

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



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD DE CEPAS PROMISORIAS
DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*
(BALSAMO) VUILL. SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus
hampei* (FERRARI) EN LABORATORIO**

ROMULO CLEMENTE FLORES CHOQUEHUANCA

LA PAZ - BOLIVIA

2009

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

EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD DE CEPAS PROMISORIAS
DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*
(BALSAMO) VUILL. SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ
Hypothenemus hampei (FERRARI) EN LABORATORIO

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

ROMULO CLEMENTE FLORES CHOQUEHUANCA

Tutor:

Ing. Carlos López Blanco.

Asesor:

Ph. D. David Cruz Choque.

Tribunal Examinador:

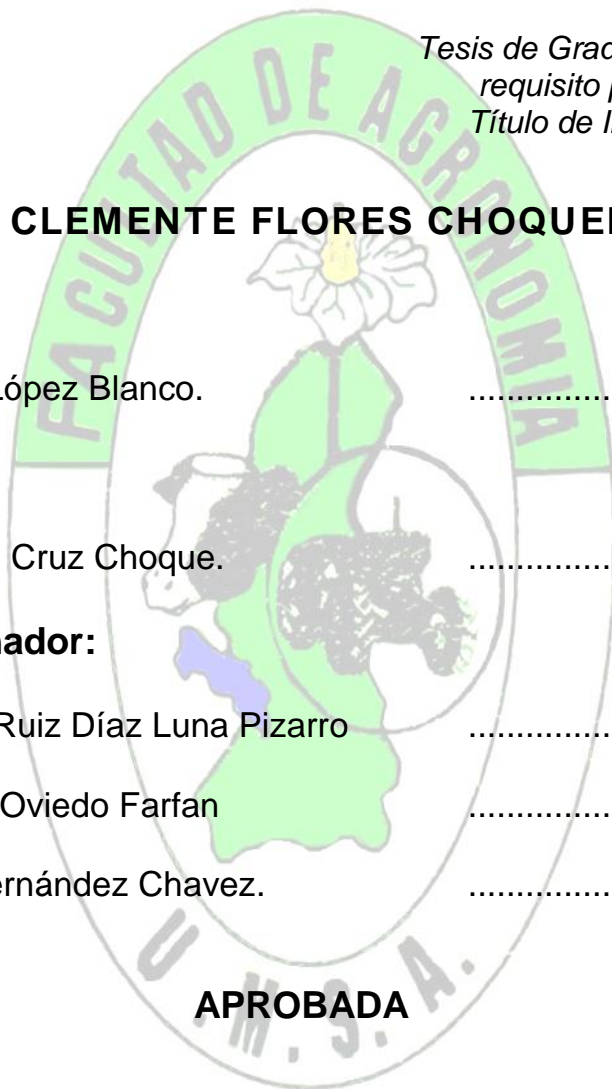
Ing. Teresa Ruiz Díaz Luna Pizarro

Ing. José E. Oviedo Farfan

Ing. Celia Fernández Chavez.

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador



DEDICATORIA

A la memoria de mis padres Juan y Juana de Flores+, a mi querida familia por su amor, paciencia confianza y comprensión, a mis hermanos y hermanas quienes me impulsaron para que culmine este ciclo de estudio y comenzar una vida profesional

AGRADECIMIENTOS

Expresar mis sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

A mi asesor y tutor Dr. David Cruz Ch. e Ing. Carlos López B. porque me transmitieron sus conocimientos, sus valiosas sugerencias, por el tiempo dedicado para mejorar el siguiente trabajo de investigación.

A mi tribunal revisor: Ing. Teresa Ruiz D., Ing. Eduardo Oviedo F. e Ing. Celia Fernández Ch., 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.

Al laboratorio de Biología de la Facultad de Agronomía, docentes y personal administrativo por facilitarme a realizar parte del presente trabajo.

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.

Rómulo Flores Ch.

INDICE GENERAL

	Pagina
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCION.	1
1.1 Objetivo General.	2
1.2. Objetivos específicos.	2
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.	3
2.1. El café y su cultivo.	3
2.2. Caficultura Nacional.	3
2.3. Generalidades de la broca del café.	5
2.3.1. Origen, distribución y características del insecto.	5
2.3.2. Dispersión de la broca.	5
2.3.3. Clasificación taxonómica.	6
2.3.4 Biología de la broca.	6
2.3.5. Penetración y posición de la broca en los frutos.	8
2.3.6. Efecto de la broca sobre la producción de café.	8
2.3.7. Enemigos naturales de la broca del café.	9
2.3.8. Control de la broca del café.	9
2.4. Generalidad de hongos entomopatógenos.	9
2.4.1. Clasificación taxonómica de los hongos.	10
2.4.2. Patogenicidad en hongos entomopatógenos.	10
2.4.3. Virulencia en hongos entomopatógenos.	11

2.4.4.	Producción de enzimas y toxinas de los hongos entomopatógenos.	11
2.4.5.	Rango de hospederos, especificidad y seguridad de los hongos.	12
2.4.6.	Limitantes bióticas y abióticas de los entomopatógenos.	12
2.4.7	Prueba de viabilidad en hongos entomopatógenos.	12
2.4.8.	Producción de entomopatógenos.	13
2.4.9.	Formulaciones.	13
2.4.10	Aplicación de hongos	13
2.5.	Generalidades del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> .	14
2.5.1.	Clasificación taxonómica del hongo.	14
2.5.2.	Características del hongo.	14
2.5.3.	Ciclo biológico de <i>B. bassiana</i> .	15
2.5.4.	Producción de enzimas, toxinas y ácidos metabólicos.	15
2.5.5.	Modo de acción.	16
2.5.6.	Producción de <i>B. bassiana</i> .	16
2.5.7.	<i>B. bassiana</i> en el control de la broca del café.	16
3.	LOCALIZACION	18
4.	MATERIALES Y METODOS	19
4.1.	Materiales.	19
4.1.1.	Equipos de laboratorio.	19
4.1.2.	Cristalería.	19
4.1.3.	Reactivos.	19
4.1.4.	Varios.	20
4.1.5.	Material biológico.	20
4.2.	Método.	20
4.2.1.	Reconocimiento del área de trabajo en laboratorio.	20
4.2.2.	Antecedentes de calidad de las cepas del hongo <i>B. bassiana</i> .	21
4.2.3.	Condiciones de laboratorio.	22
4.3.	Trabajos preliminares antes del bioensayo.	22
4.3.1.	Reactivación de las cepas en estudio sobre <i>H. hampei</i> .	22
4.3.2.	Preparación de medios semisólidos para la siembra del hongo.	23

4.3.3.	Aislamiento y siembra de <i>B. bassiana</i> en la obtención de la matriz o cepa madre.	24
4.3.4.	Siembra del hongo a partir de la cepa madre	25
4.3.5.	Obtención de <i>H. hampei</i> , para la prueba de patogenicidad.	26
4.3.6.	Lectura de conidias.	27
4.4.	Trabajos concernientes al bioensayo.	28
4.4.1.	Viabilidad de conidias del hongo.	28
4.4.2.	Acondicionamiento del material para el bioensayo.	29
4.4.3.	Obtención de café pergamino para la alimentación de <i>H. hampei</i> .	29
4.4.4.	Dosificación del hongo <i>B. bassiana</i> para la prueba de patogenicidad.	29
4.4.5.	Infección de la broca del café con el hongo y su disposición en viales.	30
4.4.6.	Adición de grano pergamino y agua destilada (ADE) en los viales.	30
4.4.7.	Evaluación de patogenicidad de <i>B. bassiana</i> sobre <i>H. hampei</i> .	31
4.5.	Variables de respuesta.	31
4.6.	Diseño experimental.	32
4.6.1.	Tratamientos.	33
4.6.2.	Croquis del experimento.	33
4.6.3.	Análisis estadístico.	34
5.	RESULTADOS Y DISCUSION.	35
5.1.	Desarrollo del hongo en medios de cultivo artificial y natural.	35
5.2.	Evaluación de la viabilidad del hongo.	37
5.3.	Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> sobre <i>H. hampei</i> .	38
5.3.1.	Análisis de varianza de la patogenicidad del hongo.	39
5.3.2.	Mortandad por el hongo, otras causas y sobrevivencia de <i>H. hampei</i> .	40
5.3.3.	Evaluación de la infestación de <i>H. hampei</i> .	42
5.4.	Modo de acción del entomopatógeno.	45
5.5.	Evaluación del grado de virulencia de <i>B. bassiana</i> .	46
5.5.1.	Mortalidad diaria de la broca.	47
5.5.2.	Mortalidad acumulada, Tiempo Letal Medio (TL ₅₀) y Mortalidad Total.	48

5.5.3. Tiempos de las etapas de desarrollo del hongo.	51
6. CONCLUSIONES.	53
7. RECOMENDACIONES.	55
8. BIBLIOGRAFIA	56
ANEXOS	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pagina
1.	Distribución de producción de café en Bolivia.	4
2.	Longevidad de <i>H. hampei</i> por sexos	7
3.	Antecedentes de calidad de las cepas en estudio.	21
4.	Promedios generales de Temperatura y humedad relativa (Laboratorio)	22
5.	Desarrollo del hongo en medio de cultivo artificial SDA. (12 días de evaluación)	36
6.	Análisis de Varianza para la mortandad de brocas (Patogenicidad)	40
7.	Comparación de promedios de mortandad de brocas por causa del hongo <i>B. bassiana</i> .	40
8.	Mortalidad por el hongo, mortalidad por otras causas y sobrevivencia de la broca del café	41
9.	Posición de <i>H. hampei</i> sobre el grano pergamino (Posición a, b, c, d)	43
10.	Tiempo de duración de las etapas de desarrollo del hongo <i>B. bassiana</i> sobre la broca del café <i>H. hampei</i> .	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Adultos de <i>Hypothenemus hampei</i> .	5
2. Ciclo de vida de <i>H. hampei</i>	7
3. Posición de <i>H. hampei</i> en el fruto de café.	8
4. Características microscópicas y macroscópicas de <i>Beauveria bassiana</i> ; A) Dibujo del esquema de conidióforos y conidias de <i>B. bassiana</i> . B) Microfotografía de conidióforos y conidias de <i>B. bassiana</i> .	15
5. Brocas de café atacadas por el hongo <i>Beauveria bassiana</i> en campo.	17
6. Ubicación de Coroico y la Comunidad de San Pedro de la Loma; Estación Experimental Coroico;	18
7. Cepas del hongo <i>B. bassiana</i> . A) Cepas 24 y 13; B) cepa 9205 (Bioplag).	21
8. <i>B. bassiana</i> reactivado sobre <i>H. hampei</i> infectado; A) Brocas sometidas al inoculo del hongo. B) Esporulación del hongo en cámara húmeda.	23
9. Medios de cultivo artificial; A) SDA, AN, PDA. B) Preparación de medios artificiales en matraz Erlenmeyer.	24
10. Proceso de preparación de sustrato solidó de arroz. Llenado en bolsa, engrapado de bolsa y colocado en la olla a presión para su esterilizado.	26
11. A) Incubación del hongo en sustrato de arroz en la Cámara de Incubación B) Maduración del hongo en estante.	26
12. A) Cámara de Neubauer; B) Retículo central de conteo de la cámara.	27
13. Adición de café pergamino en vial y tratamiento listo para su evaluación.	31

14.	Croquis de distribución de tratamientos en Diseño Completamente al Azar (superior); distribución de tratamientos en el bioensayo (inferior).	33
15.	Contaminación en medios de cultivo. A) cultivo artificial afectado por <i>Aspergillus sp</i> y <i>Rhizopus sp</i> . B) cultivo de arroz con contaminación bacteriana.	35
16.	Características de las cepas de <i>B. bassiana</i> en el medio de cultivo Saboraud Dextrosa Agar (SDA).	37
17.	Desarrollo de <i>B. bassiana</i> en medio de cultivo artificial. A) Medición del crecimiento (caja petri invertida). B) Desarrollo del hongo en círculos concéntricos (Vista frontal).	37
18.	A) conidias de <i>B. bassiana</i> . B) conidias germinadas.	38
19.	Broca del café controlada por <i>B. bassiana</i> en posición de ataque en grano pergamino (posición a y b).	44
20.	Etapas de desarrollo de <i>B. bassiana</i> sobre <i>H. hampei</i> . A) Muerte; B) Inicio de micelio; C) Cubrimiento de micelio; D) Conidiogénesis; E) Liberación de conidias.	46
21.	Distribución de la mortalidad diaria de población de brocas.	47
23.	Mortalidad acumulada de <i>H. hampei</i> .	48
24.	Tiempo para el 50% de mortandad de población de brocas (TL ₅₀).	49
25.	Tiempo para el 100% de mortandad de población de brocas.	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo

- 1 Mapa cartográfico que muestra la localidad de Coroico.
- 2 Características de cultivos artificiales para siembra de *B. bassiana*.
- 3 Registro de temperatura en el bioensayo.
- 4 Concentración de conidias del hongo *B. bassiana*.
- 5 Crecimiento del hongo *B. bassiana* en tamaño y superficie.
- 6 Germinación de conidias de las cepas del hongo *B. bassiana*
- 7 Mortalidad de *H. hampei* por efecto patogénico de *B. bassiana* en el bioensayo.
- 8 Mortandad de *H. hampei* por causas patogénicas de *B. bassiana*.
- 9 Mortandad de *H. hampei* por causas patogénicas de *B. bassiana*.
- 10 Porcentaje de mortalidad por efectos patogénicos del hongo, Mortalidad por otras causas y sobrevivencia de la broca.
- 11 Infestación y posición de *H. hampei* sobre el grano pergamino.
- 12 Ciclo de desarrollo de *B. bassiana* sobre *H. hampei* (Promedios en horas).

RESUMEN

Mediante un bioensayo se evaluó la patogenicidad de cepas promisorias del hongo *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Hypothenemus hampei* criados en café pergamino. Las brocas se desinfectaron por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por 10 minutos y se lavaron por tres veces con agua destilada. Luego se expusieron a soluciones fúngicas en una concentración de $1 \cdot 10^7$ conidias/mililitro durante tres minutos. Se colocaron las brocas individualmente en viales (botellitas de penicilina) con discos de papel filtro húmedo y tapados con algodón. Permanecieron en esta forma por 24 horas; adicionándose luego un grano de café pergamino/vial con 45% de humedad. Se evaluó los siguientes tratamientos: Cepas nativas 24 PV/CC y 13 U/VB y la Cepa Bb. 9205 (exótica) y un testigo sin inóculo.

Al cabo de 24 horas después de la inoculación, las brocas tratadas con el hongo presentaron menor actividad por los síntomas de enfermedad. Los resultados mostraron un ataque a granos pergamino en 31.6% en la posición **b** (daño mínimo), 29.2% en la posición **c** (daño intermedio) y 28.3% en la posición **d** (daño severo); mientras en el testigo alcanzo un nivel de 10%, 10% y 77.5% en las posiciones **b**, **c** y **d**, lo que significa que las brocas infectadas por el hongo tienen una menor capacidad de causar daño en los granos pergamino. El tiempo letal medio (TL₅₀) fue: cepa 13 (67.59 horas), mientras las cepas 9205, 24 tomaron 72.18 y 76.48 horas y el tiempo al 100% de mortandad fue: 115.27, 147.77 y 148.12 horas. Se identificaron cinco etapas en el desarrollo de *B. bassiana* sobre *H. hampei*: Muerte, Producción de micelio, Cubrimiento micelial, Conidiogénesis y Liberación de conidias.

Estos resultados llevaron a concluir que existe variabilidad en términos de patogenicidad y virulencia, manifestando la calidad en potencialidad agresiva (virulencia) de estas cepas, parámetro importante que justifica su aplicación en campo.

1. INTRODUCCION.

El café originario de África, es un cultivo ampliamente distribuido por el mundo, jugando un rol importante en la subsistencia de millones de familias. En Bolivia existen alrededor de 24.000 hectáreas, donde el 95% se encuentra en los Yungas de La Paz; involucradas en la cadena productiva alrededor de 32.000 familias en forma directa e indirecta.

La broca del café *Hypothenemus hampei*, (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) es actualmente la plaga insectil que mayor daño causa a la caficultura nacional, porque su ataque se dirige al fruto donde se reproduce, causando infestaciones desde el 10% hasta el 100%.

El hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es el entomopatógeno mas estudiado en el control de la broca del café y muchas plagas, por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica. Las condiciones de vida de la broca del café, la hacen naturalmente susceptible a la infección por el hongo ya que tanto este como la broca se desarrollan de manera óptima en condiciones de alta humedad.

Actualmente a nivel local se cuenta con cepas promisorias (nativa, exótica), específicas en el control de *H. hampei*, con antecedentes de selección, bioensayo, dosis y aplicación distintos. A su vez señalar que las cepas nativas no tienen control de patogenicidad por varios años en relación a la cepa exótica, evaluada constantemente en su país de origen.

