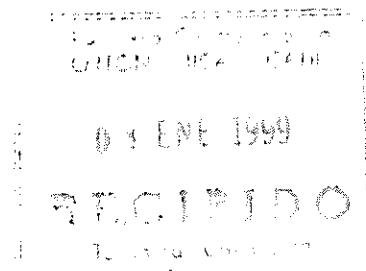


**CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA**  
**PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



**USO DE *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN COMO  
ALTERNATIVA DE MANEJO DEL PICUDO DEL CHILE  
*Anthonomus eugenii* CANO**

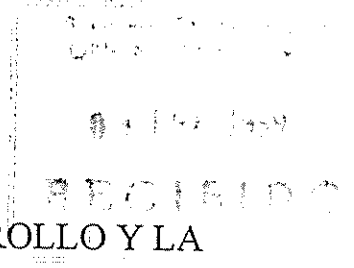
**POR**

**JOAQUIN DURAN MORA**



Turrialba, Costa Rica  
1998

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y  
ENSEÑANZA  
(CATIE)



PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA  
CONSERVACIÓN

ESCUELA DE POSTGRADO

// Uso de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin como alternativa de manejo del picudo del Chile *Anthonomus eugenii* Cano.

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Postgrado del Programa de Enseñanza para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de:

*Magister Scientiae*

por

Joaquín Durán Mora

Turrialba, Costa Rica

1998

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

**FIRMANTES:**

*Manuel Carballo N.*

Manuel Carballo, M.Sc.  
**Profesor Consejero**

*Daniel Coto Alfaro*

Daniel Coto Alfaro, M.Sc.  
**Miembro Comité Asesor**

*Elkin Bustamante Rojas*

Elkin Bustamante Rojas, Ph.D.  
**Miembro Comité Asesor**

*Eduardo Hidalgo Jamienson*

Eduardo Hidalgo Jamienson, M.Sc.  
**Miembro Comité Asesor**

*Juan A. Aguirre G.*

Juan A. Aguirre G., Ph.D.  
**Director y Decano de la Escuela de Postgrado**

*Joaquín Durán Mora*

Joaquín Durán Mora  
**Candidato**

## DEDICATORIA

En memoria de mis padres

A mi familia que han sabido convivir conmigo

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

A Fundatrópicos y la Embajada de Gran Bretaña, por el apoyo financiero brindado para la realización de mis estudios de maestría.

Al M. Sc. Manuel Carballo, por los conocimientos brindados durante los dos años de estudio en CATIE.

A los miembros del Comité Asesor, Ph. D. Elkin Bustamante, M. Sc. Eduardo Hidalgo J., M. Sc. Daniel Coto A., por las sugerencias y comentarios pertinentes para la presentación de este documento.

A mis especiales compañeros de Maestría, Marta González, Fernando Mancebo, Juanita Pérez, Mirza Castro, Juan Guillermo Cobo, Larry Lugo, Frantz Smith, por todos aquellos momentos y todas las desveladas que pasamos juntos para salir adelante en el estudio.

A mis compañeros de tiquicia, Marvin Cordero y Luis Diego Pérez.

Al personal de los Laboratorios de Diagnóstico y Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE, M. Sc. Lorena Flores, Arturo Gamboa, Cristian Zúniga, Armando Portugués, Guiselle Alvarado, así como también a M. Sc. Nelly Vásquez del Laboratorio de Biotecnología.

Al personal de la Unidad de Informática, Josefina Hernández, Ramón Alvarado, y en especial al Doctor Christoph Kleinn, Gustavo Calvo y Johnny Pérez por el soporte en los análisis estadísticos de este estudio.

A todo el personal de Postgrado, por su amabilidad y eficiencia, especialmente a Jeannette Solano, Eduardo Molina, Marta González, Arturo Vargas.

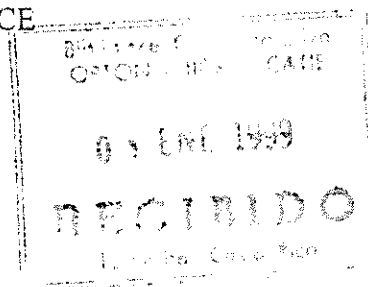
To my teacher, Paula Mellom, por las correcciones y sugerencias realizadas al resumen en inglés.

A todo el personal de la Biblioteca Conmemorativa ORTON, por la accesibilidad en las consultas de referencia, en especial a Rigoberto Aguilar, Juan Rojas, Lissette Brenes, Javier Brenes.

Al personal de la Finca Cabiria, por la ayuda y colaboración desinteresada en el establecimiento del ensayo de campo, en especial al Señor Rigoberto Bonilla, y a Chino (Lesmes Cerdas Pereira) por la ayuda en las labores de campo.

A Francisco Solano (Macho Guayabo), por la ayuda brindada en la preparación de las presentaciones del anteproyecto y del examen de grado.

# INDICE



HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v
RESUMEN	x
SUMMARY	xii
INDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE CUADROS	xv
INDICE DE ANEXOS	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Objetivos</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1 Objetivo general</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2 Objetivo específicos</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3 Hipótesis planteadas</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE <i>Anthonomus eugenii</i></b>	<b>4</b>
<b>2.2 HÁBITOS Y BIOLOGÍA DE <i>Anthonomus eugenii</i></b>	<b>4</b>
<b>2.3 HOSPEDANTES ALTERNOS DE <i>Anthonomus eugenii</i></b>	<b>5</b>
<b>2.4 ETAPAS DEL CICLO DE VIDA</b>	<b>6</b>
<b>2.5 DAÑOS E IMPORTANCIA DE <i>Anthonomus eugenii</i></b>	<b>7</b>
<b>2.6 MÉTODOS PARA EVALUAR POBLACIONES DE <i>Anthonomus eugenii</i></b>	<b>8</b>
<b>2.7 MANEJO DE LA PLAGA</b>	<b>11</b>

2.7.1 Control cultural de <i>Anthonomus eugenii</i>	11
2.7.2 Control químico de <i>Anthonomus eugenii</i>	13
2.7.3 Control microbial de <i>Anthonomus eugenii</i>	15
2.7.3.1 Uso de hongos entomopatógenos	15
<i>Beauveria bassiana</i>	15
<b>2.8 GENERALIDADES Y MODOS DE ACCIÓN DE LOS HONGOS</b>	
<b>ENTOMOPATÓGENOS</b>	17
2.8.1 Etapas de infección de los hongos entomopatógenos	17
2.8.2 Patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i>	20
2.8.3 Formulaciones	21
2.8.4 Efecto de los plaguicidas sobre <i>Beauveria bassiana</i>	23
<b>CAPÍTULO 2</b>	31
<b>EFFECTO DE <i>Beauveria bassiana</i> SOBRE LA MORTALIDAD DEL PICUDO DEL CHILE <i>Anthonomus eugenii</i></b>	31
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b>	31
2.1.1 Objetivos	34
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	34
<b>2.2.1 CAMPO</b>	34
2.2.1.1 Localización del experimento	34
2.2.1.2 Manejo del experimento	34
2.2.1.3 Tratamientos	35
2.2.1.4 Diseño experimental	36
2.2.1.5 Variables evaluadas	36
2.2.1.6 Análisis estadístico	36
<b>2.2.2 LABORATORIO</b>	37
2.2.2.1 Localización del experimento	37
2.2.2.2 Aislamiento, concentración y formulaciones de <i>Beauveria bassiana</i> a utilizar	37

2.2.2.3 Reproducción masiva de <i>Beauveria bassiana</i>	37
2.2.2.4 Mortalidad de adultos de <i>A. eugenii</i> bajo los tratamientos aplicados en el campo	38
2.2.2.5 Determinación de número de conidios por insecto muerto	38
2.2.2.6 Diseño experimental	39
2.3 RESULTADOS	39
CAMPO	39
LABORATORIO	40
2.4 DISCUSIÓN GENERAL	42
2.5 CONCLUSIONES	47
2.6 LITERATURA CITADA	48
CAPITULO 3	50
EFFECTO DE LOS PLAGUICIDAS SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE <i>Beauveria bassiana</i>	50
3.1 INTRODUCCIÓN	50
3.1.1 Objetivo general	55
3.1.2 Objetivos específicos	55
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	55
A. EFFECTO DE LOS FUNGICIDAS	55
3.2.1 Localización del experimento	55
3.2.2 Prueba de germinación de <i>B. bassiana</i>	55
3.2.3 Ensayo de susceptibilidad de <i>B. bassiana</i> a fungicidas	56
3.2.4 Efecto de los fungicidas sobre la esporulación	57



<b>B. EFECTO DE LOS INSECTICIDAS Y COADYUVANTES</b>	57
3.2.5 Localización del experimento	57
3.2.6 Prueba de germinación de <i>B. bassiana</i>	57
3.2.7 Ensayo de susceptibilidad de <i>B. bassiana</i> a insecticidas y coadyuvantes	58
3.2.8 Efecto de los insecticidas y coadyuvantes sobre la esporulación	59
<b>3.3 RESULTADOS</b>	59
<b>A. EFECTO DE LOS FUNGICIDAS</b>	59
Prueba de germinación de <i>B. bassiana</i>	59
Ensayo de susceptibilidad de <i>B. bassiana</i> a los fungicidas	60
Efecto de los fungicidas sobre la esporulación	62
<b>B. EFECTO DE LOS INSECTICIDAS Y COADYUVANTES</b>	
Prueba de germinación de <i>B. bassiana</i>	63
Ensayo de susceptibilidad de <i>B. bassiana</i> a insecticidas y coadyuvantes	65
Efecto de los insecticidas y coadyuvantes sobre la esporulación	68
<b>3.4 DISCUSIÓN</b>	70
<b>3.5 CONCLUSIONES</b>	73
<b>3.6 LITERATURA CITADA</b>	74
<b>CAPÍTULO 4</b>	77
<b>4.1 DISCUSIÓN GENERAL</b>	77
<b>4.2 CONCLUSIONES</b>	80
<b>4.3 RECOMENDACIONES</b>	81

<b>CAPÍTULO 5</b>	82
<b>LITERATURA CITADA</b>	82
<b>CAPITULO 6</b>	93
<b>ANEXOS</b>	93

DURAN, M. J. 1998. Uso de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) como alternativa de control del picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Tesis M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, *Anthonomus eugenii*, inhibición, plaguicidas, picudo del chile, hongos entomopatógenos, tasa de crecimiento, crecimiento diametral, control químico, control biológico, control integrado, formulaciones, tiempo medio letal.

## RESUMEN

La utilización de hongos entomopatógenos en el control de plagas de importancia agrícola se ha incrementado en los últimos años debido a los riesgos de contaminación y toxicidad que acarrear los plaguicidas en general, así mismo, permite reducir los daños a nivel ambiental, sin afectar la flora y fauna benéfica presente en los agroecosistemas, procurando además un mejor nivel de producción de los cultivos. Unido a esto, se han realizado estudios sobre el efecto de plaguicidas sobre la inhibición de los entomopatógenos, con resultados promisorios.

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en combinación con el control químico para el control integrado del picudo del chile *A. eugenii*; y evaluar el efecto sinérgico de los plaguicidas sobre el crecimiento de *Beauveria bassiana*.

**Efecto del control integrado sobre adultos de *Anthonomus eugenii* y el rendimiento del cultivo del chile.**

FASE CAMPO: se evaluó el efecto de las combinaciones de insecticida Regent (fipronil) con esporas del hongo *B. bassiana* y aceite agrícola en el control del picudo del chile *Anthonomus eugenii*. Se produjo una mayor cantidad de frutos en los tratamientos con aceite agrícola y con insecticidas, además se redujo la cantidad de adultos capaces de producir daño.

FASE LABORATORIO: el insecticida Regent (fipronil) solo o en combinación con *B. bassiana*, y *B. bassiana* en formulación con el aceite agrícola Agrol, muestra efectividad de control de adultos del picudo del chile. El tiempo medio letal de adultos varió de 6.48 horas para el insecticida Regent en mezcla con *Beauveria bassiana* a 50.64 horas para el hongo solo. Los tratamientos con solo insecticida produjeron la mortalidad del 100% de los adultos desde el primer día de la inoculación. Las dosis bajas de insecticidas en combinación con *B. bassiana* se presentan como una alternativa para el control del picudo del chile ya que predispone al insecto al ataque del hongo.

### **Efecto de los plaguicidas sobre la germinación y el crecimiento de *B. bassiana*.**

La prueba se desarrolló a nivel de laboratorio en la cual se demostró la inhibición y el crecimiento de *B. bassiana* por el efecto de los fungicidas, insecticidas y coadyuvantes.

Los fungicidas Benlate (benomyl), Curzate (mancozeb+cymoxanil), Acrobat (dimetomorf-mancozeb), Daconil (clorotalonil), Antracol (propineb) y Dithane (mancozeb), y los insecticidas Karate (karate), Decis (deltametrina) y Cymbush (cipermetrina), afectan de manera significativa la germinación y el crecimiento de *B. bassiana*. Por otro lado, los fungicidas Aliette (fosetyl-Al), Previcur (propamocarb) y Kocide (oxicloruro de cobre), los insecticidas Ambush (permetrina), Confidor (imidacloprid), Sevin (carbaryl), Vydate (oxamil), Regent (fipronil), Malation (malation), Tamaron (metamidofos) y Thiodan (endosulfan), así como los coadyuvantes Nufilm (pinolene), NP-7 (alquil aril polimer), Agrol (aceite parafinico), Citowett (alquil-aril poliglicol) y WK (nonoxinol) no afectaron en forma significativa el crecimiento y la germinación del hongo entomopatógeno.

Los resultados obtenidos permiten tomar decisiones de aplicación en el campo según la compatibilidad de los agroquímicos sobre los entomopatógenos, facilitan la integración de diferentes métodos de control para disminuir el impacto del excesivo uso de plaguicidas en el ambiente.

DURAN, M. J. 1998. Use of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) as an alternative in the control of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Thesis M. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Keys words: *Beauveria bassiana*, *Anthonomus eugenii*, inhibition, pesticides, pepper weevil, entomopathogens fungi, growth rate, diameter growth, chemical control, biological control, integrated control, formulations, mean lethal time.

## SUMMARY

The use to entomopathogenic fungi in the control of agriculturally significant pests has increased in recent years due to the risk of pollution and toxicity resulting from excessive pesticide use. Using entomopathogenic fungi reduces environmental damage and does affect the flora and beneficial fauna in the agroecosystems. Besides, there have been studies done on the effect of pesticides on the inhibition of the entomopathogens, with promising results.

The aim of the study was evaluated the efficiency of the entomopathogen fungi *Beauveria bassiana* in combination with the chemical pesticides for the integrated control of the pepper weevil *A. eugenii*; and to evaluate the effect of pesticides on the germination and growth rate of *B. bassiana*.

### **Effect of integrated control on *Anthonomus eugenii* adults and pepper yields.**

FIELD PHASE: the effect of the combinations of insecticide Regent (fipronil) with spores of the fungi *B. bassiana* and agricultural oil, in the control of the pepper weevil *Anthonomus eugenii*, was evaluated. More fruit was produced in the treatments with agricultural oil and with insecticides. Furthermore, was the number of adults insects capable adults of producing damage was reduced.

LABORATORY PHASE: the insecticide Regent (fipronil) alone or in combination with *B. bassiana*, and *B. bassiana* in formulation with agricultural oil Agrol, were efficient

in controlling pepper weevil adults. The mean lethal time varied of 6.48 hours, for the insecticide Regent mixed with *Beauveria bassiana*, to 50.64 hours, for fungus alone. The treatments with the insecticide alone produced 100% mortality on the same day of application, while the fungus alone produced 97.5% seven days after the inoculation. Low dosages of certain insecticides with *B. bassiana* are presented as an alternative to increase the effectiveness of entomopathogenic fungi used for the control of the pepper weevil, since they cause the insects to become susceptible to fungal infections.

### **Effect of pesticides on germination and growth of *B. bassiana*.**

The trial was developed under laboratory conditions. The results demonstrated that the fungicides, insecticides and adjuvants have an inhibition and the growth of *B. bassiana*.

The fungicides Benlate (benomyl), Curzate (mancozeb+cymoxanil), Acrobat (dimethomorph-mancozeb), Daconil (chlorothalonil), Antracol (propineb) and Dithane (mancozeb), and the insecticides Karate (lambda-cyhalothrin), Decis (deltamethrin) and Cymbush (cypermethrin), significantly affect the germination and the growth of *B. bassiana*. On the other hand, the fungicides Aliette (fosetyl-Al), Previcur (propamocarb) and Kocide (copper oxychloride), and the insecticides Ambush (permethrin), Confidor (imidacloprid), Sevin (carbaryl), Vydate (oxamyl), Regent (fipronil), Malathion (malathion), Tamaron (methamidophos) and Thiodan (endosulfan), as well as the adjuvants Nufilm (pinolene), NP-7 (alquil aril polimer), Agrol (paraffinic oil), Citowett (alquil-aril poliglicol) and WK (nonoxinol) did not affect the growth and the germination of the fungus in a significant way.

The results obtained allowed decisions to be made on the field of pesticides compatible with this entomopathogen, hence making it possible to integrate both control methods and reduce the environment impact of the excessive use of pesticides.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje acumulado de mortalidad de adultos de <i>Anthonomus eugenii</i> , bajo los tratamientos aplicados. CATIE, Turrialba, 1998.	41
Figura 2. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>Beauveria bassiana</i> sobre los fungicidas en concentración de 100 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	107
Figura 3. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los fungicidas en concentración de 500 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	107
Figura 4. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los fungicidas en concentración de 1000 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	108
Figura 5. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los coadyuvantes en concentración de 100 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	108
Figura 6. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los coadyuvantes en concentración de 500 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	109
Figura 7. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los coadyuvantes en concentración de 1000 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	109
Figura 8. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los insecticidas en concentración de 100 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	110
Figura 9. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los insecticidas en concentración de 500 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	110
Figura 10. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> sobre los insecticidas en concentración de 1000 ppm. CATIE, Turrialba, 1998.	111

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el experimento de campo. CATIE, Turrialba, 1998.	35
Cuadro 2. Cantidad de frutos por clase comerciales, por unidad experimental, según los tratamientos. CATIE, Turrialba, 1998.	40
Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad, tiempo letal medio (días) y número de conidios por cadáveres de adultos de <i>Anthonomus eugenii</i> transcurridos siete días bajo distintos tratamientos. CATIE, Turrialba, 1998.	42
Cuadro 4. Porcentajes de germinación de esporas de <i>Beauveria bassiana</i> , bajo nueve fungicidas a tres diferentes concentraciones y un testigo (promedio de tres repeticiones). CATIE, Turrialba, 1998.	60
Cuadro 5. Promedio del crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> en presencia de nueve fungicidas y un testigo. CATIE, Turrialba, 1998.	61
Cuadro 6. Efecto de nueve fungicidas y un testigo sobre la tasa de crecimiento diario de <i>B. bassiana</i> en medio de cultivo. CATIE, Turrialba, 1998.	62
Cuadro 7. Número de esporas de <i>B. bassiana</i> presentes en los tratamientos de fungicidas. CATIE, Turrialba, 1998.	65
Cuadro 8. Porcentajes de germinación de esporas de <i>B. bassiana</i> , bajo once insecticidas a tres diferentes concentraciones y un testigo (promedio de tres repeticiones). CATIE, Turrialba, 1998.	64
Cuadro 9. Porcentajes de germinación de esporas de <i>B. bassiana</i> , bajo cinco coadyuvantes a tres concentraciones y un testigo (promedio de tres repeticiones). CATIE, Turrialba, 1998.	65
Cuadro 10. Efecto de diferentes insecticidas y coadyuvantes a tres concentraciones y un testigo sobre el crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> en medio de cultivo. CATIE, Turrialba, 1998.	66
Cuadro 11. Efecto de los insecticidas, coadyuvantes y un testigo sobre la tasa de crecimiento diario de <i>B. bassiana</i> en medio de cultivo. CATIE, Turrialba, 1998.	67
Cuadro 12. Número de esporas de <i>B. bassiana</i> presentes los tratamientos de insecticidas y coadyuvantes. CATIE, Turrialba, 1998.	69



## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos aplicados en el campo sobre la calidad de frutos de chile. CATIE, Turrialba, 1998.	94
Anexo 2. Porcentaje de mortalidad diaria de adultos de <i>Anthonomus eugenii</i> bajo distintos tratamientos. CATIE, Turrialba, 1998.	94
Anexo 3. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos respecto a las mortalidades de adultos del picudo del chile. CATIE, Turrialba, 1998.	95
Anexo 4. Agroquímicos y concentraciones evaluadas en los estudios de susceptibilidad y germinación de <i>Beauveria bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	96
Anexo 5. Nombres genéricos, nombres comerciales y familias químicas de los agroquímicos utilizados en los estudios de susceptibilidad y germinación de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	97
Anexo 6. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de fungicidas con respecto a la germinación conidial de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	98
Anexo 7. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de fungicidas con respecto al crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	98
Anexo 8. Análisis de varianza para el efecto de los fungicidas sobre la tasa de crecimiento diario de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	99
Anexo 9. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de insecticidas y coadyuvantes con respecto a la germinación de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	100
Anexo 10. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de insecticidas con respecto al crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	100
Anexo 11. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de coadyuvantes con respecto al crecimiento diametral de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	101
Anexo 12. Análisis de varianza para el efecto de los insecticidas sobre la tasa de crecimiento diario de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	102

Anexo 13. Análisis de varianza para el efecto de los coadyuvantes sobre la tasa de crecimiento diario de <i>B. bassiana</i> . CATIE, Turrialba, 1998.	103
Anexo 14. Ecuaciones de regresión del crecimiento diametral (Y) de <i>B. bassiana</i> sobre los fungicidas según las concentraciones (X). CATIE, Turrialba, 1998.	104
Anexo 15. Ecuaciones de regresión del crecimiento diametral (Y) de <i>B. bassiana</i> sobre los insecticidas según las concentraciones (X). CATIE, Turrialba, 1998.	105
Anexo 16. Ecuaciones de regresión del crecimiento diametral (Y) de <i>B. bassiana</i> sobre los coadyuvantes según las concentraciones (X). CATIE, Turrialba, 1998.	106

## CAPITULO 1

### 1. INTRODUCCION GENERAL

El chile es un cultivo hortícola de alto consumo en América Central, presenta una gran variabilidad genética relacionada principalmente con el chile dulce *Capsicum annuum* y el chile picante *Capsicum frutescens*. Este cultivo es atacado por varias plagas en sus distintas fases de desarrollo, siendo las de mayor importancia aquellas que causan daño directamente en los frutos, destacándose entre ellos el picudo del chile. Esta plaga es también conocida como gorgojo del chile, gorgojo del pimiento, antonómo del pimiento y barrenillo del pimiento. Pertenece a la especie *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), siendo los hospederos principales el chile dulce y el chile picante, del género *Capsicum* sp.

El picudo del chile *A. eugenii* es una plaga nativa del área Mesoamericana y se encuentra distribuido en Norte América, Centro América, y el Caribe, siendo de reciente introducción en Costa Rica, donde se ha convertido en la plaga de mayor importancia tanto del chile dulce como del picante en las principales áreas productoras del país. Los principales daños ocurren en las épocas de floración y fructificación, donde los adultos dañan el fruto en desarrollo y causan la caída de yemas florales, flores y frutos pequeños. Este insecto llega a causar grandes pérdidas en las zonas sembradas de chile ya que en muchas ocasiones la plaga se hace incontrolable, llegando a ocasionar pérdidas totales en el cultivo.

El control tradicional del picudo del chile se basa en la utilización de productos químicos, los cuales son poco eficaces debido a que varios instares de desarrollo del insecto se localizan dentro de las estructuras florales y frutos en desarrollo. Al no tener mucho éxito este control tradicional, se plantea la posibilidad de realizar un control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos. Estos podrían aplicarse para el control de los adultos cuando permanezcan sobre las hojas o en tejidos tiernos. Los trabajos preliminares realizados a nivel de laboratorio demuestran que estos hongos tienen

un alto potencial para el control microbial de esta plaga (Carballo 1996; Gómez y Jiménez 1995).

El interés por el control biológico se ha incrementado en los últimos años debido a los riesgos de contaminación y toxicidad que acarrearán los plaguicidas en general, así mismo, permite reducir los daños a nivel ambiental, sin afectar la flora y fauna benéfica presente en los agroecosistemas, procurando además un mejor nivel de producción de los cultivos.

El uso de controladores biológicos contra el picudo del chile se viene documentando desde principios de siglo con el uso de parasitoides y depredadores (Pratt 1907; Elmore *et al* 1934), mientras que con el uso de hongos entomopatógenos las experiencias se han orientado a insectos de la familia Scarabaeidae remontándose al año de 1878 con el uso de *Metarhizium anisopliae* (Zimmermann 1992).

Sin embargo, el control microbiano del picudo del chile podría verse afectado por el efecto adverso que tienen los plaguicidas aplicados en el cultivo sobre los hongos entomopatógenos. Este efecto adverso de los productos químicos sobre los agentes microbiológicos se viene documentando desde hace treinta años, cuando se observó en condiciones *in vitro* la inhibición del patógeno *Cephalosporium aphidicola* utilizado en el control microbial del áfido del melón y el algodón *Aphis gossypii*, por los fungicidas benomyl y triarimol (Wilding 1972).

Ramarajahe *et al* (1967), Clark *et al* (1982) y Calderón *et al* (1991), señalan que desde hace más de cuatro décadas se conoce la inhibición de los plaguicidas sobre la fisiología de *Beauveria bassiana*, principalmente debido a los fungicidas benomyl, propiconazol y zineb. Los herbicidas como el oxyfluorfen, paraquat y alachlor (Gardner y Storey, 1985), y los reguladores de crecimiento Flurprimidol, Silaid y el coadyuvante en aspersión Triton CS-7, han demostrado la inhibición en el crecimiento micelial de *Beauveria bassiana* (Storey y Gardner 1986).

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo General

Determinar la eficacia del hongo entomopatógeno *B. bassiana* para el control microbiano del picudo del chile *A. eugenii*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

a) Evaluar el efecto de mezclas de dos formulaciones de *B. bassiana* con diferentes dosis de insecticida en comparación con el control químico del agricultor, sobre el control del picudo en una plantación de chile establecida.

b) Evaluar el efecto sinérgico de las dosificaciones de insecticida, sobre la efectividad de *B. bassiana* para el control del picudo del chile.

c) Determinar el efecto de fungicidas, insecticidas y coadyuvantes utilizados en el cultivo del chile sobre el crecimiento del hongo entomopatógeno *B. bassiana*.

### 1.2.3 Hipótesis Planteadas

H<sub>0</sub> : Preparados biológicos a base de *B. bassiana* ejercen un control efectivo del picudo del chile, *A. eugenii*.

H<sub>0</sub> : Dosificaciones a base de insecticidas en mezcla con *B. bassiana* tienen un efecto sinérgico en el control del picudo.

H<sub>0</sub> : Los agroquímicos no tienen efecto sobre la germinación y el crecimiento de *B. bassiana*.

H<sub>1</sub> : Preparados biológicos no tienen igual eficacia en el control del picudo del chile.

H<sub>1</sub> : No existen diferencias en las formulaciones del hongo y mezclas con dosificaciones de insecticidas sobre el control del picudo del chile.

H<sub>1</sub> : Los agroquímicos tienen un efecto sobre la germinación y el crecimiento de *B. bassiana*.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE *Anthonomus eugenii*

El picudo del chile es una especie nativa de Mesoamérica, de aparente origen mexicano, el cual fue descrito originalmente por Cano y Alcacia a fines del siglo pasado con especímenes recolectados de México; sin embargo, ya existían registros de su ocurrencia 40 años más atrás (Cano y Alcacia (1894) citado por Hernández y Reyes (1989); Velasco (1969); Gordón y Armstrong 1990).

Su distribución geográfica abarca el sureste de Estados Unidos, México, América Central, Hawaii y varias islas del Caribe (Riley y Sparks 1992). Se presenta principalmente, aunque no exclusivamente en zonas secas (CATIE 1993).

### 2.2 HÁBITOS Y BIOLOGÍA DE *Anthonomus eugenii*

Estudios realizados por Riley (1990) y Riley *et al* (1992), citados por Riley y King (1994), mostraron que los adultos del picudo del chile se concentran en los brotes de los frutos y las hojas, pero son más comunes en el tercer ápice de la planta desde la parte superior de la planta hacia abajo.

La duración del ciclo de vida del picudo del chile, que comprende desde la oviposición hasta la emergencia del adulto puede variar de una zona geográfica a otra. Ortiz y Cajas (1983) citados por Morales (1989), consideran que en la zona de Zacapa en Guatemala el ciclo de vida dura aproximadamente 37 días. Riley y Sparks (1992) reportan que la variación generacional puede ser en promedio de 21 días, el cual se puede reducir en clima cálido hasta los 13 días. King y Saunders (1984) y CATIE (1993) indican que el ciclo dura aproximadamente entre 15 y 20 días, y 12 y 31 días respectivamente. Con esta fluctuación es factible que se presenten entre 5 y 8 generaciones por año.

El ciclo biológico del insecto se ve afectado por las condiciones climáticas, principalmente por la precipitación y la temperatura. Goff y Wilson (1937), citados por Andrews *et al* (1986), y Patrock y Schuster (1992) observaron que las poblaciones de picudos son reducidas por el efecto de la lluvia. Por otro lado Riley y Sparks (1992) consideran que en clima cálido el tiempo generacional puede ser de 2 semanas y en clima frío hasta de 6 semanas.

### 2.3 HOSPEDANTES ALTERNOS DE *Anthonomus eugenii*

Este picudo es considerado como un especialista (Prokopy y Owens 1983, citados por Morales 1989), definido como un insecto capaz de completar su ciclo vital en otras plantas de una misma familia taxonómica, en este caso solamente en plantas de la familia Solanaceae.

