

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**REPRODUCCIÓN MASIVA DE CONIDIAS DE CEPAS DEL HONGO
ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN
SOBRE SUSTRATO NATURAL DE ARROZ, BAJO DIFERENTES
CALIDADES DE GRANO**

HERNÁN JORGE POMA LAURA

LA PAZ – BOLIVIA

2011

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

REPRODUCCIÓN MASIVA DE CONIDIAS DE CEPAS DEL HONGO
ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN
SOBRE SUSTRATO NATURAL DE ARROZ, BAJO DIFERENTES
CALIDADES DE GRANO

*Tesis de Grado presentado como
requisito parcial para optar el
Título de Ingeniero Agrónomo*

HERNÁN JORGE POMA LAURA

Tutor:

Ing. Carlos López Blanco

Asesor:

Ph. D. David Cruz Choque

Tribunal Examinador:

Ph. D. Víctor Hugo Mendoza Condori

Ing. M. Sc. Teresa Ruiz Díaz Luna Pizarro

Ing. José Eduardo Oviedo Farfan

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador:

DEDICATORIA

A mi padre Lorenzo Poma y mi madre (+) Albertina Laura, por su amor, comprensión, apoyo y paciencia.

A mi esposa Gladys y mis hijos Aldair, Najhara, Jhojan y mis hermanos(nas) por el apoyo moral que me brindaron.

AGRADECIMIENTOS

Expresar mis sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

A mi asesor y tutor: Ph. D. David Cruz Ch. e Ing. Carlos López B. por haberme transmitido sus conocimientos, sus valiosas sugerencias, por el tiempo dedicado para mejorar el siguiente trabajo de investigación.

A mi tribunal revisor: Ph. D. Víctor H. Mendoza, Ing. M.Sc Teresa Ruiz D. e Ing. Eduardo Oviedo F., por sus valiosos aportes para el enriquecimiento del trabajo y por el tiempo dedicado a la revisión del mismo.

Un especial agradecimiento a la ESTACION EXPERIMENTAL COROICO dependiente del SERVICIO DEPARTAMENTAL AGROPECUARIO (SEDAG) de la PREFECTURA DEL DEPARTAMENTO DE LA PAZ, por brindar el apoyo necesario para poder realizar esta investigación y la colaboración del personal técnico, administrativo y de campo.

A la OFICINA REGIONAL DE SEMILLAS (ORS) LA PAZ, dependiente del PROGRAMA NACIONAL DE SEMILLAS (PNS) y personal técnico por haber brindado el apoyo en el uso de laboratorio.

Un profundo agradecimiento al personal docente, administrativo y compañeros de la Facultad de Agronomía de la UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES (UMSA), a quienes debo mi formación profesional.

Por siempre:

Hernán Jorge Poma Laura

INDICE GENERAL

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| INDICE GENERAL | iii |
| LISTA DE CUADROS | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE ANEXOS | viii |
| RESUMEN | ix |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Objetivo general | 2 |
| 1.2. Objetivos específicos | 2 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. Hongos entomopatógenos | 3 |
| 2.1.1. Clasificación taxonómica de los hongos | 3 |
| 2.1.1.1. Características de los hongos de la Subdivisión <i>Deuteromycotina</i> | 4 |
| 2.1.2. Patogenicidad y virulencia | 4 |
| 2.1.3. Producción de enzimas y toxinas | 5 |
| 2.1.4. Modo de acción de los hongos | 5 |
| 2.1.5. Rango de hospederos, especificidad y seguridad de los hongos | 6 |
| 2.1.6. Limitantes bióticas y abióticas de los entomopatógenos | 6 |
| 2.1.7. Viabilidad en hongos entomopatógenos | 6 |
| 2.1.8. Formulación de entomopatógenos | 7 |
| 2.1.9. Aplicación de hongos | 8 |
| 2.2. Entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> | 8 |
| 2.2.1. Clasificación taxonómica del hongo | 8 |
| 2.2.2. Características del hongo | 8 |
| 2.2.3. Ciclo biológico de <i>B. bassiana</i> | 9 |
| 2.2.4. Producción de enzimas, toxinas y ácidos metabólicos en <i>B. bassiana</i> | 10 |
| 2.2.5. <i>B. bassiana</i> en el control de plagas | 10 |
| 2.3. Producción de entomopatógenos | 11 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.1. Medios de cultivo | 12 |
| 2.3.2. Producción de <i>B. bassiana</i> | 12 |
| 2.3.3. Formulación y aplicación de <i>B. bassiana</i> | 14 |
| 3. LOCALIZACIÓN..... | 16 |
| 4. MATERIALES Y METODOS | 18 |
| 4.1. Materiales | 18 |
| 4.1.1. Equipos de laboratorio | 18 |
| 4.1.2. Cristalería..... | 18 |
| 4.1.3. Reactivos | 18 |
| 4.1.4. Vários..... | 18 |
| 4.1.5. Material biológico | 19 |
| 4.2. Método | 19 |
| 4.2.1. Reconocimiento y acondicionamiento de áreas de trabajo | 19 |
| 4.2.2. Antecedentes de la calidad de cepas de <i>B. bassiana</i> | 19 |
| 4.2.3. Condiciones de laboratorio..... | 20 |
| 4.2.4. Preparación del medio semisólido para la siembra del hongo | 20 |
| 4.2.5. Siembra de <i>B. bassiana</i> en el medio de cultivo semisintético..... | 21 |
| 4.2.6. Reproducción masiva del hongo a partir de cepas purificadas | 21 |
| 4.2.6.1. Selección de impurezas, lavado e hidratado del arroz | 22 |
| 4.2.6.2. Embolsado y esterilización del sustrato de arroz | 23 |
| 4.2.6.3. Inoculación y maduración de <i>B. bassiana</i> | 24 |
| 4.2.7. Lectura de concentración de conidias | 25 |
| 4.3. Variables de respuesta | 27 |
| 4.4. Diseño experimental | 28 |
| 4.4.1. Factores y niveles de estudio | 29 |
| 4.4.2. Tratamientos | 29 |
| 4.4.3. Croquis del experimento | 29 |
| 4.4.4. Análisis estadístico..... | 30 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 31 |
| 5.1. Características y comportamiento de sustratos de arroz | 31 |
| 5.2. Desarrollo del hongo en medios de cultivo sintético y natural | 33 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3. Determinación de la concentración de unidades infectivas del hongo | 36 |
| 5.4. Análisis de varianza de concentración de conidias | 39 |
| 5.4.1. Análisis de efectos simples de la interacción (A x B)..... | 40 |
| 5.4.1.1. Análisis de varianza de efectos simples de los factores A x B. | 40 |
| 5.5. Costos parciales de producción a nivel de laboratorio comunal..... | 46 |
| 6. CONCLUSIONES | 48 |
| 7. RECOMENDACIONES | 50 |
| 8. BIBLIOGRAFIA | 51 |
| ANEXOS..... | 56 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Hongos patógenos de plagas producidos en sustratos sólidos..... | 14 |
| Cuadro 2. Antecedentes de calidad de las cepas del hongo <i>B. bassiana</i> | 20 |
| Cuadro 3. Promedios de temperatura en laboratorio..... | 20 |
| Cuadro 4. Características de los sustratos de arroz. | 31 |
| Cuadro 5. Ganancia en peso de agua en sustratos de arroz..... | 31 |
| Cuadro 6. Concentración de conidias de <i>B. bassiana</i> , a los 18 días de maduración. | 38 |
| Cuadro 7. Concentración de conidias del hongo a los 25 días de maduración..... | 38 |
| Cuadro 8. Análisis de Varianza de la esporulación de cepas del hongo..... | 40 |
| Cuadro 9. Combinación de factores con promedios de conidiación (c/g). | 40 |
| Cuadro 10. Análisis de Varianza de efectos simples del factor B en los niveles de A... | 41 |
| Cuadro 11. Comparación de conidiación de <i>B. bassiana</i> sobre sustratos de arroz. ... | 41 |
| Cuadro 12. Análisis de Varianza de efectos simples del factor A en niveles de B. | 43 |
| Cuadro 13. Comparación de conidiación de cepas de <i>B. bassiana</i> | 43 |
| Cuadro 14. Costos de producción del hongo en sustratos. | 46 |
| Cuadro 15. Costo de producción del hongo en relación sustrato/bolsas obtenidas. | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. <i>B. bassiana</i> : a) Conidias; b) germinación de conidias. | 7 |
| Figura 2. <i>B. bassiana</i> : a) Conidióforo; b) Fialide; c) Conidias. | 9 |
| Figura 3. Ciclo de <i>B. bassiana</i> dividida en fase infectiva y reproductiva. | 9 |
| Figura 4. <i>B. bassiana</i> controlando a <i>H hampei</i> en campo. | 11 |
| Figura 5. Cultivos de <i>B. bassiana</i> contaminados con organismos saprofitos. | 14 |
| Figura 6. a) Preparación del hongo <i>B. bassiana</i> ; b) Aplicación del hongo en campo. .. | 15 |
| Figura 7. a) Estación Experimental Coroico; b) Oficina Regional de Semillas La Paz. . | 16 |
| Figura 8. Ubicación geográfica del estudio. | 17 |
| Figura 9. a) Cultivo Saboraud Dextrosa Agar (SDA); b) Preparación; c) Distribución. .. | 21 |
| Figura 10. Sustratos de arroz: a) Cateto; b) Estaquilla; c) Carolina; d) Arroccillo. | 22 |
| Figura 11. Impurezas del arroz: a) Cascarillas; b) Granos enfermos. | 22 |
| Figura 12. Escurrimiento del agua en arroz hidratado. | 23 |
| Figura 13. a) Pase de arroz en bolsas; b) Esterilización; c) Bolsas esterilizadas. | 24 |
| Figura 14. a) Siembra del hongo; b) Bolsas de hongo en proceso de maduración. | 24 |
| Figura 15. a) Solución madre (10^0); b) Soluciones consecutivas ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4$). | 25 |
| Figura 16. a) Cámara de Neubauer; b) Retículo central de conteo de conidias. | 26 |
| Figura 17. Fases del conteo del hongo: a) Pesado; b) Deposito de la dilución en cámara; c) Visualización; d) Conteo y registro de conidias. | 27 |
| Figura 18. Distribución de tratamientos en Diseño Factorial Completamente al Azar. .. | 29 |
| Figura 19. Distribución aleatoria de tratamientos (vista frontal y lateral). | 30 |
| Figura 20. <i>B. bassiana</i> en medios de cultivos de SDA y arroz: a) cepa 24; b) cepa 13; c) cepa 9205. | 35 |
| Figura 21. <i>B. bassiana</i> contaminada por <i>Aspergillus sp.</i> | 35 |
| Figura 22. Conidiación del hongo en arroz: a) Cepa 9205; b) Cepa 13. | 37 |
| Figura 23. Conidias de <i>B. bassiana</i> en retículo de conteo. | 37 |
| Figura 24. Esporulación de conidias de cepas del hongo sobre sustratos de arroz. | 41 |
| Figura 25. Influencia de sustratos de arroz en conidiación de cepas de <i>B. bassiana</i> . .. | 43 |

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Registro de temperaturas promedio en laboratorio.
- Anexo 2. Calidad de sustratos de arroz en relación a granos enteros y partidos.
- Anexo 3. Peso del hongo a los 18 días de maduración (gramos/bolsa).
- Anexo 4. Conidiación en volumen a los 18 días de maduración (conidias/mililitro).
- Anexo 5. Conidiación en peso a los 18 días de maduración (conidias/gramo).
- Anexo 6. Peso del hongo a los 25 días de maduración (gramos/bolsa).
- Anexo 7. Conidiación en volumen a los 25 días de maduración (conidias/mililitro).
- Anexo 8. Conidiación en peso a los 25 días de maduración (conidias/gramo).
- Anexo 9. Matriz de sumatoria de unidades experimentales.
- Anexo 10. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz cateto.
- Anexo 11. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz estaquilla.
- Anexo 12. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz carolina.
- Anexo 13. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz arrocillo.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la esporulación de conidias de cepas promisorias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre diferentes sustratos de arroz, a los 18 y 25 días de maduración, bajo la producción masiva a escala artesanal a nivel de laboratorio comunal, a una temperatura promedio de 23,88 °C, procediéndose con la caracterización de sustratos, hidratación, esterilización, inoculación del hongo, maduración y lectura de concentración de conidias. Se utilizó el Diseño Factorial Completamente al Azar con 2 factores: Factor A, sustrato de arroz con sus niveles a_1 , a_2 , a_3 y a_4 (cateto, estaquilla, carolina y arrocillo); Factor B, cepas del hongo con sus niveles b_1 , b_2 , y b_3 (cepas 24, 13 y 9205), con 12 tratamientos.

La conidiación completa de cepas del hongo se manifestó hasta los 25 días, con una esporulación máxima de conidias en el tratamiento a_1b_3 (cateto x cepa 9205), con $2,03 \cdot 10^9 \pm 0,33 \cdot 10^9$ conidias/gramo, y la mínima en a_2b_2 (estaquilla x cepa 13), con $5,23 \cdot 10^8 \pm 1,73 \cdot 10^8$ conidias/gramo. Los tratamientos presentaron altas, medias y bajas esporulaciones, altas en a_1b_3 (cateto x cepa 9205), a_1b_2 (cateto x cepa 13), a_3b_1 (carolina x cepa 24) y a_3b_2 (carolina x cepa 13); medias en a_3b_3 (carolina x cepa 9205), a_1b_1 (cateto x cepa 24) y $a_4b_1b_2b_3$ (arrocillo x cepas 24, 9205 y 13); y bajas en $a_2b_1b_2b_3$ (estaquilla x cepas 24, 9205 y 13).

Estadísticamente se determinó la dependencia entre las cepas del hongo y sustratos de arroz, con esporulación heterogénea de conidias, con un potencial similar en las cepas, con eficiencia sobre los sustratos cateto y carolina seguida de arrocillo y estaquilla. La estimación de costos unitarios de producción del hongo (200 gramos/bolsa), con sustrato arrocillo, cateto, carolina y estaquilla es de 3,92; 4,36; 4,46 y 4,85 Bolivianos/bolsa, con 1254,40; 1312,36; 1257,72 y 1387,10 Bs/qq, obteniendo 320, 301, 282 y 286 bolsas/qq respectivamente. Relacionando la producción de cepas del hongo con la esporulación de conidias y costos de producción se recomienda al sustrato cateto y carolina, asimismo el arrocillo compensa la esporulación por la mayor cantidad de bolsas obtenidas, descartando el sustrato estaquilla por su baja conidiación y alto costo.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de insectos plagas ocasionado por hongos, principalmente *Deuteromycetes* y *Entomophthorales*, son comunes de amplia distribución y frecuentemente disminuyen las poblaciones de insectos a través de epizootias espectaculares. Los hongos entomopatógenos pueden ser utilizados, para el control de insectos plaga, en diferentes estrategias, como la colonización estacional o insecticida microbial, siendo necesario producir masivamente el patógeno, formularlo y liberarlo oportunamente en el campo para disminuir la población de insectos plaga.

El sustrato de granos libres o quebrados es el más estudiado, donde el arroz es de mayor uso, ya que conserva las condiciones de viabilidad, patogenicidad y producción de volúmenes mayores de esporas (conidias), considerados como altos rendimientos de material infectivo.

El uso masivo de hongos entomopatógenos producidos en sustratos naturales para el control de insectos plagas, se viene estudiando y llevando a cabo en países como China, Cuba, Brasil, Venezuela, Colombia y otros. El hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es el entomopatógeno mas estudiado en el control de muchas plagas, por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica. La reproducción masiva del hongo *B. bassiana* en sustrato sólido, generalmente se da en granos de arroz como matriz (soporte y sustrato), formulación y control de calidad.

Actualmente a nivel local se cuenta con cepas promisorias del hongo (nativa, exótica), específicas en el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*: Ferrari), con antecedentes de selección, bioensayo y aplicación. Asimismo las cepas nativas no tienen un control de producción (cantidad de conidias) en la formulación de sustrato de sólido de arroz en relación a la cepa exótica, evaluada constantemente en su país de origen.

Esta situación exigió realizar la evaluación de la reproducción masiva de conidias de cepas promisorias del hongo *B. bassiana* sobre sustrato sólido de arroz bajo diferentes

calidades de grano a partir de cepas madre, con un método de tecnología artesanal, sencilla a nivel de laboratorio comunal, determinando la concentración de unidades infectivas (conidias) del entomopatógeno en determinado peso y volumen.

Por lo expuesto los objetivos del trabajo fueron:

1.1. Objetivo general

Evaluar la producción masiva de conidias de cepas promisorias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre sustrato natural de arroz bajo diferentes calidades de grano.

1.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características de comportamiento de los sustratos de arroz en el proceso de preparación.
- Evaluar el desarrollo de *B. bassiana* en los medios de cultivo sintético y natural de arroz.
- Determinar la concentración de unidades infectivas (conidias) del hongo en unidad de volumen y peso en la formulación.
- Determinar los costos parciales de producción del producto biológico terminado.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hongos entomopatógenos

Según la Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (1997), los primeros trabajos con hongos entomopatógenos se atribuyen a Bassi en 1836 con *B. bassiana* sobre el gusano de la seda *Bombix mori*, y Metchnikoff en 1879, utiliza a *Metarhizium anisopliae* contra *Anisoplia austriaca*.

La Sociedad Mexicana de Control Biológico (1995); citado por López (2003), señala que los hongos fueron los primeros microorganismos encontrados, causando enfermedades a insectos, considerándose en la actualidad como agentes potenciales en el control biológico de insectos, registrando para su uso cinco géneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomocela*, *Hirsutilla* y *Verticillium*.

Giraldo (2007), los hongos entomopatógenos son organismos heterótrofos (falta de fotosíntesis), que poseen células quitinizadas, normalmente no móviles; destacando comercialmente *B. bassiana* (Coleópteros), *V. lecanii* (Áfidos, moscas blancas y tisanópteros) y *M. anisopliae* (Homópteros, en general).

Rojas (2003), los hongos entomopatógenos son microorganismos que atacan insectos y ácaros, jugando un rol importante dentro de la biodiversidad, pues a partir de ellos se obtienen productos biológicos llamados bioinsecticidas, que son utilizados para controlar los insectos plaga en los cultivos.

2.1.1. Clasificación taxonómica de los hongos

La Sociedad Mexicana de Control Biológico (1995), indica que los hongos entomopatógenos se clasifican por sus características morfológicas, tomando en cuenta la forma del micelio, tipo de fructificación, tipo de hospedero, hábitat, condiciones

ambientales, medios de cultivo en que se desarrolla; realizado en microscopio electrónico, en base a análisis bioquímico, genético y biológico.