Esta situación exigió realizar la evaluación de patogenicidad de cepas promisorias del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café, con un método de bioensayo estándar, con el objeto de determinar el potencial patogénico actual en condiciones de laboratorio.

Por lo expuesto los objetivos del trabajo fueron:

1.1. Objetivo general:

Evaluar la patogenicidad de cepas promisorias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* en condiciones controladas de laboratorio.

1.2. Objetivos específicos:

- Conocer el desarrollo del hongo en tres cepas promisorias en cultivo artificial y natural.
- Establecer la viabilidad del hongo en las diferentes cepas.
- Determinar el modo de acción del hongo sobre la broca del café.
- Determinar el grado de patogenicidad y virulencia de las cepas del entomopatógeno.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. El café y su cultivo

Según Desarrollo Alternativo (2005), el café pertenece al genero *Coffea* de la familia de las *Rubiáceas*. Dos especies de este genero son de importancia económica, la especie *Coffea arábica*, cuyo nombre comercial en la industria es “Arábica” y abarca más del 70% de la producción mundial; y *Coffea canephora* (o *Coffea robusta*), cuyo nombre comercial en la industria es “Robusta”, y comprende alrededor del 30% de la producción mundial.

A la vez señala que el cafeto se desarrolla en zonas cálidas y semicálidas con precipitaciones promedio de 1,500 mm anuales. La especie Arábica se desarrolla en climas templados en cuanto a altitud con temperaturas entre 18°C y 24°C y con estaciones bien diferenciadas; esta variedad es más resistente al frío. La especie Robusta se desarrolla en condiciones de clima cálido ecuatorial con temperaturas anuales medias de 24°C a 26°C y estaciones seca y lluviosa menos diferenciadas.

2.2. Caficultura Nacional.

La producción de café en Bolivia esta concentrada en diferentes departamentos como se detalla en el cuadro.1

Según el INE (2005) citado por Desarrollo Alternativo (2005), el nivel de producción de café en Bolivia para la gestión 2004, alcanzo a un total de 24.500 Toneladas Métricas de café cereza en una superficie cerca de 25.200 hectáreas. De este nivel de producción aproximadamente un 30% se destina al mercado nacional y unos 70% a mercados extranjeros concentradas en cuatro países: Alemania, Estados Unidos, Rusia y los Países Bajos.

Cuadro 1. Distribución de producción de café en Bolivia.

Departamento	Provincia	Localidad
La Paz (95%)	Caranavi Nor Yungas Sud Yungas Franz Tamayo Inquisivi Larecaja	Caranavi Coroico, Coripata Asunta, Chulumani, Irupana Apolo Circuata, Licoma, Cajuata Larecaja
Santa Cruz (3%)	Ichilo San Ignacio de Velasco Sara	Buena Vista San Ignacio de Velasco Sara
Cochabamba (1%)	Chapare	Chapare
Tarija (0.5%)	Arce	Bermejo
Beni (0.5%)	Vaca Diez	Vaca Diez

Fuente: Desarrollo Alternativo Integral (2006).

La Razón (2005), respecto a la calidad indica, antes el café boliviano era considerado de mala calidad en el exterior, de hecho se vendía como relleno en los grandes pedidos. Pero ahora con el comercio justo, se cultiva el café orgánico, especial y de altura, único y de primera calidad, países como Europa y Estados Unidos ya conocen su calidad y los consumidores saben que se cultiva sin químicos y sin dañar el medio ambiente.

La broca del café causa daño de 30 a 35% en la producción del cultivo, existen al momento algunas organizaciones que controlan la plaga, mediante la aplicación de *B. bassiana*, pero se sienten poco o nada capacitados para combatir enfermedades que es otro gran problema que afecta la producción en el rendimiento de granos. Dentro del problema de las enfermedades, las mas importantes por la severidad de las infecciones son: Roya, Ojo de gallo, Llagu negra, Mal de Hilacha, Mancha de hierro, Antracnosis y Phoma que están ligadas a las condiciones ambientales (FECAFEB, 2005 citado por Desarrollo Alternativo Integral, 2005).

2.3. Generalidades sobre la broca del café.

2.3.1. Origen, distribución y características del insecto.

Le Pelley (1968) citado por Bustillo (2002), señala que la broca del café es originaria del África ecuatorial, introducida al continente americano a principios del siglo pasado; en la actualidad se encuentra prácticamente en todo los países productores de café.

Cárdenas y Benavides (1987), describen a la broca del café como un escolitido muy pequeño de forma abultada, variando su tamaño y altura entre las hembras y los machos. El color va desde café castaño hasta negruzco, vive necesariamente en el fruto del café por eso la denominación de “broca del café. La principal diferencia existente entre las hembras y los machos además del tamaño, es que estos últimos no pueden volar por tener las alas atrofiadas (Figura 1).

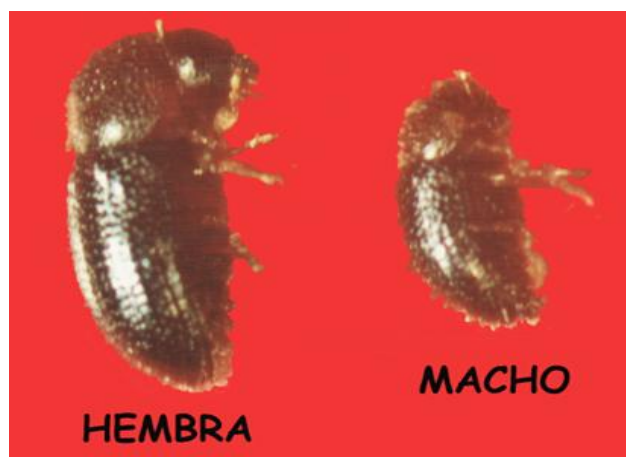


Figura 1. Adultos de *Hypothenemus hampei*.

2.3.2. Dispersión de la broca.

En general, muchos insectos tratan de migrar como un mecanismo de supervivencia. La broca adulta vuela y se dispersa; por consiguiente, es casi imposible erradicar la plaga con los métodos de control (Manejo Integrado de la

Broca), si en un momento dado parte de su población esta volando y otra parte esta refugiada en cafetales donde no se hace practicas de control. Por tanto, una vez que aparece la broca en una zona hay que convivir con ella (Bustillo, 2002).

2.3.3. Clasificación taxonómica.

Según Klein (1986), hace la siguiente clasificación:

Clase	: Insecta
Orden	: Coleóptera
Suborden	: Polyphaga
Serie	: Cucurlionoidea
Familia	: Scolytidae
Subfamilia	: Ipinae
Tribu	: Cryphalini
Genero	: <i>Hypothenemus</i>
Especie	: <i>Hypothenemus hampei</i>

2.3.4. Biología de la broca.

La biología y hábitos de vida han sido estudiados por varios autores con considerables diferencias sobre la duración de los estados, esto obedece fundamentalmente a diferencias en las condiciones ambientales de los diversos estudios especialmente la temperatura (Bustillo *et al.*, 1998).

A la vez indica que el adulto hembra de la broca del café una vez que emerge de la pupa puede aparearse y unos tres días después puede iniciar posturas. Su periodo de oviposición es de unos 20 días y coloca entre 2 y 3 huevos/día. La incubación del huevo dura 7.6 días (23 °C) y el estado de larva 15 días para los machos y 19 días para las hembras, la prepupa 2 días y la pupa 6.4 días (25.8 °C). El ciclo total (figura 2) de huevo a emergencia de adulto se estima en 27.5

días. Sin embargo el tiempo generacional, o sea el tiempo que tarda en iniciarse otra generación bajo condiciones de campo se estima en 45 a 60 días. La relación de sexos es de aproximadamente de 1:10 a favor de las hembras.

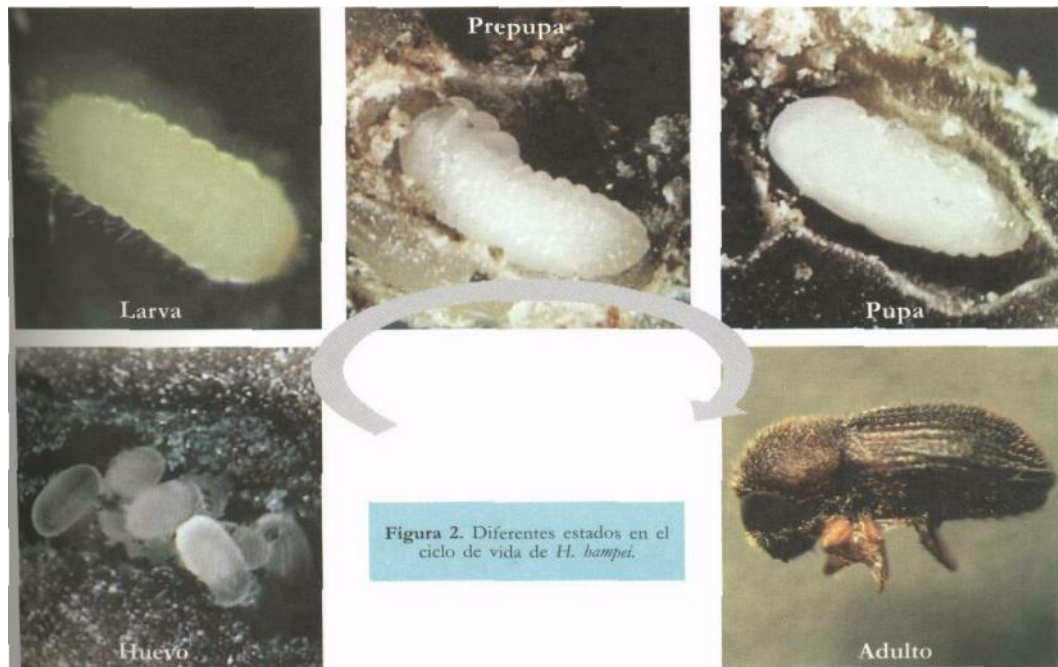


Figura 2. Ciclo de vida de *H. hampei*

Ruiz (1996), señala que la broca hembra permanece en el interior del fruto hasta su muerte cuidando su progenie. En el fruto del café desde el momento de ataque de la broca hasta la cosecha se pueden producir dos generaciones; si estos no se cosechan pueden alcanzar hasta cuatro generaciones. El macho es de menor tamaño siempre permanece en los frutos, es incapaz de volar y perforar un fruto. Los intervalos de longevidad de las hembras y los machos de *H. hampei* son variables y se detalla en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Longevidad de *H. hampei* por sexos

Sexo/días	Máximo	Mínimo	Promedio
Hembras	283	81	156,6
Machos	103	78	—

Fuente: Maya *et al.* (1987).

2.3.5. Penetración y posición de la broca en los frutos.

El tiempo que una hembra demora en penetrar un fruto, varía de acuerdo con el estado de desarrollo del fruto así: frutos verdes 5 horas 36 minutos, frutos pintones 5 horas 54 minutos, frutos maduros 4 horas 50 minutos y frutos secos 11 horas 21 minutos. Lo que indica que la broca penetra con mayor rapidez en frutos maduros (Miguel y Pauline ,1975 cit. Bustillo, 2002).

En la infestación (figura 3), la broca toma las siguientes posiciones en el fruto: la posición **a**, una broca en busca de fruto o iniciando su perforación; la posición **b**, cuando la broca está en el canal de penetración; en la posición **c**, la broca está perforando la almendra; y la posición **d**, cuando una broca se establece produciendo descendencia (Bustillo, 2002).

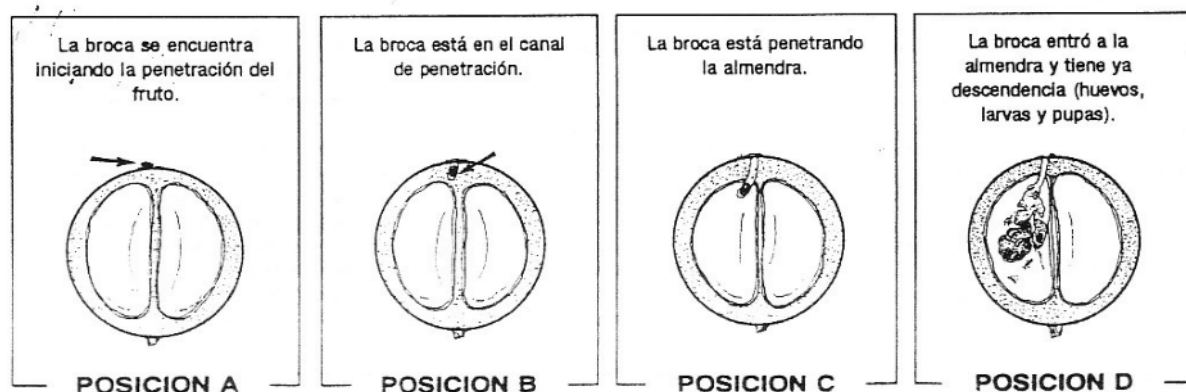


Figura 3. Posición de *H. hampei* en el fruto de café.

2.3.6. Efecto de la broca sobre la producción de café.

Según Bustillo (2002), el daño que ocasiona la broca al fruto de café consiste en perforaciones y caída de estos. La pérdida de peso del café pergamino seco por causa de la broca es alrededor de 18.1% y los frutos que fueron atacados tempranamente tienen maduración prematura, lo cual repercute en un manchado del pergamino de los granos sanos.

2.3.7. Enemigos naturales de la broca del café.

Según Bustillo *et al.* (1995), señalan que los enemigos más importantes de la broca del café son cuatro parasitoides (*Prorops nasuta*, *Cephalonomia stephanoderis*, *Heterospillus coffeicola* y *Phymastichus coffea*) y dos hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*).

A su vez Bustillo *et al.* (1998) citado por Bustillo (2002) indica que en Colombia existe fauna benéfica nativa, mencionándose 18 reguladores biológicos de poblaciones de broca y 7 grupos de organismos compitiendo por su nicho ecológico. Entre los primeros se encuentran 9 entomopatógenos, 1 parasitoide de adultos y 8 predadores. La preservación de esta fauna benéfica redundará muy favorablemente en la reducción de poblaciones de broca.

2.3.8. Control de la broca del café.

Según Bustillo (2002), al analizar a la broca sobre el fruto de café en daño, biología y comportamiento de ataque se emplea el método de control adecuado. Las prácticas de control cultural constituyen un 80% de éxito (cosecha oportuna y recolección de frutos dejados); el control químico se lo realiza técnicamente justificando su aplicación con equipos de aspersión calibrados y operarios capacitados; y finalmente el control biológico, empleando enemigos naturales introducidos o endémicos (parasitoides y entomopatógenos) que incidan favorablemente sobre poblaciones de broca.

2.4. Generalidad de hongos entomopatógenos.

Según la Sociedad Mexicana de Control Biológico (1995), los hongos fueron los primeros microorganismos encontrados, causando enfermedades a insectos. Actualmente son considerados como agentes potenciales en el control biológico de insectos, constituyendo un amplio grupo representado por 750 especies,

registrando hasta el momento, para su uso solamente 5 géneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomocela*, *Hirsutilla* y *Verticillium*

2.4.1. Clasificación taxonómica de los hongos.

La clasificación de los hongos entomopatógenos se basa en las características anatómicas o morfológicas, tomando en cuenta la forma del micelio, tipo de fructificación, tipo de hospedero, hábitat, condiciones ambientales, medios de cultivo en que se desarrolla. Los estudios se realizan con microscopio electrónico, en base a análisis bioquímico, genético y biológico (Roberts y Hunters, 1981 cit. en Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1995).

Rogg *et al.* (1997), señalan que las especies más estudiadas son: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongiarthii*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecani* y *Paecilomyces spp.*, para el control de plagas forestales y cultivos.

2.4.2. Patogenicidad en hongos entomopatógenos.

Alves (1986), define patogenicidad 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.

González *et al.* (1993), señalan que la patogenicidad determina si el patógeno ataca a la plaga al cual esta dirigida, sin embargo no asegura la efectividad bajo condiciones de campo que en condiciones de laboratorio.

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.

2.4.3. Virulencia en hongos entomopatógenos.

Alves (1986), define virulencia a la capacidad del patógeno de incidir en el detrimento del hospedero, venciendo su resistencia. Un patógeno posee alta virulencia cuando incide sobre un gran número de individuos produciendo epizootias con gran capacidad de diseminación y sin duda debe ser seleccionado para el control microbiano.

La virulencia es la propiedad con que cuenta un agente entomopatógeno, definida como el grado de patogenicidad con la habilidad de invadir y afectar los órganos del hospedero específico. El bioensayo en laboratorio, es la forma de realizar las mediciones de virulencia, presentando patógenos de alta virulencia con ciclo de enfermedad corto y producción de inóculo en grandes cantidades causando un incremento rápido de la enfermedad dentro de una población. En contraste los agentes infecciosos de baja virulencia se multiplican y propaga más lentamente (Garza *et al.* 1994, y Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1997).

