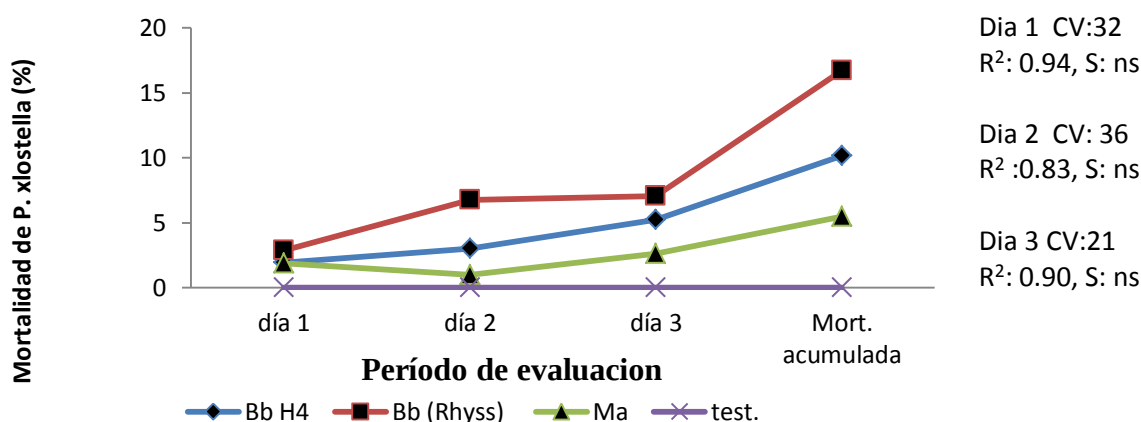


Figura 2. Mortalidad diaria de *P. xylostella*, causadas por *B. bassiana* H₃, *B. bassiana*, *Bb. Rhyssomathus sp* y *M anisopliae* en el laboratorio.

Carballo *et al.* (1995) aislaron la cepa de *Beauveria bassiana* 447 en laboratorio inocularon larvas de *P. xylostella* del segundo estadio y encontró altas mortalidades y un tiempo letal medio reducido a una concentración de 1×10^9 conidias/ hectaria. Lo anterior demuestra los diferentes aislados de *Beauveria bassiana* presentan las características deseables de un entomopatógeno y se deben considerar promisorias.

Ferrán (1978) afirma que existe una correlación positiva entre el número de esporas infectivas y la mortalidad. Menciona además que las concentraciones bajas no causan el desarrollo de la enfermedad. También Fernández *et al.* (1985) reporta que encontraron un aumento de mortalidad de la broca del café *Hypothenemus hampei* al aumentar la concentración de *B. bassiana*.

De igual manera Franco (2001) encontró resultados similares en su trabajo de investigación con cepas de *Beauveria bassiana*, logrando similares porcentajes de mortalidad a los cinco días después de inoculadas las larvas de *P. xylostella* con la diferencia que manejó temperaturas de laboratorio de 18 °C en cambio Bb. Aislado de *Rhyssomathus sp.* logró mortalidades mínimas en tres días debido a que las temperaturas fueron desde 26 -30 °C, situación que aceleró el tiempo de infección.

5.3 Esporulación de las larvas

Para esta variable la cepa de *Beauveria bassiana* extraída de *Rhyssomathus sp.* fue la que mostró mayor esporulación diferenciándose desde el día cuatro hasta el día siete, diferenciando en el día cuatro a *Beauveria bassiana* con 24.25 % y *Metarhizium anisopliae* 23.25 % para el día cinco superó con 29.35 %, y 27.25 % para *M. anisopliae*, finalmente el día seis causó diferencia 39 % y 42.25 %. Nótese en la Figura 3. que los porcentajes causados por *B. bassiana* y *M. anisopliae* son similares para el día uno, dos, tres y cuatro y según la prueba de medias (LDS) al 0.005% no presentan diferencias significativas entre ambos (Cuadro 4).

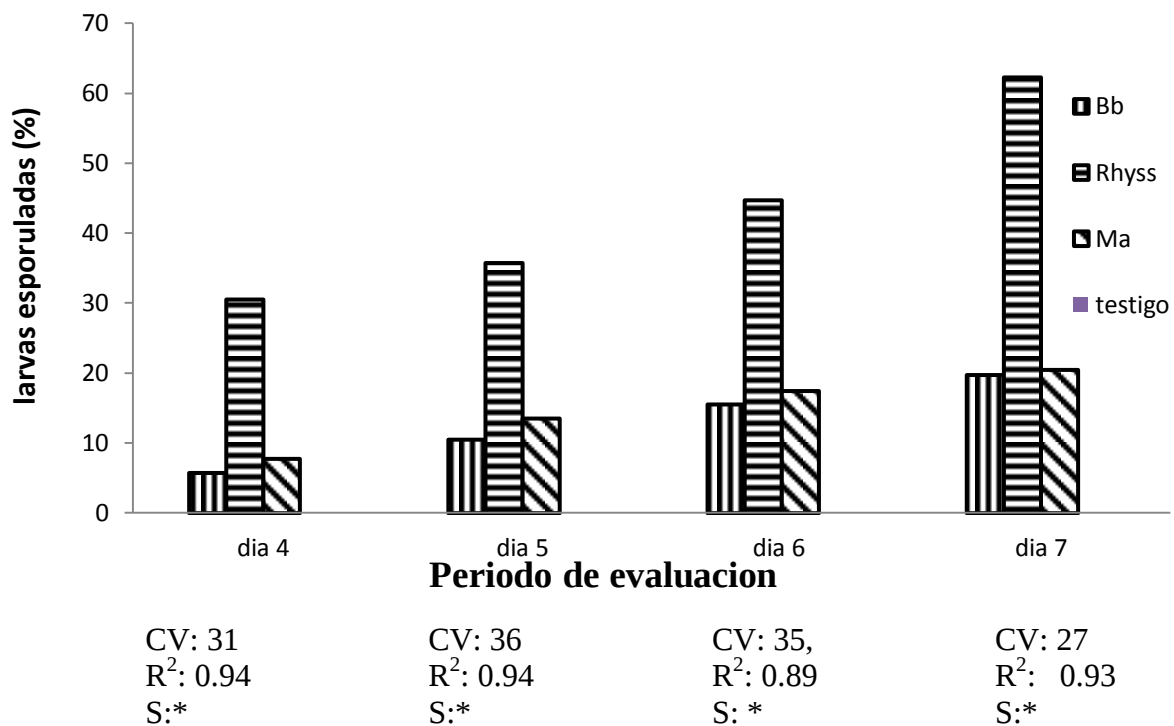


Figura 3. Esporulaci3n diaria de *P. xylostella*, causadas por *B. bassiana* H₃, *Bb.* *Rhyssomathus* sp y *M. anisopliae*

Ferr3n (2005) menciona que la gran dependencia de la humedad es el mayor factor limitante que presentan los hongos, ya que para que se produzca la germinaci3n y esporulaci3n fuera del hospedante se requieren valores de humedad relativa superiores a 90%.

