

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA



TESIS DE GRADO

EVALUACION DE LA VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DEL HONGO

(*Beauveria bassiana*) SOBRE LA BROCA DEL CAFE

(*Hypothenemus hampei*) EN LABORATORIO

RAUL EDGAR ARIAS FORONDA

La Paz – Bolivia

2009

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA

EVALUACION DE LA VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DEL HONGO
(*Beauveria bassiana*) SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ
(*Hypothenemus hampei*) EN LABORATORIO

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

RAUL EDGAR ARIAS FORONDA

TUTOR:

Ph. D. Ing. Víctor Hugo Mendoza Condori

ASESOR:

Ing. M. Sc. Celia Fernández Chávez

TRIBUNAL EXAMINADOR:

Ph. D. Ing. David Cruz Choque

Ing. M. Sc. Ramiro Mendoza Nogales

Ing. M. Sc. Eduardo Oviedo Farfán

APROBADA

PRESIDENTE TRIBUNAL EXAMINADOR:

DEDICATORIA.

Doy gracias al Dios Padre, a su hijo Jesucristo El Señor y a su Santo Espíritu. El único que tiene inmortalidad, que habita en luz inaccesible; a quien ninguno de los hombres ha visto ni puede ver, al cual sea la honra, la gloria y el imperio sempiterno, por los siglos de los siglos Amén.

(1 Timoteo 6:16)

AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso y a nuestro Señor Jesucristo por el gran amor que nos brindan ya que “El temor de Señor es el Principio de la sabiduría, y el conocimiento del Santísimo la inteligencia” Prov. 9.10.

Agradezco a Dios por mis Papitos, Sr. Paulino Arias Choque y Sra. Marcelina Foronda de Arias por el apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria y a mi hermana María Isabel Arias Foronda por el apoyo constante e incansable, para la obtención del título académico.

Un agradecimiento especial al Dr. Víctor Hugo Mendoza, que me brindo su apoyo en los trabajos de laboratorio, así mismo a los amigos Octavio, Magi y Neli.

Agradezco a la Ingeniera: Celia Fernández, por la colaboración en el asesoramiento de la presente Tesis.

Un agradecimiento al tribunal revisor de la tesis en especial al Ing. Ramiro Mendoza por haber aportado su conocimiento en las correcciones realizadas del presente trabajo.

Un agradecimiento al Proyecto “Jatun Sach’a” por su apoyo en la realización de la investigación del presente trabajo.

Finalmente, a los amigos de la Facultad de Agronomía que incentivaron a proseguir hasta llegar a finalizar este trabajo de tesis.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
INDICE GENERAL.....	iii
LISTA DE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1 El cultivo del café.....	4
2.2 Caficultora en Bolivia.....	4
2.3 Importancia económica.....	5
2.3.1 Nacional.....	5
2.3.2 Regional.....	6
2.3.3 Agricultor.....	6
2.4 Pérdidas causadas por la broca del café.....	7
2.5 Descripción del insecto biología de reproducción.....	7
2.5.1 Clasificación taxonómica.....	8
2.5.2 Ciclo de vida de <i>Hypothenemus hampei</i>	9
2.5.3 Forma de ataque y daño al fruto.....	10

2.6	Descripción del entomopatógeno (<i>Beauveria bassiana</i>).....	12
2.6.1	Características de la especie <i>Beauveria bassiana</i>	13
2.6.2	Clasificación taxonómica del hongo.....	15
2.6.3	Modo de acción de la <i>Beauveria bassiana</i>	15
2.6.3.1	Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero.....	16
2.6.3.2	Germinación de la espora.....	16
2.6.3.3	Penetración de la cutícula.....	16
2.6.3.4	Replicación en el hemocele del insecto plaga.....	17
2.6.3.5	Dispersión de las esporas.....	18
2.7	Control de <i>Hypothenemus hampei</i>	19
2.7.1	Medidas preventivas.....	19
2.7.2	Control cultural.....	20
2.7.3	Control biológico.....	20
2.7.4	Control con entomopatógenos.....	20
2.7.5	Control con parásitos <i>Hymenopteros</i>	21
2.8	Patogenicidad.....	23
2.9	Virulencia.....	24
2.10	Tiempo letal medio (TL ₅₀).....	24
2.11	Aislamiento del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	24
2.12	Medios de cultivo.....	25
2.13	Inoculadores.....	26
2.14	Producción masiva de hongos entomopatógenos.....	26

III.	LOCALIZACION.....	27
3.1	Ubicación Geográfica.....	27
3.2	Condiciones de laboratorio.....	27
IV.	MATERIALES Y METODOS.....	28
4.1	Materiales.....	28
4.1.1	Materiales de campo.....	28
4.1.2	Material de laboratorio.....	28
4.1.3	Material biológico.....	28
4.2	Metodología.....	29
4.2.1	Estudio de Campo.....	29
4.2.1.1	Recolección del hongo <i>B. bassiana</i> en campo.....	29
4.2.1.1.1	Recolección de cepas nativas en Villa Camacho.....	29
4.2.1.1.2	Recolección de cepas asperjadas en el cafetal provenientes de la estación experimental de Coroico (COBIPLA)..	30
4.2.1.2	Determinación del porcentaje de infestación.....	30
4.2.2	Estudio de laboratorio.....	31
4.2.2.1	Desarrollo y selección del hongo <i>B. bassiana</i>	31
4.2.2.2	Evaluación de las muestras de <i>Beauveria bassiana</i>	33
4.2.2.3	Cría masiva del insecto plaga.....	34
4.2.2.4	Producción de las cepas del hongo a partir de las matrices.....	35
4.2.2.5	Concentración de conidios.....	37

4.2.2.6	Infección del hongo <i>Beauveria bassiana</i> sobre la broca del café.....	38
4.2.2.7	Parámetros de evaluación por la infección del hongo <i>B. bassiana</i>	38
4.2.2.8	Ciclo de infección del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	39
4.2.2.9	Producción masiva del hongo <i>B. bassiana</i>	40
4.2.3	Diseño Experimental.....	40
4.2.4	Variables de Respuesta.. ..	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	42
5.1	Estudio de campo.....	42
5.1.1	Porcentaje de infestación de la presencia natural hongo <i>Beauveria bassiana</i> ...	42
5.2	Estudio de Laboratorio.....	44
5.2.1	Viabilidad y desarrollo del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	44
5.3	Evaluación de la patogenicidad del hongo (<i>Beauveria bassiana</i>) sobre la broca del café (<i>Hyphotenemus hampei</i>).....	46
5.4	Evaluación del grado de virulencia del hongo (<i>Beauveria bassiana</i>).	50
5.4.1	Evaluación del grado de virulencia en tiempo letal medio (TL ₅₀).....	50
5.4.2	Evaluación del grado de virulencia en tiempo letal acumulada (TL ₁₀₀).....	54
5.5	Ciclo de infección del hongo <i>Beauveria bassiana</i> sobre la broca del café.....	56
5.6	Producción Masiva del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	59
VI.	CONCLUSIONES	61
VII.	RECOMENDACIONES	63
VIII.	BIBLIOGRAFIA	64
	Anexos	71

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Adultos de la broca del café, hembra y macho (CENICAFE, 1998).....	8
Figura 2. Ciclo de vida de la broca del café (Bustillo, 1998, Eutimio <i>et. al.</i> , 2006).....	9
Figura 3. (1) <i>Hypothenemus hampei</i> , la broca del café; (2) Barrenador y galería; (3, 4) Daño causado por la larva; (5) Cerezas demostrando el daño característico; (6) Granos dañados por la broca (Anónimo, 1986).....	11
Figura 4. Broca infectada por el hongo <i>Beauveria bassiana</i> (PROCAFE, 1998).....	13
Figura 5. Características microscópicas y macroscópicas de <i>Beauveria bassiana</i> a = Esquema de conidióforos y conidios de <i>B. bassiana</i> , Dibujo tomado de Barnett y Hunter, (1998); b =Microfotografía de conidióforos y conidios de <i>B. bassiana</i> , Fotografía Tomada de Kouassi, (2001); c =Morfología de las colonias de <i>B. bassiana</i>	14
Figura 6. Hembra de <i>Heterospilus coffeicola</i> (ICAFE, 2001).....	21
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Prorops nasuta</i> (ICAFE, 2001).....	22
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Phymastichus coffea</i> (ICAFE, 2001).....	23
Figura 9. Zona de muestreo, a=Villa Camacho; b=San Pedro Florida, La Asunta Sud Yungas de La Paz.....	29
Figura10. Muestreo de frutos brocados con la presencia natural del hongo entomopatógeno en La Asunta Sud Yungas de La Paz, a=Variedad Catuai; b=Agricultor colectando muestras del hongo.....	30
Figura 11. Frutos sanos de café.....	31
Figura 12. Frutos Brocados.....	31
Figura 13. Frutos con presencia de <i>B. bassiana</i>	31
Figura 14. Cámara de cría para la broca del café.....	34

