

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE COSTA RICA
CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
23 DIC 1999
RECIBIDO
BIBLIOTECA

**EVALUACION DE FORMULACIONES Y METODOS DE ALMACENAMIENTO
DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* PROMISORIOS PARA EL
CONTROL DE BROCA DEL CAFE**

POR

MAIRA FUENMAYOR

CATIE

Turrialba, Costa Rica
1999

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y
ENSEÑANZA PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL
DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO**

RECIBIDO

**EVALUACION DE FORMULACIONES Y METODOS DE
ALMACENAMIENTO DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana*
PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE BROCA DEL CAFÉ**

**Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Postgrado,
Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del
Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como
requisito parcial para optar por el grado de:**

Magister Scientiae

Por

Maira Fuenmayor Morán

**Turrialba, Costa Rica
1999**

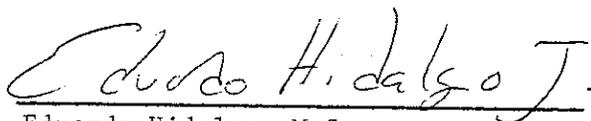
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



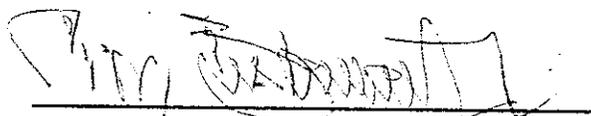
Manuel Carballo, M.Sc.
Consejero Principal



Eduardo Hidalgo, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Daniel Coto, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Elkin Bustamante, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gilberto Páez, Ph.D.
Director y Decano de la Escuela de Posgrado



Maira Fueymayor
Candidato

DEDICATORIA

En memoria de mi abuela Ana a quién siempre recordaré.

A mis: Hijos Alvaro, Sebastián y Mairita.

A mi esposo: Hernán Nieto.

A mis padres: Isidro Fuenmayor y Marcolina de Fuenmayor.

Como fiel testimonio de mi agradecimiento y admiración.

AGRADECIMIENTOS

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

Al FONDO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (FONAIAP) Venezuela, por todo el apoyo financiero brindado para la realización de mis estudios de maestría.

Al M.Sc. Manuel Carballo quien con su apoyo incondicional hizo posible mi formación durante los dos años de estudios.

A los miembros del comité Asesor, Ph D. D Elkin Bustamante, M Sc. Eduardo Hidalgo J., M Sc. Daniel Coto A., por toda la dedicación que a tiempo me brindaron.

A mis hijos y mi esposo quienes con paciencia y amor me apoyaron siempre en estos dos años.

A mis padres que aun estando lejos me contagiaron de esperanza y fe para lograr la meta.

A mis compañeros de maestría: Rosina, Gerardo, Yanira, Eulises, Jorge, Cecilia, Omar, Carlos, y Eduardo quienes con sus nacionalidades forjaron un crecimiento y fortalecimiento espiritual y de armonía durante los dos años acá en CATIE.

Al personal de área de Fitoprotección: Lorena Flores, Arturo Gamboa, Adolfo Martinez, Claudio Arroyo, Edgar Rojas, Miguel Zanabria, Guiselle Alvarado, Guido Zanabria, Isabel Royo, Vera Sánchez, y Nelly Vásquez del laboratorio de biotecnología quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

A Arturo Ramírez quien supo darme muestra de solidaridad y responsabilidad durante el trabajo realizado

A Frank López y Carlos Aguirre del laboratorio de nutrición animal quienes fueron soporte muy importante para la ejecución del trabajo de tesis.

Al personal de la biblioteca muy especialmente a Rigoberto Aguilar y Javier Brenes quienes siempre me brindaron su apoyo y orientaciones durante los dos años continuos de mis estudios.

Al personal de la unidad de informática muy espacialmente a Jhony Pérez y Gustavo López quienes con mucho profesionalismo me brindaron su apoyo.

A todo el personal de postgrado, Marta González, Lucy Agüero, Rosmary Garro, Janette Solano, Emilo Mora, Eduardo Molina, y Alfonso Marín, por toda la amabilidad y eficiencia.

Ami querido Profesor Gilberto Páez quien fue un pilar importante durante mi formación en CATIE.

A mis profesores de Ingles Josphe Mata y Carlos Muñoz por su preocupación y ayuda para la tesis y mi formación integral.

A Francisco Solano (Macho), quien fue siempre un estupendo compañero y profesional dándole a las presentaciones la mas alta calidad en el trabajo efectuado.

INDICE

HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	vi
RESUMEN	ix
SUMMARY	xi
INDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE CUADROS	xv
INDICE DE ANEXOS	xvi
Capitulo I	1
1.- INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.2.- Objetivos	1
1.2.1.- Objetivo General.	2
1.2.2.- Objetivos Específicos	2
1.3.- Hipótesis	3
2.- REVISIÓN DE LITERATURA.	3
2.1.- Origen y distribución de <i>Hypothenemus hampei</i>	3
2.2.- Hábitos y Biología de <i>H. hampei</i> .	3
2.3.- Daños e importancia de <i>H. hampei</i>	5
2.4.- Medidas de Control	6
2.4.1.- Combate cultural.	6
2.4.2.- Combate químico.	7
2.4.3.- Combate biológico microbiano.	7
2.4.4.- Caracterización del hongo <i>Beauveria bassiana</i> .	9
2.4.5.- Descripción del hongo	9
2.4.6.- Hospedantes	10
2.4.7.- Incidencia Natural.	10
2.5.- Modo de acción de los hongos entomopatógenos	10
2.5.1.- Producción de enzima.	10
2.5.2.- Producción de toxinas.	11
2.5.3.- Vías de invasión.	11

2.5.4.- Patogenicidad del hongo <i>B. bassiana</i>	11
2.5.5.- Factores que afectan la eficacia de control	12
2.5.6.- Efectos de los fungicidas sobre <i>B. bassiana</i> .	13
2.5.7.- Factores que afectan la viabilidad de los conidios.	14
2.6.- Métodos de conservación de cultivos de hongos.	15
2.7.- Formulación.	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
3.1 Fase I: Evaluación de formulaciones y métodos de almacenamiento.	17
3.1.1 Localización del experimento.	17
3.1.2. Producción masiva del hongo <i>Beauveria bassiana</i> .	17
3.1.3. Evaluación de las formulaciones.	18
3.1.4. Variables evaluadas.	19
3.1.4.1 Viabilidad de las conidias.	19
3.1.4.2 Evaluación del crecimiento diamétrico.	19
3.1.4.3 Evaluación de la esporulación.	19
3.1.5. Análisis estadístico.	20
3.2 Fase II. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento y esporulación de <i>B. bassiana</i> .	20
3.2.1 Localización del experimento.	20
3.2.2 Evaluación del crecimiento diametral.	20
3.2.3 Efecto de los fungicidas sobre la esporulación.	21
3.2.4 Análisis estadísticos.	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Fase I: Evaluación de formulaciones y métodos de almacenamiento.	22
4.1.1 Viabilidad de conidios.	22
4.1.2. Crecimiento de <i>B. bassiana</i> .	24

4.1.3. Esporulación de <i>B. bassiana</i> .	25
4.2 Fase II. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento y esporulación de <i>B. bassiana</i> .	26
4.2.1 Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento de <i>B. bassiana</i> .	26
4.2.2 Efecto de los fungicidas sobre la esporulación.	27
5 DISCUSION.	28
6 CONCLUSIONES.	31
7 RECOMENDACIONES.	32
8 LITERATURA CITADA.	33
9 ANEXOS.	40

FUENMAYOR, M. M. 1999. Evaluation of formulations and methods of storage of isolations promissory *Beauveria bassiana* for the control of drill of the coffee. Thesis of M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Key words: *Beauveria bassiana*, drill of the coffee, formulations, storage, methods, fungicides, entomopatogens fungi, storage, diametrical growth, biological control, chemical control, Coffee, *Hypothenemus hampei*.

SUMMARY

The fungi entomopatogens used for the control of the coffee borer, is a fundamental option in the development of a program of integrated handling whose purpose is the preservation of the atmosphere and the rational use of chemical insecticides. The fungi conform the biggest group in microorganisms registered as pahogens of insects; however, it seems to exist certain rejection regarding their use as agents of successful control in the field, due to the environmental limitations that could be obviated by means of the use of appropriate formulations. It is considered that *Beauveria bassiana* can play an importan role in the control of coffee borer, under the conditions of the coffee ecosystems. *Beauveria bassiana* is parasitic to *Hypothenemus hampei* in all the development states, especially in times of high humidity.

The objective of this work was to evaluate the effect of the formulations and different storage conditions on some characteristics of two isolations of *Beauveria bassiana* and to know the degree of compatibility with different fungicides

Evaluation of the effect of different formulations and storage methods on characteristic basic of *Beauveria bassiana*.

Four formulations of *B.bassiana* as main treatments were evaluated in oil Agrol 97l, *B. bassiana* in Agrol 85l, *B. bassiana* liofilizada and powdered *B.bassiana*. Two stumps were used (RL-9 AND 9205), two storage temperatures (0(C AND 22(C) and two drying treatments (with and without sílica, which was added inside the formulation of the mushroom). The evaluated variables were: viability of the conidias, diametric growth and esporulación, in each one of the formulations. The results indicated that the formulation liofilizada allowed 100 germination% through the time while the powdered

formulations, oil agrol 97 and agrol 85 diminished the viability of the conidias in both stumps during the experimental period. For the stump RL-9, the sílica had a beneficent effect in conserving the viability, for the powdered formulation, while for the formulation of Agrol 85 the one that allowed bigger level of viability during the 9 months was. The effect of the temperature had interaction with the sílica para the stump 9205, where the powdered formulation with sílica stored at 0(C showed the viability from the conídios to more levels that the one stored at 22(C. As for the variable growth in both stumps of the mushroom through the time, the formulations didn't have effect, since at the end of the experimental period the four formulations behaved equally. Finally the esporulación of both stumps was favored in the powdered formulation, presenting the highest values.

Effect of the fungicides on the growth and esporulation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*.

The effect of different dose of fungicides was evaluated on the growth and esporulation of two stumps of the fungi *B.bassiana* (RL-9 and 9205). The fungicides Kocide was used, Atemi, Cupravit, Silvacur and Daconil, were used to the concentrations 5, 10, 100, 500, 1000 p.p.m. and the respective witness.

The study of the compatibility of the fungicides demonstrated inhibition in the diametric growth and esporing of when it was exposed the fungicidal Silvacur, Atemi, and Daconil in all the evaluated concentrations. The fungicidal Kocide AND Cupravit didn't affect significantly the growth and the esporing. The use of fungi simultaneous entomopathogenic with fungicides in areas where the frequent use of fungicides is made for the handling of pests, he should take into account its compatibility with these products to improve its action on coffee borer.

FUENMAYOR, M. M. 1999. Evaluación de formulaciones y métodos de almacenamiento de aislamientos *Beauveria bassiana* promisorias para el control de broca del café. Tesis de M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, broca del café, formulaciones, almacenamiento, métodos, fungicidas, hongos entomopatógenos, almacenamiento, crecimiento diametral, control biológico, control químico, Café, *Hypothenemus hampei*

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos usados para el control de la broca del café, son una opción fundamental en el desarrollo de un programa de manejo integrado, cuya finalidad sea la preservación del ambiente y el uso racional de insecticidas químicos. Los hongos conforman el grupo más grande de microorganismos registrados como patógenos de insectos; sin embargo, parece existir cierto rechazo respecto del uso como agentes de control exitoso en el campo, debido a las limitaciones ambientales que podrían obviarse mediante el uso de formulaciones adecuadas. Se considera que *Beauveria bassiana*, puede jugar un papel importante en el control de la broca, bajo las condiciones de los ecosistemas cafetaleros. *Beauveria bassiana*, parásita a *Hypothenemus hampei* en todos los estados de desarrollo, especialmente en épocas de alta humedad.

El objetivo de éste trabajo fue evaluar el efecto de las formulaciones y diferentes condiciones de almacenamiento sobre algunas características de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* y conocer el grado de compatibilidad con diferentes fungicidas

Evaluación del efecto de diferentes formulaciones y métodos de almacenamiento sobre características básicas de *B. bassiana*.

Se evaluaron cuatro formulaciones como tratamiento principal *B. bassiana* en aceite Agrol 971, *B. bassiana* en Agrol 851, *B. bassiana* liofilizada y *B. bassiana* en polvo. Se utilizaron dos cepas (RL-9 Y 9205), dos temperaturas de almacenamiento (0°C Y 22°C) y dos tratamientos de secado (con y sin sílica, la cual se agregó dentro de la formulación del hongo). Las variables evaluadas fueron: viabilidad de los conidios, crecimiento diamétrico y esporulación, en cada una de las

formulaciones. Los resultados indicaron que la formulación liofilizada permitió el 100% de germinación a través del tiempo mientras que las formulaciones en polvo, aceite agrol 97 y agrol 85 disminuyeron la viabilidad de los conidios en ambas cepas durante el periodo experimental. Para la cepa RL-9, la sílica tuvo un efecto benéfico en conservar la viabilidad, para la formulación en polvo, mientras que para la formulación de Agrol 85 fue la que permitió mayor nivel de viabilidad durante los 9 meses. El efecto de la temperatura tuvo interacción con la sílica para la cepa 9205, donde la formulación en polvo con sílica almacenada a 0°C mostró la viabilidad de los conidios a niveles mayores que la almacenada a 22°C. En cuanto a la variable crecimiento en ambas cepas del hongo a través del tiempo, las formulaciones no tuvieron efecto, por lo que al final de el período experimental las cuatro formulaciones se comportaron igual. Finalmente la esporulación de ambas cepas se vio favorecida en la formulación en polvo, presentando los valores más altos.

Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento y esporulación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Se evaluó el efecto de diferentes dosis de fungicidas sobre el crecimiento y esporulación de dos cepas del hongo *B. bassiana* (RL-9 y 9205). Se utilizaron los fungicidas Kocide, Atemi, Cupravit, Silvacur y Daconil, a las concentraciones 5, 10, 100, 500, 1000 p.p.m. y los respectivos testigo.

El estudio de la compatibilidad de los fungicidas demostró inhibición en el crecimiento y esporulación cuando fue expuesto a los fungicidas Silvacur, Atemi, y Daconil en todas las concentraciones evaluadas. Los fungicidas Kocide Y Cupravit no afectaron significativamente, el crecimiento y la esporulación. La utilización de hongos entomopatógenos simultanea con fungicidas en áreas donde se hace el uso frecuente de fungicidas para el manejo de enfermedades, debe tomarse en cuenta su compatibilidad con estos productos para mejorar su acción sobre la broca del café.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de varias formulaciones y dos humedades (con y sin sílica) sobre la viabilidad de conidios de *Beauveria bassiana* (9205) a dos temperaturas, a 22 °C (Izquierda) y 0 °C (derecha), a los 6 meses (superior) y 9 meses (inferior). 23

Figura 2. Efecto de varias formulaciones y dos humedades (con y sin sílica) sobre la viabilidad de conidios de *Beauveria bassiana* (RL-9) a los 6 y 9 meses. 24

INDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Efecto de diferentes formulaciones sobre el crecimiento de *Beauveria bassiana* en cm. durante diferentes períodos de evaluación. 25
- Cuadro 2. Efecto de varias formulaciones sobre la esporulación de *Beauveria bassiana* (conidios/ml. x 10^8), durante tres periodos de evaluación. 26
- Cuadro 3. Efecto de diferentes dosis de cinco fungicidas sobre el crecimiento diametral de *Beauveria bassiana* cepa RL-9 en diferentes dosis. 27
- Cuadro 4. Efecto de diferentes dosis de cinco fungicidas sobre la esporulación de *Beauveria bassiana* cepa RL-9. 28

formulación en aceite Agrol 85 fue la segunda mejor formulación, siendo esto muy importante ya que podría almacenarse por un mayor tiempo a un costo más bajo que la liofilización la cual requiere de equipos más sofisticados. Estos resultados son importantes para formular las cepas de *B. bassiana* promisorias para el control de la broca del café, lo cual puede mejorar su eficiencia en el campo, permitir mayor tiempo para almacenar el producto y permitir la comercialización, lo cual podría impulsar el uso de este patógeno en programas de manejo de plagas. En el presente estudio no se define si realmente estas cepas son adecuadas para el control de la broca ya que ambas cepas han demostrado potencial para el control de esta plaga, siendo la 9205 reactivada sobre broca del café en Colombia como de alto potencial, con una mortalidad del 100% (Gonzales *et al.* 1993), mientras que la RL-9, fue evaluada por Lazo, (1990).

Al evaluar el efecto de las formulaciones sobre el crecimiento diametral del hongo los resultados indicaron que no hubo diferencias por efecto de las formulaciones. Esta variable se ve afectada directamente por la viabilidad de los conidios y podría pensarse que al transcurrir mayor tiempo de evaluación, si podría verse afectado debido a una mayor pérdida de viabilidad en algunas de las formulaciones pero que debe seguirse evaluando. Se observó una velocidad de crecimiento mayor en los conidios de la formulación liofilizada, ya que de todas la evaluadas estas eran las primeras en germinar.

Al evaluar el efecto de la esporulación en cada una de las formulaciones, la formulación en polvo obtuvo el mayor porcentaje de esporulación. Probablemente esto se deba a algún factor intrínseco de la formulación, adonde el proceso de liofilización o bien el aceite, reducen la capacidad de esporular del hongo.

Una vez evaluados a nivel de laboratorio la compatibilidad de *B. bassiana* con fungicidas utilizados para el manejo de algunas enfermedades en café, se pudo observar que el hongo crece y esporula a todas la dosis evaluadas de Kocide y Cupravit, pero es afectada negativamente por los fungicidas Atemi, Daconil y Silvacur. Esta información sirve de guía para la toma de decisiones en el manejo de enfermedades del café y la compatibilidad con el combate de la broca mediante el uso de hongos entomopatógenos. Otras medidas de combate de enfermedades en café podrían utilizarse para aminorar el efecto perjudicial de los fungicidas. Una de las estrategias es definir los períodos de aplicación para cada uno de los problemas fitosanitarios adonde se buscaría que no haya traslape entre las aplicaciones de *B. bassiana* contra la broca y la aplicación de los fungicidas. Otra es el

Anexo 15. Nombre genérico, nombre comercial de los fungicidas utilizados en los estudios de susceptibilidad y esporulación de *Beauveria bassiana*. 57

Anexo 16. ARTICULO I: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES FORMULACIONES Y MÉTODOS DE ALMACENAMIENTO SOBRE CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *B. bassiana*. 58

Anexo 17. ARTICULO II: EFECTO DE ALGUNOS FUNGICIDAS SOBRE EL CRECIMIENTO Y ESPORULACIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*. 77

CAPITULO 1

1.1 INTRODUCCION GENERAL

El café es atacado por varias plagas en sus distintas fases de desarrollo, siendo las de mayor importancia, las que causan daño directamente en los frutos como la broca (*Hypothenemus hampei*). La broca *H. hampei*, nativa de Africa, se encuentra en México, parte de Centro América, Sur América, y el Caribe. En Costa Rica la broca del café no se ha detectado hasta el momento. Esta plaga es de gran importancia económica. Los principales daños ocurren en el fruto, causando disminución del peso, depreciación del grano y pérdida de la calidad de productos (bebida) por la presencia de impurezas. Este insecto causa grandes pérdidas en las zonas sembradas del cultivo, ya que en muchas ocasiones se hace incontrolable y ocasiona pérdidas totales.

El control de la broca se basa en la utilización del manejo integrado de plagas como: el control cultural, control biológico y el control químico, este último con múltiples dificultades por su residualidad, precio y contaminación ambiental, por lo que se plantea la utilización de hongos entomopatógenos como la herramienta de mayor importancia. Estos hongos podrían aplicarse para el control de adultos cuando estos inicien la perforación del grano. Los trabajos que se han llevado a cabo sobre broca, demuestran que estos hongos, entre los que sobresalen *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, tienen un alto potencial para el control microbiano de esta plaga. Aunque los insecticidas microbiales representan menos del 1% del mercado total de insecticidas, el control microbiano de insectos, está ganando importancia. El crecimiento anual del uso de este tipo de productos es de 10-25 %, siendo *Bacillus thuringensis* el más utilizado; por el contrario, el uso de insecticidas químicos crece entre el 1-2 % por año (Starnes, 1993). Esto ha generado mucho interés en la producción masiva, formulación, técnicas de aplicación y posibilidad de comercialización de estos agentes microbianos (Carballo, 1998).

Dentro de los factores que pueden limitar la efectividad del hongo *B. bassiana* se encuentra la compatibilidad con los productos químicos de uso en el manejo de enfermedades o de la misma broca de los cuales existen productos que pueden inhibir la fisiología del hongo, entre ellos, los fungicidas benomyl, propiconazol y zineb. Los herbicidas, como el oxyfluorfen, paraquat y alaclor los reguladores de crecimiento flurprimidol, salid y el coadyuvante en aspersión triton CS-7, han demostrado la inhibición en el crecimiento micelial.

El desarrollo de formulaciones de hongos entomopatógenos es de vital importancia para el uso exitoso de los micoinsecticidas (Daoust *et al* 1982, 1983). La formulación tiene como objetivo principal mejorar la vida media de los conidios, aumentar la estabilidad durante el almacenamiento, permitir su comercialización y mejorar su eficacia en el campo (Carballo, 1998). La formulación de los conidios de los entomopatógenos debe reducir el efecto negativo que tienen diferentes factores sobre su viabilidad, como: la exposición a la luz solar (Roberts, 1971), la humedad. El éxito de un patógeno como plaguicida microbial no depende solo de su virulencia. Este necesita ser formulado de tal manera que su almacenamiento sea óptimo y así mantener su virulencia para luego ser aplicado con métodos económicos y eficaces (Lacayo, 1995). La selección de las especies y tipos con las mejores características es de gran ayuda para formular con éxito un pesticida microbial. Este es un aspecto muy importante en el éxito de los insecticidas microbiales (Lacayo, 1995).

Se considera una formulación a la combinación de un biocida activo con material secundario (Couch, 1981). Una formula entomopatógena debe mantener la viabilidad patógena y su virulencia durante la formulación. El resultado final es un producto que no solo preserva sino que puede mantener las propiedades del patógeno. Una buena formulación necesita tener la correcta combinación de ingredientes, adecuadas para su aplicación en el campo y producir un producto económico con un largo periodo de vida en almacenamiento. En algunos casos la formulación puede mejorar la efectividad de el ingrediente activo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General.

Desarrollar formulaciones del hongo entomopatógeno *B. bassiana* con potencial para el control de Broca y conocer diferentes factores que afectan sus propiedades.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la viabilidad, crecimiento y esporulación de las formulaciones de *B. bassiana* bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura.
- Determinar el efecto de los fungicidas usados en el control de enfermedades en café, sobre las características del hongo entomopatógeno.

1.3. HIPOTESIS

Ho: La viabilidad, el crecimiento y la esporulación de *B bassiana* se mantendrá por igual tiempo, en las diferentes formulaciones y condiciones en que estas son almacenadas.

Ho: Los agroquímicos utilizados para el manejo de enfermedades, no afectan el crecimiento y esporulación de *Beauveria bassiana*.