Tambi3n Wilding (1986) en un trabajo realizado en la EARTH, Costa Rica reporta que *Metarhizium anisopliae* solo represent3 un 8 % de virulencia y esporulaci3n baja iniciando a los seis d3as y terminando a los ocho d3as.

Si se compara la esporulaci3n con las larvas muertas, n3tese en el Cuadro 4 que cuando se aplica *Bb.* aislado de *Rhyssomathus* sp ascendió de acuerdo como se iban realizando los

muestreos en donde Bb. Rhyssomathus se comportó de una manera más agresiva comparada con la cepas restantes

Cuadro 4. Porcentaje de larvas muertas (LM) y esporuladas (LE) en el laboratorio en cuatro muestreos

Trat	Larvas		Larvas		Larvas		Larvas
	Muertas	Espor.	Muertas	Espor.	Muertas	Espor	Espor.
	2.3	5.75	3.63	10.5	6.25	15.5	19.75
	3.45	30.5	8.13	35.75	8.48	44.75	62.25
	2.25	7.75	1.13	13.5	3.15	17.5	20.5

5.4. Variables evaluadas en campo

5.4.1 Sobrevivencia de larvas en el campo

Resultados evaluados por la siguiente variable muestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados ($P < 0.05$) en donde todos los aislados muestran un efecto bioplaguicida no significativo. Diferencias entre los aislados no sobresale ninguna que haya efectuado control de larvas sobrevivientes. No se encontró diferencias significativas las cepas de acuerdo a la prueba de medias (LSD).

Durante los muestreos de larvas que se realizaron en el día uno, antes y después de aplicar se encontró que el número de larvas sobrevivientes eran similares, de igual manera para día dos y tres, todos los resultados no muestran diferencias significativas respecto al testigo, tal como se observa en el Cuadro 5 que los niveles de *Plutella* se mantuvieron desde el inicio de las aplicaciones hasta el día del ultimo muestreo, poblaciones que sobrepasaron el nivel crítico que es de una larva por cabeza, nótese que el rango presentado fue de 3.65 a 5.03 larvas.

Cuadro 5. Número de larvas antes y después de los muestreos previo hacer la aplicación de soluciones (cepas).

	Primera aplicación		Segunda aplicación		Tercera aplicación	
Cepas	L. antes	L. despues	L. antes	L. despues	L. antes	L. despues
Bb H3	4.35	4.425	4.9	5.025	3.65	3.775
Bb. Rhyss	4.675	4.775	4.275	4.325	4.45	4.425
Ma	5.025	5.2	4.175	4.675	4.5	4.55
Test.	4.7	4.95	4.575	4.75	4.4	4.35
CV	5.04	23.99	7.33	8.21	9.7	10.26
R ²	0.84	0.47	0.64	0.51	0.63	0.57
S	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Los resultados reportados son similares a los encontrados por franco (2005) en un estudio realizado a nivel de campo durante la época lluviosa. Durante el manejo experimento se registraron precipitaciones altas (Figura 4). Trabanino (1997) menciona que la lluvia y las bajas temperaturas son elementos climáticos que reducen significativamente las poblaciones de *P. xylostella*.

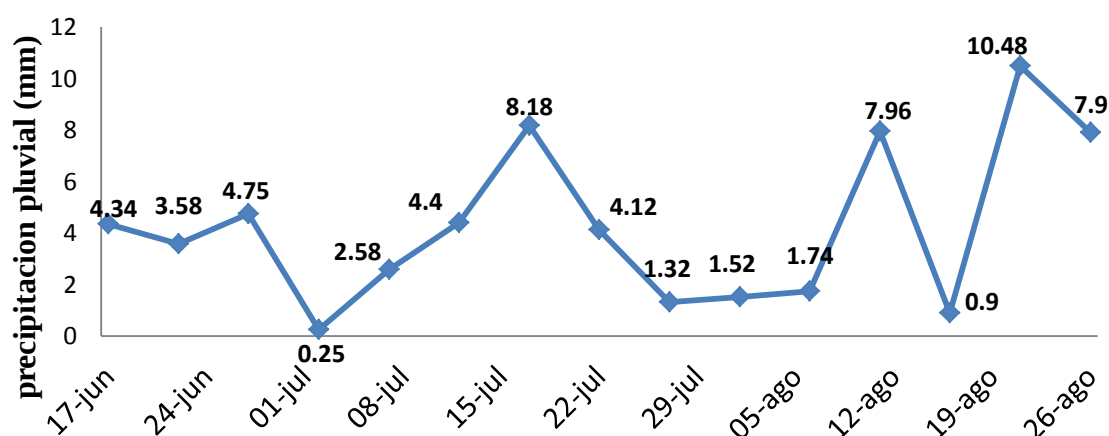


Figura 4. Distribución de lluvias desde junio a agosto durante el ensayo a nivel de campo evaluado.

5.4.2 Peso comercial de la cabeza de repollo

Al cuantificar pesos de cabeza de repollo se encontró una similitud entre los datos, nótese que su rango fue de 1.53 a 2.0 kg donde las aplicaciones con *Metarhizium anisopliae* fueron las cabezas con menor daño y *Beauveria bassiana* se obtuvo mayores daño y menor peso comercial de cabeza (Figura 5).

