

Evaluación de un formulado de aceite vegetal de *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio para el control de la broca del café

Arcadio D. Morales De León,¹ Ramón Jarquín Gálvez,² Jaime Gómez Ruiz,³ Ovidio Díaz Gómez² y José Marín Sánchez²

¹ Universidad Autónoma de Chiapas, CENBIO. Carretera a Puerto Chiapas Km 1,5, Tapachula, Chiapas, México, dari-mor-dleon@hotmail.com

² Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Carretera San Luis-Matehuala Km 14,5, San Luis Potosí, México, ramon.jarquin@uaslp.mx, odg@uaslp.mx, jose.marin@uaslp.mx.

³ El Colegio de la Frontera Sur. Carretera Antiguo Aeropuerto Km 2,5, Tapachula, Chiapas, México, jgomez@ecosur.mx Autor para correspondencia: ramon.jarquin@uaslp.mx

RESUMEN

Se investigó la patogenicidad de una formulación comercial del hongo *Beauveria bassiana* contra la broca del café (*Hypothenemus hampei*) bajo tres tratamientos: a) esporas de *B. bassiana* en sustrato de arroz (presentación comercial); b) esporas de *B. bassiana* separadas del sustrato de arroz (colocadas en frasco ámbar); c) esporas de *B. bassiana* separadas del sustrato de arroz en aceite de maíz comercial (colocadas en frasco ámbar). Los tres tratamientos fueron mantenidos a temperatura ambiente (30 °C) y en refrigeración (4 °C); los bioensayos se realizaron cada 15 días. Al inicio de los tratamientos se hicieron pruebas de patogenicidad y viabilidad del producto comercial sobre brocas adultas, y cada mes se repitieron las mismas pruebas a cada uno de los tratamientos. Los resultados indican que la presentación comercial (en sustrato de arroz) a temperatura ambiente como en refrigeración pierde antes de 30 días su patogenicidad y viabilidad, en tanto que las esporas puras y esporas en aceite se mantienen viables después de un mes a temperatura ambiente como en refrigeración. La presentación de hongo en arroz se dejó de usar ya que a los 15 días presentaba contaminación. El hongo formulado en aceite no mejoró en mucho los porcentajes de efectividad para el control biológico, pero al manejarse presentó un mejor control de insecto, ya que mantuvo una mayor mortandad en los bioensayos como aparición micelial que superó el de esporas puras.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, patogenicidad, viabilidad, esporas

ABSTRACT

The pathogenicity of a commercial formulation of the fungus *Beauveria bassiana* against coffee berry borer *Hypothenemus hampei* was investigated under three treatments: a) *B. bassiana* spores in rice substrate (commercial form), b) *B. bassiana* spores separated from rice substrate (placed in amber bottle), and c) *B. bassiana* spores separated from rice substrate in commercial corn oil (placed in amber bottle). Treatments were maintained at room temperature (30 °C) and refrigeration (4 °C). Bioassays were conducted every fifteen days. Pathogenicity and viability tests of commercial product on adult borers and every month, the same tests were done to each treatment. Results indicate that commercial presentation (in rice substrate) lose pathogenicity and viability before 30 days so at room temperature as refrigeration conditions, while pure spores and spores in oil kept viable after one month at room and refrigeration temperatures. Fungus presentation in rice was contaminated till fifteen days and stop being used. Oil formulated fungus did not improve in much the percentages of efficiency for biological control, but presented a better insect control because presented a major mortality in biotests like micelial appearance that surpassed the pure spores one.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, pathogenicity, spores, viability

INTRODUCCIÓN

México cuenta con 760 974,05 ha establecidas de café (*Coffea arabica* L.) y rendimiento promedio de 1,87 t/ha [SIAP, 2013]; ocupa el séptimo lugar en producción mundial de café [Terra México, 2009], y es uno de los primeros lugares en la producción de café orgánico en el mundo, cuyo destino principal son los mercados europeo y norteamericano, lo que permite, por un lado, mejores ingresos de los caficultores, y por

el otro la disminución migratoria de los pequeños productores de café [Escamilla, 2007]. La broca del grano de café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) es la plaga más importante de la caficultura a nivel mundial [Jaramillo *et al.*, 2006] debido al daño directo que ocasiona al grano, sin importar el sistema de cultivo que se desarrolle, bajo sombra o sin sombra [Jarquín, 2005]. Las pérdidas en las cosechas debidas

a esta plaga varían del 10 al 80 % [Le Pelley, 1968], lo cual exige medidas de control eficientes en forma oportuna y cuando el insecto amenace con causar pérdidas económicas [Trujillo *et al.*, 2006].

En la actualidad existe gran preocupación por el uso de plaguicidas en la agricultura, puesto que para el control de las principales plagas que atacan el café se emplean cantidades considerables de productos químicos como el endosulfán [López *et al.*, 2009], situación que ha conducido a problemas de contaminación ambiental, reducción de los rendimientos y resistencia a los insecticidas [Irulandi *et al.*, 2010]. Existe entonces la necesidad creciente de reducir el uso de agroquímicos para el control fitosanitario [Suárez, 2009]. Varias de las investigaciones que se realizan en algunos países tienen como objetivo descubrir los métodos más seguros y eficaces para el control de plagas de insectos, como el empleo de entomopatógenos, bacterias, virus y hongos, los que han sido reportados como agentes de protección contra varios insectos [Rosell *et al.*, 2008]. Los hongos entomopatógenos tienen diferentes atributos que determinan su virulencia, como la producción de enzimas hidrolíticas que suelen facilitar cada etapa de infección del hongo y, adicionalmente, pueden ser importantes en la invasión del hemocele del insecto [Zibae y Bandani, 2009; Zhanga *et al.*, 2008].