Ainsworth (1973); citado por Alean (2003), señala que la clasificación taxonómica de los hongos se separa en dos divisiones: *Myxomycota* por formar plasmodios y *Eumycota* por no fórmalos y ser frecuentemente miceliales.

Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división *Eumycota* y en las subdivisiones: *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* y *Deuteromycotina* (Tanada y Kaya1993; citado por Alean, 2003).

2.1.1.1. Características de los hongos de la Subdivisión *Deuteromycotina*

Los *Deuteromycotina* u hongos imperfectos, la mayoría carecen de fase sexual, o bien ésta no se conoce. Al tener reproducción asexual, son formadores de conidias (Tanada y Kaya 1993; citado por Alean 2003). En una clasificación jerárquica, estos hongos no son iguales a los *Ascomycotina* y *Basidiomycotina* pero ambos son complementarios taxonómicamente y por nomenclatura (Ainsworth 1973; citado por Alean, 2003).

Los *Deuteromycotina* son encontrados en dos clases, *Hyphomycetes* y *Coleomycetes*. Muchos son patógenos altamente virulentos y han sido aplicados en el control de insectos plaga (Samson *et al.* 1988; citado por Alean, 2003).

2.1.2. Patogenicidad y virulencia

Según Alves (1986), la patogenicidad se refiere a la capacidad de un microorganismo patógeno de provocar enfermedad en términos de virulencia y agresividad sobre insectos e individuos; refiriéndose a la virulencia a la capacidad de vencer la resistencia específica del hospedero, conocido como resistencia vertical y la agresividad afectando la resistencia horizontal del hospedero.

Agrios (1991); mencionado por Cruz (2001), define patogenicidad como una alteración ocasionada por algún agente patógeno sobre una o varias funciones esenciales del hospedero, variando el grado de patogenicidad o capacidad de enfermar de acuerdo al agente infeccioso.

La virulencia se lo realiza en laboratorio, determinando patógenos de alta virulencia con ciclo de enfermedad corto, producción de inoculo en grandes cantidades y causando un incremento rápido de la enfermedad dentro de una población. En contraste los agentes de baja virulencia se multiplican y propagan más lentamente (Garza *et al.* 1994, y Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1997).

2.1.3. Producción de enzimas y toxinas

La infección fúngica del entomopatógeno generalmente se inicia a través del contacto con la superficie del insecto, donde las esporas se adhieren, germinan y las hifas formadas secretan varias enzimas como las hidrolasas, proteasas, esterases y quitinasas para suavizar la cutícula, con el objeto de penetrar e invadir el hemocele del hospedero (Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1995).

La muerte del insecto ocurre por metabolitos tóxicos o por desajustes fisiológicos de la infección de entomopatógenos, algunas especies pueden matar al hospedero mediante la acción toxica más que por la invasión del mismo a través del cuerpo del insecto (Roberts, 1981; citado por Garza *et al.*, 1994).

2.1.4. Modo de acción de los hongos

Según Giraldo (2007), los hongos presentan las siguientes fases de desarrollo sobre los hospederos: germinación, formación de apresorios y estructuras (grampa) de penetración, colonización y reproducción del patógeno. En todos los casos la unidad infectiva es la conidia donde se adhiere a la cutícula del insecto, penetrando por acción

física y química, resultante de la acción enzimática, lo cual facilita la penetración mecánica.

2.1.5. Rango de hospederos, especificidad y seguridad de los hongos

Saik *et al.* (1990); citado por la Sociedad Mexicana de Control Biológico (1995), señalan que la mayoría de los hongos entomopatógenos tienen un amplio rango de hospederos, siendo un potencial para ser usado en el control de muchos insectos plagas. Con respecto a la “especificidad” en hospederos se ha demostrado en laboratorio que son diferentes, es decir que la patogenicidad es variable. En cuanto a “seguridad”, en general los hongos entomopatógenos no son tóxicos a animales superiores o plantas y no contaminan el medio ambiente.

2.1.6. Limitantes bióticas y abióticas de los entomopatógenos

Los hongos como agentes de control biológico están limitados por varios factores bióticos y abióticos. Los bióticos incluyen, antagonistas microbiales sobre el hospedero, superficie de la hoja, suelo, comportamiento de alimentación del insecto, edad y cepa del hongo. Los abióticos como la humedad, temperatura y radiación solar, determinan si la infección se lleva a cabo (Roberts *et al.* 1991; citado en Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1995).

2.1.7. Viabilidad en hongos entomopatógenos

La viabilidad de hongos entomopatógenos realizada a través de la germinación de conidias en laboratorio, debe ser superior al 85% en un tiempo de incubación de 12 a 24 horas, debido a que cuando se aplica el hongo debe tener un rápido efecto sobre la población de insectos plaga en un corto periodo de exposición a condiciones ambientales adversas de campo (Marín, 1994).

La germinación de las esporas en gran parte depende de la humedad ambiental y temperatura y en menor grado de las condiciones de luz y nutricionales (Tanada y Kaya 1993; citado por Alean, 2003).

El resultado de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero (Samson *et al.* 1988; citado por Alean 2003).

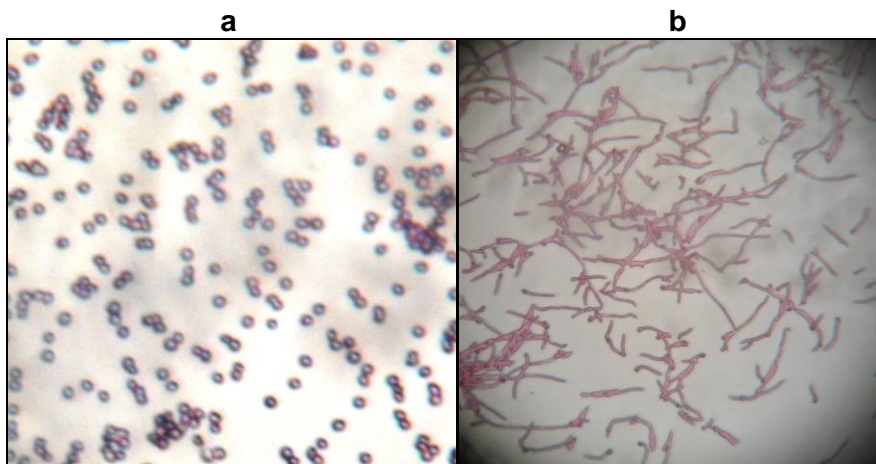


Figura 1. *B. bassiana*: a) Conidias; b) germinación de conidias.

2.1.8. Formulación de entomopatógenos

A diferencia de los insecticidas químicos el micelio, conidias, blastosporas, zoosporas o esporangios producidos por hongos entomopatógenos son propágulos vivos; por tanto, el tipo de formulación y selección de aditivos son críticos para su estabilidad (Mc Coy *et al.* 1988; citado en Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1997).

Los materiales utilizados en la formulación no deben tener actividad biológica; ni afectar la actividad del hongo, deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con los conidias; facilitar la aplicación del producto y ser económicamente rentables (Giraldo, 2007).

2.1.9. Aplicación de hongos

Según Garza *et al.* (1994), los métodos de aplicación están relacionados con las formulaciones y de las ventajas que estas aportan, como estabilidad biológica y física, favoreciendo la reducción en evaporación, incrementando la cobertura y adherencia, mejorando la dispersión, aumentando la resistencia a la intemperie (lluvia, luz ultravioleta) y reduciendo la pérdida del ingrediente.

2.2. Entomopatógeno *Beauveria bassiana*

Carballo y Falguni (2004), indican que el hongo *B. bassiana* se conoce muy bien por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica, probada por su patogenicidad contra más insectos plaga que cualquier otra especie de hongo.

2.2.1. Clasificación taxonómica del hongo

Según Roberts y Humber (1981); citado en la Sociedad Mexicana de Control Biológico (1995), se tiene la siguiente clasificación:

| | |
|-------------|--------------------------------------------------|
| División | : <i>Eumycotica</i> |
| Subdivisión | : <i>Deuteromycotina</i> |
| Clase | : <i>Hyphomycetes</i> |
| Orden | : <i>Moniliales</i> |
| Género | : <i>Beauveria</i> |
| Especie | : <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin. |

2.2.2. Características del hongo

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* ó *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*; sin embargo las más estudiadas son *B. bassiana* y *B. brongniartii* (Bustillo, 2001).

El hongo *B. bassiana* se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares, de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) (Bustillo, 2002; Samson et al. 1988; citado por Alean, 2003).

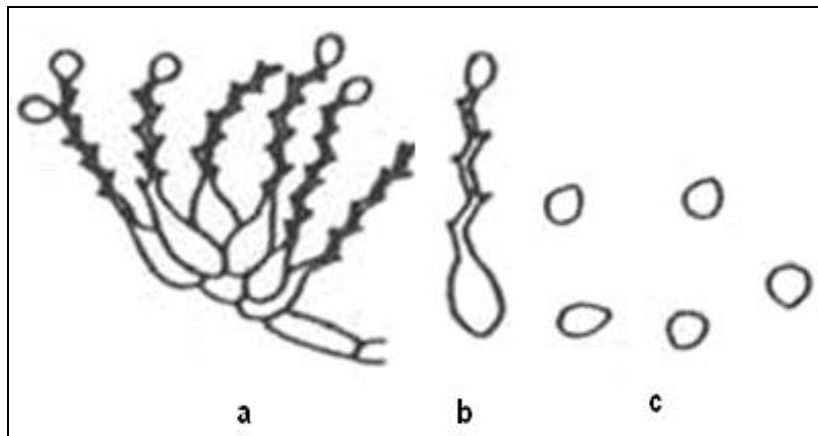


Figura 2. *B. bassiana*: a) Conidióforo; b) Fialide; c) Conidias.

2.2.3. Ciclo biológico de *B. bassiana*

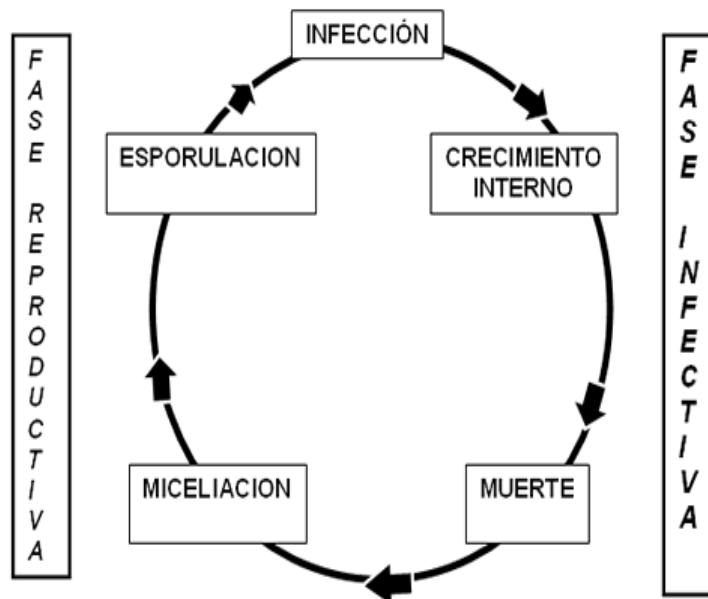


Figura 3. Ciclo de *B. bassiana* dividida en fase infecciosa y reproductiva.

Según Delgado (2008), el ciclo de *B. bassiana* se divide en fase infectiva y fase reproductiva (Figura 3). La fase infectiva se desarrolla desde la germinación de la espora sobre el integumento del insecto hasta su muerte, donde los factores para el crecimiento están relacionados con las condiciones nutricionales, temperatura y humedad que le ofrece el huésped. La fase reproductiva se manifiesta después de la muerte del insecto y cumple dos etapas: miceliación y esporulación, donde las condiciones de humedad y la temperatura son estrictas para su manifestación.

2.2.4. Producción de enzimas, toxinas y ácidos metabólicos en *B. bassiana*

Brocaril (2002); Carballo y Falguni (2004), indican que *B. bassiana* produce una gran variedad de enzimas, toxinas y ácidos metabólicos; enzimas como la quitinasa, proteasa y lipasa, que actúan de manera sinérgica para digerir y penetrar la epicutícula; las toxinas aisladas del hongo son Beauvericin, Beauveriloides, Isarolides, Bassianolide y eniantina, caracterizadas por ser ciclodepsipeptidos, ocasionando la muerte del hospedero durante el crecimiento micelial; finalmente el hongo también produce ácidos metabólicos como el cítrico y el oxálico que solubilizan proteínas cuticulares, colaborando en la infección.

2.2.5. *B. bassiana* en el control de plagas

Macleod, (1954) y Alves (1986); citado por Giraldo (2007), *B. bassiana* es aislado de insectos muertos con mayor frecuencia que cualquier otro entomopatógeno y se informa que infecta cerca de 200 especies de insectos.

Carballo y Falguni (2004); Delgado (2008), *B. bassiana*, actúa naturalmente en el campo por contacto o por ingestión en insectos plagas, de incidencia económica en diferentes cultivos agrícolas. En América Latina, el uso más importante en los últimos años ha sido para el control de la broca del café.

Con respecto a la plaga *H. hampei*, el hongo *B. bassiana* se encuentra infectando en toda las regiones donde este ha sido llevado e introducido. Los primeros registros de la incidencia del hongo sobre la broca fueron realizados en el Congo Belga en la de cada del 30 (Gonzales *et al.*, 1993 y Bustillo, 2002).

La conidias de *B. bassiana* son muy sensibles a la luz solar, por lo que las formulaciones deben tener protectores solares para una mayor permanencia en el ecosistema. En relación a la compatibilidad con fungicidas e insecticidas, en general no se deben hacer mezclas, porque estos reducen la viabilidad y matan al hongo (Vélez y Montoya 1993, Rivera *et al.* 1994; citado por Bustillo, 2002).



Figura 4. *B. bassiana* controlando a *H hampei* en campo.

2.3. Producción de entomopatógenos

El proceso de producción implica la selección de la cepa y el mantenimiento de la misma en los medios de cultivo. La “producción masiva” depende de la habilidad del aislamiento y del cultivo del patógeno en un organismo vivo o sobre un medio artificial. (Mc coy, 1990; citado por la Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1995).

Garza *et al.* (1994), la reproducción de hongos entomopatógenos se realizan en sustratos de diferentes tipos de grano, mismos que proporcionan el sustento para su

desarrollo, subsistencia alimenticia y producción de esporas, denominada como una técnica de producción de espora libre.

2.3.1. Medios de cultivo

Garza *et al.* (1994), los sustratos donde se desarrollan los entomopatógenos son denominados medios de cultivo, la composición de estos básicamente se establecen en fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio; a su vez oligoelementos representados por hierro, manganeso, cobalto, cobre y zinc.

Alean (2003), señala que los medios de cultivo deben contener nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos. El pH debe ser ligeramente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos.

Según Pelczar *et al.* (1997; citado por Alean (2003), de acuerdo a su procedencia y origen de sus componentes existen tres tipos de medios de cultivo para los hongos: 1) Medios naturales, de origen natural, de composición no exacta (frutas, vegetales, cereales y tejidos animales), no son fácilmente reproducibles, ni de amplio uso; 2) Medios semisintéticos, de origen natural y químico, preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de procedencia desconocida o variable; 3) Medios sintéticos, de composición química definida cuantitativa y conocida.

2.3.2. Producción de *B. bassiana*

Fernández (2007), señala que para la selección del método de reproducción es importante tener en cuenta no sólo la factibilidad tecnológica y económica, sino el mecanismo de acción ya que en el producto final deben estar presentes las estructuras infectivas y los metabolitos activos de forma estable y con su mayor potencial biológico. El autor también señala que se debe tomar en cuenta: 1) Selección de la cepa adecuada, 2) Selección de un medio de cultivo que permita obtener un desarrollo del

hongo con máximo potencial patogénico y con eficiencia económica, 3) La posibilidad tecnológica y económica a nivel de producción, 4) Formulación que permita periodos de almacenamiento prolongados, facilidad de aplicación y estabilidad en condiciones de campo.

Morales *et al.* (1991); citado por Bustillo (2002), señala dos enfoques para la producción de *B. bassiana*, industrial y artesanal; produciendo en el primer caso en medios artificiales y líquido bajo formulación y agitación (blastosporas) y en el segundo caso se utiliza arroz y agua, con esterilización produciendo esporas.

Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (1997), los hongos entomopatógenos, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae*, *M. flavoridae* y otros, han sido producidos en sustrato sólido para ensayos en laboratorio y campo, plantas piloto y de forma semiindustrial para el control de diversos insectos plaga en prácticamente todo el mundo.

Según el Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFE) (1995), los caficultores pueden producir y aplicar *B. bassiana*, usando como sustrato el arroz, mediante una tecnología sencilla, económica y eficiente, con recursos de fácil consecución. El hongo producido en esta forma puede estar disponible para el agricultor en cantidades suficientes y oportunas.

A su vez señala que el cultivo del hongo en forma segura y eficiente comprende las siguientes etapas: Preparación del medio de cultivo, esterilización de los medios de cultivo, siembra del hongo, maduración del hongo en el medio de cultivo, calidad del hongo y cosecha del hongo.

Por otra parte en el proceso de maduración de *B. bassiana* se desarrollan coloraciones amarilla o violeta debido al metabolismo del hongo, cuya función es inhibir el desarrollo de contaminantes en el medio, no debiendo confundirse con el crecimiento de hongos contaminantes (saprofitos), como *Penicillium sp*, *Aspergillus sp* y *Rhizopus sp.*, que

producen coloraciones verdes, negras, café y naranja. En ocasiones, también se presentan contaminaciones por levaduras y bacterias que imparten un aspecto líquido, cremoso y mal olor al medio de cultivo.

Cuadro 1. Hongos patógenos de plagas producidos en sustratos sólidos.

| Patógeno | Sustrato | Plaga | País | Estatus* |
|------------------------|------------------|--------------------------------|-----------|----------|
| <i>B. brongniartii</i> | granos de cebada | <i>Melolontha melolontha</i> | Suiza | EC |
| <i>B. brongniartii</i> | Granos de cereal | <i>Melolontha melolontha</i> | Italia | EC |
| <i>B. bassiana</i> | microgranulos | <i>Ostrinia nubilalis</i> | Francia | PP |
| <i>B. bassiana</i> | granos de arroz | <i>Pantorhytes plutus</i> | N. Guinea | EL |
| <i>B. bassiana</i> | granos de arroz | <i>Hypothenemus hampei</i> | México | Si |
| <i>M. anisopliae</i> | granos de arroz | <i>Antitrogus spp.</i> | Australia | EL |
| <i>M. anisopliae</i> | granos de arroz | <i>Adoryphorus couloni</i> | Tazmania | Si |
| <i>M. anisopliae</i> | granos de arroz | <i>Aeneolamia spp.</i> | México | Si |
| <i>M. anisopliae</i> | granos de arroz | <i>Mahanarva posticata</i> | Brasil | Si |
| <i>M. flavoridae</i> | granos de arroz | <i>Schistocerca piceifrons</i> | México | EC |

Fuente: Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (1997).