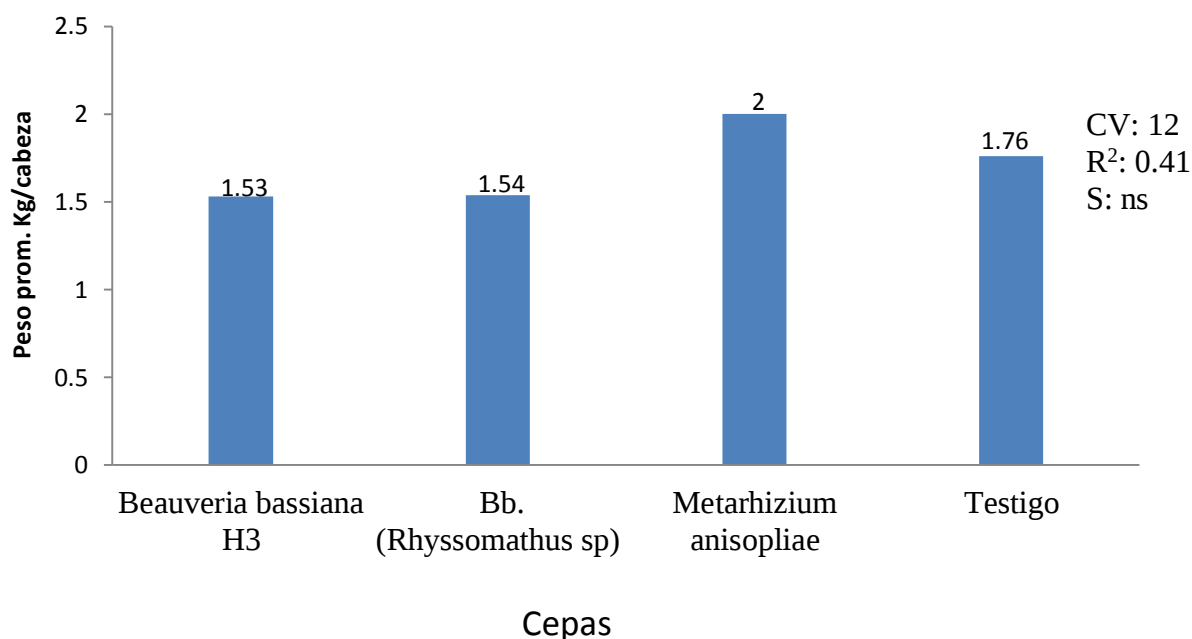


Figura 5. Peso comercial de la cabeza de repollo del cultivo de repollo (*brassica oleracea*) híbrido Izalco, cosechadas 68 ddt.

Queda por investigar si el testigo presentó similares resultados pudo deberse a las altas precipitación observada en la Figura 6. Las cuales redujeron la efectividad y virulencia de las cepas inhibieron la efectividad y virulencias de las cepas. Lecuona y Alves (1996) señalan que la sobrevivencia del inóculo sobre el follaje es fundamental para incrementar el contagio del hospedante, Estos autores también mencionan varios factores importantes que determinan la sobrevivencia de los entomopatógenos en el campo, como son la radiación solar, la humedad relativa y la temperatura; la lluvia es considerada como un factor importante que incide en la disseminación de hongos,

Trabanino (1997) menciona que la lluvia y las bajas temperaturas son elementos climáticos que reducen significativamente las poblaciones de *P. xylostella*, es posible que debido a estos factores se obtuvieron los anteriores resultados.

5.4.3 Porcentaje de daño a la hoja

El efecto de control esperado de los hongos no puede ser constatado en el daño de las *Plutella xylostella* en las hojas externas, observe que en la Figura 6. Las diferencias son insignificantes, los tratamientos presentaron daños similares, para *Beauveria bassiana* 15.25 %, Bb *Rhyssomathus sp* 15.48 %, *Metarhizium anisopliae* 20%, y testigo 17.5 %, Estadísticamente no se encontraron diferencias entre los tratamientos (Figura 6)

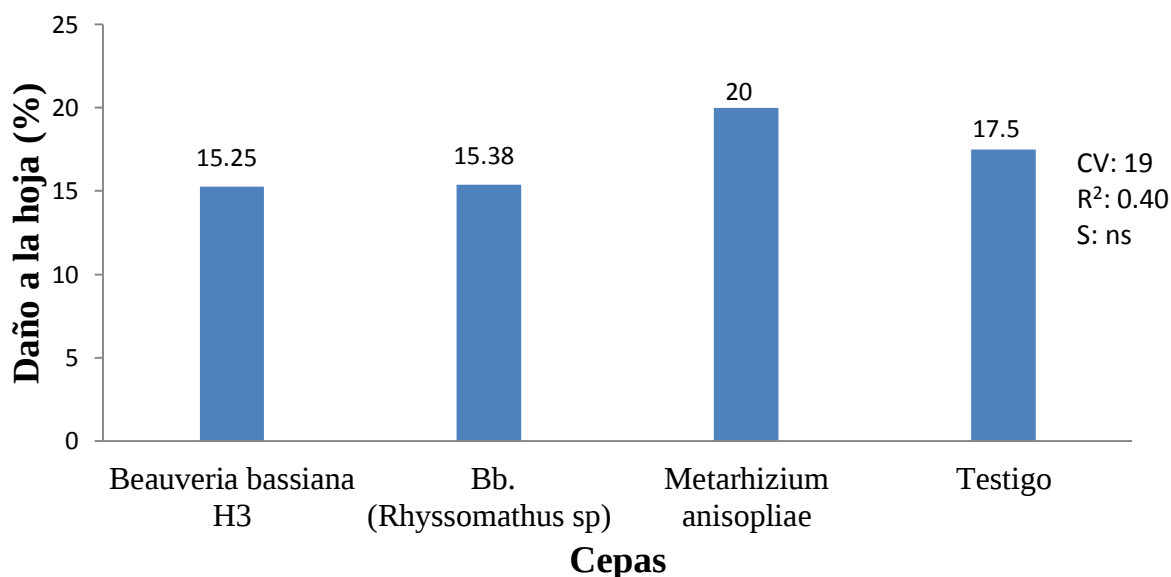


Figura 6. Porcentaje de daño a la hoja en el cultivo de repollo (*brassica oleracea*) híbrido Izalco evaluado a los 68 ddt.