La lucha biológica se plantea como una alternativa amigable con el medioambiente, más favorable que el control químico, de ahí que el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, reportado como un seguro bioplaguicida [Suárez, 2009; Devi *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2008], continúe en estudio de manera intensiva como agente de control biológico, así como su papel en la regulación de poblaciones de insectos debido a su potencial capacidad insecticida al presentar amplia gama de hospedantes de 700 especies de insectos [Sahayaraj *et al.*, 2011; Pedrini *et al.*, 2010; Senthilrajaa *et al.*, 2010; Ajaykumar, 2008; Vasantharaj, 2008; Montesinos *et al.*, 2011] y la ocurrencia natural de epizootias en poblaciones de la broca del café (*H. hampei*) en zonas cafetaleras [Vázquez *et al.*, 2010]. La agricultura orgánica es un sistema de producción integral para la obtención de productos agropecuarios libres de agroquímicos, con apego a normas agroecológicas, y con una certificación externa que los acredita como tales [Gómez y Gómez, 1996], lo que implica la utilización de controles naturales y biológicos para el control de plagas y enfermedades, y el manejo integrado como la forma más racional de luchar contra los insectos plaga [Jarquín, 2005].

En Latinoamérica se han desarrollado y utilizado formulaciones comerciales de *B. bassiana* para el control de la broca del café desde mediados de los años noventa, producidas principalmente por centros de investigación u organizaciones de productores [Antia, 1992]. El término *formulación* implica establecer diferentes presentaciones del ingrediente activo, o la adición de compuestos con el fin de mejorar la actividad de la aplicación. Se ha reportado que los diferentes componentes de una formulación (aceites vegetales, aceites derivados del petróleo, vehículos acuosos, diluyentes en polvo o granulares) pueden afectar la viabilidad de las conidios; sin embargo, SAGARPA (2007 a) recomienda la necesidad de monitorear la virulencia de la formulación debido a que en algunas a base de polvo, aceites o granulares que se mantuvieron almacenadas a 4 °C hasta por ocho meses, no se afectó la germinación, pero sí la virulencia. El objetivo de una buena formulación es preparar una combinación de ingredientes de forma tal que el principio activo se mantenga estable durante el almacenamiento y después de la aplicación, efectivo y fácil de aplicar [Pedrini *et al.*, 2011; Fragas *et al.*, 2007, citado por Gato, 2010]. Los materiales utilizados en la formulación no deben tener actividad biológica sobre animales, plantas o insectos benéficos, ni afectar la actividad del hongo; deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con el ingrediente activo, facilitar la aplicación del producto y ser económicamente rentables [Urtubia y France, citados por Gato, 2010]. De acuerdo con Monzón (2001), la viabilidad de los conidios se mantiene mayor tiempo en la formulación líquida que en la sólida; sin embargo, cuando en la formulación líquida se utilizan aceites minerales o derivados de petróleo, esta no es aceptada en la producción orgánica debido al tipo de aceite que contiene, por lo que se recomienda la utilización de aceites vegetales para no influir en el concepto de un producto orgánico.

La Norma Fitosanitaria 2000 contra la broca del café [NOM-002-FITO-2000; SAGARPA, 2007 b] indica que el producto del hongo *B. bassiana* deberá tener una concentración de $1,3 \times 10^{12}$ esporas viables/mL, y que será provisto por laboratorios que hayan cumplido con dicha norma [Ramírez, 2007]. Por lo general, los aislados de *B. bassiana* usados contra la broca del café en México se propagan a escala masiva en arroz (*Oryza sativa* L.) como sustrato; sin embargo, también se han empleado otros materiales como bagazo de caña

(*Saccharum officinarum* L.), salvado de trigo (*Triticum aestivum* L.) y residuos de papa (*Solanum tuberosum* L.) [Núñez *et al.*, 2010; Barrera, 2008]. El producto final es almacenado y transportado sin separarlo del sustrato, y son los productores quienes realizan la separación del hongo del arroz; pero la tendencia actual es la venta del producto en formulaciones aceitosas o polvos humectables [Barrera, 2008].

Basado en estas modificaciones, el presente trabajo tuvo como objetivos comparar si un formulado de aceite vegetal preparado en laboratorio presenta una mayor patogenicidad y acción germinativa que el sustrato de arroz, así como comparar su vida de anaquel tanto en condiciones ambientales como en refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en 2008 en el Laboratorio de Patología de Insectos de la Línea de Investigación Manejo Integrado de Plagas de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), localizado en Tapachula, Chiapas.

Como material biológico se utilizó producto comercial del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* producido en la Junta Local de Sanidad Vegetal de Tapachula, Chiapas. El producto comercial contiene esporas de *B. bassiana* en arroz dentro de bolsas negras de 600 g para una dosis, a una concentración de $3,5 \times 10^9$ conidios/g. Algunas de las bolsas se mantuvieron selladas y en refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta los bioensayos, mientras que otras fueron abiertas para separar las esporas del arroz a través de un tamizado. Las esporas se colocaron en frascos de color ámbar y puestas en refrigeración hasta el día de los bioensayos. En promedio se obtuvieron 6 g de esporas por bolsa. Las esporas de *B. bassiana* obtenidas de las bolsas fue analizado antes de los ensayos, para lo que se utilizaron adultos de *H. hampei*, en aras de determinar la concentración letal media y la viabilidad del hongo.

Se trabajó con brocas adultas provenientes de frutos colectados en cafetales del municipio de Cacahoatán. Los frutos colectados fueron puestos en bases de madera con malla mosquitera que contenía papel toalla, y colocados por una semana en laboratorio para su posterior disección y extracción de brocas adultas.

Para la realización de los tratamientos de esporas en aceite se buscó el aceite comercial con el pH más cercano al neutro, ya que su valor influye en la germinación del hongo,

y la retarda cuando no se encuentra dentro del intervalo óptimo entre 5,5 y 7,0 [Bastidas *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009]. Para este estudio se eligió el aceite de girasol Great Value, el cual presentó un pH de 5,8.

Los tratamientos que se emplearon fueron: a) esporas del hongo en sustrato de arroz mantenida en su empaque (250-300 g de arroz con esporas de *B. bassiana*); b) esporas separadas del sustrato de arroz colocada en frasco ámbar (2,5 g de esporas); c) esporas separadas del sustrato de arroz mezcladas con aceite comercial de girasol y colocado en frasco ámbar (2,5 g de esporas en 40 mL de aceite de girasol) (Tabla 1). Todos los tratamientos fueron mantenidos a temperatura ambiente (30 °C) y en refrigeración (4 °C). Se realizaron cuatro repeticiones más un testigo absoluto.