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1. Origen y distribución de *H. hampei*

H. hampei, es un insecto originario de Africa Ecuatorial, probablemente del Congo, Uganda y Kenia (Sánchez, 1985), de donde se diseminó a otras partes del mundo. La broca se encontró por primera vez en Francia, en frutos importados desde Africa, entre 1908 y 1965. En Asia entre 1904 y 1963, y entre 1922 y 1968, se a difundido en la mayoría de los países cafetaleros de América (Le Pelley, 1973). La broca fue introducida de manera accidental en Brasil en 1920, en Perú en 1959-1960, a través de granos infectados provenientes de Brasil (De Ingunza, 1964). En 1971 se detectó en Guatemala, extendiéndose a los países vecinos. En Honduras se detectó en 1977, en México en 1978. En El Salvador y Ecuador en 1981, en Nicaragua en 1988, en Colombia en 1989 y en Venezuela en 1995 (Rocha, 1984; Campos 1985; Muñoz, 1985; Molinari, 1988, Dufour, 1994). Se ha encontrado en frutos de varias especies de *Coffea*, siendo una plaga de *C. robusta*, y en áreas bajas en *C. arábica* en muchos países (Hill, 1975; Urbina, 1986).

2.2 Hábitos y Biología de *H. hampei*.

La broca del fruto del café, tiene una metamorfosis completa, es decir pasa por los estadios: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos son de forma globosa, ligeramente elípticos, siendo al principio de color blanco lechoso y a medida que el período de incubación progresa, se tornan de color blanco hialino, y próximos a la eclosión, toman un color amarillento. Su tamaño oscila entre 0.45- 0.83 mm de largo.

Las larvas son de color blanco lechoso y de consistencia blanda. Son ápodas, y con una cápsula cefálica parda y bien esclerotizada, provista de mandíbulas fuertes proyectadas hacia el frente miden de 1.88 a 2.30 mm de largo.

Las pupas tienen una coloración amarillenta al principio, cambiando a pardo pálido poco antes de emerger el adulto. Conforme la pupa se desarrolla, se puede apreciar la cabeza con sus ojos, las antenas y la boca definida, así como las alas y las patas. La duración del estado de pupa es muy variable, debido a los factores bióticos y abióticos, teniéndose un mínimo de 4 días hasta un máximo de 10 días (García, 1983).

El adulto es un escarabajo de tamaño minúsculo y la hembra mide 1.77 mm., vuela de un árbol a otro para ovipositar. Los machos son más pequeños, miden 1.20 mm de longitud y nunca vuelan, manteniéndose en la cereza, fertilizando a las hembras de la camada (Le Pelley, 1973). En ambos sexos, el cuerpo está cubierto por cerdas y en la parte anterior del protorax se observan una serie de protuberancias, parecidas a dientes que le da la apariencia de una corona (García, 1983).

La broca es atraída al fruto por su color, olor y forma, así mismo se ha comprobado que es atraída por los desechos de frutos y las heces de las otras brocas. En estudios de olfatometría se observó que existen diferencias en atractividad entre distintas especies y variedades de café (Castro, 1990).

Cuando llega a un fruto la hembra toma aproximadamente de 3 a 5 horas para perforar el endospermo, donde construye una galería que la utiliza como cámara de oviposición (Penagos y Flores, 1974). La broca tiene una dispersión agregada, en las plantas de cafeto, se observa, al dividir la planta en 3 tercios, que las bandolas del tercio medio son las más infestadas (Baker, 1986)

La broca oviposita entre 2 a 3 huevos por día (Sreedharán, et al 1984) con un promedio de 74 huevos en su ciclo de vida. Las hembras fecundadas van en busca de frutos adecuados para su primera oviposición. Una vez que las hembras han iniciado su oviposición, pueden emigrar en busca de cerezas con mayor contenido de humedad, obligadas a abandonar las cerezas cuando están demasiado calientes por el sol. También debido a la destrucción avanzada de las semillas, aglomeración de adultos y larvas, o si la cámara de cría se inunda de agua, caída de frutos, introducción de larvas y/o insectos intrusos (De Oliveira, 1927, citado por Hernandez y Sánchez 1972)

2.3. Daños e importancia de *Hypothenemus hampei*.

La hembra de la broca inicia su perforación en la mayoría de los casos, en la corona del fruto, esto es en el extremo opuesto a la base. La hembra perfora hasta el endospermo donde empieza a depositar sus huevos. Si el fruto no tiene la consistencia adecuada, (menos de 20% de materia seca), la hembra permanece en el canal de perforación sin penetrar el endospermo. Si la perforación se inicia cuando los frutos están muy pequeños, (estado lechoso) el principal daño consiste en la caída del fruto, con la consecuente reducción del rendimiento. El mayor daño es causado cuando el fruto está en estado de consistencia (más de 100% de peso seco), ya que en esta etapa el endospermo, es duro, ofreciendo un sustrato adecuado para la oviposición y alimentación de los adultos y el desarrollo de los estados inmaduros. Este daño da como resultado, la pérdida de peso del grano, reduciendo el rendimiento (Decazy, 1991).

Las pérdidas que ocasiona este insecto, lo han elevado a la categoría de plaga número uno de la caficultura mundial. Varios autores citados por Le Pelley (1973), señalan las pérdidas que este insecto a causado en algunos países de Africa: Hearnreaves, 1936 cuantificó que el 80% de los frutos se encontraban infestados en una plantación de Uganda; Cobertt, 1975 constató el 90% de cerezas perforadas en una localidad de Malaya. En Costa de Marfil, este insecto ataca del 5 al 20% del cultivo y en ocasiones se eleva hasta un 50 a un 80%. En el Congo se han obtenido datos de infestación de 80% en frutos verdes y 96% en frutos maduros (Molinari, 1988). En Sao Paulo, Brasil, se citan pérdidas que oscilan entre el 60 y 80% en plantaciones donde no se aplicaron medidas de control. De Ingunza, (1964), señala que el valle de Satipo, Perú, la cosecha fue mermada en un 30%. En Guatemala la cantidad de cereza, disminuyó en un 25% o más y el deterioro de la calidad comercial alcanzó algunas veces hasta el 50% (Anacafé, 1981).

Monterroso (1981), indica que las pérdidas ocasionadas por broca, puede ser estimada en función al % de frutos infestados, por ejemplo, cuando el café cereza tiene 0% de infestación, se obtienen 22 Kg. de café Pergamino, por cada 100 Kg. de cereza madura, pero cuando se tiene 100% de frutos infestados, se obtienen únicamente 9.44 Kg./por cada 100 Kg. de café cereza maduro. Esto representa una pérdida del 57,1% en peso, por lo tanto es lógico que el productor tenga que enfrentar otro problema, como es el castigo en el precio de compra (Alonso, 1985). En algunas ocasiones el productor vende su cosecha en café cereza, por lo que el comprador ha determinado la cantidad de este producto necesario para obtener 1 quintal de café oro. García,(1983), indica que en Guatemala

se necesitan 5,61 quintales de café cereza, para obtener 1 quintal de café oro, en tanto que con el 100% de frutos infestados, el productor deberá entregar 13,23 quintales de café cereza, para que el comprador obtenga 1 quintal de café oro (Méndez, 1990).

2.4. Medidas de Control.

Los niveles de infestación de broca en el campo, sugieren que los niveles del 5% de daño, justifican la puesta en práctica de todas las herramientas de control, para evitar pérdidas económicas de consideración.

2.4.1. Combate cultural.

Los objetivos a lograr mediante la aplicación de las practicas culturales, son reducir las poblaciones de broca, y propiciar las condiciones de un microclima desfavorable al desarrollo de la plaga. Para ello es necesario realizar una serie de labores como son podas de árboles de sombra, podas del cafeto, aumentar la distancia de plantación de los cafetos, control de malezas, y la aplicación adecuada de fertilizantes (Decazy, 1991). Posiblemente lo que más sobresale del control cultural, es la recolección de frutos después de la cosecha, esta es una actividad que se recomienda realizar en todas aquellas áreas en donde la broca se encuentra establecida, para lo cual es necesario recoger todos los frutos que se encuentran en el árbol o en el suelo (Vega y Romero, 1985; Decazy, 1988). Estas labores están plenamente justificadas, ya que la continua disponibilidad de alimento durante todo el año permite la sobrevivencia y reproducción de la plaga y la subsistencia de la misma de una cosecha a otra (Molinari, 1988). Otra labor no menos importante que las anteriores, es la conocida como repase, que consiste en la recolección de los frutos tempranos, productos de las floraciones locas; estos frutos representan una mínima parte de la cosecha total, pero son los primeros en ser atacados por la broca, por lo que se recomienda cosecharlos antes para evitar que la broca tenga progenie en su interior (Anacafé, 1981; Decazy, 1985; Méndez, y Velazco, 1987). Los frutos producto de la recolección pueden tener varios destinos dependiendo del grado de infestación; si están muy deteriorados y existe abundancia de estado biológico, lo más recomendable es enterrarlos, previo tratamiento con Endosulfán polvo al 3%. En el caso en que aún puedan ser aprovechados, deben sumergirse en agua hirviendo durante 5 minutos, para eliminar cualquier fase de desarrollo de la plaga (Coronel, 1978; Rocha, 1984; Decazy, 1985).

2.4.2. Combate Químico.

La recomendación más generalizada para el control químico de la broca en México, Guatemala, El Salvador y Honduras, es el uso del insecticida endosulfán. Méndez (1990) indica que 600 ml. de Thiodán 35 CE en 200 lts. de agua por hectárea, proporciona un control eficiente de la broca. Muñoz señala que aplicando 1.5 lts. de Thiodán, 35 CE en 500 lts. de agua por hectárea, produce buenos resultados controlando la broca. Ochoa et al (1987) menciona que la dosis de 1.5 lts. de Thiodán 35 CE en 500 lts. de agua por hectárea, controla satisfactoriamente. Penado y Ochoa (1987) recomiendan hacer solo una aplicación cuando el fruto está en estado de semiconsistencia, lo que se alcanza a los 137 días después de la floración a 1000 msnm. y a los 147 días a 1300 msnm. La aplicación se debe realizar también cuando hay un 5% de frutos perforados.

2.4.3. Combate biológico microbiano.

Los hongos entomopatógenos usados para el control de la broca del café, son una opción fundamental en el desarrollo de un programa de manejo integrado, cuya finalidad sea la preservación del ambiente y el uso racional de insecticidas químicos. Los hongos conforman el grupo más grande de microorganismos registrados como patógenos de insectos; sin embargo, parece existir cierto rechazo respecto al uso de estos como agentes de control exitoso en el campo, debido a las limitaciones ambientales que podrían obviarse mediante el uso de formulaciones adecuadas (Velez, 1998).

Se considera que los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, pueden jugar un papel importante en el control de la broca, bajo las condiciones de los ecosistemas cafetaleros. *B. bassiana*, parasita a *Hypothenemus hampei* en todos los estados de su desarrollo, especialmente en épocas de alta humedad. Este hongo fue encontrado infestando a la broca del cafeto, en el Congo Belga en 1933. De Ingunza (1964) por ejemplo constató la presencia de este hongo en Perú en 1982. Monterroso en 1985, reporto haber encontrado adultos de broca muertos por *B. bassiana* en Guatemala. Molinari 1988, da cuenta de este hongo en el Ecuador. Villacorta en 1984, constató la presencia del hongo en el estado de Paraná en Brasil. Le Pelley (1973), reporta la presencia del hongo en Java. Ticheler 1963, menciona la existencia de *B. bassiana* en Costa de Marfil. Pascalet (1939), da cuenta de él en Camerún, y Lavabre (1961) lo menciona como enemigo importante de la

broca en Uganda. Siemaszko (1973) realizó experimentos con diferentes especies de *Beauveria* y determinó que bajo condiciones tropicales, se adapta a la broca del café.

Este hongo es considerado como el mejor medio para controlar la broca, ya que se le encuentra en cualquier lugar en que se presente la plaga, independientemente de la variedad del café de que se trate; sobre todo en la zonas boscosas con lluvias abundantes (Molinari, 1988; Pacalet, 1939).

Respecto al grado de maduración de los frutos, el mayor porcentaje de insectos infestados corresponde a frutos verdes con 48% mientras que, en los frutos maduros alcanzan un 3%. Se ha explicado que el hecho de que los insectos en los frutos verdes, fueran mas susceptibles a la infección, posiblemente se deba a la humedad; aunque no hay correlación entre las lluvias y la infección. ~

La infección por el hongo se efectúa en la superficie del fruto y es posible que ocurra cuando los insectos estén volando de un fruto a otro para ovipositar. Por otro lado, el frío es otra causa que predispone a los insectos al ataque del hongo, ya que en esta época desarrollan más actividad que en los días soleados. Pascalet (1939) señala que el hongo forma una capa algodonosa de color entre blanco y rosado en la entrada del orificio perforado por la broca, y que el ambiente ecológico para su desarrollo es de alta humedad relativa, aproximadamente del 80% y es más frecuente observarlo sobre los frutos verdes atacados por la plaga. Este autor menciona que los pre-requisitos para el establecimiento de epidemias del hongo, entre las poblaciones de broca, incluyen: abundancia de los insectos, temperatura de 20 a 30°C, precipitación inicial que proporcione al hongo la humedad suficiente para una esporulación intensa y estímulo para que las brocas se establezcan en las plantas; se ha establecido que el límite inferior de humedad relativa para la germinación de esporas de Deuteromicetes que infectan insectos terrestres es aproximadamente 92% y que el microambiente en la superficie del insecto puede proveer condiciones favorables para el desarrollo de estos hongos. Sin embargo algunos autores afirman que entomopatógenos como *B. bassiana* y *M. anisopliae* no requieren altas humedades relativas o presencia de agua libre para causar infección, esto se confirma en estudios con formulaciones en aceite de *Beauveria bassiana* para el control de *Panthorythes plutus* (Coleótera: Curculionidae), en los cuales sólo se requiere alta humedad para la producción y dispersión de esporas (Velez, 1998).

También dentro de los requerimientos de *B. bassiana* este necesita de uno o dos días de sol para reducir la humedad y facilitar la dispersión uniforme de los conidios por las corrientes de aire; luz, y "

obscuridad para promover el desarrollo de los conidios. Las hifas paralizan el movimiento del insecto y luego ejercen una acción química, matando al huésped después de un periodo máximo de 6 días.

2.4.4. Caracterización del hongo *Beauveria bassiana*.

Este hongo fue descrito originalmente por Agostino Bassi, quien realizó varios experimentos para demostrar que la enfermedad denominada "Muscardina Blanca". "Mal de Segno", o "calcino", era ocasionada por este hongo.

Clasificación Taxonómica.

División: Amastigomycota

Subdivisión: deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes

Orden: Moniliales

Genero: *Beauveria*

Especie: *bassiana*

2.4.5. Descripción del hongo

B. bassiana ha sido descrito como un hongo de apariencia algodonosa blanco o amarillo cremoso con aspecto polvoso. El micelio se ramifica formando conidióforos simples e irregulares que terminan en verticilios en forma de racimos. Las células conidiógenas están densamente agrupadas, tienen una base globosa o forma de botella y el raquiz es denticulado en zigzag y se extiende apicalmente con un conidio por denticulo. El conidio es aseptado, globoso y < a 3,5 micras (Carballo, 1998). Los conidios son hialinos, redondeados u ovalados de 3-3,5 milímetros de diámetro que se producen en forma individual sobre pequeñas salientes o esterigmas (Pascalet, 1939, Barnett y Hunter, 1922). Los cadáveres de insectos infectados por este hongo, presentan una cubierta blanca muy densa formadas por el micelio y esporulación del hongo.

2.4.6. Hospedantes.

Roberts y Yendol (1971) señalan que las enfermedades fungosas son más comunes en ciertos grupos taxonómicos como lepidópteros que comprenden a las mariposas y palomillas, cuyo estado susceptible es la larva; Hymenoptera (abejas); Diptera (moscas y mosquitos) y coleoptera (escarabajos barrenadores) entre otros.

2.4.7. Incidencia Natural.

Existen muchos reportes de la incidencia natural de *Beauveria bassiana* causando epizootias que varían en magnitud, sobre insectos de importancia agrícola y forestal en su mayoría. Steinhaus (1985) menciona que tan solo en Norte América se conocen 175 especies de insectos susceptibles a *Beauveria bassiana*, hongo que puede ser utilizado para el control de insectos destructivos. La efectividad de su control varía con las condiciones del clima, ya que con alta humedad puede causar la muerte de los dos terceras partes de la población, aunque existen años en que su incidencia carece de importancia.

2.5. Modo de acción de los hongos entomopatógenos

2.5.1. Producción de enzimas

Con la ayuda de una enzima secretada en el ápice de las hifas durante el proceso de penetración este hongo alcanza a penetrar la cutícula de los insectos. Samsinakova et al (1971) evaluaron la acción del sistema enzimático sobre la cutícula de las larvas de la palomilla de la cera *Galleria mellonella* y sugirieron que la secreción de las enzimas lipasas, proteasas y quitinasas facilitan la penetración del hongo a través de la cutícula del insecto infestado. Estos investigadores aplicaron enzimas comerciales en forma individual, obteniendo como resultado la desintegración de lípidos, proteínas y quitina según la enzima específica, sin embargo, cuando se aplicaron en mezcla causaron la desintegración total del tegumento. Con base en esto, se señala que las lipasas y proteasas son las primeras que actúan, en tanto que la quitinasa actúa al final (Person, 1984; Bidochka y Khachatourians, 1987). Estudios de electroforesis muestran que este hongo presenta dos tipos de actividades enzimáticas, las oxido-reductasas, como la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, la monofenol monooxigenasa y catalasa. Las otras enzimas se encuentran en el grupo de las hidrolasas

dentro de las cuales se mencionan las esterasas, desoxirribonucleasas, ribonucleasas, B glucosidasa, B glucuronidasas, quimiotripsina A y las proteasas (Duriez-Vaucelle, 1981).

2.5.2. Producción de toxinas.

El "beauvericin" es un depsipéptido que fue separado del micelio de *Beauveria* con metanol; extraído en acetato de etilo y purificado por cromatografía sobre la albúmina básica. El compuesto contiene tres unidades, cada una consiste de (1)-N-metilfenilalanina y (d)-alfa-hidroxiácido isovalérico en un anillo macrocíclico (Hamill et al, 1971).

2.5.3. Vías de invasión.

Madelin (1967) observó estructuras parecidas a apresorios en cultivos in vitro, ellos consideran que en la penetración del insecto por el hongo existe la formación de apresorios como en el caso de los patógenos de las plantas, de tal forma que el hongo ejerce una presión mecánica y una acción enzimática. A las 48 horas de ocurrida la invasión, el hongo circula en la hemolinfa, invadiendo toda la cavidad de la larva en forma de cuerpos hifales, generalmente las células sanguíneas no pueden detener la invasión masiva del hongo, ya que este se multiplica rápidamente (Prasertphon, 1968).

2.5.4. Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana*

Las esporas o conidias del hongo son las estructuras infectivas y una vez que entran en contacto con el tegumento de la broca, germinan y penetran al cuerpo, inmovilizándola a las 48 horas como máximo, luego continua su desarrollo internamente en el insecto hasta causar la muerte. Las estructuras de reproducción emergen del cuerpo de la broca a los 8,5 días produciendo de nuevo conidias que pueden establecerse en el cafetal y reproducirse bajo condiciones favorables de humedad y temperatura. Los hábitos y estado de desarrollo del huésped afectan su susceptibilidad hacia un patógeno. Debido a sus hábitos la fase más vulnerable de *H. hampei* es la fase adulta; la hembra pasa el período de post cosecha en los frutos caídos en el suelo y los dejados en la planta.

Se ha sugerido que las hembras pueden ser atacadas por *B. bassiana* y reducir la fuente de infestación de la plaga para la próxima fructificación (Alves, 1986).

Otro factor que influye es la edad del huésped; así por ejemplo, Ferrón (1975) encontraron que adultos de *Acanthoselides obtetus* (Coleoptera: Bruchidae) de dos a cuatro horas de edad son más susceptibles a *B. bassiana* que los de dos y cinco días. El tegumento del insecto es una barrera físico-química que varía de insecto a insecto. Durante la estación lluviosa los insectos encuentran condiciones favorables para la deposición de ceras en el tegumento. En la época seca, la secreción de cera es activada y los insectos se vuelven más resistentes a la penetración del hongo (Alves, 1986).

2.5.5. Factores que afectan la eficacia de control

La concentración letal que es el número de unidades infectivas para matar al insecto. Un patógeno es más efectivo entre menor sea la concentración letal, sin embargo se sabe que concentraciones más bajas son más efectivas en estados iniciales de la plaga pero conforme el insecto es más viejo se requiere una mayor concentración de los patógenos para que este sea efectivo (Carballo, 1998).

El tiempo de aplicación, el cual está relacionado con la mayor susceptibilidad de estadios jóvenes y las condiciones climáticas, ya que la lluvia por ejemplo tiene efectos negativos en la persistencia de los patógenos. La cobertura de una aplicación en el follaje es muy importante para asegurar el éxito del control. Generalmente esto se puede asegurar mediante una formulación adecuada y un equipo de aplicación apropiado. El grado de acidez del agua usado como vehículo para disolver las unidades infectivas, influyen sobre la actividad del hongo, estos tienen un rango de acidez apropiado que es importante conocer.

Así mismo en la naturaleza existen agentes antagonistas o antibióticos que impiden la acción de los hongos o impiden su desarrollo, principalmente en el suelo y estos pueden afectar negativamente la eficacia de los patógenos. Muchas plantas producen sustancias que inhiben la actividad de los agentes microbiales. Por ejemplo el alcaloide tomatina en las plantas de tomate que inhiben la formación de colonias o el crecimiento de *B. bassiana*.

La compatibilidad con productos químicos de uso en el cafetal, pueden tener efectos sinérgicos y antagonistas; se puede mencionar a los fungicidas que son los más perjudiciales o incompatibles con los hongos. Sin embargo algunos insecticidas usados en dosis bajas pueden hacer que los insectos sean más susceptibles a los hongos al aumentar su grado de estrés, una de las ventajas de los entomopatógenos es que ellos tienden a ser específicos y por lo tanto son compatibles con los parasitoides, depredadores, y otros patógenos, así mismo la resistencia del hospedante ya que cada

especie de hongo es específico a insectos en particular pero también hay inmunidad por maduración del insecto. Los factores ambientales también pueden afectar la susceptibilidad de los insectos a los entomopatógenos. También existe la variabilidad genética en la habilidad de los insectos para responder a los patógenos y resistencia genética a patógenos (Alves, 1986; Leucona, 1996).

2.5.6. Efectos de los fungicidas sobre *B. bassiana*.

B. bassiana en evaluaciones *in vitro* es afectado en alto grado por los fungicidas que inhiben, en las dosis comercial, hasta el 100% de la germinación y el crecimiento micelial. La inhibición es menor con los insecticidas en las dosis comercial hasta en un 50%. (Posada, 1992). Los fungicidas que presentan mayor efecto deletéreo sobre *B. bassiana* son triadimefon y hexaconazol y en menor grado el oxiclóruo de cobre (Posada, 1992).

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 criterio radial de la colonia como criterio de inhibición, Clark *et al* (1982), Gardner y Storey (1985), Storey y Gardner (1986), consideran la germinación conidial como un criterio de compatibilidad. Estas variables permiten visualizar si existe algún efecto deletéreo sobre el hongo, como 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, citados 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 1983; Batista *et al*, 1994; Rivera 1993).