Figura 15.	Crecimiento del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en bandeja de plástico, a= Hongo con una pigmentación blanca cremosa; b = Hongo con una pigmentación blanca rosada.....	36
Figura 16.	Crecimiento del hongo en bolsas con sustrato de Arroz.....	36
Figura 17.	Cámara Nuebauver o Hematocímetro.....	37
Figura 18.	Distribución de las unidades experimentales.....	40
Figura 19.	Frutos de café mostrando la parte media más productiva del árbol.....	42
Figura 20.	Comparación de infestación del hongo <i>Beauveria bassiana</i> y la broca del café en las zonas de recolección.....	43
Figura 21.	Crecimiento en diámetro y forma del hongo <i>Beauveria bassiana</i> , a= Cepa nativa de La Asunta, zona Villa Camacho; b= Cepa colectada en San Pedro Florida; c= Cepa obtenida del inóculo de la broca del café.....	46
Figura 22.	Comparación del porcentaje de mortalidad de brocas del café.....	49
Figura 23.	Comparación del porcentaje de mortalidad (TL ₅₀).....	52
Figura 24.	Comparación del porcentaje de mortalidad (TL ₅₀) del hongo <i>B. bassiana</i> frente a estudios realizados por Gonzales, 1993 (Cepa Bb-9205BFC); Jiménez, 1992 (Cepa 5EVL); Verela y Morales, 1996 (Cepa 8906).....	53
Figura 25.	Comparación del porcentaje de mortalidad (TL ₁₀₀).....	55
Figura 26.	Desarrollo de la infección del hongo <i>Beauveria bassiana</i> sobre la broca del café.....	58
Figura 27.	Manifestación de la infección de <i>Beauveria bassiana</i> sobre la broca del café <i>H. hampei</i> ; a=hongo emergiendo al exterior del insecto ya muerto; b=hongo revistiendo totalmente al insecto (Bustillo, 1998; CATIE, 2002)..	59
Figura 28.	Bolsas inoculadas con cepas madres del hongo <i>Beauveria bassiana</i> , a= Bolsas ordenadas en el estante; b= Hongo con coloración cremosa al llegar a la maduración.....	60

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Producción de café en el ámbito regional.....	6
Cuadro 2. Ciclo de vida promedio de la broca en función a la temperatura.....	10
Cuadro 3. Postura y longevidad de las hembras en el fruto de café.....	10
Cuadro 4. Condiciones de laboratorio.....	33
Cuadro 5. Crecimiento del hongo en tamaño (12 días).....	45
Cuadro 6. Evaluación de la patogenicidad del hongo <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de la broca del café.....	47
Cuadro 7. Análisis de varianza de la Patogenicidad del hongo <i>Beauveria bassiana</i> sobre la broca del café.....	48
Cuadro 8. Prueba de significancia de patogenicidad Duncan al 5%.....	48
Cuadro 9. Análisis de varianza de la comparación en los tres tratamientos de tiempo letal medio (TL ₅₀).....	50
Cuadro 10. Prueba de significancia de virulencia Duncan al 5%.....	51
Cuadro 11. Análisis de varianza de la comparación en los tres tratamientos de tiempo letal acumulado (TL ₁₀₀).....	54
Cuadro 12. Prueba de significancia de virulencia Duncan al 5%.....	54
Cuadro 13. Ciclo de infección del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	57
Cuadro 14. Análisis de varianza del ciclo de infección del hongo (<i>B. bassiana</i>).....	59

RESUMEN

El presente estudio pretende determinar la virulencia y patogenicidad de las cepas del hongo *Beauveria bassiana*, sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*), con la finalidad de conocer la viabilidad y desarrollo del hongo, mortalidad causada (patogenicidad), los tiempo de acción de muerte del hongo sobre la plaga, representada en TL_{50} y TL_{100} tiempos letales y el ciclo de infección.

La investigación se realizo en la ciudad de La Paz, en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía. Situada a una altitud de 3630 msnm entre los 16°30' Latitud sur y 69°08' Longitud oeste del meridiano de Greenwich.

Las cepas del hongo *Beauveria bassiana* fueron muestreadas en la Asunta que está ubicada en la provincia Sur Yungas, que presenta una topografía muy accidentada, con relieves irregulares de cerros con pendientes muy pronunciadas. Se realizó la identificación de las comunidades que se dedicaban al cultivo del café, como ser la de Villa Camacho y San Pedro Florida, donde se procedió a la toma de muestras de frutos con presencia de la plaga y del hongo nativo de la zona, como también del hongo que fue introducido de la estación experimental "COBIPLA" como control de la broca del café.

Para la obtención de datos del estudio se realizó la selección de las mejores cepas en medio MS, evaluación de patogenicidad, determinación de la virulencia y ciclo de infección del hongo sobre la plaga.

Con la selección de las mejores cepas para los tratamientos del estudio, se comprobó que las cepas incrementar su desarrollo en medios nutritivos, como ser las cepas provenientes de la estación experimental COBIPLA que mostraron un crecimiento de 8.0 cm. en diámetro con una superficie de 4 cm² siendo el mayor registrado, la cepa natural de la Asunta mostró un crecimiento de 7.3 cm en diámetro y una superficie de 2.19 cm².

En la prueba de patogenicidad, se tuvo una mortalidad del 100 % de brocas infectadas con el hongo a partir de las 64 horas de infección de las cepas obtenidas del inóculo de los insectos brocas del café.

Para los tiempos letales TL_{50} y TL_{100} se determinó que cepas infectadas en brocas y extraídas de los cuerpos muertos del insecto, llegan a ser más agresivas a la plaga, matándola menor tiempo de acción, de las cuales se registró un tiempo de muerte del 50% de los insectos en 50.5 horas y el 100% en 64.5 horas de muerte hacia el hospedero.

En el ciclo de infección se identificaron cinco etapas de acción del hongo sobre la plaga las cuales son: Inoculación a muerte, muerte a producción del micelio, muerte a cubrimiento micelial, muerte a conidio génesis y muerte a liberación de conidios, de las cuales las cepas obtenidas del inóculo de la broca del café mostraron un tiempo de 89.02 horas de infección, las cepas nativas un tiempo de 94.01 horas y las cepas provenientes de COBIPLA con 98.06 horas tiempo de infección.

En conclusión las cepas obtenidas del inóculo de la broca del café, son las que mayor acción favorable muestran en el control de esta plaga, con su acción eficaz y favorable en el ciclo de infección sobre el insecto hembra de la broca del café.

SUMMARY

The present study, intend to determine the virulence and patogenicity of strains of the fungus *Beauveria bassiana*, on her borer of the coffee (*Hypothenemus hampei*), with the finality to know the viability and development of the fungus, mortality caused (Patogenicity), them time to action of death of the fungus on the plague, presentee in TL_{50} y TL_{100} lethal times and the cycle of infection.

The investigation himself i realize at the city of La Paz, in the laboratory of Biotechnology vegetable of the Agronomy Faculty. Situated to 3630 msnm altitude among the 16°30 Latitude south and 69°08 Longitude West of meridian of Greenwich.

The strains of the fungus *Beauveria bassiana*, they were sampled in litigates to her that be located at the province Sur Yungas, that he presents a very uneven topography, with irregular reliefs of ridges with very inclines pronounced. Came true the identification of the communities that dedicated to the cultivation of the coffee, like being the of Villa Camacho and San Pedro Florida, where he came from to the sampling fruits with presence of plague and of the fungus native of the zone, like also of the mushroom that was introduced of the experiment station COBIPLA like control of the coffee bean borer.