El producto comercial de *B. bassiana*, en bolsas de 600 g en sustrato de arroz, fue analizado antes de los bioensayos para determinar concentración, patogenicidad y viabilidad. Se utilizaron 20 brocas adultas obtenidas de frutos de café, las cuales fueron desinfectadas previamente con hipoclorito comercial diluido al 5 %. Posteriormente se le aplicó la solución fúngica con un atomizador, a una concentración de $3,2 \times 10^7$ conidios/mL. Después de la aplicación de *B. bassiana*, las brocas fueron colocadas en frascos y revisados diariamente hasta la muerte del último espécimen. Los insectos muertos fueron colocados en cámaras húmedas para observar crecimiento micelial. Se hicieron cuatro repeticiones, más un testigo absoluto, donde las brocas solo fueron asperjadas con agua destilada estéril más adherente Tween al 0,1 %. Esta misma metodología fue utilizada para las pruebas de los diferentes tratamientos cada 15 días.

La viabilidad de las esporas de *B. bassiana* del producto comercial se determinó mediante microcultivos, para lo cual se colocaron unas gotas del medio de cultivo ADS en los extremos de una laminilla, y sobre el medio de cultivo se agregó una alícuota de la tercera dilución del hongo. Las laminillas fueron revisadas a las 24 h para realizar el conteo de germinación de conidios bajo un microscopio compuesto. El procedimiento anterior fue utilizado para las pruebas de los diferentes tratamientos cada 15 días. Es importante mencionar que a los 15 días las bolsas que contenían las esporas de *B. bassiana* en sustrato de arroz ya no servían, estaban contaminadas, tanto las mantenidas a 4 °C como la de 30 °C, por lo que ya no se les hicieron las pruebas de patogenicidad ni viabilidad.

A fin de determinar el efecto de los diferentes tratamientos sobre las brocas adultas de *H. hampei* se realizó un análisis de sobrevivencia, para lo cual se consideraron a las brocas como individuos sometidos a un tratamiento en un rango o intervalo de tiempo, y se empleó

el modelo de riesgo proporcional de Cox, que se basa en los grados de similitud entre un tratamiento y otro, donde el riesgo depende del aumento o disminución en el tiempo de sobrevivencia [Lee, 1980]. Se utilizó el programa estadístico Minitab Inc. (versión 2007).

Tabla 1. Tratamientos realizados del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* a diferentes temperaturas bajo condiciones de laboratorio y su clave respectiva

Tratamiento	Temperatura	
	30 °C	4 °C
Esporas de <i>B. bassiana</i> en sustrato de arroz	Az1	Az2
Esporas de <i>B. bassiana</i> separadas del sustrato	EsC	EsF
Esporas de <i>B. bassiana</i> en aceite	AcC	AcF
Testigo absoluto (agua + adherente Tween)		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de *B. bassiana* obtenida del producto comercial previo a los tratamientos fue de $3,5 \times 10^9$ conidios/g, con una virulencia del 100 % y una viabilidad del 95 %. Lo anterior demuestra que la patogenicidad y viabilidad del producto comercial coinciden con lo que indica la etiqueta; sin embargo, dicha concentración se encuentra por debajo de la concentración de esporas que exige la norma oficial (NOM-002-FITO-2000), que es de $1,3 \times 10^{12}$ esporas viables/mL [Ramírez, 2007]. El porcentaje

de mortalidad total de los adultos de *H. hampei* se obtuvo a los cinco días después de haberse aplicado la solución fúngica (Fig. 1), lo que demuestra la virulencia de la cepa de *B. bassiana* del producto comercial. Todas las brocas muertas presentaron el desarrollo micelial del hongo, lo que confirma que la muerte de los adultos de *H. hampei* se debió a la acción de *B. bassiana* (Fig. 2), en tanto que en el testigo no se observó el crecimiento micelial en ninguna de las brocas.

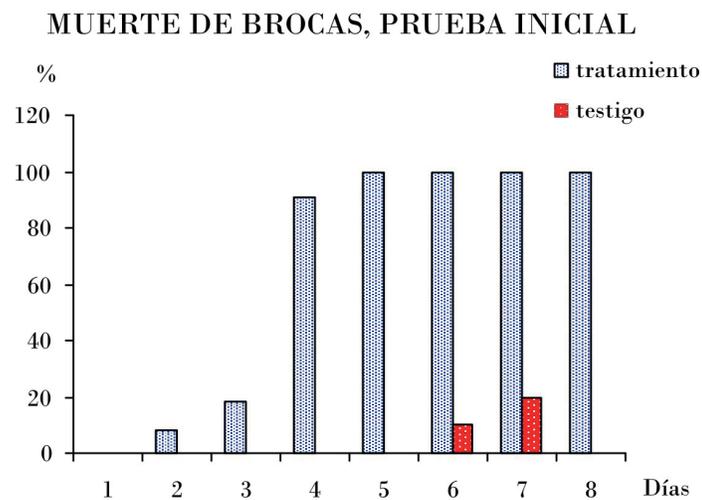


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de adultos de *Hypothenemus hampei* por *Beauveria bassiana* con esporas obtenidas de una presentación comercial en sustrato de arroz.

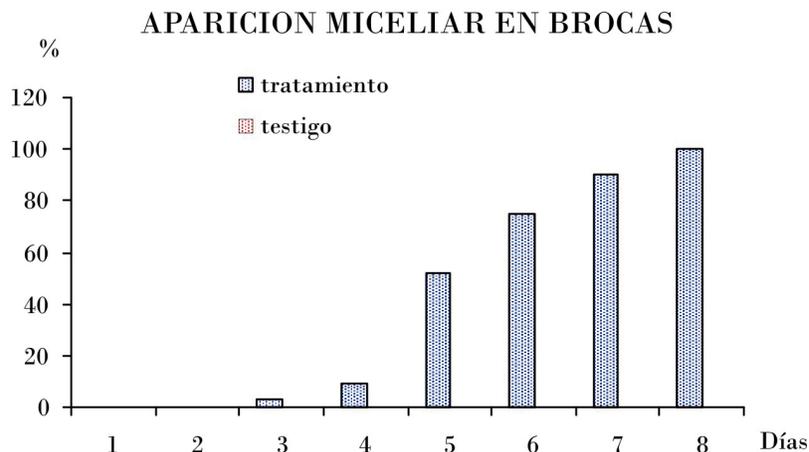


Figura 2. Porcentaje de adultos de *Hypothenemus hampei* que presentaron crecimiento micelial después de la aplicación de una solución fúngica comercial de *Beauveria bassiana*.