Patridge y Rich (1962), consideran que los hongos expuestos continuamente en ciertos fungicidas (Sulfato de cobre, glyodin, captan, sulfuro), presentan alguna tolerancia a concentraciones crecientes 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.

2.5.7. Factores que afectan la viabilidad de los conidios.

Los factores que afectan la supervivencia de los conidios del hongo en la formulación o durante su aplicación en el campo son :

Exposición a la luz solar: La vida media de los conidios aplicados en hojas expuestas a la luz solar es de aproximadamente 2 horas, debido a que la luz ultravioleta causa su muerte (Roberts 1989). De acuerdo a Goettel e Inglis, 1997, la radiación ultravioleta -B (295-320) es la más perjudicial.

Contenido de humedad: La humedad es un factor determinante en la supervivencia de los conidios. Cuando éstos están secos, pueden mantener un nivel de germinación alto durante 3 meses a 30°C (Moore *et al.* 1995). La viabilidad de los conidios sin secar y almacenados a 8°C se reduce de 80% a 6% en 51 semanas y a 0% en más de 60 semanas. Por el contrario, en conidios secos en sílica gel con aceite, la viabilidad decrece de 95 a 90% a las 51 semanas y a 65% en más de 60 semanas. A 17°C ocurre algo similar.

La sílica es el factor clave para mantener la viabilidad debido a que los conidios alcanzan un secado significativo (Carballo, 1998). Feng *et al.* 1994, señalan que el polvo puro de conidios sin formular puede almacenarse en recipientes herméticos a 4°C y mantener una viabilidad de 71% a los 21 meses, si el contenido de humedad es menor a 10%. El uso de cal viva como desecante durante el almacenamiento de polvo sin formular permite conservar un 83% de viabilidad a los seis meses (Carballo, 1998)

Temperatura: La temperatura es un factor que influye significativamente sobre la viabilidad de los conidios. Las temperaturas bajas son más favorables para mantener niveles de viabilidad adecuadas. Por ejemplo, la viabilidad para las formulaciones en aceite puede reducirse a cero, después de 20 días a 25°C, mientras que a 2°C, se mantiene entre 95 y 99% por 40 días (Prior *et al.*, 1988) citado por Carballo (1998).

Tiempo de almacenamiento: Como se ha mencionado, la temperatura y la humedad en la interacción con el tiempo de almacenamiento determinan el tiempo de viabilidad de los conidios. En condiciones de baja humedad, el tiempo de almacenamiento se incrementa y la viabilidad es alta. Un comportamiento similar se observa con la temperatura. (Carballo, 1998).

2.6. Métodos de conservación de cultivos de hongos.

El objetivo de una adecuada conservación de hongos entomopatógenos es mantener por mucho tiempo, sin pérdida de viabilidad o de otras características las diferentes cepas de especies de hongos, para que puedan ser usados en un futuro en pruebas de control de plagas, en enseñanza para demostraciones de técnicas y metodologías en el laboratorio y para propósitos de comercialización de cepas en el futuro. Existen técnicas sencillas cuando se carece de equipos especiales o recursos y técnicas más sofisticadas pero a mayor costo (Goettel e Inglus, 1997). Los hongos entomopatógenos se pueden conservar tanto a temperaturas menores a los 0°C como temperaturas mayores hasta un máximo de la temperatura ambiente. Sin embargo, conforme aumenta la temperatura, la pérdida de viabilidad de los conidios u otras características de los hongos puede ser mayor por lo que se requerirá de emplear otras técnicas para contrarrestar el efecto de la temperatura, tal es el caso de aceites, sílica, liofilización, etc. Entre estos métodos podemos mencionar:

Cultivos en series: Este método consiste conservar a 4°C cultivos del hongo que se transfieren periódicamente a platos con medios de cultivos nuevos. Esta técnica no permite almacenar hongos por mucho tiempo ya que puede causar cambios en las características del entomopatógeno, como pérdida de virulencia, patogenicidad y esporulación por el subcultivo frecuente repetido. Este método es usado normalmente después de realizar el aislamiento de un hongo traído del campo, principalmente para propósitos de purificación del entomopatógeno pero luego se recomienda usar otra técnica para su conservación por mayor tiempo (Goettl e Inglus, 1997).

Conservación en aceite mineral: Este método es muy práctico, simple, y de bajo costo y permite conservar hongos por muchos años sin pérdida de patogenicidad o virulencia. El aceite evita la desecación y disminuye el intercambio de gases, reduciendo el metabolismo del hongo a un nivel muy bajo (Goettl e Inglus, 1997). Se utilizan tubos de cultivo de vidrio donde el medio es colocado en forma inclinada. Luego el hongo es inoculado hasta obtener un cultivo vigoroso. Se debe autoclavar el aceite mineral al menos dos veces para eliminar cualquier bacteria presente. Posteriormente se cubre el cultivo con el aceite esterilizado hasta una profundidad de 1cm. Luego los tubos son tapados y sellados con parafilm y colocados en refrigeración a 4-10°C. Para recobrar el cultivo, simplemente se obtiene una porción del tubo, se drena el exceso de aceite y se coloca en un plato con medio. El tubo es nuevamente sellado y guardado. Esto se debe realizar periódicamente para evaluar la viabilidad y contaminación (Goettl e Inglus, 1997).

Liofilización: Esta técnica es más sofisticada ya que requiere un equipo de liofilización. Este sigue un proceso de congelación y secado y se utilizan diferentes tipos de ampollas para contener el producto liofilizado. Este método de conservación es efectivo para hongos que producen conidios como Hyphomycetes, Ascomycetes, y Basidiomycetes. La liofilización consiste en obtener la desecación total. Las ampollas liofilizadas pueden mantenerse a 4°C aunque también puede dejarse a temperatura ambiente (Humber,1997) citado por (Goettl e Inglus, 1997) Conservación a temperatura bajo 0°C: Se utilizan equipos de refrigeración a -20°C. Aunque no es recomendable usarlo para hongos en medio de cultivo, en el CATIE se han conservado exitosamente cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarrizium anisopliae* en medios con PDA a -20°C. Esta técnica permite almacenar conidios que previamente son almacenados en cristales de sílica gel anhidra y mantenidos luego a -20°C, permitiendo mantener la viabilidad por más de 10 años (Goettl e Inglus, 1997)

2.7. Formulación.

La formulación es el producto resultante de mezclar un agente microbioal (hongo entomopatogénos), con uno o varios ingredientes inertes que permiten que el compuesto final sea efectivo. El término formulación implica alteración del ingrediente activo o de adición de compuestos con el objetivo de mejorar su actividad conservación, o aplicación. El desarrollo de formulaciones apropiadas es esencial para la utilización exitosa de los micoinsecticidas (Daoust *et al.* 1982,1983).

La formulación tiene como objetivos, mejorar la vida media y viabilidad de los conidios durante su almacenamiento y aplicación. Aumentar la estabilidad durante el almacenamiento y después de la aplicación. Las propiedades físicas y biológicas de la formulación deben permanecer estables por un tiempo mínimo de 12 meses, pero es recomendable que se mantengan durante 18 meses para permitir su comercialización (Carballo,1998). Incrementar la efectividad sobre el insecto plaga, la penetración de la suspensión de conidios en el insecto es facilitada por las propiedades cutinolíficas del aceite que permiten que un mayor número de conidios alcancen las membranas intersegmentales susceptibles (Carballo,1998), mejorar la adherencia a la cutícula del insecto, aumentar o mantener la virulencia, permitir su aplicación utilizando equipos de ultrabajo volumen, incrementar el potencial de producción de conidios y mejorar su eficacia en el campo.

El desarrollo de procedimientos de obtención de insecticidas biológicos a base de hongos entomopatógenos de forma masiva, resulta un requisito indispensable en la investigación con dichos microorganismos como medio de control de plagas.

Existe cierto rechazo respecto al uso exitoso de los hongos entomopatógenos en el campo como agentes de control biológico, debido a las limitaciones ambientales que podrían obviarse mediante el uso de las formulaciones adecuadas (Velez, 1998).

Una vez desarrollada una formulación básica del agente biológico es esencial preservar la actividad de éste en el sustrato en el cual se incorpora, sustratos como suelo, tejido vegetal o granos almacenados, pueden atenuar el efecto de los factores ambientales en la actividad del patógeno, en consecuencia la luz solar, la temperatura, la humedad y los agentes químicos determinan su éxito o fracaso en el campo (Velez, 1998).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Primera fase: Evaluación de formulaciones y métodos de almacenamiento

3.1.1 Localización del experimento.

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Control Microbial de la unidad de Fitoprotección del CATIE, entre enero y octubre de 1999.

3.1.2. Producción masiva del hongo *Beauveria bassiana*.

Se utilizaron las cepas 9205, y RL-9 de *Beauveria bassiana*, estas cepas estaban disponibles en el laboratorio de control microbial del CATIE. La cepa 9205 fue aislada de *Diatraea saccharalis* y reactivada y evaluada contra la broca del café por González *et al* (1993) en Colombia; mientras que la RL-9 corresponde a la cepa No 9 recolectada y evaluada por Lazo, (1990) en broca del café en Honduras. Para su mantenimiento se utilizó el medio de cultivo PDA al 2 %. Los cultivos fueron incubados a 26°C. Se preparó una suspensión de conidios en agua estéril mezclada con Tween 80 (dispersante); para esto se utilizarón 0,5 ml/l (aproximadamente 1 gota por cada 50ml). Se sembró el hongo en arroz el cual fue sumergido previamente en agua durante hora y media, posteriormente se esterilizó durante 20 minutos a 15 libras de presión y 120°C. La inoculación se realizó sobre 400 gr. de arroz por bolsa de polipropileno; se pusieron 15 ml de la suspensión del hongo de 1×10^7 conidios /ml. Luego de cuatro días de la inoculación se vertieron en bandejas plásticas con tapa para estimular

la germinación y el proceso de secado por 4 a 5 días consecutivos. La separación de los conidios de los granos de arroz se hizo mediante un tamiz de 50 mesh. Se cuantificó el número de conidios por gramo de polvo para los cálculos de las concentraciones a usar.

3.1.3. Evaluación de las formulaciones.

Se evaluaron cuatro formulaciones, como tratamiento principal a saber: *Beauveria bassiana* en aceite Agrol 971 (Stepen company, USA) , *B bassiana* en Agrol 85L (Sun spray 9E de la Sun Company, Philadelphia, USA), *B bassiana* liofilizada y *B bassiana* en polvo. Se utilizaron dos cepas (RL-9 y 9205), dos temperaturas de almacenamiento (0 y 22 °C) y dos tratamientos de secado (con sílica y sin sílica), la cual se agregó dentro de la formulación del hongo). Se procedió a preparar las formulaciones del hongo *B. bassiana* a partir de los aceites, los cuales son aceites parafínicos, derivados de hidrocarburo, conteniendo 1×10^7 esporas/ml de solución de aceite; estas presentaciones fueron líquidas. La formulación liofilizada tuvo una presentación en polvo. Para esta, se procedió a tomar una muestra de 1 gr. del hongo previamente obtenido y se sometió al proceso de liofilización, en el cual se procedió a congelar el hongo en polvo, se utilizó tela dacrón para confeccionar las bolsitas de 2 cm. x 5 cm. donde fueron vertidas las muestras; estas impedían la pérdida de la muestra por medio del vacío en el liofilizador. Estas fueron selladas utilizando calor. A la muestra se le adicionó nitrógeno líquido el cual sirve para romper las moléculas de agua y ayuda a la deshidratación total de la muestra.

Estas muestras fueron colocadas en frascos especiales de 500 ml de capacidad para liofilizar, los cuales tuvieron un tiempo de secado de 12 horas. El vacío utilizado fue de 0,1 torr, una vez secado el material fue retirado y a cada tubo se le aplicó vacío por 20 segundos tratando de eliminar todo el oxígeno posible del tubo. De esa forma fueron almacenados en desecadores (cámara de vidrio con sílica indicadora) durante 9 meses.

Los tratamientos, se ubicaron en un diseño irrestricto al azar, con cuatro formulaciones, dos cepas, dos temperaturas, dos modalidades de almacenamiento para un total de 32 tratamientos.

3.1.4. Variables evaluadas.

3.1.4.1 Viabilidad de las conidias

Mensualmente se evaluó la viabilidad del hongo utilizando la siguiente metodología. Para la formulación en polvo y liofilizada se prepararon suspensiones de hongo con 25 ml de agua con Tween esterilizadas, a los que se le agregó 0,01g de conidios de dichas formulaciones, estas fueron agitadas en ultrasonificador y colocados en platos de petri con medio PDA agregándole 90 microlitros de agua y 10 microlitros de suspensión, rayando el plato e incubando a 26°C por 20 horas. Para la formulación en aceite se utilizaron 10 ml de agua y 0,01ml de cada formulación. Luego se procedió a realizar los conteos de germinación hasta tener un total de 100 conidias, separando las conidias germinadas y las no germinadas.

3.1.4.2 Evaluación del crecimiento diamétrico

Se utilizaron discos de hongo de 1 cm de diámetro de cada formulación, se sembraron en platos de petri, se incubaron a 25°C, cada dos días se evaluó el crecimiento en diámetro muestreándose 8 veces cada mes en todo el periodo experimental.

3.1.4.3 Evaluación de la esporulación.

Esta prueba se llevó a cabo disolviendo un disco de 1 cm de diámetro del cultivo del hongo de cada plato de petri proveniente de la prueba de crecimiento diamétrico. Para disolver el inóculo se utilizó agua con Tween en concentración conocida, haciendo las diluciones correspondientes y contando el número de esporas a través del hematocímetro.

3.1.5. Análisis estadístico

El modelo matemático utilizado para el análisis fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + F_j + T_k + H_l + (CF)_{ij} + (TH)_{kl} + (FTH)_{jkl} + E_{ijkl}$$

DONDE:

μ : PROMEDIO GENERAL

C_i : CEPAS

F_j : EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS

T_k : EFECTO DE LA TEMPERATURA

H_l : EFECTO DE HUMEDAD

CF, TH : EFECTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS TRAT.

FTH : EFECTO DE LAS INTERACCIONES DE SEGUNDO ORDEN

E_{ijkl} : VARIACIÓN DEBIDA AL ERROR EXPERIMENTAL

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante las pruebas de Análisis de Varianza y pruebas de medias (SAS institute 1985).

3.2 Fase II. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento y esporulación de *B. bassiana*

3.2.1 Localización del experimento.

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Fitoprotección del CATIE.

3.2.2 Evaluación del crecimiento diametral

Se evaluaron dos cepas del hongo *B. bassiana*, una codificada como Cepa 9205 procedente de Colombia, y la Cepa RL-9 de Honduras, a una concentración de 1.2×10^7 conidios/ml. Se utilizaron los fungicidas Kocide, Atemi, Silvacur, Cupravit y Daconil (ver anexo 11) a las concentraciones de 5, 10, 100, 500, 1000 ppm, y un testigo. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño irrestricto al azar con tres repeticiones.

Para la preparación de los medios de cultivo con las diferentes concentraciones de los fungicidas se prepararon volúmenes de 50ml. de medio de cultivo de PDA, los cuales fueron enfriados a 65°C, para agregar la cantidad de los fungicidas y alcanzar la concentración indicada de cada uno y estreptomycinina 2,5g/50ml; luego se vertieron 16 ml. sobre platos de petri.

Solidificado el medio, se procedió a inocular el hongo utilizando un círculo (0,7 mm. de diámetro) de papel filtro impregnado previamente con una suspensión del hongo ($1,2 \times 10^7$ con/ml). Estos se incubaron a temperatura de 26° C. Las evaluaciones se llevaron a cabo cada 48 horas, durante 15 días, midiendo el crecimiento radial del hongo en cada uno de los tratamientos

3.2.3 Efecto de los fungicidas sobre la esporulación

Luego de finalizada la fase de crecimiento del hongo se procedió a realizar el conteo de esporas de los tratamientos que mostraron crecimiento micelial. En 25 ml de agua + Tween se le agregó círculos 0,7 mm de micelio contenidos en el medio artificial PDA, luego se agitó con la ayuda del ultrasonificador y posteriormente con el hemocitómetro se realizó el conteo de esporas.

Se aplicó un análisis de varianza del crecimiento diametral diario y total y de esporulación, con un nivel de significancia del 95%.

3.2.4 Análisis estadísticos

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijklm} = \mu + F_i + C_j + A_k + (FC)_{ij} + (FA)_{ik} + (CA)_{jk} + (FCA)_{ijk} + O_m + E_{ijklm}$$

DONDE:

μ : Promedio general

F_i : Fungicidas

C_j : Concentraciones

A_k : Cepas

FC, FA, CA: Efectos de las interacciones de 2do orden

FCA: Efectos de las interacciones de 3er orden

om: Testigo

Eijklm: Variación debida al error experimental

El análisis se llevó a cabo mediante el ANDEVA de crecimiento diametral a los 15 días de evaluación con un nivel de significancia del 95% (SAS Institute, 1985).

4 RESULTADOS

4.1. Primera fase: Evaluación de formulaciones y métodos de almacenamiento

4.1.1 Viabilidad de conidios

Hubo diferencias significativas para el efecto de las formulaciones y las condiciones de almacenamiento (humedad y temperatura) así como las interacciones sobre la viabilidad de conidios para la cepa 9205 mientras que para la cepa RL-9, solo la interacción humedad por formulación fue significativa. (Anexo 1 y 4)

La formulación liofilizada mantuvo el mayor porcentaje de viabilidad (100 %) a los 6 y 9 meses bajo las diferentes condiciones de almacenamiento (Figuras 1 y 2). Las otras formulaciones se comportaron diferente de acuerdo a la cepa y a las condiciones de temperatura (0 y 22 °C) y de humedad (con sílica y sin sílica).

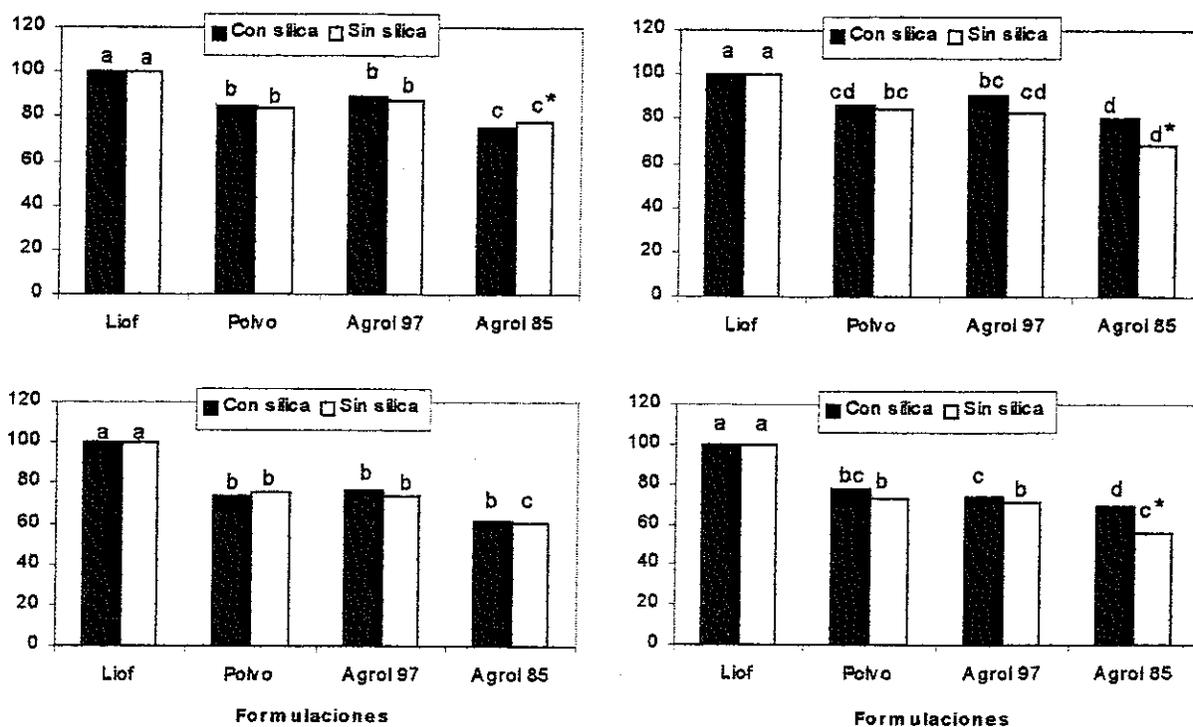


Figura 1.- Efecto de varias formulaciones y dos humedades (con y sin sílica) sobre la viabilidad de conidios de *B. bassiana* (9205) a dos temperaturas, a 22 °C (Izquierda) y 0 °C (derecha), a los 6 meses (superior) y 9 meses (inferior)

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de T para medias ajustadas al 5 %

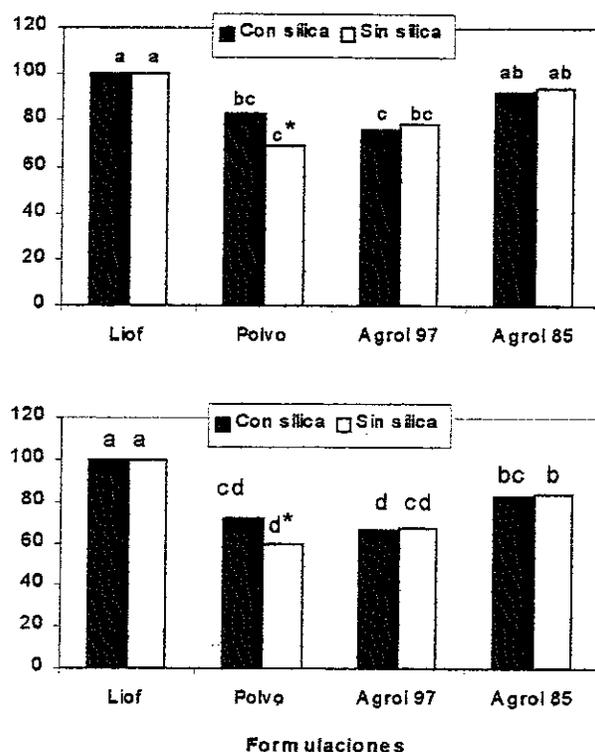


Figura 2. Efecto de varias formulaciones y dos humedades (Con y sin sílica sobre la viabilidad de conidios de *B. bassiana* (RL-9) a los 6 y 9 meses.

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de T para medias ajustadas al 5 %.

Para la cepa RL-9, solamente hubo interacción entre formulación y humedad por lo que en la Fig 2 no se considera el efecto de la temperatura. Para esta cepa la viabilidad fue muy alta en el agrol 85, alcanzando valores superiores al 82 % a los 9 meses, lo cual es muy bueno. Las formulaciones en polvo y agrol 97 tuvieron valores intermedios. Respecto al efecto de la humedad (sílica) en la Fig 2 se observa que solamente para la formulación en polvo hay un efecto benéfico ya que a los 9 meses, la viabilidad fue del 59 % sin sílica y de 72 por ciento con sílica mientras que en las formulaciones de aceite prácticamente mantuvieron niveles de viabilidad similares (Fig 2).