Esta plaga ha sido encontrada en otros hospedantes del género *Capsicum*, ovipositando en flores de berenjena (*Solanum melongena* L.), hierba mora (*Solanum americanum* Mill.) (Patrock y Schuster 1992; Riley y King 1994; Gordón y Armstrong 1992). En Estados Unidos se considera al tomatillo *Solanum nigrum* como un hospedante alternativo en la cual el picudo se alimenta y se reproduce durante el invierno, manteniendo pequeñas poblaciones de picudos durante los periodos de barbecho (Stanley 1998), sin embargo en Centroamérica no está bien documentado este papel de las especies del género *Solanum* en la biología de la plaga (Patrock y Schuster 1987; CATIE 1993).

## 2.4 ETAPAS DEL CICLO DE VIDA

La descripción de cada una de las etapas del ciclo biológico del picudo del Chile fue inicialmente hecha por Elmore y colaboradores (1934), en California, y compilado por King y Saunders (1984), Burke y Woodruff (1980), CATIE (1993), Morales (1989) y Gordón y Armstrong (1990). Las etapas que comprenden este ciclo se describen a continuación :

**Huevo:** Mide aproximadamente 0.53 mm de largo por 0.39 mm de diámetro, de color blanco perlado en el momento de la oviposición cambiando a color amarillento antes de la eclosión; usualmente de forma oblongo-ovalados, con el exterior (corión) liso, brillante, flexible y fuerte. La eclosión del huevo tarda de 2 a 5 días.

**Larva:** La larva madura mide cerca de 6 mm de largo, es ápoda (sin extremidades), de forma cilíndrica y curvada y de color blanco-grisáceo; la cabeza de color pardo amarillenta con margenes pardo y mandíbulas pardo oscuro, cuando maduran presentan tonalidades que van del color rosado al púrpura. Protórax ligeramente más pequeño que el mesotórax y metatórax, siendo estos últimos anchos como los primeros segmentos abdominales. La larva del tercer instar empupa dentro del fruto, en una celda excavada con anterioridad, en el primer instar larval. La larva pasa por un período de prepupa que dura de 1 a 8 días. El periodo larval varía de 6 a 12 días.

**Pupa:** Mide de 3.5 a 4 mm de longitud por 2 mm de ancho, de color transparente al inicio, con las regiones que corresponden a los ojos, el rostro y los élitros oscuras; a medida que madura se torna blanca cremosa. El periodo pupal dura de 3 a 6 días.

**Adulto:** De forma ovalada, con dimensiones entre 2 y 4 mm. El cuerpo está cubierto por escamas similares a pelos, de color gris a marrón negruzco, siendo más densas en el abdomen, lo que les confiere una apariencia blancuzca. Las dos terceras partes del cuerpo son de color anaranjado-amarillento, pero con el tiempo el adulto pierde muchas escamas y se oscurece adquiriendo un color negro-plateado. Después de la emergencia del fruto, el



adulto inicia su alimentación a base de flores, yemas florales y frutos; en la ausencia de estos se alimenta de hojas tiernas. La cópula ocurre dos días después de la emergencia, y el inicio de la oviposición se da unos 2 o 3 días después de la cópula. La vida media del adulto es de 79 días, la cual puede ser reducida de 1 a 3 semanas sin alimento disponible y extenderse a un promedio de 3 meses con la presencia del mismo.

En pruebas de campo y laboratorio, Mancía y Zabanech (1988), señalan que el período de preoviposición transcurre en 11.3 días en el campo, mientras que el periodo de oviposición oscila de 31-37 días en el campo y de 42-105 días para las generaciones desarrolladas en laboratorio. La mayor cantidad de huevos producidos por una hembra fue de 445, con una duración de la etapa de huevo de 2.6 días, de 5.5 días para larva, prepupa 2.1 días y la longevidad del adulto entre 3 y 129 días. Sorensen (1993), considera que cada hembra deposita 200 huevos en un periodo de 30 días.

## 2.5 DAÑOS E IMPORTANCIA DE *Anthonomus eugeni*

El daño inicial ocurre cuando las hembras perforan un pequeño hueco en el fruto en desarrollo con la parte final de la proboscis, en la cual colocan huevos individuales y éstos son tapados con materia fecal (Stansly 1998). Los principales daños son visibles cuando las plantas entran en producción, debido a que causa la caída de flores y frutos jóvenes (inmaduros), provocando la maduración prematura y la producción de frutos deformes (CATIE 1993; Llanes 1980). El daño más severo ocurre por la destrucción de yemas florales y frutos inmaduros debido a las larvas (Coudriet y Kishaba 1988). Este daño es causado por efecto de la alimentación de las larvas dentro del fruto en desarrollo, produciéndose manchas necróticas en el área circundada por las semillas. Para salir del fruto, el adulto realiza pequeñas perforaciones, que pueden ser la puerta de entrada para patógenos oportunistas, tales como *Alternaria* sp., en la cual las perforaciones son infestadas por los adultos al emerger de estos (Bruton *et al* 1989).

Bajo condiciones de ataque, el rendimiento total abarca tres componentes: frutos sanos, perforados y abortados. Las pérdidas del rendimiento comprenden la suma de los

frutos abortados y perforados; siendo los frutos abortados la causa principal de pérdidas del rendimiento (Segarra y Pantoja 1988b).

## 2.6 MÉTODOS PARA EVALUAR POBLACIONES DE *Anthonomus eugenii*

Por los movimientos de los picudos en el campo, estos pueden trasladarse a largas distancias, facilitando su reinfestación en hospederos secundarios. La información referente a los movimientos de los adultos del picudo es escasa, pero mediante observaciones de campo se sugiere que la dispersión de los adultos se realiza lentamente a través del campo, en las primeras etapas de desarrollo del cultivo, pudiéndose observar grupos localizados de adultos del picudo, por lo general en los márgenes de las parcelas. Plantaciones de chile sembradas cerca de *Solanum nigrum* (hierba mora, chile perro) o de *Solanum melongena* (berenjena), establecidas con anterioridad son de fácil ataque por parte de los adultos. El patrón de dispersión de los picudos está establecido en los márgenes del campo, y para ello el monitoreo a lo largo de los bordes tiene una mejor idea de la infestación reduciendo así el tiempo de muestreo.

Es importante localizar estas áreas de mayor incidencia para determinar si son necesarios controles extras con productos químicos y descubrir los posibles hábitos del picudo. Riley y Sparks (1992), consideran varios métodos de detección de la actividad de los adultos del picudo, entre ellos se citan:

- Inspecciones de brotes terminales o grupos de brotes para determinar la presencia de adultos del picudo.
- El uso de trampas adherentes de color amarillo para los adultos.
- Realizar conteos directos de picudos usando como unidad de inspección toda la planta.
- Exploración de daños por efecto de la alimentación o por posturas en grupos de brotes terminales.
- Utilización de trampas para picudo del algodón con cebos de adultos del picudo del chile o con extractos de feromonas.

El comportamiento más usual en *A. eugenii* corresponde a que los individuos se distribuyan en manchas o conglomerados. Segarra y Pantoja (1988b) realizaron mediante análisis de probabilidades, la comparación de las distribuciones Binomial y de Poisson, para lo cual afirman que el comportamiento agregado (Distribución Binomial Negativa) predice con mayor certeza la distribución de los adultos del picudo en el campo. Las razones del alto grado de agregación no es bien entendido, pero la presencia de feromonas de agregación pueden sugerir una posible causa, como está documentado para su congénere *Anthonomus grandis grandis* Boheman. Por otro lado, Patrock *et al* (1992) en pruebas de laboratorio, confirman la producción de feromonas de agregación por parte de adultos de *A. eugenii*.

Eller y colaboradores (1994), mediante análisis de sustancias volátiles y cromatografía de gases, revelan la presencia de seis componentes espectrales a partir de machos de *Anthonomus eugenii*, entre ellos se encuentran el ácido geránico y el aldehído geraniol. Los autores reportan que una de las debilidades de las trampas atrayentes consiste en que las formulaciones comerciales no liberan el ácido geránico, componente principal para la actividad completa de los adultos.

La presencia de frutos caídos de tamaño medio no puede utilizarse como indicador de la actividad del picudo, debido a que en esta etapa ya es demasiado tarde para prevenir pérdidas significativas en el rendimiento, sin embargo deben ser utilizados para los conteos de estimación poblacional (Andrews *et al* 1986).

Según Riley y Sparks (1992), por cada día que un adulto maduro no sea controlado, se producen seis nuevos picudos. Así, si un fruto toma tres días para abortar y el problema es detectado dos días después, cada hembra adulta es capaz de ovipositar treinta huevos adicionales antes de la detección de los frutos caídos. Los estados maduros e inmaduros del picudo presentes en los frutos caídos no pueden ser controlados con insecticidas, únicamente aquellos adultos que están en contacto con el químico.

La carencia de monitoreos frecuentes y precisos de las poblaciones de picudo son las mayores limitantes para implementar la acción de decidir el tipo de control a seguir. En sitios donde los picudos son conocidos como problema, el campo debe ser aspejado periódicamente antes de la floración (Riley y Sparks 1992). Esta es una táctica recomendada si realmente los métodos de muestreo no son utilizados, pero puede ser contraproducente para el ambiente, por la adquisición de resistencia por parte de la plaga principal y con otras plagas de carácter secundario.

Los muestreos bisemanales de brotes dañados pueden detectar poblaciones con tiempo suficiente para seguir un manejo antes que el daño del fruto ocurra (Cartwright *et al* 1990).

Existe una metodología complementada con un programa de muestreo que permite restringir el uso de insecticidas cuando sea estrictamente necesario. Para ello se deben considerar ciertos aspectos metodológicos: utilizar los brotes terminales que consisten en los extremos de las ramas donde se encuentran las hojas recién emergidas, los botones florales, flores o frutos recién cuajados. En días soleados los picudos se esconden debajo del follaje o llegan al suelo, lo mismo ocurre al tocar o mover la planta durante el recuento, por lo tanto es necesario evitar que esto suceda (CATIE 1993; Coto 1996).

La inspección de brotes terminales tiene la ventaja de la concentración natural de adultos del picudo en grupos de yemas ubicadas en la parte superior de la planta. El número de adultos observados en la mañana en yemas expuestas provee un estimado alto de la densidad poblacional que un muestreo realizado en la tarde, pero este último no tiene un efecto significativo en el umbral de acción basado en el muestreo de adultos (Riley *et al* 1992).

El procedimiento de muestreo descrito por CATIE (1993) y Coto (1996) para determinar el manejo de *A. eugenii* en Chile se describe a continuación:

- a) Se seleccionan cinco sitios de interés en la plantación (conformados por 20 plantas en cada sitio), se selecciona al azar un brote terminal por planta y se revisa con el fin de detectar la presencia de picudos, los brotes han de ser visibles sin necesidad de tocar la planta.
- b) Durante las dos primeras semanas de floración, deben de localizarse cuatro sitios de muestreo en los bordes de la plantación y uno en el interior. Transcurrido este tiempo, los sitios deben estar distribuidos en áreas representativas de la plantación.
- c) Al finalizar el muestreo, se deben haber revisado 100 plantas, si se encontró un picudo esto implica que se alcanzó el umbral de acción permitido para esta plaga, por lo tanto debe realizarse una aplicación de insecticida con el fin de reducir la densidad poblacional. No es conveniente el uso de insecticidas sistémicos por su efecto residual en los frutos; se pueden utilizar carbaryl (Sevin), deltametrina (Decis), ciflutrin (Solfac) y fipronil (Regent).

Riley y Sparks (1992), estudiaron la relación de daño y el nivel de infestación de picudos en el campo; sugieren que los niveles del 5% de daño en brotes terminales, o un picudo adulto por cada 200 plantas (inspeccionando dos brotes terminales por planta), justifica la aplicación de insecticidas (con un alto grado de significancia) para prevenir pérdidas económicas de consideración. Con la inspección de los brotes terminales, se pueden monitorear cerca de 800 plantas en media hora de exploración.

## 2.7 MANEJO DE LA PLAGA

### 2.7.1 Control cultural de *Anthonomus eugenii*

Las medidas culturales para el combate del picudo del chile consisten principalmente en aspectos básicos de zonificación, monitoreos semanales, recolección y eliminación de rastrojos (follaje y frutos caídos con posible incidencia interna de estados inmaduros del picudo), la utilización de plantas hospedantes tales como hierba mora (*Solanum nigrum*) y, chiles del tipo dulce, picante y silvestre (*Capsicum* spp.) sembradas con anterioridad al cultivo y que funcionan como atrayentes (Coto 1996; Riley y Sparks

1992). La evitación es una medida que puede disminuir o retrasar la infestación permitiendo romper el ciclo vital del picudo, y consiste en sembrar otros cultivos en zonas con registros anteriores de infestaciones de picudo.

En el control de plagas se han utilizado plantas que poseen cierto efecto repelente, o de tipo bioinsecticida, tal es el caso de *Tripterygium wilfordii*. Esta es comercializada en los mercados de China para proteger sus cultivos contra plagas insectiles. Las raíces producen alcaloides conocidos como 'wilforgine' y 'wilfordine', que funcionan como toxinas para ciertos insectos chupadores. Pruebas realizadas demostraron que *T. wilfordii* fue efectiva contra los coleópteros *Gastrophysa cyanea* (Melsh) y *A. eugenii* Cano, además muestra toxicidad a larvas de varias especies de importancia agrícola por ejemplo, *Heliothis armigera* y *Estigmene acrea* (Beroza y Bottger 1954).

El uso de los extractos de hojas de altamisa (Compositae: *Ambrosia cumanensis*), semillas de paraíso (Meliaceae: *Melia azedarach*), hojas de ruda (Rutaceae: *Ruta graveolens*) y chile picante (Solanaceae: *Capsicum frutescens*), brindan una alternativa para el control cultural del picudo. En El Salvador, el Centro de Formación Integral y Capacitación en Agricultura Sostenible (CEFICAS), informan que el uso de estas especies dieron buenos resultados para el control del picudo (Palma y Serrano 1997). Además estos autores utilizando extractos de chile, semillas de paraíso y de madrecaao (madero negro, *Gliricidia sepium*) ejercen un efecto fagorepelente sobre los adultos del picudo; además que la aplicación de extractos con semillas de madrecaao y semilla de higuierillo (Euphorbiaceae: *Ricinus comunnis*) registran muertes de un 50 % o más de adultos del picudo (Palma y Serrano 1997).

Seal y Schuster (1995), en un estudio de campo probaron dos dosis de criolite (Kryocide 96%), una dosis de avermectina (MK-244, 0.16EC), dos dosis de metomil (Lannate), dos dosis de azadiractina (WRC7301 4.5%) y azadiractina (WRC7303 0.25%) en mezcla con *B. thuringiensis* var *aizawai* (Xentari WP) (Bta). Los resultados muestran que la azadiractina en mezcla con Bta produjo reducciones significativas de daños del picudo en comparación con el testigo, mientras que criolite y metomil

presentaron menos daños por el picudo. Estos estudios preliminares demuestran la eficacia de la azadiractina la cual en combinación con el coadyuvante humectante (Cell-U-Wett™), pero deben realizarse más investigaciones sobre este producto natural (Schuster *et al* 1996b).

### 2.7.2 Control químico de *Anthonomus eugenii*

Para establecer un control económico del picudo, es conveniente establecer un programa de aplicaciones basado en muestreos de adultos en el campo y la frecuencia de las aplicaciones. Estos monitoreos deben realizarse en varios puntos dentro y fuera de la plantación de chile, con el fin de obtener la mayor información sobre la actividad del picudo.

Rolston (1977), citado por Schuster y Everett (1982), en pruebas de laboratorio, demostró que la permanencia de 4-5 días de los residuos de los insecticidas endosulfan (Thiodan) y chlordimeform (Fundal) no inducen a más del 15% de mortalidad de adultos, y los residuos de metomyl (Lannate) y toxaphene (Orthene) inducen no más del 65% de mortalidad de adultos del picudo del chile; y a su vez, los residuos de carbofuran (Furadan), carbaryl (Sevin) y permetrina (Pounce), provocan la mortalidad sobre el 90% de adultos del picudo. Por otro lado, Ozaki y Genung (1982), reportan que metomyl, endosulfan, leptophos (Phosvel) y chlormideform reducen el número de picudos en follaje de plantas tratadas.

Por otra parte, Schuster y Everett (1982), en pruebas de campo sobre el control químico de las plagas *A. eugenii* y *Spodoptera frugiperda*, observaron que los insecticidas carbaryl (Sevin), chlordimeform, leptophos, metomyl, toxaphene y endosulfan, son efectivos para reducir el número de adultos del picudo presentes en follaje de plantas tratadas, considerando el endosulfan y el carbaryl como los más efectivos a nivel de laboratorio.

En estudios recientes, se recomiendan el uso de insecticidas tales como permethrin (Ambush), oxamyl (Vydate), esfenvalerato (Asana), cryolite (Kryocide) (Riley y Sparks 1992). El uso de estos productos con moderación no causa residuos excesivos en los frutos cosechados. Stansly (1998) considera que el adulto al ser susceptible solo a insecticidas, y que el relativo bajo costo y disponibilidad de éstos en el mercado, conlleva a aplicaciones regulares como una alternativa para reducir las pérdidas en producción por bajas en cantidad y calidad de los frutos.

En estudios más recientes, Seal y Schuster (1995), evaluaron los insecticidas esfenvalerato (Asana XL 0.66EC), lambda-cyhalothrin (Karate 1EC), metomil (Lannate 2.4L), *B. bassiana* (Naturalis), oxamyl (Vydate 2L), y azadirachtin combinado con Bta, y Neem Guard contra *A. eugenii*. Los resultados demuestran que el esfenvalerato, clorpirifos y oxamyl reducen los daños internos debido al hábito alimenticio del picudo. En un tercer estudio, se evaluaron virus de poliedrosis nuclear de *Spodoptera exigua*, cryolite (Kryocide 96%), clorpirifos (Lorsban 50WP), acefato (Payload 15G), oxamil y azadiractina, y en base a los resultados los autores consideran que los productos oxamil, clorpirifos y cryolite son promisorios en controlar el daño del picudo del Chile.

Un cuarto estudio realizado por Seal y Schuster (1995), evaluó el oxamil, y el fipronil (Regent) comparados contra un testigo. Los resultados muestran que el número promedio de adultos del picudo es significativamente más pequeño en oxamil y fipronil que el testigo; un patrón similar fue obtenido en larvas de picudo cuando los frutos caídos fueron disectados. En un quinto estudio, los autores evaluaron el metamidofos (Monitor), naled (Dibrom), oxamil, acefato y un testigo, y en la cual después de la segunda aplicación, la cantidad de larvas en frutos caídos fue significativamente más pequeña en metamidofos y oxamil que el testigo.

Consecuentemente a los diferentes estudios realizados por Seal y Schuster (1995), un sexto estudio, comparando el efecto del imidacloprid (Provado), ciflutrin (Baythroid), fipronil y un testigo, demostraron que los insecticidas convencionales utilizados fueron efectivos en reducir el daño por adultos del picudo, pero que ninguno



de los insecticidas presentó diferencias significativas entre el número de frutos caídos o en el número de larvas dentro de esos frutos.

### 2.7.3 Control microbial de *Anthonomus eugenii*

#### 2.7.3.1 Uso de hongos entomopatógenos

Existen reportados en la literatura varios hongos utilizados en el control microbiano, que muestran distintas reacciones a los hospedantes. La patogenicidad de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Paecilomyces fumoroseus* (Wise) Brown y Smith, y *Verticillium lecanii* (Zimmeman) Viegas, han sido evaluados principalmente dentro de la familia Scarabaeidae (Coleoptera).

Para el uso de los hongos entomopatógenos, deben considerarse factores ambientales que puedan afectar la persistencia de los mismos. Cough y Ignoffo (1981), citados por Vélez (1996), consideran que factores de tipo abiótico como luz solar, temperatura, agua, humedad y sustancias químicas determinan el éxito o fracaso de un agente de control biológico en el campo.

Para *B. bassiana* y *M. anisopliae* el punto letal térmico (tiempo a una temperatura dada en que termina la actividad del organismo), es de 15 minutos a 50°C. Para *Beauveria bassiana* se ha encontrado que la longevidad de los conidios es variable con respecto a la temperatura, por ejemplo, los conidios mantienen una longevidad de  $\pm$  900 días a temperaturas de 5-10°C, 85 días entre 20-30°C y menos de un día a 45-50°C (Ignoffo 1992). Según Ramoska (1984), citado por Batista *et al* (1995), un alto nivel de humedad relativa o una microhumedad más constante cerca del exoesqueleto, provee un medio adecuado para la germinación de *B. bassiana*.

*Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) (Humber 1997). Ha sido utilizado para el manejo de muchas especies de insectos en regiones tropicales y templadas, y en moderada escala en Europa del este y China. Un nuevo bioinsecticida

(AF-4 ) a base de *B. bassiana* y producida por Mycotech, ha demostrado tener alta patogenicidad para insectos de la familia Coleoptera (Starnes *et al* 1993).

En bioensayos de laboratorio Coutinho y Oliveira (1991), demostraron que el aislado I-149Bb (proveniente de una cepa de *B. bassiana*), es altamente patogénico al curculiónido del algodón *A. grandis* Boheman. En las pruebas realizadas, los adultos fueron inoculados a través de inmersión en concentraciones que variaron de  $3.72 \times 10^6$  a  $3.72 \times 10^{10}$  conidios/ml. de patógeno y se observaron mortalidades entre 67.5-100%, respectivamente. Estas mortalidades se observaron a los 37 días después de realizada la inoculación.

A nivel de laboratorio se evaluaron 12 aislamientos de *B. bassiana* de la colección de hongos entomopatógenos del CATIE. Se evaluó la mortalidad y tiempos letales de la inoculación del hongo en adultos del picudo del chile. Se observó que todas las cepas utilizadas fueron patogénicas pero sobresalieron las cepas RL-9, 113 y 35 con mortalidades del 100%, y las cepas 447, 290 RL9-2, 0084 y 9205 con mortalidades arriba del 95%. La cepa 447 obtuvo el menor tiempo letal con 1.8 días, seguido de las cepas 113 (2.25 días) y 9205 (2.25 días) (Carballo 1996).

En un estudio para evaluar el potencial de selección de enemigos naturales para el control del picudo del chile en condiciones de laboratorio, se evaluaron la patogenicidad de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *P. fumoroseus* (Wise) Brown y Smith, y *V. lecanii* (Zimmeman) Viegas. Los distintos instares de desarrollo del picudo fueron muertos con dosis bajas de los patógenos. Todas las especies de hongos a concentraciones de  $10^7$  conidios/ml fueron patogénicas a larvas, pupas y adultos del picudo. Estos instares no mostraban un efecto similar de mortalidad a los patógenos, por ejemplo, las larvas aparentemente fueron las más afectadas por *Beauveria* (80% de mortalidad), mientras que los adultos fueron afectados por *Verticillium* (40%), y en pupas fue de *Paecilomyces* (67%), todos estos hongos se aplicaron a grupos de 15 individuos de todos los instares (Schuster *et al* 1996).

Gómez y Jiménez (1995), comprobaron la patogenicidad de cepas de *B. bassiana* sobre adultos de *A. eugenii*, y en la cual presentan porcentajes de mortalidad mayores a 80% cuando se produjo la inmersión de adultos del picudo en soluciones fúngicas del hongo en concentraciones de  $1 \times 10^8$  conidios/ml.

## 2.8 GENERALIDADES Y MODOS DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

### 2.8.1 Etapas de infección de los hongos entomopatógenos

El desarrollo de la enfermedad en los insectos comienza con la adhesión al tegumento y la germinación de los conidios o esporas sobre éste. Después se produce la penetración a través de la cutícula del insecto, la multiplicación del hongo en el hemocele y la producción de toxinas (en ciertos hongos o cepas). Sobreviene la muerte del insecto y el hongo coloniza todo el interior del hospedante. Posteriormente, el micelio sale hacia el exterior pasando a través del tegumento, esporula sobre la superficie del insecto y finalmente los propágulos son diseminados al medio (Lecuona, 1996; Carballo, 1997).

Las etapas del desarrollo de los hongos entomopatógenos descritas por Lecuona (1996) y Carballo (1997), se describen a continuación :

**a) unión de unidad infectiva a la epicutícula:** Se da la fijación de las unidades infectivas (propágulo) sobre la superficie del insecto mediante mecanismos en los cuales intervienen propiedades físicas, químicas y electrostáticas del patógeno y del insecto. En el proceso de adhesión, ocurren tres etapas: la primera es la adsorción o inmovilización del microorganismo sobre la superficie, la cual es afectada por factores físicos y químicos del sustrato; la segunda es la interacción del patógeno y el insecto, y la tercera es la adhesión del patógeno en la superficie del insecto. Esta adhesividad es un aspecto importante porque regula la especificidad hospedante-patógeno y la virulencia. Los espacios intersegmentales del insecto son los lugares preferenciales para la adhesión, germinación y

penetración. Esto no excluye la capacidad de los hongos para penetrar por regiones membranosas.

**b) germinación:** La espora del hongo produce uno o dos tubos germinativos sobre la cutícula del insecto, y puede ocurrir en un mínimo de 12 horas dependiendo de la humedad y temperatura ambiental, condiciones nutricionales y lumínicas.

**c) formación de apresorios:** El apresorio es una dilatación de hifas en la extremidad del tubo germinativo, el cual no es formado cuando penetra por aberturas naturales. El apresorio puede debilitar la cutícula del insecto en sus puntos de contacto, fijarse al tegumento durante la penetración o bien servir de transición entre el tubo germinativo y la formación de la estaquilla de penetración.

**d) formación de la estaquilla de penetración:** Es formada en la parte inferior del apresorio y penetra la epicutícula del insecto. La fijación del apresorio con la superficie del insecto puede ocurrir por medio de sustancias mucilaginosas.

**e) penetración:** Puede ocurrir por la cutícula y regiones intersegmentales, por la boca y el ano. El modo de penetración depende de la dureza y esclerotización de la cutícula, así como de la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. Esta etapa puede ocurrir de dos formas, el primero es el proceso físico por presión de las hifas que rompen las áreas membranosas y esclerosadas, y el segundo es el proceso químico mediante la elaboración de enzimas (proteasas, lipasas y quitinasas) producidas por la hifa infectiva de los entomopatógenos que facilitan la penetración mecánica.

En el área de la procutícula o alrededor de la penetración aparecerán síntomas de la histólisis (descomposición del tejido por acción enzimática). Estas enzimas son producidas secuencialmente reflejando el orden del sustrato sobre el cual actúan, primeramente sobre las capas de ceras de la epicutícula y luego sobre la matriz de proteína y quitina. Sin embargo la secreción de enzimas durante los primeros estados de desarrollo de un hongo, no siempre es condición suficiente para asegurar la penetración del tegumento. Cuando la penetración ocurre por la boca, la espora puede germinar rápidamente en el ambiente

digestivo pero los fluidos digestivos pueden destruir la espora o hifa germinada. En muchos casos esta digestión de las estructuras fúngicas puede causar la muerte más por las toxinas liberadas que por la micosis.

**f) multiplicación del hongo en el hemocele:** Una vez en el interior del insecto, el hongo se multiplica principalmente por gemación, dando formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastoporas en Deuteromycetes. Los insectos tienen un sistema inmunológico que les permite reconocer y reaccionar a partículas extrañas dentro del hemocele que pueden ser fagocitadas si son muy grandes, sin embargo el principal mecanismo de defensa es la encapsulación la cual se produce para la concentración de plasmocitos o granulocitos alrededor del punto de infección, logrando una masa pseudotisular llamada granuloma.

**g) producción de toxinas:** No todos los hongos o todas las cepas de una misma especie fúngica producen toxinas en el hemocele. El término toxina se refiere a toda sustancia venenosa producida por organismos patógenos. Son sustancias que pueden originar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas pero además, ellas actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones de los hemocitos y retarda la agregación de células de la hemolinfa. En el caso de *B. bassiana* puede producir las toxinas beauverecina, tenellina, bassiana, ácido oxálico, destruxinas.

**h) muerte del insecto:** Ocurre generalmente antes de que el hongo colonice todo el interior del hemocele, entre los 4 y 7 días, dependiendo del insecto. Es originada en parte por la acción de las sustancias tóxicas secretadas por el hongo. La muerte ocurre por micotoxinas, histólisis y por el bloqueo mecánico del aparato digestivo que conlleva también a deficiencias nutricionales. La muerte del hospedante, marca el final de la fase parasítica para continuar creciendo saprofiticamente por todos los tejidos y compitiendo en ciertos insectos con la flora bacteriana intestinal. El tiempo que demanda la muerte del insecto dependerá de las cepas del hospedante y de los factores ambientales. Se pueden observar cambios en su comportamiento normal antes de la muerte y cuando ella ocurre, no se observan aún signos visibles de una enfermedad fúngica.

**i) colonización total:** Después de la muerte, el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por hifas filamentosas. La secuencia de la colonización es, primero los cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipodermis y sistema nervioso, músculos y tráqueas. El tiempo de colonización del hongo varía entre 76 y 120 horas.

El cadáver se transforma en una momia resistente a la descomposición bacteriana, aparentemente y sin poder generalizar, debido a la acción de antibióticos liberados por el hongo, entre ellos oosporin (en *B. bassiana*) o el cordycepin (*Cordyceps militaris*). Estas momias sirven como reservorio del hongo para pasar las condiciones climáticas adversas.

**j) emergencia del hongo hacia el exterior:** Dentro del cuerpo del insecto, el hongo forma una gran masa micelial, manteniendo intacto el tegumento. Permanece bajo esta forma mientras la humedad sea baja en ambientes húmedos y cálidos, atraviesa nuevamente el tegumento desde el interior hacia el exterior, a través de las áreas poco esclerosadas como las membranas intersegmentales o los espiráculos, aunque esto dependerá también del hospedante y de su estado de desarrollo.