Dado que las bolsas con esporas de *B. bassiana* en sustrato de arroz se contaminaron durante los primeros 15 días, no se realizaron las pruebas de patogenicidad ni viabilidad en ellas. Para el resto de los tratamientos, los datos de sobrevivencia de los adultos de *H. hampei* a esporas de *B. bassiana*

mantenidas bajo diferentes condiciones durante 15 días muestran que el hongo tuvo un efecto letal sobre las brocas, sin importar si las esporas estuvieron solas o en aceite, o si permanecieron a temperaturas de 4 °C o 30 °C, y se notó una aparente diferencia con el testigo (Fig. 3).

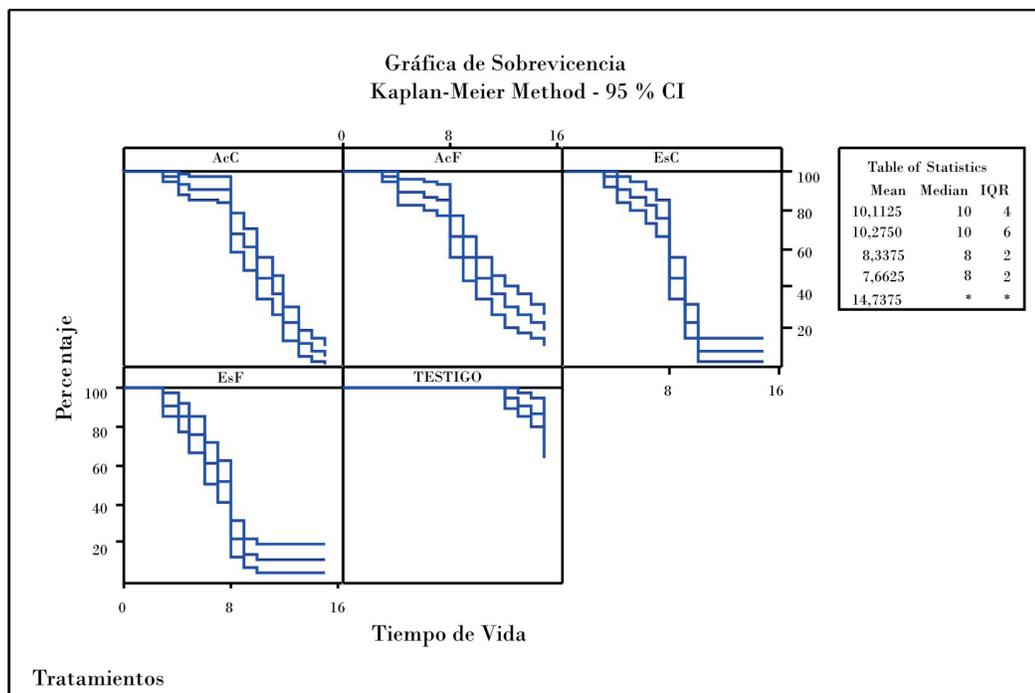


Figura 3. Sobrevivencia de adultos de *H. hampei* a esporas de *B. bassiana* mantenidas por 15 días bajo diferentes tratamientos de conservación.

Las esporas mantenidas en aceite (AcC y AcF) tuvieron un efecto tardío sobre los adultos de *H. hampei*,

ya que la sobrevivencia se mantuvo alta durante los primeros ocho días, en tanto que en las esporas solas

(EsC y EsF) la mortalidad de los adultos ocurrió a etapas muy tempranas; sin embargo, en ambos casos la mortalidad se mantuvo constante durante el resto del tiempo, en tanto en el testigo la sobrevivencia se mantuvo estable durante los primeros 10 días. Es posible que el efecto tardío en la mortalidad de los tratamientos de las esporas mantenidas en aceite se haya debido al encapsulamiento de las esporas de *B. bassiana* por las gotas de aceite, lo que evitó el contacto directo de las esporas sobre las brocas, de tal manera que el contacto del micelio con *H. hampei* ocurrió tardíamente. Este suceso fue posible observarlo en las pruebas de viabilidad, donde se apreció que las esporas estaban cubiertas con el aceite; pero se mantuvieron viables, pues lograron germinar posteriormente. Bastidas *et al.* (2009) indican que hay una mayor adherencia de las esporas puras que las formuladas en aceite; sin embargo, las esporas formuladas en aceite evitan la fácil remoción por el viento y garantizan la permanencia de las esporas por más tiempo, situación que permite tener una idea más cercana de lo que puede ocurrir en el campo.

Se puede notar también que un porcentaje de las brocas que fueron tratadas con esporas solas lograron sobrevivir al final del período de observación (Fig. 3), lo que no ocurrió con aquellas que fueron tratadas con esporas en aceite, las cuales, a pesar de haber iniciado tardíamente la mortalidad, al final lograron mantener una mortalidad constante y total sobre los adultos de *H. hampei*.

Las pruebas de la razón de verosimilitud indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 2). Esta diferencia fue posible encontrarla con el análisis de la razón de riesgo, donde los resultados señalan que las diferencias entre los tratamientos está dada por las esporas en aceite mantenida en refrigeración (Tabla 3), de tal manera que los tratamientos AcC, EsC y EsF fueron diferentes estadísticamente al tratamiento AcF.