4.1.2. Crecimiento de *B. bassiana*

El crecimiento del hongo fue afectado por las formulaciones, las condiciones de almacenamiento y sus interacciones para ambas cepas estudiadas durante los 9 meses (Anexos 2 y 5). Como esta variable es dependiente de la viabilidad y de la cantidad de inóculo que se ponga en el plato con el medio de PDA a crecer, y además porque el estudio de crecimiento se realizó en condiciones uniformes de temperatura y humedad, probablemente las condiciones en que se mantuvieron las

formulaciones en su momento, esto es la humedad (con o sin sílica) así como de temperatura (0 y 22 ° C) no deberían tener un efecto drástico sobre el crecimiento y esporulación del hongo. Por esta razón, se va a enfatizar solo el efecto de las formulaciones durante los 3, 6 y 9 meses como se presenta en el Cuadro 1. Como se observa en este Cuadro, el crecimiento del hongo en la cuatro formulaciones es similar en los diferentes períodos de evaluación y las dos cepas.

Cuadro 1. Efecto de diferentes formulaciones sobre el crecimiento de *B. bassiana* en cm durante diferentes períodos de evaluación.

Formulación	Cepa 9205			Cepa RL-9		
	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 3	Mes 6	Mes 9
Liofilizada	3.98 a	2.83 a	2.03 a	4.00 a	2.78 b	2.08 a
Polvo	3.85 a	2.72 a	1.98 a	4.00 a	2.95 a	2.15 a
Agrol 97	3.77 a	3.06 a	1.98 a	3.87 b	3.41 a	1.93 b
Agrol 85	3.87 a	3.15 a	2.04 a	3.93 a	2.68 b	2.03 a

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de Tukey al 5 %

4.1.3. Esporulación de *B. bassiana*

Según el análisis de varianza, la esporulación al igual que el crecimiento, fue afectado por los diferentes factores en estudio y sus interacciones.(Anexos 3 y 6). Sin embargo, como este depende del crecimiento del hongo de la prueba anterior y como se indicó, este no fue afectado por la humedad y la temperatura de almacenamiento de las formulaciones, se da énfasis al efecto solo de las formulaciones sobre la esporulación (Cuadros 2) durante tres períodos de evaluación. La formulación en polvo fue la que presentó los más altos valores de esporulación durante los tres meses, para ambas cepas evaluadas.

Cuadro 2. Efecto de varias formulaciones sobre la esporulación de *B. bassiana* (Conidios/ml $\times 10^8$), durante tres periodos de evaluación.

Formulación	Cepa 9205			Cepa RL-9		
	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 3	Mes 6	Mes 9
Liofilizada	6.65 b	6.56 b	6.16 b	5.84 b	5.74 b	5.57 b
Polvo	12.12 a	12.00 a	11.79 a	11.66 a	11.56 a	11.32 a
Agrol 97	6.52 b	6.38 b	6.23 b	7.41 b	7.38 b	7.31 b
Agrol 85	6.13 b	5.93 b	5.74 b	4.59 c	4.57 c	4.38 c

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de Tukey al 5 %

4.2 Fase II. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento y esporulación de *B. bassiana*

4.2.1 Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento de *B. bassiana*.

El análisis de varianza mostró un efecto de los fungicidas a diferentes concentraciones sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* (Anexos 7 y 8). Este hongo reacciona diferente al tipo de fungicida con el cual se encuentra en contacto. En el cuadros 3 se presenta el crecimiento diametral del hongo a los 15 días.

Para las cepas 9205 y RL-9, el Silvacur, el Daconil y el Atemi en todas las dosis, inhibieron el crecimiento del hongo durante todo el período de evaluación mientras que los fungicidas a base de cobre como Kocide y Cupravit no inhibieron el crecimiento (Cuadro 3)

Cuadro 3. Efecto de diferentes dosis de cinco fungicidas sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* Cepa RL-9 en diferentes dosis.

Fungicida	Crecimiento en centímetros a diferentes dosis					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	2.06 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 b
Daconil	2.60 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 b
Atemi	3.20 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 b
Kocide	1.50 a	1.63 a	1.60 a	1.63 a	1.70 a	1.53 a
Cupravit	1.76 a	1.63 a	1.63 a	1.80 a	1.13 b	1.50 a

*Valores con la misma letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según la prueba de Tukey al 5 %.

4.2.2 Efecto de los fungicidas sobre la esporulación

El análisis de varianza mostró un efecto de los fungicidas a diferentes concentraciones sobre la esporulación de *B. bassiana* (Anexos 9 y 10)

Con respecto a la esporulación (Cuadros 5), los fungicidas que mostraron un crecimiento visible de *B. bassiana* sin inhibir significativamente a el hongo lograron esporular durante el período de evaluación. En los testigos de todos los tratamientos la esporulación fue mayor, mientras que en las dosis más altas los niveles de esporulación fueron menores a los testigos para aquellos fungicidas donde el hongo se desarrolló, como es el caso de cupravit y kocide y en las dosis de 5 y 10 ppm de atemi.

Cuadro 4. Efecto de diferentes dosis de cinco fungicidas sobre la esporulación de *B. bassiana* Cepa RL-9.

Fungicida	Dosis del fungicida sobre el número de conidios/ml $\times 10^8$					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	2,89 c b	0,0 c b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Daconil	3,62 a	0,0 c b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Atemi	2,97 b	0,0 c b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Kocide	1,99 d c	0,73 a	0,97 a	0,61 a	1,17 a	0,93 a
Cupravit	2,90 d b	0,72 b a	0,83 b	0,35 b	0,75 b	0,60 b

*Valores conigual letra dentro de una misma columna, son iguales entre sí según la prueba de Tukey al 5 %.

5 DISCUSION

En cuanto a la evaluación llevada a cabo para medir el efecto de diferentes formulaciones sobre las características de las dos cepas 9205 y RL-9 del hongo *B. bassiana*, se pudo constatar que la formulación liofilizada presentó la mayor eficacia para preservar la viabilidad de los conidios de ambas cepas durante los nueve meses de muestreo. La liofilización podría garantizar el almacenamiento por un mayor tiempo y a la vez debido a que como la operación se efectúa a bajas temperaturas, se evita cualquier deterioro térmico del producto.

El uso de sílica para el proceso de secado de los conidios tuvo un efecto benéfico sobre la viabilidad en interacción con la temperatura para la cepa 9205, manteniéndose la viabilidad más alta cuando fue almacenada a 0°C para las formulaciones en polvo y en aceite. La humedad y la temperatura los factores más adversos para la supervivencia de los conidios temperaturas bajas mantienen la viabilidad por más tiempo.

Las formulaciones en aceite presentaron porcentajes bajos de viabilidad al inicio del estudio debido a que las 20 horas dadas a esta formulación para que los conidios germinaran no fueron suficiente por lo cual se optó por darles más tiempo para realizar las evaluaciones de germinación. Esto se debe a que, los conidios necesitan humedad para germinar y las formulaciones en aceite forman una película en el conidio que impide que este absorba agua. Sin embargo para la cepa RL-9 la

formulación en aceite Agrol 85 fue la segunda mejor formulación, siendo esto muy importante ya que podría almacenarse por un mayor tiempo a un costo más bajo que la liofilización la cual requiere de equipos más sofisticados. Estos resultados son importantes para formular las cepas de *B. bassiana* promisorias para el control de la broca del café, lo cual puede mejorar su eficiencia en el campo, permitir mayor tiempo para almacenar el producto y permitir la comercialización, lo cual podría impulsar el uso de este patógeno en programas de manejo de plagas. En el presente estudio no se define si realmente estas cepas son adecuadas para el control de la broca ya que ambas cepas han demostrado potencial para el control de esta plaga, siendo la 9205 reactivada sobre broca del café en Colombia como de alto potencial, con una mortalidad del 100% (Gonzales *et al.* 1993), mientras que la RL-9, fue evaluada por Lazo, (1990).

Al evaluar el efecto de las formulaciones sobre el crecimiento diametral del hongo los resultados indicaron que no hubo diferencias por efecto de las formulaciones. Esta variable se ve afectada directamente por la viabilidad de los conidios y podría pensarse que al transcurrir mayor tiempo de evaluación, si podría verse afectado debido a una mayor pérdida de viabilidad en algunas de las formulaciones pero que debe seguirse evaluando. Se observó una velocidad de crecimiento mayor en los conidios de la formulación liofilizada, ya que de todas la evaluadas estas eran las primeras en germinar.

Al evaluar el efecto de la esporulación en cada una de las formulaciones, la formulación en polvo obtuvo el mayor porcentaje de esporulación. Probablemente esto se deba a algún factor intrínseco de la formulación, adonde el proceso de liofilización o bien el aceite, reducen la capacidad de esporular del hongo.

Una vez evaluados a nivel de laboratorio la compatibilidad de *B. bassiana* con fungicidas utilizados para el manejo de algunas enfermedades en café, se pudo observar que el hongo crece y esporula a todas la dosis evaluadas de Kocide y Cupravit, pero es afectada negativamente por los fungicidas Atemi, Daconil y Silvacur. Esta información sirve de guía para la toma de decisiones en el manejo de enfermedades del café y la compatibilidad con el combate de la broca mediante el uso de hongos entomopatógenos. Otras medidas de combate de enfermedades en café podrían utilizarse para aminorar el efecto perjudicial de los fungicidas. Una de las estrategias es definir los períodos de aplicación para cada uno de los problemas fitosanitarios adonde se buscaría que no haya traslape entre las aplicaciones de *B. bassiana* contra la broca y la aplicación de los fungicidas. Otra es el

manejo de la sombra tanto para el control de la roya como del ojo de gallo o bien, el uso de los materiales resistentes desarrollados a partir de catimores por los centros de investigaciones en café de los diferentes países de la región.

6 CONCLUSIONES

- La germinación, crecimiento y esporulación, del hongo *B. bassiana* se vieron afectadas por las formulaciones en las dos cepas 9205, y RL-9.
- La formulación liofilizada permitió la germinación al 100% de los conidios durante los nueve meses de evaluación no se vió afectada por la temperatura ni las condiciones de almacenamiento.
- Las formulaciones en polvo, aceite Agrol 97 y Aceite Agrol 85 disminuyeron la viabilidad de los conidios de ambas cepas durante el periodo experimental.
- La formulación en aceite Agrol 85 fue la segunda mejor en cuanto a la conservación de la viabilidad de los conidios en la cepa RL-9.
- Para la cepa 9205 la formulación en polvo con sílica almacenados a 0°C mejoraron sensiblemente la viabilidad de los conidios que la almacenada a 22°C.
- La sílica y la temperatura de 0°C permiten una mayor conservación de la viabilidad de los conidios.
- Para la variable crecimiento en ambas cepas del hongo *B. bassiana* a través del tiempo no se presentó efecto de las formulaciones
- La esporulación en ambas cepas se vió favorecida en la formulación en polvo.
- Es importante tomar en cuenta estos factores a la hora de utilizar y almacenar *B. bassiana* con fines de manejo y propósitos de comercialización de cepas.
- El estudio de la compatibilidad de los fungicidas sobre el hongo *B. bassiana* demostró inhibición de este por el efecto de los fungicidas Silvacur, Atemi y Daconil.
- El crecimiento y la esporulación se vió inhibida por los fungicidas Silvacur, Atemi y Daconil en todas las concentraciones evaluadas, los fungicidas Kocide y Cupravit no afectaron significativamente el crecimiento y la esporulación del hongo. El atemi tuvo poco efecto en 5 y 10 ppm pero si a 100 y 1000 ppm. Los resultados sobre el efecto de los fungicidas sobre el hongo deben tomarse en cuenta a la hora de aplicar medidas de manejo de la broca en el campo utilizando *Beauveria*.

7 RECOMENDACIONES.

- Es necesario continuar con las investigaciones por un período de 18 meses para determinar si se mantiene los niveles de viabilidad aceptables, en especial de la liofilizada.
- Es importante realizar estudios de virulencia de las formulaciones sobre insectos (Coleopteros) ya que la virulencia es un atributo indispensable dentro del control biológico de insectos
- Es importante seleccionar la mejor formulación antes de que aparezca la broca del café *Hypothenemus hampei* en Costa Rica. Este trabajo podría realizarse en Nicaragua donde se estudia el manejo de esta plaga.
- Los resultados obtenidos en la evaluación con los fungicidas deben tomarse en cuenta a la hora de utilizar hongos entomopatógenos en áreas donde se hace uso frecuente de fungicidas para el manejo de enfermedades y que a su vez no perjudiquen su acción sobre la broca.

LITERATURA CITADA

- ALONZO, P. 1985. Avances de un programa integrado de investigación contra la broca. III Congreso de manejo integrado de plagas. Guatemala C.A. 263-270.
- ALVES, S. 1986. Patologia geral. In. Controle microbiano de insectos. Ed por Sergio Batista Alves. Sao Paulo Brasil 10-15.
- ANACAFE. 1981 La broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* F. Sugerencia Técnica. Folleto Técnico s/n. Guatemala C.A 11p.
- ANDERSON, T. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. J Econ Entmol 17(1): 1437-1440.
- BAKER, P. 1985. La distribución, ecológica y comportamiento de la broca del café en el Soconusco: la información necesaria para ensamblar un programa de control integrado. Memorias del III Congreso Nacional de Manejo Integrado. Guatemala C.A. 291-294.
- BAKER, P. S. 1986. Biología, ecología y hábitos de la broca . In curso regional sobre manejo integrado de plagas del cafeto. San Pedro Sula, Honduras, IICA-PROMECAFE. P 1-2.
- BARNETT, H. ; HUNTER, B. 1972. illustrated Genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company.
- BATISTA, A. ; LEITAO, A. ; SATO, M. ;LEITE, L. ; 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.
- BIDOCHKA, M. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the enthomopathogenic fungus. *Beauveria bassiana*. Appl. And Environ Microbial 53: (7) 1679-1682.
- BUSTILLO, A 1995. El uso de entomopatogenos en el control de la broca del café en Colombia. CENICAFE 42: 1-12 p.
- 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. *Beauveria bassiana*. Protección de plantas (Cuba) 1 (1):21-31.
- CAMPOS, A 1985. La broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: Scolytidae) en Guatemala. Memorias del curso sobre Manejo Integrado de Plagas del cafeto con énfasis en Broca del fruto del café. IICA/PROMECAFE. Guatemala. C.A. :159-162.

- CARBALLO, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Manejo Integrado de Plagas. Hoja Técnica No 25..
- CARBALLO, M. 1998. Uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas. Curso de Control Biológico CATIE. Costa Rica. 20-24.
- CASTRO, U. 1990. La Broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* y su importancia en la caficultura. Memorias del Curso del Manejo Integrado de plagas del Cafeto, con énfasis en Broca del fruto del café. IICA/PROMECAFE. Guatemala C.A.: 90-94.
- CERDA, M. 1995. Respuesta de la Entomofauna Benéfica del cafeto (*Coffea arabica*) a Varias Frecuencias de Aplicación de Endosulfan en Costa Rica. Tesis Ms. Sc. CATIE. Turrialba. Costa Rica. : 7-14.
- CORONEL, G. 1978. Informe del curso intensivo sobre broca del café celebrado en Chicolá, San Antonio, Guatemala C. A 18p.
- COUCH, T. L., and Ignoffo, C. M. 1981. Formulation of insect pathogenens. In "Microbial Control of Pest and Diseases 1970-1980 (H. D Burges, ed), pp 621-634. Academic Press, New york.
- CLARK, R. 1980. Fungicidal inhibition of *Beauveria bassiana*, a pathogene of the colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of the New York Entomological Society 88(1):40.
- DAOUST, R. A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metharhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. Journal of invertebrate Pathology 40:228-236.
- DAOUST, R. A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. Journal of Invertebrate Pathology 41:151-160.
- DAOUST, R. 1986. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadaveres of cowpea pest stored outdoors and in laboratory in Brasil. Environ. Entomol 15(3): 642-645.
- DECAZY, B. 1985. Métodos de control químico y cultural de la broca del cafeto. Memorias del curso sobre manejo integrado de plagas del cafeto con énfasis en broca del fruto. IICA/PROMECAFE, ANACAFE Guatemala C.A. 147-150.
- DACAZY, B. 1991. Investigaciones conducidas en Francia y en Africa sobre la broca del café .Reunión Internacional sobre broca del café .Tapachula, Chiapas Mexico. 47-49 p.
- DE INGUNZA, M. 1964. La Broca del Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari.1867) en el Perú. Revisión Peruana de Entomología. 7(1) : 96-98.
- DE OLIVEIRA, M. 1927. Contribuicao para conhecimento da broca do café (*Stephanoderes hampei*, Ferr.1867). Modo de comportarse e ser combatida em Sao Pablo, Brasil. 94 p.

- DUFOUR, B. 1993. Control Biológico de la broca del café con parasitoides. Organización de estados americanos, Washinton, D. C. (EUA). Departamento, de asuntos Científicos y Tecnológicos. Curso y Foro subregional centroamericano y del caribe, León Nicaragua 64-66p
- DURAN, J. 1998. Uso de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Como alternativa de Manejo del Picudo del Chile *Anthonomus eugenii* Cano. Tesis Ms. Sc. CATIE. Turrialba. Costa Rica.
- DURIEZ, V. 1981. Etude enzymatique comparee de champignons entomopathogenes des genres *Beauveria bassiana* et *Metrhizium anisopliae*. *Mycopathologia* 75: 109-115.
- FENG, M.G.; OPPROWSKI, T. J. KHACHATOURIANS, G.G. 1994. Production, formulation and application of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Science and Technology* 4:3-34.
- FARGUES, J.; ROBERT, P.; et REISINGER, O. Formulation de productions de masse de l'hyphomycete entomopathogene *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires. *Annales. Zoologie (Ecologie animale)* 11(2): 247-250.
- FERRON, P. 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Col: Bruchidae). *Entomophaga*. 22(4): 393-395.
- GARDNER, W. 1985. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. *J. Econ Entomol* 78(6): 1275-1277.
- GARCIA, L. 1983. La Broca del Fruto del Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae), en técnicas modernas para el cultivo del café. Instituto Salvadoreño de Investigación del Café (ISIC). IICA.ROCAP. Nueva San Salvador. El Salvador C.A. : 128-130.
- GOETTEL, M.S Y INGLIS, G.D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In Lacey,. 1997 *Techniques in Insect Pathology*, Academic Press pp 213-249.
- GONZALEZ, M.; POSADA, F.; BUSTILLO, A. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *CENICAFE*, 44(33): 93-102.
- HIDALGO, E. 1995. Development and evaluation of different formulations of *Beauveria bassiana*, to control *Sitophilus zeamais* in stored maize. Ms. Sc. University of London. 76p.
- HERNÁNDEZ, P. 1978. Evaluación del sistema de aplicación de bajo volumen en el control de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) *Rev Cafetalera*. Guatemala C.A. 134: 15-18.
- HERNANDEZ, P. ; SANCHEZ, A. 1972. La broca del fruto del café. *Bol (11) ANACFE* 72 p.

- HILL, D. 1975. Agricultura in Search Pest of the Tropics and their Control. Cambridg University Press. London. : 409-410.
- IGNOFFO, M. 1979. Laboratory and field studies with Boverin: a micoinsecticidal preparation of *Beauveria bassiana* produced in the Soviet Union. J of Econ. Entomol 72(4) :562-563.
- IICA/PROMECAFE. 1997. XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. Memorias. INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA. 1997. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. San José Costa Rica. : 70-82.
- LACAYO, L. 1995. Use of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. for control of *Hypothenemus hampei* Ferr. and *Plutella xylostella* in Nicaragua. A thesis submiteted for the degree of doctor of Philosophy of the University of London and for the Diploma of imperial College. Department of Biology imperial College at Silwood Park. Ascot. London Inglaterra. pp123-129
- LAPPA, N. 1967. The effects of different pesticides on the variability and the germantion vigor of spores of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Zashch. Rast. Kiev (Rusia). 4:139-144
- LAVABRE, E. 1961. Le scolyte des cerises de café. En : Maya, M. L. A., Moncada, B. M del P. 1987. La broca de la cereza del café *Hypothenemus hampei* Ferrari 1867; esumenes analiticos. CENICAFE. Chinchina Caldas, Colombia. 11 p
- LAZO, R. 1990. Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto, *Hypothenemus hampei*, al hongo entomopatogeno *Beauveria bassiana* y su tolerancia al Oxicloruro de Cu. Tesis Ms. Sc. CATIE. Costa Rica. : 4-13.
- LE PELLEY, R. 1973. Pest of Coffe. Buttler y Tanner Ltd. London.: 590p.
- LÓPEZ, L. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café . Ministerio de Agricultura y Ganaderia. Dirección de Protección Agropecuaria . Programa de Control Biologico San Jose Costa Rica 1-10.
- LORIA, R. ; GALANI, S. ; Roberts, D 1983. Survial of inoculum of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. Environ. Entomol. 12 (6): 1724-1726.
- MAHR, M. 1999. *Beauveria bassiana*. University of Wisconsin- Madison 4(10): 1-3 p.
- MADELIN, M. 1967. Appressorium-like structures in insect-parasitizing. Deuteromycetes. J. Of Invertebrate Pathol. 9: 404-412.
- MENDEZ, I. 1990. Control Microbiano de la Broca del fruto del Cafeto *Hypothenemus hampei*. (Ferrari. 1867) (Coleoptera: Scolytidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuretomycetes) en el Soconusco. Chiapas. Tesis de Grado. Colegio de postgraduados. Chapingo. Mexico. : 30-56.

- MENDEZ, L. ; VELAZCO, P. 1987. Abundancia de estados biológicos de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* Ferr. Sobre frutos residuales. Taller de trabajo Internacional sobre Manejo Integrado de la Broca de café. Tachalupa Mexico. 140-147 p.
- MOLINARI, P. 1988. Situación de la Broca *Hypothenemus hampei*. (Ferrari. 1867) (Coleoptera: Scolytidae) en Santo Domingo de los Colorados. Rev. Sanidad Vegetal. Ecuador 3 (3) : 31-40 p.
- MONTERROSO, J. 1981. Incidencia de *Beauveria bassiana* sobre broca del café y su reproducción en coco en Guatemala. Rev. Cafetalera ANACAFE .6(21): 10-12.
- MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; PRIOR, C. 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviridae* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Science and Technology 5:193-199.
- MUÑOZ, R. 1985. Medidas de Control de la Broca del fruto del café efectuadas en Honduras. Memorias del curso sobre Manejo Integrado de Plagas del café con énfasis en Broca del fruto del café. IICA/PROMECAFE. Guatemala C.A.: 170-175. as influenced by fungicides. Environ. Entomol. 12 (6): 1724-1726
- OCHOA, M. 1987. Estudio de un tipo de muestreo para determinar el índice de combate de la broca del café. Control de la broca del café. Guatemala 25 p.
- PASCALET, P. 1939. La lutte biologique contre *Stephanoderes hampei* ou scolyte du café au Cameroun. Revue de Botanique appliquée et d'Agriculture Tropicale. Bull. 219: 753-764.
- PEARSON, M. 1984. Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. J of Invertebrate Pathol 44: 342-345.
- PENADOS, R. ; OCHOA, H. 1979. La consistencia del fruto del café y su importancia en el control de broca. ANACAFÉ (181):10-16.
- PENADOS, R. ; OCHOA, H. 1979. La consistencia del fruto del café y su importancia en el control de la broca. ANACAFE (181):10-16.
- POSADA, F. ; ANTÍA, O. ; BUSTILLO, A. 1992. Estandarización de las pruebas de control de calidad para las formulaciones de bioplaguicidas. In : CONGRESO SOCOLEN, Manizales 97p.
- PRASERTPHON, S 1968. The formation and circulation, in *Galleria*, of hyphal bodies of entomophagous fungi. J of Invertebrate Pathol. 11: 260-265. formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Invertebrate Pathology 52:66-72.
- RAMARAJE, N. ; GOVINDU, H. ; SHIVASHANKARA, K. 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 9(3):398-403.