**k) esporulación:** Una vez que las hifas han atravesado el tegumento, pueden permanecer en etapa vegetativa o pasar a la reproductiva dentro de las 24 y 48 horas y con la formación de conidios o esporas si las condiciones de humedad relativa son altas. El hongo toma una coloración característica al esporular, dependiendo de la especie en particular.

**l) diseminación:** Los conidios o esporas formadas sobre el insecto se diseminan por el viento, agua, hombre, u otros organismos y dan inicio a un nuevo ciclo de infección.

### 2.8.2 Patogenicidad de *Beauveria bassiana*

La patogenicidad corresponde a la capacidad de un organismo para provocar una enfermedad en el hospedero. La patogenicidad de *B. bassiana* se ha experimentado contra más especies de insectos que cualquier hongo, conociéndose actualmente cerca de 500 hospedantes para éste hongo. El amplio espectro de acción de *B. bassiana* incluye muchos

insectos del orden Coleoptera, entre los que se pueden citar a *Anthonomus grandis* (picudo del algodón) y *A. eugeni* (picudo del chile), *Artipus floridanus* (gorgojo o picudo de la raíz de los cítricos) (Mc Coy *et al* 1985), *Cerotoma arcuata* (conchuelas, vaquitas), *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo dorado de la papa), *Pantorhytes plutus* (picudo del coco), *Hypothenemus hampei* (broca del café), *Cosmopolites sordidus* (picudo del plátano) y *Metamasius hemipterus* (Barrios 1992; Batista *et al* 1994; Carballo 1996; Castiñeiras *et al* 1990; Coutinho y Oliveira 1991); *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* y *Trilobium castaneum* (Padín *et al* 1995). Esta patogenicidad ha sido demostrada en larvas de *Philosamia cynthia* (Lepidoptera: Saturniidae) (Misra *et al* 1991) y por Martins *et al* (1997) en adultos de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae).

### 2.8.3 Formulación

La formulación es la composición resultante cuando un plaguicida, en este caso el hongo entomopatógeno se mezcla con uno o varios ingredientes para hacer el material apropiado para su uso (Carballo 1998). Este proceso tiene como objetivo proporcionar una forma económica y fácilmente utilizable de un principio activo con viabilidad prolongada y, de ser posible, contribuir a incrementar su efectividad (Auld 1991, citado por Dorta y Arcas 1996), mejorando así la viabilidad, virulencia y eficacia del agente, incrementando el potencial de producción de conidios y mejorar su eficacia en el campo.

Además se promueve una fácil aplicación del producto, aumentando la persistencia, la humectabilidad, y la adhesividad a la planta o al insecto y lo hace más atractivo a éste último (Contreras 1996; Carballo 1997). Dichas formulaciones están basadas en diluyentes como aceites, los cuales no se evaporan rápidamente y aseguran la protección del hongo del efecto de la radiación solar (Bateman *et al* 1992, citados por Vélez 1996).

Prior *et al* (1988), citados por Batista *et al* (1995), consideran que las formulaciones de patógenos fúngicos basados en aceite pueden tener la ventaja de una excelente adhesión de la cutícula hidrofóbica de la plaga permitiendo así la reducción del volumen de aplicación.

Se debe considerar que el principio activo es una célula viva y que debe permanecer como tal. Para llegar a la superficie del insecto, el microorganismo puede ser sometido o no, a bruscos cambios de presión y, súbitamente, expuesto a las radiaciones solares, viento y lluvia a la espera de ponerse en contacto con el insecto plaga (Dorta y Arcas 1996).

Al igual que otros insecticidas biológicos, la formulación de hongos entomopatógenos puede requerir la incorporación de agentes dispersantes, humectantes, reguladores de la viscosidad, protectores ultravioleta, entre otros (Dorta y Arcas 1996).

Rivera y colaboradores (1994), consideran que el efecto inhibitorio de la germinación conidial se produce tempranamente en las mezclas debido al tipo de solvente utilizado en las formulaciones, los cuales tienen propiedades desecantes de la membrana citoplasmática, afectando la viabilidad de las conidias. Para verificar esta aseveración, utilizaron los insecticidas endosulfan, clorpirifos, diazinon, pirimifosmetil, fenitrotion, malation, y isazofos. Los resultados demuestran que hubo diferencias significativas entre productos, entre ellos el diazinon PM (polvo mojable) inhibió completamente la germinación mientras que diazinon EM (emulsión mojable) no lo hace, esta conclusión concuerda con Olmert y Kennteh (1974) y Alves (1986); además que el malatión inhibió la germinación significativamente.

Rivera *et al* (1994), evaluaron en condiciones *in vitro* dos aislamientos de *Beauveria bassiana* y ocho formulaciones de insecticida para determinar combinaciones compatibles para el manejo de la broca del café *Hypotenemus hampei*. La mortalidad de los insectos provocada por los hongos entomopatógenos se incrementa en general en presencia de una dosis baja de un insecticida. Fargues (1975) citado por Rivera *et al* (1994) en estudios de campo cita que los insecticidas azinfosmetil y carbaryl en dosis reducidas combinados con *B. bassiana* no producen acción sinérgica. Las formulaciones en polvo mojable a menudo incrementan las unidades formadoras de colonias; los piretroides (permetrina y fenvalerato) fueron inhibitorios como formulación y como ingrediente activo.



Rivera y colaboradores (1994), consideran que la mayoría de insecticidas utilizados tienen un efecto fungistático más que fungicida, pues se presenta la germinación y crecimiento micelial a las 48 horas de evaluación, excepto para diazinon PM, fenitrothion y el malation que presentaron un efecto deletéreo sobre el hongo. El efecto fungistático, consideran los autores, es explicable debido a la difusión de la mezcla en el agar, disminuyendo así la acción inhibitoria del insecticida.

Vélez (1997), evaluó el hongo *B. bassiana* en mezcla con agua y aceite agrícola (0.05%), y con aceite "Tersol" (aceite mineral blanco, al 10% en agua, seleccionado previamente en laboratorio). Las aspersiones del hongo se realizaron en forma dirigida a la parte superior e inferior de las ramas de plantas de café, mostrando ambas preparaciones del hongo eficacia en el control de *Hypothenemus hampei*, debido a la supervivencia de los propágulos del hongo en los frutos de café, tanto en los sistemas de sol como en los de sombra.

#### 2.8.4 Efecto de los plaguicidas sobre *Beauveria bassiana*.

La susceptibilidad de los agentes microbiales utilizados junto con productos químicos, principalmente fertilizantes y plaguicidas, se viene experimentando desde hace más de treinta años, cuando se observó la inhibición del entomopatógeno *Cephalosporium aphidicola* utilizado en el control del áfido del melón y el algodón *Aphis gossypii*. Wilding (1972), en condiciones *in vitro* observó la inhibición del crecimiento del patógeno debido a los fungicidas benomyl y triarimol.

Ramaraje *et al* (1967), Clark *et al* (1982) y Calderón *et al* (1991), señalan que este efecto de la inhibición del crecimiento del hongo por efecto de los plaguicidas se conoce desde hace más de tres décadas, principalmente sobre la fisiología de *B. bassiana*.

Olmert y Kenneth (1974) citados por Rivera (1993) utilizan el crecimiento radial de la colonia como criterio de inhibición, mientras que Clark *et al* 1982, Gardner y Storey (1985), Storey y Gardner (1986), consideran la germinación conidial como un criterio de

compatibilidad. La importancia de medir esta variable consiste en visualizar si existe algún efecto deletéreo sobre el hongo, como podría ser la inhibición del crecimiento celular o la germinación conidial, la muerte de todo o cierto porcentaje del micelio, la inhibición de ciertas actividades metabólicas normales como la respiración y la inhibición de algún hábito normal de esporulación (Ashida 1965, citado por Rivera 1993); esto no indica que los efectos de los plaguicidas pueden influir sobre los parámetros de la iniciación de una epizootia, como es la supervivencia del inóculo (Loría *et al* 1983), sin olvidarse de que hay un periodo crítico para la germinación y el crecimiento de las conidias de *B. bassiana* después de la aspersión, cuando el efecto de los plaguicidas está minimizado (Anderson y Roberts 1983; Batista *et al* 1994; Rivera 1993).

Ignoffo y Dutky (1963), determinaron la actividad microbicida del desinfectante de laboratorio hipoclorito de sodio sobre la viabilidad e infectividad de esporas de *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* y *Beauveria bassiana*. Las esporas expuestas en el desinfectante al 0.5% por cinco minutos mostraron alguna plásmolisis inicial, después de una exposición de 15 minutos todas las esporas fueron plasmolizadas.

Clark (1980), a nivel de laboratorio evaluó la acción de fungicidas contra *Phytophthora infestans*, el cual puede limitar el desarrollo de epizootias de *Beauveria bassiana* sobre *Leptinotarsa decemlineata*. Utilizando platos petri inoculados con esporas de *B. bassiana* y la acción de los fungicidas, el autor observó zonas de inhibición indicando que el entomopatógeno fue inhibido por los fungicidas mancozeb, metiram y clorotalonil, retardando además las tasas de crecimiento micelial.

Machowicz (1983), evaluó el efecto de fungicidas sobre el crecimiento de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. farinosus* y *V. lecanii*, mostrando que sólo mancozeb mostró un efecto tóxico a estos hongos. Machowicz (1985), cita la inhibición en el crecimiento de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. farinosus* y *V. lecanii* por efecto de fungicidas sistémicos tales como benomyl, carbendazim y triadimefon, la mezcla de captafol+carbendazim, en la cual limitan el crecimiento de los hongos mucho más que thiophanato-methyl.

Tal parece que los hongos *Penicillium notatum*, *Sclerotinia fructicola* y *Stemphylium sarcinaeforme* toleran concentraciones crecientes de fungicidas, en la cual crecen más normalmente y esporulan libremente después de exposiciones prolongadas a los fungicidas (Patridge y Rich 1962). Estos autores citan que estas adaptaciones pueden ser por tres vías:

- a) los hongos usualmente toleran incrementos de concentraciones de fungicidas cuando crecen en presencia de un número de vehículos (transfers);
- b) las tasas de crecimiento ordinariamente se parecen a los testigos cuando el hongo fue transferido sucesivamente en medio agar con fungicida; y
- c) la esporulación tiende a aproximarse a los controles después de transferencias sucesivas en agar fungicida.

Patridge y Rich (1962), consideran que los hongos expuestos a exposiciones continuas de ciertos fungicidas (sulfato de cobre, glyodin, captan, sulfuro), presentan alguna tolerancia a concentraciones incrementales de fungicidas o mediante adaptaciones graduales de las tasas de crecimiento y esporulación. Esto implica que la tolerancia resulta probablemente de cambios semipermanentes en las capacidades enzimáticas o asimilativas de los organismos.

Taylor (1953), evaluó el efecto de los fungicidas sobre el hongo *Physalospora obtusa* en frutos de manzana. Observó que los fungicidas ferbam y ziram exhibieron un efecto fungistático sobre el crecimiento micelial del patógeno.

Anderson y Roberts (1983), estudiaron la compatibilidad del hongo *B. bassiana* en mezcla con los insecticidas endosulfan (Thiodan), esfenvalerato (Asana), permethrin (Ambush), piperonyl butoxido (Prentox), oxamyl (Vydate), carbaryl (Sevin), carbofuran (Furadan), azinphos methyl (Guthion) y diflubenzuron (Dimilin). Los autores obtuvieron que los piretroides esfenvalerato y permethrin contribuyen a inhibir la germinación de las esporas de *B. bassiana* en un 96.6 y 92.8%, respectivamente, mientras que los otros productos mostraron rangos de inhibición en el crecimiento de esporas entre un 4 y 36%.

Los autores reportan que carbaryl al igual que triflumuron, producen un incremento de las cantidades de unidades formadoras de colonias, considerando además que los coadyuvantes en polvo mojable y las formulaciones floables pueden actuar como suaves abrasivos y romper las aglomeraciones de conidios. Además observaron que los insecticidas formulados como concentrados emulsificables (CE) que usan solventes aromáticos a base de xileno, fueron los más inhibitorios para el hongo.

Osborne y Boucias (1985), mediante una revisión de literatura, citan estudios en laboratorio sobre la inhibición del crecimiento radial de *B. bassiana* y *M. anisopliae* por efecto de plaguicidas. Rivera y Bustillo (1996a), al igual que Osborne y Boucias (1985), consideran que los fungicidas carbamatos son los más tóxicos para los hongos.

Altahtawy (1970), y Lingg y Donaldson (1981) citados por Osborne y Boucias (1985), citan que *Bacillus subtilis* inhibe la germinación y el crecimiento de *B. bassiana*, en la cual esta inhibición parece ser causada por la producción de los antibióticos bacitracina y subutilina.

Anderson y colaboradores (1989), utilizando los insecticidas carbaryl, fenvalerato, abamectina, triflumuron y thuringiensin (de mayor uso en el combate de *Leptinotarsa decemlineata*) en combinación con *B. bassiana*, mostraron la compatibilidad de abamectina, triflumuron y thuringiensin.

Lappa (1967), evaluó el efecto de diferentes plaguicidas sobre la viabilidad y germinación de esporas de *B. bassiana*. Los resultados muestran que la exposición de dos horas en mezcla con carbaryl al 0.5% inhibe la germinación, pero no tiene un efecto adverso sobre la viabilidad.

Filho *et al* (1987), consideran que la integración de métodos de control de plagas realza la alternativa como forma racional de disminuir el impacto del uso excesivo de insecticidas en el medio ambiente, citan además la compatibilidad de *B. bassiana* con los

insecticidas Ambush CE, Dimetoato SC, Phosdrin CE y Folimat CE, mientras que los más perjudiciales son Diazinon CE, Thiodan CE, Lannate PM.

Calderón *et al* (1991), estudiaron a nivel de laboratorio la acción de los fertilizantes y plaguicidas (fungicidas, herbicidas, insecticidas) utilizados en el cultivo del plátano en Cuba, sobre la cepa LBB-1 de *Beauveria bassiana*; esta compatibilidad del hongo hacia los productos químicos se estableció según criterios de formación de biomasa y germinación conidial. Los fungicidas benomyl (15000 ppm), propiconazol (7500 ppm) y zineb (18758 ppm) mostraron un fuerte efecto depresivo, ya que no mostraron germinación conidial y la formación de biomasa al cabo de 72 horas y siete días, respectivamente. Por otro lado, los fertilizantes cloruro de potasio (45000 ppm) y nitrato de amonio (18000 ppm), propiciaron un aumento de biomasa de *B. bassiana*, mientras que los herbicidas dalapón (20400 ppm), simazina (9600 ppm) y el fertilizante completo (7.5-6-18, 20000 ppm) no variaron estadísticamente la biomasa total.

En otro estudio, Tedders (1981), observó la inhibición *in vitro* de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, por tres fungicidas utilizados en el cultivo de la Peca, *Carya illioensis* (Wangenh.), para el control del picudo *Curculio caryae* (Horn). Los fungicidas triphenyltin hydroxide (Brestanid), zineb (Dithane) y benomyl (Benlate) inhibieron la germinación de esporas y el crecimiento de *B. bassiana*.

En pruebas de campo, Clark *et al* (1982), observaron que los plaguicidas muestran la inhibición del patógeno *Beauveria bassiana* de la catarinita de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Utilizando los fungicidas metiram, chlorotalonil y mancozeb contra el tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans* (Montagne), y los insecticidas azinphos methyl, carbofuran y permethrin contra la catarinita de la papa *L. decemlineata* (Say), los autores demostraron que el fungicida mancozeb muestra una completa inhibición de las esporas de *B. bassiana*, mientras los insecticidas azinphos methyl y carbofuran mostraron una moderada inhibición de la esporas, reduciendo el crecimiento micelial cerca del 50%, mientras tanto, la permetrina no inhibió el crecimiento del hongo exhibiendo una curva de respuesta similar al tratamiento control.

Rivera (1993), evaluó la compatibilidad de *B. bassiana* con los fungicidas cyproconazol (Alto), hexaconazol (Anvil), triadimefon Bayleton) y oxiclورو (Oxicloruro de Cobre), y los insecticidas pirimifos-metil (Actelic), dicrotofos (Bidrin), fenitrothion (Sumithion) y endosulfan (Thiodan). Se mezclaron los plaguicidas en tres dosis comerciales en el medio de cultivo para hongos Agar-Sabouraud-Dextrosa (SDA), para la germinación de conidios se utilizó 5  $\mu$ l de solución de Bb en concentración de  $1 \times 10^6$  conidios /ml. A las 24 horas de la inoculación se midió la germinación conidial. La germinación conidial de *B. bassiana* fue inhibida por todos los plaguicidas evaluados en la dosis comercial más alta; los productos oxiclورو de cobre y el dicrotofos inhibió fuertemente la germinación en la dosis media, mientras que el insecticida fenitrothion fue el único que inhibió el crecimiento micelial en las dosis probadas; por otro lado, el endosulfan causó una alta inhibición en el crecimiento fúngico en la dosis más alta. El autor afirma que los fungicidas ejercen una mayor inhibición que los insecticidas.

Lord *et al* (1997), utilizando dos formulaciones a base de esporas de *B. bassiana* (Mycotrol), evaluaron la compatibilidad en mezcla (dos días antes, dos horas después y dos días después de la aplicación en el campo de Mycotrol) con fungicidas, insecticidas y coadyuvantes. El Thiodan EC el cual contiene tolueno causa alguna pérdida de viabilidad de las esporas, mientras que esta pérdida no sucede en Thiodan WP. Algunos coadyuvantes e insecticidas causan conglomerados de las suspensiones y emulsiones de Mycotrol, y que los fungicidas clorotalonil, maneb, mancozeb y benomyl fueron muy tóxicos a las esporas cuando las aplicaciones se separaron entre dos días. Los fungicidas cúpricos y sulfurados causaron una toxicidad inmediata cuando se aplicaron a nivel foliar.

Todovora (1997) evaluó el efecto de los fungicidas clorotalonil, maneb, tiofanato-metil, mancozeb, metalaxyl-mancozeb y zineb, y los herbicidas diquat y glufosinato-amonio, usados en campos comerciales de papa contra *L. decemlineata*. El autor cita que todos los fungicidas y el herbicida glufosinato-amonio inhibieron el crecimiento micelial y esporulación de *B. bassiana*.

Carballo *et al* (1998a), en un experimento desarrollado a nivel de laboratorio, evaluaron el efecto de seis fungicidas y un bactericida sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* en medio de cultivo (PDA). Los resultados demuestran que el crecimiento del hongo es inhibido por los fungicidas siendo el antracol, dithane y benlate los más perjudiciales, mientras que oxiclورو de cobre presenta un efecto menor, el agrimicin 100 al igual que los fungicidas daconil y previcur no tuvieron un efecto drástico sobre el hongo bajo las condiciones del ensayo.

Los reguladores de crecimiento y coadyuvantes exhiben algún grado de inhibición en el crecimiento de estructuras del hongo *Beauveria bassiana*. En condiciones de laboratorio se observó que el flurprimidol (Cutless), silane (Silaid) y el coadyuvante en aspersión Triton CS-7, inhiben significativamente el crecimiento micelial de *B. bassiana*, mientras que los coadyuvantes Ortho X-77, Nu-Film y Tween-80, no mostraron una inhibición significativa del micelio del hongo (Storey y Gardner, 1986).

Otros plaguicidas utilizados a nivel de laboratorio, tales como los herbicidas oxyfluorfen (Goal), paraquat (Paraquat) y alachlor (Lazo) inhibieron la germinación de esporas de *Beauveria bassiana*, en comparación con los herbicidas glyphosate (Roundup) y oryzalin (Surflan) que no causaron una inhibición significativa en la germinación de conidios de *B. bassiana* (Gardner y Storey 1985).

Bajan y Kmitowa (1982) evaluaron el efecto de los herbicidas Simazin 50, Avadex (di-allate) y Antyperz (triclورو acetato de sodio), sobre la patogenicidad de los hongos *B. bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *P. fumosoroseus* y *M. anisopliae*. Los resultados demuestran que los hongos mostraron una alta especificidad a la presencia de los herbicidas en medio de cultivo, y en la cual *B. bassiana* fue el más susceptible, resultando en la inhibición del crecimiento y disminuyendo la patogenicidad, mientras tanto *P. fumosoroseus* fue el menos susceptible.

El grupo de trabajo Plaguicidas y Organismos Benéficos de la Organización Internacional de Control Biológico (IOBC), evaluó el efecto de 5 insecticidas, 8 fungicidas y 6 herbicidas sobre 24 especies de organismos benéficos. Entre los fungicidas evaluados figuran el hexaconazol (Anvil), tridemorph (Calixin), triforine (Saprol), tradimenol (Bayfidin); los insecticidas metamidofos (Tamarón), buprofezin (Applaud), diflubenzuron (Dimilin), y los herbicidas bentazone (Basagran), clopyralid (Lontrel 100), entre otros. Entre los organismos benéficos evaluados estaban 7 parásitos, 3 ácaros depredadores, 8 insectos depredadores y 3 hongos. Los resultados muestran que el insecticida buprofezin, los fungicidas triforine, tradimenol, hexaconazol y tridemorph, y el herbicida bentazone fueron los menos dañinos a la mayoría de organismos benéficos evaluados y pueden ser recomendados para el uso en programas de control integrado. En el caso de *B. bassiana*, los productos Anvil, Baydifan, Calixin y Basagran mostraron ser moderadamente dañinos (Hassan *et al* 1994).

Costa y Gaugler (1989), en estudios *in vitro* evaluaron la compatibilidad de extractos de plantas sobre *B. bassiana*, tal es el caso del antibiótico nistatina, los alcaloides tomatina y solanina, encontrando que la nistatina es el compuesto más tóxico, mientras que la inhibición causada por la tomatina fue mayor que la causada por solanina, presentando ésta última poco efecto sobre el hongo. En otro estudio, Raghavajah y Jayaramajah (1987), citados por Rivera y Bustillo (1996a), encontraron que el ajo tiene un potente efecto inhibitor sobre *B. bassiana*.

Rivera y Bustillo (1996b), en base a los estudios de Roberts y Campbell (1977), presentan una amplia revisión de literatura de los efectos de los agroquímicos sobre los patógenos de la broca del café *B. bassiana* y *M. anisoplie*. Los productos benomil, BHC PM, carbaril, captan, captafol, diazinon PM, clorotalonil, endosulfan 3EC, diquat, fenitrothion, fenvalerato 2.4 CE, hipoclorito de sodio, malation, mancozeb, maneb, metil paration, metomil, paraquat, procloraz y zineb mostraron una alta o completa inhibición sobre *B. bassiana*. Mientras que los coadyuvantes Triton AE, Tween 80, aceite de parafina, carbofuran 4F, DDT, dinocap, endosulfan 50 PM, metalaxyl, Nu-film 17, Ortho X-77, oxamyl, permetrina, pirimicarb, PCNB, toxapheno, no presentan inhibición.



## CAPITULO 2

### EFFECTO DE *Beauveria bassiana* SOBRE LA MORTALIDAD DEL PICUDO DEL CHILE *Anthonomus eugenii*.

#### 2.1 INTRODUCCION

El picudo del chile *A. eugenii* Cano es una plaga originaria del área Mesoamericana, localizándose en Norte América, Centro América, y el Caribe. De reciente introducción en Costa Rica, su importancia se ha incrementado en las principales áreas productoras de chile del país. Los principales daños ocurren en las épocas de floración y fructificación, donde los adultos dañan el fruto en desarrollo, causando la caída de yemas florales, flores y frutos pequeños. En muchas ocasiones la plaga se hace incontrolable, provocando grandes pérdidas a plantaciones establecidas de chile, alcanzando pérdidas totales en el cultivo.

El control tradicional de esta plaga está basado en el uso de productos químicos, siendo poco efectivos debido a que el estado larval que es el más dañino se localiza dentro de las estructuras florales y frutos en desarrollo. El efecto restringido del control químico, plantea la alternativa de implementar un control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos. Estos podrían aplicarse para el control de los adultos cuando éstos permanezcan sobre el follaje o tejidos tiernos. Trabajos preliminares realizados a nivel de laboratorio demuestran el alto potencial de estos hongos para el control microbiano del picudo del chile (Carballo *et al* 1998b).

En Costa Rica, se evaluaron en laboratorio 12 cepas de *B. bassiana* provenientes de la colección de hongos entomopatógenos del CATIE. Para ello se inocularon adultos del picudo del chile con conidios del hongo y se evaluó la mortalidad y los tiempos letales medios. Los resultados mostraron que todas las cepas utilizadas fueron patogénicas destacando las cepas RL-9, 113 y 35 con mortalidades de adultos del 100%, y las cepas

447, 290, RL9-2, 0084 y 9205 con mortalidades superiores al 95%. La cepa 447 obtuvo el menor tiempo letal con 1.8 días, seguido de las cepas 113 (2.25 días) y 9205 (2.25 días) (Carballo *et al* 1998b).

Schuster *et al* (1996a), a nivel de laboratorio, se evaluó la patogenicidad de los hongos *B. bassiana* (Bals.), *Paecilomyces fumoroseus* (Wise), y *Verticillium lecanii* (Zimmermann) sobre el picudo del chile. Todos estos hongos se aplicaron a grupos de 15 individuos de todos los instares, presentando mortalidades en dosis bajas de los patógenos. Las especies de hongos evaluados a concentraciones de  $10^7$  conidios/ml fueron patogénicas a larvas, pupas y adultos del picudo. Estos instares mostraron un efecto diferente de mortalidad a los patógenos, siendo las larvas las más afectadas por *Beauveria* (80% de mortalidad), los adultos por *Verticillium* (40%), y las pupas por *Paecilomyces* (67%).

Gómez y Jiménez (1995), comprobaron la patogenicidad de cepas de *B. bassiana* sobre adultos de *A. eugenii*, y en la cual la inmersión de adultos del picudo en soluciones del hongo en concentraciones de  $1 \times 10^8$  conidios/ml., causó mortalidades mayores a 80%.

El uso de dosis bajas de insecticidas en mezcla con *B. bassiana*, tiene como objetivo causar un estrés en los insectos con el fin de predisponer a la plaga a una mayor susceptibilidad. Rivera *et al* (1994), evaluaron en condiciones *in vitro* dos aislamientos de *B. bassiana* y ocho formulaciones de insecticida determinando que la mortalidad de adultos de la broca del café *Hypotenemus hampei*, provocada por *B. bassiana* es incrementada en presencia de subdosis de insecticida. Fargues (1975) citado por Rivera *et al* (1994), en estudios de campo cita que los insecticidas azinfosmetil y carbaryl en dosis reducidas no tienen acción sinérgica cuando se combina con *B. bassiana*.

El éxito o fracaso de un agente de control biológico en el campo está influido por factores de tipo ambiental. En el uso de hongos entomopatógenos, deben considerarse factores que afectan la persistencia de los mismos, tales como temperatura, luz solar, agua o humedad y sustancias químicas (Cough y Ignoffo 1981, citados por Vélez 1996). Para *B. bassiana* se ha encontrado que la longevidad de los conidios es de 900 días a temperaturas

de 5-10°C, 85 días a 20-30°C y menos de un día a 45-50°C; mientras que esporas expuestas a la luz solar natural y colocadas sobre hojas de soya tienen una vida media entre 48 y 72 horas (Ignoffo 1992). Una microhumedad constante cerca del exoesqueleto del insecto, o un alto nivel de humedad relativa proporciona un medio adecuado para la germinación de *B. bassiana* (Ramoska 1984, citado por Batista *et al* 1995).

Estos inconvenientes pueden ser superados mediante el tipo de formulación (incorporando protectores), y el momento de la aplicación, la cual se recomienda en las horas de menor radiación solar (Lecuona 1996). Otros factores que influyen en la efectividad de los hongos entomopatógenos, están el ciclo evolutivo del patógeno, del cultivo y de la plaga, y la planificación de las aplicaciones para lograr reducir la población insectil antes que alcance el nivel de daño económico (Lecuona 1996).

Al ser solo el adulto del picudo susceptible al control químico, considerando además la disponibilidad y el relativo bajo costo de los mismos, las aplicaciones regulares se presentan como alternativa para reducir las pérdidas de producción en cantidad y calidad de frutos (Stansly 1998).

Las aspersiones de insecticidas deben realizarse temprano en la mañana o terminado la tarde, cuando el insecto se localiza sobre la planta (Coto 1996). Estas aplicaciones han de iniciarse con la apertura de los primeros botones florales, asegurándose una buena cobertura de aspersión y prolongarse por todo el ciclo del cultivo, evitando utilizar los productos sistémicos y de residualidad prolongada en el periodo de producción de frutos (Riley y Sparks 1992, Coto 1996).

Las aplicaciones preventivas de un amplio espectro de insecticidas convencionales para el manejo del picudo del chile, pueden tener consecuencias de resistencia a insecticidas y presentar explosiones de plagas secundarias. Sustituyendo estas aplicaciones convencionales por plaguicidas racionales y biológicos, unido a las prácticas culturales integradas, prometen tener un potencial a largo plazo del manejo del picudo del chile.

### 2.1.1 Objetivos

a) Evaluar el efecto de mezclas de dos formulaciones de *Beauveria bassiana* con diferentes dosis del insecticida fipronil en comparación con el control químico usado por el agricultor, sobre el control del picudo del chile *Anthonomus eugenii* y la producción de frutos en una plantación de chile establecida.

b) Evaluar el efecto de las dosificaciones del insecticida fipronil, sobre la efectividad y patogenicidad de *B. bassiana* y el desarrollo del picudo del chile.

c) Evaluar a nivel de laboratorio, el efecto de mezclas de dos formulaciones de *Beauveria bassiana* con diferentes dosis de insecticida sobre la efectividad y patogenicidad de *B. bassiana* y la mortalidad de adultos del picudo del chile.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 CAMPO

#### 2.2.1.1 Localización del experimento

El trabajo de campo se realizó en la finca experimental Cabiria del CATIE, en Turrialba, Costa Rica, situada a 602 msnm, con precipitaciones anuales de 2500 mm, con temperatura y humedad relativa promedio de 24°C y 85%, respectivamente.