2.4.4. Producción de enzimas y toxinas de los hongos entomopatógenos.

La infección del entomopatógeno 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, penetrando e invadiendo el hemocelo (Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1995).

Según Roberts (1981), citado por Garza *et al.* (1994), señala que la muerte del insecto ocurre ya sea por la producción de metabolitos tóxicos o por desajustes fisiológicos producto de la infección. Los hongos entomopatógenos en algunas

especies pueden matar al hospedero mediante la acción tóxica más que por la invasión del mismo a través del cuerpo del insecto; estas sustancias son metabolitos secundarios considerados compuestos tóxicos a insectos.

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

Los hongos entomopatógenos en su mayoría tienen un “amplio rango de hospederos” y debido a esto presentan un potencial para ser usados 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 ambiente (Saik *et al.*, 1990 citado en Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1995).

2.4.6. Limitantes bióticas y abióticas de los entomopatógenos.

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

2.4.7. Prueba de viabilidad en hongos entomopatógenos.

Marín (1994), señala que la viabilidad de hongos entomopatógenos se realiza a través de la germinación de conidias en laboratorio, que 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 plagas en un corto periodo de exposición a condiciones ambientales adversas de campo.

2.4.8. Producción de entomopatógenos.

El proceso de producción implica principalmente 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 cit. en Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1995).

2.4.9. Formulaciones.

Las formulaciones básicas de hongos entomopatógenos e insecticidas químicos comprende: líquidos (suspensiones acuosas), polvos humectables, cebos y granulados; los hongos son entidades vivas y no pueden ser formulados como polvos solubles (Couch e Ignoffo, 1981 citado en Garza *et al.*, 1994).

A diferencia de los insecticidas químicos el micelio, conidias, blastosporas, zoosporas o esporangios producidos por hongos entomopatógenos son propagulos 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).

2.4.10. 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.

2.5. Generalidades del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Carballo *et al.* (2004), indica que los primeros datos sobre *Beauveria bassiana* fueron emitidos por Agostino Bassi en 1834 cuando demostró que este hongo era el agente causal de una enfermedad del gusano blanco *Bombix mori*, conocido como muscardina blanca. 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.

2.5.1. Clasificación taxonómica del hongo.

Roberts y Humber (1981), citado en la Sociedad Mexicana de Control Biológico (1995), dan a conocer la siguiente clasificación:

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

2.5.2. Características del hongo.

El género 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 (Figura 4A), después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares. El hongo *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) y las estructuras conidióforas forman densos grupos (Figura 4 B) (Bustillo, 2002; Samson *et al.* 1988 citado por Alean, 2003).

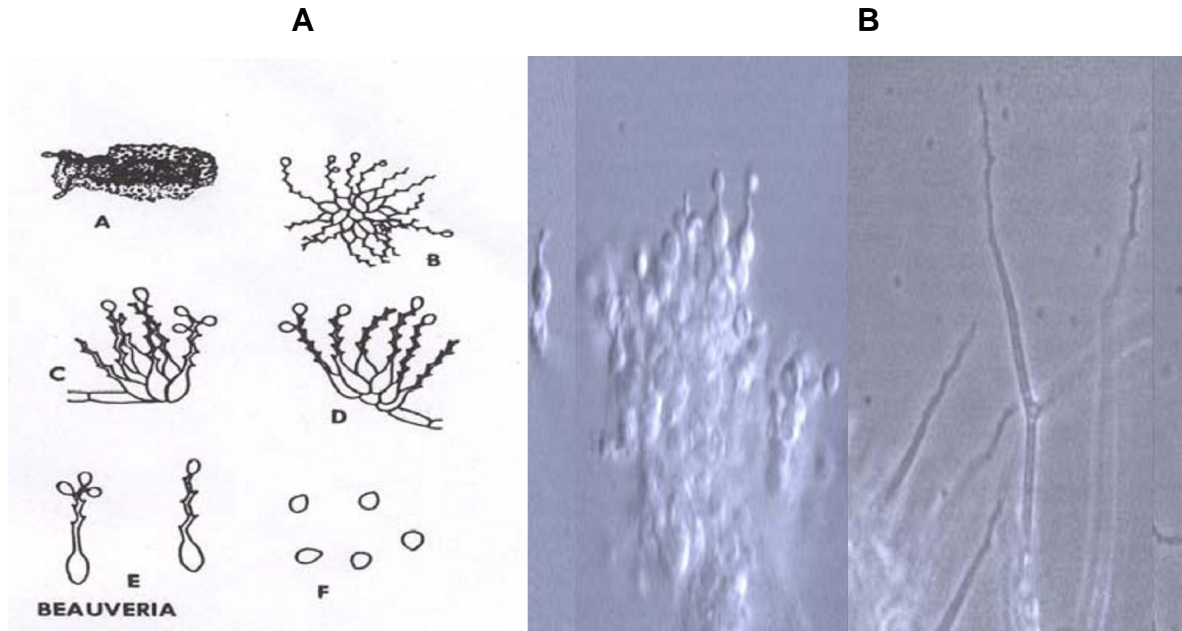


Figura 4. Características microscópicas y macroscópicas de *Beauveria bassiana*;
A) Dibujo del esquema de conidióforos y conidias de *B. bassiana*.
B) Microfotografía de conidióforos y conidias de *B. bassiana*.

2.5.3. Ciclo biológico de *B. bassiana*.

Carballo *et al.* (2004), indica que el ciclo de vida de *B. bassiana* comprende dos fases, una patogénica y la otra saprofítica. La fase patogénica involucra cuatro pasos principales: Adhesión, germinación, diferenciación y penetración. La fase saprofítica ocurre dentro del hemocele con un crecimiento profílico del hongo.

Por su parte Alves (1986), menciona que los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentan las siguientes fases sobre el hospedero: germinación (Formación de opresorios y grapas de penetración), penetración, colonización, reproducción y diseminación de conidias.

2.5.4. Producción de enzimas, toxinas y ácidos metabólicos.

Brocaril (2002), Carballo *et al.* (2004), indican que *B. bassiana* produce una gran variedad de enzimas, toxinas y ácidos metabólicos; enzimas como la quitinasa, la

proteasa y la lipasa, que actúan de manera sinérgica para digerir y penetrar la epicutícula; las toxinas aisladas del hongo son Beauvericina, Beauveriloides, Isarolides, Bassianolide y eniantina, estos se caracterizan 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.

2.5.5. Modo de acción.

Según BROCARIL (2002), ocurre de dos maneras: 1) en el proceso fermentativo de producción de *B. bassiana* se producen una gran variedad de toxinas y ácidos metabólicos que causan parálisis muscular y un efecto de “knockdown” sobre los insectos susceptibles, 2) A través del contacto ocurre la muerte del insecto, manifestando el ciclo biológico con la fase patogénica y saprofitica.

2.5.6. Producción de *B. bassiana*.

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

2.5.7. *B. bassiana* en el control de la broca del café.

González *et al.* (1993), Bustillo (2002), señalan que el hongo *B. bassiana* se encuentra naturalmente infectando la broca del café 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.

Bustillo (2002), El ciclo de vida del hongo sobre la broca bajo condiciones de laboratorio se completa en un promedio de 8.2 días desde la inoculación del

insecto con el patógeno hasta la liberación de esporas. En campo dependiendo de las condiciones ambientales, puede tomar entre 15 a 30 días.

La incidencia del hongo *B. bassiana* sobre *H. hampei* en condiciones de campo varía de un país a otro, con infección escasa y altos niveles de control. Estas diferencias pueden deberse a factores climáticos o a que la broca está mejor adaptada al hongo en su sitio de origen, pero es susceptible a los aislamientos que encuentra en los nuevos sitios que coloniza (González *et al.*, 1993).

Bustillo *et al.* (1991, 1995, 1996) citado por Bustillo (2002), indican que la eficiencia de *B. bassiana* en campo es variable, influenciados por condiciones climáticas y de cultivo, fluctuando entre valores de 20% hasta niveles del 75%.

Las esporas 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 5. Brocas de café atacadas por el hongo *Beauveria bassiana* en campo.

3. LOCALIZACION

El presente trabajo de investigación se llevo 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 Km. de la localidad de Coroico, dependiente del Servicio Departamental Agropecuario SEDAG de la Prefectura de La Paz. Asimismo se realizo una parte del trabajo en el laboratorio de Biología de la Facultad de Agronomía dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés

La Estación Experimental se halla dentro de la jurisdicción de la Provincia Nor Yungas del Departamento de La Paz a una altura de 1630 metros sobre el nivel del mar, con precipitación pluvial promedio de 1621 milímetros/año y una temperatura promedio de 20°C, mínima de 15.16 °C y 26.4 °C máxima, Humedad Relativa de 80.79%; geográficamente situado a 16°12'17" de Latitud Sur y 67°41'52" de Longitud Oeste. Esta zona se caracteriza por tener una topografía accidentada, con grandes cañadones y altas pendientes cuya clasificación de acuerdo a la formación de zonas corresponde al bosque húmedo sub tropical de piso montano (Holdridge, 1987).



Figura 6. Ubicación de Coroico y la comunidad de San Pedro de la Loma; Estación Experimental Coroico.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales.

4.1.1. Equipos de laboratorio.

Asa de platino	Aguja entomológica
Balanza digital	Bisturí Cámara de flujo
Cámara de incubación	Calculadora
Cámara fotográfica	Cronometro
Cocinilla mas garrafa	Estante metálico
Estereoscopio	Engrapadora
Jeringas de 1 y 5 ml	Microscopio
Olla a presión	Nebulizador manual
Termoventilador	Mesa de trabajo
Termómetro	Refrigerador

4.1.2. Cristalería.

Cajas petri	Cámara de Neubauer
Mechero de Bunsen	Pipetas
Vasos precipitados	Viales (160 botellitas de penicilina)
Matraz Erlenmeyer	Pipetas de pasteur
Tubos de ensayo	Porta + cubreobjetos
Probeta	

4.1.3. Reactivos.

Alcohol etílico al 96%	Agua destilada estéril (ADE)
Hipoclorito de sodio al 8%	Saboraud Dextrosa Agar (SDA)
Papa Dextrosa Agar (PDA)	Agar Nutriente (AN)

Aceite Agrícola (Carrier)
Detergente

Colorante policromico

4.1.4. Varios.

Bolsas de polipropileno

Grapas

Bañadores

baldes

Papel absorbente

Papel aluminio

Algodón

Barbijos

Parafilm

Recolector de brocas

Sumergidor de brocas

Cepillos

Guardapolvo

Guantes (goma, cuero)

Pinceles

Cuaderno de registro

Material de escritorio (Computadora, Impresora, Papel, bolígrafos).

Material de limpieza (toallas, cepillos, guantes, escoba, pisos).

4.1.5. Material biológico.

Hongo *Beauveria bassiana* (Cepas: 24 PV/CC, 13 U/VB y Bb 9205)

Broca del café *H. hampei*.

Café pergamino con 45% de humedad

Arroz (cateto).

4.2. Método.

4.2.1. Reconocimiento del área de trabajo en laboratorio.

El programa de trabajo se inicio con un reconocimiento de laboratorio con sus respectivas áreas de trabajo: Área de preparación de sustratos, inoculación, incubación y maduración del hongo entomopatígeno a estudiar.

4.2.2. Antecedentes de calidad de las cepas del hongo *B. bassiana*.

Se procedió a identificar tres cepas promisorias (figura 7) del hongo *B. bassiana* de las cuales dos son nativas de la región Yungueña codificadas como: 24 PV/CC de Puente Villa, recolectado el 15-03-97 por Nicanor Cuba y David Cordero; 13 U/VB de Uyunense, recolectado el 05-02-97 por Verónica Benavides; y la cepa exótica codificada como Bb. 9205 proveniente de CENICAFE-Colombia. Parte de los antecedentes se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Antecedentes de calidad de las cepas en estudio.

Cepa	Número de controles	Concentración		Viabilidad (%)	Pureza (%)	Patogenicidad (%)
		conidias/mililitro	conidias/gramo			
24	-	$3.50 \cdot 10^7 / (105 \text{ l.})$	$1.4 \cdot 10^9$	-	-	98.0
13	-	$3.50 \cdot 10^7 / (37 \text{ l.})$	$1.4 \cdot 10^9$	-	-	97.0
9205	11	$3.87 \cdot 10^{11} \pm 0.44 \cdot 10^{11}$	$7.74 \cdot 10^9$	85 - 100	99,8	97.0

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



Figura 7. Cepas del hongo *B. bassiana*. A) Cepas 24 y 13; B) cepa 9205 (Bioplag).

Cordero (1999), manifiesta que la reproducción masiva en arroz de las cepas nativas 13 y 24 se obtuvieron entre 22 y 25 días a una temperatura de 25 ± 1 °C. El TL_{50} en 64 y 67 horas respectivamente; ensayo realizado en Cajas Petri con infección de brocas de $3.50 \cdot 10^7$ conidias/mililitro, no individualizadas con adición de 5 granos de café pergamino como sustrato alimenticio.

A su vez González *et al.* (1993) y Bustillo *et al.* (1998), señalan que la cepa Bb.9205 se lo obtiene en 15 días en reproducción masiva en sustrato de arroz a una temperatura de 25 a 27°C., por otra parte la cepa tiene un TL₅₀ de 92.4 y 54.72 horas (no reactivado y reactivado en *H. hampei*) realizado en bioensayo con brocas individualizadas con inoculación del hongo de 1*10⁷ conidias/mililitro.

4.2.3. Condiciones de laboratorio.

Siguiendo las recomendaciones de CENICAFE (1996), las condiciones ambientales dentro del laboratorio para los diferentes trabajos fueron controlados con rangos de temperatura y Humedad Relativa óptimos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedios generales de Temperatura y humedad relativa (Laboratorio)

Temperatura Máxima(°C)	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Promedio(°C)	Humedad Relativa (%)
26.8	22.26	24.20	68

Fuente: Propia

Por otra parte el laboratorio se mantuvo en condiciones asépticas con aseo periódico; mediante desinfección del piso con solución de hipoclorito de sodio al 10 %; los materiales de manipuleo con alcohol etílico al 96 % y la cristalería en general con calor húmedo a 100 °C. (Pérez, 2002).

4.3. Trabajos preliminares antes del bioensayo.

4.3.1. Reactivación de las cepas en estudio sobre *H. hampei*.

Con las recomendaciones de CENICAFE (1996), se seleccionaron brocas activas recolectadas de campo, que se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % por 10 minutos, luego se lavaron por tres veces consecutivas con agua destilada estéril (ADE) y se pasaron a papel absorbente estéril para su secado. Las brocas se infectaron en soluciones fungosas (figura 8)

en forma independiente con las cepas 24, 13 y 9205 por el lapso de tres minutos y se colocaron en cajas petri con papel absorbente previamente humedecidas con agua destilada (cámara húmeda) donde se evaluó el desarrollo del patógeno con esporulación abundante de conidias sobre la broca en un tiempo de 15 días; teniendo de esta manera los tratamientos con su potencial patogénico reactivado.

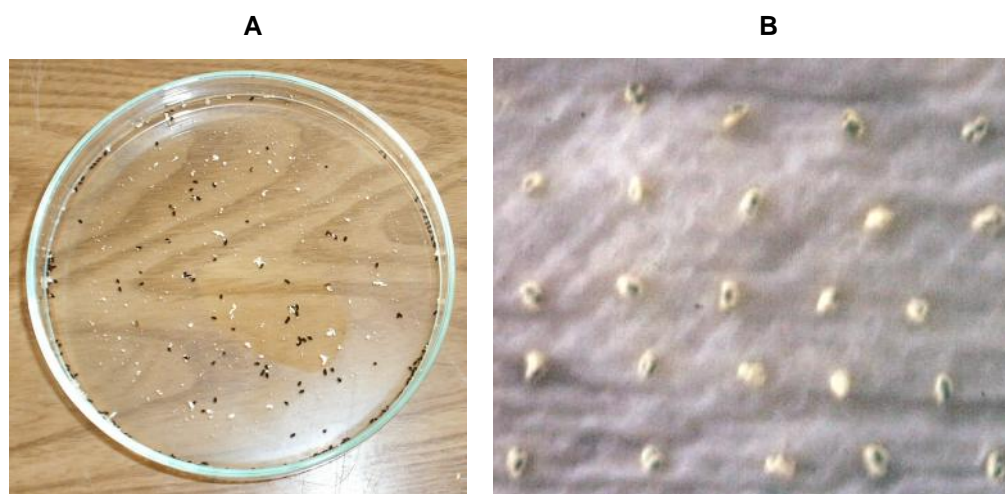


Figura 8. *B. bassiana* reactivado sobre *H. hampei*; A) Brocas sometidas al inóculo del hongo. B) Esporulación del hongo en cámara húmeda.