- RIVERA, M. 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. 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.
- ROBERTS, D. ; YENDOL, W. 1971. Use of fungi for microbial control of insect. In: *Microbial control of insects*. In: *Microbial control of insect and mites*. Edited by burgues H.D and Hussey N. W Academic Press. 125-146 p.
- PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; PATOUREL, G. LE. 1988. Infectivity of oil and water insect and mite. 125- 139.
- ROCHA, M. 1984. La Broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867). Su comportamiento y sus formas de combate en el Soconusco Chiapas. *Memorias del II congreso Nacional de Manejo Integrado de Plagas*. Guatemala C.A 262-269.
- ROMERO, A. 1985. Perspectiva del proyecto "Prevención y combate de la broca del fruto del café en el Salvador". IICA, San José Costa Rica. PROMECAFE. 216-220 p.
- SAMSINAKOVA, A. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of greater wax moth larvae *Galleria melonella*. *J of Invertebrate P.* 18: 322-330.
- SANCHEZ, A. 1985. Biología de la broca del café (*Hypothenemus hampei*, Ferr.) IICA, Guatemala. PROMECAFE; Asociación Nacional del acfé, Guatemala. 97-104 p.
- SANCHEZ, M. 1992. Obtencion de un biopreparado en polvo del hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill (Deuteromycotina:Hyphomycetes). *Revista Latinoamericana de Microbiología* 34(4): 319-324.
- SIEMASZCO, W. 1973. Studies on entomogenous fungi of poland. *Resumenes analiticos CANEICAFE Chinchina Caldas, Colombia* 171.
- SREEDHARAN, K. 1995. Integrated management of coffee berry borer. Annual Meeting of UPASI. Coonor (India). *Indian coffee*, 59(10) 9-10 p.
- STARNES, R. 1993. History use and future of microbial insecticides. *American Entomologist*. Summer 83-85.
- STEINHAUS, E. 1985. Enfermedades microbianas de los insectos. *Control Biologico de las Plagas de insectos y malas hierbas*. CECSA, Mexico 607-610.
- STOREY, G. 1986. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to select plant growth regulators and spray additives. *Appl and Env Microbiol.* 52 (1) 1-10.
- TICHELER, J. 1963. Analysis of the epidemiology of the coffee berry borer, *Sephanoderes hampei* Ferr. *Agricultural University, Wageninge (Paises bajos)* 8-50 p.

- URBINA, N. 1986. Descripción General de la Broca del Fruto del Cafeto en Control de Residuos de Pesticidas, usados en café. Informe Final, Proyecto Regional del Control de Pestes del café. PROMECAFE.: 3-15.
- VEGA, R 1985. Combate de la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en el Salvador. IICA/PROMECAFE .ANACAFE. Guatemala C.A. 92-94.
- VILLACORTA, A. 1987. Ocorrencia de *Beauveria sp* infectando a broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) em lavouras no estado do Paraná. Anais de Sociedade Entomológica do Brasil. 13(1) 177-178 p.
- VELEZ, P.A.; POSADA, F.J.; MARIN, P.; GONZALEZ, M.T.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A.E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones en Café. Boletín Técnico. Nº 17. 37p.
- VELEZ, P. 1998. Supervivencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopilae*. En dos Localidades Cafetaleras Colombianas. CENEICAFE, 49(1) : 51-56.
- VINCENTE, P. 1990. Biology and Control, Insects pests attacking Macadamia nuts in Hawaii. Manoa. Honolulu.: 24-26.

ANEXOS

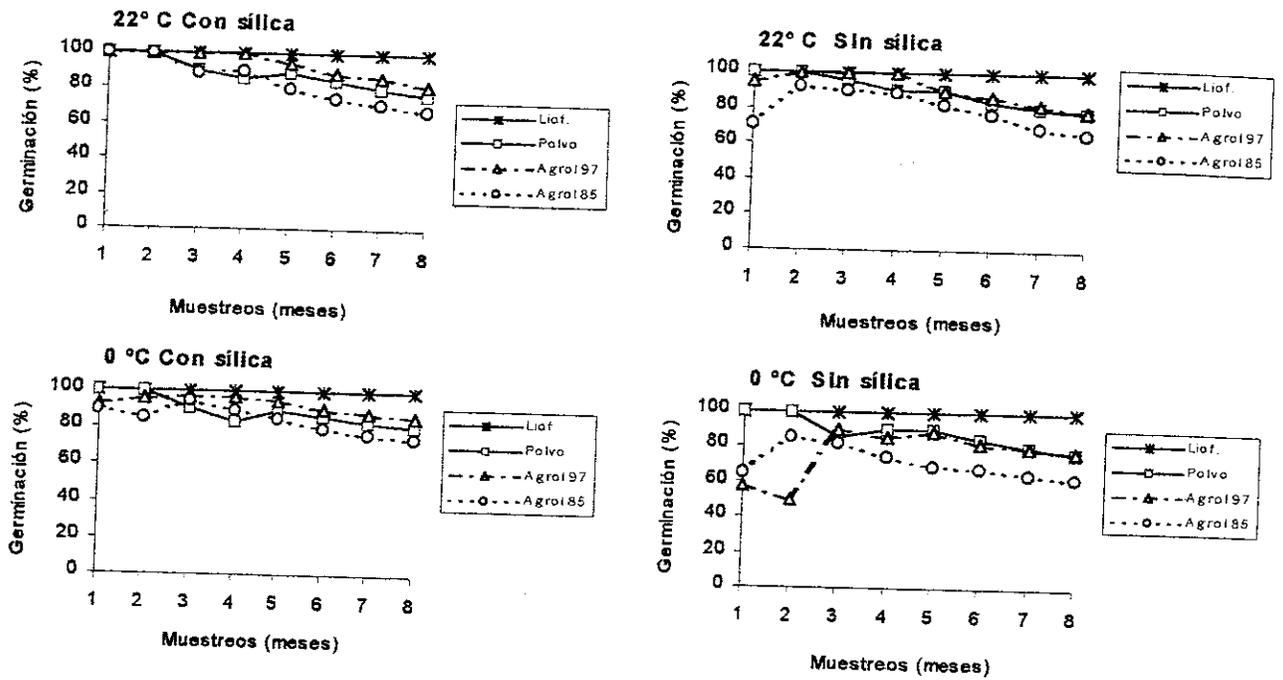


Fig 1-A. Porcentaje de germinación de conidios de *B. bassiana* cepa 1 (9205) en diferentes formulaciones, bajo dos temperaturas y dos humedades (Con y sin sílica)

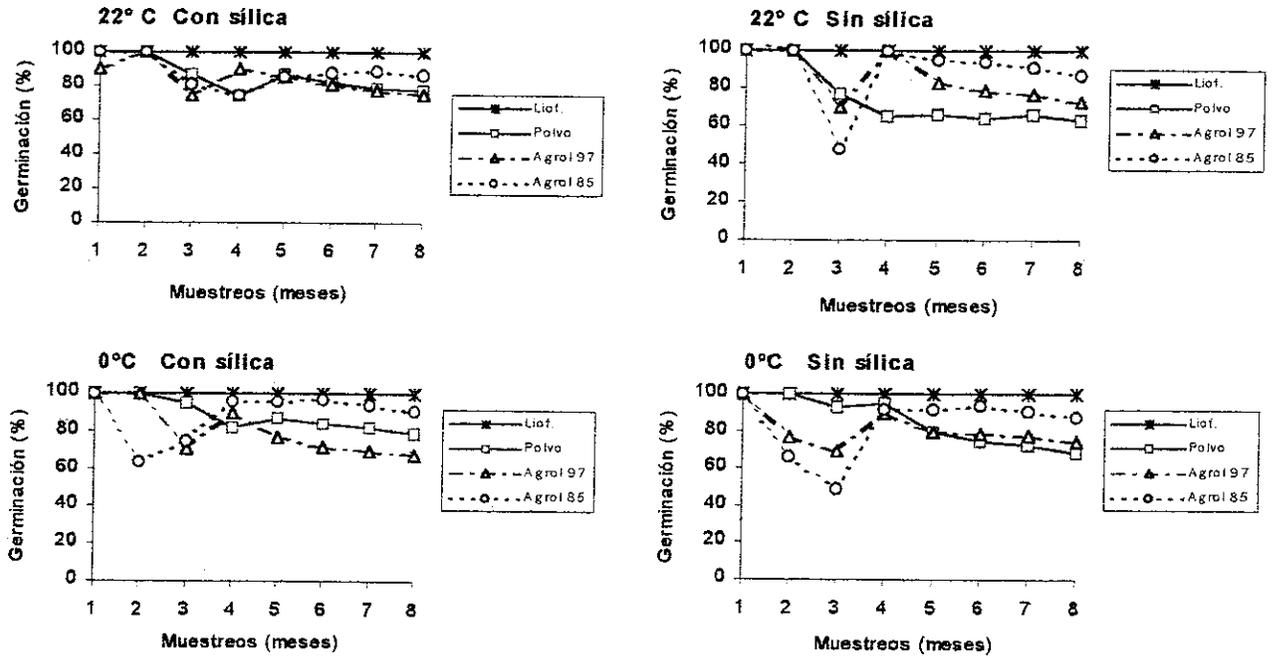


Fig 2-A. Porcentaje de germinación de conidios de *B. bassiana* cepa 2 (RL-9) en diferentes formulaciones, bajo dos temperaturas y dos humedades (Con y sin sílica)

Anexo 1. Análisis de varianza para el efecto de las formulaciones sobre la germinación de la cepa 9205 del hongo *Beauveria bassiana*. CATIE, Turrialba, 1999.

Fuente de variación	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	f	Calculado
CEPA	1	268.78720	268.78720	4.33	0.0380*
FORM	3	23453.17113	7817.72371	126.02	0.0001*
TEMP	1	615.25149	615.25149	9.92	0.0018*
HUM	1	1726.08482	1726.08482	27.82	0.0001*
CEPA*FORM	3	3432.59970	1144.19990	18.44	0.0001*
CEPA*TEMP	1	502.32292	502.32292	8.10	0.0047*
CEPA*HUM	1	297.33482	297.33482	4.79	0.0292*
FORM*TEMP	3	2547.30208	849.10069	13.69	0.0001*
FORM*HUM	3	727.23065	242.41022	3.91	0.0090*
TEMP*HUM	1	485.18006	485.18006	7.82	0.0054*
CEPA*FORM*TEMP	3	375.68304	125.22768	2.02	0.1108
CEPA*FORM*HUM	3	1781.14732	593.71577	9.57	0.0001*
CEPA*TEMP*HUM	1	332.93006	332.93006	5.37	0.0211*
FORM*TEMP*HUM	3	1052.89732	350.96577	5.66	0.0008*
CEPA*FORM*TEMP*HUM	3	271.79018	90.59673	1.46	0.2249
REP*FORM*TEMP*HUM*REP	64	6166.85714	96.35714	1.55	0.0068*
M	6	9357.49702	1559.58284	25.14	0.0001*
CEPA*M	6	5792.63988	965.43998	15.56	0.0001*
FORM*M	18	9385.69345	521.42741	8.41	0.0001*

• Nivel de significancia al 5%

Anexo 2. Análisis de varianza para el efecto de las formulaciones sobre el crecimiento de la cepa 9205 del hongo *B bassiana*.

Fuente de variación	GL	Cuadrados	F calculado
FORM	3	7.82	
TEMP	1	0.06777623	0.0006*
HUM	1	0.00000691	0.9720
FORM*TEMP	3	0.00171742	0.8210
FORM*HUM	3	0.02461170	0.0050
TEMP*HUM	1	0.00649035	0.2832
FORM*TEMP*HUM	3	0.02939091	0.0016*
FORM*TEMP*HUM*REP	32	0.00673517	0.2201
M	8	0.67323844	0.0001*
FORM*M	24	0.05879948	0.0001*
TEMP*M	8	0.01577264	0.0053
HUM*M	8	0.02118544	0.0003*
FORM*TEMP*M	24	0.02446763	0.0001*
FORM*HUM*M	24	0.01639746	0.0001*
TEMP*HUM*M	8	0.01276798	0.0229*
FORM*TEMP*HUM*M	24	0.02428331	0.0001*

Anexo 3. Análisis del efecto de las formulaciones sobre la esporulación de la cepa 9205 del hongo *B bassiana*.

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FORM	3	2.43940E+19	8.13134E+18	49208.11	0.0001*
TEMP	1	2.11120E+16	2.11120E+16	127.76	0.0001*
HUM	1	4.06395E+13	4.06395E+13	0.25	0.6204
FORM*TEMP	3	2.93127E+18	9.77089E+17	5913.01	0.0001*
FORM*HUM	3	8.73323E+16	2.91108E+16	176.17	0.0001*
TEMP*HUM	1	1.48148E+13	1.48148E+13	0.09	0.7649
FORM*TEMP*HUM	3	1.12006E+17	3.73354E+16	225.94	0.0001*
FORM*TEMP*HUM*REP	32	3.07465E+16	9.60829E+14	5.81	0.0001*
M	8	1.49559E+18	1.86948E+17	1131.35	0.0001*
FORM*M	24	7.94832E+17	3.31180E+16	200.42	0.0001*
TEMP*M	8	5.42902E+16	6.78628E+15	41.07	0.0001*
HUM*M	8	1.70472E+17	2.13090E+16	128.95	0.0001*
FORM*TEMP*M	24	1.16097E+17	4.83738E+15	29.27	0.0001*
FORM*HUM*M	24	2.54751E+17	1.06146E+16	64.24	0.0001*
TEMP*HUM*M	8	2.46151E+17	3.07689E+16	186.20	0.0001*
FORM*TEMP*HUM*M	24	2.75578E+17	1.14824E+16	69.49	0.0001*

Anexo 4. Análisis de varianza del efecto de las formulaciones sobre la germinación de la cepa RL-9.

Source		DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > FFORM
3	24789.85880	8263.28627	94.21	0.0001		
TEMP		1	0.66898	0.66898	0.01	0.9305
HUM		1	450.18750	450.18750	5.13	0.0243
FORM*TEMP		3	1653.22917	551.07639	6.28	0.0004
FORM*HUM		3	1146.85880	382.28627	4.36	0.0051
TEMP*HUM		1	2.52083	2.52083	0.03	0.8655
FORM*TEMP*HUM		3	607.74769	202.58256	2.31	0.0768
FORM*TEMP*HUM*REP		32	8037.25926	251.16435	2.86	0.0001
M		8	16513.90741	2064.23843	23.53	0.0001
FORM*M		24	19783.20370	824.30015	9.40	0.0001
TEMP*M		8	2038.26852	254.78356	2.90	0.0041
HUM*M		8	1356.75000	169.59375	1.93	0.0555
FORM*TEMP*M		24	3072.58333	128.02431	1.46	0.0809
FORM*HUM*M		24	3330.28704	138.76196	1.58	0.0448*
TEMP*HUM*M		8	343.83333	42.97917	0.49	0.8629
FORM*TEMP*HUM*M		24	1698.64815	70.77701	0.81	0.7271

Anexo 5. Análisis de varianza sobre el efecto de las formulaciones sobre el crecimiento de la cepa RL-9 del hongo *B bassiana*.

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr >
FFORM	3	0.51330302	0.17110101	3.84	0.0103
TEMP	1	0.06026738	0.06026738	1.35	0.2460
HUM	1	0.02282315	0.02282315	0.51	0.4749
FORM*TEMP	3	0.19216934	0.06405645	1.44	0.2324
FORM*HUM	3	0.71082422	0.23694141	5.32	0.0014
TEMP*HUM	1	0.27932922	0.27932922	6.27	0.0129
FORM*TEMP*HUM	3	0.25460055	0.08486685	1.90	0.1294
FORM*TEMP*HUM*REP	32	2.56843472	0.08026359	1.80	0.0071
M	8	58.66441458	7.33305182	164.52	0.0001
FORM*M	24	10.64384190	0.44349341	9.95	0.0001
TEMP*M	8	1.91364057	0.23920507	5.37	0.0001
HUM*M	8	1.14994638	0.14374330	3.22	0.0016
FORM*TEMP*M	24	4.43673339	0.18486389	4.15	0.0001
FORM*HUM*M	24	5.14452943	0.21435539	4.81	0.0001
TEMP*HUM*M	8	0.82109395	0.10263674	2.30	0.0213
FORM*TEMP*HUM*M	24	2.30195883	0.09591495	2.15	0.0019

Anexo 6. Análisis de varianza del efecto de las formulaciones sobre la esporulación de la cepa RL-9 del hongo *B bassiana*.

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FORM	3	2.66999E+19	8.89997E+18	39996.18	0.0001
TEMP	1	3.88050E+17	3.88050E+17	1743.88	0.0001
HUM	1	4.38600E+17	4.38600E+17	1971.05	0.0001*
FORM*TEMP	3	5.16923E+18	1.72308E+18	7743.45	0.0001*
FORM*HUM	3	1.77054E+18	5.90182E+17	2652.26	0.0001*
TEMP*HUM	1	6.61134E+15	6.61134E+15	29.71	0.0001*
FORM*TEMP*HUM	3	1.82089E+18	6.06962E+17	2727.67	0.0001*
FORM*TEMP*HUM*REP32		1.11839E+17	3.49497E+15	15.71	0.0001*
M	8	3.02755E+18	3.78444E+17	1700.71	0.0001*
FORM*M	24	9.90462E+17	4.12692E+16	185.46	0.0001*
TEMP*M	8	1.37414E+16	1.71767E+15	7.72	0.0001*
HUM*M	8	1.49504E+16	1.86880E+15	8.40	0.0001*
FORM*TEMP*M	24	8.99250E+17	3.74688E+16	168.38	0.0001*
FORM*HUM*M	24	1.19391E+17	4.97463E+15	22.36	0.0001*
TEMP*HUM*M	8	2.90803E+16	3.63503E+15	16.34	0.0001*
FORM*TEMP*HUM*M24		4.41312E+16	1.83880E+15	8.26	0.0001*

Anexo 7. Análisis de varianza sobre el efecto del crecimiento del hongo *B bassiana* (Cepa 9205) expuesto a direntes fungicidas.

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr >
FFUN	4	0.33701432	0.08425358	8.47	0.0001
REP	2	0.02691219	0.01345610	1.35	0.2624
CEPA	1	0.05116657	0.05116657	5.15	0.0251
DOSIS	5	1.02418613	0.20483723	20.60	0.0001
DOSIS*FUN	20	0.17677478	0.00883874	0.89	0.6011
CEPA*DOSIS	5	0.07668075	0.01533615	1.54	0.1819
CEPA*FUN	4	0.95957569	0.23989392	24.13	0.0001
CEPA*DOSIS*FUN	20	0.49422378	0.02471119	2.49	0.0013

Anexo 8. Análisis de varianza sobre el efecto de los fungicidas sobre el crecimiento de la cepa RL-9 del hongo *B bassiana*

Sourc	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr >F
CEPA	1	1.89195790418830E+18	1.89195790418830E+18	25263.19	0.0001
FUN	4	2.28629481228290E+19	5.71573703070740E+18	76321.86	0.0001
DOSIS	5	1.13975273555950E+20	2.27950547111900E+19	99999.99	0.0001
REP	2	5.19368530038780E+14	2.59684265019390E+14	3.47	0.0344
CEPA*FUN	4	2.12475867838540E+18	5.31189669596350E+17	7092.94	0.0001
CEPA*DOSIS	5	2.71700857449570E+18	5.43401714899140E+17	7256.01	0.0001
FUN*DOSIS	20	1.43726128529930E+19	7.18630642649650E+17	9595.83	0.0001
C*F*DS	20	1.25850770727480E+19	6.29253853637410E+17	8402.38	0.0001

Anexo 9. Analisis de varianza del efecto de los fungicidas sobre la esporulación de la cepa 9205 del hongo *Beuaveria bassiana*

Sum of Source	Mean	DF	Squares	Square	F Value	Pr > F
Model		29	84593601.281	2917020.734	15315.92	0.0001
Error		60	11427.409	190.457		
Corrected Total		89	84605028.690			
	R-Square		C.V.	Root MSE		ESPORO Mean
	0.999865		1.353660	13.800609		1019.5035

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	4	12937400.864	3234350.216	16982.07	0.0001
DOSIS	5	59707283.130	11941456.626	62699.03	0.0001
TRAT*DOSIS	20	11948917.287	597445.864	3136.91	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	4	12937400.864	3234350.216	16982.07	0.0001
DOSIS	5	59707283.130	11941456.626	62699.03	0.0001
TRAT*DOSIS	20	11948917.287	597445.864	3136.91	0.0001



Anexo 10. Análisis de varianza del efecto de los fungicidas sobre la esporulación de la cepa RL-9 del hongo *Beauveria bassiana*

Sum of Source	Mean	DF	Squares	Square	F Value	Pr > F
Model		29	91814460.139	3166015.867	99999.99	0.0001
Error		60	115.625	1.927		
Corrected Total		89	91814575.764			
	R-Square		C.V.	Root MSE		ESPORO Mean
	0,999999		0.148413	1.3881943		935.36111

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	4	15580491.736	3895122.934	99999.99	0.0001
DOSIS	5	68729658.681	13745931.736	99999.99	0.0001
TRAT*DOSIS	20	7504309.722	375215.486	99999.99	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	4	15580491.736	3895122.934	99999.99	0.0001
DOSIS	5	68729658.681	13745931.736	99999.99	0.0001
TRAT*DOSIS	20	7504309.722	375215.486	99999.99	0.0001

Anexo 11 Analisis de varianza para el área bajo la curva de crecimiento de *B. bassiana* (9205) por efecto de diferentes concentraciones de fungicidas

Dependent Variable: AUC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	4928.348889	169.943065	16.57	0.0001
Error	60	615.473333	10.257889		
Corrected Total	89	5543.822222			
	R-Square	C.V.	Root MSE		AUC Mean
	0.888980	30.63246	3.202794		10.45556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2318.002222	579.500556	56.49	0.0001
DOSIS	5	1271.266222	254.253244	24.79	0.0001
FUNGI*DOSIS	20	1339.080444	66.954022	6.53	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2318.002222	579.500556	56.49	0.0001
DOSIS	5	1271.266222	254.253244	24.79	0.0001
FUNGI*DOSIS	20	1339.080444	66.954022	6.53	0.0001

Anexo 12 Analisis de varianza para el área bajo la curva de crecimiento de *B. bassiana* (9205) por efecto de diferentes concentraciones de fungicidas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	28	3969.584556	141.770877	66.70	0.0001
Error	61	129.661667	2.125601		
Corrected Total	89	4099.246222			
	R-Square	C.V.	Root MSE		AUC Mean
	0.968369	22.17218	1.457944		6.575556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2414.139556	603.534889	283.94	0.0001
DOSIS	5	946.060479	189.212096	89.02	0.0001
FUNGI*DOSIS	19	609.384521	32.072870	15.09	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2287.362107	571.840527	269.03	0.0001
DOSIS	5	952.276854	190.455371	89.60	0.0001
FUNGI*DOSIS	19	609.384521	32.072870	15.09	0.0001

Anexo 13 Análisis para el área bajo la curva de la Cepa RL-9.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	28	3969.584556	141.770877	66.70	0.0001
Error	61	129.661667	2.125601		
Corrected Total	89	4099.246222			
	R-Square	C.V.	Root MSE		AUC Mean
	0.968369	22.17218	1.457944		6.575556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2414.139556	603.534889	283.94	0.0001
DOSIS	5	946.060479	189.212096	89.02	0.0001
FUNGI*DOSIS	19	609.384521	32.072870	15.09	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2287.362107	571.840527	269.03	0.0001
DOSIS	5	952.276854	190.455371	89.60	0.0001
FUNGI*DOSIS	19	609.384521	32.072870	15.09	0.0001

Anexo 14 Análisis para el área bajo la curva de la Cepa 9205.