#### 2.2.1.2 Manejo del experimento

Se utilizó chile dulce (*Capsicum annum*) de la variedad Agronómico. La siembra se realizó en bandejas plásticas de 51 compartimentos. Los semilleros se mantuvieron en invernadero y se aclimataron antes de transplantarlas al campo. Se realizaron aplicaciones foliares de Fosnutrén (2.5 ml/L), Previcur (2.5 ml/L), y alternando Confidor y Thiodan (2.5 ml/L). Tres semanas después de la germinación, las plántulas fueron llevadas al campo,

preparado una semana antes del trasplante. El experimento se realizó en parcelas con hileras distanciadas a 1.20 metros y 0.50 metros entre plantas, para una densidad de siembra de 16667 plantas por hectárea. Cada unidad experimental (repetición) constó de 48 plantas en un área estimada de 28.8 m<sup>2</sup>, para un total de 115.2 m<sup>2</sup> por tratamiento. Cada parcela útil estaba compuesta de 16 plantas. El área total del experimento fue de 1200 m<sup>2</sup>. La fertilización se realizó al momento del trasplante usando la fórmula 10-30-10. A los 45 días del trasplante se aplicó 320 Kg/ha de Nutrán y 30 días después 270 Kg/ha de Nutrán. Todos estos fertilizantes se incorporaron al suelo en dosis de 30 gramos por planta. Se aplicó Bayfolán Forte (1.4-2.0 litros/ha) al follaje cada dos semanas; y Micromins (1.2 litros/ha) a los 20-35 y 50 días después del trasplante.

### 2.2.1.3 Tratamientos

Los tratamientos evaluados se presentan en el cuadro 1. En los tratamientos con *Beauveria bassiana* (Bb) se utilizó la cepa B-447, a una concentración de  $1,2 \times 10^7$  conidios/ml. Cada uno de los tratamientos, se mezclaron con agua en una bomba rociadora de mochila "Spray-Mec" (capacidad para 18 litros provista de una boquilla graduable minijet, y con una presión de aplicación de 10 atmósferas), y se les añadió adherente Nufilm a razón de 3 cc pc/4 litros. Una vez preparados los tratamientos, estos se asperjaron en cada parcela experimental cada ocho días por un periodo de dos meses.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el experimento de campo. CATIE; Turrialba, 1998.

Tratamiento	Simbología	Descripción de Tratamiento	Dosis
1	Ag	Aceite Agrícola Agrol	20 cc. por litro de agua
2	Ag+Bb	Aceite Agrol + Bb	20 cc + Bb
3	Bb	Bb	Agua + Bb
4	Rb	Regent dosis baja	0.02 cc ia /litro de agua
5	Ra	Regent dosis alta	0.1 cc ia /litro de agua
6	Rb+Bb	Regent dosis baja + Bb	0.02 cc ia /litro de agua + Bb
7	Ra+Bb	Regent dosis alta + Bb	0.1 cc ia /litro de agua + Bb
8	T	Testigo absoluto	Solo agua

Bb: Se utilizó 0.34 gramos de conidios de *B. bassiana* (Bb) a una concentración de  $1,2 \times 10^7$  conidios/ml para aplicar en un volumen de 4 litros de agua.

### 2.2.1.4 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo de parcelas divididas en el tiempo, y cuatro tratamientos en arreglo factorial, con 4 repeticiones, para un total de 32 unidades experimentales.

### 2.2.1.5 Variables evaluadas

Las variables utilizadas para valorar el efecto de los tratamientos descritos fueron: número de frutos caídos no comerciales por tamaño y por parcela útil cada ocho días, número de frutos cosechados de calidad comercial por tamaño y por parcela útil cada ocho días y rendimiento de frutos por tratamiento.

La cosecha de los frutos se inició a los 79 días después del transplante (ddt) y se prolongó por ocho semanas. La calidad de los frutos cosechados se clasificó de la siguiente manera:

- Frutos de Primera: frutos con longitudes superiores a 14 cm.
- Frutos de Segunda: frutos con longitudes entre 10 y 14 cm.
- Frutos de Tercera: frutos con longitudes menores a 10 cm.
- Frutos caídos: frutos presentes en el suelo al momento de la cosecha y de calidad no comercial.

### 2.2.1.5 Análisis estadístico

El modelo estadístico fue el siguiente :  $Y_{ijk} = \mu + t_i + a_j + \beta_k + B_j + (a\beta)_{jk} + E_{ijk}$  en la cual:

- $Y_{ijk}$  : Variable aleatoria observable
- $\mu$  : promedio general.
- $t_i$  : efecto de las repeticiones (factor de bloqueo).
- $a_j$  : efecto del factor A.
- $\beta_k$  : variación debido al azar de las parcelas principales.
- $B_j$  : efecto del factor B.
- $(a\beta)_{jk}$  : efecto de las interacciones entre los tratamientos y las mezclas.
- $E_{ijk}$  : variación debida al error de experimentación.

El análisis estadístico de los datos se realizó a través de las pruebas de Análisis de Varianza (diferencias entre fuentes de variación), Análisis de Regresión (medición del grado de asociación de una variable respecto a otra) y Prueba de Tukey (95% de significancia, comparación de dos medias) (SAS Institute 1985).

## **2.2.2 LABORATORIO**

### **2.2.2.1 Localización del experimento**

El trabajo de laboratorio se realizó en los Laboratorios de Diagnóstico y Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE.

### **2.2.2.2 Aislamiento, concentración y formulaciones de *Beauveria bassiana* a utilizar.**

Se utilizó la cepa de *B. bassiana* B-447, la cual se encuentra en el inventario del Laboratorio de Control Microbial del CATIE. Se usó una concentración de  $1,2 \times 10^7$  conidios por mililitro de suspensión. Las suspensiones se realizaron en agua con Tween 80® (ICI Americas Inc.) al 0.3% (agente dispersante).

### **2.2.2.3 Reproducción masiva de *B. bassiana***

Para mantener la vitalidad del material a utilizar se inocularon adultos de picudo del chile con una suspensión del aislado B-447 en agua. Al morir los insectos y mostrar signos de esporulación del hongo, se realizó un aislamiento del hongo. Para esto, se colocaron los adultos en cajas petri conteniendo medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar).

Para la multiplicación del hongo se preparó una suspensión de conidios en agua estéril mezclada con Tween 80, a razón de 0.5 ml/L. Se utilizó arroz (95% grano entero), el cual se sumergió previamente en agua por noventa minutos, para luego autoclavar a 130°C y una presión de 15 bares por 30 minutos, utilizando 350 gramos de arroz por bolsa de polipropileno (25.4 cm por 31.4 cm). Posteriormente las bolsas fueron inoculadas con

15 ml de suspensión de esporas del hongo en una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  con/ml.

Luego de cuatro a seis días, el arroz inoculado fue colocado en bandejas plásticas con tapa de 20 x 30 cm, por 5 cm. de altura, donde permaneció por 10 a 12 días para su esporulación. Luego se removió parcialmente la tapa para permitir el secado durante 4-5 días. Finalmente, se separaron los conidios de los granos de arroz mediante un tamiz de 50 mesh, para luego cuantificar el número de conidios por gramo de polvo y la cantidad estimada de conidios producidos por grano de arroz.

#### **2.2.2.4 Mortalidad de adultos de *A. eugenii* bajo los tratamientos aplicados en el campo**

En laboratorio se realizó una réplica de los tratamientos aplicados en el campo (Cuadro 1). Se colocaron diez adultos del picudo del chile en viales plásticos y a cada grupo de adultos se les aplicó los tratamientos descritos mediante aspersión (simulando aplicaciones de campo) utilizando un aerógrafo Junior 03 (5923, Lukas), acoplado a un compresor Pulmo-Aide (561, Devilbiss), con una presión máxima de  $1.8 \text{ kg/cm}^2$ . Los adultos fueron alimentados con hojas de chile durante los días que duró el experimento. Se evaluó la mortalidad acumulada diaria por un periodo de siete días. La efectividad de los tratamientos fue indicada por el porcentaje de mortalidad y el tiempo medio letal.

#### **2.2.2.5 Determinación del número de conidios por insecto muerto.**

Después de realizada la aplicación de los tratamientos con el hongo entomopatógeno en el laboratorio, los insectos muertos fueron colocados en recipientes con la humedad necesaria para permitir la esporulación del hongo y calcular la producción de conidios por insectos muertos. Después de esporular, (veinte días después de la inoculación), los insectos se trasladaron a viales de 25 ml con tapa y se agregó 20 ml de agua destilada con Tween 80 al 0.3%. Se agitó por tres minutos, y ultrasonificó por un minuto para mejorar el desprendimiento de conidios. Luego se tomó una alícuota de  $10 \mu\text{l}$ ,



y se colocó en un hematocímetro para contar el número de esporas, y después calcular el número promedio de conidios liberados por insecto.

#### 2.2.2.6 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo de parcelas divididas en el tiempo, y cuatro tratamientos en arreglo factorial, con 4 repeticiones, para un total de 32 unidades experimentales. El análisis de los datos se realizó mediante las pruebas de Análisis de Varianza, y Prueba de Tukey (95% de significancia). La efectividad de los tratamientos fue indicada por el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal medio (TL50), calculado mediante el análisis de próbitos (SAS Institute 1985).

### 2.3 RESULTADOS

#### CAMPO

El número de frutos de las cuatro clases comerciales, así como el total, variaron entre tratamientos (Cuadro 2, Anexo 1). El tratamiento 6 (Regent baja + *Beauveria*), el tratamiento 3 (*Beauveria* en agua), al igual que el tratamiento 8 (Testigo Absoluto) mostraron las mayores cantidades de frutos cosechados totales por tratamiento, no mostrando diferencias significativas entre sí (Cuadro 2). El tratamiento 1 (Agrol) se presenta en cuarto orden de cantidad de frutos totales significativamente diferentes a los tratamientos 3, 6 y 8, pero sin diferencias significativas a los tratamientos 5 (Regent alta) y 7 (Regent alta+*Beauveria*).

Por otro lado, los tratamientos 2 (Agrol + *Beauveria*) y 4 (Regent baja) son los que presentaron menores cantidades de frutos totales por tratamiento sin mostrar diferencias significativas entre sí, pero si presentando diferencias significativas entre los demás tratamientos.

Cuadro 2. Cantidad de frutos por clases comerciales, por unidad experimental, según los tratamientos. CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamientos*	Frutos cosechados**				Frutos Caídos
	Primera	Segunda	Tercera	Total	
Agrol	27 a	42 b	47 a	116 ab	18 a
Regent alta	43 a	50 ab	18 b	111 ab	35 a
Regent baja + <i>Beauveria</i>	47 a	61 a	48 a	156 a	24 a
Agrol + <i>Beauveria</i>	20 a	33 b	26 b	79 b	26 a
<i>Beauveria</i> en agua	50 a	59 a	46 a	155 a	30 a
Regent alta + <i>Beauveria</i>	37 a	45 ab	19 b	101 ab	13 a
Testigo Absoluto	37 a	77 a	32 ab	146 a	30 a
Regent baja	16 a	35 b	21 b	72 b	21 a

\* Tratamientos según cuadro 1 de la metodología.

\*\* Cantidades de frutos con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey.

La calidad de los frutos cosechados y frutos caídos varían entre las distintas parcelas útiles del experimento. Predominan los frutos de segunda calidad en todos los tratamientos, excepto el tratamiento 1 (Agrol) que presentó la mayor cantidad de frutos de tercera calidad, no variando estadísticamente de las demás calidades.

## LABORATORIO

El análisis de varianza demostró un efecto significativo de los tratamientos sobre la mortalidad de adultos del picudo del chile (Cuadro 3, Anexo 3). Los valores observados de mortalidad de adultos del picudo se presenta bajo los mismos tratamientos a aplicados en el campo en la prueba anterior (Anexo 2). La tendencia corresponde a una mayor mortalidad en el menor tiempo en los tratamientos del insecticida a dosis alta solo (0.1 ml. i.a./litro) y en mezcla con *Beauveria bassiana*, en estos el 100% de individuos muertos se alcanzó transcurrido un día después de la inoculación. Mientras que en el tratamiento solo *Beauveria* la mortalidad alcanzó el 97.5% al cabo de siete días, y en el Testigo el 45% de la mortalidad de los adultos se obtuvo a los siete días (Fig. 1).

Como se observa en el cuadro 3, el porcentaje de mortalidad varía de 45 a 100% conforme varían los distintos tratamientos. Aún cuando la mortalidad en el testigo fue de un 47%, no ocurrió de inmediato sino que ocurrió a lo largo del experimento. La prueba de próbitos determina el tiempo letal medio y corresponde al tiempo en días en que ocurre la mortalidad del 50% de la población. Este TL50 para los tratamientos del insecticida Regent en dosis alta solo y en mezcla con *Beauveria bassiana*, no pudo ser determinado estadísticamente debido a la mortalidad total de los individuos desde el primer día; mientras que el tratamiento que solo incluye *B. bassiana* fue de 2.11 días. El tratamiento Agrol con *B. bassiana* mostró un menor TL50 que el testigo, indicando que la mezcla con aceite provoca la mortalidad de los adultos en el menor tiempo, proporcionando una mayor barrera de protección de las estructuras del hongo a la desecación causada por el ambiente.

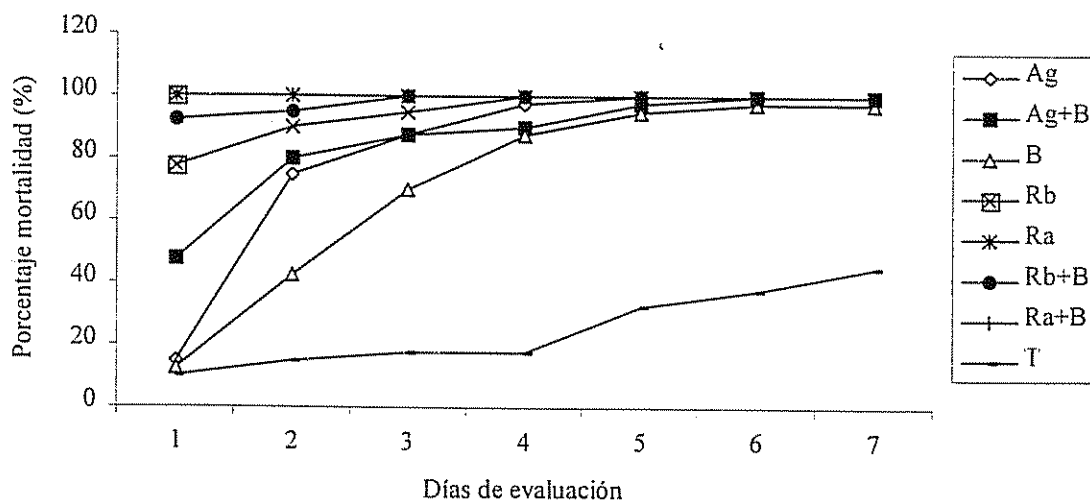


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de adultos de *Anthonomus eugenii*, bajo los tratamientos aplicados. CATIE, Turrialba, 1998.

Junto a la mortalidad de adultos (Cuadro 3), se aprecia que la cantidad de conidios liberados por insecto es mayor en el tratamiento solo *Beauveria*, siendo a su vez 1.1, 2.2 y 3.9 veces mayor que la cantidad de conidios producidos por los tratamientos Agrol+*Beauveria*, insecticida Regent en dosis alta+*Beauveria* y Regent en dosis baja+*Beauveria*, respectivamente.

Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad, tiempo letal medio (días) y número de conidios por cadáveres de adultos de *Anthonomus eugenii* transcurridos siete días bajo distintos tratamientos. CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamientos	% de Mortalidad*	TL 50	No. Conidios por insecto
Agrol	100 a	1.59	0
Agrol+ Bb	100 a	1.18	$7.75 \times 10^6$
<i>Beauveria</i> en agua	97.5 b	2.11	$8.77 \times 10^6$
Rb	100 a	0.56	0
Ra	100 a	**	0
Rb+Bb	100 a	0.27	$2.25 \times 10^6$
Ra+Bb	100 a	**	$4.00 \times 10^6$
Testigo	45 c	7.35	0

\* Porcentajes de mortalidad con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey.

\*\* no determinado estadísticamente.

La mayor mortalidad de adultos de picudo por día corresponde al tratamiento de insecticida Regent en dosis alta (0.1 cc ia/L agua) y en mezcla con *B. bassiana*, los cuales desde el primer día después de la inoculación la mortalidad era del 100%, mientras que el tratamiento de Regent en dosis baja (0.02 cc ia/L agua) presenta un 98.2% de adultos muertos al transcurrir el primer día; estos tres tratamientos no muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí. Por otro lado, los tratamientos Regent en dosis baja, Agrol +B y Agrol, presentan mortalidades de adultos del picudo de 94.6%, 84.3% y 81.8% sin presentar diferencias significativas entre sí. El Testigo+Bb y Testigo Absoluto con mortalidades de 71.8% y 26.1% son los tratamientos con menores mortalidades de picudos durante la experimentación.

## 2.4 DISCUSION GENERAL

El experimento de campo no presentó los resultados esperados debido principalmente al ataque temprano en el cultivo de enfermedades de tipo fungoso y el

ataque de plagas de suelo, influyendo en la disminución de la producción y la cosecha de los frutos, reduciendo así el periodo de aplicación y evaluación de los tratamientos.

El cultivo fue afectado en las etapas iniciales de desarrollo por patógenos del suelo (*Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp.), los cuales afectaron las raíces y la zona basal de los tallos de las plantas. El combate de los patógenos se realizó con aplicaciones de Rovral (Iprodione, 3.75 gr pc/L) a la base del tallo, alternado con Ridomil (Metalaxyl, 1 cc pc/L) y Previcur (Propamocarb, 2.5 cc pc/L). Seis semanas después del transplante se diagnosticó la presencia de plagas de suelo, principalmente *Phyllophaga* sp. (jobotos) en la mayor parte de la parcela experimental, éstas plagas se controlaron con insecticida granulado Lorsban (Chlorpyrifos, 4 gr/planta), alternando con Vydate LS 24% (Oxamyl, 10 cc pc/litro), y Furadan 10G (Carbofuran, 16 gr/planta).

Al estar el cultivo del chile afectado por las condiciones anteriormente citadas, se produce un aumento de la tasa de aborto de flores y botones florales, y por ende si este estrés dura mucho tiempo, la carga final de frutos se reduce, acortando el periodo de cosecha y disminuyendo el rendimiento. Desde la aparición de los primeros síntomas y combate de las enfermedades y plagas, se observó una disminución de la cantidad de frutos por cada unidad experimental, afectando el rendimiento, la aplicación de los tratamientos y los resultados esperados.

En estudios realizados por Segarra y Pantoja (1988b), consideran que las aplicaciones de insecticidas conlleva a una reducción significativa de los adultos del picudo y por ende los daños producidos por el desarrollo de larvas dentro de los frutos, reduciendo las cantidades de frutos abortados y caídos, mejorando la calidad de los mismos. Las cantidades de frutos caídos obtenidas en el experimento, no refleja en su totalidad los daños producidos por el picudo ya que a nivel cualitativo, las observaciones de los frutos caídos en el campo durante el periodo de experimentación fue principalmente debido a daños abióticos como quema de sol, deficiencias de calcio y pudrición del extremo apical y problemas fitopatológicos de tipo bacterial. Estos daños fueron reducidos

en su oportunidad mediante la aplicación de enmiendas como fertilizantes foliares a base de calcio y bactericidas, pero su efecto deletéreo se reflejó en el rendimiento.

El tratamiento Regent dosis baja + *Beauveria* fue el que produjo una mayor cantidad de frutos, pero no variaron significativamente de los tratamientos Regent en dosis alta, y Regent dosis alta + *Beauveria*, pero sí difiere del tratamiento Regent en dosis baja. Esto puede significar que los productos utilizados, mostraran un efecto detrimental sobre la cantidad de adultos presentes en el campo, y en la cual se refleja en las cantidades de frutos por parcela útil de los distintos tratamientos.

La utilización del insecticida Regent para el combate del picudo del chile, ha sido demostrado en varios estudios por Seal y Schuster (1995). Los autores llegaron a la conclusión que los insecticidas imidacloprid, fipronil, oxamil y ciflutrin reducen en forma significativa las cantidades promedio de adultos del picudo a nivel de campo, al igual que las cantidades de larvas presentes en frutos disectados; además la efectividad de estos productos no mostró diferencias entre el número de frutos caídos o en el número de larvas dentro de frutos.

Los tratamientos que combinaron *B. bassiana* con insecticida o aceite, presentaron una escala intermedia respecto al rendimiento, quizás porque la disminución de los adultos capaces de producir daño se produjo gradualmente a lo largo del periodo de experimentación. Estas subdosis del insecticida permite alterar el normal funcionamiento de los hábitos alimenticios del insecto, predisponiendo a la plaga a un ataque secundario del hongo.

Vélez (1996), considera que la formulación de aceite con esporas de *B. bassiana* se torna atractiva para su uso en el campo, ya que reduce la evaporación foliar y asegura la protección del hongo de la radiación solar. Sin embargo, a nivel de campo, la mezcla de Agrol+B no se presentó como uno de los mejores tratamientos en la producción de frutos y se encuentra estadísticamente por debajo de los tratamientos con Agrol e insecticida

Regent solo y en mezcla con *Beauveria*, producto de la disminución del ciclo de cosecha del cultivo por los problemas de plagas y enfermedades citados con anterioridad.

Los productos utilizados en los distintos tratamientos, muestran compatibilidad hacia *Beauveria bassiana*. Los estudios realizados por Storey y Gardner (1986), Vélez (1996), Rivera y Bustillo (1996a, 1996b), Rivera *et al* (1994), Lord *et al* (1997), demuestran la posibilidad de realizar formulaciones de *B. bassiana* en combinación con aceites agrícolas, coadyuvantes e insecticidas. Las formulaciones utilizadas en el experimento no resultaron contraproducentes hacia las estructuras reproductivas de *Beauveria*, las cuales serán discutidas en los capítulos 3 y 4 de este documento.

A nivel de laboratorio, se aplicaron los mismos tratamientos de campo, pero dirigido al control de adultos del picudo del chile. Los resultados presentes en este estudio demuestran la efectividad del insecticida Regent solo o en combinación con el hongo *Beauveria bassiana*, y *B. bassiana* en formulación con el aceite agrícola Agrol. Al ser el insecticida Regent un producto de contacto, la mortalidad de los adultos bajo las condiciones de hacinamiento en los recipientes plásticos, asegura un adecuado contacto del insecticida en la cutícula del insecto. En estos casos la mortalidad fue inmediata debido a la alta dosis del agroquímico utilizada, mientras que en dosis bajas, esta mortalidad fue más lenta posiblemente por el efecto de provocar alteraciones en el sistema nervioso del insecto, como la disminución de la alimentación dentro de las distintas repeticiones.

Los resultados obtenidos al utilizar Regent en dosis altas y en mezcla con *Beauveria bassiana*, son los esperados, ya que el 100% de mortalidad se obtiene desde el mismo día de la inoculación, mientras que los tratamientos de *B. bassiana* + Regent dosis baja, y Regent dosis baja tardan 6.48 horas y 13.44 horas respectivamente, para producir la muerte del 50% de los individuos. Esta dosis baja del insecticida en combinación con *Beauveria* se presenta como una alternativa viable en el control del picudo del chile, ya que predispone al insecto al ataque del hongo, provocando la muerte lenta de los individuos, ya que el hongo debe colonizar al individuo primero y mediante las micotoxinas combinado con el efecto del fipronil altera el comportamiento y después produce la muerte.

El tratamiento Regent en dosis baja no presenta diferencia significativa en los adultos muertos al primer día con respecto al tratamiento que utilizó el aceite agrícola solo y en mezcla con *B. bassiana*, presentando éstos últimos tiempos letales medios de 1.59 y 1.18 días, respectivamente.

La utilización del hongo *B. bassiana* solo y en mezcla con aceites, se presenta como una alternativa para el combate del picudo del chile, disminuyendo los problemas de contaminación que los agroquímicos llevan implícito. A pesar que el tiempo letal medio de este tratamiento es de 2.11 días para provocar la muerte del 50% de individuos, su efectividad va más allá, ya que al utilizar este entomopatógeno, la acción biocida es más tardía debido al efecto de las toxinas producida por este hongo.

En laboratorio, el tratamiento que utilizó solo esporas de Bb en agua aplicados sobre los adultos del picudo, mostraron la mayor cantidad de esporas producidas por insecto, mientras que el tratamiento Regent dosis baja con el hongo fue el que produjo menor cantidad, con  $8.77 \times 10^6$  y  $2.25 \times 10^6$  esporas respectivamente. Los tratamientos de Agrol+Bb y Regent dosis alta + Bb, presentan cantidades intermedias de producción de esporas.

La cantidad de inóculo aplicado y la cantidad de esporas viables presentes en los insectos después de las aplicaciones, determina la capacidad de establecimiento, multiplicación y dispersión de *Beauveria bassiana* en el campo. Este establecimiento facilita a *B. bassiana* la transmisión generacional y un nivel de reducción natural de la plaga, permaneciendo en insectos vivos, en cadáveres, y en el suelo. Según Ignoffo (1992), las esporas de *B. bassiana* expuestas a la luz solar natural y presentes en los tejidos vegetales tienen una vida media entre 48 y 72 horas, parámetros a considerar al realizar los intervalos de las aplicaciones calendarizadas del hongo; y las aplicaciones en horas tempranas del día que facilitan la germinación de *B. bassiana* debido a la microhumedad constante cerca del exoesqueleto del insecto.



## 2.5 CONCLUSIONES

Los tratamientos aplicados en el campo no tuvieron un efecto significativo en el control del picudo debido a la presencia de plagas del suelo (*Phyllophaga* sp.), así como patógenos (*Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp.), los cuales causaron el aborto de flores, botones florales, frutos pequeños, disminución del periodo de cosecha, la producción y el rendimiento del cultivo del chile, reduciendo el periodo de las evaluaciones de daño y rendimiento.

En el laboratorio, el insecticida Regent solo o en combinación con el hongo *Beauveria bassiana*, y de este en formulación con el aceite agrícola Agrol, demostraron tener una alta efectividad de control de adultos del picudo del chile. Los tratamientos con Regent en dosis altas y en mezcla con *B. bassiana*, presentan mortalidades del 100%, mientras que los tratamientos de *B. bassiana* combinado con Regent y Regent dosis baja presentan dosis letales medias de 6.48 horas y 13.44 horas respectivamente.

El uso de dosis baja de insecticida en mezcla con *B. bassiana* se presenta como alternativa para el control del picudo del chile, predisponiendo al insecto al ataque del hongo, provocando además la muerte lenta de los individuos y la permanencia de inóculo infectivo en el ambiente.

El tratamiento solo *Beauveria* aplicado a adultos del picudo del chile, presentó la mayor cantidad de esporas, mientras el tratamiento de Regent en dosis baja con el hongo fue el que produjo la menor cantidad. Esto faculta al hongo a mantener su capacidad infectiva en el campo a nivel generacional y reducir naturalmente la plaga.

## 2.6 LITERATURA CITADA

- Batista, A.; Leite, L. G.; Raga, A.; Sato, M. E. 1995. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolitus sordidus* (Germar) adults. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*. 24(2):405-408.
- Carballo, V. M. 1996. Control microbiano de adultos de picudo del chile *Anthonomus eugenii* mediante el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Proyecto de Investigación MIP-CATIE. 6p. (Inédito).
- Carballo, M.; Rodríguez, L.; Durán, J. 1998b. Uso de *Beauveria bassiana* (Bals) para el control microbiano del picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) en el laboratorio. *In* VII Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas, VII Taller Latinoamericano de Mosca Blanca y Geminivirus, XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología División Caribe APS-CD (1998, Managua, Nicaragua). Memorias. Ed. J. C. Mercado. Managua, Nicaragua. p. 109.
- Coto, D. 1996. El picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano), su reconocimiento y posible manejo (Hoja Técnica). *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 42:1-4.
- Gómez, V. M.; Jiménez, C. M. 1995. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre adultos del picudo del chile (*Anthonomus eugenii*). Presentado en I Taller Nacional de Control Biológico. León, Nicaragua. Proyecto CATIE/INTA-MIP. Avances técnicos. Tomo 4. 95-97 p.
- Ignoffo, C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist* 75(4):516-525.
- Lecuona, R. 1996. Control microbiano, utopía o realidad. *In* Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. por R. E. Lecuona. Argentina. pp. 13-15.
- Lord, J.; Near, C.; Britton, J.; Jaronski, S. 1997. Compatibility of the *Beauveria bassiana* based mycoinsectide Mycotrol with fungicides, conventional insecticides, and spray adjuvants. *In* Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology (30, 1997, Alberta Canadá). Program and Abstracts. p. 44.
- Riley, D.G.; Sparks, A.N. Jr. 1992. The pepper weevil and its management. Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System. L5069. 6p.