Tabla 2. Prueba de la razón de verosimilitud aplicada a los datos de los tratamientos de esporas de *B. bassiana* mantenidas por 15 días bajo diferentes condiciones de conservación y aplicadas sobre brocas adultas de *H. hampei*, según el modelo de riesgo proporcional de Cox

Razón de verosimilitud			
Fuente	Df	L-R Chisquared	Prob.
Tratamiento	4	164,864277	1,32285E-34

Tabla 3. Riesgo proporcional de Cox aplicada a los datos de los tratamientos de esporas de *B. bassiana* mantenidas por 15 días bajo diferentes condiciones de conservación y aplicadas sobre brocas adultas de *H. hampei*

Razón de riesgo			
Térm.	Estimado	Inferior_CL	Superior_CL
AcC	1,2812230	1,0270500	1,5875520
AcF	1,0558410	0,8380550	1,3181100
EsC	1,9239100	1,5348280	2,3950500
EsF	2,1390820	1,7028140	2,6656110

El crecimiento miceliar sobre las brocas de *H. hampei* en los bioensayos de los 15 días se presentó a partir del octavo día de la aplicación de *B. bassiana*, por lo que las observaciones se continuaron hasta el día veintiuno para descartar el efecto de mortalidad por otras causas. Cabe destacar que en el testigo no hubo presencia de micosis, por lo que no se incluyó en los análisis estadísticos. La gráfica de sobrevivencia realizada a los individuos micosados (Fig. 4) muestra el comportamiento de la aparición miceliar sobre los adultos de *H. hampei*. El crecimiento miceliar ocurrió en el 100 % de los individuos que fueron expuestos a esporas mantenidas a temperaturas bajas (4 °C), tanto para las esporas solas (EsF) como para las esporas en aceite (AcF), mientras que en los otros dos tratamientos mantenidos a temperatura ambiente (EsC y AcC) solo el 55 % de los adultos presentaron micelio.

El análisis de razón de riesgo aplicado a los datos de aparición miceliar indica que existen diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Prueba de la razón de verosimilitud aplicada a los datos de crecimiento miceliar de adultos de *H. hampei* micosados por *B. bassiana* mantenidas por 15 días bajo diferentes condiciones de conservación, según el modelo de riesgo proporcional de Cox

Razón de verosimilitud		
Fuente	Df	L-R Chisquared
Tratamiento	3	39,0151387

Los datos de la diferencia entre los cuatro tratamientos con respecto al crecimiento miceliar está dada por el efecto de la temperatura a la cual fueron almacenadas las esporas (Fig. 4), de ahí que los tratamientos mantenidos a temperaturas bajas (AcF y EsF) causaran los porcentajes más altos de micosis sobre las brocas adultas de *H. hampei* respecto a las que permanecieron a temperatura ambiente (AcC y EsC), como lo muestra los porcentajes de brocas micosadas reportadas más arriba (Tabla 4).

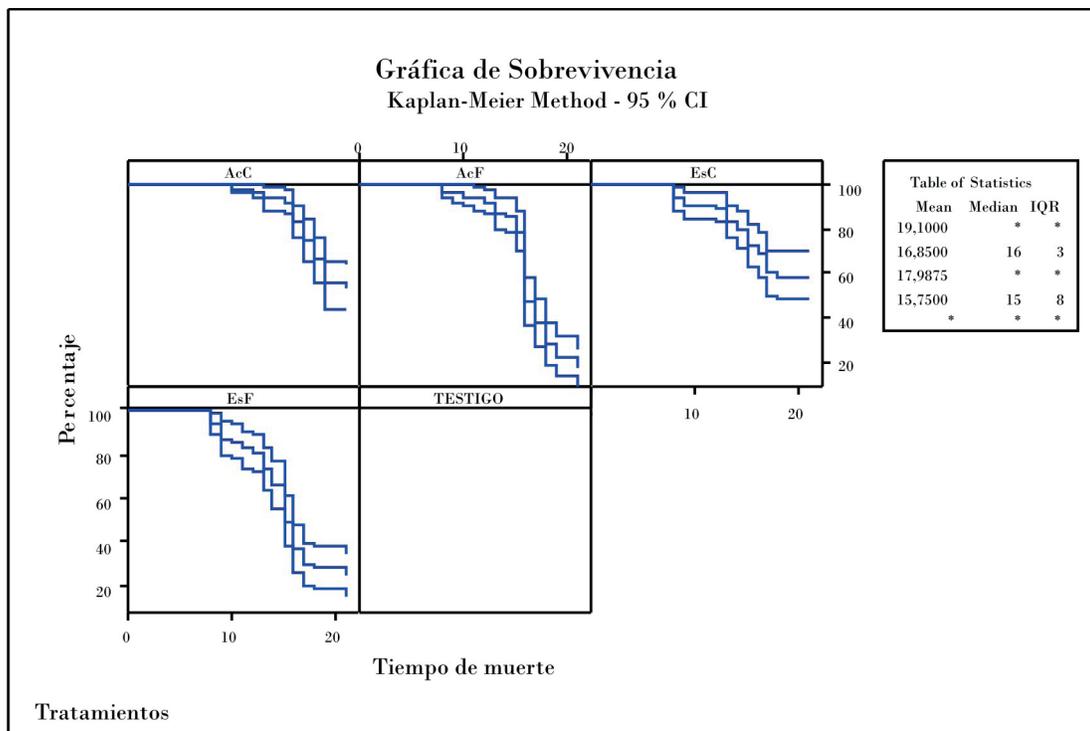


Figura 4. Representación gráfica del crecimiento del micelio en los adultos de *H. hampei* a los cuales se les aplicó esporas de *B. bassiana* bajo diferentes tratamientos de conservación por 15 días.

Las brocas expuestas a esporas de *B. bassiana* mantenidas a temperaturas bajas aumentan el riesgo de presentar micelio (Fig. 4), lo cual permite inferir que bajo esas condiciones las esporas son más virulentas que aquellas que se mantuvieron a temperaturas altas (Tabla 5). Lo anterior se ve reforzado con los datos obtenidos en los estudios de viabilidad de las esporas realizadas a los diferentes tratamientos, donde los reportes indican que las esporas mantenidas en refrigeración (AcF y EsF) tuvieron una viabilidad del 80 %, en contraste con aquellas que estuvieron a temperatura ambiente (AcC y EsC), con una viabilidad del 45 %. Así mismo, se pudo observar que en el formulado de las esporas solas como las esporas en aceite a temperatura ambiente no presentaron un significativo crecimiento micelial.