Según la recomendación de CENICAFE (1995), la ventaja que tiene este método, consiste en que el hongo aislado directamente del insecto es más virulento que permite obtener otros cultivos de primera generación.

4.3.2. Preparación de medios semisólidos para la siembra del hongo.

Los Medios de cultivo artificiales (figura 9) se emplearon para obtener unidades reproductivas e infectivas del hongo (conidias) en forma pura, libre de contaminantes. Los medios empleados fueron: Agar Nutriente (AN), Papa Dextrosa Agar (PDA) y Saboraud Dextrosa Agar (SDA) presentando características altamente higroscópicas, los elementos se detallan en el anexo 2. La preparación de estos medios de cultivo fue llevada adelante de acuerdo a las especificaciones estándar de los mismos con peso y volumen determinado, se

homogeneizo y esterilizo en la olla de presión por 30 minutos a una temperatura mayor a 100 °C. Luego se traslado a la “Cámara de flujo laminar” dotado de rayos ultravioleta, donde se enfrió y distribuyo el preparado en Cajas Petri, por el tiempo de 6 horas hasta adquirir la consistencia sólida deseada.



Figura 9. Medios de cultivo artificial; A) SDA, AN, PDA. B) Preparación de medios artificiales en matraz Erlenmeyer.

4.3.3. Aislamiento y siembra de *B. bassiana* en la obtención de la matriz o cepa madre .

Con la recomendación de CENICAFE (1995), las brocas muertas infectadas por el hongo se sometieron a hipoclorito de sodio al 8% durante dos minutos y se colocaron sobre algodón limpio para eliminar el exceso de hipoclorito, luego de procedió con la inoculación correspondiente en los medios de cultivo.

Esta operación se realizó en el área de inoculación en la Cámara de Flujo Laminar con limpieza y organización eficiente, contribuyendo a disminuir el riesgo de contaminación utilizándose para este fin implementos necesarios. En los aislamientos (cepas) se visualizaron los puntos más favorables a aislar y con la ayuda del asa de platino flameado y enfriado se traslado las conidias a las cajas petri con medios de cultivo ya preparados registrando la identificación, fecha y hora correspondiente de inoculación o siembra.

Las cajas petri sembradas con el hongo fueron llevadas a la cámara de incubación para su respectivo desarrollo para obtener bastante inóculo o esporulación a una temperatura de 22 a 26°C y un rango de luz de 6 a 12 horas con lámparas fluorescentes (4 tubos = 20 °lux) por 12 días.

La evaluación del desarrollo de las cepas del hongo se efectuó en el medio de cultivo SDA por ser apto para la producción de conidias, superior a AN y PDA (Anexo 2) a partir del segundo día posterior a la siembra, tomando los siguientes datos: Contaminación, crecimiento, forma, maduración y coloración del hongo; que se realizaron mediante estimación visual y medición lineal de la colonia.

4.3.4. Siembra del hongo a partir de la cepa madre

La producción masiva del hongo *B. bassiana* a partir de la cepa madre, se lo realizó sobre sustrato de arroz con el objeto de facilitar la concentración de conidias del hongo en determinado peso y volumen y a partir de estas realizar las pruebas de patogenicidad y virulencia en el bioensayo.

Se emplearon bolsas de polipropileno con una cantidad de sustrato de 100 gramos/bolsa, asegurando el cerrado con grapas. La esterilización se realizó en olla a presión a una temperatura aproximada de 121°C por un tiempo de 30 minutos. Las bolsas esterilizadas se trasladaron a la “Cámara de flujo laminar” donde se enfriaron y sometieron rayos ultra violeta por un tiempo de 6 horas.

Tomando las previsiones de asepsia con la ayuda del asa de platino y mechero Bunsen se realizó la inoculación de cepas del hongo, registrando fecha, código y replica. Las bolsas inoculadas se llevaron al área de “Desarrollo y maduración” donde por 48 horas se mantuvo en la “Cámara de incubación” para la respectiva germinación. Finalmente se dispusieron las bolsas en los estantes metálicos en forma ordenada; el desarrollo del hongo se evaluó por 25 días, periodo en el que se evidenció una maduración completa con esporulación abundante (figura 11).



Figura 10. Proceso de preparación de sustrato sólido de arroz. Llenado en bolsa, engrapado de bolsa y colocado en la olla a presión para su esterilizado.

A



B



**Figura 11. A) Incubación del hongo en sustrato de arroz en la Cámara de Incubación
B) Maduración del hongo en estante.**

4.3.5. Obtención de *H. hampei*, para la prueba de patogenicidad.

Con la recomendación de López (2003), se procedió a multiplicar *H. hampei* sobre granos de café pergamino con 45% de humedad en laboratorio con la finalidad de obtener brocas de una misma edad (homogéneo).

4.3.6. Lectura de conidias.

Prueba realizada en la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés que permitió el conteo de conidias del hongo *B. bassiana*, que sirvió de base para la dosificación de concentración deseada del patógeno en el bioensayo.

Se utilizó la metodología propuesta por Antia *et al.* (1992), y se procedió de la siguiente manera: En un vaso precipitado se hizo la solución o mezcla de agua destilada estéril (500 mililitros) con el hongo producido en fermentación sólida de arroz (100 gramos) y aceite agrícola carrier al 0.1 %, lo que represento la suspensión madre o dilución 10^0 ; de esta se tomo una submuestra de 1 mililitro pasando a un tubo con 9 mililitros de Agua destilada Estéril (ADE) preparando así la dilución 10^1 llevando 1 ml. de esta dilución a otro tubo con ADE 10^2 y así sucesivamente (10^3 , 10^4 , 10^n), hasta preparar la dilución apropiada que permitió el conteo para estimar el numero de esporas por mililitro de la suspensión.

Para el conteo de conidias se utilizo la Cámara de Neubauer (figura 12) y con el microscopio se observo que la cámara esta dividida en 2 retículos, cada una de estas áreas subdividida en 9 cuadros de 1 mm^2 con una superficie total de 9 mm^2 . Para el caso se utilizo el cuadrante central subdividido en 25 cuadrantes y estos a su vez en 16 cuadros más pequeños, cuyo factor constante es 10^4 .

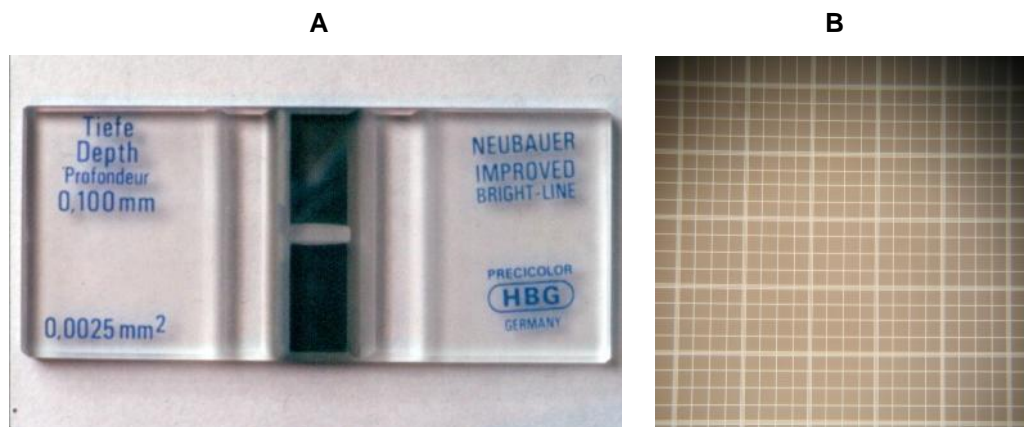


Figura 12. A) Cámara de Neubauer; B) Retículo central de conteo de la cámara.

Según CENICAFE (1996), el conteo se establece sumando el total de esporas presente en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. A cada submuestra se le realiza tres veces este procedimiento para un total de 6 lecturas. La dilución adecuada debe facilitar un conteo de 10 a 50 esporas por cuadrante.

En cada compartimiento o retículo de la cámara se deposita un aproximado de 0.01 mililitros de la dilución adecuada, dejando reposar medio minuto antes de proceder al conteo, se lleva la cámara al microscopio y con el objetivo 10X se localiza el campo visual, luego se pasa al objetivo 40X procediéndose al conteo.

La concentración se estima de la siguiente forma:

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

Donde:

C = Concentración que se desea conocer

N = Número promedio de esporas por cuadrante.

4.4. Trabajos concernientes al bioensayo.

4.4.1. Viabilidad de conidias del hongo.

Prueba realizada en la Facultad de Agronomía UMSA, con las recomendaciones de Marín (1994) y Vásquez (2007), se estableció la viabilidad de las cepas del hongo a través de la germinación de conidias de la siguiente manera:

1. Se tomaron submuestras preparadas (dilución adecuada) de la prueba de concentración de conidias.
2. Se inocularon en las cajas petri con el medio de cultivo SDA a razón de 5 alícuotas e incubaron a 24 ± 2 °C durante 12 horas.

3. Luego de la incubación, se cortaron las alícuotas depositándolas sobre el “portaobjetos” adhiriendo las colonias del hongo, fijadas con alcohol etílico al 96% evitando la desnaturalización, se empleo colorante policrómico para el teñido de conidias y se espero por 5 minutos lavando con Agua Destilada Estéril el exceso de colorante.
4. La observación se hizo en microscopio en el objetivo 10X y 40X respectivamente, contando 100 conidias (germinadas y no germinadas) por alícuota, calculándose el porcentaje de germinación.

4.4.2. Acondicionamiento del material para el bioensayo.

Se procedió con la esterilización de cajas petri y viales en vapor húmedo a 100°C por 15 minutos, se cortaron discos de papel absorbente para la base dentro del vial, asimismo se preparó motas de algodón (tapón de vial) y se identificaron las cajas petri y las botellitas con sus respectivos tratamientos.

4.4.3. Obtención de café pergamino para la alimentación de *H. hampei*.

Con las sugerencias de Soleibe y Toro (2005), se recolectó de campo café guinda procediendose al despulpado, fermentado, lavado y secado, obteniendo café pergamino para ser incorporado a los viales como sustrato alimenticio de brocas.

4.4.4. Dosificación del hongo *B. bassiana* para la prueba de patogenicidad.

Con las recomendaciones de Gonzáles *et al.* (1993), Bernal *et al.* (1994) y López (2003) se aplico la concentración del entomopatógeno de 1×10^7 conidias/mililitro, asemejando a condiciones naturales de campo para el control de *H. hampei*. Se tomo la reproducción masiva del hongo en sustrato de arroz de cada cepa o tratamiento siguiendo los pasos de suspensión, dilución y lectura de conidias ya descrito en el acápite 4.3.6. (Lectura de conidias).

Tomando a Rogg *et al.* (1997), se ajusto la concentración deseada de $1 \cdot 10^7$ conidias/mililitro con la siguiente formula:

$$\mathbf{C.i. \times V.i. = C.f. \times V.f.}$$

Donde:

C.i. = Concentración inicial.

C.f. = Concentración final.

V.i. = Volumen inicial.

V.f. = Volumen final.

4.4.5. Infección de la broca del café con el hongo y su disposición en viales.

Realizada el ajuste de la solución fungosa de las cepas de *B. bassiana*, se procedió a la infección de *H. hampei* por inmersión por 3 minutos y las brocas testigo se sometieron a inculo de agua. Los insectos se dispusieron en el vial en forma individualizada, tapándose el vial con mota de algodón para impedir la salida de la broca y mantener las condiciones de alta humedad, indispensable para el desenvolvimiento de la plaga y el proceso infectivo del hongo.

Méndez (1990), sostiene que la individualización de las brocas permite establecer el efecto directo sobre cada broca evitando el contagio que puede ocurrir cuando se evalúan poblaciones en las que una broca infectada puede enfermar otras de la población, produciendo un sesgo en la información.

4.4.6. Adición de grano pergamino y agua destilada (ADE) en los viales.

A las 24 horas después de la inoculación del hongo sobre la broca del café se adiciono a cada vial un grano de café pergamino, que sirvió para la infestación de *H. hampei* (figura 13). Por otra parte se adiciono diariamente 0,2 mililitros de Agua Destilada Estéril, para mantener la alta humedad requerida.

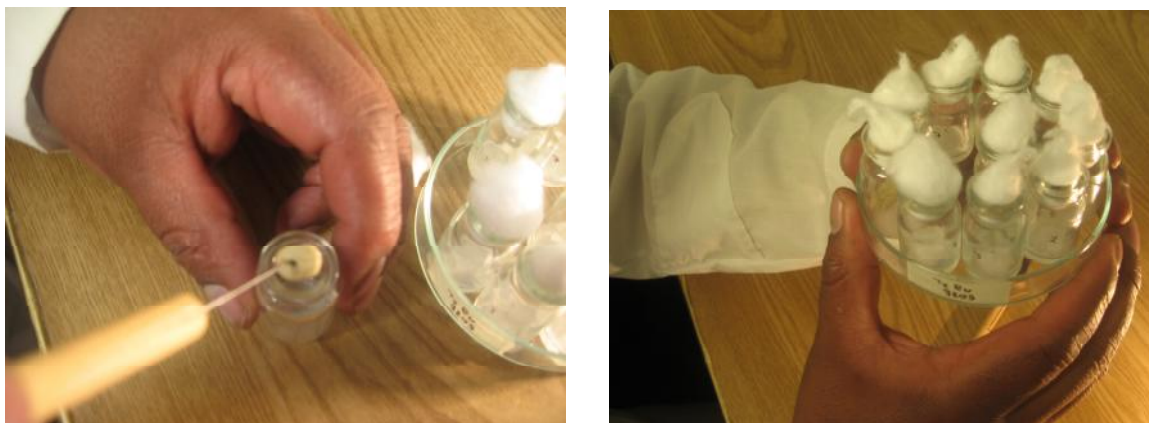


Figura 13. Adición de café pergamino en vial y tratamiento listo para su evaluación.

4.4.7. Evaluación de la patogenicidad de *B. bassiana* sobre *H. hampei*.

Tomando a Alves (1986), Gonzáles *et al.* (1993), Vélez *et al.* (1999) y López (2003), el bioensayo determino el potencial agresivo de *B. bassiana* en términos de patogenicidad y virulencia sobre *H. hampei* en condiciones de laboratorio.

CENICAFE (1996), señala que el bioensayo determina la ocurrencia de mortandad por causas patogénicas, mortandad por otras causas, sobrevivencia e infestación de granos pergamino, considerando el 100% de la población de insectos.

El bioensayo se realizó en condiciones ambientales de temperatura adecuada (Anexo 2), para favorecer el desenvolvimiento del hongo en la germinación, invasión y colonización sobre la plaga broca del café. Se evaluó diariamente la mortandad de brocas por causas patogénicas, el ciclo del hongo y el grado de infestación del insecto sobre el café pergamino. La broca del café viva o muerta permaneció en los viales con el objeto de no interrumpir la dinámica del insecto y el desarrollo hongo, de esta manera no conducir a resultados errados.

4.5. Variables de respuesta.

Considerando la importancia de los datos obtenidos en el estudio, respecto a los tratamientos se evaluó las siguientes variables:

- Desarrollo de tres cepas del hongo *B. bassiana* en cultivo artificial y natural, determinando las características de crecimiento en un tiempo establecido.
- Viabilidad del hongo, determinándose mediante la germinación de conidias en un tiempo, indicando los potenciales germinativos de las cepas, requisito para las pruebas patogénico-virulentos.
- Modo de acción del hongo sobre la broca, donde se determino las fases y las etapas de desarrollo.
- Patogenicidad y virulencia del hongo, en el primer caso se determino la mortandad de *H. hampei* por causa del hongo y el grado de infestación de la broca a granos pergamino; en el segundo caso se determino los parámetros medibles de agresividad del hongo: mortandad diaria de brocas, mortandad acumulada, Tiempo letal medio (TL₅₀), tiempo al 100% de mortandad y tiempos de las distintas etapas de desarrollo del hongo sobre la broca.

4.6. Diseño experimental.

El presente estudio se llevo bajo el diseño “COMPLETAMENTE AL AZAR” con cuatro tratamientos (Inoculo de hongo de tres cepas promisorias y un testigo sin inoculo) en cuatro repeticiones, con 16 unidades experimentales, empleando 10 brocas por tratamiento con 40 individuos por repetición y un total de 160 insectos con un margen de error del 5%. El modelo lineal aditivo se expresa en la forma:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{i(j)}$$

Donde:

Y_{ij} = Observación del i-esimo tratamiento en la j-esima repetición

μ = Media general

T_i = Efecto del i-esimo tratamiento

$E_{i(j)}$ = Error experimental.