- Rivera, A. M.; Bustillo, A. E. 1996a. Revisión del efecto de agroquímicos sobre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, patógenos de la broca del café (Primera entrega). Boletín de la Sociedad Colombiana de Entomología 24(82):5-6.
- Rivera, A. M.; Bustillo, A. E. 1996b. Revisión del efecto de agroquímicos sobre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* patógenos de la broca del café (Última entrega). Boletín de la Sociedad Colombiana de Entomología 25(83):2-16.
- Rivera, M. A.; Bustillo, P. A.; Marín, M. P. 1994. Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Revista Colombiana de Entomología 20(4): 209-214.
- SAS Institute. 1985. SAS User guide: Statistics, Version 5 ed. Cary, NC, SAS Institute Inc. 956p.
- Stansly, P. 1998. Management of pepper pests in Florida. Citrus & Vegetable Magazine (April) 1-4.
- Schuster, D. J ; Seal, D. R. ; Stansly, P. A.; Cruz, C. 1996. Development of biological control techniques for management of the pepper weevil. University of Florida, University of Puerto Rico. 8p.
- Vélez, A. P. 1996. Evaluación de campo de formulaciones en aceite del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Revista Colombiana de Entomología 22(3): 137-142.

## CAPITULO 3

### EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE *Beauveria bassiana*.

#### 3.1 INTRODUCCION

La susceptibilidad de los agentes microbiológicos utilizados junto con los productos químicos, especialmente fertilizantes y plaguicidas se viene documentando desde hace más de treinta años, cuando se observó la inhibición del patógeno *Cephalosporium aphidicola* utilizado en el control microbial del áfido del melón y el algodón *Aphis gossypii*. En condiciones *in vitro* se ha observado la inhibición en el crecimiento del patógeno debido a los fungicidas benomyl y triarimol (Wilding 1972).

Otros estudios mencionan el efecto de los fungicidas benomyl, propiconazol y zineb sobre el crecimiento y la fisiología de *Beauveria bassiana* (Ramarajahe *et al* (1967), Clark *et al* (1982) y Calderón *et al* (1991). La literatura cita la compatibilidad de *Beauveria* con los insecticidas Ambush CE, Dimetoato SC, Phosdrin Ce y Folimat CE, siendo el Diazinon CE, Thiodan CE, Lannate PM como los más dañinos (Filho *et al* 1987).

Olmert y Kenneth (1974) utilizan como criterio de inhibición el crecimiento radial de la colonia, mientras que Clark *et al* (1982), Gardner y Storey (1985), Storey y Gardner (1986), consideran la germinación conidial como un parámetro de compatibilidad. La importancia de medir estas variables radica en la presencia de algún efecto letal sobre el hongo, tal como la inhibición del crecimiento celular o la germinación conidial, la muerte de todo o cierto porcentaje del micelio, la inhibición de ciertas actividades metabólicas normales como la respiración y la inhibición de algún hábito normal de esporulación (Ashida 1965, citado por Rivera 1993); esto no indica que los efectos de los plaguicidas influyan sobre los parámetros del inicio de una epizootia, como es la supervivencia del inóculo (Loría *et al* 1983), sin olvidarse que hay un periodo crítico para la germinación y el

crecimiento de las conidias de *B. bassiana* después de la aspersión, cuando el efecto de los plaguicidas está minimizado (Anderson y Roberts 1983; Batista *et al* 1994; Rivera 1993).

En un estudio realizado por Tedders (1981), observó la inhibición *in vitro* de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, por tres fungicidas utilizados en el cultivo de la peca (*Carya illioensis* (Wangenh.)), para el control del picudo *Curculio caryae* (Horn). Los fungicidas triphenyltin hydroxide (Brestanid), zineb (Dithane) y benomyl (Benlate) inhibieron la germinación de esporas y el crecimiento de *B. bassiana*.

Lappa (1967), indica que la exposición de esporas con carbaryl al 0.5% por dos horas inhibe la germinación, pero sin un efecto adverso sobre la viabilidad.

En pruebas de campo, Clark *et al* (1982), observaron que los plaguicidas muestran la inhibición del patógeno *Beauveria bassiana* de la catarinita de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Say). En la experimentación utilizaron los fungicidas metiram, chlorothalonil y mancozeb, contra el tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans* (Montagne), y los insecticidas azinphos methyl, carbofuran y permethrin contra la catarinita de la papa. Los autores demostraron que mancozeb muestra una completa inhibición de las esporas de *B. bassiana*, mientras que los insecticidas azinphos methyl y carbofuran mostraron una moderada inhibición de la esporas, reduciendo el crecimiento micelial cerca del 50%, entre tanto, la permetrina no inhibió el crecimiento del hongo presentando una curva de respuesta similar al tratamiento control.

Anderson y Roberts (1983), estudiaron la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* en mezcla con los insecticidas endosulfan (Thiodan), esfenvalerato (Asana), permethrin (Ambush), piperonyl butóxido (Prentox), oxamyl (Vydate), carbaryl (Sevin), carbofuran Furadan), azinphos methyl (Guthion) y diflubenzuron (Dimilin). Los resultados muestran que los piretroides esfenvalerato y permethrin inhiben la germinación de esporas de *B. bassiana* en un 96.6 y 92.8%, respectivamente, mientras que los otros productos mostraron inhibir el crecimiento de esporas entre un 4 y 36%. Estos autores reportan que carbaryl al igual que triflumuron, producen un incremento de las cantidades

de unidades formadoras de colonias, y consideran además que los coadyuvantes en polvo mojable y formulaciones floables pueden actuar como suaves abrasivos rompiendo las aglomeraciones de conidios, mientras que los insecticidas formulados como concentrados emulsificables (CE) que utilizan solventes aromáticos a base de xileno, fueron los más inhibitorios para el hongo.

El efecto inhibitorio de la germinación conidial se produce tempranamente en las mezclas debido al tipo de solvente usado en las formulaciones, los cuales presentan propiedades desecantes de la membrana citoplasmática, afectando así la viabilidad de las conidias. Para verificar esta aseveración, Rivera *et al* (1994) utilizaron a nivel de laboratorio los insecticidas endosulfán, clorpirifos, pirimifosmetil, fenitrotion, malation, diazinon y isazofos en mezcla con esporas de *B. bassiana*. Los resultados demostraron que hubo diferencias significativas entre productos, entre ellos el diazinon PM (polvo mojable) inhibió completamente la germinación mientras que diazinon EM (emulsión mojable) no lo hizo y que además el malation inhibió la germinación significativamente. Estos resultados concuerdan con Olmert y Kennteh (1974), y Alves (1986) citado por Rivera (1993).

En Cuba, Calderón *et al* (1991), informan que los fungicidas benomyl (15000 ppm), propiconazol (7500 ppm) y zineb (18758 ppm) mostraron un fuerte efecto depresivo sobre la germinación conidial y formación de biomasa de *B. bassiana* (cepa LBB-1) al cabo de 72 horas y siete días, respectivamente.

Se ha demostrado la inhibición en el crecimiento micelial de *B. bassiana* mediante el coadyuvante en aspersión Tritón CS-7 y los reguladores de crecimiento flurprimidol (Cutless), silane (Silaid), mientras que los coadyuvantes Ortho X-77, Nu-Film y Tween-80, no presentaron la inhibición micelial del hongo (Storey y Gardner 1986).

Rivera y colaboradores (1994), consideran que la mayoría de insecticidas utilizados presentan un efecto fungistático más que fungicida, pues se presenta la germinación y el crecimiento micelial a las 48 horas de evaluación, excepto para diazinon PM, fenitrotion y el malation que presentaron un efecto deletéreo sobre el hongo. Esta fungistasis es

explicable debido a la difusión de la mezcla en el medio nutritivo, disminuyendo así la acción inhibitoria del insecticida.

Clark (1980), evaluó en laboratorio la acción de fungicidas contra *Phytophthora infestans*, el cual puede limitar el desarrollo de epizootias de *B. bassiana* sobre *Leptinotarsa decemlineata*. Utilizando platos petri inoculados con esporas de *B. bassiana* y en mezcla con fungicidas, Clark (1980) observó zonas de inhibición indicando que el entomopatógeno fue inhibido por los fungicidas mancozeb, metiram y clorotalonil, retardando además las tasas de crecimiento micelial.

Machowicz (1983), evaluó el efecto de fungicidas sobre el crecimiento de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. farinosus* y *V. lecanii*, mostrando que sólo mancozeb mostró un efecto tóxico a estos hongos. Machowicz (1985), evaluando los mismos hongos utilizados en 1983, obtiene que los fungicidas sistémicos tales como benomyl, la mezcla de captafol + carbendazim, carbendazim y triadimefon limitan mucho más el crecimiento de los hongos que thiophanato-methyl.

Osborne y Boucias (1985), consideran de igual manera que Rivera y Bustillo (1996a, 1996b), que los fungicidas carbamatos son los más tóxicos para los hongos.

Rivera (1993), evaluó la compatibilidad de *B. bassiana* con los fungicidas cyproconazol (Alto), hexaconazol (Anvil), triadimefon (Bayleton) y oxiclورو (oxiclورو de Cobre), y los insecticidas pirimifos-metil (Actelic), dicrotofos (Bidrin), fenitrothion (Sumithion) y endosulfan (Thiodan). Este autor concluye que la germinación conidial de *B. bassiana* fue inhibida por todos los plaguicidas evaluados en la dosis comercial más alta; los productos oxiclورو de cobre y el dicrotofos inhibieron fuertemente la germinación en la dosis media mientras que el insecticida fenitrothion fue el único que inhibió el crecimiento micelial en las dosis probadas; por otro lado, el endosulfan causó una alta inhibición en el crecimiento del hongo en la dosis más alta. El autor afirma, por estos resultados que los fungicidas ejercen una mayor inhibición que los insecticidas.

Lord *et al* (1997), consideran que el insecticida Thiodan EC, el cual contiene tolueno causa alguna pérdida de viabilidad de las esporas de *B. bassiana* (formulado como Mycotrol), mientras que esta pérdida no sucede en Thiodan WP. Algunos coadyuvantes e insecticidas causan conglomerados de las suspensiones y emulsiones de *B. bassiana*, mientras que los fungicidas clorotalonil, maneb, mancozeb y benomyl fueron muy tóxicos a las esporas cuando las aplicaciones se hicieron cada dos días, y en la cual, los fungicidas cúpricos y sulfurados tienen una toxicidad inmediata cuando se aplicaron a las hojas. El Mycotrol formulado en suspensión es menos afectado por los fungicidas que el polvo mojable.

Todovora (1997) cita que los fungicidas clorotalonil, maneb, tiofanato-metil, mancozeb, metalaxyl-mancozeb y zineb, así como el herbicida glufosinato-amonio inhiben el crecimiento micelial y esporulación de *B. bassiana*.

Rivera y Bustillo (1996b), en una compilación adaptada de Roberts y Campbell (1977), presentan una amplia revisión de los efectos de agroquímicos sobre *B. bassiana* y *M. anisoplie* como patógenos de la broca del café. Los productos benomil, BHC (PM), carbaril, captan, captafol, diazinon (PM), clorotalonil, endosulfan (3EC), diquat, fenitrotion, fenvalerato 2.4 CE, hipoclorito de sodio, malation, mancozeb, maneb, metil paration, metomil, paraquat, procloraz y zineb mostraron una alta o completa inhibición sobre *B. bassiana*. Además los coadyuvantes Triton AE, Tween 80, aceite de parafina, carbofuran 4F, DDT, dinocap, endosulfan 50 PM, metalaxyl, Nu-film 17, Ortho X-77, oxamyl, permetrina, pirimicarb, PCNB, toxapheno, son reportados como productos que no presentan inhibición.

Carballo *et al* (1998a), indican que el crecimiento del hongo *B. bassiana* es inhibido por los fungicidas siendo el antracol, dithane y benlate los más perjudiciales, presentando el hidróxido de cobre un efecto menor, mientras que el agrimicin 100 al igual que los fungicidas daconil y previcur no tuvieron un efecto drástico sobre el hongo.



### 3.1.2 Objetivo general

Evaluar la tolerancia de *Beauveria bassiana* a fungicidas, insecticidas y coadyuvantes de uso común en el cultivo del chile.

### 3.1.3 Objetivos específicos

a) Determinar el efecto de los fungicidas, insecticidas y coadyuvantes usados en el cultivo del chile sobre la germinación de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

b) Determinar el efecto de los fungicidas, insecticidas y coadyuvantes utilizados en el cultivo del chile sobre el crecimiento diametral y la tasa de crecimiento diario de *Beauveria bassiana*.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Efecto de los Fungicidas

#### 3.2.1 Localización del experimento

El trabajo de laboratorio se realizó en los Laboratorios de Diagnóstico y Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE.

#### 3.2.2 Prueba de germinación de *B. bassiana*.

Se realizó una prueba de germinación de conidios de *B. bassiana* (Cepa B-447) en medio de cultivo conteniendo los fungicidas Acrobat, Curzate, Alliette, Kocide, Antracol, Dithane, Benlate, Previcur y Daconil, en tres dosis distintas de 100, 500 y 1000 partes por millón (ppm) (Anexo 4 y 5), a una concentración del hongo de  $1.2 \times 10^5$  conidios/ml. de agua destilada, y el tratamiento testigo (sin producto químico), para un total de 28

tratamientos, con tres repeticiones. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar.

La preparación de los platos se realizó disolviendo 40 gramos del medio papa-dextrosa-agar (PDA) por litro de agua destilada, para luego autoclavar la disolución a 130°C y una presión de 15 bares por 30 minutos. Separadamente se prepararon 100 ml del medio indicado, manteniéndolos a una temperatura de 50°C para agregar el fungicida a evaluar en las concentraciones de 100, 500 y 1000 ppm y 1 ml. de ácido láctico para evitar el desarrollo bacterial, procediendo de inmediato a depositarlo en los platos petri. Se distribuyó 200 µl de la solución de *B. bassiana* sobre cada uno de los medios solidificados. Las repeticiones se almacenaron en incubadora a temperatura controlada de 26°C. Se midió el porcentaje de germinación de 100 esporas a las 16 y 24 horas después de la inoculación.

### 3.2.3 Ensayo de susceptibilidad de *B. bassiana* a fungicidas.

Se determinó la susceptibilidad del hongo entomopatógeno *B. bassiana* a nueve productos fungicidas: Acrobat, Curzate, Alliette, Kocide, Antracol, Dithane, Benlate, Previcur y Daconil, en tres dosis (100, 500 y 1000 ppm). A su vez se utilizó la cepa B-447 de *B. bassiana*, a una concentración de  $1.2 \times 10^7$  conidios/ml de agua destilada, y el tratamiento testigo (sin fungicida), para un total de 28 tratamientos, con cuatro repeticiones. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar.

Los platos petri se prepararon en igual forma que el ensayo anterior. Previamente se sumergieron por 15 minutos, círculos de papel filtro (esterilizados) de diámetro conocido (0.6 mm) en una solución de agua esterilizada con esporas del hongo a una concentración de  $1.2 \times 10^7$  conidios/ml. Una vez solidificado el medio se colocó en cada una de las repeticiones un círculo de papel filtro. Las cajas petri con los medios de cultivo se sellaron con "parafilm M" (American National Can), con el fin de minimizar la desecación durante el periodo de incubación (15 días). Estos se almacenaron en incubadora a temperatura controlada de 26°C.

La susceptibilidad de *B. bassiana* se evaluó mediante el crecimiento diametral del hongo en cada uno de los fungicidas en estudio. La medición del crecimiento del hongo (centímetros/día, cm/d) se realizó diariamente utilizando una regla graduada en milímetros, durante quince días, iniciando un día después de colocado el hongo sobre cada tratamiento.

Los datos fueron analizados utilizando la medición diamétrica máxima y la tasa de crecimiento diario<sup>@</sup> (cm/d) por cada fungicida al finalizar los 15 días experimentales, aplicando un análisis de varianza del crecimiento diametral diario y total, con un nivel de significancia del 95%, pruebas de Tukey ( $p < 0.05$ ), y curvas de regresión (Anexo 14).

#### **3.2.4 Efecto de los fungicidas sobre la esporulación**

Después de finalizada la fase de crecimiento del hongo en incubadora, se procedió a realizar el conteo de esporas de los tratamientos que mostraron un crecimiento y esporulación visible del hongo. Para ello se mezcló el medio de agar con 50 cc de agua, y mediante el ultrasonificador se separaron las conidios y se colocaron 10  $\mu$ l de la solución en el hemacitómetro para luego realizar el conteo de las esporas presentes en el campo óptico.

### **B. Efecto de los Insecticidas y Coadyuvantes.**

#### **3.2.5 Localización del experimento**

El trabajo de laboratorio se realizó en los Laboratorios de Diagnóstico y Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE.

#### **3.2.6 Prueba de germinación de *B. bassiana*.**

Se evaluó la susceptibilidad del hongo a los insecticidas Tamarón, Malatión, Decis, Ambush, Cymbush, Sevin, Vydate, Regent, Confidor, Thiodan, Karate y los coadyuvantes

---

<sup>@</sup> Tasa de Crecimiento Diario: (Diámetro Final - Diámetro Inicial) / Número de Días.

Nufilm , WK , NP7, Agrol y Citowett, en tres dosis distintas (100, 500 y 1000 ppm) (Anrexo 4 y 5). A su vez se utilizó la cepa B-447 de *B. bassiana*, a una concentración de  $1.2 \times 10^5$  conidios/ml de agua destilada, y el tratamiento testigo (sin producto químico), para un total de 49 tratamientos, con tres repeticiones. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar.

Se prepararon platos petri con solución nutritiva de papa-dextrosa-agar (PDA), como se midió en el ensayo de fungicidas. Se distribuyó 200  $\mu$ l de la solución del hongo sobre cada uno de los platos con medio solidificado. Luego se almacenaron en incubadora a temperatura controlada de 26°C. Se midió el porcentaje de germinación de 100 esporas a las 16 y 24 horas después de la inoculación.

### **3.2.7 Ensayo de susceptibilidad de *B. bassiana* a insecticidas y coadyuvantes.**

Se determinó la susceptibilidad del hongo entomopatógeno *B. bassiana* a los insecticidas y coadyuvantes usados en la prueba anterior.

Los platos petri se prepararon de igual forma que el ensayo anterior. Previamente se sumergieron por 15 minutos, círculos de papel filtro (esterilizados) de diámetro conocido (0.5 mm) en una solución de agua esterilizada con esporas del hongo a una concentración de  $1.2 \times 10^7$  conidios/ml. Una vez solidificado el medio se procedió a colocar en cada una de las repeticiones un círculo de papel filtro. Las cajas petri con los medios de cultivo se sellaron con "parafilm M" (American National Can), con el fin de minimizar la desecación durante el periodo de incubación (15 días). Estos se almacenaron en incubadora a temperatura controlada de 26°C.

La susceptibilidad de *B. bassiana* se evaluó mediante el crecimiento diametral del hongo (cm/d) en cada uno de los insecticidas y coadyuvantes en estudio. La medición del crecimiento del hongo se realizó diariamente utilizando una regla graduada en milímetros, durante quince días, iniciando un día después de colocado el hongo sobre cada tratamiento.

Los datos fueron analizados utilizando la medición diamétrica máxima y la tasa de crecimiento diario (cm/d) alcanzado por cada insecticida y coadyuvante al finalizar los 15 días experimentales, aplicando un análisis de varianza del crecimiento diametral diario y total, con un nivel de significancia del 95%, pruebas de Tukey ( $p < 0.05$ ) (SAS Institute 1985) y curvas de regresión (Anexos 15 y 16).

Con el fin de facilitar el análisis y la interpretación de los datos, el análisis estadístico se realizó separadamente para insecticidas y coadyuvantes, manteniendo el mismo tratamiento testigo en ambas pruebas.

### **3.2.8 Efecto de los insecticidas y coadyuvantes sobre la esporulación**

Después de finalizada la fase de crecimiento del hongo en incubadora, se procedió a realizar el conteo de esporas de los tratamientos que mostraron un crecimiento y esporulación visible del hongo. Para ello se mezcló el medio de agar con 50 cc de agua, y mediante el ultrasonificador se separaron los conidios y se colocaron 10  $\mu$ l de la solución en el hemacitómetro para luego realizar el conteo de las esporas presentes en el campo óptico.

## **3.3 RESULTADOS**

### **A. EFECTO DE LOS FUNGICIDAS**

#### **Prueba de germinación de *B. bassiana***

El análisis de varianza mostró un efecto de los fungicidas a diferentes concentraciones sobre el porcentaje de germinación (Anexo7). Las esporas de *B. bassiana* reaccionan diferente al tipo de agroquímico en cual se encuentre en contacto. En el Cuadro 4 se aprecian las diferencias en cuanto a la germinación de esporas a las 16 y 24 horas de realizada la inoculación con los fungicidas. Productos como Alliette, Previcur y Kocide

mostraron una alta germinación de esporas, tanto a 16 como a las 24 horas, para las tres concentraciones evaluadas. El fungicida Benlate a 100 ppm no inhibe la germinación en ninguna de los dos periodos de evaluación, pero si es capaz de inhibirla a 500 y 1000 ppm.

Cuadro 4. Porcentajes de germinación de esporas de *Beauveria bassiana*, bajo nueve fungicidas a tres diferentes concentraciones y un testigo (promedio de tres repeticiones). CATIE, Turrialba, 1998.

Fungicida	Germinación de esporas (%)						Porcentaje Germinación
	16 horas			24 horas			
	Concentración (ppm)			Concentración (ppm)			
100	500	1000	100	500	1000		
Aliette	94.7	96	75.7	96.3	97	87.7	91.22 c
Previcur	95.3	91	89	97.3	97	95	94.11 b
Kocide	98.3	96	94.3	96	99.7	97.7	97.00 a
Benlate	98.7	0	0	97.3	0	0	32.67 d
Antracol	0	0	0	0	0	0	0.00 e
Daconil	0	0	0	0	0	0	0.00 e
Acrobat	0	0	0	0	0	0	0.00 e
Dithane	0	0	0	0	0	0	0.00 e
Curzate	0	0	0	0	0	0	0.00 e
Testigo	96	94.7	95.7	98	98.7	97.3	96.83 a

\*Porcentajes de germinación con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey.

### Ensayo de susceptibilidad de *B. bassiana* a los fungicidas

Como prueba consecutiva a la anterior, se evaluó la susceptibilidad de *B. bassiana* a los fungicidas de mayor uso en el cultivo del chile dulce. Esta prueba evaluó el crecimiento diametral de Bb sobre medios de cultivo que contenían fungicidas en tres concentraciones. El crecimiento del hongo a través del tiempo se muestra en las figuras 2, 3 y 4.

Se observa que tres de los fungicidas Aliette, Previcur y Kocide no inhiben el crecimiento de Bb a las concentraciones de estudio. Los demás productos provocaron una completa inhibición del hongo a lo largo del periodo de experimentación.

El cuadro 5 muestra el efecto de los fungicidas sobre Bb expresado como el crecimiento diametral, así como la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para cada una de las tres concentraciones de los fungicidas utilizados. Los fungicidas que no presentaron inhibición del crecimiento diametral de Bb, difieren estadísticamente entre sí, ya que muestran diferencias de crecimiento entre los productos evaluados. Previcur presenta el mayor crecimiento diametral de los fungicidas evaluados en 100, 500 y 1000 ppm, variando significativamente de los demás productos de estudio, pero no de Kocide en 1000 ppm.

El Anexo 7 presenta el análisis de varianza del efecto de los fungicidas sobre el crecimiento diametral de Bb. Se muestra que existe diferencias significativas (95%) entre las distintas repeticiones así como en las concentraciones y los fungicidas de estudio, y las interacciones medición por concentración y medición por fungicida.

La tasa de crecimiento de *B. bassiana* sobre los distintas fungicidas se presenta en el cuadro 6. No existen diferencias sobre la tasa de crecimiento entre los fungicidas Previcur, Kocide y el Testigo, mientras que si existen diferencias significativas entre los demás fungicidas. El fungicida Previcur presenta la mayor tasa de crecimiento, siendo 0.65 veces mayor que el tratamiento testigo.

Cuadro 5. Promedio del crecimiento diametral de *B. bassiana* en presencia de nueve fungicidas y un testigo. CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamiento	Crecimiento diametral (cm/d)*		
	Concentración (ppm)		
	100	500	1000
Previcur	3.65 a	3.31 a	2.90 a
Aliette	2.85 b	2.16 c	1.50 c
Testigo	2.27 c	2.27 c	2.27 b
Kocide	1.86 d	2.70 b	2.93 a
Dithane	0.60 e	0.60 d	0.60 d
Benlate	0.60 e	0.60 d	0.60 d
Daconil	0.60 e	0.60 d	0.60 d
Acrobat	0.60 e	0.60 d	0.60 d
Antracol	0.60 e	0.60 d	0.60 d
Curzate	0.60 e	0.60 d	0.60 d

\* Crecimiento diametral con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey.

Cuadro 6. Efecto de nueve fungicidas y un testigo sobre la tasa de crecimiento diario de *B. bassiana* en medio de cultivo. CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamiento	Tasa de Crecimiento Diario (cm/d)*		
	Concentración (ppm)		
	100	500	1000
Previcur	0.3244 a	0.2942 a	0.2577 a
Aliette	0.1749 b	0.1326 c	0.0921 c
Testigo	0.1341 c	0.1341 c	0.1341 b
Kocide	0.0995 d	0.1444 b	0.1567 b
Dithane	0.00 e	0.00 d	0.00 d
Benlate	0.00 e	0.00 d	0.00 d
Daconil	0.00 e	0.00 d	0.00 d
Acrobat	0.00 e	0.00 d	0.00 d
Antracol	0.00 e	0.00 d	0.00 d
Curzate	0.00 e	0.00 d	0.00 d

\* Tasas de crecimiento diario con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey.

El Anexo 8 presenta el análisis de varianza del efecto de los fungicidas sobre la tasa de crecimiento diario de Bb. Se muestra que existe diferencias significativas (95%) entre las distintas repeticiones así como en las concentraciones y los fungicidas de estudio, y las interacciones medición\*concentración\*fungicida y medición por fungicida, mientras que no existen diferencias estadísticamente significativas en la interacción concentración por medición.

### Efecto de los fungicidas sobre la esporulación

Los tratamientos que mostraron un crecimiento visible de *B. bassiana*, sin provocar una inhibición significativa del hongo y a su vez esporularon después del periodo de evaluación fueron los fungicidas Aliette, Previcur y Kocide. Las cantidades de esporas producidas en cada tratamiento por centímetro cuadrado de medio nutritivo, tomando como base el área de los platos petri (17.8 centímetros de diámetro) se anotan en el cuadro 7. El tratamiento Previcur (500 ppm) muestra las mayores cantidades de esporas producidas entre los fungicidas, mientras que el fungicida Aliette (1000 ppm) produjeron la menor cantidad. La cantidad de esporas del tratamiento testigo fue mayor que la producida por los distintos fungicidas.



Cuadro 7. Número de esporas de *B. bassiana* presente en los tratamientos de fungicidas. CATIE, Turrialba, 1998.

Fungicida	Número de Esporas* Concentración (ppm)			
	0	100	500	1000
Previcur	-	$8.86 \times 10^6$	$8.94 \times 10^6$	$6.51 \times 10^6$
Alliette	-	$4.91 \times 10^6$	$3.85 \times 10^6$	$1.11 \times 10^6$
Kocide	-	$8.21 \times 10^6$	$6.94 \times 10^6$	$4.26 \times 10^6$
Testigo	$9.06 \times 10^6$	-	-	-

\*Número de esporas por  $\text{cm}^2$  (Área del plato petri =  $248.8 \text{ cm}^2$ ).

## EFFECTO DE LOS INSECTICIDAS Y COADYUVANTES

### Prueba de germinación de *B. bassiana*

Hubo un efecto significativo de los tratamientos sobre la germinación de *Beauveria bassiana* (Anexo 9), donde se observa que las esporas del hongo reaccionan diferente al tipo de insecticida y coadyuvante en el cual se encuentre en contacto. En el Cuadro 8 se aprecian los porcentajes de germinación de esporas de Bb sobre distintos insecticidas y coadyuvantes.

Los productos Decis, Cymbush y Karate muestran inhibición en un 100% de la germinación a las 16 y 24 horas de la inoculación en las concentraciones de estudio, mientras que los productos Tamarón, Ambush, Vydate, Regent, Confidor presentan germinaciones entre 75.7 y 87 para las concentraciones de 100 ppm. Los insecticidas Sevin y Thiodan presentaron germinación entre 26.3, y 63.3 respectivamente únicamente para las concentraciones de 100 ppm, mientras que los insecticidas Malatión y Vydate presentaron germinación en 100 y 500 ppm.

Cuadro 8. Porcentajes de germinación de esporas de *B. bassiana*, bajo once insecticidas a tres concentraciones y un testigo (promedio de tres repeticiones). CATIE, Turrialba, 1998.

Insecticida	Germinación de esporas (%)						Porcentaje Germinación*
	16 horas			24 horas			
	Concentración (ppm)			Concentración (ppm)			
	100	500	1000	100	500	1000	
Tamarón	84.7	83	7	85.7	86.7	30	62.83 c
Malatión	39.3	2	0	72	1	0	19.05 g
Decis	0	0	0	0	0	0	0.00 h
Ambush	87	88.7	65.3	90.3	92.3	74.7	83.05 b
Cymbush	0	0	0	1.3	0	0	0.22 h
Sevin	26.3	0	0	83	0	0	18.22 g
Vydate	75.7	5.3	0	91.3	26.3	1	33.28 d
Regent	75	0	0	78.3	0	0	25.56 e
Confidor	92.3	91	88	95	94.7	93.7	92.44 a
Thiodan	63.3	0	0	69.7	0	0	22.17 f
Karate	0	0	0	0	0	0	0.00 h
Testigo	81.7	87.7	92.7	88.3	95	97.7	90.50 a

\* Porcentajes de germinación con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey.

Por otra parte, los coadyuvantes no inhibieron en forma significativa la germinación de *B. bassiana* (Cuadro 9), ya que existen porcentajes entre 70-80% de germinación a las 16 horas aumentando a 76.3-92% a las 24 horas en concentraciones de 100 ppm. El coadyuvante Agrol no difiere estadísticamente del testigo en la germinación, mientras que los otros productos si son significativamente diferentes respecto al testigo.