Tabla 5. Riesgo proporcional de Cox aplicada a los datos de crecimiento micelial de adultos de *H. hampei* micosados por *B. bassiana* mantenidas por 15 días bajo diferentes condiciones de conservación

Razón de riesgo			
Térm.	Estimado	Inferior_CL	Superior_CL
AcC	0,6209520	0,4683290	0,8077380
AcF	1,4833230	1,1771800	1,8567960
EsC	0,6456990	0,4806010	0,8480530

En la supervivencia de los adultos de *H. hampei* a esporas de *B. bassiana* mantenidas a diferentes condiciones de conservación por 30 días (Fig. 5) se puede observar el efecto letal que tuvo *B. bassiana* sobre las brocas, sin importar el medio de conservación de las esporas. Las esporas solas tuvieron un comportamiento similar en la mortalidad provocada a las brocas adultas, haya estado a temperatura ambiente (EsC) o en frío (EsF), al generarse el 75 y el 80 % de mortalidad, respectivamente; en tanto que las esporas en aceite lograron una mortalidad del 99,9 % tanto para aquellas mantenidas a temperatura ambiente como para la que se mantuvo en frío. No se presentó mortalidad de ningún adulto de *H. hampei* en el testigo.

Se puede notar que las esporas mantenidas en aceite (AcC y AcF) tuvieron una mortalidad constante contra los adultos de *H. hampei* durante los primeros cinco días (Fig. 5), para después provocar un porcentaje alto de mortalidad, lo que no ocurrió con las esporas puras (EsC y EsF), donde la mortalidad siempre tuvo la misma tendencia. Bastidas et al. (2009) evaluaron varios preformulados de *Beauveria bassiana* utilizando glicerina, goma arábica, alginato, Veegum y almidón hidratado, en diferentes concentraciones y combinaciones, así como un testigo absoluto, un testigo comercial y

esporas puras (sin formular). Sus resultados indican que todos los preformulados presentaron mejores

características físico-químicas y microbiológicas que las esporas puras y el testigo.

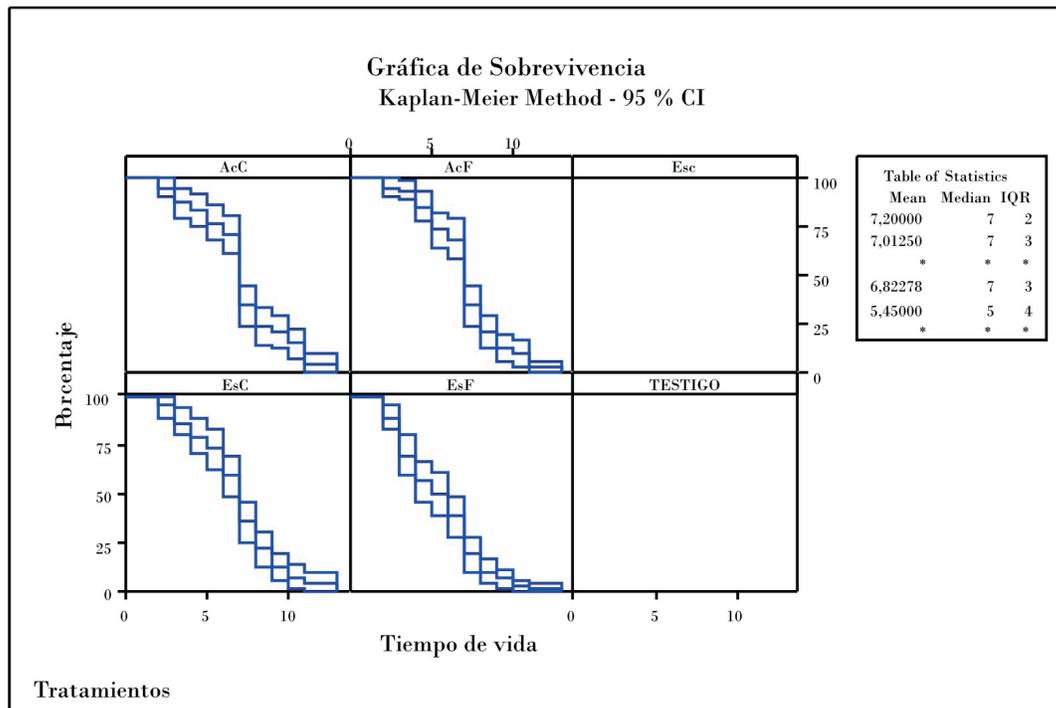


Figura 5. Supervivencia de adultos de *H. hampei* a esporas de *B. bassiana* mantenidas por 30 días bajo diferentes tratamientos de conservación.

Las pruebas de la razón de verosimilitud indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 6). El análisis de la razón de riesgo indica que las diferencias entre los tratamientos están dadas principalmente por las esporas en aceite mantenidas en refrigeración (Tabla 7), por lo cual los tratamientos AcC, EsC y EsF fueron diferentes estadísticamente al tratamiento AcF. Estos resultados muestran que la temperatura y humedad relativa son de los parámetros más importantes a considerar durante el almacenamiento de las formulaciones de hongos entomopatógenos, y de acuerdo con Grijalba *et al.* (2009) la radiación ultravioleta al emplear estos microorganismos en campo.

Tabla 6. Prueba de la razón de verosimilitud aplicada a los datos de los tratamientos de esporas de *B. bassiana* mantenidas por 30 días bajo diferentes condiciones de conservación y aplicadas sobre brocas adultas de *H. hampei*, según el modelo de riesgo proporcional de Cox

Razón de verosimilitud		
Fuente	Df	L-R Chisquared
Tratamiento	3	39,0151387

En los tratamientos de los 30 días la aparición micelial en las brocas adultas fue muy baja, por lo que no fue posible realizar los análisis de supervivencia para los diferentes tratamientos. Al final de los 15 días de observaciones se encontró presencia de micelio en el 11,35 % de todas las brocas de los cuatro tratamientos (AcC, AcF, EsC, EsF); sin embargo, en el 54 % de las brocas restantes se observó la presencia de toxinas de *B. bassiana*, indicativo de la muerte de los adultos de *H. hampei* por *B. bassiana*. Este comportamiento de las esporas para no formar micelios está dado por muchos factores, entre ellos el grosor de la cutícula, presencia de melanina, la fuerte esclerotización en coleópteros adultos, la detoxicación de la molécula y la mayor permeabilidad de la cutícula, entre otros [Arboleda *et al.*, 2003].