Sum of Source	Mean	DF	Squares	Square	F Value	Pr > F
Model		29	4928.348889	169.943065	16.57	0.0001
Error		60	615.473333	10.257889		
Corrected Total		89	5543.822222			
	R-Square		C.V.	Root MSE		AUC Mean
	0.888980		30.63246	3.202794		10.45556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2318.002222	579.500556	56.49	0.0001
DOSIS	5	1271.266222	254.253244	24.79	0.0001
FUNGI*DOSIS	20	1339.080444	66.954022	6.53	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUNGI	4	2318.002222	579.500556	56.49	0.0001
DOSIS	5	1271.266222	254.253244	24.79	0.0001
FUNGI*DOSIS	20	1339.080444	66.954022	6.53	0.0001

Anexo 15. Nombre genérico y nombre comercial de los fungicidas utilizados en los estudios de susceptibilidad y esporulación de *B bassiana*, Turrialba 1998.

Nombre Genérico	Nombre Comercial
Triazol Tebuconazol	Slivacur 30 CE
Clorotalonil	Daconil 10
Hidroxido de cobre	Kocide
Oxicloruro de cobre	Cupravit
Triazol ciproconazol	Atemi 10 SL

Anexo 16. Artículo I:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES FORMULACIONES Y MÉTODOS DE ALMACENAMIENTO SOBRE CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *B. bassiana*

1 INTRODUCCIÓN

B. bassiana es un hongo que se encuentra a nivel mundial. Este ataca una gama amplia de insectos tales como: mosca blanca, áfidos, saltamontes, termitas, picudos, chinches, hormigas, polillas etc. Las esporas infectan directamente a través del exterior de la piel del insecto. La adhesión a la cutícula del insecto requiere de condiciones adecuadas de humedad y temperatura. La hifa que crece de la espora secreta enzimas que atacan y disuelven la cutícula, permitiéndole penetrar la piel y crecer en el cuerpo del insecto. Una vez dentro del insecto produce una toxina llamada Beauvericina que debilita el sistema inmune del insecto. Cuando las condiciones son favorables el hongo emerge a través de las partes más suaves del cuerpo del insecto, produciendo una "masa blanca" (Marh, 1999). *B. bassiana* requiere condiciones de alta humedad, cercanas al 90% para crecer y esporular fuera del insecto. Estas hifas externas producen conidios que maduran y se sueltan en el ambiente, completando el ciclo.

B. bassiana está disponible comercialmente como un insecticida microbiano y puede ser producido por un proceso de fermentación o métodos menos complejos como el arroz; se puede formular para permitirle al hongo resistencia a la luz ultravioleta, la temperatura y las condiciones extremas de humedad normalmente encontradas en el campo (Marh, 1999).

Hay varios productos que contienen *B. bassiana* entre ellos Naturalis®, Mycotrol y algunos de estos productos son producidos artesanalmente. Según Daoust et al (1982), el término formulación implica alteración del ingrediente activo o adición de compuestos con el fin de mejorar la actividad y facilitar la aplicación. Para Daoust et al (1983), el desarrollo de formulaciones apropiadas es esencial para la utilización de los micoinsecticidas. Las propiedades físicas y biológicas de la formulación entre ellas la viabilidad, deben permanecer estables por lo menos un año pero preferiblemente por 18 meses para permitir su comercialización. De importancia primaria está la retención de viabilidad y

virulencia de las unidades infectivas durante el almacenamiento y la aplicación (Dauost *et al* ,1983). También se busca mejorar la aplicación de esporas y la eficiencia.

Según Feng *et al* (1994), los micoinsecticidas comerciales deben ser formulados con dos objetivos: facilitar la aplicación en el campo contra el organismo foco dentro de su hábitat y mejorar la vida media y persistencia en el ambiente después de la aplicación. Una vez que se desarrolla una formulación básica del agente biológico es esencial preservar la actividad de éste en el substrato en el cual se incorpora; de esta manera, substratos como suelo, tejido vegetal o granos almacenados, pueden atenuar el efecto de los factores ambientales en la actividad del patógeno; en consecuencia, la luz solar, la temperatura, la humedad y los agentes químicos determinan su éxito o fracaso en el campo (Velez, 1998).

Gradner *et al* (1985) evaluaron la persistencia de *Beauveria bassiana* y *Nomurea rileyi* en el follaje de la soya. Los resultado de estos estudios mostraron una pérdida del 50% de la actividad de cada patógeno en el follaje entre 5 y 10 días después de la aplicación, perdida que fue atribuida al efecto de la luz solar directa, a las altas temperaturas y a los altos niveles de evaporación (Velez,1998). El uso de portadores no acuosos tales como las suspensiones en aceite se muestran promisorios para utilización de *Beauveria bassiana* a bajo volumen. Se ha encontrado que varios tipos de aceites disminuyen los niveles de inóculo necesarios en las infecciones por hongos. Las esporas de *B.bassiana* formuladas en aceite pueden dispersarse en gotas de tamaño entre 30 a 300 micras, usando aspersoras manuales de disco rotativo a bajo volumen. Mediante la observación microscópica de éstas se ha confirmado que existe una distribución uniforme de esporas viables en las gotas de aceite. Las cutículas lipofílicas de las esporas fúngicas les permite suspenderse fácilmente en aceites portadores apropiados que se depositan sobre el cultivo esporulado del hongo. Los aceites también se adhieren rápidamente y se diseminan en las cutículas del insecto hospedante, facilitando la penetración del hongo a través de las membranas más susceptibles (Velez, 1998).

Experiencias previas en Cenicafé con algunas preparaciones de *B.bassiana* en campos experimentales y comerciales, han demostrado éxito en el control de la broca del café, de manera que se ha encontrado una alta proporción de la broca del café (> 75%) infectada por el hongo (Bustillo, 1995). Así mismo, evaluaciones realizadas en parcelas de manejo integrado han mostrado que, en promedio, la reducción en la población de broca ha sido cercana al 50% (Bustillo, 1995). Otros trabajos de campo tendientes a evaluar la eficacia de diferentes equipos de aspersión para el control

del insecto han mostrado, en promedio, porcentajes de infección del 52,1% mediante una sola aspersión dirigida al árbol (Flores, 1997). Sin embargo, las evaluaciones de campo para establecer la eficacia de *B.bassiana* en diferentes condiciones ecológicas, han mostrado un efecto variable. Los resultados muestran que se pueden obtener mortalidades de la broca por efecto del hongo hasta de un 80%, pero bajo condiciones de humedad y sombrío no favorables, su eficacia se puede reducir a niveles del 20 o el 30% (Bustillo, 1995).

En general el uso de hongos entomopatógenos ha sido promisorio en condiciones tropicales pero aún no se han realizado estudios de investigaciones tendientes a evaluar el efecto de los factores ambientales en la viabilidad de formulaciones de *B.bassiana*. Algunos trabajos previos llevados a cabo en laboratorio y campo han demostrado que a mayor tiempo de exposición de las esporas o propágulos de este hongo al efecto de la radiación solar global, menor es su viabilidad (Velez, 1993). Fergues *et al* (1979) encontraron que los conidios pulverizados para su secado a 15°C y cubiertos con bentonita tiene de 50 a 70% de viabilidad, en tanto que las blastosporas que también son sensibles a esta técnica fueron liofilizadas y mezcladas con leche en polvo suplementada con glicerina; con este tratamiento, la viabilidad de las esporas aumentó a 89%. El almacenamiento de estas preparaciones se efectúan a una temperatura de 5°C con la cual se preserva la viabilidad de las esporas por un lapso de más de 18 meses. Ignoffo (1979) menciona que el micelio o esporas de *B.bassiana* una vez secas, pueden ser mezcladas con talco ó algún material inerte como la perlita, Kaolin, la bentonita o el almidón. Alcocer (1979) utilizó la harina de arroz estéril como vehículo para su preparación y la preservó a 4°C.

1.1 Objetivo general: Evaluar el efecto de diferentes formulaciones y métodos de almacenamiento sobre algunas características de *Beauveria bassiana*.

1.2 Objetivos específicos: Determinar el efecto de la temperatura y humedad de diferentes formulaciones sobre la viabilidad de conidios, crecimiento y esporulación de dos cepas de *B. bassiana*

2 Materiales y Métodos

2.1 Localización del experimento.

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Control Microbial de la unidad de Fitoprotección del CATIE, entre enero y octubre de 1999.

2.2 Producción masiva del hongo *Beauveria bassiana*.

Se utilizaron las cepas 9205, y RL-9 de *Beauveria bassiana*, estas cepas estaban disponibles en el laboratorio de control microbial del CATIE. La cepa 9205 fue aislada de *Diatraea saccharalis* y reactivada y evaluada contra la broca del café por González *et al* (1993) en Colombia; mientras que la RL-9 corresponde a la cepa No 9 recolectada y evaluada por Lazo, (1990) en broca del café en Honduras. Para su mantenimiento se utilizó el medio de cultivo PDA al 2 %. Los cultivos fueron incubados a 26°C. Se preparó una suspensión de conidios en agua estéril mezclada con Tween 80 (dispersante); para esto se utilizaron 0,5 ml/l (aproximadamente 1 gota por cada 50ml). Se sembró el hongo en arroz el cual fue sumergido previamente en agua durante hora y media, posteriormente se esterilizó durante 20 minutos a 15 libras de presión y 120°C. La inoculación se realizó sobre 400 gr. de arroz por bolsa de polipropileno; se pusieron 15 ml de la suspensión del hongo de 1×10^7 conidios/ml. Luego de cuatro días de la inoculación se vertieron en bandejas plásticas con tapa para estimular la germinación y el proceso de secado por 4 a 5 días consecutivos. La separación de los conidios de los granos de arroz se hizo mediante un tamiz de 50 mesh. Se cuantificó el número de conidios por gramo de polvo para los cálculos de las concentraciones a usar.

2.3 Evaluación de las formulaciones.

Se evaluaron cuatro formulaciones, como tratamiento principal a saber: *Beauveria bassiana* en aceite Agrol 971 (Stepen company, USA), *B bassiana* en Agrol 85L (Sun spray 9E de la Sun Company, Philadelphia, USA), *B bassiana* liofilizada y *B bassiana* en polvo. Se utilizaron dos cepas (RL-9 y 9205), dos temperaturas de almacenamiento (0 y 22 °C) y dos tratamientos de secado (con sílica y sin sílica), la cual se agregó dentro de la formulación del hongo). Se procedió a preparar las formulaciones del hongo *B. bassiana* a partir de los aceites, los cuales son aceites parafínicos, derivados de hidrocarburo, conteniendo 1×10^7 esporas/ml de solución de aceite; estas presentaciones fueron líquidas. La formulación liofilizada tuvo una presentación en polvo. Para esta, se procedió a tomar una muestra de 1 gr. del hongo previamente obtenido y se sometió al

proceso de liofilización, en el cual se procedió a congelar el hongo en polvo, se utilizó tela dacrón para confeccionar las bolsitas de 2 cm. x 5 cm. donde fueron vertidas las muestras; estas impedían la pérdida de la muestra por medio del vacío en el liofilizador. Estas fueron selladas utilizando calor. A la muestra se le adicionó nitrógeno líquido el cual sirve para romper las moléculas de agua y ayuda a la deshidratación total de la muestra.

Estas muestras fueron colocadas en frascos especiales de 500 ml de capacidad para liofilizar, los cuales tuvieron un tiempo de secado de 12 horas. El vacío utilizado fue de 0,1 torr, una vez secado el material fue retirado y a cada tubo se le aplicó vacío por 20 segundos tratando de eliminar todo el oxígeno posible del tubo. De esa forma fueron almacenados en desecadores (cámara de vidrio con sílica indicadora) durante 9 meses.

Los tratamientos, se ubicaron en un diseño irrestricto al azar, con cuatro formulaciones, dos cepas, dos temperaturas, dos modalidades de almacenamiento para un total de 32 tratamientos.

2.4 Variables evaluadas.

Viabilidad de las conidias

Mensualmente se evaluó la viabilidad del hongo utilizando la siguiente metodología. Para la formulación en polvo y liofilizada se prepararon suspensiones de hongo con 25 ml de agua con Tween esterilizadas, a los que se le agregó 0,01g de conidios de dichas formulaciones, estas fueron agitadas en ultrasonificador y colocados en platos de petri con medio PDA agregándole 90 microlitros de agua y 10 microlitros de suspensión, rayando el plato e incubando a 26°C por 20 horas. Para la formulación en aceite se utilizaron 10 ml de agua y 0,01ml de cada formulación. Luego se procedió a realizar los conteos de germinación hasta tener un total de 100 conidias, separando las conidias germinadas y las no germinadas.

Evaluación del crecimiento diamétrico

Se utilizaron discos de hongo de 1 cm de diámetro de cada formulación, se sembraron en platos de petri, se incubaron a 25°C, cada dos días se evaluó el crecimiento en diámetro muestreándose 8 veces cada mes en todo el periodo experimental.

Evaluación de la esporulación.

Esta prueba se llevó a cabo disolviendo un disco de 1 cm de diámetro del cultivo del hongo de cada plato de petri proveniente de la prueba de crecimiento diamétrico. Para disolver el inóculo se utilizó agua con Tween en concentración conocida, haciendo las diluciones correspondientes y contando el número de esporas a través del hematocímetro.

2.5 Análisis estadístico

El modelo matemático utilizado para el análisis fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + F_j + T_k + H_l + (CF)_{ij} + (TH)_{kl} + (FTH)_{jkl} + E_{ijkl}$$

DONDE:

μ : PROMEDIO GENERAL

C_i : CEPAS

F_j : EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS

T_k : EFECTO DE LA TEMPERATURA

H_l : EFECTO DE HUMEDAD

CF, TH: EFECTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS TRAT.

FTH: EFECTO DE LAS INTERACCIONES DE SEGUNDO ORDEN

E_{ijkl} : VARIACIÓN DEBIDA AL ERROR EXPERIMENTAL

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante las pruebas de Análisis de Varianza y pruebas de

3 RESULTADOS

3.1 Viabilidad de conidios

En la Figura 1, se observa el porcentaje de germinación de conidios para las dos cepas por efecto de las formulaciones a través de los 9 meses de evaluación. La formulación liofilizada mantuvo un 100 % de viabilidad durante este tiempo, no siendo afectada por los métodos de almacenamiento (temperatura y humedad). La formulación en polvo, agrol 97 y agrol 85 si mostraron una disminución a través del tiempo. En la formulación en polvo, la viabilidad cayó al 75 y 66 % para la cepa 9205 y RL-9 respectivamente. En el agrol 97, esta cayó a 73 y 67 % para la cepa 9205 y RL-9 respectivamente mientras que para el agrol 85L, la disminución fue alta para la cepa 9205

alcanzando el 61 % pero para la cepa RL-9 se mantuvo alta a los 9 meses con el 83 %, siendo la mejor formulación aparte de la liofilizada.

Hubo diferencias significativas para el efecto de las formulaciones y las condiciones de almacenamiento (humedad y temperatura) así como las interacciones sobre la viabilidad de conidios para la cepa 9205 mientras que para la cepa RL-9, solo la interacción humedad por formulación fue significativa. (Anexo 1 y 4)

La formulación liofilizada mantuvo el mayor porcentaje de viabilidad (100 %) a los 6 y 9 meses bajo las diferentes condiciones de almacenamiento (Figuras 2, 3 y 4). Las otras formulaciones se comportaron diferente de acuerdo a la cepa y a las condiciones de temperatura (0 y 22 °C) y de humedad (con sílica y sin sílica).

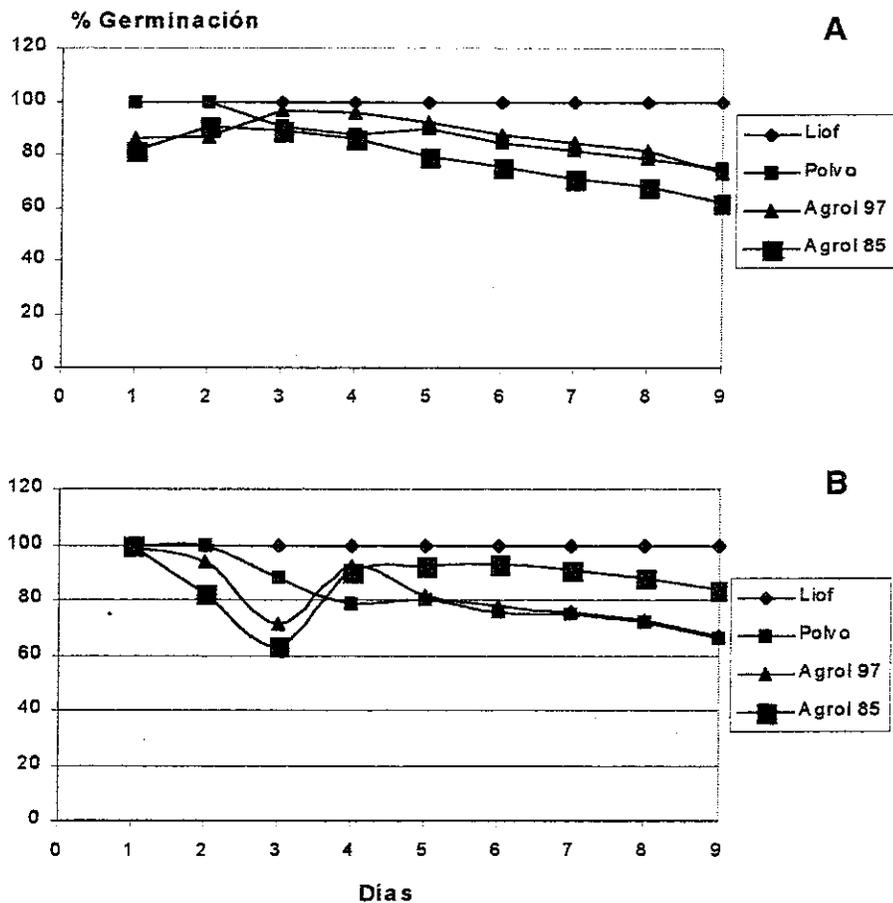


Figura 1. Efecto de cuatro formulaciones de *B. bassiana* sobre la viabilidad de conidios durante nueve meses para A. Cepa 9205 y B. Cepa RL-9

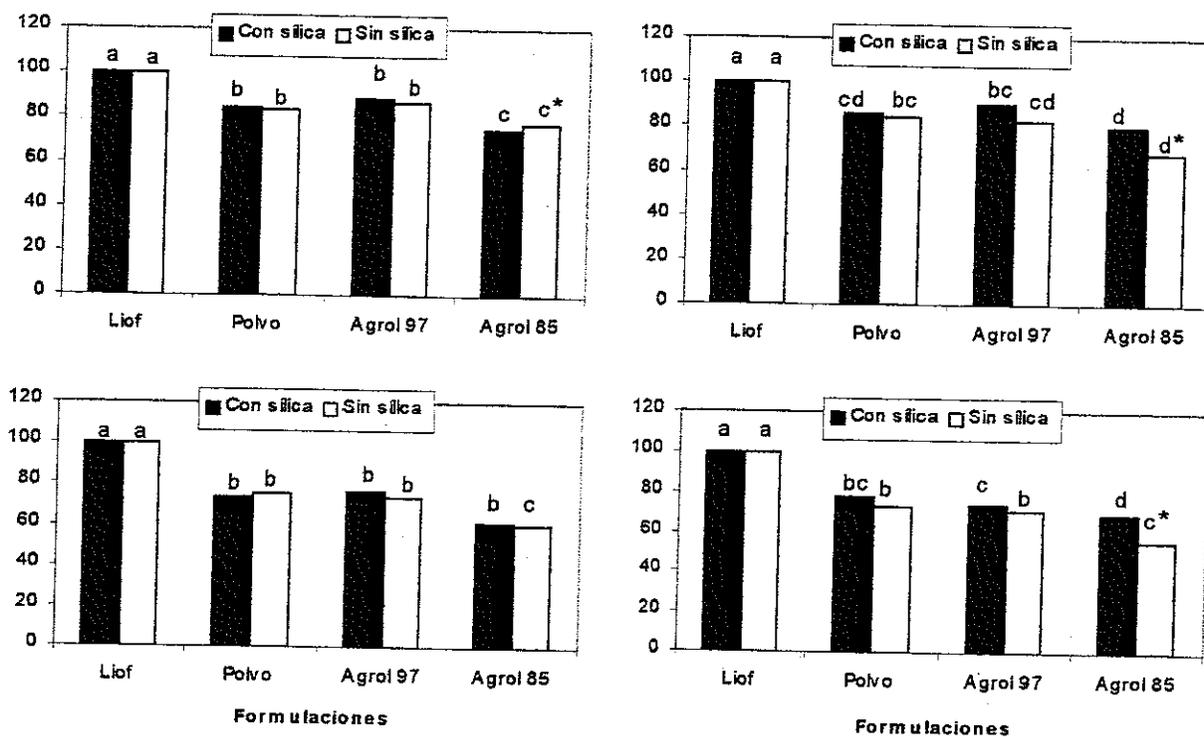


Figura 2. Efecto de varias formulaciones y dos humedades (con y sin sílica) sobre la viabilidad de conidios de *B. bassiana* (9205) a dos temperaturas, a 22 °C (Izquierda) y 0 °C (derecha), a los 6 meses (superior) y 9 meses (inferior)

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de T para medias ajustadas al 5 %

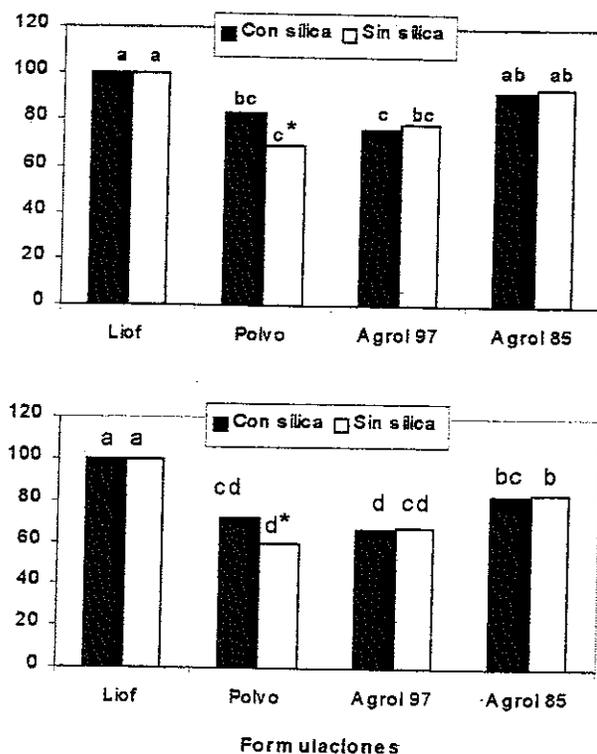


Figura 3. Efecto de varias formulaciones y dos humidades (Con y sin sílica sobre la viabilidad de conidios de *B. bassiana* (RL-9) a los 6 y 9 meses.