For the obtaining of data of the study came true the selection of the best strains in half MS, patogenicity evaluation, determination of virulence and cycle of infection of the fungus on the plague.

With the selection of improve them strains for the treatments of study, it was checked than the strains incrementing his development in nutritious means, like being the originating strains of the experiment station COBIPLA that they evidenced 8.0 cm growth in diameter with a surface of 4 cm² being the major registered, the natural strain of litigates to her he showed 7.3 cm growth in diameter and a surface of 2.19 cm².

In the pathogenicity test, is tube a mortality of 100% of borers infected with the fungus starting from the 64 hours of infection of the obtained strains of the inoculates of the insects borers of the coffee.

For the lethal times TL50 and TL100, it was determined than strains infected in borer and extracted of the bodies dead of the insect, they become more aggressive to the plague, killing her in junior time of action, of them as a time of death of the 50 % of the insects in 50.5 hours and the 100 % in 64.5 hours of death toward the innkeeper were registered.

In the cycle of infection they identified five stages of action of the fungus on the plague the ads are: Inoculation to death, death to the micelio production, death to cubrimiento micelial, death to conidio genesis and death to conidios liberation, of them as the strains obtained of the I inoculate of her borer of the coffee a time of 89,02 hours of infection, the native strains evidenced a time of 94,01 hours and COBIPLA's originating strains with 98,06 hours time of infection.

In conclusion the strains obtained of the i inoculate of the coffee bean borer, are the that they evidence favorable action major in the control of this plague, with its action effective and favorable in the cycle of infection on the insect female of the coffee bean borer.

1. INTRODUCCION

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae) es el insecto plaga más importante del café (*Coffea* spp.) en el mundo (Barrera *et al.* 2007).

En abril de 1985 mediante una comisión de sanidad vegetal del entonces Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios (MACA), se registró oficialmente la aparición de la Broca del fruto en cafetales de la zona de Caranavi y Taipiplaya (Barrientos, 2000).

En Bolivia el café se constituye en uno de los principales productos de exportación. La mayor parte de la producción de café de exportación se concentra en el departamento de La Paz, concretamente la zona de los Yungas en un 95 % respecto a los otros departamentos (IBCE, 2007), se constituye en el centro cafetalero del país esto debido a las condiciones ecológicas de las zonas de producción. Donde la Broca del café (*Hypothenemus hampei*), es la que mayor daño ocasiona al cultivo, sin duda la plaga más preocupante de la caficultora boliviana tradicional (Tovar, 1999).

Entre las medidas de control más comunes contra la broca, están la utilización de entomopatógenos (Monzón, 2001), de estos *Beauveria bassiana* es el más conocido y aplicado con éxito en programas de manejo integrado de plagas, el mismo es compatible con la utilización de parasitoides (Ibarra y Varela, 2002). Se destacó dentro de los controles de *H. hampei*, al cultural que es el componente más importante en el manejo integrado de esta plaga, con una mayor producción de café, mayores ingresos y márgenes de contribución económica y que otros controles son menos efectivos.

Beauveria bassiana ha sido utilizado fundamentalmente para el control de lepidópteros, homópteros, coleópteros, hemípteros y dípteros de importancia agronómica. La eficacia de este microorganismo ha sido evaluada mediante aspersiones en los cafetales a través de diferentes formulaciones, dosis y métodos de aplicación, donde el hongo ataca y mata las plagas, no es contaminante, ni afecta la salud del hombre ni la de los animales, ni la de los insectos benéficos, siendo un habitante natural del medio.

En Bolivia se evidencia la presencia natural del hongo *Beauveria bassiana* en el año 1993 por el instituto de ecología de la UMSA que juega un papel importante en la regulación de poblaciones de broca, ya que esta penetra y produce disturbios a nivel digestivo, nervioso, muscular, respiratorio, etc (Tovar, 1999).

En la actualidad, la importancia económica de los daños causados por las hembras de la broca del café radica en que afectan el rendimiento del grano del café como ser: la caída de frutos jóvenes que constituyen en un 5 a 23% de pérdidas, aumento en los costos de producción, pérdida del mercado exterior, entre otros. Estas pérdidas demandan un control que no afecte la producción del café orgánico, es por eso que se han evaluado predadores, parasitoides o microorganismos entomopatógenos, que han tenido buen éxito en el control de varias especies (Landa y Osborne, 1992).

De los microorganismos que causan enfermedades a los insectos incluyendo bacterias, hongos, virus y nematodos solo los hongos entomopatógenos han sido reportados como capaces de infectar insectos pertenecientes a la familia *Scolytidae* mediante la penetración de su cutícula (Jiménez, 1992).

Lo que hace necesario la búsqueda de alternativas de control donde Cárdenas (2000), señaló la necesidad de la búsqueda de sustitutos de los agroquímicos, en este sentido se ha orientado el interés hacia los insecticidas de la tercera generación, que son productos naturales que intervienen en las relaciones hospedero-parásito.

Considerando los antecedentes precedentes se decidió llevar a cabo la investigación “Evaluar la virulencia y patogenicidad del hongo *Beauveria Bassiana* sobre la broca del café”, que plantea los siguientes objetivos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el grado de virulencia y patogenicidad del hongo (*Beauveria bassiana*) sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en laboratorio.

1.1.2 Objetivos específicos

Establecer la viabilidad del hongo en el medio artificial (MS) y biológico (arroz).

Identificar el desarrollo y la concentración de conidios del hongo *B. bassiana*.

Evaluar la patogenicidad del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café.

Evaluar la virulencia del hongo en tiempos letales TL_{50} y TL_{100} .

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 El cultivo del café

Según Calani (1995), el cafeto (*Coffea arabica* L.) es un arbusto que alcanza de 3 a 4 m de altura, su origen está en las montañas de Etiopía a alturas que oscilan entre 1600 a 2800 msnm; hasta hoy cuenta con numerosas variedades, muchas útiles al hombre. En las montañas de Etiopía crecen espontáneamente e inclusive habita en áreas cercanas como Sudan, no se conoce con precisión cual de las variedades representa al estado salvaje, ya que mucha son polimorfos, estudios ontogénicos muestran evidencias sobre su ancestro, pero si se sabe que es un alelotetraploide.

El café pertenece a la familia *Rubiaceae*, donde el género *coffea* a su vez incluye 500 géneros y mas de 6000 especies, la planta de esta familia tienen varias características fáciles de reconocer (Barrientos, 2000).

Coffea arabica L., esta especie está adaptada ampliamente a las condiciones climáticas, suelo de las áreas tropicales y subtropicales en lugares hasta 2000 msnm donde se ha prestado total atención a aquellas variedades de alta calidad y productividad.

La Broca del café (*Hypothenemus hampei*), es la que mayor daño ocasiona al cultivo, sin duda la plaga mas preocupante de la caficultura boliviana tradicional (Tovar, 1999).

2.2 Caficultura en Bolivia

En Bolivia la caficultura se realiza en diferentes departamentos del país, pero el departamento de La Paz concretamente la zona de los Yungas, se constituye en el centro cafetalero del país. En las provincias de Caranavi, Nor y Sud Yungas, Larecaja, Franz Tamayo, Inquisivi y Murillo se cultiva el 95 por ciento de la producción nacional y el restante 5 por ciento se distribuye entre cinco departamentos: Santa Cruz (2,5 por ciento), Trópico de Cochabamba (1 por ciento), Tarija (0,5 por ciento), Beni (0,4 por ciento) y Pando (0,1 por ciento), las familias campesinas que en Bolivia, se dedican a cultivar café en aproximadamente 25.535 hectáreas, llegaron a producir en 2006 alrededor de 25.272 toneladas métricas, es decir 596 toneladas más que en la campaña 2005, que totalizó 24.976 toneladas, según datos del IBCE (2007).