4.6.1. Tratamientos.

T₁ = Cepa 24 PV/CC (nativa)

T₂ = Cepa 13 U/VB (nativa)

T₃ = Cepa Bb. 9205 (exotica)

T₄ = Testigo (sin inoculo)

4.6.2. Croquis del experimento.

Repeticiones	Tratamientos			
	1	2	3	4
I	9205	13	T	24
II	T	24	13	9205
III	13	9205	T	24
IV	24	9205	13	T



Figura 14. Croquis de distribución de tratamientos en Diseño Completamente al Azar (superior); distribución de tratamientos en el bioensayo (inferior).

4.6.3. Análisis estadístico.

Los datos se tabularon e interpretaron en cuadros, curvas de distribución e histogramas; realizando las siguientes pruebas: Análisis de Varianza, Prueba Duncan, Varianza, Desviación Estándar y Límite de Confianza.

Los datos obtenidos en el experimento (porcentaje) se sometieron a una transformación angular (grados) con la formula: $\arcsen \sqrt{X}$.

Por regla general, los datos en porcentaje tienen una distribución binomial en vez de una distribución normal; requiriendo una transformación apropiada para este tipo de datos con el nombre de angular o arcoseno (Tabla de Fisher y Yates) obteniéndose mediante la determinación del ángulo cuyo seno es la raíz cuadrada de la proporción. (Steel y Torrie 1988; Little y Hills, 1990; Calzada, 1982;).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Desarrollo del hongo en medios de cultivo artificial y natural.

Tomando los trabajos preliminares del bioensayo se evaluó el desarrollo de *B. bassiana* a través de las tres cepas en estudio sobre sustratos artificial y natural.

En la producción de cepas madre de *B. bassiana* se observó contaminación mínima por hongos saprofitos (*Aspergillus sp* y *Rhizopus sp.*) y bacterias (figura 15). Esto indica que la broca muerta con infección del hongo presentó agentes no deseables en mínima proporción que no se observaron a simple vista por lo que se tomaron las previsiones necesarias para su eliminación y obtener cepas puras garantizando la pureza del patógeno para la replica correspondiente.

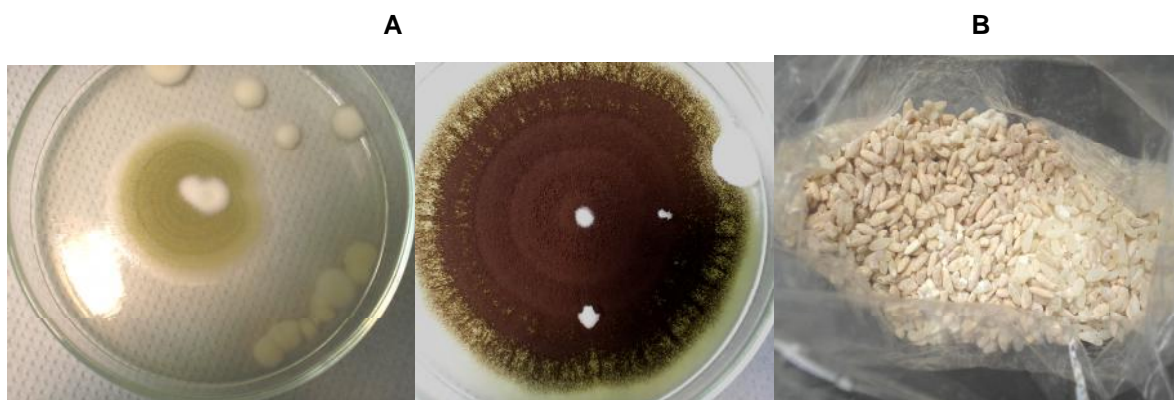


Figura 15. Contaminación en medios de cultivo. A) cultivo artificial afectado por *Aspergillus sp* y *Rhizopus sp.* B) cultivo de arroz con contaminación bacteriana.

El desarrollo de cepas del hongo en cultivo artificial Saboraud Dextrosa Agar se detalla en el cuadro 5 y anexo 5; se dio en “Anillos concéntricos” (figura 17) con una leve superioridad poco significativa de la cepa 9205 respecto a la cepa 13 y 24. Con respecto a la consistencia y coloración, se observó diversidad metabólica con diferencias marcadas (figura 16): la cepa 24 presentó una consistencia algodonosa con formación de estructuras conocidas como sinemas de coloración cremoso-amarillento intenso, con esporulación basal y aérea; la cepa 13 de

consistencia algodonosa en principio, estructura espiral compacta que con el tiempo se volvió conidiogénica pulverulenta a la maduración de conidias, sin presencia de sinemas, de coloración crema; la cepa 9205 presento características similares a la cepa anterior con diferencia en la coloración blanquecina intensa.

**Cuadro 5. Desarrollo del hongo en medio de cultivo artificial SDA.
(12 días de evaluación)**

Cepa	Diámetro total cm.	Crecimiento diario cm.	Superficie de crecimiento cm²
24	7.5	0.63	11.78
13	7.6	0.63	11.94
9205	8.4	0.70	13.19
Promedio	7.8	0.65	12.30

Fuente: Propia

El desarrollo del hongo en sustrato de arroz presentó las siguientes características: consistencia algodonosa (crecimiento micelial blanco), con esporulación a partir de los 10 días de forma heterogénea, con uniformidad de crecimiento y coloración característica a los 15 días, con cubrimiento total del sustrato hasta los 20 días, donde manifestó un desarrollo completo con abundante esporulación pulverulenta .

Los resultados de producción en medios de cultivo artificial y natural confirman lo manifestado por Narváez *et al.* (1997), que la producción de esporas es dependiente del sustrato en el cual se desarrolla el hongo, vale decir que los aislamientos 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 artificial respecto al sustrato de arroz. Asimismo las características morfológicas y de pigmentación indica la diversidad metabólica en hongos del género *Beauveria* de acuerdo a la procedencia de las mismas (Castañares, 1993).

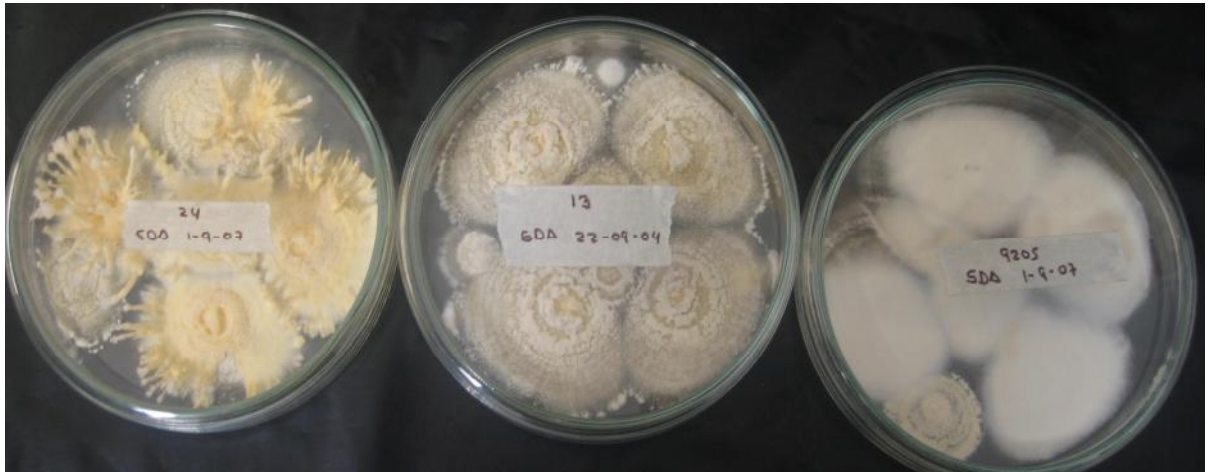


Figura 16. Características de las cepas de *B. bassiana* en el medio de cultivo Saboraud Dextrosa Agar (SDA).

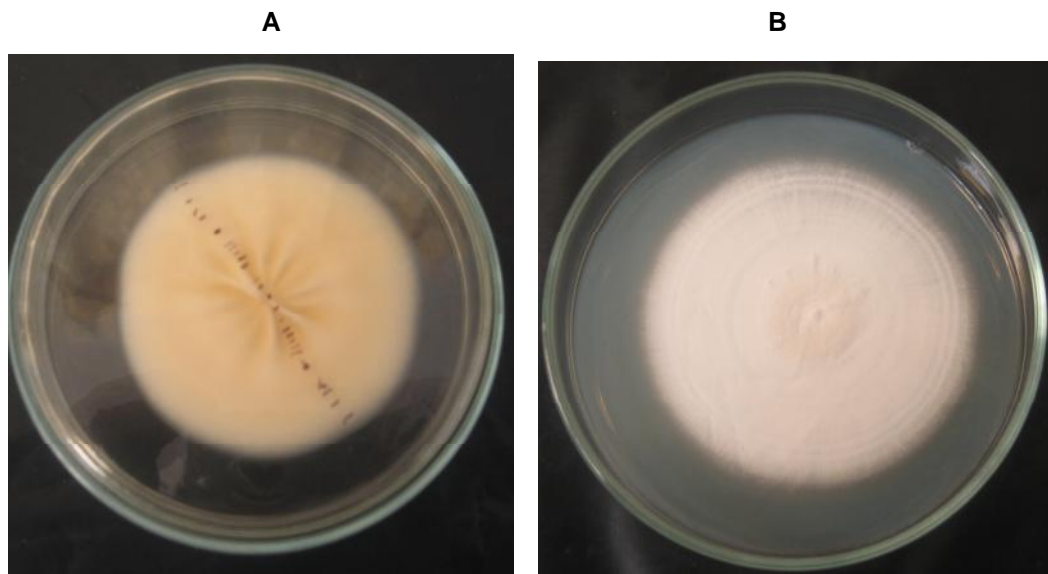


Figura 17. Desarrollo de *B. bassiana* en medio de cultivo artificial. A) Medición del crecimiento (caja petri invertida). B) Desarrollo del hongo en círculos concéntricos (Vista frontal).

5.2. Evaluación de la viabilidad del hongo.

La prueba de viabilidad del hongo se realizó en base a la lectura de conidias (anexo 4), obtención de la dosificación, inóculo en alícuotas y la lectura correspondiente de germinación de conidias (figura 18).

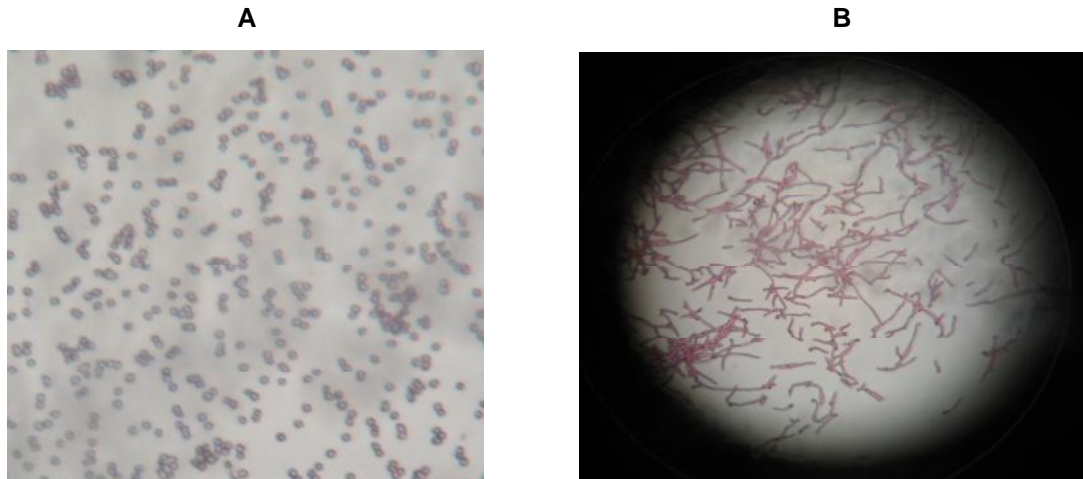


Figura 18. A) conidias de *B. bassiana*. B) conidias germinadas.

La prueba de viabilidad (Anexo 6) de las cepas del hongo *B. bassiana* hasta las 12 horas, dieron promedios de germinación de 91.0%, 92.0% y 91.8% en las cepas 24, 13, y 9205 respectivamente, con variabilidad poco significativa entre tratamientos con un promedio de germinación de 91.73 ± 5.53 %.

Los porcentajes de germinación de las cepas en estudio son superiores al 85 % (parámetro de comparación) lo que indica la buena calidad biológica de conidias empleada en el presente trabajo de investigación, lo que cumple con lo manifestado por (Marín, 1994).

Por otra parte Lazo (1990), indica que la calidad del inóculo de un entomopatógeno se relaciona con la viabilidad de las conidias generando variabilidad en las respuestas de patogenicidad sobre el hospedero, lo que se evidencia más adelante en los acápites posteriores de patogenicidad y virulencia.

5.3. Patogenicidad de *B. bassiana* sobre *H. hampei*.

La sobrevivencia de brocas después de su desinfección con hipoclorito de sodio al 0.5 % fue del 100%, no afectando e inhibiendo el proceso germinativo de conidias de las cepas estudiadas del hongo sobre el escolitido.

Esto confirma lo citado por Gonzáles *et al.* (1993), que en un bioensayo de patogenicidad de *B. bassiana* empleo la misma dosis de desinfección de hipoclorito de sodio con sobrevivencia de brocas del 100% (10 días), no afectando la viabilidad del hongo.

Asimismo Jiménez (1992), obtuvo una sobrevivencia del 80% al efectuar la desinfección con hipoclorito de sodio al 5% (concentración alta) durante 5 minutos, demostrando la fortaleza del insecto a concentraciones elevadas del desinfectante.

A las 36 horas se observó en las brocas tratadas con el hongo *B. bassiana* los síntomas de enfermedad, reflejándose en la dinámica del insecto, con menor actividad de brocado sobre el grano pergamino y descoordinación en movimientos en comparación con el testigo que manifestó todo lo contrario (actividad dinámica).

Lo que concuerda con Alves (1986) y la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (1997), indicando que insectos adultos infectados por *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentan movimientos lentos, pierden coordinación, no se alimentan, reducen su radio de acción y afectan la oviposición.

5.3.1. Análisis de varianza de la patogenicidad del hongo.

La patogenicidad de cepas del hongo tiene relación con el porcentaje de brocas muertas. El análisis de varianza en base a datos transformados demuestra que existe una diferencia significativa alta con relación a las cepas de *B. bassiana*, lo que expresa diferencias entre los tratamientos de las cepas del hongo y el testigo respectivamente (cuadro 6).

La diferencia significativa en el ANVA señala que la patogenicidad de cepas 24, 13 y 9205 del hongo *B. bassiana*, son determinantes en la capacidad de provocar enfermedad y posterior mortalidad de *H. hampei*.

Cuadro 6. Análisis de Varianza para la mortandad de brocas (Patogenicidad)

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)
Tratamientos	3	18217.69	6072.563	77.365	3.49*
Error	12	941.90	78.492		
Total	15	19159.59			

Coefficiente de Variación = 15.66%.

Cuadro 7. Comparación de promedios de mortandad de brocas por causa del hongo *B. bassiana*.

Tratamientos	13	9205	24	Testigo
Promedios	85.40	78.75	62.15	0.0

Duncan P 0.05

El análisis de la prueba de comparación Duncan de la patogenicidad de las cepas (cuadro 7), permitió analizar la variabilidad de mortandad en términos estadísticos a una concentración estándar de 1×10^7 conidias/mililitro del hongo y 0.0 conidias /mililitro en el testigo que no presento mortalidad alguna por causas patogénicas.

En la prueba se observa la superioridad de la cepa 13; con similitud de mortandad entre la cepa 13 y 9205 lo que en términos estadísticos no es significativo, pero estos si son significativos con relación a la cepa 24 y testigo respectivamente, lo que indica comportamientos diferenciados de patogenicidad del hongo sobre el hospedero broca de café.

5.3.2. Mortandad por el hongo, otras causas y sobrevivencia de *H. hampei*.

En el anexo 10 se muestra en los diferentes tratamientos y repeticiones la ocurrencia de mortalidad por causas patogénicas del hongo, mortalidad por otras causas y la sobrevivencia de *H. hampei* que se resume en el cuadro 8. Los datos correspondientes detallan la evaluación sobre 40 individuos lo que representa el 100%, lo que equivale que cada broca o individuo tome el valor de 2.5%.

Cuadro 8. Mortalidad por el hongo, mortalidad por otras causas y sobrevivencia de la broca del café

	Total	Mortalidad (%)		Vivos	Total
Tratamientos	adultos	<i>B. bassiana</i>	Otras causas	(%)	(%)
24	40	77.5	20.0	2.5	100.0
13	40	97.5	2.5	0.0	100.0
9205	40	92.5	5.0	2.5	100.0
Testigo	40	0.0	2.5	97.5	100.0

Fuente: Propia

Los resultados de mortalidad de brocas del cuadro 8, muestra la superioridad en efectividad de la cepa 13 en 5% y 20% en relación a la cepa 9205 y 24 en el cuarto y sexto día respectivamente (Anexo 7). La patogenicidad de cepas del hongo sobre la broca del café es alta, lo que da a entender que las cepas tienen un alto potencial agresivo y el porque de su selección y uso en la actualidad en condiciones de campo.