* EC= Ensayos en campo; EL= Ensayos en laboratorio; PP= Planta piloto; Si= Semiindustrial.



Figura 5. Cultivos de *B. bassiana* contaminados con organismos saprofitos.

2.3.3. Formulación y aplicación de *B. bassiana*

B. bassiana, registrada en 1999 como "Mycotrol" en Estados Unidos, es utilizado en campo para el control de saltamontes, mosca blanca, trips, áfidos y otras plagas de

insectos. Este producto es estable por más de 12 meses almacenados a 25 °C. (Wraight, Jackson, Kock, 2001; citado por Fragas *et al.*, 2007).

Algunas formulaciones granuladas muy sencillas son las del hongo en arroz o arroz molido obtenidas mediante el proceso de producción masiva del hongo. Otras como las de gránulos de aceite hidrogenado es utilizada para conidias de *B. bassiana* (Carballo, 1998).

Según CENICAFE (1995), se prepara la solución fungosa de *B. bassiana* (50 gramos de arroz), agregándole 10 mililitros de aceite agrícola y agua, obteniendo una premezcla de 1 litro, luego se adiciona agua completando a la capacidad de la mochila aspersora (20 litros), si la mochila tuviera una capacidad de 10 litros, tan solo se utiliza 0.5 litros de polución, se agita fuertemente para crear una emulsión. La aplicación se lo realiza en horas de la tarde para que las conidias no sean afectadas por la radiación solar y a la vez para evitar pérdidas por evaporación.



Figura 6. a) Preparación del hongo *B. bassiana*; b) Aplicación del hongo en campo.

3. LOCALIZACIÓN

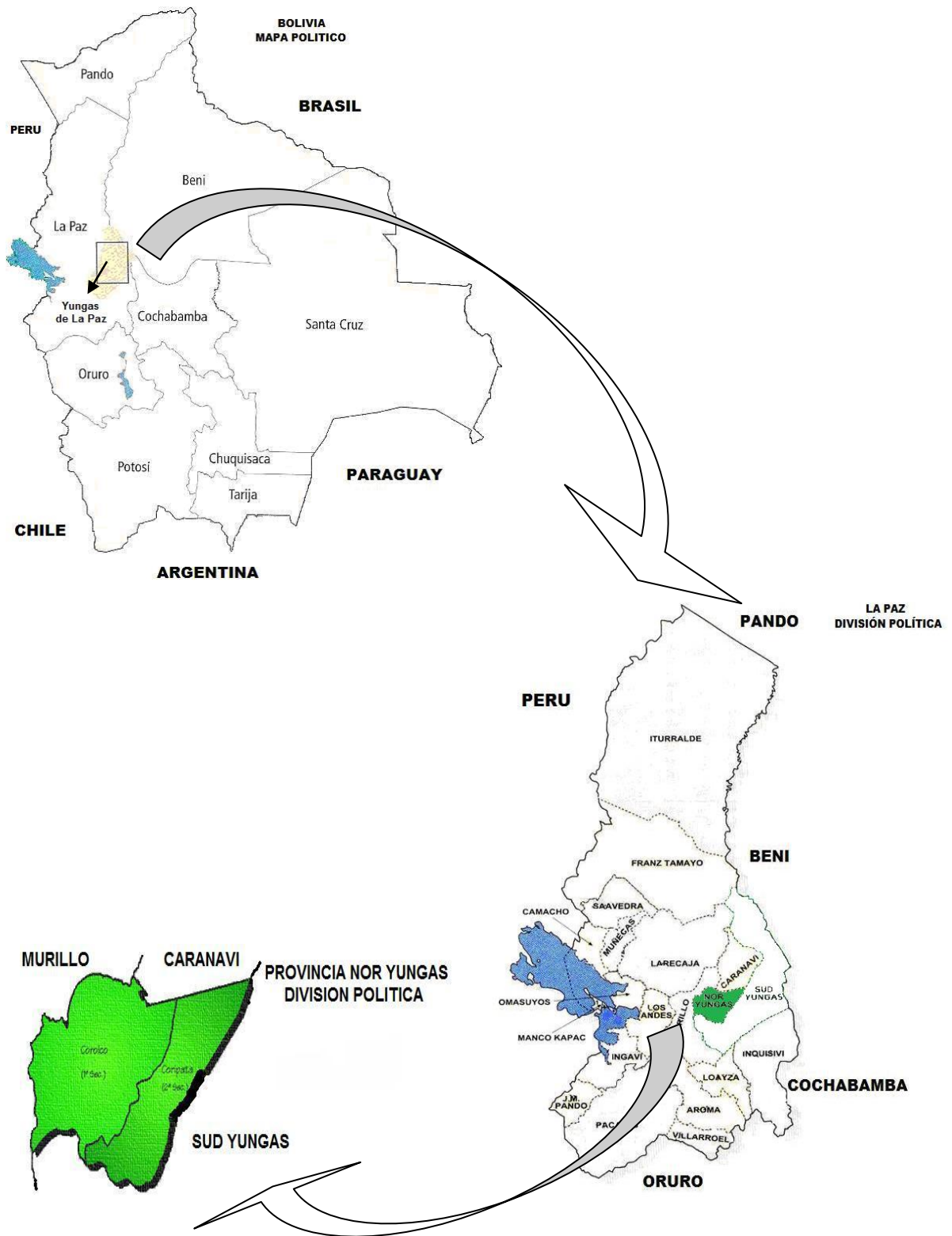
El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Entomopatógenos de la Estación Experimental Coroico, ubicado en la comunidad de San Pedro de la Loma distante a 13 Kilómetros de la localidad de Coroico y 105 kilómetros de la ciudad de La Paz, dependiente del Servicio Departamental Agropecuario (SEDAG) de la Prefectura de La Paz. Asimismo otra parte del trabajo se realizó en el laboratorio de inocuidad de semillas, de la Oficina Regional de Semillas (ORS) dependiente del Programa Nacional de Semillas (PNS) en la ciudad de La Paz.



Figura 7. a) Estación Experimental Coroico; b) Oficina Regional de Semillas La Paz.

La Estación Experimental Coroico (Figura 8), se halla dentro de la jurisdicción de la Provincia Nor Yungas del Departamento de La Paz, geográficamente se encuentra situado a 16°12'17" de Latitud Sur y 67°41'52" de Longitud Oeste, a una altura promedio de 1630 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio anual es de 21.5 °C y una humedad relativa promedio de 80.79%.

Esta zona se caracteriza por tener una topografía accidentada, con grandes cañadones y altas pendientes, caracterizada por bosque denso y especies siempre verdes, cuya clasificación de acuerdo a la formación de zonas corresponde al bosque húmedo sub tropical de piso montano (Holdridge, 1987).



Fuente: Elaboración propia

Figura 8. Ubicación geográfica del estudio.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Equipos de laboratorio

| | |
|-------------------------|----------------------|
| Asa de platino | Balanza digital |
| Cámara de flujo laminar | Cámara de incubación |
| Cámara fotográfica | Cocinilla + garrafa |
| Estereoscopio | Engrapadora |
| Microscopio | Olla a presión |
| Nebulizador manual | Termoventilador |
| Termómetro | Refrigerador |

4.1.2. Cristalería

| | |
|-----------------------|--------------------|
| Cajas petri | Cámara de Neubauer |
| Mechero de Bunsen | Pipetas |
| Vasos precipitados | Matraz Erlenmeyer |
| Pipetas de Pasteur | Tubos de ensayo |
| Porta + cubre objetos | Probeta |

4.1.3. Reactivos

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| Alcohol etílico al 96% | Agua destilada estéril (ADE) |
| Hipoclorito de sodio al 8% | Saboraud Dextrosa Agar (SDA) |
| Aceite Agrícola (Carrier) | Detergente |

4.1.4. Vários

| | |
|-------------------------|--------|
| Bolsas de polipropileno | Grapas |
|-------------------------|--------|

| | |
|-----------------------|----------------|
| Bañadores | Baldes |
| Papel absorbente | Papel aluminio |
| Barbijos | Guardapolvo |
| Guantes (goma, cuero) | Pinceles |

Materiales de escritorio (Computadora, Impresora, Papel, bolígrafos).
Materiales de limpieza (toallas, cepillos, guantes, escoba, pisos).

4.1.5. Material biológico

- Hongo *B. bassiana* (Cepas madre: 24 PV/CC, 13 U/VB y Bb. 9205).
- Arroz: cateto, carolina estaquilla (grano de oro) y arrocillo.

4.2. Método

4.2.1. Reconocimiento y acondicionamiento de áreas de trabajo

El trabajo se inicio con el reconocimiento de laboratorios respectivos, en la Estación Experimental Coroico y la Oficina Regional de Semillas. En el primer caso se acondicionó los ambientes del área de preparación de sustratos, inoculación, incubación y maduración para la reproducción masiva del hongo; en el segundo caso se acondiciono el equipo de observación y la cristalería para realizar la preparación de diluciones y la respectiva lectura de conidias del hongo.

4.2.2. Antecedentes de la calidad de cepas de *B. bassiana*

Se identificó las cepas de *B. bassiana* (Cuadro 2), las nativas (cepa 24 y 13), son procedentes de la región Yungueña evaluadas por el Proyecto Control Biológico de Plagas (COBIPLA) tienen un comportamiento variado en lo referente a la reproducción masiva en arroz, obteniéndose en ambas cepas la maduración entre 22 y 25 días a una temperatura de 25 ± 1 °C respectivamente (Cordero, 1999).

La cepa Bb.9205 es procedente de CENICAFE- Colombia, con antecedentes de obtención del hongo en 15 días sobre sustrato de arroz a una temperatura de 25 a 27°C (Bustillo *et al.*, 1998).

Cuadro 2. Antecedentes de calidad de las cepas del hongo *B. bassiana*.

| Cepa | Origen | Concentración | | Viabilidad (%) | Pureza (%) | Patogenicidad (%) |
|-----------|----------|-----------------------|----------------------|----------------|------------|-------------------|
| | | c/ml | c/g | | | |
| 24 PV/CC | Yungas | 3,50*10 ⁷ | 1,40*10 ⁹ | - | - | 98 |
| 13 U/VB | Yungas | 3,50*10 ⁷ | 1,40*10 ⁹ | - | - | 97 |
| B.b. 9205 | Colombia | 3,87*10 ¹¹ | 7,74*10 ⁹ | 85 - 100 | 99,80 | 97 |

Fuente: Bustillo *et al.* (1998) y Cordero (1999).

4.2.3. Condiciones de laboratorio

Con la recomendación de CENICAFE (1996), las condiciones ambientales de temperatura (Anexo 1) en laboratorio, en el proceso de maduración del hongo, se controló bajo los siguientes rangos promedio:

Cuadro 3. Promedios de temperatura en laboratorio.

| T. máxima (°C) | T. mínima (°C) | T. promedio (°C) |
|----------------|----------------|------------------|
| 26.0 | 22.36 | 23.88 |

Fuente: Propia.

A su vez siguiendo la recomendación de Pérez (2002), el laboratorio se mantuvo en condiciones asépticas, con aseo periódico y desinfección como: el piso (Solución de hipoclorito de sodio al 10%), material de manipuleo (Alcohol etílico al 96%) y la cristalería en general (Con calor húmedo a 100 °C).

4.2.4. Preparación del medio semisólido para la siembra del hongo

El cultivo empleado fue SDA (Figura 9a), para la conidiación del hongo en forma pura y libre de contaminantes. El cultivo tiene las siguientes características: Peptona micológica (10%), Glucosa (40%), Agar (15%), Formula típica (65 g/l), pH (5,6 ± 0.2), Esterilización (15 min/121 °C, Presión 1,5 atmósferas).

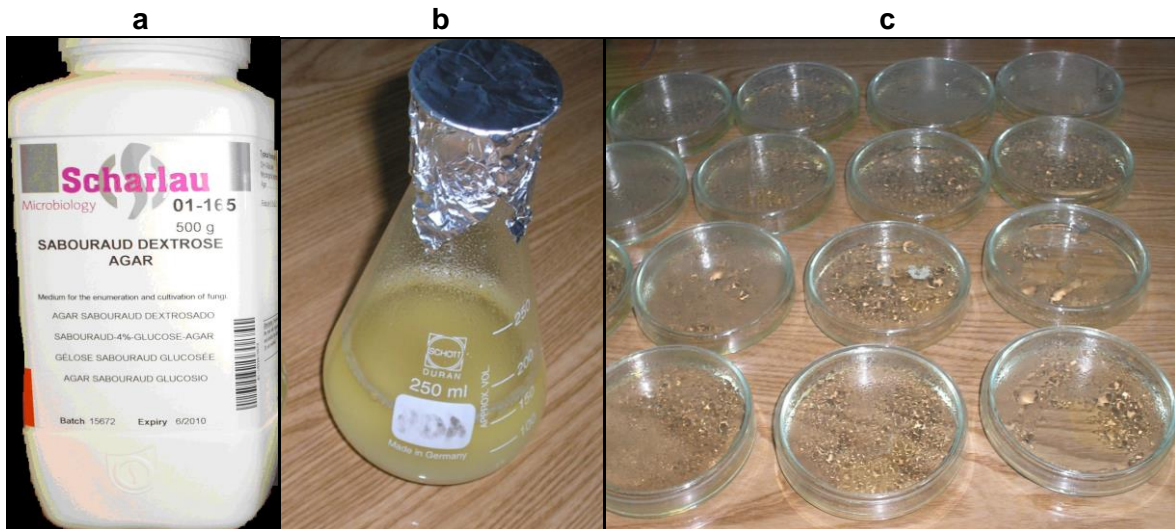


Figura 9. a) Cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA); b) Preparación; c) Distribución.

La preparación del cultivo se llevó a cabo de acuerdo a la especificación técnica estándar (Figura 9b), con peso y volumen determinado, se homogeneizó y esterilizó en la olla de presión por 30 minutos a una temperatura de 121 °C; luego se distribuyó en Cajas Petri, para su enfriamiento y consistencia sólida deseada.

4.2.5. Siembra de *B. bassiana* en el medio de cultivo semisintético

Se realizó la siembra del hongo en la Cámara de Flujo Laminar con limpieza y organización eficiente, utilizando para este fin el Asa de Platino (flameado y enfriado), aislando conidias del hongo al medio de cultivo preparado registrando e identificando la cepa, fecha y hora respectiva. El hongo inoculado se llevo a la cámara de incubación para su respectivo desarrollo a una temperatura de 24°C, con evaluación constante, tomando datos necesarios de contaminación y desarrollo, obteniendo una esporulación abundante en 12 días.

4.2.6. Reproducción masiva del hongo a partir de cepas purificadas

Se selecciono cepas del hongo desarrolladas libres de contaminantes con el objeto de garantizar la reproducción masiva sin agentes indeseables, utilizando sustratos de arroz y empleando la técnica artesanal de laboratorio comunal.

4.2.6.1. Selección de impurezas, lavado e hidratado del arroz

Se trabajó con arroz cateto, estaquilla, carolina y arrocillo (Figura 10), separando elementos indeseables como cascarillas, piedrecillas, semillas de malezas, granos atacados por insectos y enfermedades, con el objeto de homogeneidad de granos.

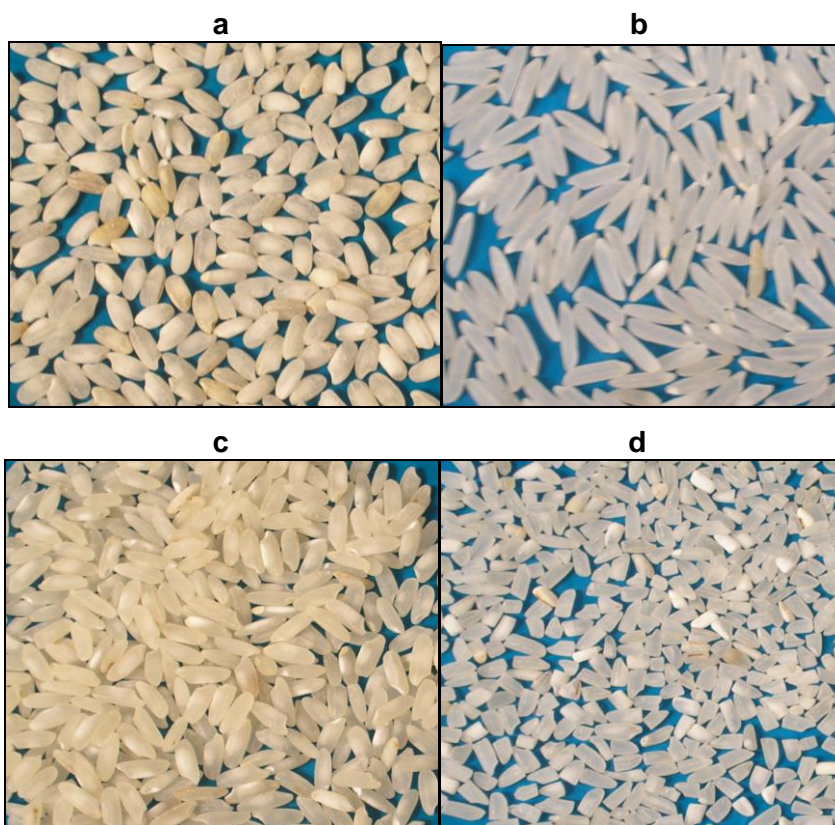


Figura 10. Sustratos de arroz: a) Cateto; b) Estaquilla; c) Carolina; d) Arrocillo.



Figura 11. Impurezas del arroz: a) Cascarillas; b) Granos enfermos.

El arroz seleccionado se lavo con agua, quitándole el polvillo, luego se hidrato en agua hervida por 40 minutos con el fin de ganar humedad, lo cual es un requisito indispensable para que el hongo se desarrolle, finalmente se escurrió el exceso de agua en colador por gravedad.



Figura 12. Escurrimiento del agua en arroz hidratado.

4.2.6.2. Embolsado y esterilización del sustrato de arroz

Para la contención y desarrollo del hongo en arroz se empleó bolsas de polipropileno, se utilizó una cantidad aproximada de 100 gramos de arroz/bolsa, (Figura 13a) cerrando y asegurando con grapas, con el objeto de que el sustrato no pierda humedad en el proceso de esterilización y posterior desarrollo del hongo.