Según los datos del IBCE (2007), en la actividad cafetalera nacional intervienen directamente 88 mil agricultores y alrededor de 10 mil personas en los procesos de transporte, comercialización e industrialización. Adicionalmente, 5 mil personas participan en procesos complementarios, como empleados permanentes y eventuales dedicados a la selección manual del producto, la comercialización y la exportación. En 2006, unas 19 empresas exportaron 5.700 toneladas métricas de café en grano, sin tostar, ni descafeinar a Estados Unidos y países de la Unión Europea por un valor de 14,2 millones de dólares, es decir 2,9 millones más que en 2005, que totalizó 11,2 millones de dólares.

2.3 Importancia económica

2.3.1 Nacional

Paz (1990), indica que la producción nacional hasta la década de los 80 estaba concentrada en 95 % en la zona de los yungas del departamento de La Paz, en las últimas décadas se ha incorporado nuevas áreas cafetaleras en los departamentos de Santa Cruz, Beni y Tarija, aunque con producción poco significativas que solo sirven para requerimientos locales. El departamento de La Paz actualmente continúa siendo el principal productor de café en sus diversas formas de comercialización (pergamino y molido), principalmente con el exterior para el ingreso de divisas.

La cosecha del café en Bolivia se inicia en el mes de marzo prolongándose hasta el mes de octubre, por las diferentes altitudes en que se planta café. La cúspide de la producción se presenta en los meses de mayo, junio y julio, los cuales son aprovechados por los intermediarios siendo rescatadores, quienes pagan precios mas bajos a los productores.

Según ACEB (2004), en Bolivia el cultivo de café se remonta al año 1780, cuando fue introducido por los esclavos de la realeza africana que huían del Brasil. En principio el café servía como cultivo de lindero para marcar los límites de la propiedad rural, recién a partir del año 1950 se constituye en producción rentable, con excedentes que son destinados a la exportación.

Actualmente la producción del café en Bolivia está distribuida en los siguientes departamentos:

Cuadro1. Producción de café en el ámbito regional

Departamento	Provincia	Localidad
La Paz 95%	Prov. Caranavi: Prov. Nor Yungas: Prov. Sud Yungas: Prov. Franz Tamayo: Prov. Inquisivi: Prov. Larecaja:	Caranavi Coroico, Coripata Asunta, Chulumani, Irupana Apolo Circuata, Licoma, Cajuata Larecaja
Santa Cruz 3%	Prov. Ichilo: Prov. San Ignacio de Velasco Prov. Sara	Buena Vista Ignacio de Velasco
Cochabamba 1%	Provincia Chapare	Chapare
Tarija 0,5%	Provincia Arce	Bermejo
Beni 0,5%	Provincia Vaca Diez	Vaca Diez

Fuente ACEB, 2004

La superficie de café cultivada en estos departamentos asciende a 23.000 hectáreas, donde trabajan alrededor de 20 familias de manera directa y alrededor de 12.000 familias de manera indirecta, con una producción aproximada de 100.000 sacos de 60 kg, de los cuales casi un 30% se destina al mercado nacional y un 70% a mercados extranjeros. La especie que se produce es la Arábica, con variedades tales como la Típica o Criolla (93% de la producción), Caturra y Catuai (con un 7%), según datos de ACEB (2004).

2.3.2 Regional

Las Organizaciones Económicas Campesinas (OECAs) de los Yungas de La Paz, afiliadas a la Federación de Caficultores Exportadores de Bolivia (FECAFEB) exportaron el año pasado a Europa 1.500 toneladas de café, que representa el 23,31 por ciento de las exportaciones nacionales, que alcanzaron un total de 5.700 toneladas del producto por un valor de 6,2 millones de dólares. Los caficultores de los Yungas obtuvieron el año pasado ingresos por 3,7 millones de dólares, según datos de FECAFEB (2007).

2.3.3 Agricultor

Según COBOLCA (1996), en la recuperación de los daños causados por la broca del café trabajan diferentes organizaciones (ONGs) buscando diferentes métodos de control principalmente biológicos y culturales.

Se ha observado la pérdida que ocasiona esta plaga más que todo al sector del pequeño caficultor, alcanza hasta un 20 por ciento del total del café exportable, en el país alcanza a 30.517,5 sacos de 60 kilogramos, económicamente esta suma hace que exista una pérdida aproximada de cuatro millones de dólares.

IBCE (2007), menciona que una significativa proporción de la producción se encuentra en manos de pequeños productores quienes poseen entre uno a cuatro hectáreas exclusivamente concentrados en los yungas de La Paz. Actualmente tenemos una producción de exportación de 122.070,37 sacos de 60 kilogramos año en las provincias de Nor y Sud Yungas, Caranavi e Inquisivi.

2.4 Pérdidas causadas por la broca del café

Borbón (2001), reporta las siguientes pérdidas causadas por el ataque de broca:

Caída de frutos: Los frutos jóvenes que sufren el ataque de la broca caen al suelo, el cual puede constituir entre 5 a 23% de pérdidas.

Baja calidad del grano: El grano se considera de inferior calidad y por lo general es rechazado en los países clientes.

Pérdida de rendimiento: Debido el ataque de la broca el grano pierde peso y disminuye el rendimiento en el beneficiado, puede ser de 1 a 10 kg por fanega.

Pérdida del Mercado Internacional: Se presentaría si no se cuenta con un estricto control de la calidad en la exportación de granos de café.

Aumento en los costos de beneficiado: Se debe invertir más en la selección de los granos dañados por la broca.

Aumento en los costos de producción: Por labores que deberá realizar el productor en su cafetal y la aplicación de métodos de control.

2.5 Descripción del insecto biología de reproducción

Hypothenemus hampei es una especie de coleóptero originario de África del tamaño de la cabeza de un alfiler. Es conocido por ser la plaga que más daño causa a los cultivos de café a nivel mundial, entre los nombres vulgares de este insecto resaltan el de broca del fruto del cafeto, barrenador del café, gorgojo del café, broca del café y taladro de cerezas del cafeto.

2.5.1 Clasificación taxonómica

Según Borbón (1991), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: *Insecta*
Orden: *Coleóptera*
División: *Phytophaga*
Familia: *Scolytidae*
Género: *Hypothenemus*
Especie: *H. hampei* Ferrari

También se le conoce como: *Stephanoderes hampei* Ferr, *Xyloborus coffeicola*, *Stephanoderes coffea*.

Según Guharay (2001), es de color negro, muy pequeño, de apariencia similar a los gorgojos. Es un insecto holometábolo, lo cual quiere decir que presenta un estado de huevo, varios estados larvarios, una pupa y el estado adulto. El adulto de la broca es un insecto mastigador ya que la hembra perfora el grano por la cicatriz del cáliz (ombligo), en cambio los machos por su imposibilidad de volar rara vez se les ve perforando a los frutos. La hembra demora 6 a 7 horas en perforar un grano, una vez que ha llegado al endospermo del cotiledón constituye una galería que les sirve como cámara de ovoposición, nacen dentro de los granos de café y durante su vida pasa por cuatro estados: Huevo, larva, pupa, adulto.



Figura 1. Adultos de la broca del café, hembra y macho (CENICAFE, 1998).

2.5.2 Ciclo de vida de *Hypothenemus hampei*

El ciclo de vida, es decir desde huevo hasta llegar a adulto, la broca tarda de 24 a 45 días. A temperaturas bajas el ciclo es más largo en cambio a temperaturas altas el ciclo es más corto. Generalmente la hembra perfora el fruto por la corola o disco, aunque también lo puede perforar por un lado si este presenta un 20% o más de materia seca. Dos días luego de instalarse en el fruto, la hembra comienza a poner huevos. Esta se queda con los 35-50 huevos que eclosionarán en una proporción de 13 hembras por cada macho (Ruiz, 1996).

Llegar a la adultez toma entre una semana y un mes, dependiendo de la temperatura y la consistencia del endospermo de la semilla. Las hembras viven entre 35 y 190 días y durante ese período son capaces de ovipositar desde 10 hasta 120 huevos, los machos aproximadamente 40 días. Las nuevas hembras se aparean con los pequeños machos dentro de la semilla. Algunas hembras depositan sus huevos en la misma planta donde eclosionaron, pero también pueden mudarse a otra. Si dos hembras han colonizado la misma planta sus proles pueden aparearse entre sí. Los machos incapaces de volar nunca abandonan el fruto (Baker *et al.*, 1992).