Los ensayos anteriores demuestran que el uso de distintas familias químicas de insecticidas afectan en forma considerable la germinación de esporas de Bb, mientras que los coadyuvantes lo hacen en menor grado.

Cuadro 9. Porcentajes de germinación de esporas de *B. bassiana*, bajo cinco coadyuvantes a tres diferentes concentraciones y un testigo (promedio de tres repeticiones). Turrialba, 1998.

Coadyuvante	Germinación de esporas (%)						Porcentaje Germinación*
	16 horas			24 horas			
	Concentración (ppm)			Concentración (ppm)			
	100	500	1000	100	500	1000	
Nu-film	78	88.7	88.3	83.3	91.7	93.3	87.22 b
WK	88	76	77	88.7	80	82.3	82.11 c
NP 7	70	76.3	81.7	83.3	85.7	82.3	79.89 d
Agrol	84.7	89	85.7	92	93.7	91.3	89.39 ab
Citowett	70.3	72.7	77.7	76.3	80	89.3	77.72 d
Testigo	81.7	87.7	92.7	88.3	95	97.7	90.50 a

\* Porcentajes de germinación con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey.

### Ensayo de susceptibilidad de *B. bassiana* a insecticidas y coadyuvantes.

Similar a la prueba de germinación, la prueba de crecimiento diametral presenta diferencias significativas en la susceptibilidad de Bb a los insecticidas y coadyuvantes (Anexo 10). El crecimiento del hongo a través del tiempo en la prueba de coadyuvantes se presenta en las figuras 5, 6 y 7; así como la prueba de insecticidas en las figuras 8, 9 y 10.

Los distintos insecticidas utilizados presentan diferencias en el crecimiento diametral, máxime que los insecticidas Decis, y Karate en concentraciones de 100, 500 y 1000 ppm, inhibieron el crecimiento del hongo en los medios de cultivo, mientras que el insecticida Ambush presentó la inhibición en concentraciones de 1000 ppm, y Thiodan en 500 y 1000 ppm. Los demás insecticidas utilizados no mostraron inhibir el crecimiento del hongo en ninguna de las tres concentraciones (Cuadro 10). El insecticida Confidor no difiere significativamente del Testigo referente al crecimiento diametral, mientras que si difieren del resto de los insecticidas utilizados.

Todos los coadyuvantes presentaron crecimientos entre 1.29 (NP 7) y 1.68 (Agrol) cm. por debajo del testigo, el cual presentó 1.92 cm al final del periodo de evaluación.

En concentraciones de 100 ppm (Cuadro 10) todos los productos difieren significativamente con el testigo, mientras que Tamarón y Agrol no difieren entre sí, a su vez Tamarón no presenta diferencias en el crecimiento que los productos Vydate y Cymbush. Los coadyuvantes WK, Citowett y NP 7 no se diferencian entre sí, pero si respecto al Nufilm.

Cuadro 10. Efecto de diferentes insecticidas y coadyuvantes a tres concentraciones y un testigo sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* en medio de cultivo. CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamiento	Crecimiento diametral (cm/d)*		
	Concentración (ppm)		
	100	500	1000
Testigo	1.92 a	1.92 a	1.92 b
Confidor	1.77 b	1.93 a	2.05 a
Agrol	1.68 c	1.53 c	1.51 d
Tamarón	1.65 cd	1.65 b	1.60 c
Vydate	1.62 de	1.41 d	1.27 g
Cymbush	1.61 de	1.20 f	0.60 j
Ambush	1.60 e	0.99 h	0.50 k
Malatión	1.58 e	1.00 h	0.50 k
Regent	1.52 f	1.19 f	1.28 g
Sevin	1.51 f	1.40 d	1.37 f
Nufilm	1.49 f	1.38 d	1.44 e
WK	1.32 g	1.22 f	1.18 i
Citowett	1.31 g	1.15 g	1.22 h
NP 7	1.29 g	1.29 e	1.29 g
Thiodan	1.10h	0.50 i	0.50 k
Decis	0.50 i	0.50 i	0.50 k
Karate	0.50 i	0.50 i	0.50 k

\* Crecimiento diametral con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey

En 500 ppm (Cuadro 10), el Testigo no difiere estadísticamente del insecticida Confidor, pero sí de todos los demás productos utilizados, además el coadyuvante Agrol y el insecticida Tamarón difieren entre sí. Todos los coadyuvantes a concentraciones de 500 ppm difieren entre sí.

Cuadro 11. Efecto de insecticidas, coadyuvantes y un testigo sobre la tasa de crecimiento diario de *B. bassiana* en medio de cultivo. CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamiento	Crecimiento diametral (cm/d)		
	Concentración (ppm)		
	100	500	1000
Testigo	0.1263 a	0.1249 a	0.1263 b
Confidor	0.1146 b	0.1263 a	0.1327 a
Agrol	0.0717 c	0.0653 c	0.0645 d
Tamarón	0.0743 cd	0.0743 b	0.0721 c
Vydate	0.0567 de	0.0493 e	0.0444 f
Cymbush	0.0494 de	0.0368 f	0.0184 j
Ambush	0.0404 e	0.0250 h	0.0126 h
Malatión	0.0407 e	0.0258 h	0.0129 h
Regent	0.0573 f	0.0449 e	0.0483 e
Sevin	0.0655 f	0.0608 d	0.0595 d
Nufilm	0.0575 f	0.0533 d	0.0556 e
WK	0.0405 g	0.0375 f	0.0362 g
Citowett	0.0381 g	0.0335 g	0.0355 g
NP 7	0.0416 g	0.0416 e	0.0416 f
Thiodan	0.0118 h	0.0054 h	0.0054 i
Decis	0.0000 i	0.0000 i	0.0000 j
Karate	0.0000 i	0.0000 i	0.0000 j

\* Tasas de crecimiento con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), según Tukey

A concentraciones de 1000 ppm, el Confidor mostró un mayor crecimiento diametral de *B. bassiana* siendo estadísticamente diferente a los insecticidas y coadyuvantes usados (Cuadro 10). Los insecticidas Decis, y Karate en las tres concentraciones no difieren entre sí máxime que inhibieron en su totalidad el crecimiento de esporas de *B. bassiana*.

El cuadro 11 presenta el efecto de los insecticidas y coadyuvantes sobre la tasa de crecimiento de *B. bassiana*. No existen diferencias sobre la tasa de crecimiento diario entre el tratamiento Testigo y el insecticida Confidor, mientras que esta tasa de crecimiento es significativamente diferente respecto a los demás insecticidas.

El Anexo 12 presenta el análisis de varianza del efecto de los fungicidas sobre la tasa de crecimiento diario de Bb. Se muestra que existe diferencias significativas (95%) entre las distintas repeticiones así como en las concentraciones e insecticidas en estudio, y las interacciones medición\*concentración, medición\*concentración\*insecticida y medición\*insecticida.

Existen diferencias significativas entre el tratamiento Testigo y los coadyuvantes sobre la tasa de crecimiento, en tanto que no existe diferencias entre Agrol y Nufilm, y NP7, WK y Citowett.

El análisis de varianza (Anexo 13), presenta las diferencias significativas para las repeticiones, coadyuvantes, concentraciones y mediciones, mientras que no existen diferencias estadísticamente significativas para la interacción coadyuvante por concentración por medición.

A pesar que algunos insecticidas y los coadyuvantes no inhiben la germinación de esporas de Bb ni tampoco el crecimiento del hongo, es importante tomar en cuenta que las concentraciones utilizadas pueden ser deletéreas hacia la viabilidad, presentando estos productos un efecto fungistático más que fungicida, debido principalmente a la difusión del producto químico en el medio nutritivo, disminuyendo así la acción inhibitoria del agroquímico.

### **Efecto de los insecticidas y coadyuvantes sobre la esporulación**

Los insecticidas que no afectaron el crecimiento de *B. bassiana*, y tampoco la esporulación después del periodo de evaluación en las tres concentraciones de estudio fueron Tamarón, Malatión, Sevin, Vydate, Regent, Confidor y Cymbush; presentando el

insecticida Thiodan esporulación en concentración de 100 ppm y Ambush en 100 y 500 ppm. Todos los coadyuvantes evaluados, presentaron esporulación (Cuadro 12). De los insecticidas que mostraron esporulación sobre los platos petri, el Ambush (500 ppm) muestra la mayor cantidad de esporas producidas entre los insecticidas con  $4.75 \times 10^7$  esporas, mientras que el insecticida Vydate (500 ppm) produjo la menor cantidad con  $1.72 \times 10^6$  esporas.

Cuadro 12. Número de esporas de *B. bassiana* presentes en los tratamientos de insecticidas y coadyuvantes. CATIE, Turrialba, 1998.

Agroquímico	Número de esporas*		
	Concentración (ppm)		
	100	500	1000
Tamarón	$2.35 \times 10^6$	$9.82 \times 10^6$	$9.93 \times 10^6$
Malatión	$1.58 \times 10^7$	$6.89 \times 10^6$	$7.14 \times 10^6$
Decis	0	0	0
Ambush	$1.31 \times 10^7$	$4.75 \times 10^7$	0
Karate	0	0	0
Sevin	$3.47 \times 10^6$	$2.66 \times 10^6$	$2.86 \times 10^6$
Vydate	$6.80 \times 10^6$	$1.72 \times 10^6$	$4.30 \times 10^6$
Regent	$7.89 \times 10^6$	$7.83 \times 10^6$	$1.52 \times 10^7$
Confidor	$2.14 \times 10^7$	$7.27 \times 10^6$	$8.61 \times 10^6$
Thiodan	$3.79 \times 10^6$	0	0
Cymbush	$3.45 \times 10^6$	$5.53 \times 10^6$	$2.96 \times 10^6$
Nufilm	$7.5 \times 10^6$	$2.77 \times 10^7$	$1.38 \times 10^7$
WK	$5.30 \times 10^6$	$5.00 \times 10^6$	$2.09 \times 10^6$
NP 7	$5.10 \times 10^6$	$6.46 \times 10^6$	$2.27 \times 10^7$
Agrol	$4.53 \times 10^6$	$1.59 \times 10^7$	$1.06 \times 10^8$
Citowet	$8.12 \times 10^6$	$6.49 \times 10^6$	$4.56 \times 10^6$
Testigo	$1.05 \times 10^7$		

\*Número de esporas por  $\text{cm}^2$  (Área del plato petri =  $248.8 \text{ cm}^2$ ).

Los coadyuvantes Agrol y NP7 en concentraciones de 1000 ppm, mostraron tener la mayor y menor cantidad de esporas producidas, con  $1.06 \times 10^8$  y  $2.27 \times 10^6$ , respectivamente.

Bajo esta prueba, la producción de esporas de los testigos no fue mayor que la producida por los distintos insecticidas y coadyuvantes, siendo menor que los insecticidas Ambush (100 ppm y 500 ppm), Malatión (100 ppm), y Confidor (100 ppm); y los coadyuvantes Nufilm (500 ppm y 1000 ppm) y Np 7 (1000 ppm).

### 3.4 DISCUSION

Existe reportado en la literatura el efecto de distintos fungicidas sobre el desarrollo del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Los resultados aquí obtenidos concuerdan con los reportes realizados por Wilding (1972), Calderón *et al* (1991) y más recientemente por Carballo *et al* (1998a).

El primer parámetro de estudio en esta investigación, la germinación de esporas de Bb demuestra que aún a 24 horas de realizada la inoculación, el desarrollo normal de las esporas fue afectado en distinto grado por los fungicidas. Incluso, la germinación fue evidente en los fungicidas Aliette, Previcur, Kocide y Benlate (100 ppm), tanto a las 16 como a las 24 horas de inoculación de *B. bassiana* sobre el medio, indicando un alto grado de tolerancia pero únicamente el Benlate inhibe completamente la germinación y por ende el crecimiento y desarrollo normal de las esporas del hongo, situación que se comprobó a nivel de microscopio en la cual se observaron crecimientos anormales de las esporas germinadas y el micelio del hongo, siendo estos micelios de menor tamaño que en los demás fungicidas, e incluso del testigo.

Relacionado con el crecimiento diametral, los fungicidas con mayor efecto letal fueron los fungicidas Benlate, Curzate, Acrobat, Antracol y Dithane; mientras que los productos Aliette, Previcur y Kocide no mostraron inhibir el crecimiento diametral del



hongo por lo que pueden considerarse tolerantes. Estos últimos fungicidas presentaron un crecimiento muy similar al testigo, e incluso el Previcur y el Kocide presentaron crecimientos significativamente diferentes al Testigo.

En concentraciones de 100 ppm el fungicida Previcur presentó el mayor crecimiento diametral en comparación con los otros fungicidas, pero este crecimiento decreció en concentraciones de 500 y 1000 ppm. Este comportamiento fue descrito por Partridge y Rich (1962), y en la cual asumen que durante exposiciones continuas a fungicidas, los hongos pueden presentar algún nivel de tolerancia a concentraciones incrementales de fungicidas, o pueden presentar adaptaciones graduales de las tasas de crecimiento y esporulación. Esto implica que la tolerancia resulta probablemente de cambios semipermanentes en las capacidades enzimáticas o asimilativas de los organismos.

Los resultados aquí analizados permiten tomar decisiones de campo en cuanto a la compatibilidad de los fungicidas sobre los hongos entomopatógenos. Permiten decidir sobre el tipo de formulación o mezcla más adecuada orientada al manejo de plagas agrícolas, integrando los diferentes métodos de control existentes como alternativa racional para disminuir el impacto del uso excesivo de insecticidas en el ambiente.

El insecticida organofosforado Malation y los piretroides (Decis, Ambush y Cymbush) son letales en ciertas concentraciones a la germinación y desarrollo normal de esporas de *B. bassiana*. En forma similar, Rivera *et al* (1994), consideran que los insecticidas formulados como concentrados emulsificables (Thiodan) que usan solventes aromáticos a base de xileno son los más inhibitorios, mientras que el organofosforado Tamarón, presentado en formulación concentrado soluble (SL) no inhibe el crecimiento *Beauveria*. Estos solventes de las formulaciones actúan como desecantes de la membrana citoplasmática afectando la viabilidad de las esporas. Además los productos en formulación polvo mojable (Karate) en forma similar a los resultados obtenidos por Olmert y Kenneth (1974), y Alves (1986) citado por Rivera *et al* (1994) demuestran la inhibición completa de la germinación y por ende del crecimiento diametral. Lord *et al* (1997),

considera que el Thiodan (EC), el cual contiene tolueno en la formulación causa alguna pérdida de viabilidad de las esporas de *B. bassiana*.

La utilización de un insecticida en el control de plagas depende principalmente de su efectividad y compatibilidad con otros plaguicidas. La importancia radica en el hecho que algún compuesto presente en los agroquímicos puede inhibir o alterar el correcto funcionamiento de los productos en combinación. La mezcla de agroquímicos con hongos entomopatógenos se viene documentando desde hace treinta años, en la cual se ha demostrado por pruebas de laboratorio y/o campo este comportamiento. Los insecticidas piretroides (permetrin y esfenvalerato), así como los reguladores de crecimiento y coadyuvantes Flurprimidol, Silane y tritón CS-7, inhiben significativamente el crecimiento micelial de *B. bassiana* (Storey y Gardner 1986).

Los resultados obtenidos en esta prueba, corrobora en cierta manera el comportamiento de los insecticidas y coadyuvantes sobre la germinación y crecimiento diametral del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. De los insecticidas piretroides usados, solamente el Decis en las tres concentraciones de estudio inhiben el crecimiento de Bb, mientras que el Ambush produce una inhibición en 1000 ppm. Esta inhibición es debida principalmente al solvente utilizado en las distintas formulaciones de los insecticidas, el cual se presenta en los insecticidas con presentación de concentrado emulsificable y los polvos mojables, siendo letales hacia la germinación y desarrollo normal de las esporas de *B. bassiana*. Este comportamiento inhibitorio de los solventes de las formulaciones, es debido a las propiedades desecantes sobre la membrana citoplasmática que afectan la viabilidad y el crecimiento de las esporas.

### 3.5 CONCLUSIONES

Se demostró la inhibición y el crecimiento de *B. bassiana* por el efecto de fungicidas, insecticidas y coadyuvantes.

La germinación y el crecimiento de *B. bassiana* fue inhibida a causa de los fungicidas Benlate, Curzate, Acrobat, Daconil, Antracol y Dithane, y los insecticidas Karate, Decis y Cymbush. Los productos Aliette, Previcur y Kocide, así como los insecticidas Tamarón, Ambush, Confidor, Sevin, Vydate, Regent, Confidor y Thiodan, y los coadyuvantes Citowett, Nufilm, NP-7, Agrol y WK, no afectaron en forma significativa la germinación y el crecimiento de *B. bassiana*.

Los resultados obtenidos permiten tomar decisiones de aplicación en el campo de la compatibilidad de los agroquímicos sobre los hongos entomopatógenos. Permiten además decidir sobre la formulación o mezcla más adecuada en el combate de plagas agrícolas.

Estas formulaciones proporcionan la integración de diferentes métodos de manejo como alternativa racional para disminuir el impacto del excesivo uso de plaguicidas en el ambiente.

Los agroquímicos formulados como concentrados emulsificables que usan solventes aromáticos a base de xileno, y los polvos mojables son más deletéreos a *Beauveria bassiana*, que los concentrados solubles, produciendo un desecamiento de las membranas citoplasmáticas de los hongos.

La utilización de hongos entomopatógenos en el manejo de plagas depende de su efectividad y compatibilidad con otros plaguicidas.

### 3.6 LITERATURA CITADA

- Anderson, T. E.; Roberts, D. W. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology* 76 (6):1437-1441.
- Batista, A.; Leitão, A. E. F.; Sato, M. E.; Leite, L. G.; Raga, A. 1994. Efeito da associacao *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com oleo mineral, na mortalidade de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*. 23(3):379-383.
- Calderón, A.; Castiñeiras, A.; López, M. 1991. Efecto de los biocidas y fertilizantes empleados en el cultivo del plátano en Cuba sobre los hongos entomopatógenos. 1. *Beauveria bassiana*. *Protección de Plantas (Cuba)* 1(1):21-31.
- Carballo, M.; Durán, J.; Rodríguez, L. 1998a. Efecto de fungicidas de uso común en el cultivo del chile sobre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. 6p. (Inédito).
- Clark, R.A. 1980. Fungicidal inhibition of *Beauveria bassiana*, a pathogen of the colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of the New York Entomological Society*. 88(1):40.
- Clark, R. A.; Casagrande, R. A.; Wallace, D. B. 1982. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11(1):67-70.
- Filho, B. A.; Oliveira, L. J.; Alves, B. S. 1987. Compatibilidade de insecticidas químicos com entomopatógenos. *Biológico* 53(7/12): 69-70.
- Gardner, W. A.; Storey, G. K. 1985. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. *Journal of Economic Entomology*. 78(6): 1275-1279.
- Lappa, N. V. 1967. The effects of different pesticides on the variability and the germination vigor of spores of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Zashch. Rast. Kiev (Russia)*. 4: 139-144.
- Compediado en: *Review of Applied Entomology (Series A: Agricultural)* 59(5):1436. 1971.

- Lord, J.; Near, C.; Britton, J.; Jaronski, S. 1997. Compatibility of the *Beauveria bassiana* based mycoinsecticide Mycotrol with fungicides, conventional insecticides, and spray adjuvants. XXX Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology. Programmand Abstracts. Alberta, Canadá, 24-26 August, 1997. pp. 44.
- Loria, R.; Galaini, S.; Roberts, D. W. 1983. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* as influenced by fungicides. *Environmental* 12(5): 1724-1726.
- Machowicz-Stefaniak, Z. 1983. The effect of fungicides used in orchard protection on the growth of entomopathogens fungi. *Roczniki Nauk Rolniczych E (Ochrona Roslin)*. 10: 187-199.  
Compediado en: *Review of Applied Entomology (Series A: Agricultural)* 72(10): 6458. 1984.
- Machowicz-Stefaniak, Z. 1985. The effect of systemic fungicides used in orchard protection on the growth of entomopathogens fungi (Hyphomycetales, Mycophyta). *Roczniki Nauk Rolniczych E (Ochrona Roslin)*. 11: 63-75.  
Compediado en: *Review of Applied Entomology (Series A: Agricultural)* 74(12): 6068. 1986).
- Olmert, I.; Kenneth, R. G. 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi *B. bassiana*, *V. lecanii* and *Verticillium* spp. to fungicides and insecticides. *Environmental Entomology* 3(1):33-38.
- Osborne, L. S.; Boucias, D. G. 1985. A review of chemical antagonists to mycopathogens of citrus root weevils. *Florida Entomologist* 68(3):409-416.
- Ramaraje, N. V.; Govindu, H. C.; Shivashankara, K. S. 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9(3):398-403.
- Rivera, M. A. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19(4): 151-158.

- Rivera, M. A.; Bustillo, P. A.; Marín, M. P. 1994. Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología* 20(4): 209-214.
- Rivera, A. M.; Bustillo, A. E. 1996a. Revisión del efecto de agroquímicos sobre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, patógenos de la broca del café (Primera entrega). *Boletín de la Sociedad Colombiana de Entomología* 24(82):5-6.
- Rivera, A. M.; Bustillo, A. E. 1996b. Revisión del efecto de agroquímicos sobre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* patógenos de la broca del café (Última entrega). *Boletín de la Sociedad Colombiana de Entomología* 25(83):2-16.
- SAS Institute. 1985. SAS User guide: Statistics, Version 5 ed. Cary, NC, SAS Institute Inc. 956p.
- Storey, G. K.; Gardner, W. A. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plant growth regulators and spray additives. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(1):1-3.
- Tedders, W. L. 1981. *In vitro* inhibition of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by six fungicides used in pecan culture. *Environmental Entomology* 10(3):346-349.
- Todovora, S. I.; Coderre, D.; Duchesne, R. M.; Côte, J. C. 1997. Compatibility of the *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin with selected fungicides and herbicides. *In Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology* (30, 1997, Alberta Canadá). Programmand Abstracts. p. 64.
- Wilding, N. 1972. The effect of systemic fungicides on the Aphid Pathogen, *Cephalosporium aphidicola*. *Plant Pathology* 21(3):137-139.

## CAPITULO 4

### 4.1 DISCUSION GENERAL

A nivel de campo se evaluó el efecto de las formulaciones del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en mezcla con diferentes dosis del insecticida fipronil en comparación con el control químico del agricultor y la producción de frutos en una plantación de chile establecida. Se implementó en su momento las prácticas fitosanitarias necesarias, no obteniéndose los resultados esperados orientados al control de la plaga y su efecto en el rendimiento, debido al ataque de enfermedades de tipo abióticas, patológicas y plagas insectiles. Además los fungicidas utilizados en el cultivo, pudieron haber afectado el efecto de *B. bassiana* sobre los adultos del picudo presentando resultados erróneos.

Los tratamientos evaluados no presentaron un comportamiento ideal en cuanto a la efectividad del insecticida Regent en comparación con *B. bassiana*. En estudios previos, los insecticidas conllevan a reducciones significativas de la cantidad de adultos del picudo y por ende de la cantidad de frutos caídos, pero esta disminución de frutos dañados fue principalmente debido a daños de tipo abiótico. Debido a los resultados desfavorables obtenidos en el estudio de campo, se desarrolló un ensayo similar en el laboratorio. El uso del aceite agrícola Agrol, en mezcla con esporas de *B. bassiana*, con dosis reducidas de fipronil se presentan como alternativas del control químico, ya que las mortalidades de adultos oscila entre un 97.5 y 100% para los tratamientos que utilizaban solo esporas del hongo, y aquellos que se combinaban con el insecticida Regent, respectivamente.

La utilización de *B. bassiana* como controlador de adultos del picudo del chile, se presenta como una alternativa que no contamina el ambiente, y al establecerse en un área determinada, mantienen un inóculo infectivo capaz de mantener las poblaciones de la plaga por debajo de los niveles de daño económico, permitiendo la transmisión entre generaciones y un nivel de disminución natural de la plaga. Este microorganismo no ocasiona en la plaga la muerte inmediata pero provoca alteraciones de orden biológico,

tales como disminución de oviposición y reducción de hábitos alimenticios, además de reducir el desarrollo de resistencia por parte de la plaga.

El uso de mezclas de agentes microbiológicos como hongos entomopatógenos, con subdosis de insecticidas y/o fungicidas, produce un efecto sinérgico, ocasionando epizootias contra plagas agrícolas, disminuyendo así los efectos de contaminación ambiental a causa de los agroquímicos, y un consecuente ahorro en tiempo de aplicación y mano de obra. Los resultados de estas mezclas se viene estudiando años atrás, debido al efecto de inhibición en los hongos entomopatógenos por efecto de los agroquímicos de uso convencional en los cultivos agrícolas. *B. bassiana*, por ser un controlador microbiológico de importancia agrícola, se presenta como uno de los entomopatógenos de mayor estudio.

Estudios recientes realizados por Rivera (1993), Rivera *et al* (1994), Lord *et al* (1997), Todovora (1997) y Carballo *et al* (1998a), demuestran que los agroquímicos al ser utilizados en ciertas concentraciones y formulaciones, inhiben significativamente la germinación y desarrollo de esporas de *B. bassiana*

Mediante la utilización de insecticidas, coadyuvantes y fungicidas de mayor uso en el cultivo del chile, se comprobó la inhibición de *B. bassiana* por efecto de dichos agroquímicos. Los productos más perjudiciales para el hongo fueron los fungicidas Curzate, Daconil, Acrobat, Benlate, Dithane y Antracol, así como los insecticidas Karate y Decis. Estos productos por su efecto letal hacia el hongo deben usarse con cautela en futuros programas de control de plagas que involucren el uso de *B. bassiana*. Los insecticidas Thiodan, Ambush, Vydate, Tamarón, Cymbush, Sevin, Regent y Confidor, así como los fungicidas Previcur, Kocide y Alliete al no producir una inhibición significativa del hongo, deben utilizarse en forma alterna para el combate de plagas del cultivo del chile. Se debe considerar que diferentes cepas de *B. bassiana* muestran un comportamiento diferente a fungicidas como lo señala Lazo (1990).

El programa de aplicaciones debe ser implementado desde el inicio de la siembra en semilleros, con el uso de productos preventivos para el control de plagas y



enfermedades del suelo, principalmente, no dejando de lado las aplicaciones fitosanitarias y de nutrientes al follaje.

Con la aparición de los botones, flores y frutos, se empiezan a observar los primeros síntomas de aparición del picudo del chile, los cuales se muestran como pequeñas puntuaciones en las estructuras florales. A partir de este momento, los muestreos de adultos se hacen necesarias, ya que si la plaga alcanza el umbral de acción, se debe iniciar las medidas de control para evitar que la población alcance niveles perjudiciales.

Al realizar aplicaciones de agentes microbiológicos en mezcla con agroquímicos, conviene conocer la dinámica de inhibición de los químicos sobre las estructuras reproductivas del hongo. La utilización de formulaciones de insecticidas y fungicidas con hongos entomopatógenos se tornan como una alternativa viable en el control de plagas y enfermedades del cultivo del chile, con posibilidad de extenderse a otros cultivos agrícolas.

El uso continuo de los hongos entomopatógenos no genera resistencia por parte de la plaga, pero sí el uso de agroquímicos, por lo cual se deben realizar rotaciones de insecticidas y fungicidas compatibles con *Beauveria bassiana*. La combinación de dosis bajas de insecticida con *B. bassiana* permiten un buen manejo de la plaga y posiblemente no produce resistencia del insecto a los agroquímicos. De los resultados de este estudio, se pueden utilizar los insecticidas Tamarón, Ambush, Sevin, Regent, Malation, Confidor, Cymbush, Thiodan, y los fungicidas Previcur, Kocide y Alliette.

Bajo cualquier condición climática, el uso de los coadyuvantes facilitan la adherencia, humectación y penetración de los plaguicidas químicos y microbiológicos en el tejido foliar o cutícula del insecto, además protegen a los plaguicidas de la degradación de los rayos solares y reducen la descomposición y evaporación por efectos del calor. En estudios previos, el uso de estos productos inhiben el crecimiento de *B. bassiana*, dificultando su modo de acción sobre las plagas agrícolas. Los productos WK, NP 7, Nufilm, Citowett y Agrol, no inhiben el desarrollo micelial de *B. bassiana* bajo las

condiciones de este estudio, en la cual su uso puede extenderse al control de otras plagas agrícolas.

## 4.2 CONCLUSIONES

Por problemas de tipo patológico a nivel de campo, los resultados del manejo integrado del picudo del chile *A/eugenii* no fueron los esperados.

La mortalidad del picudo del chile en laboratorio fue efectiva mediante la formulación de *B. bassiana* en mezcla con subdosis del insecticida Regent, y se incrementó utilizando subdosis solo del insecticida.

La germinación de esporas, el crecimiento micelial y la esporulación de *B. bassiana* son afectados en distinto grado por fungicidas e insecticidas, no así por los coadyuvantes utilizados.

Los productos que afectaron en mayor o menor grado la inhibición de *B. bassiana*, deben considerarse en futuros programas de manejo de plagas que combinen agroquímicos con hongos entomopatógenos.

### 4.3 RECOMENDACIONES

Para futuros estudios de campo, contar con antecedentes previos de los cultivos establecidos en el área de experimentación y los problemas fitosanitarios presentados, así como también realizar análisis preliminares de suelo con el fin de reducir los problemas referentes a plagas y enfermedades.

Realizar estudios a nivel de laboratorio y campo de la efectividad de diferentes insecticidas en dosis y subdosis sobre la mortalidad de *Anthonomus eugenii*.

Evaluar en campo, la compatibilidad de *B. bassiana* con los insecticidas y fungicidas que no mostraron un efecto negativo sobre *B. bassiana*, así como el efecto de factores ambientales en el desarrollo del hongo entomopatógeno.