La esterilización se realizó en olla a presión por 30 minutos (Figura 13b), a una temperatura y presión aproximada de 121 °C y 1.5 atmósferas. Las bolsas esterilizadas (Figura 13c) se trasladaron a la Cámara de Flujo Laminar, donde se enfriaron y sometieron rayos ultra violeta por un tiempo de 6 horas para su posterior inoculación.

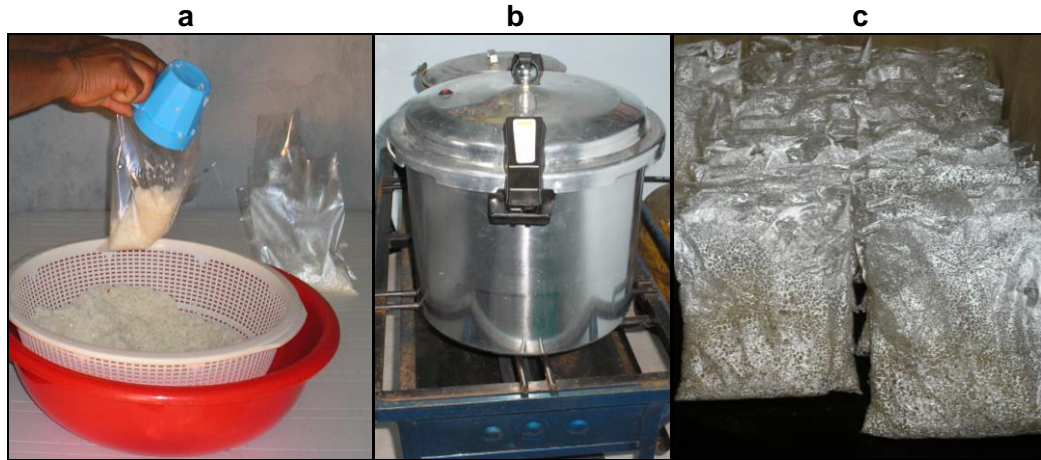


Figura 13. a) Pase de arroz en bolsas; b) Esterilización; c) Bolsas esterilizadas.

4.2.6.3. Inoculación y maduración de *B. bassiana*

La reproducción masiva de *B. bassiana* de los tratamientos (cepas + sustratos de arroz), a partir de matrices purificadas, se lo realizó tomando las previsiones de asepsia evitando los agentes contaminantes como bacterias y hongos saprofitos (*Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y *Rhizopus sp*).



Figura 14. a) Siembra del hongo; b) Bolsas de hongo en proceso de maduración.

Con la ayuda del Asa de Platino cerca de un mechero Bunsen (Figura 14a), se realizó la inoculación de las cepas del hongo en los diferentes sustratos de arroz, registrando la fecha, código y cepa respectivamente. Las bolsas inoculadas (Figura 14b), se agitaron para diseminar las conidias y acelerar el contacto y germinación respectiva,

disponiéndose en la cámara de incubación de forma ordenada para su maduración. Se efectuó un seguimiento por un periodo de tiempo (18 a 25 días), evidenciando una maduración completa del entomopatógeno, denotándose una esporulación abundante de conidias.

4.2.7. Lectura de concentración de conidias

La cuantificación de concentración de conidias de cepas del hongo, se realizó en el laboratorio de la Oficina Regional de Semillas, en la ciudad de La Paz, con pruebas de conteo posterior a los 18 y 25 días respectivamente.

Se utilizó la metodología propuesta por Antia *et al.* (1992), procediendo a preparar la solución madre o dilución 10^0 (Figura 15a) con un volumen de ADE de 200 mililitros, el hongo producido y aceite agrícola Carrier al 0,1%; a su vez se preparó en tubos de ensayo en orden secuencial en gradilla, 9 mililitros de ADE.

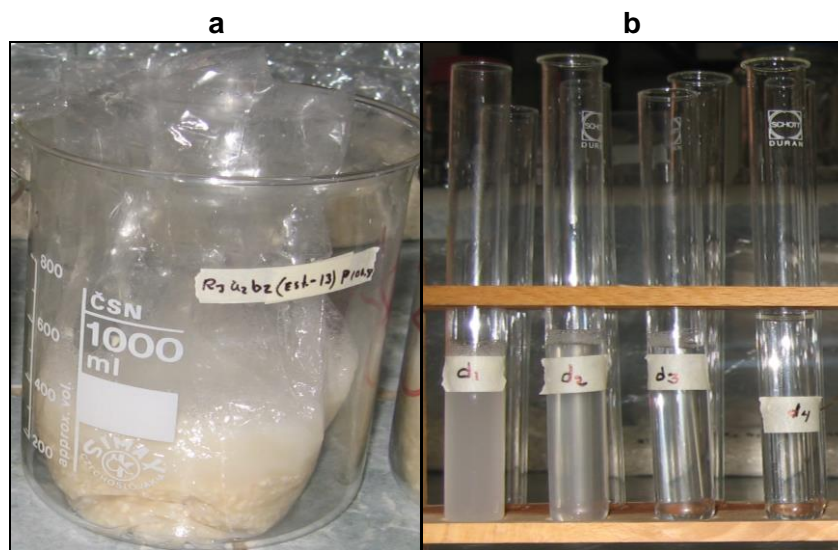


Figura 15. a) Solución madre (10^0); b) Soluciones consecutivas ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4$).

De la solución madre (Figura 15b), previa agitación se tomó una submuestra de 1 mililitro depositando al primer tubo de ensayo preparado obteniendo así la dilución 1 o 10^1 , llevando de esta 1 mililitro al siguiente tubo de ensayo, obteniendo la dilución 2 o

10^2 y así sucesivamente, hasta preparar la dilución apropiada (10^n), que permitió el conteo conidias/mililitro de la suspensión.

Para el conteo se utilizó microscopio y la Cámara de Neubauer (Figura 16), esta última está dividida en 2 retículos, cada una subdividida en 9 cuadros de 1 mm^2 con una superficie total de 9 mm^2 . Para el caso se utilizó el cuadrante central subdividido en 25 cuadrantes y estos a su vez en 16 cuadros más pequeños, cuyo factor es 10^4 .

Según CENICAFE (1996) y López (2003), el conteo se establece sumando el total de esporas presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara, a cada submuestra, realizando tres veces este procedimiento con total de seis lecturas, la dilución adecuada permitió facilitar conteos de 10 a 50 conidias/cuadrante.

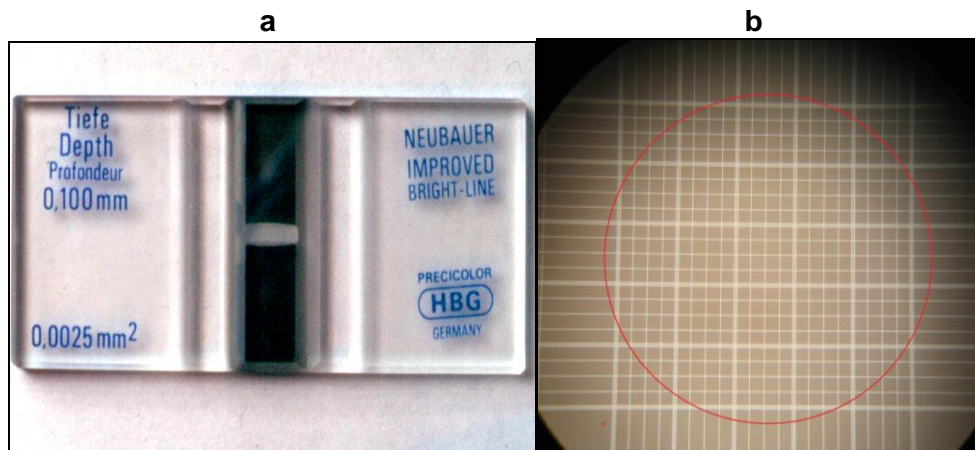


Figura 16. a) Cámara de Neubauer; b) Retículo central de conteo de conidias.

Para el cálculo de número de conidias, se debe previamente pesar la bolsa con hongo (Figura 17a), y saber el volumen de agua utilizada. Para el conteo la dilución adecuada se debe agitar durante 30 segundos y tomar una muestra aproximada de 0,01 mililitros, depositando en cada retículo de la cámara (Figura 17b), con la ayuda del microscopio (objetivo 10X) se localiza el campo central de conteo (Figura 17c), de tal forma que se observe nítidamente los cuadrantes y luego se pasa al objetivo 40X precediéndose al conteo respectivo (Figura 17d).

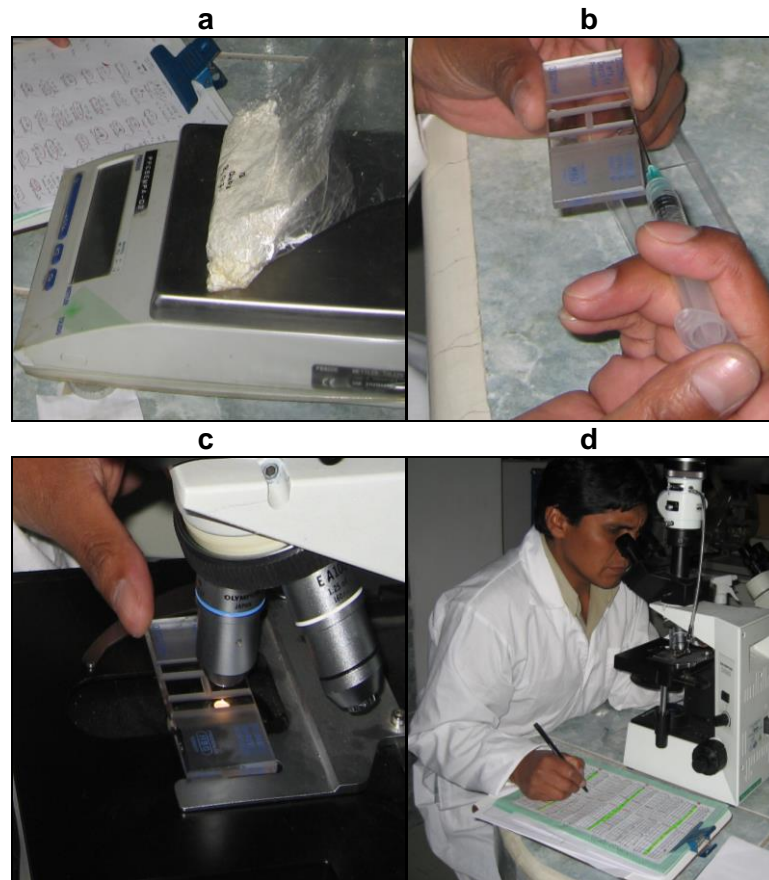


Figura 17. Fases del conteo del hongo: a) Pesado; b) Deposito de la dilución en cámara; c) Visualización; d) Conteo y registro de conidias.

La concentración de conidias se calculo empleando la formula siguiente:

$$C = N * \text{Dilución empleada} * \text{Factor cámara}$$

Donde:

C: Concentración que se desea conocer

N: Número promedio de esporas por cuadrante.

4.3. Variables de respuesta

- Se evaluó las características y comportamiento de sustratos de arroz en el proceso de preparación, conociendo el porcentaje de granos enteros y partidos y determinando la ganancia de peso en humedad o agua después de la hidratación y esterilización respectivamente.

- De manera visual se evaluó las características físicas de *B. bassiana*, determinando las etapas de desarrollo (fase micelial, formación conidial y esporulación de conidias) en su fase saprofítica en los cultivos sintético y natural en tiempos determinados.
- En base al peso de la formulación del hongo (100 g) se cuantifico la concentración de conidias de cepas, en los diferentes sustratos de arroz, estimando por unidad de peso y/o volumen respectivamente.
- Se determino los costos de producción del producto biológico terminado en los diferentes sustratos, por unidad (bolsa de 200 g) y cantidad (bolsas/qq), en base a insumos y mano de obra empleados, con enfoque a tecnología artesanal (laboratorio comunal).

4.4. Diseño experimental

El presente estudio se llevó bajo el diseño “FACTORIAL COMPLETAMENTE AL AZAR” con factorial 4 x 3 (Factor A x B), haciendo 12 tratamientos en 4 repeticiones, con 48 unidades experimentales (3 bolsas por unidad experimental), con un margen de error del 5%. El modelo lineal aditivo se expresa en la forma siguiente:

$$Y_{(ij)k} = \mu + A_i + B_j + (A \times B)_{ij} + E_{k(ij)}$$

Donde:

- $Y_{(ij)k}$ = Observación del ij-esimo tratamiento en la k-esima repetición
- μ = Media general
- A_i = Efecto del i-esimo factor
- B_j = Efecto del j-esimo factor
- $(A \times B)_{ij}$ = Efecto de la interacción de factores en el ij-esimo tratamiento
- $E_{k(ij)}$ = Error experimental.

4.4.1. Factores y niveles de estudio

Factor A (Sustrato de arroz)

Factor B (Cepas de *B. bassiana*)

Niveles:

Niveles:

a_1 = Cateto

b_1 = Cepa 24

a_2 = Estaquilla

b_2 = Cepa 13

a_3 = Carolina

b_3 = Cepa 9205

a_4 = Arrocillo

4.4.2. Tratamientos

$T_1 = a_1 b_1$ (cateto x cepa 24)

$T_2 = a_1 b_2$ (cateto x cepa 13)

$T_3 = a_1 b_3$ (cateto x cepa 9205)

$T_4 = a_2 b_1$ (estaquilla x cepa 24)

$T_5 = a_2 b_2$ (estaquilla x cepa 13)

$T_6 = a_2 b_3$ (estaquilla x cepa 9205)

$T_7 = a_3 b_1$ (carolina x cepa 24)

$T_8 = a_3 b_2$ (carolina x cepa 13)

$T_9 = a_3 b_3$ (carolina x cepa 9205)

$T_{10} = a_4 b_1$ (arrocillo x cepa 24)

$T_{11} = a_4 b_2$ (arrocillo x cepa 13)

$T_{12} = a_4 b_3$ (arrocillo x cepa 9205)

4.4.3. Croquis del experimento

Repeticiones

Tratamientos

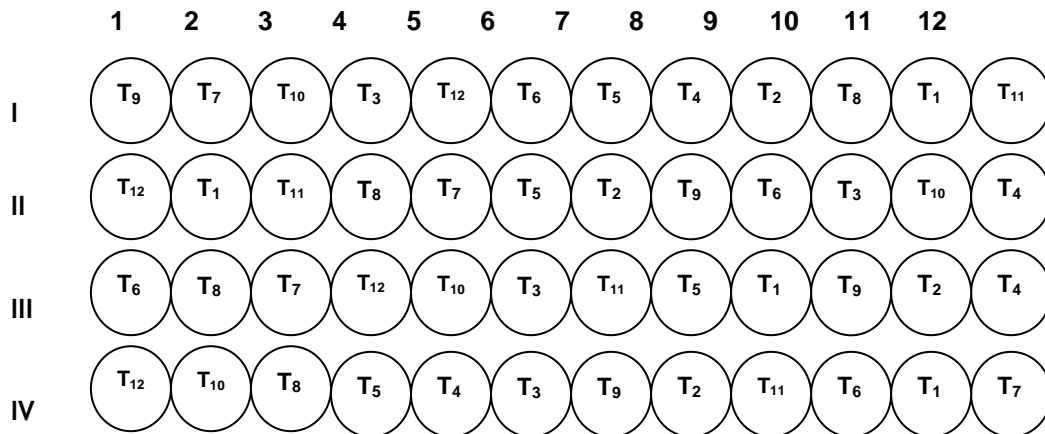


Figura 18. Distribución de tratamientos en Diseño Factorial Completamente al Azar.



Figura 19. Distribución aleatoria de tratamientos (vista frontal y lateral).

4.4.4. Análisis estadístico

Los datos se tabularon e interpretaron en cuadros y curvas de distribución; realizando las siguientes pruebas: Análisis de Varianza, Análisis de efectos simples en factores y niveles (Análisis de Interacción), Varianzas, Desviación Estándar y prueba de rango múltiple (Steel y Torrie 1988; Little y Hills, 1990; Calzada, 1982).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Características y comportamiento de sustratos de arroz

Los sustratos de arroz (Factor A) empleados en la producción de *B. bassiana*, presentaron características propias en lo referente a la calidad de sus granos (Cuadro 4), realizado en muestreos en peso de 10 gramos determino la cantidad en número, relación de granos enteros y partidos. A la vez la ganancia de peso de sustratos después de la hidratación y esterilización a partir de un peso seco de 3200 gramos, manifestó la ganancia en peso por la absorción del agua, lo cual es indispensable para la reproducción del hongo y su respectiva esporulación de conidias (Cuadro 5).

Cuadro 4. Características de los sustratos de arroz.

| Sustrato | Peso (g) | Número de granos | | Peso (gramos) | | Porcentaje (%) | |
|------------|----------|------------------|---------|---------------|------|----------------|-------|
| | | GE | GP | GE | GP | GE | GP |
| Cateto | 10 | 316±11 | 114±18 | 8,38 | 1,62 | 83,80 | 16,20 |
| Estaquilla | 10 | 343±10 | 58±14 | 9,04 | 0,96 | 90,40 | 9,60 |
| Carolina | 10 | 335±6 | 72±13 | 8,89 | 1,10 | 88,90 | 11,10 |
| Arrocillo | 10 | 6±3 | 1100±33 | 0,06 | 9,94 | 0,60 | 99,40 |

GE: Granos enteros.

GP: Granos partidos.

Fuente: Propia.

Cuadro 5. Ganancia en peso de agua en sustratos de arroz.

| Sustrato | Peso Seco (g) | % | Peso Hidratado (g) | % | Peso esterilizado (g) | % |
|-----------------|---------------|------------|--------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | Cateto | 3200 | 100 | 4206,08 | 131,44 | 4185,28 |
| Estaquilla | 3200 | 100 | 3995,84 | 124,87 | 3978,24 | 124,32 |
| Carolina | 3200 | 100 | 3937,92 | 123,06 | 3915,84 | 122,37 |
| Arrocillo | 3200 | 100 | 4479,36 | 139,98 | 4457,28 | 139,29 |
| Promedio | 3200 | 100 | 4154,80 | 129,83 | 4134,16 | 129,19 |

Fuente: Propia.

Los resultados indican que el sustrato estaquilla tuvo mayor número de granos enteros y por ende menor número de granos partidos, seguido de carolina y cateto respectivamente, y por el contrario el sustrato arrocillo presento casi en su totalidad

granos partidos (99,40%), repercutiendo en los costos de adquisición y producción que se ve más adelante.