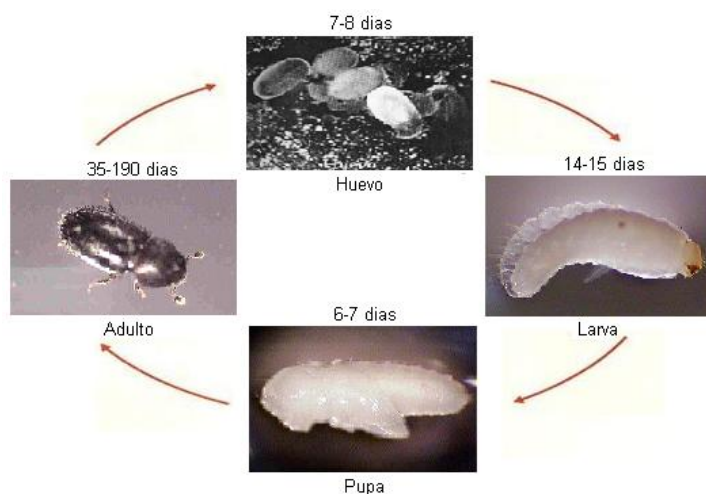


Figura 2. Ciclo de vida de la broca del café (Bustillo, 1998; Eutimio *et. al.*, 2006).

Una misma planta generalmente alberga más de tres generaciones; se cree que podrían llegar a ocho generaciones al año, pero sólo en casos excepcionales pasarían de las cinco en este período. En los frutos más maduros se pueden llegar a encontrar más de 100 individuos (Bustillo, 1998).

Los huevos son de color blanquecino, depositados por las hembras en el interior de los frutos, cuando estos están de semilechosos a maduros.

Las larvas emergen dentro de los frutos, son de tamaño pequeño, pueden medir desde 0.7 mm hasta 2.2 mm; son de color blanquecino y no tienen patas. En este estado puede durar de 10 a 26 días. La pupa también ocurre dentro del fruto, se parece a la larva pero es de color amarillento a café claro.

Los adultos emergen dentro del fruto, si el adulto emergido es una hembra abandonará el fruto en busca de nuevos frutos para ovipositar; si es un macho, éste permanece alimentándose dentro del fruto.

Cuadro 2. Ciclo de vida promedio de la broca en función a la temperatura.

Temperatura	19.2°C días	22°C días	27°C días
Huevo	13.5	6	4
Larva	29.5	14	11
Pre pupa	6.0	4	2
Pupa	14.0	3	4
Total	63.0	27	21

Fuente Ruiz, 1996

Cuadro 3. Postura y longevidad de las hembras en el fruto de café.

	Mínimo	Promedio	Máximo
Numero de huevos	31	74	119
Días de vida adulto	81	156	282

Fuente Ruiz, 1996

2.5.3 Forma de ataque y daño al fruto

Según Decazy (1990), el ataque a las plantaciones varía de acuerdo a factores tales como: temperatura, humedad, tipo de cultivo, grado de infestación inicial. La susceptibilidad al ataque aparenta estar relacionada a la altitud sobre el nivel del mar a la que se encuentran las plantaciones y las condiciones de la zona cafetalera.

El daño principal ocurre desde que el endospermo empieza a tomar mayor consistencia hasta que la corteza este madura. En este estado la broca es capaz de reproducirse en el interior de la semilla, causando su destrucción parcial o total (Salazar *et al.*, 1993).

La broca del Café es un insecto que ha co-evolucionado con el cultivo por lo tanto está adaptado a las condiciones del mismo sean estas fisiológicas o ecológicas. El insecto coloniza los frutos del café durante su maduración, desarrollándose dentro de los mismos y destruyendo gran parte de la cosecha en un tiempo corto (Figura 3). Después de la cosecha, la broca se desarrolla en los frutos que quedan en los cafetos y en los que se han caído al suelo durante la cosecha. La lluvia es un factor que favorece el desarrollo de las poblaciones de broca (Anónimo, 1986).



Figura 3. (1) *Hypothenemus hampei*, la broca del café; (2) Barrenador y galería; (3, 4) Daño causado por la larva; (5) Cerezas demostrando el daño característico; (6) Granos dañados por la broca (Anónimo, 1986).

La broca destruye frutos tiernos como granos maduros, cerezas o almendras. En los frutos jóvenes los insectos perforan los granos que se encuentran en estado blando lechoso, produciendo la caída de estos al suelo.

Se ha observado que esta plaga perfora los frutos en estado “lechoso” permaneciendo en el hueco de la entrada. Cuando los frutos pasan al estado siguiente a frutos consistentes, ya se observan huevos y larvas. En el estado “duro” se observan todos los estadios de la plaga y la destrucción del endospermo (Borbón, 1991).

2.6 Descripción del entomopatógeno (*Beauveria bassiana*)

B. bassiana es un hongo del grupo de los deuteromicetes, hongos imperfectos. Porque la mayoría de los hongos carecen de fase sexual, o bien ésta no se conoce. Al tener reproducción asexual, son formadores de conidios (Tanada y Kaya, 1993). Tiene la habilidad de sobrevivir como parásito y como saprofito en materia orgánica.

Presenta células conidiógenas globosas con un cuello muy corto, conidióforos apiñados formando sinemas o grupos de conidióforos muy juntos, conidias lisas e hialinas, globosas o globosas elipsoidales, raquis en zigzag. El desarrollo en medio de cultivo es levantado, de color blanco, tomando coloraciones amarillas en el reverso de la placa cuando tienen mucho tiempo.

Este es un hongo cosmopolita (presente en todo el mundo) que parasita a varias especies de insectos, entre ellos a la broca (se reportó por primera vez en 1922). Este hongo siempre se encuentra presente en el campo principalmente en zonas húmedas y donde hay alta incidencia de la broca. Este hongo ataca naturalmente a la broca, ocasionando entre 40 y 50 % del control de la plaga.

El hongo se desarrolla en el insecto, al cual mata, se reconoce por el micelio blanco que desarrolla entre los tegumentos de su hospedero. El hongo puede atacar a la broca cuando está fuera del fruto, o bien si no se encuentra muy profunda en el fruto, ya que de otra forma es casi invulnerable al patógeno.

Si la broca se contamina con el hongo muere después de 3 ó 6 días en condiciones de humedad saturada, dura hasta 9 días si las condiciones de humedad relativa son de 70 a 80%. Si la humedad es excesiva la viabilidad de las esporas del hongo baja.

Los primeros microorganismos que se encontraron causando enfermedad en insectos, fueron los hongos por su crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos. Algunos hongos entomopatógenos sin embargo no producen crecimiento superficial o producen muy poco. La mayoría son patógenos obligados o facultativos y algunos son simbióticos. Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas en particular, alta humedad y temperatura adecuada para la

esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Tanada y Kaya, 1993).



Figura. 4 Broca infectada por el hongo *Beauveria bassiana* (PROCAFE, 1997).

A partir de algunos avances realizados en nuestro país demuestra la presencia de hongos naturales en los cafetales, como también orientados a seleccionar cepas del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café, en la región yungueña (Rodríguez, 1995).

Estudios realizados en diferentes países, demuestra que el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (*Deuteromycotina*) puede matar la broca en condiciones de laboratorio o en campo (Jiménez, 1992).

2.6.1 Características de la especie *Beauveria bassiana*

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

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco (Figura 5c), 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 5a), después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Bustillo, 2001). *B. bassiana* posee conidias globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) y las estructuras conidióforos forman densos grupos (Figura 5b) (Samson *et al.*, 1988).