Lo que concuerda con Jiménez (1992), quien indica que aislamientos activados y/o reactivados sobre hospederos cambian las características fisiológicas y genéticas del hongo en cuanto a su patogenicidad y agresividad (virulencia).

Por su parte Alves (1986), indica que los entomopatógenos presentan una variabilidad genética recurrente de heterocariosis que resulta del control de muchas plagas con diferentes grados de patogenicidad, virulencia, especificidad producción de conidias y resistencia a factores abióticas.

En lo referente a la mortandad por otras causas el mayor porcentaje se presenta en la cepa 24, por encima de 15.0% y 17.5% respecto a la cepa 9205, 13 y testigo respectivamente; dando a entender que las brocas murieron por causas de manipuleo en la disección de granos pergamino, aplastamiento y causas desconocidas. Por otra parte acotar la eficiencia del hongo sobre el insecto en

contacto, adhesión y germinación que favorecieron en la patogenicidad del hongo sobre la broca del café.

Los insectos vivos en los tratamientos 24, 9205 y 13 son inferiores en 95% y 97.5% con relación al testigo, lo que demuestra la eficiencia del entomopatógeno en el proceso infeccioso de enfermedad y mortandad de *H. hampei*.

En forma general la mortalidad promedio de escolitidos por patogenicidad de cepas del hongo es de 89.16%, mortalidad por otras causas 9.16% y sobrevivencia de 1.6%.

Alves (1986), indica que el punto mas critico de los hongos entomopatógenos referente al modo de infección es esencialmente por contacto, dificultando la determinación exacta del número de esporas envueltas en el proceso infeccioso, siendo a la vez difícil garantizar la permanencia de la suspensión sobre el tegumento del insecto hospedero, además la utilización de desinfectantes, dispersantes y adherentes podría perjudicar la germinación o infección de los hongos.

Asimismo CENICAFE (1990), manifiesta que los patógenos una vez que entran en contacto con el hospedero, se multiplican rápidamente causando enfermedad que con frecuencia no siempre es mortal, por factores bióticos y abióticos.

5.3.3. Evaluación de la infestación de *H. hampei*.

La infestación se relaciona por la acción de perforación, penetración y posición de la broca de café en el grano pergamino **a, b, c** y **d** (figura 3). Por consiguiente mediante observación del comportamiento del escolitido sobre los granos pergamino y disectación de las mismas, se determinó el grado de ataque y posición del insecto sobre el grano pergamino en los tratamientos (cuadro 9).

**Cuadro 9. Posición de *H. hampei* sobre el grano pergamino
(Posición a, b, c, d)**

Tratamientos	No. granos	Posición de daño (%)				Total (%)
		a	b	c	d	
24	40	32.5	22.5	20.0	25.0	100.0
13	40	30.0	35.0	32.5	2.5	100.0
9205	40	30.0	30.0	32.5	7.5	100.0
Testigo	40	2.5	10.0	10.0	77.5	100.0

Fuente: Propia

A las 24 horas de adicionado el grano pergamino en los tratamientos, los escolitidos de forma inmediata buscaron e iniciaron la perforación del mismo de manera dinámica. Con el transcurso del tiempo las brocas tratadas con hongo disminuyeron su actividad contrario a las brocas testigo que continuaron su infestación sobre la almendra en el proceso respectivo de bioensayo (anexo 11).

Como se observa en el cuadro 9, las posiciones de ataque (**a**, **b**, **c** y **d**) de la broca de café sobre el grano pergamino (promedio 160 granos), en los tratamientos con el hongo presentaron los siguientes niveles promedio: almendra sin daño 31.6% (posición **a**), daño inicial o mínimo 29.2% (posición **b**); daño intermedio 28.3% (posición **c**) y daño severo con 11.7% (posición **d**). El testigo presenta la siguiente relación: posición **a** (2.5%), posición **b** (10.0%), posición **c** (10.0%) y posición **d** (77.5%).

Estos datos llevan a concluir que las brocas tratadas con *B. bassiana* por efectos de enfermedad y posterior muerte tuvieron una menor actividad por consiguiente una menor capacidad de causar daño en los granos pergamino con relación al testigo que presentó un ataque de daño superior.

Bustillo (2002), se evidencia la posición de ataque de la broca manifestada en el fruto de café cereza, variando el grado de daño en la almendra por la condición del grano (café pergamino).

A su vez González *et al.* (1993), en bioensayo con *B. bassiana*, manifestó que la broca tuvo una menor capacidad de brocado hacia los granos pergamino, con ataque de 14.44% en los tratamientos con el hongo y 44.40% en el testigo en un número promedio de 90 granos.

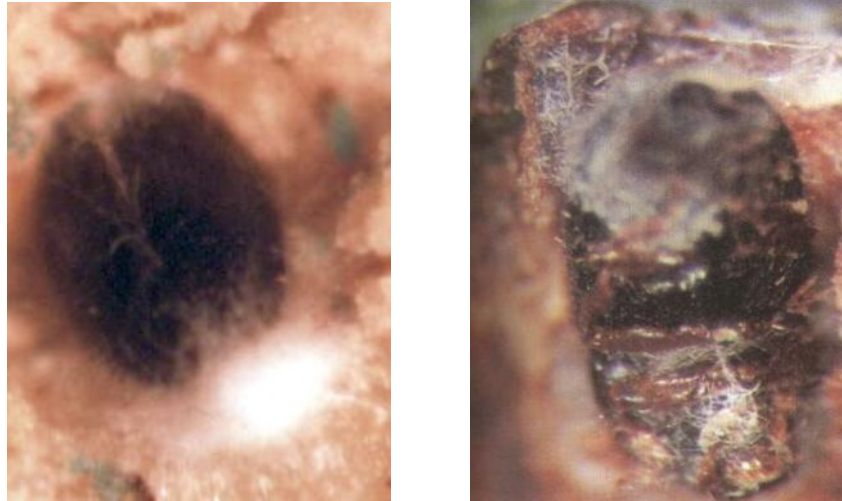


Figura 19. Broca del café controlada por *B. bassiana* en posición de ataque en grano pergamino (posición a y b).

Relacionando la sobrevivencia de *H. hampei* con el ataque de granos pergamino en los tratamientos, el testigo con 97.5% (vivos) y un ataque severo de establecimiento en el grano de 77.5% (posición d) del cual un 47.5% presenta oviposición con un promedio de 7.2 huevos. En los tratamientos con el hongo no se evidenció descendencia alguna.

Estos resultados confirman los efectos benéficos de patogenicidad de las cepas del entomopatógeno *B. bassiana* sobre *H. hampei* con capacidad de enfermar, matar y provocar desajustes fisiológicos en insectos sobrevivientes en este caso afectando el aparato reproductor (esterilidad).

En este sentido Alves (1986), señala que el ataque de los patógenos en los órganos o sistemas del insecto altera las funciones provocando desajustes

fisiológicos, afectando el sistema digestivo, respiratorio, circulatorio, adiposo, excretor, nervioso y reproductivo.

A su vez la Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (1997), indica que un entomopatógeno infeccioso tiene la capacidad patogénica de enfermar, invadiendo y provocando anormalidad o matando al hospedero.

5.4. Modo de acción del entomopatógeno.

En el modo de acción del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café, se tomó en cuenta el ciclo de vida del entomopatógeno a partir de la infección, mediante observación.

El hongo estudiado pertenece a la clase más avanzada, causando la mortalidad del huésped, presumiendo la acción de germinación de conidias, secreción de enzimas para digerir y penetrar la epicutícula, ácidos metabólicos que solubilizan proteínas cuticulares y la producción de metabolitos tóxicos liberados en el hemocele provocando desajustes fisiológicos y posterior muerte del escolitido, evidenciándose la fase patogénica. La fase saprofitita se inicio después de la muerte del insecto evidenciando el desarrollo externo del hongo (características estructurales del hongo).

En general en el ciclo de desarrollo del hongo (fase patogénica y saprofitita) sobre la broca del café se identificaron cinco etapas: 1) muerte del insecto por causa del hongo 2) inicio de micelio, de aspecto algodonoso poco abundante de coloración blanquecina. 3) cubrimiento de micelio, de forma abundante y compacta. 4) conidiogénesis, formación de conidioforos y conidias del hongo. 5) liberación de conidias, de aspecto polvoriento (figura 20).

En este sentido rescatamos a BROCARIL (2002), Bustillo y Baker (1990), quienes afirman que sin excepción, los entomopatógenos penetran e infectan al insecto

directamente a través de la cutícula usando un complejo de enzimas; una vez en el interior del insecto el hongo se multiplica rápidamente por gemación o fisión hifal, y las células se diseminan en el cuerpo provocando la muerte del insecto.

Asimismo señalan que las hifas del patógeno emergen a través de la cutícula del hospedero solo después de la muerte, desarrollándose el micelio externo y las esporas se liberan pasiva o violentamente para continuar el ciclo de infección. Por otra parte la toma de nutrientes del hospedero y de agua por las hifas de rápido crecimiento, originan la desecación o momificación del insecto (Kativar, 1984).

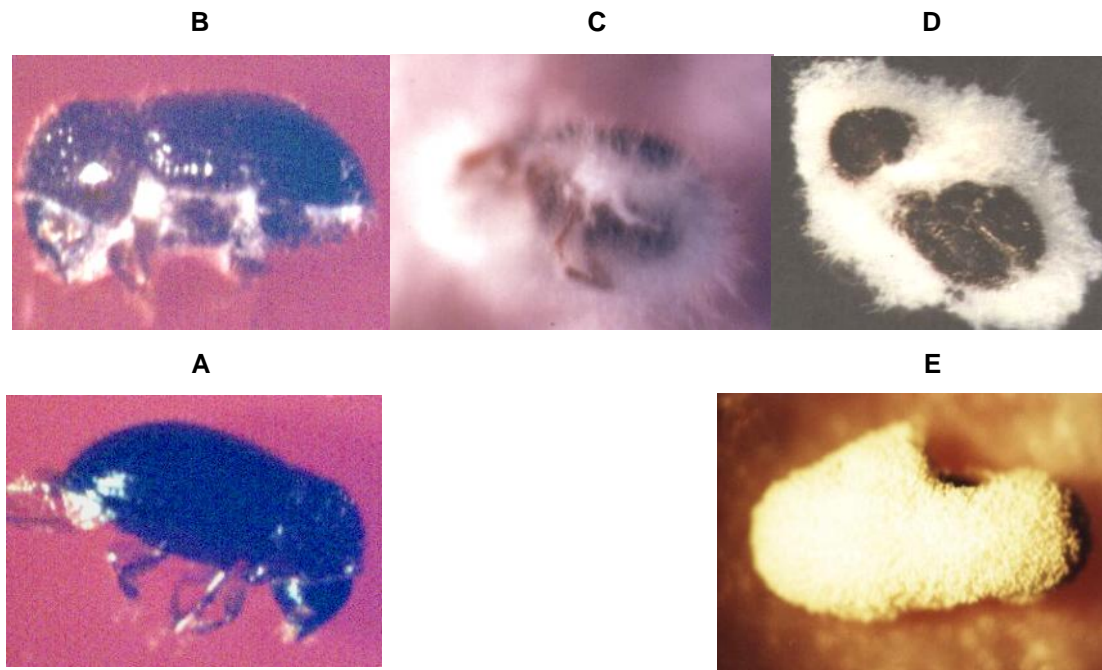


Figura 20. Etapas de desarrollo de *B. bassiana* sobre *H. hampei*. A) Muerte; B) Inicio de micelio; C) Cubrimiento de micelio; D) Conidiogénesis; E) Liberación de conidias.

5.5. Evaluación del grado de virulencia de *B. bassiana*.

Por las condiciones controladas del bioensayo en laboratorio se realizó la medición de virulencia (grado de agresividad) con respecto a la patogenicidad,

especificando el comportamiento del hongo hacia la broca, con las siguientes acciones básicas: Mortalidad diaria, mortalidad acumulada, tiempo letal medio (TL₅₀), Tiempo total de mortandad y tiempos del ciclo de desarrollo del hongo.

Alves (1986), indica que existe una serie de métodos (selección natural, químico, genético y otros) para evaluar la virulencia contra un determinado insecto. El método del proceso biológico con la reactivación del entomopatógeno en hospederos con resultados de mortandad se considera un mejoramiento natural para aumentar la virulencia.

5.5.1. Mortalidad diaria de la broca.

La mortalidad diaria de población de *H. hampei* por acción del hongo *B. bassiana* en los diferentes tratamientos (cepas) presentaron diferente distribución durante el periodo evaluado (Figura 21).

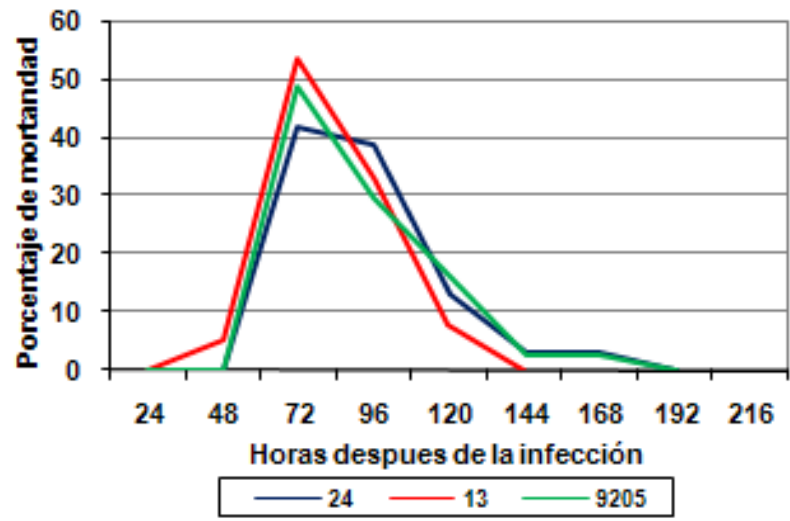


Figura 21. Distribución de la mortalidad diaria de población de brocas.

En la cepa 24, la mortalidad de brocas se inicio después de las 48 horas (61.35 horas), el mayor porcentaje 41.94% se presentó hasta las 72 horas, seguido de 38.70% hasta las 96 horas, 12.90% (120 horas), 3.23% (144 y 168 horas). La mortalidad se extendió hasta las 192 horas (147.77 horas).

Cepa 13, la mortalidad se inicia a partir de las 24 horas (29.37 horas) registrando la máxima mortandad de 53.84% hasta las 72 horas, seguido de 33.33% (96 horas), 7.70% (120 horas) y 5.13% (48 horas). La mortalidad finalizo hasta las 120 horas (115.27 horas).

En la cepa 9205 la mortalidad se inicia después de las 48 horas (52.66 horas), el mayor porcentaje de 48.65% se da hasta las 72 horas, seguido de 29.73% (96 horas), 16.22% (120 horas) y 2.70% (144 y 168 horas). La mortalidad de escolitidos finaliza hasta las 168 horas (148.12 horas).

Los resultados muestran que la cepa 13 tiene mayor porcentaje de mortalidad diaria de escolitidos respecto a las cepas 9205 y 24. De manera general las 3 cepas muestran una efectividad notable en la mortandad de población de *H. hampei* lo que se traduce en agresividad o virulencia.

5.5.2. Mortalidad acumulada, Tiempo Letal Medio (TL₅₀) y Mortalidad Total.

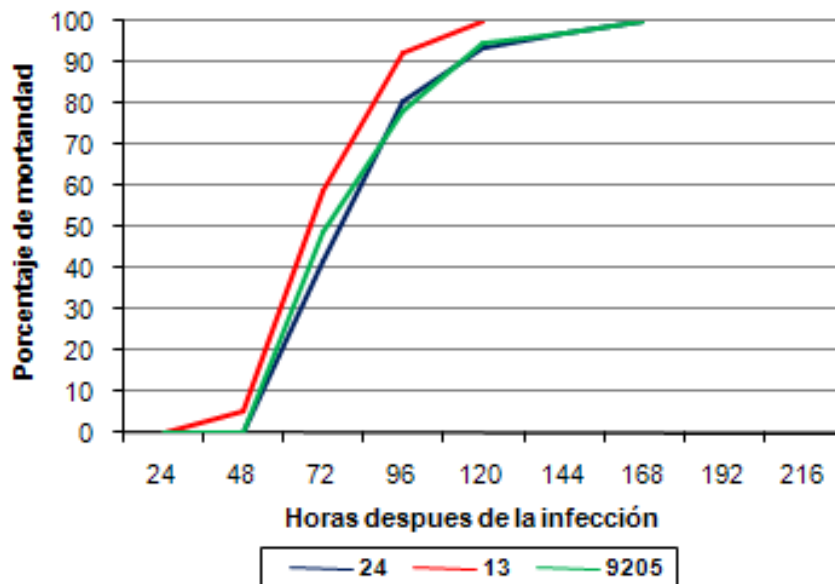


Figura 22. Mortalidad acumulada de *H. hampei*.