Por otra parte la ganancia de peso en sustratos de arroz en el proceso de preparación (hidratación y esterilizado), donde el cultivo está listo para inoculación del hongo, manifestó superioridad el sustrato arrocillo en 39,29%, seguido de los sustratos cateto, estaquilla y carolina con 30,79%; 24,32% y 22,37%, traducido en peso de agua absorbido por los sustratos de 1257,28; 985,28; 778,24 y 715,84 gramos respectivamente a partir de 3200 gramos de sustrato seco.

Los sustratos presentan heterogeneidad en la absorción de agua, siendo superior en el sustrato arrocillo por la alta capacidad de retención de agua, debido al contacto de sus granos después de su estilado (eliminación de agua excedentaria); asimismo el sustrato cateto demuestra una alta hidrosopicidad en sus granos absorbiendo una considerable cantidad de agua; los sustrato estaquilla y carolina presentan una absorción baja de agua debido a la dureza de sus granos, requiriendo mayor tiempo de hidratación.

A su vez indicar que la pérdida de humedad en el proceso de esterilización en sustratos hidratados, es mínima con un promedio de 0,05%, traducido en peso de agua de 20,64 gramos del peso total hidratado, lo cual indica que las bolsas de polipropileno empleadas, son resistentes a las elevadas temperaturas e impermeables, manteniendo la humedad interna para el desarrollo y preservación en almacenado del hongo.

En este sentido Gutiérrez *et al.* (1995); citado por la Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (1997), señalan que el empleo de sustratos sólidos de arroz en cultivo de hongos a través de la fermentación sólida es una tecnología limpia sin tener un impacto negativo sobre el medio ambiente, por la ventaja de la simplicidad del medio de cultivo, utilización directa, condiciones de esterilidad menos estrictas y por el bajo capital de inversión.

Asimismo, indican que los cultivos sólidos tienen la capacidad de retener agua interviniendo en la constitución de los microorganismos y en la difusión de enzimas, nutrientes y productos a través de la materia sólida. En todo caso el agua libre debe permitir el desarrollo de entomopatógenos (humedad mayor al 50%) sin reducir la porosidad del material ni disminuir el intercambio de gases.

5.2. Desarrollo del hongo en medios de cultivo sintético y natural

El desarrollo de cepas del hongo *B. bassiana* (Figura 20), sobre medios de cultivo sintético Saboraud Dextrosa Agar (SDA) y natural de sustratos de arroz, se manifestó en tiempos de 12 y 25 días respectivamente, desde la inoculación hasta la liberación de conidias, comprobándose la fase saprofitica del entomopatógeno. El desarrollo de las cepas del hongo en SDA se dio en anillos concéntricos y en el sustrato de arroz de forma inundativa, cubriendo los granos.

Por otra parte las cepas del hongo *B. bassiana* presentaron sus características propias sobre los medios de cultivo semisintético y natural en estructura, color y consistencia, a la vez la presencia de agentes contaminantes, detallándose visualmente lo siguiente:

- En SDA la cepa nativa 24, se caracterizó por una consistencia algodonosa, presentando estructuras pronunciadas compactas hacia la parte aérea (Sinemas), llegando a la parte superior de la caja petri, manifestando una coloración cremosa-amarillenta intensa, con bastante esporulación tanto basal como aérea.
- La cepa nativa 13, presento una consistencia algodonosa en su crecimiento inicial, de coloración crema suave, llegando a su fase final a una estructura compacta conidiogénica pulverulenta agrietada, de la misma manera con bastante esporulación de conidias.
- La cepa exótica 9205 también formó una consistencia algodonosa a principio pasando al estado conidiogénico-pulverulento no agrietada, de coloración blanca intensa, con bastante esporulación

- El ciclo de desarrollo de cepas del hongo sobre el sustrato natural de arroz, manifestó similares características desarrolladas en el cultivo sintético de SDA con diferencia en la cepa 24 que no pudo desarrollar las estructuras de sinemas, debido a los movimientos que se dio a las bolsas para la dispersión de conidias.
- La contaminación (Figura 21), en el cultivo matriz de SDA, fue mínima o insignificante, presentándose en un promedio de 5% del total de medios inoculados identificándose la presencia del hongo saprofito *Aspergillus sp.*, de coloración verde intenso, diferenciándose de *Penicillium sp.* que tiene una coloración verde claro vivo, siendo ausente en la presente producción; lo que garantizo la producción masiva de cepas del hongo en sustratos de arroz que no presento contaminación alguna.
- Las cepas del hongo *B. bassiana* en la reproducción masiva en sustrato de arroz, a parte de su coloración natural respectiva, no desarrollo otros como mecanismo de defensa (cambios de coloración amarilla o violeta), indicando la ausencia de contaminantes especialmente bacterias.
- La fase saprofítica de cepas del hongo *B. bassiana* en los medios de cultivo sintético y natural, presentó las siguientes etapas: 1) Germinación de conidias; 2) Inicio de micelio de aspecto algodonoso abundante no muy compacto con sus coloraciones respectivas; 3) Cubrimiento de micelio, de forma abundante y compacta; 4) Conidiogénesis, con formación de conidióforos y conidias del hongo; 5) Liberación de conidias, de aspecto pulverulento.

Los resultados indican que la asepsia en el manejo de laboratorio y en el proceso productivo del hongo fue eficiente, y lo más importante que las cepas madres empleadas en el presente estudio fueron de alta calidad, resaltando su pureza, que garantizó la réplica en nuevos aislados y en la reproducción masiva del hongo en sustratos de arroz.

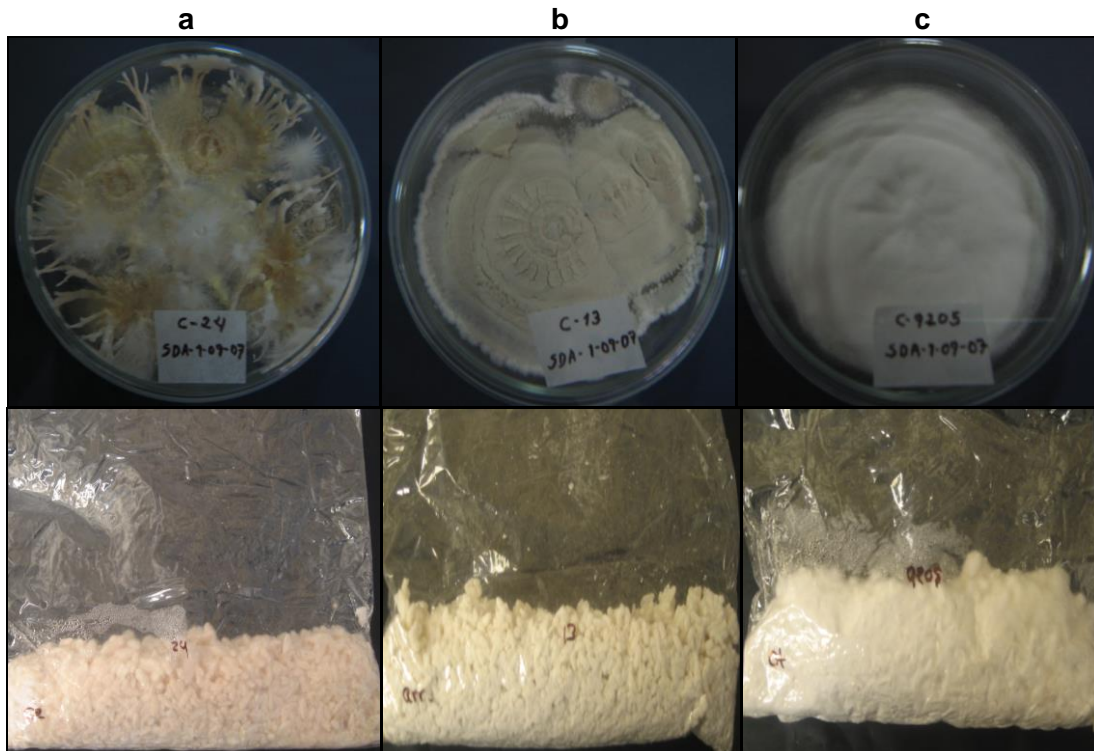


Figura 20. *B. bassiana* en medios de cultivos de SDA y arroz: a) cepa 24; b) cepa 13; c) cepa 9205.



Figura 21. *B. bassiana* contaminada por *Aspergillus* sp.

Flores (2009), confirma el desarrollo de las cepas del hongo (24, 13 y 9205), en los medios de cultivo sintético y natural, con las características citadas; añadiendo la viabilidad de las cepas del hongo con un promedio de germinación de 91,73%, lo cual indica una alta calidad biológica superando el parámetro de comparación de 85%, que es un requisito indispensable para trabajos de investigación.

Por otra parte Narváez *et al.* (1997), señalan que la producción de conidias del hongo depende del medio de cultivo, es decir responden mejor a un sustrato que a otro, debido a los nutrientes que lo conforman; evidenciándose un desarrollo rápido y óptimo en los medios de cultivo sintético respecto al sustrato natural de arroz.

Asimismo Castañares (1993), manifiesta que las características morfológicas y de pigmentación indica la diversidad metabólica en hongos del género *Beauveria* de acuerdo a la procedencia de las mismas, evidenciando estas diferencias marcadas en las tres cepas estudiadas.

Con respecto a contaminantes saprofitos en la reproducción del entomopatógeno CENICAFE (1995), manifiesta que los cultivos pueden desarrollar coloraciones amarillas o violetas debido al metabolismo del hongo, inhibiendo el desarrollo de contaminantes, sin confundir con el crecimiento de hongos contaminantes. Asimismo indica que los contaminantes más comunes son los hongos saprofitos *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.*, produciendo coloraciones verdes y negras respectivamente.

BROCARIL (2002), confirma la fase saprofítica del hongo, en los medios de cultivo empleados, con cinco etapas de desarrollo en los medios de cultivos empleados con características propias de desarrollo, descartando la fase patogénica donde actúan un complejo de enzimas y acción metabólica tóxica que provocan desajustes fisiológicos en insectos plaga. Esto indica que el hongo pertenece a la clase más avanzada causando patogenicidad y sobreviviendo en forma saprofítica en condiciones adversas.

5.3. Determinación de la concentración de unidades infectivas del hongo

La concentración de conidias en cepas de *B. bassiana*, en sustratos de arroz, obtenido en volumen (conidias/mililitro) y unidad de peso (conidias/gramo), a los 18 y 25 días, manifestó bastante conidiación (Figura22). La dilución obtenida en la formulación (hongo + agua destilada) en los tratamientos en la fase de conteo de conidias del hongo

fue de 10^3 y 10^4 a los 18 y 25 días de maduración respectivamente, dando a entender que las cepas del hongo tienen mayor esporulación en un tiempo mayor de maduración. Las lecturas realizadas en la Cámara de Neubauer (Figura 23), con la fórmula respectiva, determino la tasa de concentración de conidias del entomopatógeno, presento heterogeneidad (Cuadros 6 y 7).

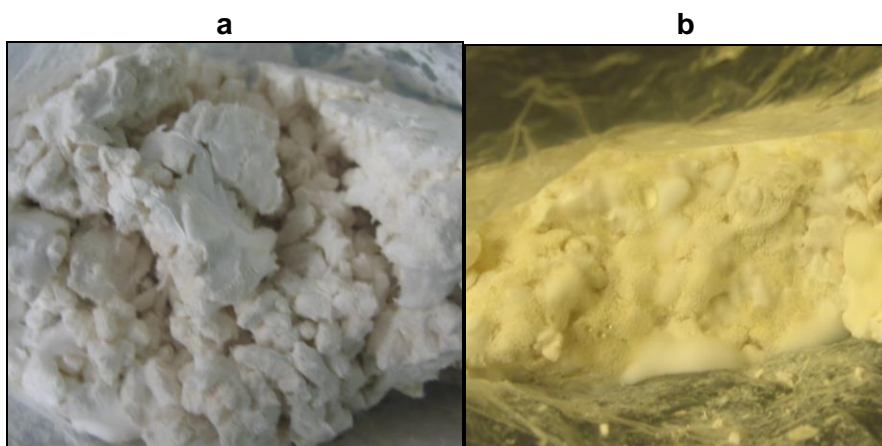


Figura 22. Conidiación del hongo en arroz: a) Cepa 9205; b) Cepa 13.

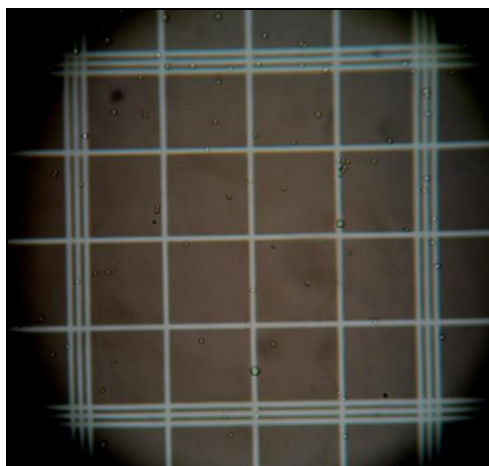


Figura 23. Conidias de *B. bassiana* en retículo de conteo.

Los resultados de concentración de conidias a los 18 días de maduración, manifestó superioridad el tratamiento a_1b_3 (arroz cateto x cepa 9205), en base a un peso promedio de $97,86 \pm 6.35$ gramos, obteniéndose $5,93 \cdot 10^8 \pm 0,74 \cdot 10^8$ conidias/mililitro lo que equivale a $1,23 \cdot 10^9 \pm 0,57 \cdot 10^9$ conidias/gramo, y la conidiación mínima en el tratamiento

a₂b₃ (estaquilla x cepa 9205), en peso de 96,19±5,55 gramos, con 1,10*10⁸±0,34*10⁸ conidias/mililitro, equivalente a 2,29*10⁸±0,61*10⁸ conidias/gramo respectivamente.

Por otra parte la concentración de conidias a los 25 días de maduración, manifestó una esporulación definitiva de las cepas del hongo, con un aumento significativo de unidades infectivas en los tratamientos. La esporulación más baja se manifestó en el tratamiento a₂b₂ (Estaquilla x cepa 13), en un peso de 97,40±0,36 gramos, obteniéndose 2,54*10⁸±0,85*10⁸ conidias/mililitro equivalente a 5,23*10⁸±1,73*10⁸ conidias/gramo, y la más alta ocurrió en el tratamiento a₁b₃ (cateto x cepa 9205) en peso de 100,52±3,29 gramos, con 2,81*10⁹±0,34*10⁹ conidias/mililitro, equivalente a 2,03*10⁹±0,33*10⁹ conidias/gramo, respectivamente.

Cuadro 6. Concentración de conidias de *B. bassiana*, a los 18 días de maduración.

| A x B | a ₁ Cateto | a ₂ Estaquilla | a ₃ Carolina | a ₄ Arrocillo |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b₁ Cepa 24 | *99,93±4,48 **2,83*10 ⁸ ±0,13*10 ⁸ ***5,66*10 ⁸ ±0,22*10 ⁸ | 97,52±5,99 1,99*10 ⁸ ±0,54*10 ⁸ 4,05*10 ⁸ ±0,93*10 ⁸ | 97,93±6,49 3,00*10 ⁸ ±0,78*10 ⁸ 7,20*10 ⁸ ±1,67*10 ⁸ | 92,10±4,96 1,52*10 ⁸ ±0,45*10 ⁸ 3,27*10 ⁸ ±0,78*10 ⁸ |
| b₂ Cepa 13 | 101,29±4,59 5,51*10 ⁸ ±0,45*10 ⁸ 1,11*10 ⁹ ±0,82*10 ⁹ | 104,23±5,45 1,72*10 ⁸ ±0,66*10 ⁸ 3,32*10 ⁸ ±1,30*10 ⁸ | 97,26±5,77 2,30*10 ⁸ ±1,01*10 ⁸ 4,70*10 ⁸ ±2,07*10 ⁸ | 98,35±8,75 2,31*10 ⁸ ±0,38*10 ⁸ 4,76*10 ⁸ ±1,09*10 ⁸ |
| b₃ Cepa 9205 | 97,86±6,35 5,93*10 ⁸ ±0,74*10 ⁸ 1,23*10 ⁹ ±0,57*10 ⁹ | 96,19±5,55 1,10*10 ⁸ ±0,34*10 ⁸ 2,29*10 ⁸ ±0,61*10 ⁸ | 98,87±3,82 1,60*10 ⁸ ±0,48*10 ⁸ 3,20*10 ⁸ ±0,91*10 ⁸ | 95,82±5,49 2,15*10 ⁸ ±0,66*10 ⁸ 4,48*10 ⁸ ±1,26*10 ⁸ |

*Peso cantidad del hongo en bolsa (formulación): gramos.

**Por unidad de volumen: conidias/mililitro.

***Por unidad de peso: conidias/gramo.

Fuente: Propia.

Cuadro 7. Concentración de conidias del hongo a los 25 días de maduración.

| A x B | a ₁ Cateto | a ₂ Estaquilla | a ₃ Carolina | a ₄ Arrocillo |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b₁ Cepa 24 | *97,50±7,05 **3,38*10 ⁸ ±0,35*10 ⁸ ***6,98*10 ⁸ ±0,96*10 ⁸ | 101,06±1,49 3,30*10 ⁸ ±1,28*10 ⁸ 6,48*10 ⁸ ±2,56*10 ⁸ | 100,95±5,88 7,48*10 ⁸ ±1,61*10 ⁸ 1,47*10 ⁹ ±0,23*10 ⁹ | 92,77±6,64 3,24*10 ⁸ ±1,28*10 ⁸ 7,02*10 ⁸ ±2,87*10 ⁸ |
| b₂ Cepa 13 | 97,03±1,97 7,22*10 ⁸ ±0,45*10 ⁸ 1,48*10 ⁹ ±0,61*10 ⁹ | 97,40±0,36 2,54*10 ⁸ ±0,85*10 ⁸ 5,23*10 ⁸ ±1,73*10 ⁸ | 97,91±5,74 6,67*10 ⁸ ±4,62*10 ⁸ 1,36*10 ⁹ ±0,93*10 ⁹ | 89,37±2,73 4,36*10 ⁸ ±0,42*10 ⁸ 9,80*10 ⁸ ±1,25*10 ⁸ |
| b₃ Cepa 9205 | 100,52±3,29 2,81*10 ⁹ ±0,34*10 ⁹ 2,03*10 ⁹ ±0,33*10 ⁹ | 95,21±4,27 2,94*10 ⁸ ±0,38*10 ⁸ 6,21*10 ⁸ ±0,99*10 ⁸ | 101,80±6,41 4,39*10 ⁸ ±3,48*10 ⁸ 8,36*10 ⁸ ±2,70*10 ⁸ | 90,46±1,89 4,24*10 ⁸ ±0,41*10 ⁸ 9,39*10 ⁸ ±0,93*10 ⁸ |

Fuente: Propia.