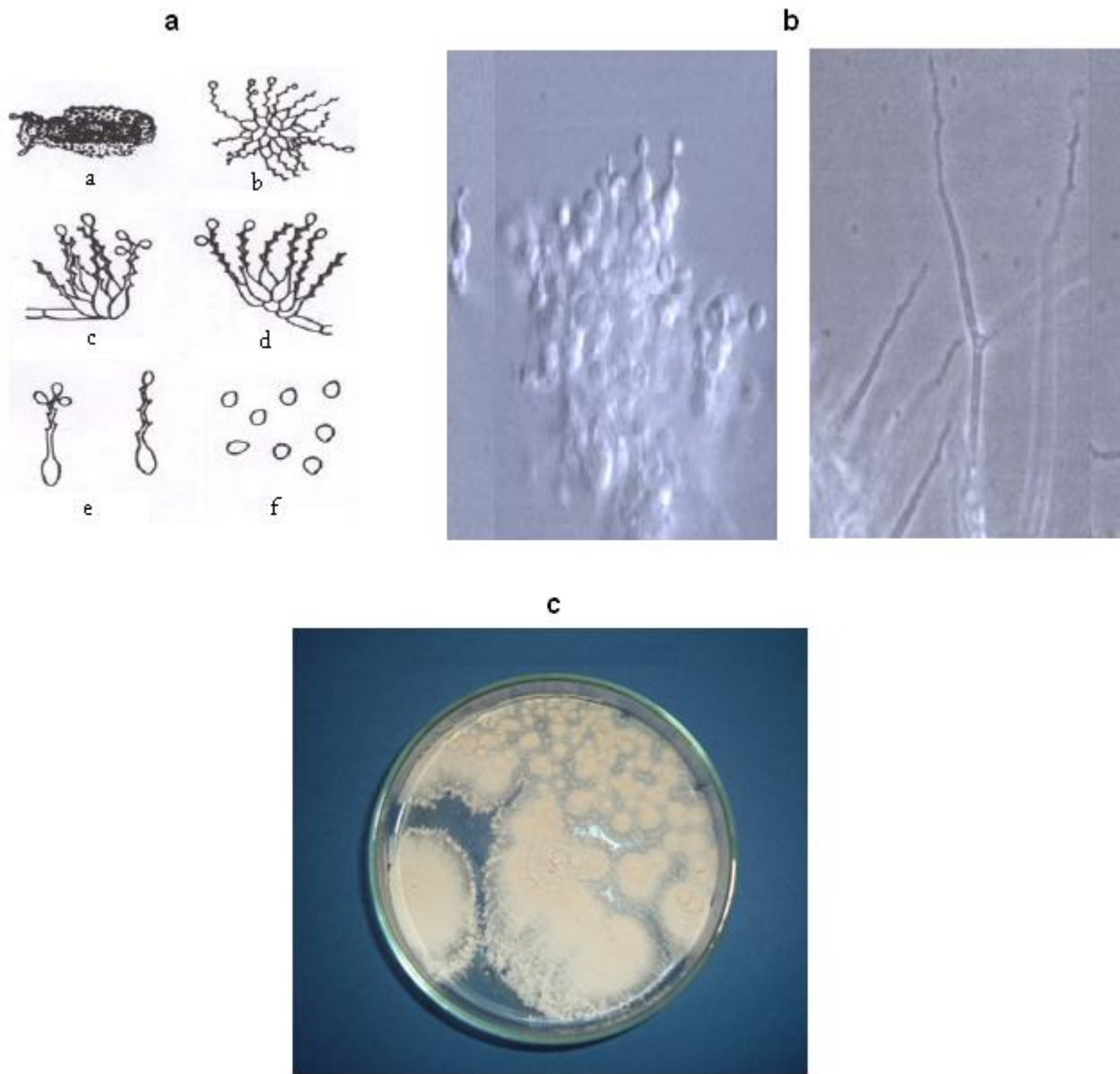


Figura 5. Características microscópicas y macroscópicas de *Beauveria bassiana*, **a**=Esquema de conidióforos y conidios de *B. bassiana*, Dibujo tomado de Barnett y Hunter, (1998); **b**=Microfotografía de conidióforos y conidios de *B. bassiana*, Fotografía Tomada de Kouassi, (2001); **c**=Morfología de las colonias de *B. bassiana*.

2.6.2 Clasificación taxonómica del hongo

Según Castillo (2001), la clasificación taxonómica del hongo *Beauveria bassiana* es la siguiente:

Reino	: <i>Myceteae</i>
División	: <i>Amastigomycotina</i>
Sub división	: <i>Deuteromycotina</i>
Clase	: <i>Hypomycetes</i>
Orden	: <i>Moniliales</i>
Familia	: <i>Moniliaceae</i>
Género	: <i>Beauveria</i>
Especie	: <i>B. bassiana</i>

Es un hongo imperfecto, caracterizado por la formación de micelio septado con producción de conidios de aproximadamente 0.5 a 0.8 micras de diámetro o formas de reproducción asexual, en conidióforos que nacen a partir de hifas ramificadas.

2.6.3 Modo de acción de la *Beauveria bassiana*

El desarrollo de micosis puede estar dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo. Lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto.

La patogenicidad del hongo sobre los insectos depende de una compleja relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y la fortaleza del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del hongo. Esta relación se debe a factores muy concretos incluidos las diferencias cuticulares, la penetración cuticular y las reacciones inmunes. El desarrollo del hongo sobre el insecto puede ser influenciado por la eficacia de los hematocitos en encapsular y melanizar el patógeno. Casi siempre los hematocitos se agregan al lugar de la penetración cuticular, formando algunas veces nódulos alrededor de las esporas inyectadas. En el interior de los insectos la germinación usualmente procede de esporas que están fuera de la agregación de hematocitos pero para que se desarrollen siempre deben de estar afuera del agregado.

2.6.3.1 Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero

El primer contacto que hace la espora con la superficie del hospedero es por la cutícula. Las características físicas y químicas de las superficies de la cutícula del insecto y la espora son las responsables de esta unión. En algunos hongos la adhesión es un fenómeno no específico, mientras en otros esto es un proceso específico. Algunas glicoproteínas pueden servir como un receptor específico para las esporas (Tanada y Kaya, 1993).

2.6.3.2 Germinación de la espora

Se entiende por germinación el proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinales, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas (Volcy y Pardo, 1994).

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

El nivel de agua determina el crecimiento de los hongos y pequeñas diferencias en el nivel de humedad relativa, después de la aplicación de conidios se puede determinar de un modo u otro el éxito del hongo en el control de insectos plaga (Gillespie, 1988).

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

2.6.3.3 Penetración de la cutícula

La penetración de la cutícula del insecto por conidias germinadas, ocurre como resultado de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica por el tubo germinal (Gillespie, 1988).

El modo de penetración principalmente depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y la presencia de sustancias anti-fúngicas y nutricionales (Charnley, 1984).

La fuerza mecánica es notable en el extremo de una hifa invasiva donde la capa cuticular es deformada por presión (Tanada y Kaya, 1993). Se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física (Monzón, 2001).

La penetración de hifas al cuerpo del hospedero (Broca del café) dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedero ocurre a través de la cutícula o por vía oral. Cuando la penetración se da por la cutícula intervienen lipasas, quitinasas y proteasas. El tubo germinativo de la conidia invade directamente, produciendo apresorios que penetran la epicutícula, dando lugar a cuerpos hifales, los cuales se desarrollan en el hemocele y circulan en la hemolinfa.

2.6.3.4 Replicación en el hemocele del insecto plaga

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por física destrucción (Bustillo, 2001).

Las toxinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Ferrón, 1981).

Posterior al crecimiento del hongo en el hemocele, la micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. En la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales y cambio de color del cadáver (Ferrón, 1978).

Después de muerto el insecto, si la disponibilidad de agua es alta los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inoculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando lleguen las condiciones favorables. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres pero puede también ocurrir en insectos vivos (Tanada y Kaya, 1993).

La invasión de los tejidos por parte del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto, dura de 2 a 3 días. Durante el proceso de invasión del hongo se producen una gran variedad de metabolitos tóxicos. La *Beauveria bassiana* produce metabolitos secundarios, como son: *Beauvericin*, *Beauveriloides*, *Bassianolide*, *Isarolide*, *Enniatinas* y *Oosporeina*.

Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, incoordinación de movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere queda momificado. Algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas que corresponden a los sitios de penetración de los conidios en el tegumento.