Contreras *et al.* (1997) utilizó *B. bassiana* en aceite de soya para el control del picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*) obteniendo buenos resultados debido a que el aceite posee propiedades que evitan la evaporación y permite la aplicación en gotas más pequeñas que

las utilizadas con suspensiones acuosas. Además, la formulación en aceite mejora la persistencia de los conidios en la superficie del cultivo y permite usar concentraciones más bajas del hongo. Estos aspectos, así como el uso de equipos de aplicación de bajo volumen.

VI. CONCLUSIONES

1. En laboratorio la cepa *Bb* aislada de *Rhyssomathus sp.* fue la que presentó mayor mortalidad sobre *P xylostella* representada con 16.7 % y la cepa con menor mortalidad fue *M. anisopliae* aislado de termias con de 5 %
2. El TL₅₅ no se logro determinar ya que no se obtuvo más del 50%de mortalidad del total de larvas inoculadas encontrándose únicamente el 19.3%.
3. La cepa *Bb.* aislado de *Rhyssomathus sp* presentó el 68 % de larvas esporuladas considerándose la más patógena comparada con *Beauveria bassiana* H₃ que ocasionó el 19 % y *M. anisopliae* con 17.8 %.
4. Al cuantificar el número de larvas vivas después de las aplicaciones en cada una de las cepas no se encontró diferencia alguna debido a que la virulencia de estas no se vieron manifestadas al compararla con el testigo.
5. Al cuantificar el peso comestible de la cabeza de repollo cuando se aplica *Bb* aislado de *Rhyssomathus sp* se observó un menor daño por *Plutella* valores que no fueron significativos al comparar con el testigo.
6. A nivel de campo ninguna de las cepas aplicadas en el cultivo de repollo híbrido Izalco presentó diferencias de peso de la cabeza de repollo respecto al testigo, por lo que la producción obtenida ocurrió por efectos naturales.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en aceite, tanto mineral como vegetal para mejorar persistencia en la planta de repollo.
2. Reactivar las cepas en los mismos insectos a evaluar para incrementar virulencia
3. Evaluar las mismas cepas y concentraciones en laboratorio con larvas del primer estadio.
4. Realizar el mismo ensayo en época de seca con las mismas cepas, concentración y la misma metodología para comprobar si el efecto del agua, humedad relativa y temperatura inhiben la efectividad de los inoculos.
5. Por su efecto en laboratorio la cepa *Beauveria bassiana* aislado del insecto *Rhyssomathus sp.* es un hongo promisorio para ser evaluado en un programa de manejo microbiano de *P. xylostella*..
6. Establecer estrictas normas de ingreso al laboratorio para reducir la presencia de contaminantes, además que el personal use los implementos necesarios.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Acevedo (2008) Aislamiento y validación en campo de *Beauveria bassiana* (Balsamo) contra *Hypothenemus hampei* (ferrari) Sampedro-Rosas. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 4 (2): 199-202. Universidad Autónoma de Guerrero México, UA de Ciencias de Desarrollo Regional, calle Pino s/n Col. El Roble, Acapulco, Gro. C. P. 39-640.

Aguilar P. (2010), Caracterización molecular de 18 aislamientos de *Beauveria bassiana* asociado a *Cosmopolites sordidus* y *Metamasius* sp, Tesis como requisito a optar el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas Olancho honduras C. A. pág. 5-45.

Alves, S.B.1986. Control microbiano de insectos, primera edición, editorial Manole, san Pablo Brasil, 407 pág.

Alves, 1986. Controle microbiano de insectos. Primerira edicao. Ed. Manole. 409 pp. Cabrera, R. I. 1992. Aislamiento y Ceoario. En Curso de control biológico de plagas y enfermedades del ácaro del cocotero *Eriophyes gerreronis*. Cienc. Tec. Agric. Vol. 10.

Andrews K. 1984. El manejo Integrado de Plagas invertebradas en los cultivos Agronómicos, Hortícolas y frutales en la Escuela Agrícola panamericana. Zamorano Press. Consultado el 28 febrero del 2012 Disponible en:
<http://web.entomology.cornell.edu/shelton/veg-insects-global/spanish/dbm.html>.

Armstrong, A.M. (1992). Insectos y Métodos de Control en Repollo. In Foro técnico cultivo y producción de repollo, Barranquitas. Puerto Rico, Universidad de Puerto Rico. 14 pág.

Ávila 2011 EFECTO DE *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill.) Y *Metarhizium anisopliae* (Metch. Sorok.) CONTRA EL PICUDO NEGRO DE LA MUSACEAS (*Cosmopolites sordidus*, Tesis como requisito a optar el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas Olancho honduras C. A. pág. 5-45.

Berlaga, A. (2006), Manejo y conservación de Hongos Entomopatógenos, Producción de Hongos Entomopatógenos, Centro Nacional de Referencia de Control biológico, Tecoman, Colima. México. 12 pág.

Blanco, E. 2007. Control biológico de la polilla de la col *Plutella xylostella* (L.). En línea, consultado el 25 marzo de 2012, Disponible en <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/PLUT-BIO.htm>

CATIE C.R. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas el cultivo del repollo. Turrialba, Costa Rica. Editorama S.A 80p. (Serie técnica, Informe No. 150).

Cañedo V, Ames T, 2004, “Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos”, Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.

Charnley, A. 1984. Physiological aspects of destructive patogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: Invertebrate-microbial interactions. Anderson, J., A. Rayner and D. Walton. Cambridge University Press. Cambridge. pp 229-270.

Cortez E, Moncada J, (2007). “Parasitismo natural de la palomía dorso de diamante (*plutella xylostella*) L. en canaloa en el norte de Sinaloa” colegio de postgrados, agro ciencia, México vol. 41, número 003, pág., 347 – 354.

Díaz BA, 2005, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. (2008) Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 301-306.

Echeverría B.2006. Caracterización biológica y molecular de aislamientos de hongo entomopatógenos *Beauveria bassiana*. Consultado el 28 de febrero del 2012, disponible <http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/dspace/bitstream/2238/463/1/Trabajo+Final+de+Graduaci%EF%BF%BD%EF%BF%BDn+Biblioteca.pdf> .

Echeverría Beirute, F.2006. Caracterización Biológica Y Molecular De Aislamientos Del Hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Tesis. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico De Costa Rica.105pp.