De manera general los resultados a los 25 días, indican la concentración heterogénea de conidiación, siendo los mejores tratamientos de relación sustrato/conidiación a_1b_3 (cateto x cepa 9205), a_1b_2 (cateto x cepa 13), a_3b_1 (carolina x cepa 24) y a_3b_2 (carolina x cepa 13); la concentración media se presenta en el sustrato arrocillo con las tres cepas, a la vez a_3b_3 (carolina x cepa 9205) y a_1b_1 (cateto x cepa 24); los de concentración baja se presenta en el sustrato estaquilla con las 3 cepas, suponiendo que influyo la dureza del grano (baja hidratación) y el poco polvillo que presento (arroz limpio).

Estos resultados indican que los sustratos de arroz son un factor importante en la conidiación de esporas del hongo *B. bassiana*, influyendo a su vez otros factores, como la metodología de trabajo, tecnología y las condiciones ambientales.

CENICAFE (1995), indica que la cepa 9205 en Colombia, desarrollada a una temperatura de 27 ± 2 °C en botellas con 50 gramos de arroz a 20 días de incubación, manifestó una esporulación de $3,87*10^{11}\pm 0,44*10^{11}$ conidias/mililitro equivalente a $7,74*10^9$ conidias/gramo, siendo 74 veces más alta que la concentración obtenida en el tratamiento a_1b_3 , (cepa 9205 en sustrato cateto), producida en bolsa de polipropileno a una temperatura de 23,88 °C.

Esto confirma la influencia que ejerce la temperatura y la metodología de producción, acelerando o retardando la maduración y la esporulación de unidades infectivas del hongo, ya que en nuestro caso se obtuvo una conidiación tope en un tiempo de 25 días con relación a los 20 días de CENICAFE-Colombia.

5.4. Análisis de varianza de concentración de conidias

El análisis de varianza (Cuadro 8), demuestra que el factor A (sustratos) es significativo respecto al factor B (cepas del hongo), a su vez estos factores interactúan (A x B) o sea son dependientes, no correspondiendo el análisis por separado. La interacción señala las diferencias de conidiación de cepas del hongo (24, 13 y 9205) sobre los diferentes sustratos de arroz (cateto, estaquilla, carolina y arrocillo).

Cuadro 8. Análisis de Varianza de la esporulación de cepas del hongo.

| FV | GL | SC | CM | Fc | Ft (0.05) |
|--------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------|------------------|
| A | 3 | 4,66*10 ¹⁸ | 1,55*10 ¹⁸ | 11,53 | 2,87 * |
| B | 2 | 5,07*10 ¹⁷ | 2,53*10 ¹⁷ | 1,88 | 3,23 NS |
| A x B | 6 | 4,23*10 ¹⁸ | 7,05*10 ¹⁷ | 5,24 | 2,37 * |
| Error | 36 | 4,85*10 ¹⁸ | 1,35*10 ¹⁷ | | |
| Total | 47 | | | | |

Coeficiente de Variación: 35.82%.

Fuente: Propia.

5.4.1. Análisis de efectos simples de la interacción (A x B)

La interacción A x B, se analizó independientemente a partir de un factor en los niveles del otro factor mediante análisis de varianzas, en base a una tabla de doble entrada de promedios de esporulación de conidias (Cuadro 9), de los diferentes tratamientos, graficándose para ambos factores el comportamiento de esporulación de conidias para su interpretación, sustentando al final con la prueba de rango múltiple Duncan, bajo una probabilidad de error de 0,05%.

Cuadro 9. Combinación de factores con promedios de conidiación (c/g).

| A x B | a₁ | a₂ | a₃ | a₄ | Promedio |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| b₁ | 6,98*10 ⁸ | 6,48*10 ⁸ | 1,47*10 ⁹ | 7,02*10 ⁸ | 8,79*10 ⁸ |
| b₂ | 1,48*10 ⁹ | 5,23*10 ⁸ | 1,36*10 ⁹ | 9,80*10 ⁸ | 1,09*10 ⁹ |
| b₃ | 2,03*10 ⁹ | 6,21*10 ⁸ | 8,36*10 ⁸ | 9,39*10 ⁸ | 1,11*10 ⁹ |
| Promedio | 1,40*10 ⁹ | 5,98*10 ⁸ | 1,22*10 ⁹ | 8,74*10 ⁸ | 1,02*10 ⁹ |

Fuente: Propia.

5.4.1.1. Análisis de varianza de efectos simples de los factores A x B.

El análisis de varianza del factor B en los niveles del factor A (Cuadro 10), nos muestra estadísticamente diferencias significativas para los niveles a₁ y a₂ (sustrato cateto y estaquilla), influyendo heterogéneamente sobre la conidiación de esporas. En cambio en los niveles a₃ y a₄ (sustrato carolina y arrocillo) es no significativo, manifestando estadísticamente igualdad, con poca variación en cuanto a la conidiación de unidades infectivas en dichos niveles.

Cuadro 10. Análisis de Varianza de efectos simples del factor B en los niveles de A.

| FV | GL | SC | CM | Fc | Ft (0.05) |
|-------------------------|----|-----------------------|-----------------------|-------|-----------|
| B(a₁) | 2 | 3.46*10 ¹⁸ | 1.73*10 ¹⁸ | 12.91 | 3.27* |
| B(a₂) | 2 | 3.46*10 ¹⁸ | 1.73*10 ¹⁸ | 12.91 | 3.27* |
| B(a₃) | 2 | 7.96*10 ¹⁷ | 3.98*10 ¹⁷ | 2.97 | 3.27 NS |
| B(a₄) | 2 | 1.63*10 ¹⁷ | 8.15*10 ¹⁶ | 0.61 | 3.27 NS |
| Error | 36 | 4.85*10 ¹⁸ | 1.35*10 ¹⁷ | | |

Fuente: Propia.

Cuadro 11. Comparación de conidiación de *B. bassiana* sobre sustratos de arroz.

| Tipos de arroz | a ₁ Cateto | a ₃ Carolina | a ₄ Arrocillo | a ₂ Estaquilla |
|------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Promedios | 1.40*10 ⁹ | 1.22*10 ⁹ | 8.47*10 ⁸ | 5.98*10 ⁸ |

Duncan P ≤ 0.05.

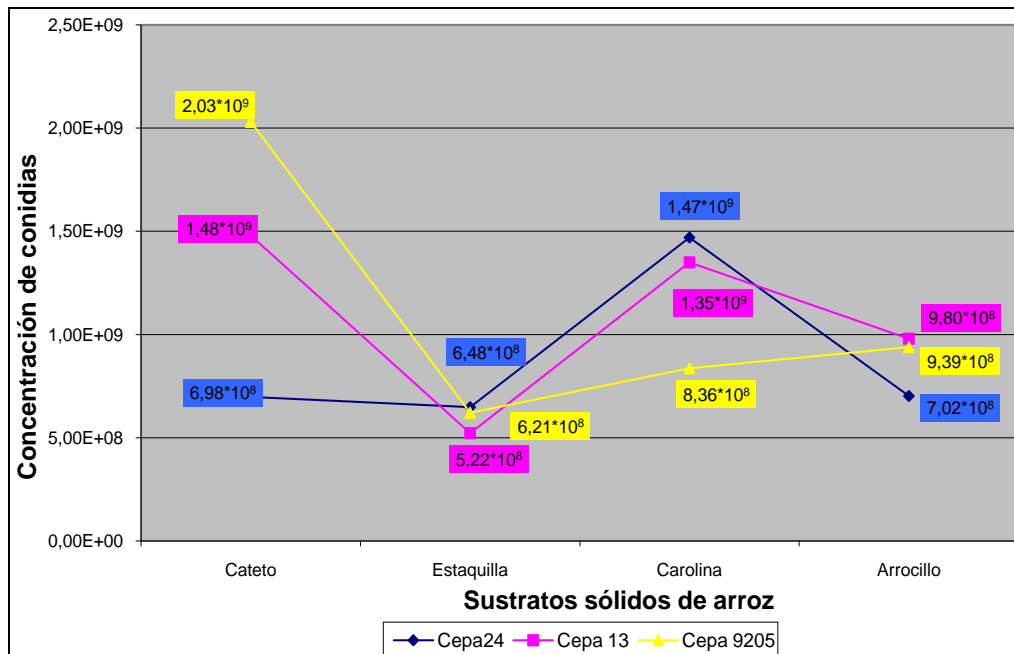


Figura 24. Esporulaci3n de conidias de cepas del hongo sobre sustratos de arroz.

Con el análisis de efectos simples del factor B en los niveles del factor A, en base al ANVA de efectos simples, (Cuadro 10), la grafica de la figura 24 y la prueba de rango múltiple Duncan (Cuadro 11), se tiene la siguiente interpretaci3n:

- La esporulación de *B. bassiana* especialmente en las cepas 13 y 9205, en los sustratos cateto y estaquilla (ANVA, significativo) tienen conidiación diferenciada, superior en el primer caso respecto al segundo. Se muestra a su vez la conidiación casi homogénea (no significativo) de cepas del hongo en los sustratos carolina y arrocillo, con una mínima superioridad de la cepas 24 y 13 en el sustrato carolina.
- Analizando el comportamiento de las cepas del hongo sobre sustrato de arroz, la cepa exótica 9205 sobre cateto tiene la mayor esporulación de todos los tratamientos, presentando mínima esporulación en estaquilla conjuntamente las otras cepas, con menor esporulación en carolina y similar e intermedia en el sustrato arrocillo con relación a las otras cepas.
- La esporulación de la cepa nativa 13 demuestra una superioridad mínima en el sustrato cateto con relación al sustrato carolina, presentando una esporulación media en arrocillo e inferior en el sustrato estaquilla. Es la cepa que mejor se adapta a los sustratos cateto, carolina y arrocillo y similar con las otras cepas en estaquilla con esporulación baja.
- La cepa nativa 24 tiene un comportamiento de esporulación elevada en el sustrato carolina y muestra una similitud con poca variación de conidiación en los sustratos cateto, estaquilla y arrocillo respectivamente.
- La prueba de comparación Duncan, indica estadísticamente la esporulación de conidias de cepas del hongo *B. bassiana* sobre sustratos de arroz, siendo los mejores en el desarrollo y esporulación de conidias los sustratos cateto y carolina seguido de arrocillo y estaquilla respectivamente.

El análisis de varianza de efectos simples del factor A en los niveles del factor B (Cuadro 12), demuestra estadísticamente diferencias significativas para los niveles b_1 , b_2 y b_3 respectivamente lo cual indica heterogeneidad de las cepas del hongo *B. bassiana* en esporulación de conidias sobre los sustratos de arroz.

Cuadro 12. Análisis de Varianza de efectos simples del factor A en niveles de B.

| FV | GL | SC | CM | Fc | Ft (0.05) |
|--------------------|----|-----------------------|-----------------------|-------|-----------|
| A(b ₁) | 3 | 1.82*10 ¹⁸ | 6.07*10 ¹⁷ | 4.49 | 2.87 * |
| A(b ₂) | 3 | 2.17*10 ¹⁸ | 7.23*10 ¹⁷ | 5.36 | 2.87 * |
| A(b ₃) | 3 | 4.81*10 ¹⁸ | 1.60*10 ¹⁸ | 11.85 | 2.87 * |
| Error | 36 | 4.85*10 ¹⁸ | 1.35*10 ¹⁷ | | |

Fuente: Propia.

Cuadro 13. Comparación de conidiación de cepas de *B. bassiana*.

| Cepas de <i>B. bassiana</i> | b ₃ Cepa 9205 | b ₂ Cepa 13 | b ₁ Cepa 24 |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Promedios | 1,11*10 ⁹ | 1,08*10 ⁹ | 8,79*10 ⁸ |

Duncan P ≤ 0.05.

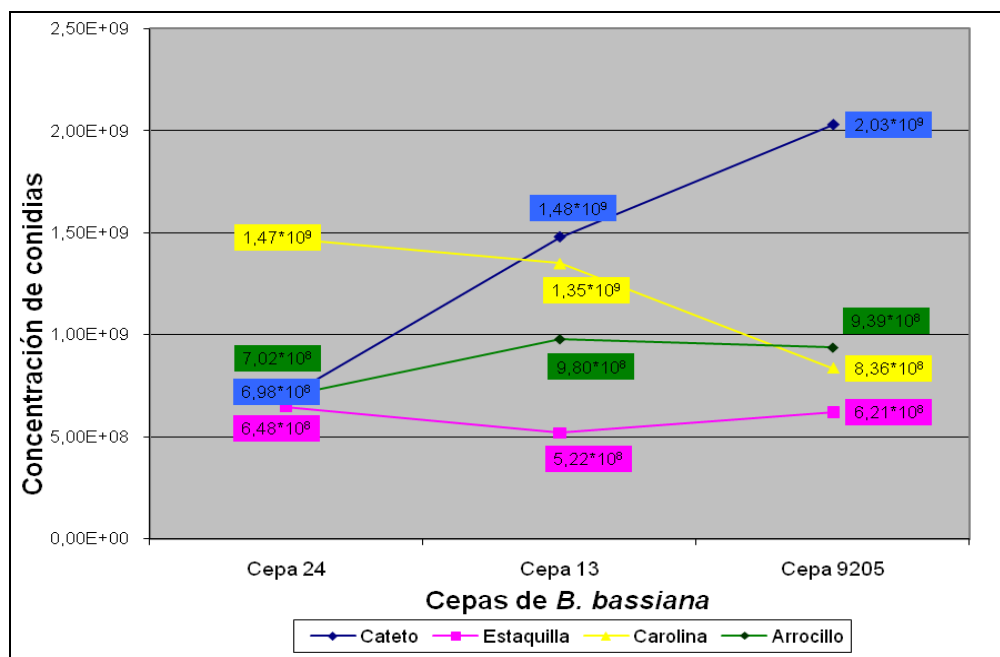


Figura 25. Influencia de sustratos de arroz en conidiación de cepas de *B. bassiana*.

El análisis de efectos simples del factor A en los niveles del factor B, en base al ANVA, la grafica (Figura 25) y la prueba Duncan, se llega a la siguiente interpretación:

- El comportamiento de los sustratos de arroz respecto a la conidiación de cepas del hongo, es significativo teniendo un comportamiento heterogéneo de desarrollo y formación de conidias aéreas.

- En la grafica manifiesta superioridad de conidiación el sustrato *cateto* con la cepa 9205, con el mismo comportamiento con la cepa 13 (similar al arroz carolina con la cepa 24 y 13), con baja conidiación con la cepa 24 (similar a estaquilla y arrocillo).
- El sustrato *carolina* tiene un comportamiento favorable de conidiación con la cepa 24 y 13, casi similares con el sustrato *cateto* en la cepa 13, siendo inferior con la cepa 9205 (similar a arrocillo y estaquilla).
- El sustrato *arrocillo*, tiene una homogeneidad de conidiación con la cepa 13 y 9205, con una leve inferioridad con la cepa 24. Es el sustrato con mayor uniformidad con relación a los demás sustratos.
- El sustrato *estaquilla* presenta una homogeneidad de esporulación con las tres cepas, siendo la más baja con relación a los otros sustratos.
- La prueba Duncan, manifiesta que las cepas estadísticamente son similares, respecto al potencial de esporulación de conidias sobre sustratos de arroz, con variación poco significativa.

Relacionando los análisis expuestos se llega a uno global siguiente:

- Existe dependencia entre los factores sustratos de arroz y cepas de *B. bassiana*, con conidiación heterogénea de unidades infectivas (conidias).
- Las graficas muestran la conidiación en unidad de peso (conidias/gramo), manifestando superioridad la cepa 9205 en sustrato *cateto*, la cepa 13 en sustrato *cateto*, la cepa 24 en sustrato *carolina*, manifestando superioridad el primero en 27 veces respecto al segundo y tercero y 34 veces con respecto al cuarto.
- Los valores regulares de conidiación se presentan en la cepa 24 en sustrato *cateto* y cepa 9205 en sustrato *carolina*, siendo inferior en 65 y 41 veces respecto al mejor

tratamiento. De la misma manera las cepas 13, 9205 y 24 en sustrato arrocillo, manifiestan una inferioridad en el orden de 52, 54 y 65 veces con relación a la mejor esporulación.

- Los valores mínimos de esporulación con las cepas 24, 9205 y 13, se presentaron en el sustrato estaquilla, manifestando una inferioridad respecto al mejor valor de esporulación (cepa 9205 en sustrato cateto) de 68, 69 y 74 veces respectivamente.
- El análisis de comparación estadística respecto a la esporulación de conidias, en sustratos resultaron ser los mejores los sustratos cateto y carolina seguido de arrocillo; en lo referente a cepas del hongo *B. bassiana*, resultaron ser similares con un alto potencial esporulativo de conidias.

Se sustenta con Humphreys y coautores (1989); SARH (1994); citado por Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, (1997), señalando que las conidias aéreas de entomopatógenos se obtienen masivamente en cultivos de sustrato sólido, generalmente granos precosidos, presentando gran dificultad de obtener productos de calidad homogénea.

A su vez la Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, (1997), señala que las condiciones ambientales y otros factores influyen en la morfogénesis de los hongos como: la temperatura, pH, naturaleza de fuentes de carbono y nitrógeno, relación carbono/nitrógeno, actividad del agua, concentraciones de oxígeno y bióxido de carbono (intercambio gaseoso), condiciones de iluminación y concentración de ciertos iones (calcio, magnesio y fosfato entre otros).

Asimismo Alves (1986), indica que los entomopatógenos presentan una variabilidad genética recurrente de heterocariosis que resulta con diferentes grados de patogenicidad, virulencia, especificidad, producción de conidias y resistencia a factores abióticas.

5.5. Costos parciales de producción a nivel de laboratorio comunal

Los estimativos se hicieron basados en precios del mes de abril del 2010. Para el cálculo de mano de obra se estimó una producción de 100 bolsas del hongo (200 gramos/bolsa) por jornal, también se calculó la energía que se requiere (gas licuado) en el hidratado y esterilizado del arroz, descartando el costo de la energía eléctrica y el costo del agua, el primero por la ausencia del servicio en varias comunidades y el segundo por usos y costumbres (Derechos de agua y Ley de aguas).

El cuadro 14 muestra los costos de producción por bolsa de *B. bassiana* en base a los insumos necesarios que se emplean en la producción directa (Costos variables), descartando los equipos, materiales y ambiente (Costos fijos). Asimismo el cuadro 15 muestra los costos de producción del hongo a partir de la relación peso estándar de sustrato/número de bolsas obtenidas.