Evaluar a nivel de laboratorio y campo, concentraciones menores a las utilizadas en este estudio, tanto en medio nutritivo sólido como en medio líquido, para los fungicidas e insecticidas que presentaron inhibiciones significativas de la germinación y el desarrollo de esporas de *B. bassiana*.

Estudiar alternativas para el manejo de enfermedades fungosas cuando se utilizan hongos entomopatógenos.

## CAPITULO 5

## LITERATURA CITADA

- Anderson, T. E.; Roberts, D. W. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology* 76 (6):1437-1441.
- Anderson, T. E.; Hajek, A. E.; Roberts, D. W.; Preisler, H. K.; Robertson, J. L. 1989. colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinatinos of *Beauveria bassiana* with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 82(1):83-89.
- Andrews, K. L.; Rueda, A., Gandini, G.; Evans, S.; Arango, A.; Avedillo M. 1986. A supervised control programme for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano, in Honduras, Central America. *Tropical Pest Management* 32(1):1-4.
- Bajan, C.; Kmitowa, K. 1982. The effect of herbicides: Simazin 50, Avadex and Antyperz on four species of entomopathogenic fungi. *Polish Ecological Studies (Polonia)* 8:489-497.
- Compediado en: *Review of Applied Entomology (Series A: Agricultural)* 71(12): 8144. 1983.
- Barfield, C. S. 1989. El muestreo en el manejo integrado de plagas. *In*. Andrews, K. L. y Quezada, J. R. eds. *Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: estado actual y futuro*. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. p. 145-162.
- Barfield, C. S.; Sharpe, P. J.; Bottrell, D. G. 1977. A temperature-driven developmental model for the parasite *Bracon mellitor* (Hymenoptera: Braconidae). *Canadian Entomologist* 109:1503-1514.
- Batista, A.; Leitão, A. E. F.; Sato, M. E.; Leite, L. G.; Raga, A. 1994. Efeito da associacao *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com oleo mineral, na mortalidade de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*. 23(3):379-383.

- Batista, A.; Leite, L. G.; Raga, A.; Sato, M. E. 1995. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolites sordidus* (Germar) adults. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*. 24(2):405-408.
- Beroza, M.; Bottger, G. T. 1954. The insecticidal value of *Tripterygium wilfordii*. *Journal of Economic Entomology* 47(1):188-189.
- Bruton, B. D.; Chandler, L. D.; Miller, M. E. 1989. Relationships Between Pepper Weevil and Internal Mold of Sweet Pepper. *Plant Disease* 73(2):170-173.
- Burke, H. R.; Woodruff, R. E. 1980. The pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) in Florida. Fla. Dept. and Consumer Serv. Entomology Circular No. 219. 4p.
- Burks, B. D. 1954. Parasitic Wasps of the *Catolaccus* Group in the Americas. U.S.D.A. Technical Bulletin no. 1093. 21p.
- Calderón, A.; Castiñeiras, A.; López, M. 1991. Efecto de los biocidas y fertilizantes empleados en el cultivo del plátano en Cuba sobre los hongos entomopatógenos. 1. *Beauveria bassiana*. *Protección de Plantas* 1(1):21-31.
- Calvo, D. G.; Pacheco, A. B.; French, J. B.; Alvarado, E. 1989. Análisis económico del manejo del picudo de chile (*Anthonomus eugenii* Cano) en Zacapa, Guatemala. *Manejo Integrado de Plagas* 11:31-50.
- Carballo, V. M. 1996. Control microbiano de adultos de picudo del chile *Anthonomus eugenii* mediante el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Proyecto de Investigación MIP-CATIE. 6p. (Inédito).
- Carballo, V. M. 1997. Uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas. *Control Biológico de Plagas*. CATIE, Proyecto MIP. Curso de Postgrado.
- Carballo, V. M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos (Hoja Técnica). *Manejo Integrado de Plagas*. 47:1-4.
- Carballo, M.; Durán, J.; Rodríguez, L. 1998a. Efecto de fungicidas de uso común en el cultivo del chile sobre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. *Manejo Integrado de Plagas* (en prensa).

- Carballo, M.; Rodríguez, L.; Durán, J. 1998b. Uso de *Beauveria bassiana* (Blas) para el control microbiano del picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) en el laboratorio. In VII Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas, VII Taller Latinoamericano de Mosca Blanca y Geminivirus, XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología División Caribe APS-CD (1998, Managua, Nicaragua). Memorias. Ed. J. C. Mercado. Managua, Nicaragua. p. 109.
- Cartwright, B.; Teague, T. G.; Chandler, L. D.; Edelson, J. V.; Bentsen, G. 1990. An action threshold form management of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae) on Bell Peppers. *Journal of Economic Entomology* 83(5):2003-2007.
- Cave, R. D. 1995. Manual para el reconocimiento de parásitos de plagas agrícolas en América Central. El Zamorano, Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. 202p.
- CATIE. 1993. Guía para el manejo de plagas del cultivo: chile dulce. Turrialba, Costa Rica. Descripción y manejo de plagas invertebradas: p. 50-55.
- Clark, R.A. 1980. Fungicidal inhibition of *Beauveria bassiana*, a pathogen of the colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of the New York Entomological Society*. 88(1):40.
- Clark, R. A.; Casagrande, R. A.; Wallace, D. B. 1982. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11(1):67-70.
- Costa, S. D.; Gaugler, R. 1989. Influence of *Solanum* host plants on Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) susceptibility to the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Environmental Entomology* 18(3):531-536.
- Coto, D. 1996. El picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano), su reconocimiento y posible manejo. Hoja Técnica, no. 19. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 42. 4p.
- Coudriet, D. L.; Kishaba, A. N. 1988. Bioassay procedure for an attractant of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 8(15):1499-1502.

- Coutinho, J. L.; Oliveira, J. V. 1991. Patogenicidade do isolado I-149Bb de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a adultos de *Anthonomus grandis* (Coleoptera, Curculionidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 20(1):199-207.
- Cross, W. H.; Chesnut, T. L. 1971. Arthropod Parasites of the Boll Weevil, *Anthonomus grandis*: 1. An Annotated List. Annals of the Entomological Society of America 64(2):516-527.
- Dorta, B.; Arcas, J.A. 1996. Producción de hongos entomopatógenos. *In*. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. por R. E. Lecuona. Argentina. pp. 195-206.
- Eller, F.J.; Bartelt, R. J.; Shasha, B. S.; Schuster, D. J.; Riley, D. G.; Stansley, P. A.; Mueller, T. F.; Shuler, K. D.; Johnson, B.; Davis, J. H. 1994. Agregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. Journal of Chemical Ecology 20(7):1537-1555.
- Elmore, J. C.; Davis, A. C.; Campbell, R. E. 1934. The pepper weevil. USDA, Technical Bulletin no. 447. 27 p.
- Esquivel, E. 1993. El ají picante (*Capsicum* spp.): recomendaciones generales para el cultivo. Instituto del Chile, Nuevo México. U.S.A. 62p.
- Filho, B. A.; Oliveira, L. J.; Alves, B. S. 1987. Compatibilidade de insecticidas químicos com entomopatógenos. Biológico 53(7/12): 69-70.
- Gardner, W. A.; Storey, G. K. 1985. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. Journal of Economic Entomology. 78(6): 1275-1279.
- Gómez, V. M.; Jiménez, C. M. 1995. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre adultos del picudo del chile (*Anthonomus eugenii*). *In*. Taller Nacional de Control Biológico (1, 1995, León, Nicaragua). Avances técnicos. Nicaragua, Proyecto CATIE/INTA-MIP. v. 4, p. 95-97.
- Gordón, R.; Armstrong, A. M. 1990. Biología del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 74(1):69-73.

- Gordón-Mendoza, R.; Medina-Gaud, S.; Armstrong, A. 1991. Nuevo hospedero alterno del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano en Puerto Rico. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 75(4):423.
- Hanson, P.; Gauld, . 1995. The hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press. The Natural History Museum, London. 893 p.
- Hassan, S. A.; Bigler, F.; Bogenschütz, H.; Boller, E.; Brun, J.; Calis, J. N. M.; Coremans-Pelseneer, J.; Duso, C.; Grove, A.; Heimbach, U.; Helyer, N.; Kokkanen, H.; Lewis, G. B.; Mansour, F.; Moreth, L.; Polgar, L.; Samsøe-Petersen, L.; Sauphanor, B.; Stäubli, A.; Sterk, G.; Vainio, A.; van de Veire, M.; Viggiani, G.; Vogt, H. 1994. Results of the sixth joint pesticide testing programme of the IOBC/WPRS-Working group <<Pesticides and Beneficial Organism>>. Entomophaga 39(1):107-119.
- Hernández-Zúñiga, J.; Reyes-Villanueva, F. 1989. Patrón de distribución espacial y tamaño óptimo de muestra de *Anthonomus eugenii* en el cultivo de chile serrano. SouthWestern Entomologist 14(4):387-395.
- Hruska, A. J.; Rosset, P. M. 1987. Estimación de los niveles de daño económico para plagas insectiles. Manejo Integrado de Plagas 5:30-44.
- Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. In: Lacey, L. Ed. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, Wapato, WA, USA. p. 153-185.
- Ignoffo, C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomologist 75(4):516-525.
- Ignoffo, C. M.; Dutky, S. R. 1963. The effect of sodium hypochlorite on the viability and infectivity of *Bacillus* and *Beauveria* spores and cabbage looper nuclear-polyhedrosis virus. Journal of Insect Pathology. 5(1):422-426.
- Jiménez, C. M. 1994?. Uso de hongos entomopatógenos para el manejo del picudo del algodón. Nicaragua. Proyecto Hongos Entomopatógenos. CENAPROVE-CATIE-INTA/MIP. 7 p. (inédito).
- King, A. B. S.; Saunders, J. L. 1984. Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. Turrialba, C. R., CATIE. Departamento de Producción Vegetal. 175 p.



- Lappa, N. V. 1967. The effects of different pesticides on the variability and the germination vigor of spores of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Zashch. Rast. Kiev (Rusia). 4: 139-144.  
Compediado en: Review of Applied Entomology (Series A: Agricultural) 59(5):1436. 1971).
- Lazo, R. R. 1990. Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*) al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y su tolerancia al oxiclورو de cobre. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. 61p.
- Lecuona, R.; Papierok, K. B.; Riba, G. 1996. Hongos entomopatógenos. *In*. Lecuona, R. E. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. p. 35-60.
- Llanes, L. A. 1980. Dinámica poblacional del picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano, en un cultivo de chile serrano *Capsicum annum* Linn., en el Mezquital, Apodaca, N.L. México. Tesis Ing. Agr. 65p.
- López, N. J. C.; Rivera, M. A.; Bustillo, P. A. E. Chaves, C. B. 1995. Persistencia de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el suelo con el transcurso del tiempo. Revista Colombiana de Entomología 21(4):173-176.
- Lord, J.; Near, C.; Britton, J.; Jaronski, S. 1997. Compatibility of the *Beauveria bassiana* based mycoinsectide Mycotrol with fungicides, conventional insecticides, and spray adjuvants. *In*. Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology (30, 1997, Alberta Canadá). Programmand Abstracts. p. 44.
- Loría, R.; Galaini, S.; Roberts, D. W. 1983. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* as influenced by fungicides. Environmental 12(5): 1724-1726.
- Machowicz-Stefaniak, Z. 1983. The effect of fungicides used in orchard protection on the growth of entomopathogens fungi. Roczniki Nauk Rolniczych E (Ochrona Roslin). 10: 187-199.  
Compediado en: Review of Applied Entomology (Series A: Agricultural) 72(10): 6458. 1984.

- Machowicz-Stefaniak, Z. 1985. The effect of systemic fungicides used in orchard protection on the growth of entomopathogens fungi (Hyphomycetales, Mycophyta). *Roczniki Nauk Rolniczych E (Ochrona Roslin)*. 11: 63-75.  
Compediado en: *Review of Applied Entomology (Series A: Agricultural)* 74(12): 6068. 1986).
- Mancía, J. E. Zabaneh, R. C. 1988. Estudio bioecológico del picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano en El Salvador. *In*. Memoria del II Seminario Nacional de Manejo Integrado de Plagas. CENTA-CATIE, Proyecto MIP. San Salvador, El Salvador. Serie Técnica, Informe Técnico, No 145. Eds. J. F. Larios; M. R. Reyes; G. G. Rivas.
- Martins, J. F. da S.; de Lima, M. G. A.; Botton, M.; Carbonari, J. J.; Quintela, E. D. 1997. Efeito de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo-do-colmo do arroz, *Tibraca limbativentris* Stal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 26(2):277-283.
- McCoy, C. W.; Beavers, G. M.; Tarrant, C. A. 1985. Susceptibility of *Artipus floridanus* to different isolates of *Beauveria bassiana*. *Florida Entomologist* 68(3): 402-409.
- Misra, R. M.; Prasad, G.; Mishra R. K.; Misra, B.M. 1991. Bionomics and control of *Philosamia (Attacus) cynthia drury* (Lepidoptera: Saturniidae). *The Indian Forester* 117(1):48-52.
- Morales, H. E. 1989. Atracción y colonización de *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) a diferentes solanáceas hospederas: posibilidades de control cultural en chile dulce. Thesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 85 p.
- Olmert, I.; Kenneth, R. G. 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi *B. bassiana*, *V. lecanii* and *Verticillium* spp. to fungicides and insecticides. *Environmental Entomology* 3(1):33-38.
- Osborne, L. S.; Boucias, D. G. 1985. A review of chemical antagonists to mycopathogens of citrus root weevils. *Florida Entomologist* 68(3):409-416.
- Ozaki, H. Y.; Genung, W. G. 1982. Insecticide evaluation for the pepper weevil control. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 95:347-348.

- Padin, S. B.; Dal Bello, G. M.; Vasicek, A. L. 1995. Potencial bioinsecticida de hongos entomopatógenos de plagas en granos almacenados. *Revista de la Facultad de Agronomía (Universidad de Buenos Aires)* 15(1):1-7.
- Palma, R. M.; Serrano L. 1997. Efecto de extractos botánicos sobre el picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano). Resultados preliminares en El Salvador. *Agronomía Mesoamericana* 8(1):99-107.
- Patrock, R. J.; Schuster, D. J.; Mitchell, E. R. 1992. Field evidence for an attractant produced by the male pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist* 75(1):138-144.
- Patrock, R. J.; Schuster, D. J. 1987. Field survey for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii*, on nightshade. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 100:217-220.
- Patrock, R. J.; Schuster, D. J. 1992. Feeding, oviposition and development of the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano), on selected species of solanaceae. *Tropical Pest Management* 38(1):65-69.
- Pierozzi, I.; Habib, M. E. 1993. Aspectos biológicos e de comportamento dos principais parasitos de *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae), em Campinas, SP. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 22(2):317-323.
- Pratt, F. C. 1907. Notes on the pepper weevil. *USDA, Bureau of Entomology-Bulletin* 63(5):55-58.
- Ramaraje, N. V.; Govindu, H. C.; Shivashankara, K. S. 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9(3):398-403.
- Riley, D. G.; King, E. G. 1994. Biology and management of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): A review. *Entomol. (Trends in Agril. Science)* 2:109-121.
- Riley, D. G.; Schuster, D. J.; Barfield, C.S. 1992. Sampling and dispersion of pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae) adults. *Environmental Entomology* 21(5):1013-1021.

- Riley, D. G.; Shuster D. J.; Barfield, C. S. 1992. Refined action threshold for pepper weevil adults (Coleoptera: Curculionidae) in bell peppers. *Journal of Economic Entomology* 85(5):1919-1925.
- Riley, D.G.; Sparks, A.N. Jr. 1992. The pepper weevil and its management. Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System. L5069. 6p.
- Rivera, A. M.; Bustillo, A. E. 1996a. Revisión del efecto de agroquímicos sobre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, patógenos de la broca del café (Primera entrega). *Boletín de la Sociedad Colombiana de Entomología* 24(82):5-6.
- Rivera, A. M.; Bustillo, A. E. 1996b. Revisión del efecto de agroquímicos sobre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* patógenos de la broca del café (Última entrega). *Boletín de la Sociedad Colombiana de Entomología* 25(83):2-16.
- Rivera, M. A. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19(4): 151-158.
- Rivera, M. A.; Bustillo, P. A.; Marín, M. P. 1994. Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología* 20(4): 209-214.
- Sandoz-Agro. 1994. Pherocon® Pew Monitoring System. Sandoz Agro, Basel, Switzerland. 3p.
- SAS Institute. 1985. SAS User guide: Statistics, Version 5 ed. Cary, NC, SAS Institute Inc. 956p.
- Schuster, D. J.; Everett, P. H. 1982. Control of the beet armyworm and pepper weevil on pepper. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 95:349-351.
- Schuster, D. J. ; Seal, D. R. ; Stansly, P. A.; Cruz, C. 1996?a. Development of biological control techniques for management of the pepper weevil. University of Florida, University of Puerto Rico. 8p.
- Schuster, D. J., Seal, D. R.; Stanley, P. A.; Dean, D. E.; Cruz, C.; Zapata, R. 1996b. Prospects for integrated management of the pepper weevil in the Caribbean Basin. *In* National Pepper Conference (1996, Naples, Florida). *Proceedings*. Ed. D. N. Maynard. Florida, University of Florida. p. 71-72.

- Seal, D. R.; Schuster, D. J. 1995. Control of pepper weevil, *Anthonomus eugenii*, in West-Central and South Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 108:220-224.
- Segarra-Carmona, A. E.; Pantoja, A. 1988a. Evaluation of relative sampling methods for population estimation of the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 72(3):387-393.
- Segarra-Carmona, A. E.; Pantoja, A. 1988b. Sequential sampling plan, yield loss components and economic thresholds for the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 72(3):375-385.
- Sorensen, K. A. 1993. Pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano, Coleoptera: Curculionidae). Vegetable: insect pest management. Insect Note 34. 3p.
- Stansly, P. 1998. Management of pepper pests in Florida. Citrus & Vegetable Magazine (April) 1-4.
- Starnes, R.; Li Liu, Chi ; Marrone, P. G. 1993. History, Use, and Future of Microbial Insecticides. American Entomologist 39(2):83-91.
- Storey, G. K.; Gardner, W. A. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plant growth regulators and spray additives. Applied and Environmental Microbiology. 52(1):1-3.
- Taylor, J. 1953. The effect of continual use of certain fungicides on *Physalospora obtusa*. Phytopathology 43: 268-270.
- Tedders, W. L. 1981. *In vitro* inhibition of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by six fungicides used in pecan culture. Environmental Entomology 10(3):346-349.
- Tejeda, L. O.; Aranda, E.; Barajas, R. 1988. Aspectos biológicos del picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano y evaluación de tres insecticidas para su combate en Apodaca, N.L. *In*. Informe de Investigación, División de Ciencias Agropecuarias y Marítimas, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, México. 20:45-46.

- Todovora, S. I.; Coderre, D.; Duchesne, R. M.; Côte, J. C. 1997. Compatibility of the *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin with selected fungicides and herbicides. In Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology (30, 1997, Alberta Canadá). Programmand Abstracts. p. 64.
- Velasco, H. 1969. Evaluación de Pérdidas, Preferencia de Oviposición del Picudo o Barrenillo del Chile (*Anthonomus eugenii* Cano). Efectividad de Varios Insecticidas y Reacción de Diferentes Variedades a su Ataque. Agricultura Técnica en México 2(11):499-507.
- Vélez, A. P. 1996. Evaluación de campo de formulaciones en aceite del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Revista Colombiana de Entomología 22(3): 137-142.
- Vélez, A. P. 1997. Evaluación de formulaciones en aceite y agua del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en campo. Revista Colombiana de Entomología 23(1/2): 59-64.
- Wilding, N. 1972. The Effect of systemic fungicides on the aphid pathogen, *Cephalosporium aphidicola*. Plant Pathology 21(3):137-139.
- Zimmermann, G. 1992. *Metarhizium anisopliae* – an entomopathogenic fungus. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 45(63):113-128.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos aplicados en el campo sobre la calidad de frutos de chile. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Bloque (BL)	3	198.19043	66.0634766	0.0001*
Calidad (Cal)	3	92.6748047	30.8916016	0.0001*
Tratamiento (Trat)	7	688.350586	98.335798	0.0001*
Trat*Cal	21	58.5673828	2.788923	0.1856ns
BL*Trat*Cal	93	570.02832	6.1293368	0.0001*
Medición (Días)	7	99.7255859	14.2465123	0.0001*
Medición*Calidad	21	52.6298828	2.5061849	0.2968ns
Medición*Trat	49	207.047852	4.2254664	0.0002*
Medición*Trat*Cal	147	285.94043	1.945173	0.8126ns
Bloque	3	198.19043	66.0634766	0.0001*
Calidad	3	92.6748047	30.8916016	0.0028*
Tratamiento	7	688.350586	98.335798	0.0001*
Tratamiento*Calidad	21	58.5673828	2.788923	0.9789ns
Total	351	R2 =0.604681	C.V.= 135.48	

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo

Anexo 2. Porcentaje de mortalidad diaria de adultos de *Anthonomus eugenii* bajo distintos tratamientos. CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamientos	Días						
	1	2	3	4	5	6	7
Ag	15	75	87.5	97.5	100	100	100
Ag+B	47.5	80	87.5	90	97.5	100	100
B	12.5	42.5	70	87.5	95	97.5	97.5
Rb	77.5	90	95	100	100	100	100
Ra	100	100	100	100	100	100	100
Rb+B	92.5	95	100	100	100	100	100
Ra+B	100	100	100	100	100	100	100
T	10	15	17.5	17.5	32.5	37.5	45



Anexo 3. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos respecto a las mortalidades de adultos del picudo del chile. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Medición (Días)	6	338.214286	56.3690476	0.0001*
Repetición	3	8.3571429	2.7857143	0.0290*
Tratamiento	7	1213.35714	173.336735	0.0001*
Medición*Tratamiento	42	315.142857	7.5034014	0.0001*
Total	58	R2 =0.929321	C.V.= 11.65	

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo

Anexo 4. Agroquímicos y concentraciones evaluadas en los estudios de susceptibilidad y germinación de *Beauveria bassiana*. Turrialba, 1998.

Nombre Genérico	Nombre Comercial	Formulación y Concentración	Dosis de pc en gr o ml <sup>1/</sup>		
			100 ppm	500 ppm	1000ppm
<b>FUNGICIDAS</b>					
Fosetil-Al	Aliette	80% PM*	0.0125	0.0625	0.125
Propamocarb	Previcur	72.2% SC**	0.01385	0.0692	0.1385
Hidróxido de cobre	Kocide	101 77% WP*	0.013	0.065	0.13
Propineb	Antracol	70% WP*	0.0143	0.0714	0.1428
Benomyl	Benlate	50% WP*	0.02	0.1	0.2
Clorotalonil	Daconil	2787 82.5% WG*	0.01212	0.0606	0.1212
Dimetomorf-mancozeb	Acrobat	MZ 69% WP*	0.0144	0.072	0.144
Mancozeb	Dithane	M45 80% PM*	0.0063	0.0313	0.0625
Mancozeb+cymoxanil	Curzate	M8 72% PM*	0.0138	0.0694	0.138
<b>INSECTICIDAS</b>					
Tamarón	Metamidofos	60% SL**	0.0166	0.0833	0.166
Malatión	Malatión	57% CE**	0.01754	0.0877	0.1754
Decis	Deltametrina	2.5 % CE**	0.4	2	4
Ambush	Permetrina	50% CE**	0.02	0.1	0.2
Cymbush	Cipermetrina	20% CE**	0.04	0.2	0.4
Carbaryl	Sevin	80% SP*	0.0125	0.0625	0.125
Oxamyl	Vydate	24% LS**	0.04166	0.2083	0.4166
Fipronil	Regent	20% SC**	0.05	0.25	0.5
Imidacloprid	Confidor	70% WG*	0.01428	0.0714	0.1428
Endosulfan	Thiodan	35% EC**	0.02856	0.1428	0.2856
Karate	Karate	2.5% WP*	0.4	2	4
<b>COADYUVANTES</b>					
Pinolene	Nu-film	96%**	0.010416	0.05208	0.10416
Nonoxinol	WK	85% LS**	0.01176	0.05882	0.11764
alquil aril polimer	NP 7 104	100% L**	0.01	0.05	0.1
aceite parafínico	Agrol	97% L**	0.01	0.05154	0.103
alquil aril poliglicol	Citowett	100%**	0.01	0.05	0.1

1/: dosis del producto expresado en gramos (\*) de producto comercial por cada 100 cc de medio, o mililitros (\*\*) de producto comercial por cada 100 cc de medio PDA.

pc: producto comercial  
ppm: partes por millón  
SC: suspensión concentrada

WG: gránulo mojable  
PM (WP): polvo mojable  
CE (EC): concentrado emulsificable

SP: polvo soluble

SL: concentrado soluble

Anexo 5. Nombres genéricos, nombres comerciales y familias químicas de los agroquímicos utilizados en los estudios de susceptibilidad y germinación de *Beauveria bassiana*. Turrialba, 1998.

Nombre Genérico	Nombre Comercial	Familia Química
<b>FUNGICIDAS</b>		
fosetil-Al	Aliette	Alumino-éster de alquil fosfonato
Propamocarb	Previcur	Carbamato
Hidróxido de cobre	Kocide	Cúprico
Propineb	Antracol	Carbamato
Benomyl	Benlate	Carbamato (Benzimidazol)
Clorotalonil	Daconil	Ftalamida
Dimetomorf-mancozeb	Acrobat	Ditiocarbamato
Mancozeb	Dithane	Etilen bisditiocarmamato
Mancozeb+cymoxanil	Curzate	Ditiocarbamato
<b>INSECTICIDAS</b>		
Tamarón	Metamidofos	Organofosforado
Malatión	Malatión	Organofosforado
Decis	Deltametrina	Piretroide
Ambush	Permetrina	Piretroide
Cymbush	Cipermetrina	Piretroide
Carbaryl	Sevin	Carbamato
Oxamyl	Vydate	Carbamato
Fipronil	Regent	Fenilpirazol
Imidacloprid	Confidor	Nitroguanidina
Endosulfan	Thiodan	Hidrocarburo clorado
Karate	Karate	Piretroide
<b>COADYUVANTES</b>		
pinolene	Nu-film	Humectante, Adherente, Penetrante
nonoxinol	WK	Penetrante, Humectante
alquil aril polimer	NP 7 104	Adherente
aceite parafínico	Agrol	Penetrante, Adherente
Alquil aril poliglicol	Citowett	Humectante, Adherente

Anexo 6. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de fungicidas con respecto a la germinación conidial de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición	2	1.1839	0.592	0.52ns
Tiempo (horas)	1	74.6897	74.6897	65.97*
Concentración	2	9714.5132	4857.2566	4290.17*
Fungicida	9	337328.182	37480.9091	33104.97*
Fungicida*Concentración	17	34312.4778	2018.381	1782.73*
Rep*Fung*Conc	56	62.4828	1.1158	0.99ns
Horas*Conc	2	34.0289	17.0144	15.03*
Horas*Fung	9	176.0926	19.5658	17.28*
Horas*Fung*Conc	17	128.5222	7.5601	6.68*
Total	115	R2 =0.999828	C.V.= 2.71	

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo

Anexo 7. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de fungicidas con respecto al crecimiento diametral de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición	3	5.912019	1.970673	20.02*
Concentración	3	66.410143	22.136714	224.83*
Fungicida	8	1770.63534	221.329418	2247.96*
Fungicida *Concentración	16	113.165497	7.072844	71.84*
Rep*Fung*Conc	81	159.456418	1.968598	19.99*
Medición	15	434.271352	28.951423	294.05*
Med*Conc	45	30.02409	0.667202	6.78*
Med*Fung	120	820.819153	6.84016	69.47*
Med*Fung*Conc	240	101.58923	0.423288	4.3*
Total	203	R2 =0.965790	C.V.= 23.97	

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo

Anexo 8. Análisis de varianza para el efecto de los fungicidas sobre la tasa de crecimiento diario de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición (Rep)	3	0.0525342	0.0175114	54.11*
Fungicida (Fung)	8	9.19656594	1.14957074	3552.34*
Repetición*Fungicida	27	0.80192742	0.02970102	91.78*
Concentración (Conc)	2	0.03195226	0.01597613	49.37*
Fungicida*Concentración	16	1.56046734	0.09752921	301.38*
Rep*Fung*Conc	54	0.76337089	0.0141365	43.68*
Medición	14	1.33497043	0.09535503	294.66*
Fungicida*Medición	112	2.5860636	0.02308985	71.35*
Conc*Med	28	0.00763691	0.00027275	0.84ns
Fung*Conc*Med	224	0.29523288	0.001318	4.07*
Total	503	R2 =0.978276	C.V.= 33.10	
Repetición	3	0.0525342	0.0175114	0.59ns
Fungicida	8	9.1965659	1.1495707	38.7*
Concentración	2	0.0319523	0.0159761	1.13ns
Fungicida*Concentración	16	1.5604673	0.0975292	6.9*

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo

Anexo 9. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de insecticidas y coadyuvantes con respecto a la germinación de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición	2	14.96078	7.48039	1.03ns
Tratamiento (Insec- coad)	16	385473.569	24092.098	3331.31*
Concentración	2	30500.9608	15250.4804	2108.74*
Trat*Conc	32	78912.3726	2466.01164	340.98*
Trat*Conc*Rep	100	1847.37255	18.47373	2.55*
Tiempo (Horas)	1	2658.8366	2658.8366	367.65*
Horas*Trat	16	1825.83007	114.11438	15.78*
Horas*Conc	2	511.69281	255.84641	35.38*
Horas*Trat*Conc	32	4828.97386	150.90543	20.87*
Total	203	R2 =0.998546	C.V.= 2.689	

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo

Anexo 10. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de insecticidas con respecto al crecimiento diametral de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición	3	0.148191	0.049397	14.21*
Concentración	3	91.5408567	30.5136189	8776.11*
Insecticida	10	403.206986	40.3206986	11596.76*
Insecticida*Conc	20	81.1033894	4.0551695	1166.32*
Rep*Insecticida*Conc	99	8.0664497	0.0814793	23.43*
Medición	15	549.658799	36.64392	10539.27*
Med*Conc	45	46.0126456	1.0225032	294.09*
Med*Insecticida	150	216.014583	1.4400972	414.19*
Med*Insect*Conc	300	49.149118	0.1638304	47.12*
Total	203	R2 =0.9964	C.V.= 5.023	

\*: nivel de significancia al 5%.