España, M (2010), Efecto de carbofuran, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en el control de *Cosmopolites sordidus*, Tesis como requisito aptar título de Ingeniero agrónomo, Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas Olancho honduras C.A. pag. 10-13.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of entomology. 23:409-442.

Folcia, am, (1996). Aspectos morfológicos, biológicos e ingesta de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Rev. Facultad de Agronomía UBA, 16 (3): 173-178.

Fuentes Gregorio, Carballo V, (1995), Evaluación de aislados de *Beauveria bassiana* (BALL.) VUUL. Para el control de *Plutella xylostella* (L.) lepidoptera : plutellidae), CATIE, turrubalba, Costa Rica. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A5475E/A5475E.PDF>

Franco K. (2001) “Evaluación de tres cepas de hongos entomopatógenos para el control de *plutella xylostella* (l.) (lepidoptera: plutellidae) en condiciones de laboratorio”, Trabajo de Graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Agrónoma con el grado de Licenciatura, Universidad EARTH, Costa Rica 39 pg.

FUNICA Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua. 2003 1ªEd, Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Revisado por Dr. Falguni, GUharay, CATIE, Nicaragua.

Gonzáles, (2001) Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 60 p.31-35.

Gonzalo M; García T. (2000), “Evaluación de plaguicidas biológicos y botánicos para el control de *Plutella xylostella* en el repollo”, Tesis como requisito a la obtención de título de ing. Agrónomo, Zamorano honduras, 30 p.

Hruska, A.; Vanegas, H.; Pérez, C. 1997. La resistencia de plagas agrícolas a insecticidas en Nicaragua; causas, situación actual y manejo. Honduras. Ediciones Zas, S.A. 21 p.

Manejo integrado de plagas, Avances En El Fomento De Productos Fitosanitarios no-sintéticos, Costa Rica, No. 63, p 65, 2002 consultado el 31 enero de enero de 2012 Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/Rmip/rev63/pag95-103.pdf>

Manejo integrado de plagas, Avances En El Fomento De Productos Fitosanitarios no-sintéticos, Costa Rica, No. 63, p 65, 2002 consultado el 31 enero de enero de 2012 Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/informacion/Rmip/rev63/pag95-103.pdf>

Monroy (s.f) Biología y control de *plutella xilostella* en campo, Consultado el 23 febrero 2012, disponible en http://www.infoagro.com/hortalizas/palomilla_dorso_diamante.htm

Monzón, A.2001. Avances En el Fomento de Productos Fitosanitarios No Sintéticos: Producción, Uso Y Control de Calidad de Hongos Entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado De Plagas En Costa Rica. No. 63 P. 95-103.

Ochoa R. (1989), Algunos aspectos de la biología y comportamiento de *Plutella xilosteya* (Lepidoptera: plutellidae) y de su parasitoide *Diadegma insulare* (hymenoptera: Incneumonidae), Manejo integrado de plagas (Costa Rica) No 11 pg 21-30.

Paredes; Becerra, V France I. (2007) RAPD E ITS Detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. Consultado el 20 de febrero, disponible en <http://www.inia.cl/at/espanol/v67n2/pdf/art1.pdf>

Pastrana, J. A. 2004. Los Lepidópteros Argentinos. Sociedad Entomológica Argentina Ediciones. San Miguel de Tucumán, Argentina. 334 pp.

Samson, R. A., H. C. Evans and J.P. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Verlag, Berlin. 80p.

Shelton, A. M. 1993. Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. In: Seminar Proc. Global Manag. Insecticide Resistance in the 90's. Lake Bluff, Illinois. USA. pp: 71-75.

Talekar, N. S. 1992. Integrated management of diamondback moth: a collaborative approach in Southeast Asia. Integrated pest management in the Asia-Pacific region. pp: 37-49.

Tanada, Y. And H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press, San Diego, California, USA: 666p.

Trabanino, R. 1997. Guía para el manejo integrado de plagas invertebradas en Honduras. Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press. p 85-87

Wilding, N. 1986. The Pathogens of Diamondback Moth and their Potential for its Control- a Review-. In Diamondback Moth Management: Proceedings of the First International Workshop. Tainan, Taiwan, 11 ñ 15 March 1985. Asian Vegetable Research and Development Center. p. 219 ñ 232.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas antes de aplicación 1

FV	SC	GL	CM	FC	p-valor	F tb 0.05
Trat.	91.25	3	30.466667	5.45	0.0206	3.86 *
Rep.	172.25	3	57.416667	10.28	0.029	3.86*
Error	50.25	9	5.5833333			
Total	313.75	15				
R ² : 0.84		CV: 5	X: 47			

Tratamientos	Medias	n	Categoría	
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	43.5	4		B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (2)	46.75	4	A	B
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	50.25	4	A	
Testigo (T4)	47	4	A	B

Anexo 2. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas después de aplicación 1

FV	SC	GL	CM	FC	p-valor	F tb 0.05
Bloque	563.1875	3	187.729167	1.57	0.2634	3.86 ns
Rep.	370.6875	3	123.5625	1.03	0.4232	3.86 ns
Error	1076.0625	9	119.5625			
Total	2009.9375	15				
R ² : 0.47		CV: 24	X: 46			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	44.25	4	A
<i>Bb. Rhyssomathus sp</i> (T2)	36.5	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	52	4	A
Testigo (T4)	49.5	4	A

Anexo 3. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas antes de aplicación 2

FV	SC	GL	CM	FC	p-valor	F tb 0.05
Bloque	128.1875	3	42.7291667	3.96	0.0471	3.86 *
Rep.	41.1875	3	13.7291667	1.27	0.3411	3.86 ns
Error	97.0625	9	10.7847			
Total	266.4375	15				
R ² : 0.64		CV: 7	X: 45			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	49	4	A
<i>Bb. Rhyssomathus sp</i> (T2)	42.75	4	B
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	41.75	4	B
Testigo (T4)	45.75	4	AB

Anexo 4. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable después de aplicación 2

FV	SC	GL	CM	FC	p-val	F tb 0.05
Bloque	99.6875	3	33.2291667	2.24	0.153	3.86 ns
Rep.	41.6875	3	13.8958333	0.94	0.4625	3.86 ns
Error	133.9375	9	14.8402778			
Total	274.9375	15				
R: 0.51		CV: 8	X: 47			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	50.25	4	A
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (T2)	43.25	4	B
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	46.75	4	AB
Testigo (T4)	47.5	4	AB