Cuadro 14. Costos de producción del hongo en sustratos.

| Sustrato de arroz | Costo Unitario (Bs/bolsa de 200 g) |
|-------------------|---------------------------------------|
| Cateto | 4,36 |
| Estaquilla | 4,85 |
| Carolina | 4,46 |
| Arrocillo | 3,92 |

Fuente: Propia.

Cuadro 15. Costo de producción del hongo en relación sustrato/bolsas obtenidas.

| Sustrato | Costo de compra (Bs/qq) | C. Unitario (Bs/bolsa de 200 g) | Obtención (bolsas de 200 g/qq) | Costo de producción (Bs/qq) |
|------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Cateto | 220 | 4,36 | 301 | 1312,36 |
| Estaquilla | 340 | 4,85 | 286 | 1387,10 |
| Carolina | 230 | 4,46 | 282 | 1257,72 |
| Arrocillo | 95 | 3,92 | 320 | 1254,40 |

Fuente: Propia.

Los resultados señalan variabilidad de costos por unidad de bolsa de *B. bassiana*, siendo el más económico en el arrocillo con 3,92 Bs/bolsa con relación a los otros sustratos, manifestando mayor costo el sustrato estaquilla con 4,85 Bs/bolsa. En los

costos de producción en relación del peso estándar de sustrato (1 qq), por el número de bolsas obtenidas hay una similitud en el arroz carolina y arrocillo con diferencia mínima (1257,72 y 1254,40 Bs), manifestando mayor costo el sustrato estaquilla. Respecto al número de bolsas obtenidas el sustrato arrocillo (320 bolsas) tiene ventaja en relación a los sustratos carolina, estaquilla y cateto con 38, 34 y 19 bolsas respectivamente.

Relacionando los costos de producción con la esporulación de conidias del hongo, rescatar las cepas 9205 y 13 en sustrato cateto, la cepa 24 y 13 en sustrato carolina, las tres cepas en el sustrato arrocillo, y descartar a estaquilla por el costo alto y la baja esporulación de cepas. Esto indica que los sustratos para la producción de cepas promisorias de *B. bassiana*, deben tener alta calidad en granos para la respectiva esporulación y bajos costos de producción.

De manera general los sustratos cateto y carolina son los mejores en la producción de *B. bassiana*, por su costo y alta conidiación, debiéndose mejorar la hidratación (> a 45 minutos) para una mayor absorción de agua y eficiencia en esporulación. Asimismo el sustrato arrocillo por su alta hidratación (obtención de mas bolsas), esporulación aceptable y su bajo costo productivo, compensa la esporulación de conidias del hongo.

En este sentido Feng *et al.* (1994); citado por la Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, (1997), señalan tres requerimientos para la producción exitosa de entomopatógenos: 1) hongos con alta patogenicidad y virulencia, 2) formulación del hongo sin pérdida de viabilidad e infectiva, 3) costos de producción mínimos lográndose en medios que sean simples en composición, barato, disponible en cantidades suficientes y un procedimiento de producción fácil y con un mínimo de labor.

A la vez Fernández (2007), señala que los métodos de producción tienen ventajas y desventajas, por lo que la decisión depende de varios factores, entre los cuales, la calidad del producto final, la factibilidad tecnológica y económica son los más importantes.

6. CONCLUSIONES

1. Los sustratos de arroz empleados en la producción de hongo *B. bassiana*, presentaron características propias en la calidad de sus granos (enteros y partidos), manifestando mejor calidad el sustrato estaquilla, seguido de carolina, cateto y arrocillo, con granos enteros de 90,40%; 88,90%; 83,60% y 0,60%; granos partidos de 9,60%; 11,10%; 16,20% y 99,40% respectivamente.
2. En el proceso de preparación, los sustratos de arroz, después de la hidratación y esterilización, presentaron heterogeneidad en la absorción de agua, con ganancia en peso, mostrando superioridad el sustrato arrocillo en 39,29%, respecto a cateto, estaquilla y carolina con 30,79%; 24,32% y 22,37% respectivamente.
3. El desarrollo de cepas del hongo *B. bassiana* en medios de cultivo semisintético (Saboraud Dextrosa Agar) y natural (Arroz), se dio en tiempos de 12 y 25 días respectivamente, en anillos concéntricos y de forma inundativa, caracterizándose por la variabilidad en la formación de estructuras, coloración y consistencia; evidenciando la fase saprofítica del hongo.
4. La concentración de conidias de cepas del hongo en sustratos de arroz, manifestaron una esporulación hasta los 25 días, bajo una temperatura promedio de 23,88 °C, sobresaliendo el tratamiento a_1b_3 (cateto x cepa 9205), con promedio por unidad de peso de $2,03 \cdot 10^9 \pm 0,33 \cdot 10^9$ conidias/gramo, y la mínima se presentó en el tratamiento a_2b_2 (estaquilla x cepa 13), con $5,23 \cdot 10^8 \pm 1,73 \cdot 10^8$ conidias/gramo.
5. Los tratamientos en general presentaron esporulaciones altas, medias y bajas, siendo elevadas en los tratamientos a_1b_3 (cateto x cepa 9205), a_1b_2 (cateto x cepa 13), a_3b_1 (carolina x cepa 24) y a_3b_2 (carolina x cepa 13); la concentración media en a_3b_3 (carolina x cepa 9205), a_1b_1 (cateto x cepa 24) y $a_4b_1b_2b_3$ (arrocillo x cepas 24, 9205 y 13); y los de concentración baja se presentaron en $a_2b_1b_2b_3$ (estaquilla x cepas 24, 9205 y 13).

6. Estadísticamente se determinó la dependencia entre los factores sustratos de arroz y cepas de *B. bassiana*, de forma heterogénea en la esporulación de conidias. El análisis de comparación determinó que los mejores sustratos son cateto y carolina seguido de arrocillo; las cepas del hongo *B. bassiana*, se comportan de manera similar con un alto potencial esporulativo.

7. Los costos unitarios de producción del hongo por unidad de bolsa de peso aproximado de 200 gramos a nivel de laboratorio comunal, fue variable, con precios de 3,92; 4,36; 4,46 y 4,85 Bolivianos/bolsa en sustrato arrocillo, cateto, carolina y estaquilla, y los costos a partir de un peso estándar (1 qq), fue de 1254,40; 1312,36; 1257,72; y 1387,10 Bs/qq, con la obtención de bolsas/qq de 320, 301, 282 y 286 respectivamente.

8. En el presente estudio de manera general los sustratos cateto y carolina son los mejores en la producción de *B. bassiana*, por su costo y alta conidiación. Asimismo el sustrato arrocillo por su alta hidratación (obtención de mas bolsas), esporulación aceptable y su bajo costo productivo, compensa la esporulación de conidias del hongo, debiendo realizar en un futuro inmediato estudios en sustratos de arrocillo y carolina.

7. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la esporulación de conidias de *B. bassiana*, a nivel de laboratorio central, en base a metodologías de producción y condiciones ambientales, tomando en cuenta los factores de temperaturas, pH, actividad del agua, iluminación, intercambio gaseoso, relación carbono/nitrógeno, calidad de sustratos (Arroz de primera, segunda y tercera de una misma variedad), costos de producción, obtención de bolsas.
2. Estudiar la reproducción del hongo mediante el empleo de modelos de optimización que permitan lograr de manera rápida resultados, con el ajuste de parámetros como la temperatura, concentración de inóculo, tamaño de partículas en sustratos, tiempo total del proceso y demanda de oxígeno, tanto en formas de producción sólida como líquida.
3. Evaluar en condiciones campo la efectividad de *B. bassiana*, sobre la broca de café y otras plagas, determinando la patogenicidad a través de la aplicación de dosis eficientes de control, en base a equipos y costos de aplicación según distintas densidades de siembra. Actualmente se aplica una bolsa de hongo de 200 gramos, a ¼ hectárea (Cato) en el control de la broca del café con infestación promedio de 35% en los Yungas de La Paz.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ALVES, S. B. 1986. Controle microbiano de insectos fungos entomopatogenicos. Sao Paulo, Brasil. Editora Manole. p. 73 – 75
2. ANTIA, O. P.; POSADA, F. J.; BUSTILLO, A. E.; GONZALES, M. T. 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. CENICAFE. N° 182: 1 – 12.
3. ALEAN, C., I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia. P.101.
4. BROCARIL. 2002. Alternativa biológica para el control de la broca del café. Cali, (Colombia). LAVERLAM. División Agrícola. 4 p.
5. BUSTILLO, P., A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. P. 30-53
6. BUSTILLO, P., A. E. 2002. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. Programa de Investigación Científica CENICAFE (Colombia). N° 24: 1- 40
7. BUSTILLO, P., A. E.; CARDENAS M., R.; VILLALBA G., D.A.; BENAVIDEZ M., P.; OROZCO H., J.; POSADA F., F. J. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, CENICAFE. P. 134

8. CASTAÑARES, A., C. 1993. Estudio de la patogenicidad y virulencia de cepas del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*, Universidad Técnica de Oruro, Facultad de ciencias Agrícolas y Pecuarias. Tesis: Ingeniera Agrónoma (Bolivia). P. 118.
9. CARBALLO, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Rev. Manejo Integrado de Plagas. 47:1-4.
10. CARBALLO, M.; FALGUNI, G. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Primera edición. Managua: CATIE, (Serie técnica, Manual técnico/CATIE; N° 53). 232 p.
11. CALZADA, J. 1982. Métodos estadísticos para la investigación. Lima (Perú) Ed. Universidad Agraria La Molina. 874 p
12. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DEL CAFÉ 1995. Avances técnicos. Números: 114 al 184. Tomo II. Chinchiná, Caldas, Colombia. 243 – 254 p.
13. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DEL CAFÉ, CENICAFE (COLOMBIA). 1996. Práctica sobre el control de calidad a formulaciones de hongos entomopatógenos In: Seminario Internacional sobre Caficultura sostenible. “Manejo integrado de la broca del café “MIB. Chinchiná, Caldas. Abril 17-19: 33
14. CRUZ, CH. , D. 2001. Apuntes de fitopatología. Universidad Mayor de San Andrés UMSA. La Paz, Bolivia. 13 – 26 p.
15. CORDERO, A., J. D. 1999. Selección de cepas del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) en laboratorio para el control de la broca del café, en diferentes pisos ecológicos de los yungas de La Paz, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía .Tesis de Grado (Bolivia). P. 83

16. DELGADO, H., M. 2008. Hongos entomopatógenos para la bioregulación de población de insectos plagas y nematodos. ORIUS BIOTECNOLOGIA. Villavicencio. Colombia. P. 6.
17. FERNANDEZ, L., O. 2007. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad. Laboratorio de hongos entomopatógenos INISAV. Ciudad de La Habana Cuba. 10 p.
18. FLORES, CH., C. R. 2009. Evaluación de patogenicidad de cepas promisorias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en laboratorio. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. Tesis de Grado. La Paz – Bolivia. P. 62.
19. FRAGAS, I.; FLEITAS, G.; HIDALGO, L. 2007. Formulación de hongos entomopatógenos como control biológico. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de Las Lajas, La Habana, Cuba. P. 12.
20. GARZA, G. E.; BERLANGA, P. A.; HERNANDEZ, V., V. M. 1994. Guía técnica: producción de hongos entomopatógenos. Tecoman, México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos SARH. 32 p.
21. GIRALDO, J. 2007. Uso de entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Universidad del Tolima. Parasitología y Enfermedades Parasitarias. 12 p.
22. GONZALES, G., MT. ; POSADA, F. F.; BUSTILLO, P., A. E. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Revista CENICAFE, (Colombia). 44(3): 93-102.
23. HOLDRIDGE, L. 1987. Ecología basada en zonas de vida. IICA. San José, Costa Rica. 220 p.

24. LÓPEZ, B., C. 2003. Evaluación de la patogenicidad de aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en condiciones de Laboratorio. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. Tesis: Ingeniero Agrónomo. 87 p.
25. LITTLE, T., M.; HILLS, F., J. 1990. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. 2da. Ed. Trillas México D. F. 125 – 143 p.
26. MARIN, P. 1994. Evaluación de diferentes medios de cultivo para determinar la germinación de *Beauveria bassiana* producido en formulaciones comerciales. Informe Anual de Labores disciplina de Entomología. CENICAFE. 26 P.
27. NARVAEZ, M.; GONZALES G., M. T.; BUSTILLO P., A. E.; CHAVES C., B.; MONTOYA R., E. C. 1997. Producción de esporas de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en diferentes sustratos, Revista Colombiana de Entomología 23 (3 – 4): 125 – 132.
28. PEREZ, G., J. 2002. Curso básico de cultivo de tejidos vegetales in Vitro aplicado a la producción agrícola, Escuela Militar de Ingeniería, La Paz (Bolivia). P. 65
29. ROGG, H., W.; TOVAR, N.; QUISBERTH, E.; CABRERA, S. 1997. Guía práctica de producción masiva de *Beauveria bassiana* para el control biológico de insectos plaga en Bolivia. Santa Cruz, Bolivia. Universidad “Gabriel René Moreno”, Instituto de Investigaciones Agrícolas “El Vallecito”. Programa Entomología Agrícola. 33 p.
30. ROJAS, T. 2003. Hongos entomopatógenos: aliados del agricultor. CINIAP HOY No. 2, mayo–agosto 2003. ISSN: 1690-4117. Maracay, Aragua, Venezuela. URL: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n2/texto/trojas.htm.
31. STEEL, D.; TORRIE, J. H. 1988. Bioestadística: principios y procedimientos. Segunda edición. McGraw-Hill/Interamericana, S.A. de C.V. México D.F. 613 p.

32. SOCIEDAD MEXICANA DE CONTROL BIOLÓGICO. 1995. Memorias. VI Curso Nacional de Control Biológico. México Ed. Colegio de la Frontera Sur ECOSUR. 219 p.

33. SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL (2., 1997 MEXICO). 1997. Taller de producción masiva de agentes de control microbiano; taller organizado por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Tecoman. 98 p.

ANEXOS

Anexo 1. Registro de temperaturas promedio en laboratorio.

| Días | Temperatura máxima | Temperatura mínima | Temperatura ambiente |
|--------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| 1 | 26 | 24 | 24 |
| 2 | 26 | 23 | 25 |
| 3 | 26 | 24 | 24 |
| 4 | 27 | 24 | 25 |
| 5 | 27 | 24 | 24 |
| 6 | 27 | 23 | 24 |
| 7 | 25 | 22 | 24 |
| 8 | 25 | 23 | 23 |
| 9 | 25 | 22 | 23 |
| 10 | 26 | 22 | 24 |
| 11 | 26 | 18 | 23 |
| 12 | 26 | 19 | 23 |
| 13 | 27 | 24 | 24 |
| 14 | 25 | 23 | 25 |
| 15 | 25 | 22 | 24 |
| 16 | 25 | 23 | 25 |
| 17 | 26 | 22 | 24 |
| 18 | 26 | 22 | 24 |
| 19 | 26 | 18 | 24 |
| 20 | 26 | 19 | 23 |
| 21 | 26 | 24 | 23 |
| 22 | 26 | 23 | 24 |
| 23 | 27 | 24 | 23 |
| 24 | 27 | 24 | 25 |
| 25 | 26 | 23 | 23 |
| Prom. | 26 | 22,36 | 23,88 |

Fuente: Propia.

Anexo 2. Calidad de sustratos de arroz en relación a granos enteros y partidos.

| Sustrato | Peso (g) | Grano | Número de granos | | | | | Sumatoria | Promedio | D. E. |
|------------|----------|-------|------------------|------|------|------|------|-----------|----------|-------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| Cateto | 10 | GE | 333 | 335 | 341 | 326 | 339 | 1674 | 359 | 6 |
| | | GP | 72 | 57 | 71 | 93 | 66 | 359 | 72 | 13 |
| Estaquilla | 10 | GE | 334 | 342 | 348 | 334 | 357 | 1715 | 343 | 10 |
| | | GP | 68 | 61 | 57 | 70 | 34 | 290 | 58 | 14 |
| Carolina | 10 | GE | 310 | 308 | 321 | 308 | 334 | 1581 | 316 | 11 |
| | | GP | 114 | 123 | 133 | 99 | 100 | 569 | 114 | 18 |
| Arrocillo | 10 | GE | 4 | 12 | 4 | 6 | 8 | 34 | 7 | 3 |
| | | GP | 1110 | 1088 | 1066 | 1152 | 1084 | 5500 | 1100 | 15 |

GE: Granos enteros.

GP: Granos partidos.

D.E.: Desviación Estándar.

Fuente: Propia.

Anexo 3. Peso del hongo a los 18 días de maduración (gramos/bolsa).

| | a₁ b₁ | a₁ b₂ | a₁ b₃ | a₂ b₁ | a₂ b₂ | a₂ b₃ | a₃ b₁ | a₃ b₂ | a₃ b₃ | a₄ b₁ | a₄ b₂ | a₄ b₃ | | |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | Σ | X |
| I | 99,03 | 104,87 | 97,70 | 88,96 | 97,38 | 99,67 | 96,35 | 89,05 | 98,92 | 94,51 | 97,01 | 90,99 | 1154,44 | 96,20 |
| II | 98,75 | 99,03 | 89,05 | 99,08 | 102,35 | 87,98 | 90,84 | 102,59 | 101,53 | 97,93 | 110,86 | 91,75 | 1171,74 | 97,64 |
| III | 106,25 | 95,92 | 101,05 | 99,03 | 109,17 | 97,63 | 98,02 | 98,68 | 93,45 | 87,99 | 94,84 | 97,92 | 1179,95 | 98,33 |
| IV | 95,69 | 105,35 | 103,62 | 102,99 | 108,01 | 99,47 | 106,52 | 98,73 | 101,56 | 87,96 | 90,68 | 102,61 | 1203,19 | 100,27 |
| Σ | 399,72 | 405,17 | 391,42 | 390,06 | 416,91 | 384,75 | 391,73 | 389,05 | 395,46 | 368,39 | 393,39 | 383,27 | 4709,32 | 392,44 |
| X | 99,93 | 101,29 | 97,85 | 97,51 | 104,23 | 96,19 | 97,93 | 97,26 | 98,87 | 92,09 | 98,35 | 95,82 | | |

Fuente: Propia.