La viabilidad de los diferentes tratamientos a los 30 días disminuyó fuertemente con respecto a la viabilidad inicial. Para el caso de las esporas puras se tuvieron viabilidades del 40 % en aquellas mantenidas a temperatura ambiente (EsC), y del 70 % para las refrigeradas (EsF), mientras que las esporas en aceite presentaron una viabilidad del 45 y el 80 % a tempe-

ratura ambiente (AcC) y en refrigeración (AcF), respectivamente. Por lo anterior, y dado que la presencia del micelio también decreció, no se pudo continuar la realización de los bioensayos por más tiempo.

Tabla 7. Riesgo proporcional de Cox aplicada a los datos de los tratamientos de esporas de *B. bassiana* mantenidas por 30 días bajo diferentes condiciones de conservación y aplicadas sobre brocas adultas de *H. hampei*

Razón de riesgo			
Térm.	Estimado	Inferior_CL	Superior_CL
AcC	0,6209520	0,4683290	0,8077380
AcF	1,4833230	1,1771800	1,8567960
EsC	0,6456990	0,4806010	0,8480530

En pruebas de *Metarhizium anisopliae* con aceite sobre *Schistocerca piceifrons*, Hernández (2003) obtuvo porcentajes de mortalidad de más del 95 % a los 12 días, mientras que Rodríguez (2002), quien probó el efecto de algunos aceites sobre la germinación de conidios en *Metarhizium anisopliae*, no encontró un efecto adverso sobre la viabilidad y la estabilidad de los conidios por un mes de almacenamiento; al considerar el 85 % como parámetro estándar mínimo de germinación, esta investigación no alcanzó el estándar mínimo. Basado en sus resultados, Rodríguez (2002) concluyó que el aceite de maíz puede ser considerado como un aditivo para mejorar la mezcla en campo, pero no para su almacenamiento por períodos mayores a un mes.

En la formulación de hongo se pueden adicionar determinados compuestos como agentes humectantes, dispersantes, reguladores de la viscosidad, protectores de luz UV, atrayentes, tensoactivos, solventes, emulsificantes. Estos materiales generan modificaciones en el comportamiento de las esporas, las cuales pueden ser manipulables en la obtención de biopreparados para mejorar la vida media y la estabilidad durante su almacenamiento [Bastidas *et al.*, 2009].

CONCLUSIONES

- La presentación comercial (en sustrato de arroz) a temperatura ambiente como en refrigeración pierden antes del mes su patogenicidad y viabilidad, en tanto que las esporas puras y esporas en aceite se mantienen viables después de un mes a temperatura ambiente como en refrigeración.
- El hongo formulado en aceite no mejoró los porcentajes de efectividad para el control biológico,

tampoco en costos de producción; pero presenta un mejor control de insecto, ya que ofrece una mayor mortandad en los bioensayos como aparición miceliar que superó el de esporas puras.

- Las bolsas de arroz con esporas de *Beauveria bassiana* sufren un rápido deterioro y pérdida de viabilidad en las primeras dos semanas cuando no se tiene en refrigeración, por lo que los productores de café que vayan a realizar aplicación de este hongo tendrán que hacerlo en los primeros días después de adquirirlo.
- Es importante continuar la búsqueda de alternativas para incrementar la vida de anaquel de *B. bassiana* y probar con algunos surfactantes o coadyuvantes.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Apoyo para el Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica en el Estado de Chiapas (FODIT) del Cocyttech Proyecto Fodit-026-c01-2006 «Fortalecimiento de Capacidades para la Investigación Participativa en Diversificación y Manejo Agroecológico de Cafetales», bajo la dirección del doctor Ramón Jarquín Gálvez.

Al M.C. Javier Vallemora por la asesoría en los análisis estadísticos.

Al Pasante de Ing. Biotecnólogo David Urias Escobar por su apoyo en los trabajos de campo.

REFERENCIAS

- Ajaykumar, P.: «Effect of Temperature on Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Verticillium lecanii* (Metschnikoff) Sorokin Against *Spilosoma oblique* (Walker)», *J. Biolog. Contr.* 22 (1): 85-89, India, 2008.
- Antia, O. P.: «Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café», *Avances Técnicos Cenicafe* 182: 1-12, Colombia, 1992.
- Arboleda, J. W.; F. Delgado; A. Valencia: «Efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*», *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 68L 71-76, Costa Rica, 2003.
- Barrera, J. F.; J. Gómez; A. Castillo; E. López; G. González: «Broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)». Casos de Control Biológico en México, pp 101-120. MundiPrensa, México, *El Colegio de la Frontera Sur*. Chiapas, México, 2008.
- Bastidas, A.; E. Velásquez; P. Marín; P. Benavides; A. E. Bustillo; F. J. Orozco: «Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin para el control de la broca del café» *Agronomía* 17 (1): 44-61, Colombia, 2009.
- Bhattacharyya, B.; A. Baruah; D. Purnima; U. Bhuyan: «Field Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorki (Deuteromycotina: Moniliales) Against White Grubs in Assam», *Journal of Biological Control* 22 (1): 81-64, India, 2008.
- Devi, U.; K. Padmavathi; J. U. Maheswara; C. Akbar; M. Mohan: «A Study of Host Specificity in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria*

- bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae)», *Biocontrol Science and Technology* 18: 975-989, Inglaterra, 2008.
- Escamilla, E.: «La calidad del café como elemento de arraigo de los habitantes en las regiones cafetaleras», *Migración, implicaciones en el desarrollo*. Aurora C. Martínez. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Económicas, México. 2007.
- Gato, Y.: «Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai», *Fitosanidad* 14 (3): 189-195, Cuba, 2010.
- Gómez, M. A.; T. L. Gómez: «Expectativas de la agricultura orgánica en México», Memorias del Coloquio sobre agricultura orgánica: Una opción sustentable para el agro mexicano, pp 35-45, UACH. Chapingo, México, 1996.
- Grijalba, B.; E. Paola; L. Villamizar; A. M. Cotes: «Evaluación de la estabilidad de *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana* frente a la radiación ultravioleta», *Revista Colombiana de Entomología* 35 (1): 1-6, Colombia, 2009.
- Hernández, V. M.: «Efecto del contenido de humedad de conidios formulados de *Metarhizium anisopliae acridum* (Hyphomycetes) sobre la viabilidad y producción de exudados en almacenamiento y virulencia sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae)» Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Colima, México, 2003.
- Irulandi, S.; A. Ravikumar; C. Chinniah; R. Rajendran; P. K. Vinod: «Farm Yard Manure and Neem Cake on Feeding Preference, Ovipositional Preference and Developmental Period of Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*», *Journal of Biopesticides* 3 (3): 534-539, India, 2010.
- Jaramillo, J.; C. Borgemeister; P. Baker: «Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): Searching for Sustainable Control Strategies», *Bulletin of Entomological Research*, 96: 1-12, Inglaterra, 2006.
- Jarquín, R.; S. Jiménez; F. Guharay; J. F. Barrera: «Aportes de productores y científicos al entendimiento de la agregación de *Hypothenemus hampei* en Chiapas, México», *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología CATIE* 75: 77-82, México, 2005.
- Le Pelley, R. H. E.: *Pests of coffee*, Tropical Science Series, Longmans Press, Green and Co. Ltd, Inglaterra, 1968.
- Lee, T. E.: *Statistical Methods for Survival data Analisis*, Lifetime Learning Publications, EE. UU., 1980.
- López, P.; J. E. Cortázar; J. A. Cerón: «Cry 1B and Cry3A Are Active Against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae)», *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 242-245, EE. UU., 2009.
- Montesinos, R.; G. Viniegra; R. Alatorre; O. Loera: «Relationship Between Virulence and Enzymatic Profiles in the Cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.», *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 2095-2102, EE. UU., 2011.
- Monzón, A.: «Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua», *Manejo Integrado de Plagas* 63: 95-103, Costa Rica, 2001.
- NOM-002-FITO-2000: (D.O.F., 2001) Diario Oficial de la Federación 2001. Norma oficial mexicana, por la que se establece la campaña contra la broca del café. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. México D. F., 21 de marzo.
- Núñez, O.; G. Saucedo; R. Alatorre; O. Loera: «Effect of Moisture Content and Inoculum on Growth and Conidia Production by *Beauveria bassiana* on Wheat Bran», *Braz. Arch. Biol. Techn.* 53: 771-777, Brasil, 2010.
- Pedrini, N.; M. L. Villaverde; C. B. Fuse; G. M. Dal Bello; M. P. Juárez: «*Beauveria bassiana* Infection Alters Colony Development and Defensive Secretions of the Beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae)», *Journal of Economic Entomology*, 103 (4): 1094-1099, EE. UU., 2010.
- Pedrini, N.; G. M. Dal Bello; S. B. Padín; M. P. Juárez: «Capacidad insecticida de *Beauveria bassiana* cultivada en hidrocarburos para control de coleópteros en granos almacenados», *Agrociencia Uruguay* 15 (1): 64-69, Uruguay, 2011.
- Ramírez, del A. M.: «Campaña Nacional Contra la Broca del Café en México: Operación y Perspectivas», *La Broca del Café en América Tropical: Hallazgos y Enfoques*. 2007, Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur. México, México, 2007, pp. 73-81.
- Rodríguez, S.: «Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidios de *Metarhizium anisopliae*», *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 64: 34-40, Costa Rica, 2002.
- Rodríguez, D.; O. Loera; G. Saucedo; G. Viniegra: «Substrate Influence on Physiology and Virulence of *Beauveria bassiana* acting on Larvae and Adults of *Tenebrio molitor*», *World J. Microb. Biot.* 25: 513-518, EE. UU., 2009.
- Rosell, G.; C. Quero; J. Coll; A. Guerrero: «Biorational Insecticides in Pest Management», *J. Pest Sci.* 33 (2): 103-121, EE. UU., 2008.
- SAGARPA: «Entrenamiento sobre control de calidad en formulados de hongos entomopatógenos», Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). Tecoman, Colima. pp: 10-15; 29-37, México, 2007 a.
- SAGARPA: *Dirección General de Sanidad Vegetal-Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria*. v. 2. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Apéndice Técnico-Operativo de la Campaña contra la Broca del Café., México, 2007 b.
- Sahayaraj, K.; S. Karthick; J. Martin: «Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Extracts of Plants and Commercial Botanicals», *African Journal of Biotechnology* 10 (6): 933-938, Kenya, 2011.
- Senthilrajaa, G.; T. Ananda; C. Durairajb; J. S. Kennedyb; S. Sureshb; T. Raguchandera: «A New Microbial Consortia Containing Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* for Simultaneous Management of Leafminers and Collar Rot Disease in Groundnut», *Biocontrol Science and Technology* 20 (5): 449-464, Inglaterra, 2010.
- SIAP: servicio de información agroalimentaria y pesquera, México. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 (consultado en septiembre de 2013).
- Suárez, G. H. D.: «Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) plaga de maíz almacenado», *Revista Intropica* 4: 45-51, Colombia, 2009.
- Terra México: «Duplicaría México consumo de café en cinco años» Gottfried, septiembre de 2009. México, http://ve.invertia.com/noticias/noticia.aspx?idNoticia=200909041425_TRM_78360197&idtel= (Consultado en septiembre de 2013).
- Trujillo, H. I.; L. F. Aristizábal; A. E. Bustillo; M. Jiménez: «Evaluación de métodos para cuantificar poblaciones de broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en fincas de caficultores experimentadores», *Revista Colombiana de Entomología* 32 (1): 39-44, Colombia, 2006.
- Vasantharaj, D. B.: «Biotechnological Approaches in IPM and Their Impact on Environment», *J. Biopest.* 1 (1): 1-5, India, 2008.
- Vázquez, L.; O. Elosegui; L. Leyva; A. Polanco; M. Becerra; S. Monzón; A. Rodríguez; E. Tamayo; C. Toledo; A. Navarro; M. García: «Ocurrencia de epizootias causadas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en poblaciones de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrar) en las zonas cafetaleras de Cuba», *Fitosanidad* 14 (2): 111-116, Cuba, 2010.
- Zhanga, Y. J.; M. G. Fengb; Y. H. Fana; Z. B. Luoa; X. Y. Yanga; D. Wual: «A Cuticle-Degrading Protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* Enhances Virulence», *Biocontrol Science and Technology* 18 (6): 543-555, Inglaterra, 2008.
- Zibae, A.; A. R. Bandani: «Purification and Characterization of the Cuticle-Degrading Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* in the Presence of Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) Cuticle», *Biocontrol Science and Technology* 19 (8): 797-808, Inglaterra, 2009.