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de T para medias ajustadas al 5 %.

Para la cepa 9205, los conidios de *B. bassiana* formulados en polvo con sílica, mantuvieron niveles de viabilidad mayores cuando se mantuvieron a 0 ° C que a 22 ° C. Lo mismo ocurrió con la formulación en agrol 85, tanto a los 6 y 9 meses de evaluación (Fig 2), mientras que para agrol 97, no hubo un comportamiento claro.

Cuando se almacenaron sin sílica, tanto la formulación en polvo como en aceite agrol 97, la viabilidad fue muy semejante tanto a 0° C como a 22 ° C pero en el de agrol 85, fue mayor a 22 ° C (Fig 2). En general, la viabilidad a los 9 meses para la cepa 9205 fue menor en la formulación de agrol 85, intermedia en polvo y agrol 97 y muy alta en la liofilizada (Fig 2).

Cuando se considera la interacción temperatura x humedad para la cepa 9205 (Fig 2) se observa que a 22 ° C, las diferentes formulaciones no muestran un efecto claro de la sílica, ya que la viabilidad fue similar en las diferentes formulaciones tanto con sílica como sin ella. Mientras que a 0 ° C, los conidios almacenados con sílica siempre mantuvieron porcentajes de viabilidad superiores a aquellos sin sílica (Fig 2).

Para la cepa RL-9, solamente hubo interacción entre formulación y humedad por lo que en la Fig 3 no se considera el efecto de la temperatura. Para esta cepa la viabilidad fue muy alta en el agrol 85, alcanzando valores superiores al 82 % a los 9 meses, lo cual es muy bueno. Las formulaciones en polvo y agrol 97 tuvieron valores intermedios. Respecto al efecto de la humedad (sílica) en la Fig 3 se observa que solamente para la formulación en polvo hay un efecto benéfico ya que a los 9 meses, la viabilidad fue del 59 % sin sílica y de 72 por ciento con sílica mientras que en las formulaciones de aceite prácticamente mantuvieron niveles de viabilidad similares (Fig 3).

2.3.2. Crecimiento de *B. bassiana*

El crecimiento del hongo fue afectado por las formulaciones, las condiciones de almacenamiento y sus interacciones para ambas cepas estudiadas durante los 9 meses (Anexos 2 y 5). Como esta variable es dependiente de la viabilidad y de la cantidad de inóculo que se ponga en el plato con el medio de PDA a crecer, y además porque el estudio de crecimiento se realizó en condiciones uniformes de temperatura y humedad, probablemente las condiciones en que se mantuvieron las formulaciones en su momento, esto es la humedad (con o sin sílica) así como de temperatura (0 y 22 ° C) no deberían tener un efecto drástico sobre el crecimiento y esporulación del hongo. Por esta

razón, se va a enfatizar solo el efecto de las formulaciones durante los 3, 6 y 9 meses como se presenta en el Cuadro 1. Como se observa en este Cuadro, el crecimiento del hongo en la cuatro formulaciones es similar en los diferentes períodos de evaluación y las dos cepas.

Cuadro 1. Efecto de diferentes formulaciones sobre el crecimiento de *B. bassiana* en cm durante diferentes períodos de evaluación.

Formulación	Cepa 9205			Cepa RL-9		
	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 3	Mes 6	Mes 9
Liofilizada	3.98 a	2.83 a	2.03 a	4.00 a	2.78 b	2.08 a
Polvo	3.85 a	2.72 a	1.98 a	4.00 a	2.95 a	2.15 a
Agrol 97	3.77 a	3.06 a	1.98 a	3.87 b	3.41 a	1.93 b
Agrol 85	3.87 a	3.15 a	2.04 a	3.93 a	2.68 b	2.03 a

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de Tukey al 5 %

2.3.3. Esporulación de *B. bassiana*

Según el análisis de varianza, la esporulación al igual que el crecimiento, fue afectado por los diferentes factores en estudio y sus interacciones.(Anexos 3 y 6). Sin embargo, como este depende del crecimiento del hongo de la prueba anterior y como se indicó, este no fue afectado por la humedad y la temperatura de almacenamiento de las formulaciones, se da énfasis al efecto solo de las formulaciones sobre la esporulación (Cuadros 2) durante tres períodos de evaluación. La formulación en polvo fue la que presentó los más altos valores de esporulación durante los tres meses, para ambas cepas evaluadas.

Cuadro 2. Efecto de varias formulaciones sobre la esporulación de *B. bassiana* (Conidios/ml x 10⁸), durante tres periodos de evaluación.

Formulación	Cepa 9205			Cepa RL-9		
	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 3	Mes 6	Mes 9
Liofilizada	6.65 b	6.56 b	6.16 b	5.84 b	5.74 b	5.57 b
Polvo	12.12 a	12.00 a	11.79 a	11.66 a	11.56 a	11.32 a
Agrol 97	6.52 b	6.38 b	6.23 b	7.41 b	7.38 b	7.31 b
Agrol 85	6.13 b	5.93 b	5.74 b	4.59 c	4.57 c	4.38 c

*Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según prueba de Tukey al 5 %

4 DISCUSIÓN

La formulación liofilizada presentó una gran eficiencia para conservar la viabilidad de conidios durante 9 meses comparado con los otros tratamientos. El proceso de liofilización es normalmente usado para conservar alimentos por mucho tiempo sin afectar las características de estos. Es el método más apropiado para el secado de productos sensibles al calor. Durante la liofilización, el agua es retirada directamente en forma de vapor a partir del producto congelado. Debido a que la operación se efectúa a muy bajas temperaturas, se evita cualquier tipo de deterioro térmico del producto. Este nivel de viabilidad mantenido en la formulación liofilizada, probablemente podría permitir un mayor tiempo de almacenamiento que los nueve meses y este es independiente de las condiciones de humedad y temperatura. La sílica en esta formulación no tuvo influencia ya que el objetivo de la sílica es reducir la humedad pero al estar liofilizada, ya sea con o sin sílica, el proceso de liofilización reduce la humedad al 0 %. Se hace necesario seguir monitoreando la viabilidad por un tiempo mayor para determinar hasta que tiempo de almacenamiento, la sílica podría jugar algún papel en contribuir a mantener una mayor viabilidad de los conidios.

El uso de sílica tuvo un efecto benéfico sobre la viabilidad en interacción con la temperatura para la Cepa 9205 ya que en presencia de sílica la viabilidad se mantuvo más alta principalmente a 0° C que

a 22° C para las formulaciones en polvo y los aceites, principalmente en la formulación en polvo. Mientras tanto para la Cepa RL-9, el efecto de la sílica fue independiente de la temperatura y sólo tuvo un efecto benéfico en la formulación en polvo.

Varios autores han indicado el efecto benéfico de la sílica para mantener la viabilidad por más tiempo y han señalado a la humedad como uno de los factores más adversos para la sobrevivencia de los conidios del hongo. Algo similar ocurre con la temperatura ya que las temperaturas bajas permiten mantener la viabilidad por más tiempo (Moore, 1995; Daoust et al. 1982, 1983; Daoust y Roberts 1983).

La temperatura y humedad son factores importantes al almacenar conidios de *B. bassiana*. Así por ejemplo, Daoust y Roberst (1983) encontraron una mayor retención de viabilidad a una temperatura de 4°C y una humedad del 0%, indicando que las temperaturas bajas son más favorables para mantener niveles de viabilidad adecuados. Esto permite un almacenamiento por periodos de tiempo más largos. Es importante destacar que esto es uno de los objetivos más importantes de la formulación la cual busca mantener una mayor viabilidad en presencia de condiciones ambientales normales, la cual puede permitir que el bioplaguicida basado en conidios de *B. bassiana* pueda mantenerse por mucho más tiempo sin tener que utilizar equipos sofisticados de almacenamiento y puedan comercializarse al agricultor sin grandes problemas.

Las formulaciones en aceite al inicio del estudio presentaron bajos porcentajes de viabilidad, pero esto se debió al tiempo que se daba para hacer los conteos de germinación (20 horas); este intervalo de tiempo no era suficiente por lo que posteriormente se les dio un tiempo de 48 horas para hacer la evaluación. Esto se debió a que los conidios necesitan humedad para germinar. El aceite forma una película en el conidio que impide que este absorba agua, retardando su germinación. Es probable que muchos conidios no logren absorber suficiente humedad en el período de 48 horas lo que retrasaría su germinación y como ya habían germinado muchos, el crecimiento del micelio impide que podamos realizar conteos después de las 48 horas.

En general, la formulación en aceite Agrol 85 bajo sensiblemente la sobrevivencia de los conidios a los nueve meses para la cepa 9205 pero por el contrario para la cepa RL-9, esta formulación fue la mejor y podría tener un potencial para almacenar conidios por más tiempo ya que mantuvo niveles superiores al 82 % sin sílica y 84 % con sílica, siendo de un costo más bajo que la liofilizada la cual requiere un equipo sofisticado.

Lo que se busca con este trabajo es tener una formulación que sea barata, que permita mantener las características del bioplaguicida inalterables por mucho tiempo, que pueda almacenarse fácilmente y que permita su comercialización, además de facilitar la aplicación. Es así como las formulaciones con aceite han tenido mucho éxito para control de diferentes plagas en el campo, como por ejemplo, picudo del plátano (Contreras, 1996), picudo del chile (Duran, 1998 y Carballo 1998), mosca blanca (Carballo et al 1999) y Picudo del coco (*Pantorhyta phutor*) (Prior et al 1988).

Así mismo, aunque en este trabajo no se desarrollaron pruebas de virulencia de estas cepas contra la broca, tanto la 9205 como la RL-9 ya fueron probadas con éxito contra la broca del café en otros países. Así por ejemplo, en Colombia Gonzales, et al 1993, obtuvieron un 100 % de mortalidad con esta cepa, mientras que Lazo, 1990 en Honduras, utilizó la cepa RL-9 la cual obtuvo de adultos de broca en el campo, en un estudio de susceptibilidad de la broca a diferentes cepas de *B. bassiana* aunque esta cepa no fue la mejor en su estudio.

En cuanto a la prueba de crecimiento, los resultados indicaron que no hubo diferencias por efecto de las formulaciones. Esto es esperable ya que estamos colocando cantidades similares de inóculo del hongo (suspensiones de conidios) en todos los tratamientos ya que incluso a los 9 meses, la viabilidad de conidios todavía se mantiene alta en todas las formulaciones. Es probable que el crecimiento se vea afectado en un período mayor de almacenamiento (18 meses) porque ahí probablemente si habrá una pérdida significativa de viabilidad de algunos de los tratamientos que podría afectar el crecimiento del hongo. Es probable que para futuros trabajos la prueba de crecimiento deba hacerse con conidios individuales y no suspensiones de conidios. Si se observó por ejemplo que los conidios en la formulación liofilizada germinaban más rápido que las otras y que los de aceite tardaban más tiempo lo que podría permitir que el crecimiento sea más acelerado en la formulación liofilizada.

Sobre la esporulación de *Beauveria bassiana* en cada una de las formulaciones, la formulación en polvo esporuló en mayor cantidad que las otras formulaciones, lo cual no está asociado con el crecimiento el cual fue similar entre las formulaciones. Podría ser que algún factor en las formulaciones liofilizada y de aceites retarden la esporulación en el tiempo o bien que reduzcan la capacidad de esporular. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar a que se debe esto. Para el uso en el campo, esta característica no es muy importante ya que cuando aplicamos el hongo para el control de la plaga, lo más importante es la viabilidad de los conidios y

que estos tengan poder de germinar y penetrar el cuerpo del insecto. La esporulación se da al final del ciclo de vida del patógeno cuando el micelio de éste emerge al exterior adonde produce las esporas. Para fines de producción masiva, la esporulación es importante pero también depende del inóculo que usemos y de los métodos de conservación que utilicemos, por ejemplo, podríamos conservar cepas de hongos en forma liofilizada como se utiliza en algunos países o bien en aceite, pero debemos considerar que para evitar la pérdida de algunas de las características como capacidad de esporulación y virulencia, debemos pasar frecuentemente las cepas por el insecto hospedante original en que fue encontrada la cepa, ya que es frecuente la pérdida de capacidad de esporulación y virulencia cuando hacemos cultivos consecutivos en medios artificiales como el PDA lo que también conlleva a que perdamos capacidad de esporulación en medios para la producción masiva como el arroz.

5 CONCLUSIONES

- Las diferentes fases de crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* se vieron afectadas por las formulaciones en las dos cepas (9205 y RL-9) evaluadas.
- En cuanto a la viabilidad de los conidios, la formulación que permitió la geminación al 100% de los mismos durante los nueve meses de evaluación fue la Liofilizada.
- La formulación liofilizada no se vio afectada por la temperatura ni las condiciones de almacenamiento.
- Las formulaciones en Polvo, Aceite Agrol 97 y Aceite Agrol 85 si disminuyeron la viabilidad de los conidios de ambas cepas durante el periodo experimental.
- La formulación en aceite agrol 85 fue la segunda mejor en cuanto a la conservación de la viabilidad de los conidios en la cepa RL-9.
- Para la cepa 9205 la formulación en polvo con sílica almacenados a 0°C mantuvo la viabilidad de los conidios a niveles mayores que la almacenada a 22°C.
- La sílica y la temperatura de 0°C permiten mantener la viabilidad de las conidias a niveles mayores.
- Para la variable crecimiento en ambas cepas del hongo *B bassiana* a través del tiempo, las formulaciones no tuvieron efecto, por lo que al final de el período experimental las cuatro formulaciones se comportaron igual.
- La esporulación de ambas cepas se vio favorecida en la formulación en polvo, presentando los valores más altos.

6 RECOMENDACIONES

Se sugiere continuar monitoreando la viabilidad de los conidios en las diferentes formulaciones por mayor tiempo y a la vez evaluar el efecto de los métodos de almacenamiento sobre la preservación de los conidios.

En cuanto a la prueba de crecimiento deberá hacerse con conidios individuales y no con suspensiones de conidios.

Se hace necesario continuar las investigaciones para determinar las causas que favorecen la mayor esporulación en la formulación en polvo.

7 LITERATURA CITADA

- ALVES, S. 1986. Patologia geral. In Controle microbiano de insectos. Ed por Sergio Batista Alves. Sao Paulo Brasil 10-15.
- BARNETT, H. 1972. illustrated Genera of imperfect fungi, by H.L. BARNETT and B.B. HUNTER. 3 edi. Minneapolis, Burges, 241p.
- BATISTA, A. ; LEITAO, A. ; SATO, M. ; LEITE, L. ; 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.
- CARBALLO, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. CATIE. Costa Rica.
- CARBALLO, M. 1998. Uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas. CATIE. Costa Rica.20-24.
- CARBALLO, M. ; Hilje, L. ; STANSLY, P. ; HIDALGO, E. 1999. Mortalidad de ninfas de *Bemisia tabaci* con cepas comerciales y nativas de hongos. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- COUCH, T. L., and Ignoffo, C. M. 1981. Formulation of insect pathogenens. In "Microbial Control of Pest and Diseases1970-1980(H. D Burges, ed), pp 621-634. Academic Press, New york.
- DAOUST, R. A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metharhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. Journal of invertebrate Pathology 40:228-236.
- DAOUST, R. A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. Journal of Invertebrate Pathology 41:151-160.

- DAOUST, R 1986. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadaveres of cowpea pest stored outdoors and in laboratory in Brasil. Environ. Entomol 5(3): 642-645.
- DURAN, J. 1998. Uso de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Como alternativa de Manejo del Picudo del Chile *Anthonomus eugenii* Cano. Tesis Ms. Sc. CATIE. Turrialba Costa Rica.
- FARGUES, J.; ROBERT, P.; et REISINGER, O. Formulation de productions de masse de l'hyphomycete entomopathogene *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires. Annales. de Zoologie. (Ecologie animale) 11 (2): 247-250.
- FENG, M.G.; OPPROWSKI, T. J. KHACHATOURIANS, G.G. 1994. Production, formulation and application of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. Biocontrol Science and Technology 4:3-34.
- FERRON, P 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Col: Bruchidae). Entomophaga. 22(4): 393-395.
- GONZALEZ, M.; POSADA, F.; BUSTILLO, A. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. CENICAFE, 44(33): 93-102.
- HIDALGO, E. 1995. Development and evaluation of different formulations of *Beauveria bassiana*, to control *Sitophilus zeamais* in stored maize. Ms. Sc. University of London. 76p.
- HARGREAVES, H. 1936. *Stephanoderis hampei* Ferr.: Coffee Berry Borer in Uganda. The East African Agric. Jour p.218-224.
- IGNOFFO, M. 1979. Laboratory and field studies with Boverin: a microinsecticidal preparation of *Beauveria bassiana* produced in the Soviet Union. J of Econ. Entomol 72(4): 562-563.
- LACAYO, L 1995. Use of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. for control of *Hypothenemus hampei* Ferr. and *Plutella xylostella* in Nicaragua. A thesis submitted for the degree of doctor of Philosophy of the University of London and for the Diploma of imperial College. Department of Biology imperial College at Silwood Park. Ascot. London Inglaterra. pp123-129.
- LE PELLEY, R. 1973. Pest of Coffe. Butter y Tanner Ltd. London.: 590p.
- LEUCONA, R. ; FERNANDEZ, P. ; ALVES, S. ; BLEICHER, E. 1986. Patogenicidade de *Metarrizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. , a broca -do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). An. Soc. Entomol. Brasil. , 15 (suple):21-27.
- LORIA, R. ; GALANI, S. ; Roberts, D 1983. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. Environ. Entomol. 12 (6): 1724-1726.
- MAHR, M. 1999. *Beauveria bassiana*. University of Wisconsin. Madison 4 (10): 1-3

- MONTERROSO, J. 1981. Incidencia de *Beauveria bassiana* sobre broca del café y su reproducción en coco en Guatemala. Rev. Cafetalera ANACAFE 6(21): 10-12.
- MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; PRIOR, C. 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviridae* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Science and Technology 5:193-199.
- MOLINARI, P. 1988. Situación de la Broca *Hypothenemus hampei*. (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Rev. Sanidad Vegetal. Ecuador 3 (3) : 31-38.
- POSADA, F. ; ANTÍA, O. ; BUSTILLO, A. 1992. Estandarización de las pruebas de control de calidad para las formulaciones de bioplaguicidas. In : CONGRESO SOCOLEN, Manizales 97p.
- PRASERTPHON, S 1968. The formation and circulation, in *Galleria*, of hyphal bodies of entomophoraceous fungi. J of Invertebrate Pathol. 11: 260-265.
- PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; PATOUREL, G. LE. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Invertebrate Pathology 52:66-72.
- RAMARAJE, N. ; GOVINDU, H. ; SHIVASHANKARA, K. 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrizium anisopliae*. Journal of invertebrate Pathology 9(3):398-403.
- ROBERTS, D. 1971. Use of fungi for microbial control of insect. In: Microbial control of insect and mite. 125- 139.
- SANCHEZ, M. 1992. Obtención de un biopreparado en polvo del hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Revista Latinoamericana de Microbiología 34(4): 319-324.
- VELEZ, P.A.; POSADA, F.J.; MARIN, P.; GONZALEZ, M.T.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A.E. 1997 Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones en Café. Boletín Técnico. N° 17. 37p.

Anexo 17. Artículo II:

EFFECTO DE ALGUNOS FUNGICIDAS SOBRE EL CRECIMIENTO Y ESPORULACIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*

1 INTRODUCCIÓN

El café es un cultivo que demanda el uso de diferentes agroquímicos como fungicidas, insecticidas y herbicidas para el control de enfermedades, plagas y otros problemas fitosanitarios. Sin embargo algunos de ellos afectan la reproducción, el establecimiento y la efectividad de los enemigos naturales de las plagas, principalmente los entomopatógenos. Frecuentemente, los agroquímicos son aplicados debido a la necesidad de controlar otros problemas fitosanitarios como las enfermedades, dentro de las cuales la Roya del café *Hemileia vastratrix* y el ojo de gallo *Mycena citricolor* se destacan por las defoliaciones que puede llegar a causar. A este respecto, Sernas (1981) señala que los fungicidas a base de cobre son los más adecuados para el control de estas enfermedades, y los fungicidas más ampliamente utilizados son el Oxiclورو de cobre y el Hidróxido de cobre. Esto podría representar un problema muy importante para el establecimiento y acción de *B. bassiana* en el agroecosistema cafetero. En evaluaciones in vitro, el hongo *B. bassiana* es afectado en alto grado por los fungicidas que inhiben, en la dosis comercial, hasta el 100% de la germinación y el crecimiento micelial.

Los fungicidas que tienen mayor efecto deletéreo sobre *B. bassiana* son triadimisol y hexaconazol y en menor grado el oxiclورو de cobre. Los fungicidas triphenyltin hydroxide (Brestanid) zineb (Dithani) y benomyl (Benlate) inhiben la germinación de esporas y el crecimiento de *B. bassiana* (Méndez, 1990); sin embargo, las investigaciones realizadas por Olmert y Kennet (1974) demostraron que la germinación de los conidios del hongo no es inhibida en presencia de estos fungicidas, pero que, sería conveniente no realizar aplicaciones de fungicidas cuando se vaya a usar este hongo para el control de la broca. Corso y Moscardi, 1981, llevaron a cabo una investigación con el objetivo de encontrar un fungicida que permita controlar el ataque de *B. bassiana* sobre el gusano de seda (*Bombyx mori*), (Lepidoptora: Bombycidae); reportando que Neantina, Cerconil y una mezcla de maneb+Daconil ejercen un buen control de la epizootia (Lazo, 1990).

Mancozeb y Methiran inhibieron totalmente al hongo bajo condiciones de laboratorio y de campo (Loria *et al.* 1993). En Guatemala, Rodriguez (1983) evaluó, bajo condiciones de laboratorio, siete fungicidas usados comunmente en la caficultura de ese país, encontrando que el oxiclورو de cobre fué el que menos inhibió la esporulación de *Beauveria. bassiana* (Lazo, 1990).

Gardner y Storey (1985) evaluando el efecto de 21 herbicidas, en la dosis de 0, 6, 12, 18, 24 y 30 mg de i.a./ml, encontraron que acifluorfen, alaclor, diclofob, dinoseb, fluazifob, metalaclor, oxifluorfen y paraquat inhibieron totalmente el crecimiento micelial de *B. bassiana* en todas las concentraciones evaluadas. El glifosato (Rondup) y Horyzalin (Surflan) inhibieron significativamente el crecimiento y germinación. Los reguladores del crecimiento, flurprimidol, paclobutrazol y salid, inhiben la germinación de *B. bassiana* en las concentraciones de 6 a 30 mg/ml. Concentraciones de 6 y 12 mg/ml de mefluide no reducen significativamente la germinación. Así mismo, de ocho coadyuvantes evaluados (Ortho x77, Plyac, Miller-Aide, Un-film 17 , Pro-Stick, Triton Ag -98 Triton Cs-7 y Tween 80) solo Triton Cs-7 fue el que inhibió la germinación de *B. bassiana* (Storey y Garnerd 1986).