La mortalidad acumulada estandarizada por CENICAFE (figura 22), muestra el comportamiento variable de mortandad de población de *H. hampei* por acción de

B. bassiana de manera progresiva identificando a la cepa o tratamiento con mayor potencial agresivo o virulento. La mortalidad acumulada permitió determinar el Tiempo Letal Medio (TL₅₀), tiempo en que muere el 50% de la población de brocas y a la vez se determino el Tiempo Total en que muere el 100% de escolitidos.

En el tiempo al 50% la mortandad de población de brocas (TL₅₀), se tiene, 76.48 horas (3.2 días), 67.59 horas (2.8 días) y 72.18 horas (3.0 días) y al 100% de brocas muertas a las 147.77 horas (6.2 días), 115.27 horas (4.8 días), 148.12 horas (6.2 días) en las cepas 24, 13 y 9205 respectivamente (figura 22 y 23).

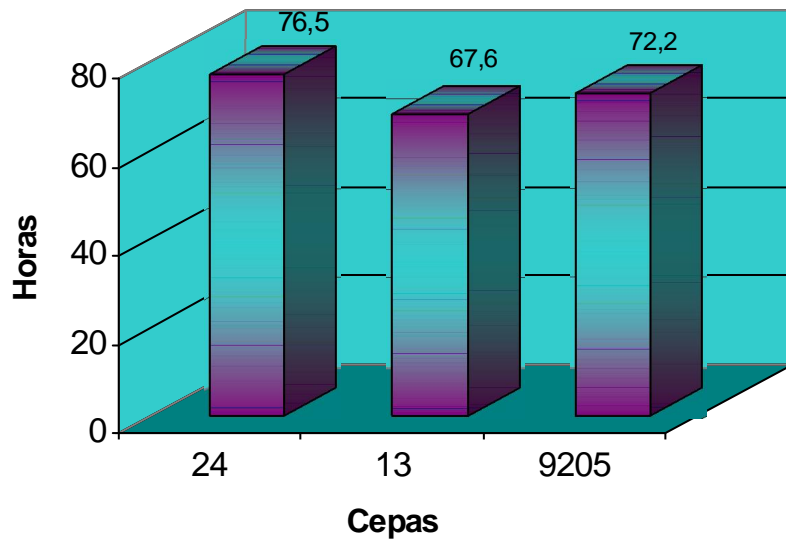


Figura 23. Tiempo para el 50% de mortandad de población de brocas (TL₅₀).

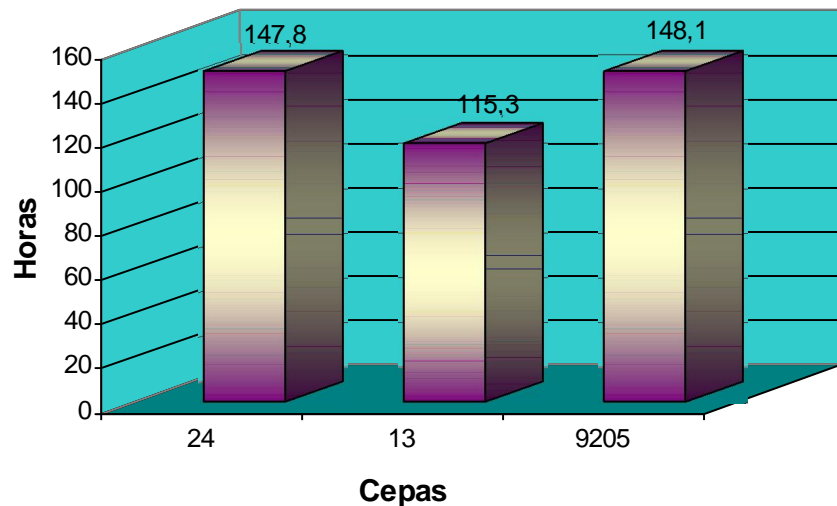


Figura24. Tiempo para el 100% de mortandad de población de brocas.

Analizando los resultados, en TL_{50} , se evidencia la superioridad (poco significativo) de la cepa 13 seguido de la cepa 9205 y 24, sacando una ventaja de 4.59 y 8.89 horas respectivamente. De la misma forma en la mortalidad total del 100% de escolitidos la cepa 13 presenta mayor agresividad o virulencia sacando una ventaja de 32.50 y 32.85 horas respecto a la cepa 24 y 9205.

Relacionando las características de antecedente (acápite 4.2.2.) de las cepas, los resultados evidencian una diferencia en cuanto a los análisis realizados, bajando su eficiencia con lo realizado actualmente; dando a entender que el patógeno por heterocariosis sufrió una serie de cambios genéticos, otro que el método de bioensayo empleado y las concentraciones empleadas contribuye a esta variación.

La virulencia de las cepas evaluadas demuestra el potencial patogénico actual que tienen para su uso en condiciones de campo, hasta una nueva selección de cepas, estas seguirán como promisorias por su alta eficiencia agresiva, garantizando el control de la plaga específica broca del café.

Jiménez (1992) y Gonzáles *et al.* (1993), aseveran que aislamientos reactivados y/o provenientes de otros insectos, pueden ser potencialmente más activos contra insectos de otros ordenes, lo que justifica el método de bioensayo luego de la reactivación del hongo estudiado sobre la broca del café.

Alves (1986), indica que la virulencia de un microorganismo patógeno medido a través de bioensayos utilizando hospederos padronizados (dinámica y edad) en condiciones de laboratorio, puede ser cuantificado a través de Tiempos Letales y Dosis Letales (TL_{50} y DL_{50}) siendo posible determinar la virulencia máxima de un patógeno con el objeto de ofrecer a condiciones externas de campo.

5.5.3. Tiempos de las etapas de desarrollo del hongo.

La evaluación de tiempos promedios de las diferentes etapas de desarrollo del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café se detallan en el cuadro 10, a un Limite de Confianza del 95%, bajo los siguientes parámetros: Inoculación a Muerte, Muerte a Producción de Micelio, Muerte a Cubrimiento Micelial, Muerte a Conidiogénesis Total, Muerte a Liberación de Conidias y Tiempo Total del ciclo.

Inoculación a muerte, existe superioridad en patogenicidad y virulencia de la cepa 13 (70.658 ± 5.426 horas) respecto a las cepas 9205 y 24, aventajando en tiempo de 8.84 y 11.15 horas.

Muerte a producción de micelio, destaca mínima superioridad la cepa 24 (24.757 ± 2.215 horas) con 4 horas promedio de ventaja, respecto a las otras dos cepas que muestran similitud (28.786 ± 1.606 y 28.818 ± 1.390 horas).

Muerte a cubrimiento micelial, marca superioridad nuevamente la cepa 24 (51.435 ± 3.427 horas) con diferencia de 2.8 y 11.9 horas respecto a las cepas 13 y 9205 respectivamente.

Muerte a conidiogénesis total, en esta etapa sobresale la cepa 13 (78.538 ± 3.672 horas) con ventaja de 2.9 y 12.1 horas respecto a las cepas 24 y 9205.

Muerte a liberación de conidias, superioridad mínima de la cepa 13 (106.088 ± 4.228 horas) completando esta etapa de desarrollo en forma anticipada de 3.7 y 9.5 horas respecto a las cepas 24 y 9205.

Tiempo total, de manera general la cepa 13 muestra superioridad en todo el proceso, con un tiempo de 176.783 horas (7.4 días) respecto a las cepas 24 y 9205 que muestran similitud con 191.557 ± 9.365 y 191.774 ± 9.453 horas (8.0 días); sacando la cepa 13 una ventaja en 14.9 horas (0.6 días) anticipado.

Cuadro 10. Tiempo de duración de las etapas de desarrollo del hongo

***B. bassiana* sobre la broca del café *H. hampei*.**

Etapas de desarrollo	Tratamientos (Cepas)	Número de adultos	Tiempo Horas X	Horas ± LC*
Inoculación a muerte	24	31	81.816	± 8.062
	13	39	70.658	± 5.426
	9205	37	79.501	± 7.084
Muerte a producción de micelio	24	31	24.757	± 2.215
	13	39	28.818	± 1.390
	9205	37	28.786	± 1.606
Muerte a cubrimiento micelial	24	31	51.435	± 3.427
	13	39	54.228	± 2.516
	9205	37	63.342	± 3.894
Muerte a conidiogenesis total	24	31	81.395	± 5.266
	13	39	78.538	± 3.672
	9205	36	90.592	± 5.331
Muerte a liberación de conidias	24	31	109.736	± 7.400
	13	39	106.088	± 4.228
	9205	35	115.541	± 6.309
Tiempo total	24	31	191.557	± 9.365
	13	39	176.783	± 6.940
	9205	35	191.774	± 9.453

* Limite de confianza al 95%

6. CONCLUSIONES.

1. El desarrollo de cepas del hongo *B. bassiana* en medios de cultivo artificial y natural, demostró poca variabilidad no influyendo en la patogenicidad y virulencia posterior; desenvolviéndose en Saboraud Dextrosa Agar (SDA) en 12 días con diámetro y superficie promedio de 7.83 ± 0.49 cm. y $12.30 \pm 0.77\text{cm}^2$ respectivamente y en arroz se obtuvo en 20 días a una temperatura promedio de 24.2 °C.
2. La formación de estructuras y coloración de cepas de *B. bassiana* evaluada en SDA mostró diferencias marcadas; la cepa 24 presentó micelio de aspecto algodonoso, estructuras conocidas como sinemas de coloración cremoso-amarillenta, con esporulación basal y aérea; la cepa 13 de consistencia algodonosa, sin presencia de sinemas con bastante esporulación pulverulenta, de coloración crema; la cepa 9205 de características similares a la anterior, variando en la coloración (blanco- intenso).
3. La prueba de viabilidad de cepas del hongo realizado en medio de cultivo SDA dieron porcentaje de germinación de conidias superiores al parámetro de comparación (85%) con un promedio general de 91.73 ± 5.53 al cabo de 12 horas, manifestando conidias viables de alta calidad biológica, justificando su empleo en la prueba de patogenicidad sobre *H. hampei*.
4. La patogenicidad expresada en mortandad de insectos por causa del hongo presentó diferencias significativas ($P=0.05$) entre tratamientos; la mortalidad causado fue de 77.5%, 97.5% y 91.8% en las cepas 24, 13 y 9205.
5. El ataque a granos pergamino en los tratamientos con *B. bassiana* fue de 31.6% en la posición **b** (daño mínimo), 29.2% en **c** (daño intermedio) y 28.3% en **d** (daño severo); mientras el testigo alcanzo niveles de 10% (**b**),

10% (c) y 77.5% (d), lo que indica que brocas tratadas por el hongo tienen una menor capacidad de causar daño en los granos.

6. La mortalidad diaria de población de brocas sometidas al hongo presentó diferente distribución. La cepa 13 manifestó superioridad, iniciando la mortalidad después de las 24 horas, el porcentaje mayor de 53.84% se obtuvo hasta las 72 horas, registrando la mortalidad hasta las 144 horas; las cepas 9205 y 24 iniciaron la mortalidad después de las 48 horas con porcentajes mayores de 48.65% y 41.94% hasta las 72 horas, extendiendo su mortalidad hasta las 192 horas.
7. El tiempo en el cual ocurrió el 50% de mortalidad (TL_{50}) en población de brocas fue variable; siendo el más corto en la cepa 13 (67.59 horas) y las cepas 9205, 24 tomaron 72.18 y 76.48 horas. El tiempo total al 100% de brocas muertas en el orden establecido fue de 115.27, 147.77 y 148.12 horas, manifestando la calidad en potencialidad agresiva (virulencia) de estas cepas, parámetro importante que justifica su aplicación en campo.
8. El ciclo biológico del hongo comprendió dos fases: 1) la fase Patogénica, caracterizada por la muerte de la broca, presumiendo la acción enzimática y liberación de toxinas, 2) la fase Saprofítica, evidenciada con el desarrollo del hongo sobre la broca muerta con la formación de estructuras y unidades infectivas con tiempos promedio variables, siendo superior la cepa 13 por la rapidez manifestada en el tiempo total con 176.783 horas, mientras que las cepas 9205 y 24 obtuvieron a 191.774 y 191.557 horas respectivamente.
9. De manera general se concluye, que existe variabilidad patogénica virulenta de las cepas promisorias de *B. bassiana* estudiados, vale decir que tienen efectos individuales de control sobre el hospedero broca del café, manteniendo su alta calidad agresiva.

7. RECOMENDACIONES.

1. Se recomienda la evaluación de *B. bassiana* sobre *H. hampei* en condiciones naturales de campo mediante aspersión en plantas de café y frutos caídos en el suelo con el objeto validar el efecto patogénico de las cepas estudiadas.
2. En condiciones de laboratorio, con el objetivo de continuar el estudio de estas cepas promisorias, se sugiere realizar la caracterización de pérdida de virulencia del hongo sobre la broca del café, a diferentes pases o replicas en reproducción masiva en sustrato natural de arroz.
3. Estudiar la concentración de conidias en sustrato natural de arroz bajo diferentes calidades de grano (Cateto, Estaquilla, Carolina, Arrocillo, etc) con el objeto de obtener mayor eficiencia en conidiacion a un costo de producción adecuado u óptimo para su recomendación en laboratorios comunales.
4. Investigar la patogenicidad y virulencia del hongo *B. bassiana* en diferentes hospederos con el objeto de determinar el potencial agresivo específico de un insecto a otro.

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. Bogota, D. C. Colombia. P.101.
4. BERNAL, M. G.; BUSTILLO, A. E.; POSADA F., F.J. 1994. Virulencia de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y su eficacia en campo sobre *Hypothenemus hampei*. Revista Colombiana de Entomología. 20 (4): 225-228.
5. BROCARIL. 2002. Alternativa biológica para el control de la broca del café. Cali, (Colombia). LAVERLAM. División Agrícola. 4 p.
6. BUSTILLO, P., A. E. Y BAKER, P., S. 1990. Manual de capacitación en control biológico. CENICAFE. Chinchina, Caldas, Colombia. 229p.
7. 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

8. BUSTILLO, P., A. E.; VILLALBA, G., D. A.; OROZCO H., J.; BENAVIDEZ M., P.; REYES, I. C.; CHAVEZ, B. 1995. Integrated pests' management to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. In: College International Sur le Café, 16. Kyoto. P. 671- 680
9. 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
10. 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.
11. CARBALLO, M.; FALGUNI, G. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Primera edición. Managua: CATIE, (Serie técnica, Manual técnico/CATIE; N° 53). 232 p.
12. CALZADA, J. 1982. Métodos estadísticos para la investigación. Lima (Perú) Ed. Universidad Agraria La Molina. 874 p
13. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DEL CAFÉ 1995. Avances técnicos de CENICAFE. Números: 114 al 184. Tomo II. Chinchiná, Caldas, Colombia. 243 – 254 p.
14. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DEL CAFÉ, CENICAFE (COLOMBIA). 1996. Práctica sobre el control de calidad a formulaciones de hongos entomopatogenos In: Seminario Internacional sobre Caficultura sostenible. "Manejo integrado de la broca del café "MIB. Chinchiná, Caldas. Abril 17-19: 33

15. CRUZ, CH. , D. 2001. Apuntes de fitopatología. Universidad Mayor de San Andrés UMSA. La Paz, Bolivia. 13 – 26 p.
16. 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
17. DESARROLLO ALTERNATIVO INTEGRAL. 2005. Estudio de identificación, mapeo y análisis competitivo del café en zonas de intervención del desarrollo alternativo. La Paz, Bolivia. 142 p.
18. DESARROLLO ALTERNATIVO INTEGRAL. 2006. La Excelencia del Café Boliviano. Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios, Programa de Desarrollo Alternativo Regional, UISAID. La Paz, Bolivia. 12 p.
19. 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.
20. 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.
21. HOLDRIDGE, L. 1987. Ecología basada en zonas de vida. IICA. San José, Costa Rica. 220 p.
22. JIMENEZ, J. A. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. CENICAFE (Colom.). 43(3): 84-88.