2.6.3.5 Dispersión de las esporas

La dispersión de la espora puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de la espora y el esporangio. Cada conidia puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Fletcher 1977; Ingold 1978 citado por Tanada y Kaya 1993).

El micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta finalmente cubrirlo. Tras la muerte del insecto y bajo unas condiciones de humedad relativa alta las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con material fungoso característico.

El desarrollo del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café presenta las siguientes etapas:

- **Adhesión al tegumento:** Es cuando las esporas se adhieren sobre el cuerpo del insecto.
- **Germinación del conidio:** Bajo condiciones favorables de humedad y temperatura el hongo germina produce las hifas.
- **Penetración de la cutícula:** Es cuando las hifas penetran al insecto.
- **Multiplicación:** El hongo se multiplica en el homocelo del insecto.
- **Producción de toxinas:** Sustancias producidas por mico toxinas del hongo en el homocelo del insecto.
- **Muerte del insecto:** Es cuando en el interior del insecto penetran cambios patogénicos en la hemolinfa, acción histológica, bloqueo mecánico del aparato digestivo y otros daños físicos por acción de las toxinas.
- **Colonización:** El hongo coloniza mediante hifas filamentosas las cuales se ramifican.
- **Emergencia del micelio fuera del insecto:** El micelio del hongo sale al exterior pasando por el tegumento.
- **Esporulación del hongo:** El hongo esporula sobre la superficie del insecto.
- **Diseminación.-** Los propágulos del insecto son diseminados.

2.7 Control de la *Hypothenemus hampei*

Un buen control de las poblaciones de brocas se logra con un programa adecuado de manejo integrado, que implica la aplicación oportuna de diversos métodos de control: Medidas preventivas, resistencia varietal, control cultural, control biológico y químico.

2.7.1 Medidas preventivas

- Prohibir la importación de frutas, semillas y plantas de café de los países infestados por la broca del café.
- Prohibir la entrada de material de acopio y usado, a menos que este acompañado de un certificado de fumigación.
- Intensificar principalmente entre los productores cafetaleros la divulgación de la gravedad e importancia económica de la existencia de la broca del café.

2.7.2 Control cultural

Borbón (1991), menciona que el control cultural consiste en reducir la población de la broca mediante el manejo agro-ecológico de la plantación comprende varios aspectos: regulación de sombras, podas, control de malezas, fertilización apropiada y mejorar técnicas de recolección.

2.7.3 Control biológico

La broca del café es originaria de África, (especie exótica en el continente americano) no poseen enemigos naturales en la región, por esto ha sido necesario introducir especies que demuestren un control efectivo de la broca.

Matiello (1991), menciona que la broca del café *Hypothenemus hampei* es controlada principalmente por los *Hymenopteros* parasitoides *Prorops nasuta* (avispa de Uganda) y *Cephalonomia stephanoderis* (avispa de costa de marfil), de los cuales la última es la más eficiente, también hace referencia a los entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Spicaria javánica* y *Metharizium anisopliae*, responsables del control natural de la broca, donde el primer y tercer hongo son los más eficientes en laboratorio pero difiere en campo.

2.7.4 Control con entomopatógenos

Varias especies de hongos entomopatógenos atacan a *H. hampei*, no obstante el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es el más común que infecta a este insecto en condiciones naturales.

Según Borbón (1991), dentro de las especies que se utilizan en el control biológico de la broca hasta el momento se encuentran:

Hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo)

Es un hongo cosmopolita que parasita varias especies de insectos. Atacando la broca del café donde este hongo se reconoce por su micelio blanco que se desarrolla en los tegumentos de su hospedero.

Hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch)

El hongo *M. anisopliae* ha mostrado ser una especie que parasita en los insectos de la broca del café, permitiendo seleccionar así aislamientos activos de este, para realizar evaluaciones en campo, ya que naturalmente no se ha encontrado brocas infestadas con este hongo (Bustillo, 1991).

2.7.5 Control con parásitos *Hymenopteros*

Heterospilus coffeicola

Es un Himenóptero de la familia *Braconidae* descubierto por Ghespiere en 1924, en Zaire. La hembra (Figura 6) va de fruto en fruto hasta que encuentra la broca, deposita un huevo en el interior del fruto, del cual después de 6 días aproximadamente, emerge una larva que se alimenta de huevos y larvas de broca, esta etapa dura de 18 a 20 días; el adulto sale de del fruto por lo que es poco probable encontrarlo en su interior.

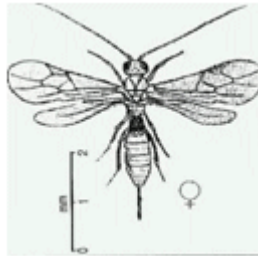


Figura 6. Hembra de *Heterospilus coffeicola* (ICAFE, 2001).

Cephalonomia stephanoderis

Es un Himenóptero de la familia *Bethylidae*, descubierto por Ticheler en 1960 en Costa de Marfil, es muy similar a *P. nasuta*. Es una avispa ectoparásita, coloca sus huevos en los estados inmaduros (larvas y ninfas) de la broca, mientras que los adultos son depredadores de todos los estados de desarrollo de la plaga. Su ciclo de vida se completa en 23,8 días a temperaturas de 22 °C y en 17,8 días a 25 °C, el número de ninfas que se puede encontrar en los frutos varia de 3 a 15 capullos.

Borbón (1991), menciona que este insecto provoca del 35 al 45 % de la mortalidad de la broca en Togo, África.

Por su parte, Castillo *et al.* (2001), reportan que se han obtenido muy buenos resultados en México, con un programa que inició en 1992, en el cual esta especie representa una de las mejores alternativas de control, ya que su ciclo biológico es ligeramente más corto en comparación al de su huésped, tiene una alta fecundidad y una supervivencia de más de un mes, a esto se une su alta capacidad de búsqueda del huésped, así como su facilidad para reproducirlo en criaderos insectarios, hacen de esta especie un agente potencial en el control de la broca.

Prorops nasuta

Es un Himenóptero de la familia *Bethylidae*; la hembra parasita las larvas en sus últimos estadios o bien en las ninfas de la broca, en las que ponen un huevo en su parte ventral. La larva de *P. nasuta* vive en exoparasitismo alimentándose de la hemolinfa de su hospedero, durante 3 ó 4 días, el desarrollo en estado ninfa dura 21 días. El ciclo total dura entre 17 y 33 días a 25 °C (Figura 7), la hembra pone de 8 a 20 huevos por fruto.

El adulto se comporta como un depredador, se alimenta de huevos y larvas de la broca, así como de los adultos. Este parasitoide se introdujo en Java, Ceylán, Indonesia y Brasil, en este último con muy buenos resultados. Al parecer plantaciones con sombra y alta humedad relativa disminuyen su actividad.



Figura 7. Ciclo de vida de *Prorops nasuta* (ICAFE, 2001).

Phymastichus coffea

Es un Himenóptero de la familia *Eulophidae*, fue descubierto por el Dr. Olger Borbón Martínez en 1987 (Togo). Este parasitoide se desarrolla sólo en las hembras de la broca, como un endoparásito, pone uno o dos huevos en el cuerpo de la hembra, la cual muere tres o cuatro días después. Su ciclo biológico se completa entre 20 - 25 días a $25,6 \pm 1,4$ °C (Figura 8). Puede causar el 30% o más de la mortalidad de la broca en ciertas épocas del año.



Figura 8. Ciclo de vida de *Phymastichus coffea* (ICAFE 2001).

2.8 Patogenicidad

La patogenicidad, es una habilidad cualitativa del patógeno para causar enfermedad, es determinada por factores relacionados con el huésped, la fisiología del hongo y el medio ambiente (Shapiro *et al.* 2005).

Según Gonzales *et al.* (1993), la patogenicidad determina si el patógeno ataca a la plaga a la cual esta dirigida, sin embargo no asegura la efectividad bajo condiciones de campo a diferencia de las condiciones de laboratorio. La determinación del porcentaje de virulencia del hongo *Beauveria bassiana* debe ser efectuado en un laboratorio que consta de todos los requerimientos necesarios para evitar contaminaciones y la obtención de un material biológico puro y de buena calidad.