Anexo 5. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas antes de la aplicación 3

FV	SC	GL	CM	FC	p-valor	F tb 0.05
Bloque	194	3	64.66	3.8	0.0518	3-86 ns
Rep.	65	3	21.16	1.27	0.3407	6.99 ns
Error	153	9	17			
Total	412	15				
R ² : 0.63		CV: 10	X: 43			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	36.5	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus sp</i> (T2)	44.5	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	45	4	A
Testigo (T4)	44	4	A

Anexo 6. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable larvas después de la aplicación 3

FV	SC	GL	CM	FC	p-valor	F tb 0.05
Bloque	141.5	3	47.16	2.45	0.1299	3.86 ns
Rep.	65	3	30.16	1.27	0.2636	
Error	90	9	19			
Total	173	15				
R ² : 63	CV: 10		X: 43			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	37.75	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus sp.</i> (T2)	44.25	4	AB
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	45.50	4	A
Testigo (T4)	43.0	4	A

Anexo 7. Análisis de varianza y pruebas de medias para la variable mortalidad día 1

FV	SC	GL	CM	FC	p-valor	F Tb 0.05
Trat	31.748	3	10.523	19.33	<0.0001	3.49*
Error	6.57	12	0.548			
Total	38.316	15				
R ² : 0.83		CV: 32	X: 2.3			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	3.45	4	A
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp(2)	3.45	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (3)	2.25	4	B
Testigo (T4)	0	4	C

Anexo 8. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad día 2

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F tb 0.05
Trat	161.769	3	53.905625	35.62	<0.0001	3.49*
Error	18.1625	12	1.5135417			
Total	179.879375	15				
R ² : 0.90		CV: 36	X: 3			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	4.58	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (T2)	8.12	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	1.13	4	C
Testigo (T4)	0	4	C

Anexo 9. Análisis de varianza y pruebas de medias para la variable mortalidad día 3

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F tb 0.05
Trat	166.69	3	55.56	64.68	<0.0001	3.49 *
Error	10.33	12	0.86			
Total	177.02	15				
R ² : 0.94		CV: 20	X: 5			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	6.45	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp.(T2)	8.47	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	3.15	4	C
Testigo (T4)	0	4	D

Anexo 10. Análisis de varianza y pruebas de medias para la variable TL₅₀ 1

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F tb 0.05
Trat	2002.5	3	667.5	34.6	<0.0001	3.49 *
Error	231.5	12	19.291667			
Total	2234	15				
R ² : 0.89		CV: 33	X: 14			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	14.25	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (T2)	30.75	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	9.0	4	B
Testigo (T4)	0	4	C

Anexo 11. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable TL₅₀ 2

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F Tb 0.05
Trat.	2935.25	4	978.45	73.15	<0.001	3.26*
Error	160.5	12	13.375			
Total	3095.75	15				
R ² : 0.95		CV: 21	X: 17			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	17.5	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (T2)	37.5	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	13.25	4	B
Testigo (T4)	0	4	C

Anexo 12. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable TL₅₀ 3

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F Tb 0.05
Trat	7384.25	3	2461.41667	162.74	<0.0001	3.49*
Error	181.5	12	15.125			
Total	7565.75	15				
R ² : 0.98		CV: 16	X: 25			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	23.75	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (T2)	58.75	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	16	4	C
Testigo (T4)	0	4	D

Anexo 13. Análisis de varianza y prueba medias para la variable esporulación día 1

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F Tb 0.05
Trat	2157.5	3	719.166667	63.32	<0.0001	3.49*
Error	136.5	12	11.375			
Total	2294	15				
R ² : 0.94		CV: 30	X: 11			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	5.75	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp. (T2)	30.5	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	7.75	4	B
Testigo (T4)	0	4	C

Análisis de varianza y prueba de medias para la variable esporulación día 2

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F Tb 0.05
Trat	2712.1875	3	904.0625	61.38	<0.0001	3.49*
Error	176.76	12	14.729167			
Total	2888.9375	15				

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	10.5	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp. (T2)	37.5	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	13.5	4	B
Testigo (T4)	0	4	C

Anexo 14. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable esporulación día 3

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F Tb 0.05
Trat	4151	3	1383.7291	30.82	<0.001	3.49*
Error	538.75	12	44895833			
Total	4689.9375	15				
R ² : 0.89		CV: 34	X: 19			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	15.5	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (T2).	44.75	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	17.5	4	B
Testigo (T4)	0	4	C

Anexo 15. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable esporulación día 4

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F Tb 0.05
Trat	8235.25	3	2745.0833	55.97	<0.001	3.49*
Error	588.5	12	49.041667			
Total	8823.75	15				
R ² : 0.93		CV: 27	X: 26			