Duran (1998) evaluando la acción de 10 fungicidas en las dosis de 100, 500, 1000 ppm utilizados en el cultivo del chile encontró que los fungicidas Aliette, Previcur y Kocide no inhiben el crecimiento del hongo, por otra parte los fungicidas Dithane, Benlate, Daconil, Acrobat, Antracol, y Curzate inhibieron totalmente la germinación y por ende el ciclo normal de desarrollo del hongo. En un intento por utilizar el hongo *Metarhizium anisopliae* como parte de un programa de manejo integrado de plagas contra la broca del café *Hypothenemus hampei*, la dosis comercial (DC) y la mitad de la dosis (1/2DC) de las siguientes sustancias fueron probadas para determinar su efecto sobre el hongo. Insecticidas: endosulfan, clorpirifos, pirimifos metil, fenitrothion y nim; fungicidas: benomyl, cyproconazol, hexaconazol, triadimefon y oxiclورو de cobre; herbicidas: oxifluorfen, paraquat, glifosato y glifosato + terbutilazina; aditivos de aspersión: Agral, Agrotin, Mezclafix y Mixel; fertilizante foliar: Tottal. La inhibición expresada en porcentaje a las 24 horas después de la germinación para la DC y la 1/2DC fue respectivamente, para los insecticidas: pirimifos metil (98.2 y 57.4%), clorpirifos (97.4 y 58.8%), fenitrothion (100 y 100%) y endosulfan (96.9 y 69.7%); para los fungicidas cyproconazol (98.8 y 96.4%), hexaconazol (58.1 y 36.6%) y triadimefon (100 y 95.1%); para los herbicidas: ioxifluorfen (100 y 100% y paraquat (99.1 y 98.8%); para los aditivos de aspersión: Mixel (43.1 y 28.9%). Las otras sustancias probadas tienen un menor efecto (<30%). El

efecto fungistático de los plaguicidas sobre el hongo disminuye a las 48h después de la germinación. (Velez, 1998)

1.1. Objetivo General

Evaluar la compatibilidad del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con fungicidas de uso común en el cultivo del café.

1.2 Objetivo Específico

Determinar el efecto de los fungicidas usados en el control de enfermedades en café, sobre el crecimiento y esporulación del hongo *B. bassiana*.

2 MATERIALES Y METODOS.

2.1 Localización del experimento.

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Fitoprotección del CATIE.

2.2. Evaluación del crecimiento diametral

Se evaluaron dos cepas del hongo *B. bassiana*, una codificada como Cepa 9205. procedente de Colombia, y la Cepa RL-9 de Honduras, a una concentración de 1.2×10^7 conidios/ml. Se utilizaron los fungicidas Kocide, Atepi, Silvapur, Cupravit y Daconil (ver anexo 11) a las concentraciones de 5, 10, 100, 500, 1000 ppm, y un testigo. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño irrestricto al azar con tres repeticiones.

Para la preparación de los medios de cultivo con las diferentes concentraciones de los fungicidas se prepararon volúmenes de 50ml. de medio de cultivo de PDA, los cuales fueron enfriados a 65°C, para agregar la cantidad de los fungicidas y alcanzar la concentración indicada de cada uno y estreptomycinina 2,5g/50ml; luego se vertieron 16 ml. sobre platos de petri.

Solidificado el medio, se procedió a inocular el hongo utilizando un círculo (0,7 mm. de diámetro) de papel filtro impregnado previamente con una suspensión del hongo ($1,2 \times 10^7$ con/ml). Estos se incubaron a temperatura de 26° C. Las evaluaciones se llevaron a cabo cada 48 horas, durante 15 días, midiendo el crecimiento radial del hongo en cada uno de los tratamientos.

2.3 Efecto de los fungicidas sobre la esporulación

Luego de finalizada la fase de crecimiento del hongo se procedió a realizar el conteo de esporas de los tratamientos que mostraron crecimiento micelial. En 25 ml de agua + Tween se le agregó círculos 0,7 mm de micelio contenidos en el medio artificial PDA, luego se agitó con la ayuda del ultrasonificador y posteriormente con el hemocitómetro se realizó el conteo de esporas.

Se aplicó un análisis de varianza del crecimiento diametral diario y total y de esporulación, con un nivel de significancia del 95%.

2.4 Análisis estadísticos

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijklm} = \mu + F_i + C_j + A_k + (FC)_{ij} + (FA)_{ik} + (CA)_{jk} + (FCA)_{ijk} + O_m + E_{ijklm}$$

DONDE:

μ : Promedio general

F_i : Fungicidas

C_j : Concentraciones

A_k : Cepas

FC, FA, CA: Efectos de las interacciones de 2do orden

FCA: Efectos de las interacciones de 3er orden

o_m : Testigo

E_{ijklm} : Variación debida al error experimental

El análisis se llevó a cabo mediante el ANDEVA de crecimiento diametral a los 15 días de evaluación con un nivel de significancia del 95% (SAS Institute, 1985).

3. RESULTADOS

A. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento de *B. bassiana*.

El análisis de varianza mostró un efecto de los fungicidas a diferentes concentraciones sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* (Anexos 7 y 8). Este hongo reacciona diferente al tipo de fungicida con el cual se encuentra en contacto. En los cuadros 3 y 4 se presenta el crecimiento diametral del hongo a los 15 días.

Para la cepa RL-9, el Silvacur, el Daconil y el Atemi en todas las dosis, inhibieron el crecimiento del hongo durante todo el período de evaluación mientras que los fungicidas a base de cobre como Kocide y Cupravit no inhibieron el crecimiento (Cuadro 3) En la figura 5 y 6 se presenta el crecimiento diametral para los diferentes fungicidas y dosis, para las dos cepas evaluadas, indicando el desarrollo del hongo en el tiempo. En las dosis 0 (testigo) el crecimiento fue normal.

Cuadro 3. Efecto de diferentes dosis de cinco fungicidas sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* Cepa RL-9 en diferentes dosis.

Fungicida	Crecimiento en centímetros a diferentes dosis					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	2.06 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 b
Daconil	2.60 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 b
Atemi	3.20 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 b
Kocide	1.50 a	1.63 a	1.60 a	1.63 a	1.70 a	1.53 a
Cupravit	1.76 a	1.63 a	1.63 a	1.80 a	1.13 b	1.50 a

*Valores con la misma letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según la prueba de Tukey al 5 %.

Al evaluar las susceptibilidad del hongo a los fungicidas químicos utilizados en café, se observa que para la cepa 9205 los fungicidas Silvacur y Daconil inhiben en su totalidad el crecimiento diamétrico del hongo en todas las dosis evaluadas y los fungicidas Kocide y Cuparvit no perjudican el crecimiento del hongo. El atemi solo limitó el crecimiento para las dosis altas pero para las dosis de 5ppm y 10ppm hubo crecimiento del hongo en el fungicida Atemi (Cuadro 4).

Cuadro 4 . Efecto de diferentes dosis de cinco fungicidas sobre el crecimiento diametral de *B. bassiana* Cepa 9205 en diferentes dosis.

Fungicida	Crecimiento en centímetros a diferentes dosis					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	2.07 a	0.00 c	0.00 d	0.00 b	0.00 b	0.00 b
Daconil	2.60 a	0.00 c	0.00 d	0.00 b	0.00 b b	0.00 b
Atemi	3.07 a	1.20 b	1.13 c	0.00 b	0.00 b b	0.00 b
Kocide	2.23 a	2.13 a	2.53 a	2.13 a	1.63 a	2.03 a
Cupravit	2.13 a	2.30 a	1.90 b	1.77 a	1.37 a	2.07 a

*Valores con la misma letra dentro de una misma columna son iguales entre sí según la prueba de Tukey al 5 %.

B. Efecto de los fungicidas sobre la esporulación

El análisis de varianza mostró un efecto de los fungicidas a diferentes concentraciones sobre la esporulación de *B. bassiana* (Anexos 9 y 10)

Con respecto a la esporulación (Cuadros 5 y 6), los fungicidas que mostraron un crecimiento visible de *B. bassiana* sin inhibir significativamente a el hongo lograron esporular durante el período de evaluación. En los testigos de todos los tratamientos la esporulación fue mayor, mientras que en las dosis más altas los niveles de esporulación fueron menores a los testigos para aquellos fungicidas donde el hongo se desarrolló, como es el caso de cupravit y kocide y en las dosis de 5 y 10 ppm de atemi.

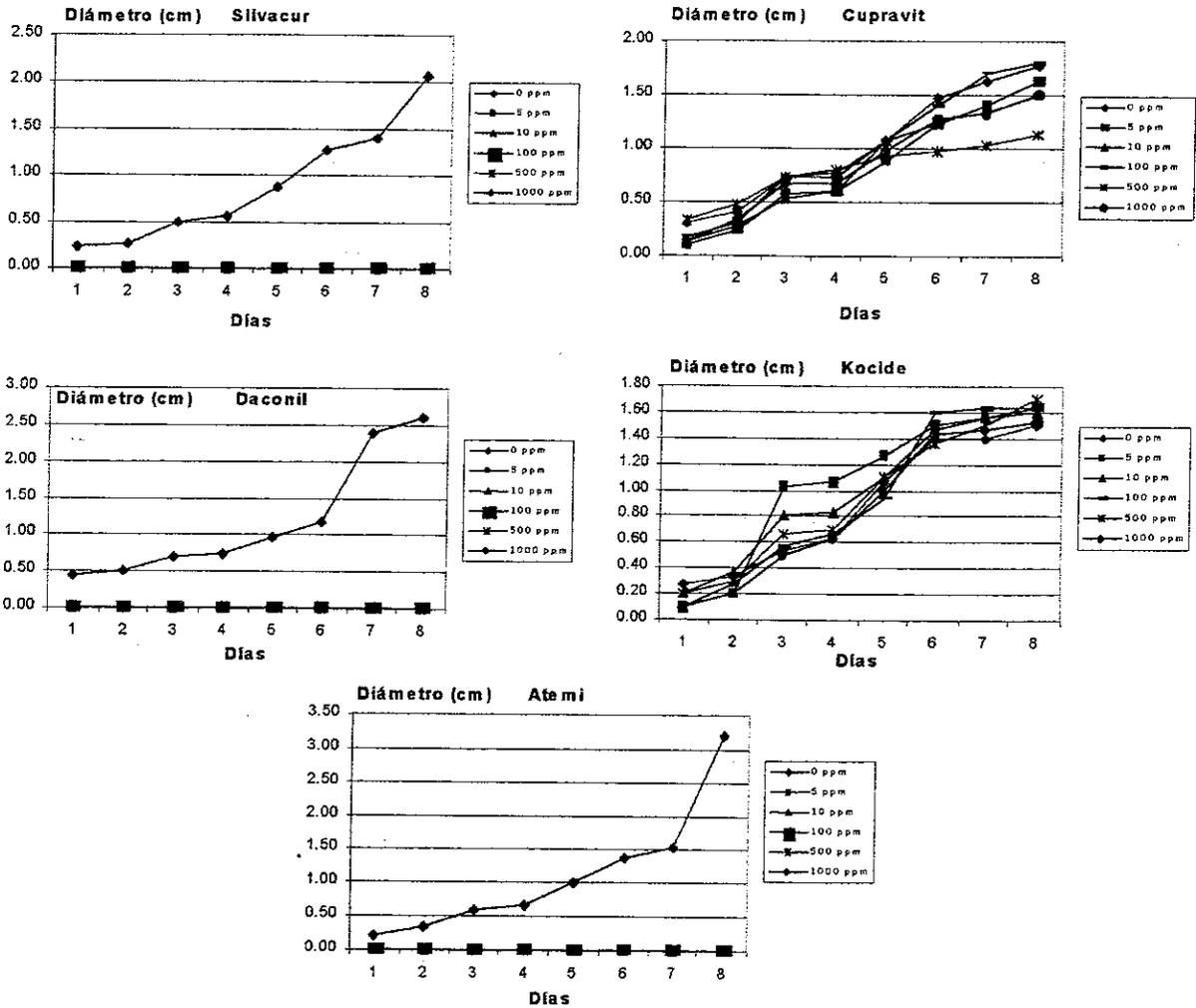


Figura 5. Crecimiento diametral de la cepa RL-9 de *Beauveria bassiana* en el tiempo por efecto de diferentes dosis de fungicidas.

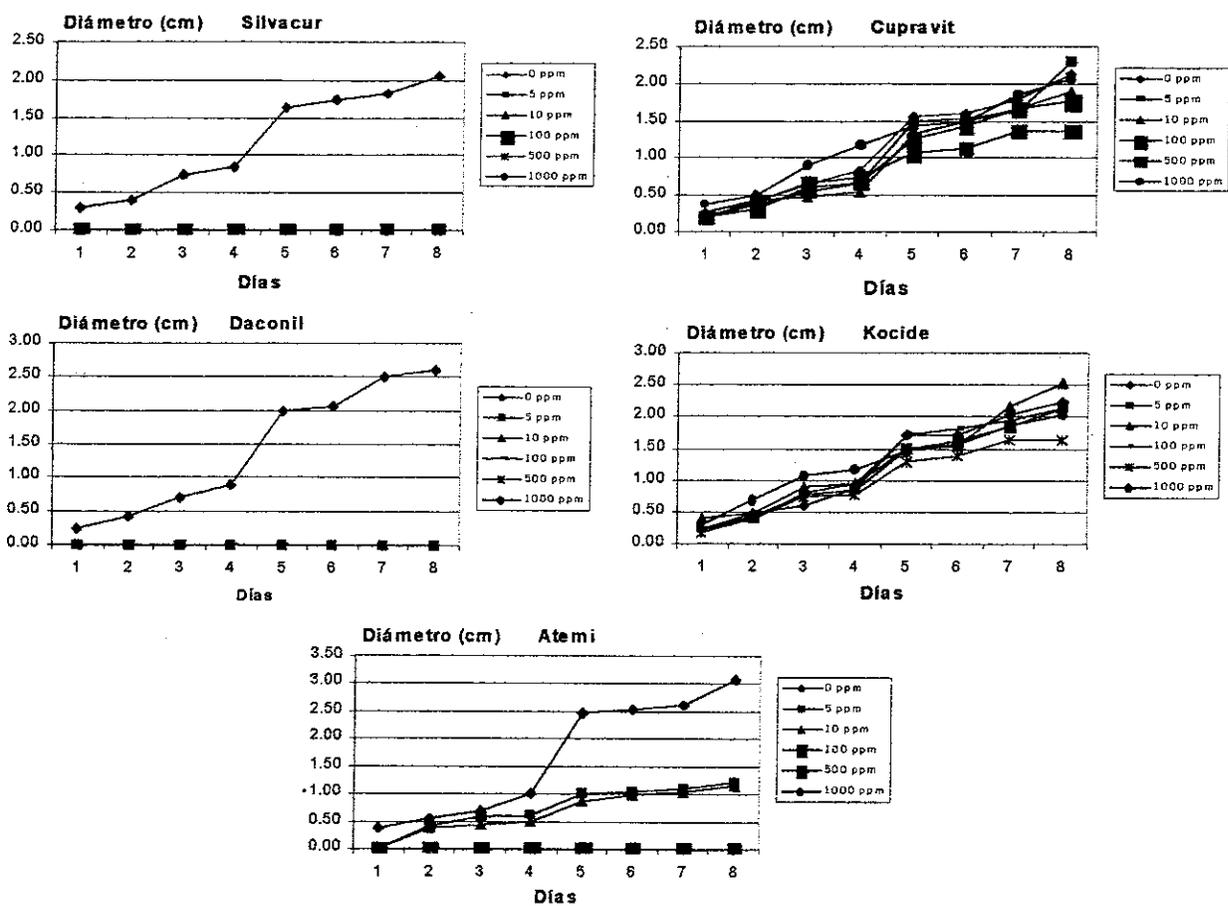


Figura 6. Crecimiento diametral de la cepa 9205 de *Beauveria bassiana* en el tiempo por efecto de diferentes dosis de fungicida.

Cuadro 5. Efecto de diferentes dosis de cinco fungicidas sobre la esporulación de *B. bassiana* Cepa RL-9

Fungicida	Dosis del fungicida sobre el número de conidios/ml x10 ⁸					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	2,89 c b	0,0 c b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Daconil	3,62 a	0,0 c b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Atemi	2,97 b	0,0 c b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Kocide	1,99 d c	0,73 a	0,97 a	0,61 a	1,17 a	0,93 a
Cupravit	2,90 d b	0,72 b a	0,83 b	0,35 b	0,75 b	0,60 b

*Valores con igual letra dentro de una misma columna, son iguales entre sí según la prueba de Tukey al 5 %.

Cuadro 6. Efecto de diferentes dosis en cinco fungicidas sobre la esporulación de *B. bassiana* Cepa 9205

Fungicida	Dosis del fungicida					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	2,92 a	0,0 d	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Daconil	2,90 a	0,0 d	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Atemi	2,91 a	1,49 a	1,25 a	0,0 c	0,0 c	0,0 b
Kocide	2,65 c	1,01 b	1,39 a	1,44 a	1,01 a	0,86 a
Cupravit	2,78 b	0,34 c	0,35 b	0,93 b	0,71 b	0,86 a

*Valores con igual letra dentro de una misma columna, son iguales entre sí según la prueba de Tukey al 5 %.

Cuadro 7. Area bajo la curva de crecimiento diametral de *B. bassiana* (RL-9) bajo diferentes concentraciones de fungicidas

Fungicida	Dosis del fungicida					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	12.03 a	0.00 b				
Daconil	15.96 a	0.00 b				
Atemi	14.40 a	0.00 b				
Kocide	12.50 a	15.00 a	14.06 a	12.10 a	12.58 a	12.86 a
Cupravit	14.20 a	11.53 a	11.96 a	13.83 a	11.33 a	12.10 a

*valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre si según prueba de T para medias ajustadas al 5 %

Cuadro 8. Area bajo la curva de crecimiento diametral de *B. bassiana* (9205) bajo diferentes concentraciones de fungicidas

Fungicida	Dosis del fungicida					
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Silvacur	16.70 b	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.00 b
Daconil	20.03 ab	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.00 b
Atemi	23.10 a	10.60 b*	9.46 b*	0.00 b	0.00 b	0.00 b
Kocide	17.20 b	16.30 a	17.93 a	17.43 a	14.20 a	18.00 a
Cupravit	16.06 b	14.96 ab	14.03 ab	13.83 a	12.30 a	17.16 a

*valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre si según prueba de T para medias ajustadas al 5 %

4. DISCUSIÓN

Las dos cepas evaluadas (9205 y RL-9) sufrieron reducciones significativas en la tasa de crecimiento micelial y esporulación en el medio expuesto con los fungicidas Atemi, Silvacur y Daconil, caso contrario con los fungicidas Kocide y Cupravit que no inhiben el crecimiento de las cepas estudiadas. Estas cepas podrían considerarse como tolerantes a dichos fungicidas, pues el hongo presentó tasas de crecimientos muy similares al testigo, aunque no redujeron la esporulación del hongo.

Los resultados obtenidos concuerdan también con los de Durán, (1998), quién encontró un efecto severo de los fungicidas Daconil, Benlate, Dithane y Antracol sobre el crecimiento de *B. bassiana* mientras que los fungicidas Alliete, Previcur y Kocide no inhibieron el crecimiento diametral del hongo por lo que consideró al hongo como tolerante a estos fungicidas.

El Atemi no fue negativo para el crecimiento y esporulación de *B. bassiana*, cepa 9205 a la dosis de 5 y 10 ppm, sin embargo estas concentraciones son bajas si las comparamos a la dosis recomendada para el campo que es de 400ml/ha de producto comercial lo que equivale a 1000 ppm en 400l de agua, por lo que se puede presumir que el Atemi va a ser negativo a *B. bassiana* en condiciones de campo.

La información generada en el presente estudio, sirve de guía para la toma de decisiones en el manejo de enfermedades en café y su compatibilización con el combate de la broca mediante el uso de hongos entomopatógenos. La búsqueda de otras alternativas para el manejo de enfermedades que sean compatibles con el control microbiano de la broca es de vital importancia. Entre estas se podría pensar en prácticas culturales como la regulación de la sombra, criterios de decisión para realizar las aplicaciones, establecer los períodos críticos para el control de enfermedades y broca para ubicar las medidas de combate en el tiempo. Los fungicidas a base de cobre son los únicos que demostraron no tener un efecto adverso sobre el crecimiento y esporulación de *B. bassiana* y según los estudios de Duran (1998), los cobres no afectan la germinación de conidios de *B. bassiana* que es lo que estaríamos aplicando en el campo y podemos compatibilizar estos con el manejo de roya del café, no así con ojo de gallo para la cual si es necesario aplicar otras medidas de control.

5. CONCLUSIONES

El estudio de la compatibilidad de los fungicidas sobre el hongo *B. bassiana* demostró inhibición de este por efecto de los fungicidas Silvacur, Atemi y Daconil.

El crecimiento y la esporulación se vió inhibida por los fungicidas Daconil, Silvacur y Atemi en todas las concentraciones evaluadas, los fungicidas Kocide y Cupravit no afectaron significativamente el crecimiento aunque no redujeron la esporulación del hongo.

6. LITERATURA CITADA

- CALDERON, CASTIÑEIRAS, A.; LÓPEZ, M. .1991. Efecto de los biocidas y fertilizantes empleados en el cultivo del plátano en Cuba sobre los hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*. Protección de plantas (Cuba) 1 (1):21-31.
- CLARK, R.1980. Fungidicial inhibition of *Beauveria bassiana*, a pathogene of the colorado patato beetle(*Leptinotarsa decemlineata* Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of the New York Entomological Society.88(1):40.
- DECAZY, B. 1985. Métodos de control químico y cultural de la broca del cafeto. Memorias del curso sobre manejo integrado de plagas del cafeto con énfasis en broca del fruto. IICA/PROMECAFE .ANACAFE Guatemala C.A. 147-150.
- DURAN, J. 1998. Uso de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Como alternativa de Manejo del Picudo del Chile *Anthonomus eugenii* Cano. Tesis Ms. Sc. CATIE. Turrialba Costa Rica.
- GARDNER, W. 1985. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selectd herbicides. J. Econ Entomol 78(6): 1275-1277.
- LAPPA, N. 1967. The effects of different pesticides on the variability and the germantion vigor of spores of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill.Zashch. Rast. Kiev (Rusia) 4:139-144.
- LAZO, R. 1990. Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto, *Hypothenemus hampei*, al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y su tolerancia al Oxiclورو de Cu. Tesis Ms. Sc. Grado. CATIE. Costa Rica. : 4-13.
- LORIA, R. 1983. Survial of inoculumof the entomopathogenes fungi. Roczniki Nauk Rolniczych E (Ochrona Roslin). 10:187-199.
- OLMERT, I. 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Verticillium lecanii* and *Verticillium* sp. To fungicides and insecticides. Environ . Entoml. 3(1) 33-38.
- RIVERA, M. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill, con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. Revista Colobiana de Entomologia 19(4):151-158.
- RIVERA, M. 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 Entomologia 20(4):209-214.