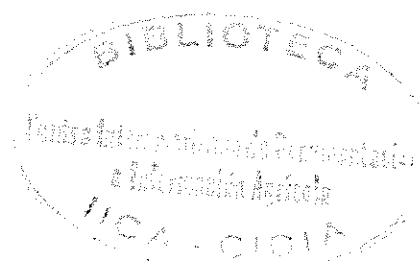
ns: no significativo

Anexo 11. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos de la prueba de coadyuvantes con respecto al crecimiento diametral de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición	3	0.2138413	0.0712804	13.81*
Concentración	3	21.1560135	7.0520045	1366.68*
Coadyuvante	4	17.0582801	4.26457	826.47*
Coad*Conc	8	1.0184824	0.1273103	24.67*
Rep*Coad*Conc	45	8.7115938	0.193591	37.52*
Medición	15	400.571511	26.7047674	5175.38*
Med*Conc	45	13.2546531	0.2945478	57.08*
Med*Coad	60	8.6066263	0.1434438	27.8*
Med*Coad*Conc	120	0.7825164	0.006521	1.26*
Total	203	R <sup>2</sup> = 0.992299	C.V. = 5.160	

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo



Anexo 12. Análisis de varianza para el efecto de los insecticidas sobre la tasa de crecimiento diario de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición (Rep)	3	0.0042354	0.0014118	133.32*
Insecticida (Insec)	11	2.87233137	0.26112103	24658.24*
Rep*Insec	33	0.02798688	0.00084809	80.09*
Concentración	2	0.28538508	0.14269254	13474.78*
Insec*Conc	20	0.50764641	0.02538232	2396.91*
Rep*Insec*Conc	63	0.04319616	0.00068565	64.75*
Medición (Med)	14	1.70957284	0.12211235	11531.34*
Insec*Med	154	0.73156157	0.0047504	448.59*
Conc*Med	28	0.08368017	0.00298858	282.22*
Insec*Conc*Med	280	0.15726734	0.00056167	53.04*
Total	608	R <sup>2</sup> =0.997720	C.V.= 5.65	
Repetición	3	0.00388546	0.00129515	1.68
Insecticida	10	2.57455962	0.25745596	334.84
Concentración	2	0.28567642	0.14283821	208.32
Insecticida*Concentración	20	0.50764641	0.02538232	37.02

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo



Anexo 13. Análisis de varianza para el efecto de los coadyuvantes sobre la tasa de crecimiento diario de *B. bassiana*. CATIE, Turrialba, 1998.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
Repetición (Rep)	3	0.00233694	0.00077898	39.58*
Coadyuvante (Coad)	5	0.28847512	0.05769502	2931.56*
Rep*Coad	15	0.011308	0.00075387	38.3*
Concentración	2	0.00515737	0.00257869	131.03*
Coad*Conc	8	0.00792412	0.00099052	50.33*
Rep*Coad*Conc	29	0.00628309	0.00021666	11.01*
Medición	14	1.25862459	0.08990176	4568.03*
Coad*Med	70	0.06378953	0.00091128	46.3*
Conc*Med	28	0.00226208	0.00008079	4.1*
Coad*Conc*Med	112	0.00250805	0.00002239	1.14ns
Total	286	R <sup>2</sup> =0.992206	C.V. = 6.14	
Concentración	2	0.00515737	0.00257869	11.9*
Coad*Conc	8	0.00792412	0.00099052	4.57*

\*: nivel de significancia al 5%.

ns: no significativo

Anexo 14. Ecuaciones de regresión del crecimiento diametral (Y) de *B. bassiana* sobre los fungicidas según las concentraciones (X). CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamiento	Concentración (ppm.)	Ecuación	R <sup>2</sup>
Testigo		$y = 0.2433x + 0.208$	0.9857
Previcur	100	$y = 0.477x - 0.402$	0.9920
	500	$y = 0.4027x - 0.107$	0.9945
	1000	$y = 0.3202x + 0.178$	0.9948
Kocide	100	$y = 0.129x + 0.759$	0.8734
	500	$y = 0.3361x - 0.159$	0.9916
	1000	$y = 0.3739x - 0.246$	0.9918
Aliette	100	$y = 0.3422x - 0.059$	0.9942
	500	$y = 0.2369 + 0.144$	0.9896
	1000	$y = 0.1247x + 0.442$	0.9943
Antracol	100	$y = 0.6$	0
	500	$y = 0.6$	0
	1000	$y = 0.6$	0
Benlate	100	$y = 0.6$	0
	500	$y = 0.6$	0
	1000	$y = 0.6$	0
Daconil	100	$y = 0.6$	0
	500	$y = 0.6$	0
	1000	$y = 0.6$	0
Acrobat	100	$y = 0.6$	0
	500	$y = 0.6$	0
	1000	$y = 0.6$	0
Dithane	100	$y = 0.6$	0
	500	$y = 0.6$	0
	1000	$y = 0.6$	0
Curzate	100	$y = 0.6$	0
	500	$y = 0.6$	0
	1000	$y = 0.6$	0

Anexo 15. Ecuaciones de regresión del crecimiento diametral (Y) de *B. bassiana* sobre los insecticidas según las concentraciones (X). CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Ecuación	R2
Testigo	0	$y = 0.2274x - 0.0125$	0.988
Tamarón	100	$y = 0.1724x + 0.185$	0.997
	500	$y = 0.1751x + 0.167$	0.996
	1000	$y = 0.1747x + 0.115$	0.992
Malatión	100	$y = 0.1711x + 0.13$	0.994
	500	$y = 0.1061x + 0.106$	0.925
	1000	$y = 0.5$	0
Decis	100	$y = 0.5$	0
	500	$y = 0.5$	0
	1000	$y = 0.5$	0
Ambush	100	$y = 0.1715x + 0.144$	0.994
	500	$y = 0.1072x + 0.131$	0.94
	1000	$y = 0.5$	0
Cymbush	100	$y = 0.1754x + 0.126$	0.992
	500	$y = 0.1361x + 0.117$	0.976
	1000	$y = 0.0263x + 0.381$	0.779
Sevin	100	$y = 0.1634x + 0.125$	0.991
	500	$y = 0.1497x + 0.133$	0.988
	1000	$y = 0.1493x + 0.105$	0.98
Vydate	100	$y = 0.169x + 0.183$	0.995
	500	$y = 0.134x + 0.273$	0.995
	1000	$y = 0.1129x + 0.319$	0.995
Regent	100	$y = 0.1578x + 0.183$	0.995
	500	$y = 0.1252x + 0.193$	0.987
	1000	$y = 0.1302x + 0.173$	0.987
Confidor	100	$y = 0.2035x + 0.044$	0.989
	500	$y = 0.2358x - 0.068$	0.987
	1000	$y = 0.2533x - 0.1$	0.99
Thiodan	100	$y = 0.1107x + 0.16$	0.968
	500	$y = 0.5$	0
	1000	$y = 0.5$	0
Karate	100	$y = 0.5$	0
	500	$y = 0.5$	0
	1000	$y = 0.5$	0
	1000	$y = 0.5$	0

Anexo 16. Ecuaciones de regresión del crecimiento diametral (Y) de *B. bassiana* sobre los coadyuvantes según las concentraciones (X). CATIE, Turrialba, 1998.

Tratamiento	Concentración (ppm.)	Ecuación	R2
Testigo Nufilm		$y = 0.2274x - 0.0125$	0.988
	100	$y = 0.1502x + 0.2203$	0.9964
	500	$y = 0.1479x + 0.205$	0.9952
	1000	$y = 0.1422x + 0.2366$	0.9967
WK	100	$y = 0.1258x + 0.2547$	0.9933
	500	$y = 0.1076x + 0.3109$	0.9954
	1000	$y = 0.106x + 0.2756$	0.9921
NP7	100	$y = 0.1169x + 0.2994$	0.9946
	500	$y = 0.12x + 0.2741$	0.9885
	1000	$y = 0.1234x + 0.2456$	0.9945
Agrol	100	$y = 0.1752x + 0.1944$	0.9959
	500	$y = 0.1568x + 0.2003$	0.9963
	1000	$y = 0.1545x + 0.1984$	0.996
Citowett	100	$y = 0.1225x + 0.27$	0.9908
	500	$y = 0.0983x + 0.3125$	0.9873
	1000	$y = 0.1112x + 0.2813$	0.9869

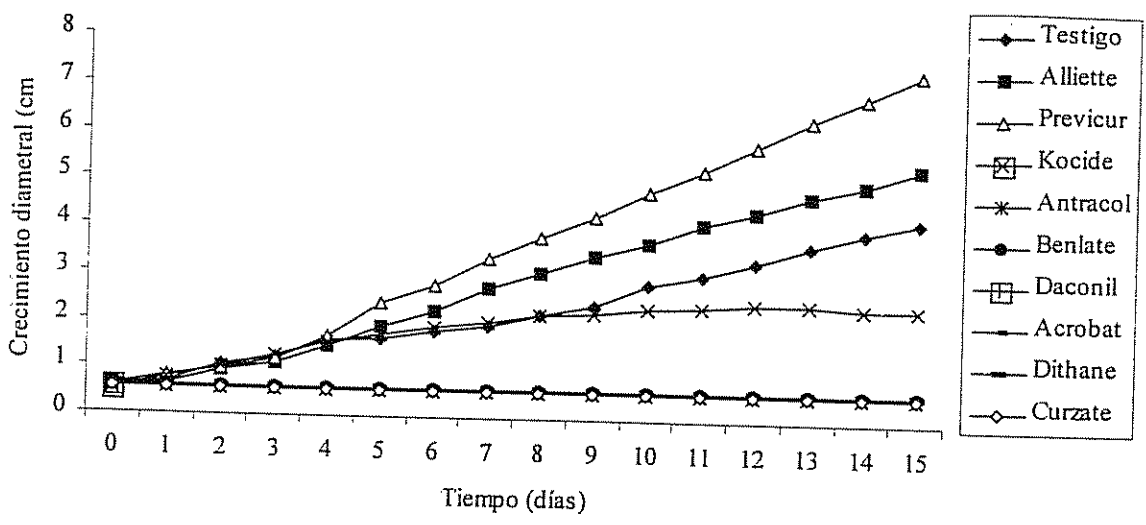


Figura 2. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los fungicidas en concentración de 100 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.

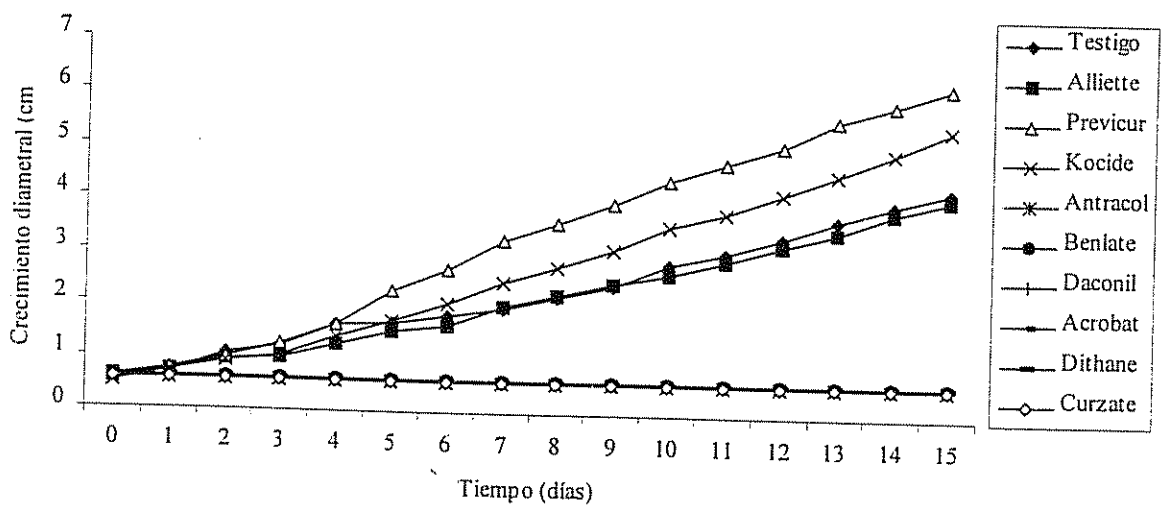


Figura 3. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los fungicidas en concentración de 500 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.

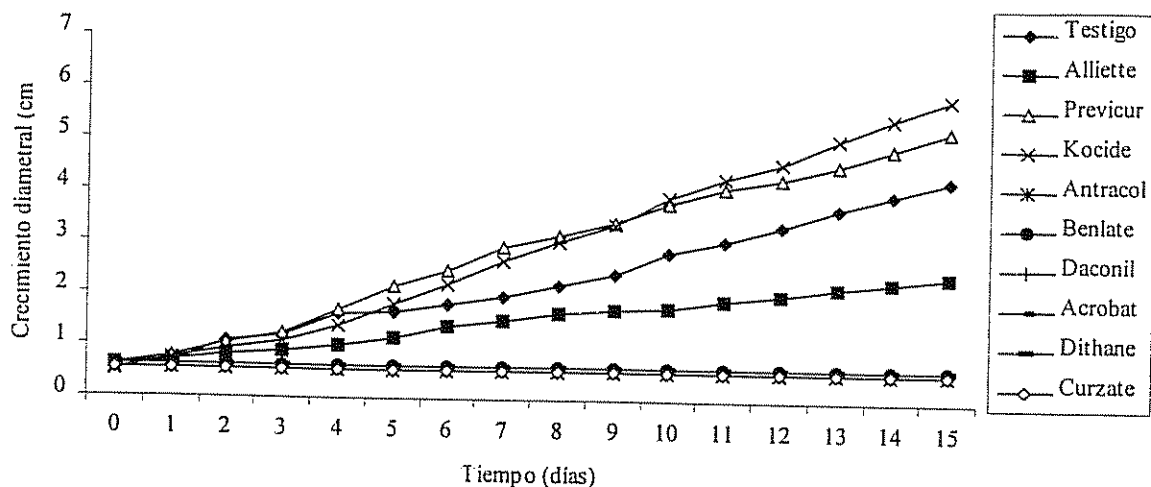


Figura 4. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los fungicidas en concentración de 1000 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.

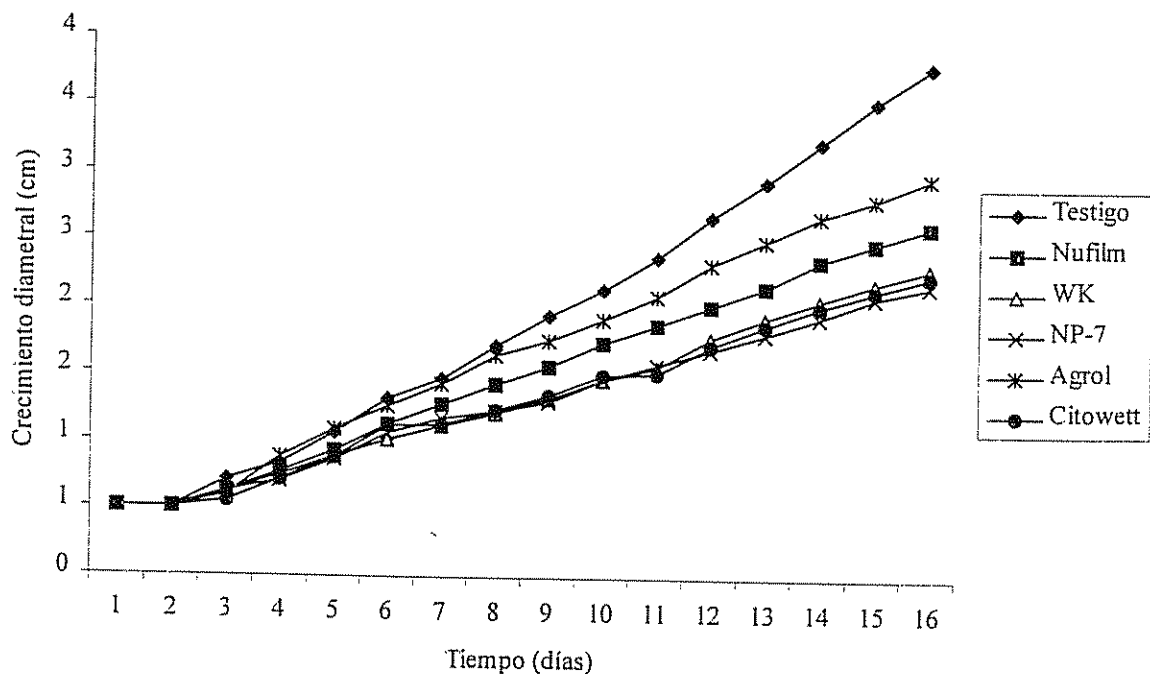


Figura 5. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los coadyuvantes en concentración de 100 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.

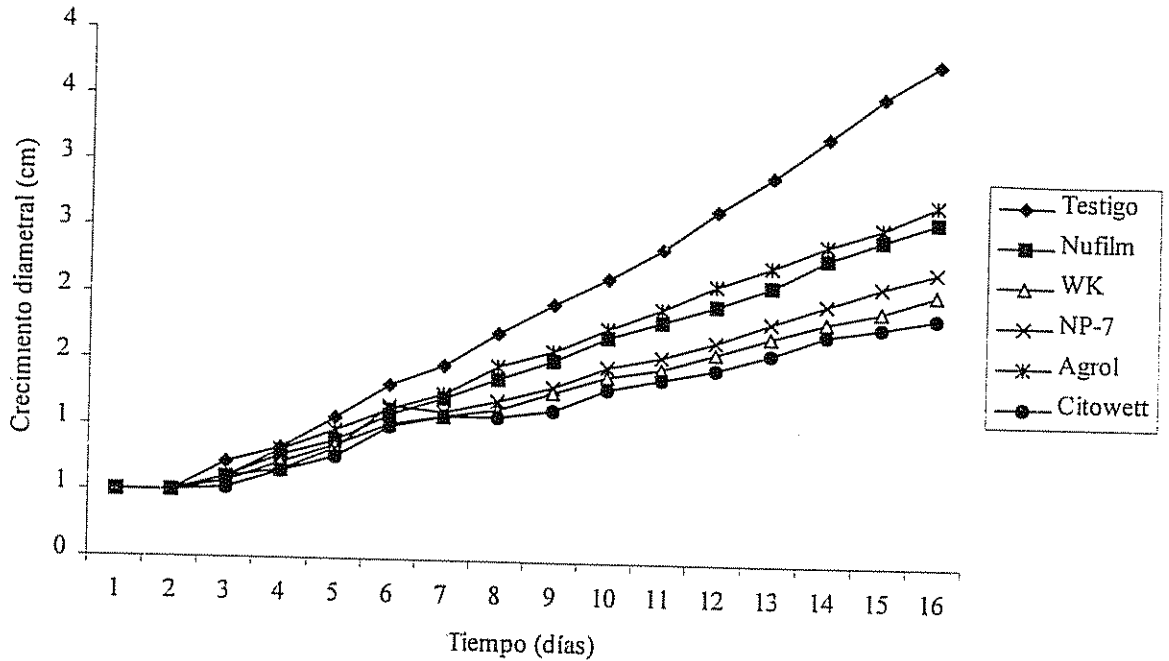


Figura 6. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los coadyuvantes en concentración de 500 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.

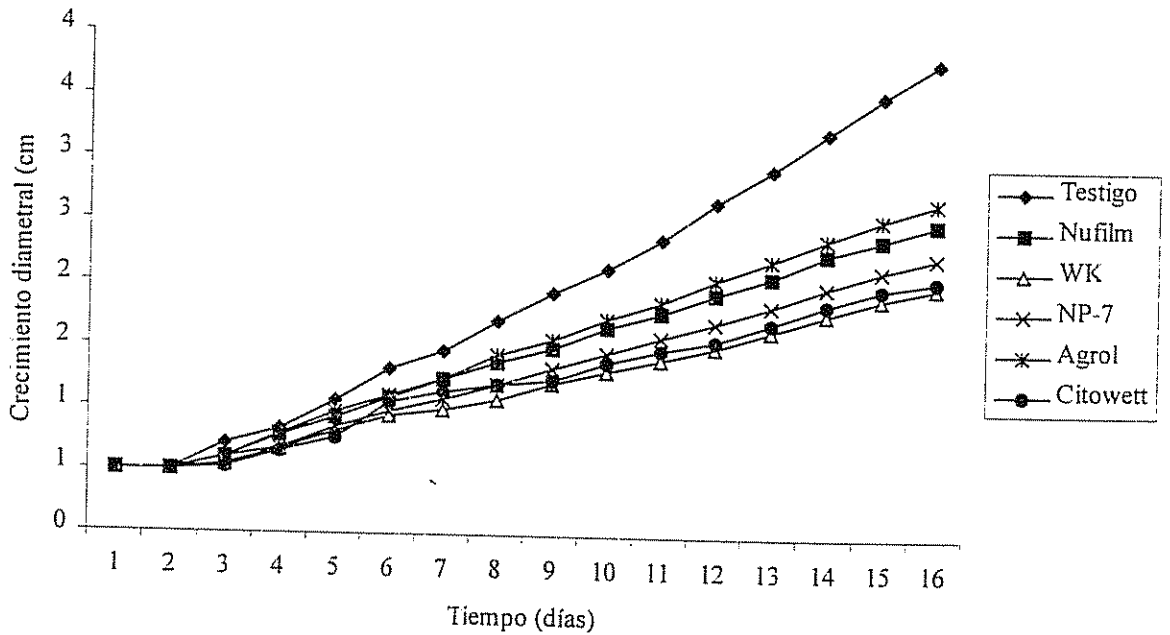


Figura 7. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los coadyuvantes en concentración de 1000 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.

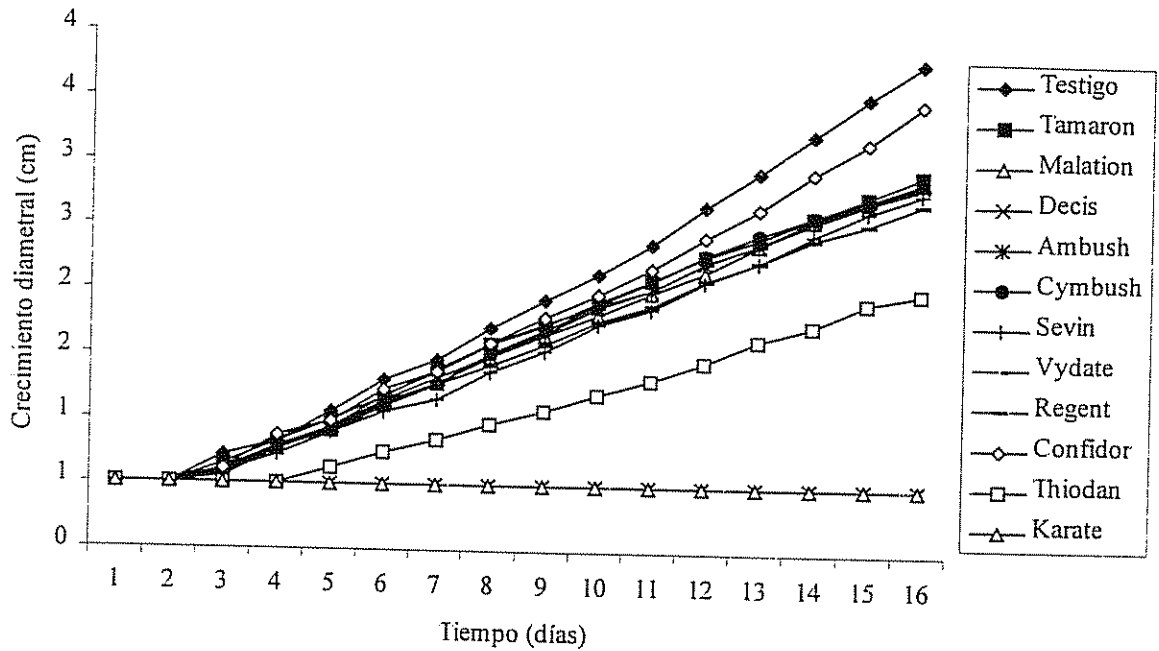


Figura 8. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los insecticidas en concentración de 100 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.

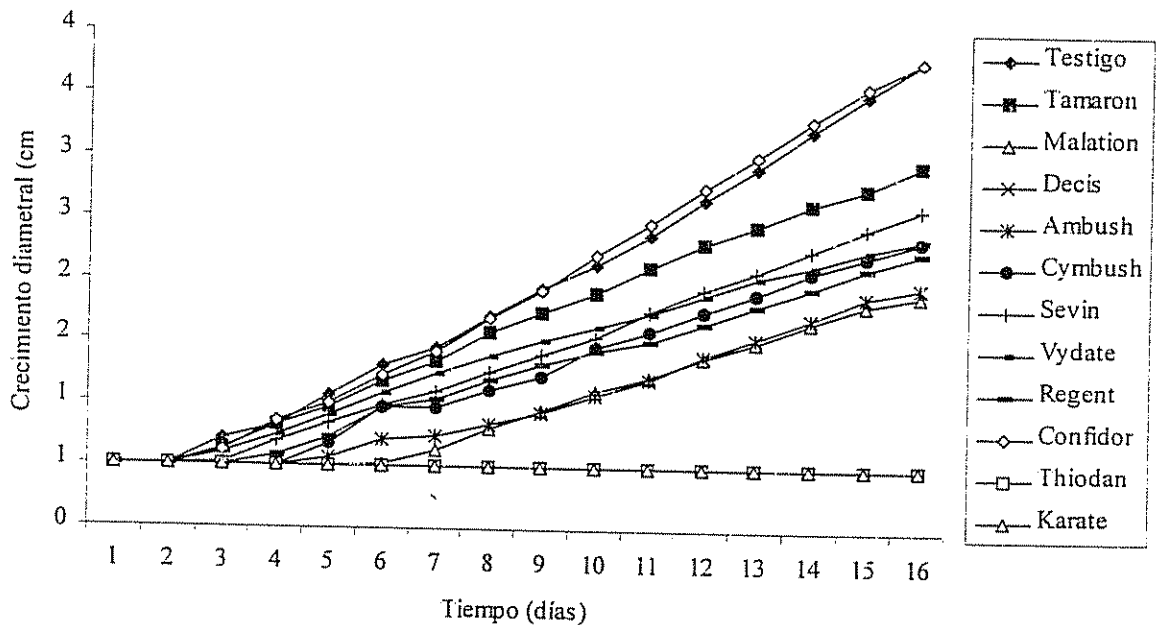


Figura 9. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los insecticidas en concentración de 500 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.



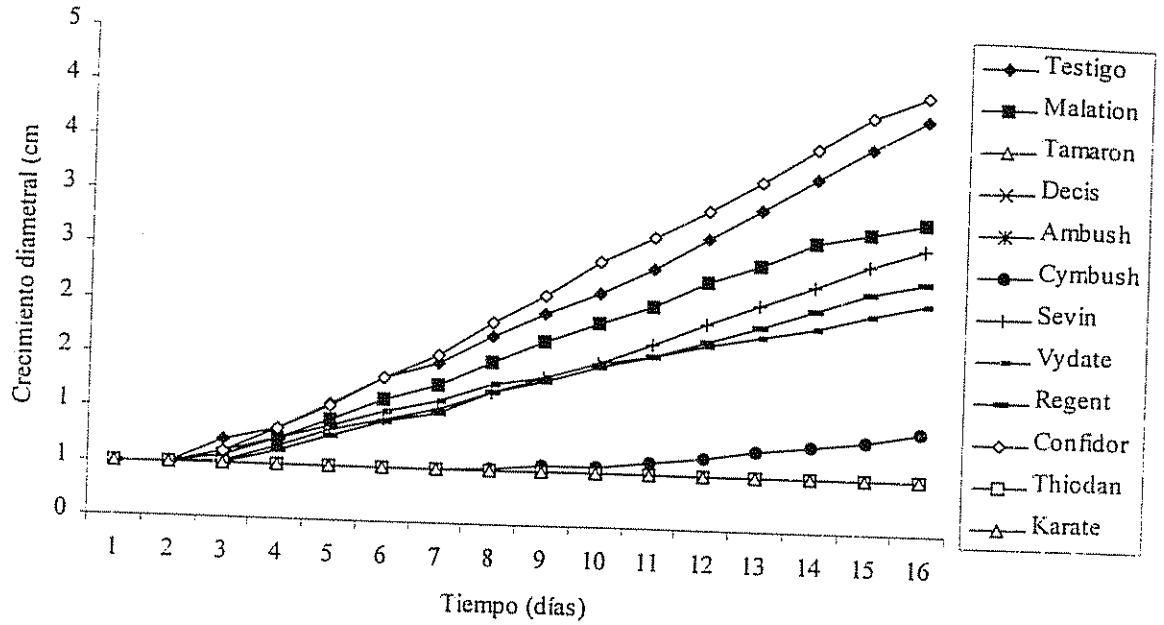


Figura 10. Comportamiento a través del tiempo del crecimiento diametral de *B. bassiana* sobre los insecticidas en concentración de 1000 p.p.m. CATIE, Turrialba, 1998.