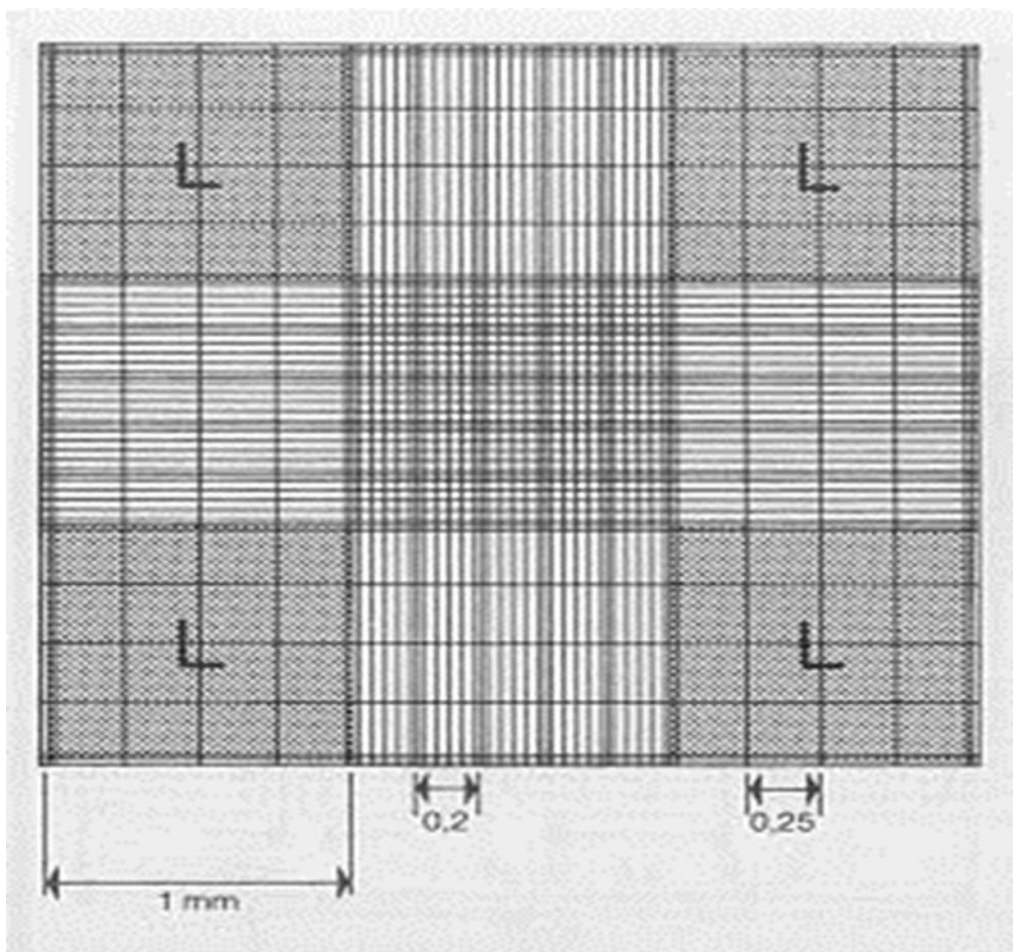
Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	19.75	4	B
<i>Bb. Rhyssomathus</i> sp (T2)	62.25	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	20.5	4	B
Testigo (T4)	0	4	C

Anexo 16..Análisis de Varianza y prueba de medias para la variable peso comercial de la cabeza

FV	SC	GL	CM	FC	P-valor	F Tb 0.05
Trat.	10667.5	3	3555.8	0.19	0.9005	3.86 ns
Rep.	105298.5	3	35099.5	1.88	0.2041	3.86 ns
Error	168400	9	18711.1			
Total	284366	15				
R2: 0.41		CV: 12	X: 12			

Tratamientos	Medias	n	Categoría
<i>Beauveria bassiana</i> H ₃ (T1)	1154	4	A
<i>Bb. Rhyssomathus sp</i> (T2)	1192	4	A
<i>Metarhizium anisopliae</i> (T3)	1222	4	A
Testigo (T4)	1169	4	A

Anexo 17. Cámara de neuber



Anexo 18. Distribución de los tratamientos en el cultivo repollo, híbrido izalco (*Brassica oleracea*)

Genealogía		Aleatorización			
		Bloque			
No.	Cepas	I	II	III	IV
T1	<i>Beauveria bassiana</i> H ₃	104	203	302	401
T2	<i>Bb. Rhyssomathus sp</i>	103	204	301	403
T3	<i>Metarhizium anisopliae</i>	102	201	303	404
T4	Testigo	101	202	304	402

Anexo 19. Registro de variables en laboratorio/Universidad Nacional de Agricultura
Catacamas, Olancho

No.	Descripción	Trat.	Rep	Variables			Observaciones
				Mortalidad en laboratorio	Tiempo letal medio	Colonización	
I							
1	Bb. H ₃	1	1				
2	<i>Bb. Rhyss</i>	3	1				
3	Ma	3	1				
4	Testigo	2	1				
II							
5	Bb. H ₃	2	2				
6	Bb. Rhyss	1	2				
7	Ma	3	2				
8	Testigo	4	2				
III							
9	<i>Bb. H₃</i>	4	3				
10	Bb. Rhyss	1	3				
11	Ma	3	3				
12	testigo	2	3				
IV							
13	Bb. H ₃	1	4				
14	<i>Bb. Rhyss</i>	2	4				
15	Ma	4	4				
16	Testigo	3	4				

Anexo 20. Registro de variables en el campo/Universidad Nacional de Agricultura

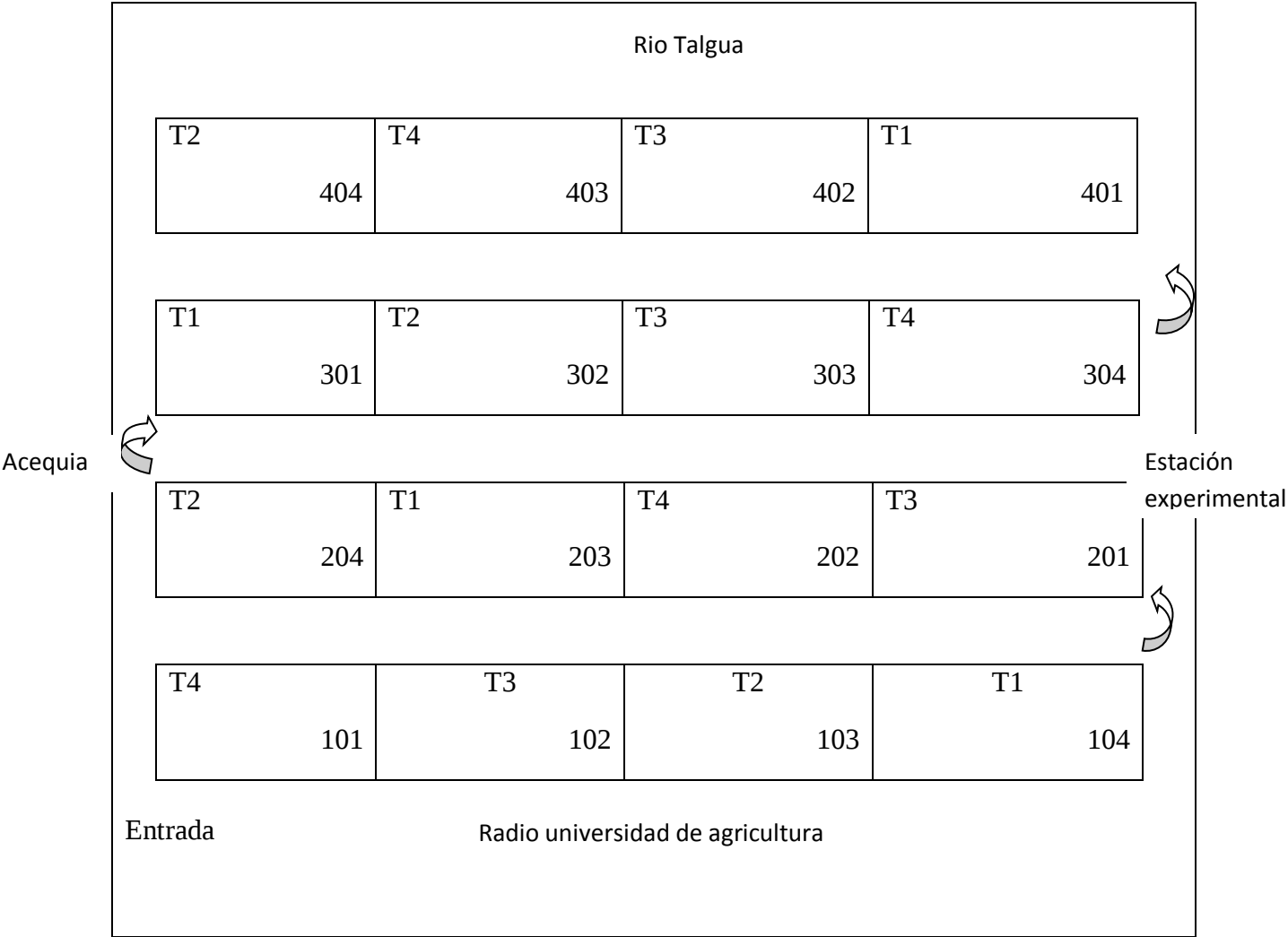
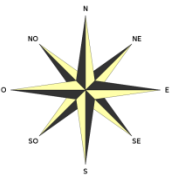
Catacamas, Olancho