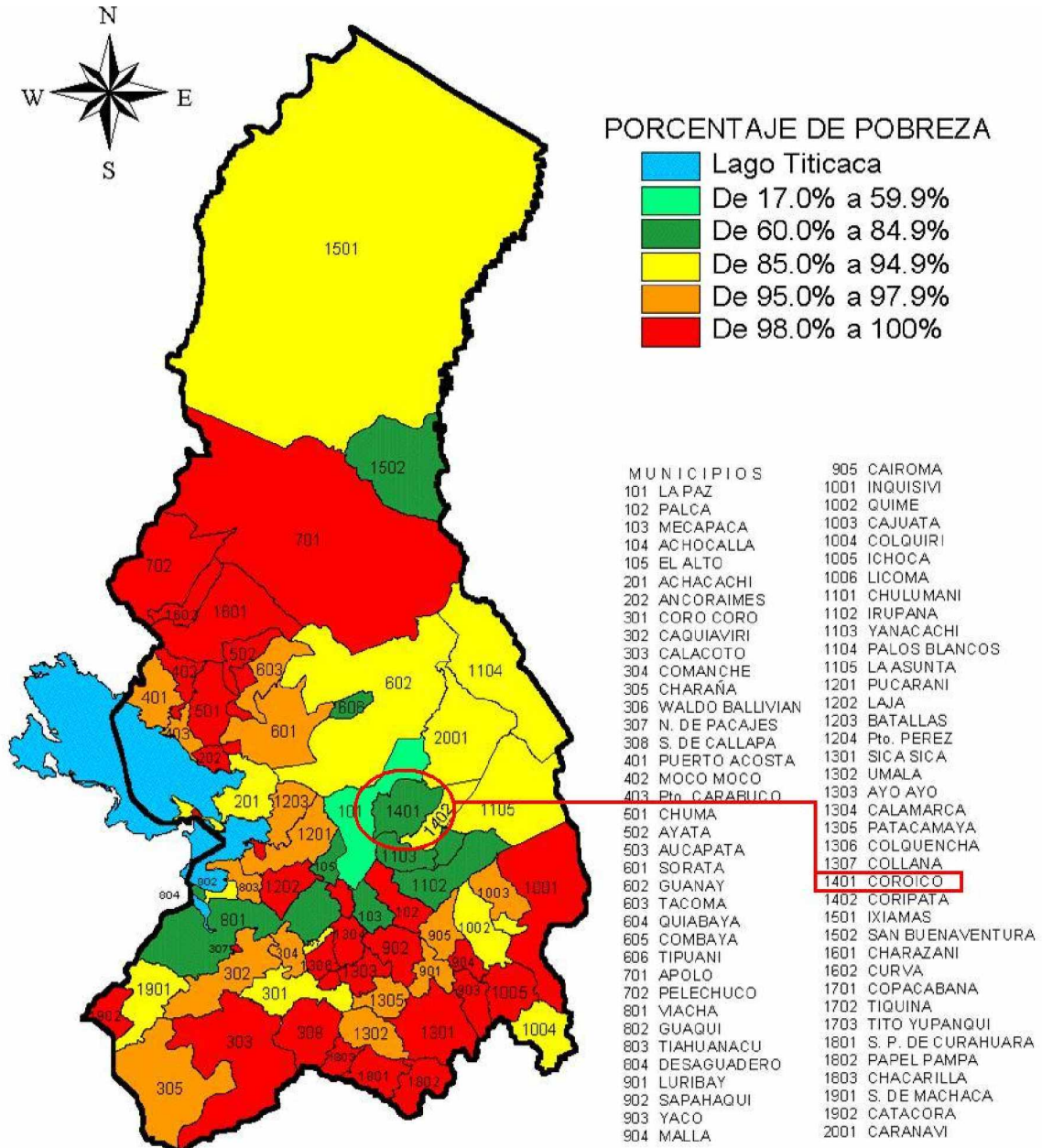
23. KATIVAR, K., P. 1984. Control de insectos. Métodos Físicos. IICA. Reunión Internacional de la Broca. 26 p.
24. KLEIN, K. C. 1986. La broca del café (*Hypothenemus hampei*) Tumbaco, Ecuador. MAG/PSU/INIAP/GTZ. 48 p.
25. LAZO, A., R. R. 1990. Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y su tolerancia al oxiclورو de cobre. Turrialba. (Costa Rica). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. 61 p.
26. LA RAZON. 2005. El café boliviano llega del productor al consumidor. Detalle noticias, La Paz (Bolivia); septiembre 1:1.
27. 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.
28. LITTLE, T., M.; HILLS, F., J. 1990. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. 2da. Ed. Trillas México D. F. 125 – 143 p.
29. MAYA, L.; MONCADA, M. 1987. La broca de la cereza del cafeto *Hypothenemus hampei*. Resúmenes analíticos, Federación Nacional de cafeteros de Colombia, CENICAFE, Chinchiná Caldas, Colombia 340 p.
30. MARIN, P. 1994. Evaluación de diferentes medios de cultivo para determinar la germinación del hongo *Beauveria bassiana* producido en formulaciones comerciales. Informe Anual de Labores disciplina de Entomología. CENICAFE. 26 P.

31. MENDEZ, L. I. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. (Deuteromycetes) en el Soconusco. Chiapas, Chapingo (México). Colegio de Postgraduados (Tesis Maestría). 135p.
32. 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.
33. 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
34. ROGG, H., W.; TOVAR, N.; QUISBERTH, E.; CABRERA, S. 1997. Guía práctica de producción masiva del entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control biológico de insectos plaga en Bolivia. Santa Cruz, Bolivia. Universidad “Gabriel Rene Moreno”, Instituto de Investigaciones Agrícolas “El Vallecito”. Programa Entomología Agrícola. 33 p.
35. ROGG, H., W. 2000. Manual de Entomología Agrícola de Bolivia. Quito, Ecuador. Ed. ABYA – YALA. 706 p.
36. RUIZ, R. 1996. Efecto de la fonología del fruto del café sobre los parámetros de la tabla de vida de la broca del café; *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Manizales (Colombia), Tesis: Ingeniero Agrónomo. 87 p.
37. STEEL, R., G. D.; TORRIE, J. H. 1988. Bioestadística: principios y procedimientos. Segunda edición McGraw-Hill/Interamericana de México, S.A. de C.V. México D.F. 613 p.

38. SOLEIBE, A. F.; TORO, E., J. E. 2005. Guía Técnica del Productor Café Mojsa. Programa de Desarrollo Humano y Reactivación Económica en los Yungas de La paz, Bolivia. Prefectura del Departamento de La Paz. Bolivia. Publixpress. 59 p.
39. SOCIEDAD MEXICANA DE CONTROL BIOLÓGICO. 1995. Memorias. VI Curso Nacional de Control Biológico. México Ed. Colegio de la Frontera Sur ECOSUR. 219 p.
40. 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.
41. VELEZ, A., P. E.; GONZALES, G., M. T.; RIVERA M., A.; BUSTILLO P., A. E.; ESTRADA M., N. C.; MONTOYA R., E. C. 1999. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* de la colección de CENICAFE. Revista Colombiana de Entomología. 25 (3 - 4): 191 – 207.

ANEXOS

Anexo1. Mapa cartográfico que muestra la localidad de Coroico



Anexo 2. Características de cultivos artificiales para siembra de *B. bassiana*.

AGAR NUTRITIVO (AN).

Extracto de levadura	2.0
Extracto de malta	1.0
Peptona	5.0
Cloruro sódico	5.0
Agar	15.0
Formula típica g/l	28
P H	7.4 ± 0.2
Esterilización min/°C	15/121

AGAR PAPA DEXTROSA (PDA).

Extracto de patata	20.0
Glucosa	20.0
Agar	15.0
Formula típica g/l	39
P H	5.6 ± 0.2
Esterilización min/°C	15/121

AGAR SABORAUD DEXTROSA (SDA).

Peptona micológica	10.0
D(+) Glucosa	40.0
Agar	15.0
Formula típica g/l	65
P H	5.6 ± 0.2
Esterilización min/°C	15/121

Anexo 3. Registro de temperatura en el bioensayo

Mes: Octubre 2007

Laboratorio: Estación Experimental Coroico

Día	Control de temperaturas					
	Ambiente			Extremas		
	Hora			Hora : 12:00		
	8:00	14:00	18:00	Máxima	Mínima	
1	24	23	24	26	19	
2	23	24	23	26	18	
3	23	24	24	26	22	
4	23	24	23	25	22	
5	23	23	24	25	23	
6	24	24	24	25	22	
7	24	24	25	27	23	
8	23	24	25	27	24	
9	23	24	25	27	24	
10	23	25	25	26	24	
X	23.3	23.9	24.2	X=23.8	26.0	22.1

Anexo 4. Concentración de conidias del hongo *B. bassiana*.

Desarrollo: 20 días

Objetivo: Conteo de conidias

Evaluador: R.F.Ch.

Código: 24, 13, 9205 Dilución: 10^3 (13, 24); 10^4 (9205) Volumen: 500 ml Cantidad: 100 g. Fecha: 13-10-2007	cepas	Lectura en Cámara de Neubauer			Σ	X	D.E.
		1	2	3			
	24	25.56	23.66	20.46	69.68	23.23	2.58
	13	17.10	20.92	13.40	51.42	17.14	3.76
	9205	11.24	11.98	11.60	34.82	11.61	0.37
	$\Sigma/X/D.E$	$23.23 \cdot 10^3 \cdot 10^4 = 2.3 \cdot 10^8 \text{ c/ml} \pm 2.58 \cdot 10^7 \text{ c/ml}$ $17.14 \cdot 10^3 \cdot 10^4 = 3.7 \cdot 10^8 \text{ c/ml} \pm 3.76 \cdot 10^7 \text{ c/ml}$ $11.61 \cdot 10^4 \cdot 10^4 = 1.2 \cdot 10^9 \text{ c/ml} \pm 0.4 \cdot 10^8 \text{ c/ml}$					

Anexo 5. Crecimiento del hongo *B. bassiana* en tamaño y superficie.

Fecha: 30/09/2007

Objetivo: Crecimiento del hongo

Evaluador: R.F.Ch.

Cepas	Días de Evaluación (Medio de cultivo SDA)												Diámetro total (cm.) X	Crecimiento diario (cm.) X	Superficie de crecimiento (cm ²)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
24	0.00	0.2	0.25	0.40	0.80	1.20	1.70	2.10	2.30	2.55	2.95	3.75	7.5	0.63	11.78
13	0.00	0.25	0.30	0.44	0.90	1.30	2.00	2.50	2.80	3.20	3.60	3.80	7.6	0.63	11.94
9205	0.00	0.24	0.45	0.60	1.20	1.60	2.20	2.50	2.80	3.40	3.75	4.20	8.4	0.70	13.19
X/D.E.	Crecimiento: 7.83 ± 0.49 cm. Superficie: 12.30 ± 0.77 cm²												7.83	0.65	12.30

D.E.: Desviación Estándar

Anexo 6. Germinación de conidias de las cepas del hongo *B. bassiana*

Fecha: 12/10/2007

Objetivo: Viabilidad y calidad del hongo

Evaluador: R.F.Ch.

Cepas	Numero de esporas observadas por Submuestras (Alícuotas)											TOTAL			%G	D.E
	1		2		3		4		5		G	NG	G+NG			
	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG						
24	93	7	84	16	88	12	100	0	90	10	455	45	500	91.0	6.0	
13	96	4	90	10	96	4	95	5	85	15	462	38	500	92.4	4.8	
9205	92	8	82	18	95	5	93	7	97	3	459	41	500	91.8	5.8	
X/D.E	%G = 91.73 ± 5.53													91.73	5.53	

G: Conidias germinadas
 NG: Conidias no germinadas
 D.E.: Desviación Estándar

Anexo 7. Mortalidad de *H. hampei* por efecto patogénico de *B. bassiana* en el bioensayo.

Fecha: 24/10/2007

Objetivo: Patogenicidad y Virulencia

Evaluador: R.F.Ch.

Código (Cepas)	Días evaluados																						Total		Mortandad día	
	0	%	1	%	2	%	3	%	4	%	5	%	6	%	7	%	8	%	9	%	10	%	Σ	%	x	%
24	0	0.0	0	0.0	13	41.9	12	38.7	4	12.9	1	3.2	1	3.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	31	100	6.20	20
13	0	0.0	2	5.1	21	53.9	13	33.3	3	7.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	39	100	9.75	25
9205	0	0.0	0	0.0	18	48.7	11	29.7	6	16.2	1	2.7	1	2.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	37	100	7.40	20

Anexo 8. Mortandad de *H. hampei* por causas patogénicas de *B. bassiana*.

(Datos originales)

Tratamientos Cepas+Testigo	Repeticiones				Total %	Promedio %
	I	II	III	IV		
24	80	70	70	90	310.0	77.5
13	100	100	100	90	390.0	97.5
9205	100	100	80	90	370.0	92.5
Testigo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Anexo 9. Mortandad de *H. hampei* por causas patogénicas de *B. bassiana*.

(Datos transformados Arcsen \sqrt{x})

Tratamientos Cepas+Testigo	Repeticiones				Total	Promedio
	I	II	III	IV		
24	63.4	56.8	56.8	71.6	248.6	62.15
13	90.0	90.0	90.0	71.6	341.6	85.40
9205	90.0	90.0	63.4	71.6	315.0	78.75
Testigo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Anexo 10. Porcentaje de mortalidad por efectos patogénicos del hongo, Mortalidad por otras causas y sobrevivencia de la broca.

Fecha: 24/10/2007

Objetivo: Patogenicidad

Evaluador: R.F.Ch.

Tratamiento	Repetición I						Repetición II						Repetición III						Repetición IV						Total (100%)					
	EP		OC		BV		EP		OC		BV		EP		OC		BV		EP		OC		BV		EP		OC		BV	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
24	8	80	2	20			7	70	3	30			7	70	2	20	1	10	9	90	1	10			31	77.5	8	20	1	2.5
13	10	100					10	100					10	100					9	90	1	10			39	97.5	1	2.5		
9205	10	100					10	100					8	80	1	10	1	10	9	100	1	10			37	92.5	2	5.0	1	2.5
Testigo					10	100			1	10	9	90					10	100					10	100			1	2.5	39	97.5

EP: Muerte por el Entomopatógeno *B. bassiana*
 OC: Muerte por otras causas
 BV: Brocas vivas

Anexo 11. Infestación y posición de *H. hampei* sobre el grano pergamino.

Fecha: 24/10/2007

Objetivo: Patogenicidad y Virulencia

Evaluador: R.F.Ch.

Tratamiento	Repetición I				Repetición II				Repetición III				Repetición IV				Total (100%)							
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a		b		c		d	
	N		%		N		%		N		%		N		%		N	%	N	%	N	%	N	%
24	3	3	0	4	5	4	4	2	3	3	3	2	2	0	1	2	13	32.5	9	22.5	8	20.0	10	25.0
13	1	3	4	0	3	5	1	1	3	3	5	0	5	3	3	0	12	30.0	14	35.0	13	32.5	1	2.5
9205	4	3	3	0	2	2	4	0	5	4	2	0	1	3	4	3	12	30.0	12	30.0	13	32.5	3	7.5
Testigo	0	3	1	6	1	0	2	7	0	1	0	9	0	1	0	9	1	2.5	4	10.0	4	10.0	31	77.5

- Posición **a**: Broca en busca de fruto o iniciando su perforación
- Posición **b**: Broca en el canal de penetración
- Posición **c**: Broca perforando la almendra
- Posición **d**: Broca establecida dentro la almendra

Anexo 12. Ciclo de desarrollo de *B. bassiana* sobre *H. hampei* (Promedios en horas).

Fecha: 24 /10/2007

Objetivo: Etapas de desarrollo

Evaluador: R.F.Ch.

Tratamientos (Cepas)	Etapas	Repeticiones				Total (Hrs.)	Promedios (Hrs.)
		I	II	III	IV		
24	1	75.193	89.003	82.332	80.822	328.350	81.816
	2	23.535	28.024	23.073	24.616	99.248	24757
	3	52.210	52.352	54.963	47.288	206.813	51.435
	4	75.148	83.771	87.098	80.664	326.681	81.395
	5	100.658	114.691	114.322	110.384	440.055	109.736
13	1	67.899	74.323	71.056	69.329	282.607	70.685
	2	29.604	26.721	29.669	29.329	115.323	28.818
	3	56.456	48.689	58.786	52.840	216.771	54.228
	4	82.523	74.003	83.948	73.138	313.612	78.538
	5	106.804	104.758	110.867	101.506	423.935	106.098
9205	1	72.942	80.149	81.343	84.432	318.866	79.501
	2	27.410	27.725	29.438	30.916	115.489	28.786
	3	57.950	64.374	67.699	64.311	254.334	63.342
	4	88.527	94.041	96.443	83.009	362.020	90.592
	5	115.516	120.025	124.305	99.156	459.002	115.541

1. Inoculación a muerte (Muerte)
2. Muerte a producción de micelio (inicio de crecimiento micelial)
3. Muerte a cubrimiento micelial (cubrimiento de micelio)
4. Muerte a conidiogénesis (formación de esporas)
5. Muerte a liberación de conidias (esporulación de esporas)