Anexo 4. Conidiación en volumen a los 18 días de maduración (conidias/mililitro).

| | a₁ b₁ | a₁ b₂ | a₁ b₃ | a₂ b₁ | a₂ b₂ | a₂ b₃ | a₃ b₁ | a₃ b₂ | a₃ b₃ | a₄ b₁ | a₄ b₂ | a₄ b₃ | Σ | X |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| I | 2,9E+08 | 5,4E+08 | 8,7E+08 | 1,3E+08 | 1,4E+08 | 1,5E+08 | 4,6E+08 | 2,9E+08 | 1,0E+08 | 1,6E+08 | 2,0E+08 | 1,4E+08 | 3,4E+09 | 2,9E+08 |
| II | 2,7E+08 | 3,2E+08 | 5,7E+08 | 1,8E+08 | 2,6E+08 | 7,7E+07 | 2,9E+08 | 1,5E+08 | 2,2E+08 | 2,1E+08 | 2,2E+08 | 2,1E+08 | 2,9E+09 | 2,5E+08 |
| III | 2,9E+08 | 1,0E+09 | 6,9E+08 | 2,5E+08 | 1,8E+08 | 1,0E+08 | 3,6E+08 | 3,7E+08 | 1,5E+08 | 1,3E+08 | 2,2E+08 | 3,0E+08 | 4,1E+09 | 3,5E+08 |
| IV | 2,7E+08 | 2,4E+08 | 2,2E+08 | 2,2E+08 | 1,0E+08 | 1,0E+08 | 3,1E+08 | 1,8E+08 | 1,6E+08 | 1,1E+08 | 2,9E+08 | 2,1E+08 | 2,4E+09 | 2,0E+08 |
| Σ | 1,1E+09 | 2,2E+09 | 2,3E+09 | 7,9E+08 | 6,8E+08 | 4,4E+08 | 1,4E+09 | 9,1E+08 | 6,3E+08 | 6,1E+08 | 9,3E+08 | 8,6E+08 | 1,3E+10 | 1,1E+09 |
| X | 2,8E+08 | 5,5E+08 | 5,9E+08 | 1,9E+08 | 1,7E+08 | 1,1E+08 | 3,5E+08 | 2,3E+08 | 1,6E+08 | 1,5E+08 | 2,3E+08 | 2,2E+08 | | |

Fuente: Propia.

Anexo 5. Conidiación en peso a los 18 días de maduración (conidias/gramo).

| | a₁ b₁ | a₁ b₂ | a₁ b₃ | a₂ b₁ | a₂ b₂ | a₂ b₃ | a₃ b₁ | a₃ b₂ | a₃ b₃ | a₄ b₁ | a₄ b₂ | a₄ b₃ | Σ | X |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| I | 5,9E+08 | 1,0E+09 | 1,8E+09 | 2,9E+08 | 2,9E+08 | 3,2E+08 | 9,5E+08 | 4,7E+08 | 2,0E+08 | 3,4E+08 | 4,2E+08 | 3,1E+08 | 7,0E+09 | 5,9E+08 |
| II | 5,5E+08 | 6,6E+08 | 1,3E+09 | 3,6E+08 | 5,1E+08 | 1,8E+08 | 6,3E+08 | 2,9E+08 | 4,3E+08 | 4,3E+08 | 3,9E+08 | 4,5E+08 | 6,2E+09 | 5,1E+08 |
| III | 5,4E+08 | 2,3E+09 | 1,4E+09 | 5,1E+08 | 3,3E+08 | 2,2E+08 | 7,3E+08 | 7,6E+08 | 3,2E+08 | 2,7E+08 | 4,6E+08 | 6,2E+08 | 8,4E+09 | 7,0E+08 |
| IV | 5,7E+08 | 4,6E+08 | 4,4E+08 | 4,4E+08 | 1,9E+08 | 2,1E+08 | 5,7E+08 | 3,6E+08 | 3,2E+08 | 2,5E+08 | 6,4E+08 | 4,2E+08 | 4,9E+09 | 4,1E+08 |
| Σ | 2,3E+09 | 4,4E+09 | 4,9E+09 | 1,6E+09 | 1,3E+09 | 9,2E+08 | 2,9E+09 | 1,9E+09 | 1,3E+09 | 1,3E+09 | 1,9E+09 | 1,8E+09 | 2,7E+10 | 2,2E+09 |
| X | 5,7E+08 | 1,1E+09 | 1,2E+09 | 4,1E+08 | 3,3E+08 | 2,3E+08 | 7,2E+08 | 4,7E+08 | 3,2E+08 | 3,3E+08 | 4,8E+08 | 4,5E+08 | | |

Fuente: Propia.

Anexo 6. Peso del hongo a los 25 días de maduración (gramos/bolsa).

| | a₁ b₁ | a₁ b₂ | a₁ b₃ | a₂ b₁ | a₂ b₂ | a₂ b₃ | a₃ b₁ | a₃ b₂ | a₃ b₃ | a₄ b₁ | a₄ b₂ | a₄ b₃ | Σ | X |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| I | 91,26 | 99,03 | 100,26 | 99,06 | 96,89 | 94,51 | 107,72 | 91,82 | 96,35 | 91,47 | 87,17 | 87,82 | 1143,36 | 95,28 |
| II | 95,78 | 97,38 | 96,69 | 102,66 | 97,38 | 101,10 | 94,51 | 95,71 | 110,86 | 102,49 | 86,86 | 92,30 | 1173,72 | 97,81 |
| III | 107,63 | 94,32 | 104,74 | 101,10 | 97,63 | 90,89 | 97,91 | 98,68 | 98,45 | 87,98 | 91,71 | 90,89 | 1161,93 | 96,83 |
| IV | 95,36 | 97,40 | 100,42 | 101,40 | 97,70 | 94,32 | 103,65 | 105,42 | 101,53 | 89,15 | 91,75 | 90,84 | 1168,94 | 97,41 |
| Σ | 390,03 | 388,13 | 402,11 | 404,22 | 389,6 | 380,82 | 403,79 | 391,63 | 407,19 | 371,09 | 357,49 | 361,85 | 4647,95 | 387,33 |
| X | 97,51 | 97,03 | 100,53 | 101,60 | 97,40 | 95,21 | 100,95 | 97,91 | 101,79 | 92,77 | 89,37 | 90,46 | | |

Fuente: Propia.

Anexo 7. Conidiación en volumen a los 25 días de maduración (conidias/mililitro).

| | $a_1 b_1$ | $a_1 b_2$ | $a_1 b_3$ | $a_2 b_1$ | $a_2 b_2$ | $a_2 b_3$ | $a_3 b_1$ | $a_3 b_2$ | $a_3 b_3$ | $a_4 b_1$ | $a_4 b_2$ | $a_4 b_3$ | Σ | X |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| I | 3,4E+08 | 7,9E+08 | 1,1E+09 | 3,7E+08 | 2,5E+08 | 3,4E+08 | 9,7E+08 | 5,3E+08 | 2,0E+08 | 1,3E+08 | 4,9E+08 | 3,9E+08 | 5,9E+09 | 4,9E+08 |
| II | 3,1E+08 | 7,2E+08 | 9,8E+08 | 1,5E+08 | 2,3E+08 | 2,5E+08 | 5,9E+08 | 2,3E+08 | 9,5E+08 | 3,7E+08 | 4,5E+08 | 3,9E+08 | 5,6E+09 | 4,7E+08 |
| III | 3,2E+08 | 6,7E+08 | 1,2E+09 | 4,5E+08 | 3,7E+08 | 3,1E+08 | 6,8E+08 | 1,3E+09 | 3,3E+08 | 3,8E+08 | 3,9E+08 | 4,4E+08 | 6,9E+09 | 5,7E+08 |
| IV | 3,9E+08 | 7,2E+08 | 7,9E+09 | 3,3E+08 | 1,6E+08 | 2,9E+08 | 7,6E+08 | 5,8E+08 | 2,8E+08 | 4,2E+08 | 4,2E+08 | 4,7E+08 | 1,3E+10 | 1,1E+09 |
| Σ | 1,4E+09 | 2,9E+09 | 1,1E+10 | 1,4E+09 | 1,0E+09 | 1,2E+09 | 2,9E+09 | 2,7E+09 | 1,8E+09 | 1,3E+09 | 1,7E+09 | 1,7E+09 | 3,1E+10 | 2,6E+09 |
| X | 3,4E+08 | 7,2E+08 | 2,8E+09 | 3,3E+08 | 2,5E+08 | 2,9E+08 | 7,5E+08 | 6,7E+08 | 4,4E+08 | 3,2E+08 | 4,4E+08 | 4,2E+08 | | |

Fuente: Propia.

Anexo 8. Conidiación en peso a los 25 días de maduración (conidias/gramo).

| | $a_1 b_1$ | $a_1 b_2$ | $a_1 b_3$ | $a_2 b_1$ | $a_2 b_2$ | $a_2 b_3$ | $a_3 b_1$ | $a_3 b_2$ | $a_3 b_3$ | $a_4 b_1$ | $a_4 b_2$ | $a_4 b_3$ | Σ | X |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| I | 7,4E+08 | 1,6E+09 | 2,2E+09 | 7,5E+08 | 5,2E+08 | 7,2E+08 | 1,8E+09 | 1,2E+09 | 4,1E+08 | 2,9E+08 | 1,1E+09 | 9E+08 | 1,2E+10 | 1,0E+09 |
| II | 6,5E+08 | 1,5E+09 | 2,0E+09 | 2,9E+08 | 4,8E+08 | 4,9E+08 | 1,2E+09 | 4,9E+08 | 1,7E+09 | 7,2E+08 | 1,0E+09 | 8,4E+08 | 1,2E+10 | 9,5E+08 |
| III | 5,9E+08 | 1,4E+09 | 2,3E+09 | 8,9E+08 | 7,6E+08 | 6,7E+08 | 1,4E+09 | 2,7E+09 | 6,7E+08 | 8,7E+08 | 8,5E+08 | 9,7E+08 | 1,4E+10 | 1,2E+09 |
| IV | 8,1E+08 | 1,5E+09 | 1,6E+09 | 6,5E+08 | 3,3E+08 | 6,1E+08 | 1,5E+09 | 1,1E+09 | 5,4E+08 | 9,3E+08 | 9,1E+08 | 1,1E+09 | 1,2E+10 | 9,6E+08 |
| Σ | 2,8E+09 | 5,9E+09 | 8,1E+09 | 2,6E+09 | 2,1E+09 | 2,5E+09 | 5,9E+09 | 5,4E+09 | 3,3E+09 | 2,8E+09 | 3,9E+09 | 3,8E+09 | 4,9E+10 | 4,1E+09 |
| X | 6,9E+08 | 1,5E+09 | 2,0E+09 | 6,5E+08 | 5,2E+08 | 6,2E+08 | 1,5E+09 | 1,4E+09 | 8,4E+08 | 7,0E+08 | 9,8E+08 | 9,4E+08 | | |

Fuente: Propia.

Anexo 9. Matriz de sumatoria de unidades experimentales.

| | $a_1 b_1$ | $a_1 b_2$ | $a_1 b_3$ | $a_2 b_1$ | $a_2 b_2$ | $a_2 b_3$ | $a_3 b_1$ | $a_3 b_2$ | $a_3 b_3$ | $a_4 b_1$ | $a_4 b_2$ | $a_4 b_3$ | X |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| I | 5,4E+17 | 2,4E+18 | 4,8E+18 | 5,7E+17 | 2,7E+17 | 5,1E+17 | 3,2E+18 | 1,3E+18 | 1,7E+17 | 8,5E+16 | 1,3E+18 | 8,1E+17 | 1,6E+19 |
| II | 4,3E+17 | 2,2E+18 | 4,1E+18 | 8,7E+16 | 2,3E+17 | 2,4E+17 | 1,5E+18 | 2,4E+17 | 3,0E+18 | 5,1E+17 | 1,1E+18 | 7,0E+17 | 1,4E+19 |
| III | 3,5E+17 | 1,9E+18 | 5,4E+18 | 8,0E+17 | 5,7E+17 | 4,5E+17 | 1,9E+18 | 7,2E+18 | 4,5E+17 | 7,5E+17 | 7,3E+17 | 9,5E+17 | 2,2E+19 |
| IV | 6,6E+17 | 2,2E+18 | 2,5E+18 | 4,2E+17 | 1,1E+17 | 3,7E+17 | 2,2E+18 | 1,2E+18 | 2,9E+17 | 8,7E+17 | 8,2E+17 | 1,1E+18 | 1,4E+19 |
| X | 1,9E+18 | 8,8E+18 | 1,7E+19 | 1,9E+18 | 1,2E+18 | 1,6E+18 | 8,8E+18 | 9,9E+18 | 3,9E+18 | 2,2E+18 | 3,9E+18 | 3,6E+18 | 6,5E+19 |

Fuente: Propia.

Anexo 10. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz cateto.

| Descripción | Unidad | Cantidad | Precio productivo (Bs.) | Costo Total (Bs.) |
|------------------------------------------|--------|----------|-------------------------|-------------------|
| 1, Materiales e insumos | | | | |
| Arroz cateto | Kg | 0,15 | 4,78 | 0,73 |
| Cepa madre (hongo <i>B. bassiana</i>) | g | 1,00 | 2,00 | 2,00 |
| Bolsa de polipropileno | Pza | 1,00 | 0,20 | 0,20 |
| Grapas | Pza | 3,00 | 0,01 | 0,03 |
| Gas licuado | Kg | 0,03 | 3,50 | 0,09 |
| Fósforos | Pza | 0,10 | 0,008 | 0,0008 |
| Alcohol | ml | 1,00 | 0,01 | 0,01 |
| Lavandina | ml | 0,20 | 0,001 | 0,001 |
| Detergente en polvo | g | 0,20 | 0,02 | 0,01 |
| Papel toalla | Pza | 0,003 | 10,00 | 0,03 |
| Guantes de goma | Pza | 1,00 | 0,06 | 0,01 |
| Subtotal | | | | 3,16 |
| 2, Mano de obra | | | | |
| Encargado de laboratorio | Jornal | 0,01 | 100,00 | 1,00 |
| 3, Gastos generales e imprevistos | | | | |
| Gastos e imprevistos (% 1+2) | | | 5,00% | 0,21 |
| Total precio unitario (Bs.) | | | | 4,36 |

Fuente: Propia.

Anexo 11. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz estaquilla.

| Descripción | Unidad | Cantidad | Precio productivo (Bs.) | Costo Total (Bs.) |
|------------------------------------------|--------|----------|-------------------------|-------------------|
| 1, Materiales e insumos | | | | |
| Arroz estaquilla grano de oro | Kg | 0,16 | 7,39 | 1,19 |
| Cepa madre (hongo <i>B. bassiana</i>) | g | 1,00 | 2,00 | 2,00 |
| Bolsa de polipropileno | Pza | 1,00 | 0,20 | 0,20 |
| Grapas | Pza | 3,00 | 0,01 | 0,03 |
| Gas licuado | Kg | 0,03 | 3,50 | 0,09 |
| Fósforos | Pza | 0,10 | 0,008 | 0,0008 |
| Alcohol | ml | 1,00 | 0,01 | 0,01 |
| Lavandina | ml | 0,20 | 0,001 | 0,001 |
| Detergente en polvo | g | 0,20 | 0,02 | 0,01 |
| Papel toalla | Pza | 0,003 | 10,00 | 0,03 |
| Guantes de goma | Pza | 1,00 | 0,06 | 0,01 |
| Subtotal | | | | 3,62 |
| 2, Mano de obra | | | | |
| Encargado de laboratorio | Jornal | 0,01 | 100,00 | 1,00 |
| 3, Gastos generales e imprevistos | | | | |
| Gastos e imprevistos (% 1+2) | | | 5,00% | 0,23 |
| Total precio unitario (Bs.) | | | | 4,85 |

Fuente: Propia,

Anexo 12. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz carolina.

| Descripción | Unidad | Cantidad | Precio productivo (Bs.) | Costo Total (Bs.) |
|------------------------------------------|--------|----------|-------------------------|-------------------|
| 1, Materiales e insumos | | | | |
| Arroz carolina | Kg | 0,16 | 5,03 | 0,82 |
| Cepa madre (hongo <i>B. bassiana</i>) | g | 1,00 | 2,00 | 2,00 |
| Bolsa de polipropileno | Pza | 1,00 | 0,20 | 0,20 |
| Grapas | Pza | 3,00 | 0,01 | 0,03 |
| Gas licuado | Kg | 0,03 | 3,50 | 0,09 |
| Fósforos | Pza | 0,10 | 0,008 | 0,0008 |
| Alcohol | ml | 1,00 | 0,01 | 0,01 |
| Lavandina | ml | 0,20 | 0,001 | 0,001 |
| Detergente en polvo | g | 0,20 | 0,02 | 0,01 |
| Papel toalla | Pza | 0,003 | 10,00 | 0,03 |
| Guantes de goma | Pza | 1,00 | 0,06 | 0,01 |
| Subtotal | | | | 3,24 |
| 2, Mano de obra | | | | |
| Encargado de laboratorio | Jornal | 0,01 | 100,00 | 1,00 |
| 3, Gastos generales e imprevistos | | | | |
| Gastos e imprevistos (% 1+2) | | | 5,00% | 0,21 |
| Total precio unitario (Bs.) | | | | 4,46 |

Fuente: Propia.

Anexo 13. Costo unitario de bolsa de hongo con sustrato de arroz arrocillo.

| Descripción | Unidad | Cantidad | Precio productivo (Bs.) | Costo Total (Bs.) |
|------------------------------------------|--------|----------|-------------------------|-------------------|
| 1, Materiales e insumos | | | | |
| Arroz arrocillo | Kg | 0,14 | 2,08 | 0,30 |
| Cepa madre (hongo <i>B. bassiana</i>) | g | 1,00 | 2,00 | 2,00 |
| Bolsa de polipropileno | Pza | 1,00 | 0,20 | 0,20 |
| Grapas | Pza | 3,00 | 0,01 | 0,03 |
| Gas licuado | Kg | 0,03 | 3,50 | 0,09 |
| Fósforos | Pza | 0,10 | 0,008 | 0,0008 |
| Alcohol | ml | 1,00 | 0,01 | 0,01 |
| Lavandina | ml | 0,20 | 0,001 | 0,001 |
| Detergente en polvo | g | 0,20 | 0,02 | 0,01 |
| Papel toalla | Pza | 0,003 | 10,00 | 0,03 |
| Guantes de goma | Pza | 1,00 | 0,06 | 0,01 |
| Subtotal | | | | 2,73 |
| 2, Mano de obra | | | | |
| Encargado de laboratorio | Jornal | 0,01 | 100,00 | 1,00 |
| 3, Gastos generales e imprevistos | | | | |
| Gastos e imprevistos (% 1+2) | | | 5,00% | 0,19 |
| Total precio unitario (Bs.) | | | | 3,92 |

Fuente: Propia.