No.	Descripción	Trat.	Rep	Variables			Observaciones
				Sobrevivencia de larvas	Peso comercial de la cabeza	Porc. de daño a la hoja	
I							
1	Bb. H ₃	1	1				
2	<i>Bb. Rhyss</i>	3	1				
3	Ma	3	1				
4	Testigo	2	1				
II							
5	Bb. H ₃	2	2				
6	Bb. Rhyss	1	2				
7	Ma	3	2				
8	Testigo	4	2				
III							
9	<i>Bb. H₃</i>	4	3				
10	Bb. Rhyss	1	3				
11	Ma	3	3				
12	testigo	2	3				
IV							
13	Bb. H ₃	1	4				
14	<i>Bb. Rhyss</i>	2	4				
15	Ma	4	4				
16	Testigo	3	4				

Anexo 21. Bitácora de campo/Departamento de producción vegetal

Fecha	Actividad	Trat	Rep	Hora	Estado tiempo	Resp.	Observaciones

Anexo 22. Croquis de los tratamientos en campo (DBCA)



Anexo 23. Insumos para laboratorio de entomopatógenos Universidad nacional de agricultura

Universidad nacional de agricultura					
Catacamas Olancho					
Insumos requeridos para realizar trabajo de tesis en laboratorio de entomopatógenos					
No.	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario	Total
1	PDA (papa dextrosa agar	Bote (500g)	1	749.49	749.49
2	SABOURAUD	Bote (500g)	1	720.53	720.53
3	Platos petri	Unidad	40	62.10	2600.80
4	Bolsas prolipel	Rollo	1	58	58
5	Papel manila	Rollo	1	234.54	234.54
6	Alcohol de quemar	Galón	1	162.85	162.85
7	Arroz blanco	Lbs.	25	12	300
8	Papel parafina	Rollo	1	1094.54	1,094.54
9	Jeringas	Caja	1	158.40	158.40
10	Atomizador de vilbis	Unidad	3	143	429
11	Mascara con filtro	Unidad	3	30	30
	Total				6536.78

Nota: Esta cantidades fueron discutidas con el Ingeniero Ramón Ávila de los cuales se dio prioridad ante la lista presentada de necesidades del laboratorio de entomopatógenos.

Hector Enrique Díaz Díaz, alumno de cuarto año de ing. Agronómica.

Anexo 24. Costos para realización de tesis a nivel en la sección de hortalizas Universidad nacional de agricultura

Actividad	Unidad	Cantidad	Costo/unidad	Costo total
Preparación del suelo				
Rom-plow	Há	1	800	800
Rastra	Há	2	385	770
Acamado	Ha	1	260	260
Sub-total				1,830
Producción y trasplante de plántulas				
Semilla	Semilla	1	500	500
Plántulas	Unidades	545	0.80	436
Sustrato	Bolsa	2	467	934
Mano de obra hacer hoyos	Personas/día	6	105	630
Mano de obra solución. arrancadora	Personas/día	7	105	735
Mano de obra trasplante	Personas/día	8	105	480
Sub-total				3,560
Control de malezas				
Mano de obra	Personas/día	10	110	1100
Control de plagas y enfermedades				
Carate	Litro	1	280	280
Ridomil	Litro	1	580	580
Mancozeb	Litro	1	130	130
Riego y Fertilización				713
Urea	qq	1.8	748	748
18-46-0	qq	1	555	555
0-0-60	qq	1	550	550
Sulfato de magnesio	qq	1	439	439
Nitrato de calcio	qq	3	558	558
Mano de obra	Personas	105	8	840
Bomba de motor	Horas	45	15	675
Sub-total				
Aspersión de hongos				
Aspersión	Personas/día	4	110	440
Cloro	kg	1	56	112
Hongos entomopatógenos <i>B. bassiana</i>	Litro	2	800	1600
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Litro	1	800	800
Sub-total				
Total				18, 658

Anexo 25. Cronograma de actividades en campo

ACTIVIDAD	JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTEMBRE			
SEMANA	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Siembra en invernadero y maceteras	X	X	X	X												
Instalación del ensayo (Lab. Y campo)			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Manejo agronómico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Aplicación de tratamientos a bioensayos									X	X	X	X				
Toma de datos							X	X	X	X	X	X	X			
Análisis de datos														X	X	X