Alves (1996), define patogenicidad a la capacidad de un microorganismo patógeno a provocar enfermedad en términos de virulencia y agresividad sobre insectos e individuos; refiriéndose a la virulencia como la capacidad de vencer resistencia específica del hospedero conocido como resistencia vertical y la agresividad afectando la resistencia horizontal del hospedero.

2.9 Virulencia

Alves (1996), define virulencia a la capacidad del patógeno a incidir en el detrimento del hospedero venciendo su resistencia. Así mismo señala que un patógeno posee alta virulencia cuando incide sobre un gran número de individuos produciendo epizootias con gran capacidad de diseminación y sin duda ser seleccionadas para el control microbiano. Por otro lado Thomas *et al.* (2004) y Shapiro-Ilan *et al.* (2005), mencionan que la virulencia es la capacidad de producir enfermedad en términos de grado o velocidad de daño en el insecto, es una característica esencial para todo microorganismo si se quiere utilizar en estrategias a corto plazo, lo cual le permite tener una capacidad para matar más rápidamente y reducir los daños al cultivo, ya que tendrá la capacidad de reducir la población del insecto plaga por debajo del umbral económico de daño.

2.10 Tiempo letal medio (TL₅₀)

Jiménez (1992), menciona que si nos basamos en los ensayos de los aislamientos del hongo que se mostraron patogénicos contra la broca del café y se compararon simultáneamente en un bioensayo a fin de estimar el tiempo tomado para matar el 50% y 100% de los insectos infestados, esto buscaría favorecer a los tratamientos que causaron mayor mortalidad en los días después realizada la inoculación para elegir los aislamientos más agresivos.

2.11 Aislamiento del hongo *Beauveria bassiana*

Jiménez y Gomes (1992), señala que estudios ya realizados comprobaron que la primera etapa para el desarrollo de cualquier hongo entomopatógeno como insecticida, es la selección de aislamiento altamente patogénicos y virulentos para el insecto que se quiere controlar, para lograrlo es necesario diseñar un sistema de bioensayos apropiados.

2.12 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc). El pH ha de ser ligeramente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos.

Además se deben añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de las bacterias saprófitas que suelen contaminar las muestras. Los más usados son el Cloranfenicol y la Gentamicina.

Existen tres tipos de medios de cultivo para los hongos de acuerdo a su procedencia y origen de sus componentes:

1. Medios naturales, se caracterizan por estar preparados por compuestos de origen natural y su composición no es exacta, como pedazos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición, no son fácilmente reproducibles, ni de amplio uso.
2. Medios semisintéticos, están conformados por compuestos de origen natural y químico, estos medios de cultivo están preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de procedencia desconocida o variable.
3. Medios sintéticos, presentan composición química definida cuantitativa y conocida. La mayoría de las fórmulas de los medios de cultivo utilizados para hongos contienen peptona, algún carbohidrato y agar (Pelczar *et al.*, 1997).

Según Kuno y Mullej (1982), la gran variedad de nutrientes que requiere los hongos, puede ser regulado con la composición del medio adecuado o puede variar, los medios semisintéticos para la caracterización de los mismos pueden ser semi-sólidos. El cultivo estacionario de microorganismos sobre la superficie de un medio nutriente ha sido modificado varias veces para lograr su uso como método de producción a escala.

2.13 Inoculadores

Según French (1982), las inoculaciones pueden ser provocadas en laboratorio o hechas en campo. La condición del inóculo y de la planta afecta el resultado, el inóculo debe mantenerse en estado virulento, agresivo y debe tomarse en cuenta que su aplicación con medio nutritivo o en cantidad excesiva puede ser poco representativa y no dar resultados que se correlacionan con lo que ocurre en la naturaleza, para ver su calidad.

2.14 Producción masiva de hongos entomopatógenos

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato (Monzón, 2001).

Tovar (1999), dice que el proceso inicial de producción de un micro plaguicida se inicia con la colecta de aislamientos fúngicos y la posterior selección de estos, en virtud de los ensayos de virulencia sobre los insectos que se desea controlar y otros parámetros deseados.

3. LOCALIZACION

3.1 Ubicación Geográfica

El trabajo de investigación se efectuó en el departamento de La Paz, laboratorio de Biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía.

La cual se ubica a una altitud de 3630 msnm entre los 16°30' Latitud sur y 69°08' Longitud oeste del meridiano de Greenwich, ubicado entre las calles Héroes del Acre y Conchitas.

3.2 Condiciones de laboratorio

Las condiciones ambientales dentro del laboratorio para el trabajo fueron controladas con rangos de temperatura de 22°C como mínima, una máxima de 28°C, una media de 25°C y una humedad relativa de 70%.

De la misma forma el laboratorio se mantuvo constantemente en condiciones asépticas con aseo periódico mediante la desinfección con solución de hipoclorito de sodio al 10% y el material de manipuleo con alcohol etílico al 96%.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Materiales de campo

Los materiales utilizados fueron:

- Cámara fotográfica
- Frascos de recolección
- Plastaformo
- Bolsas de nylon
- Libreta de campo
- Geographic Position System (GPS)

4.1.2 Material de laboratorio

Entre los materiales utilizados para los bioensayos fueron:

- Microscopio común
- Balanza electrónica
- Cámara de flujo laminar
- Probetas
- Vasos precipitados
- Matraz Erlenmeyer
- Pipetas
- Cajas petri
- Porta y cubre objetos
- Tubos de ensayo
- Olla a presión
- Papel ph
- Vasos de vidrio
- Frascos de vidrio
- Mechero
- Plastifilm
- Algodón
- Alcohol
- Hipoclorito de sodio
- Agua destilada
- Arroz estaquilla
- Bolsas de polietileno
- Aspersor de mano
- Termómetro

4.1.2 Material biológico

El material biológico fue:

- Variedad de grano de café Caturra, Catuai y Criolla
- Cepas de *Beauveria bassiana* multiplicado en laboratorio después de su colecta en La Asunta.
- Hembras adultas de la broca del café para su cría en laboratorio.

4.2 Metodología

La metodología empleada en la investigación fue la siguiente:

4.2.1 Estudio de Campo

El trabajo de campo se realizó en el municipio de La Asunta, en dos comunidades, donde se realizó un muestreo al azar de frutos de café, ya que este tipo de muestreo permitió tomar muestras de una población de tal forma que cada unidad tenga una oportunidad igual a ser muestreada.

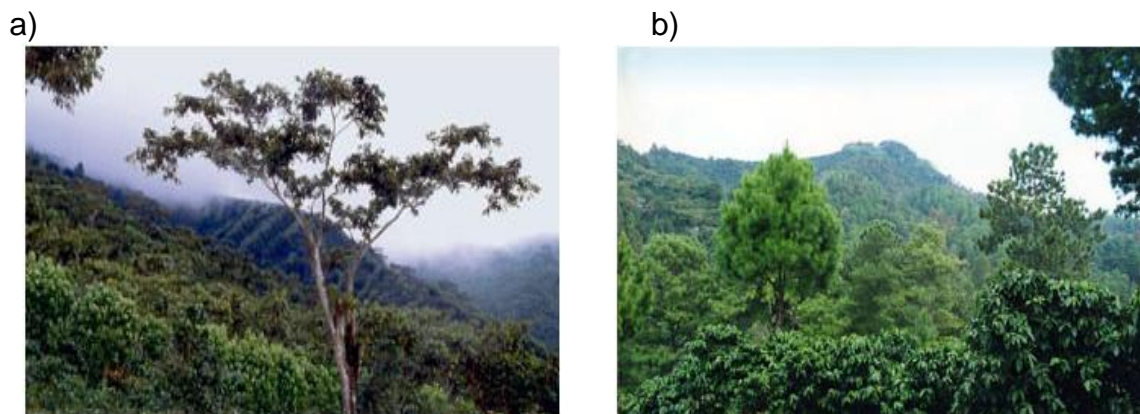


Figura 9. Zona de muestreo, a=Villa Camacho; b=San Pedro Florida, La Asunta Sud Yungas de La Paz.

4.2.1.1 Recolección del hongo *Beauveria b.* en campo

Para la recolección de cepas del hongo *B. bassiana* se tomó en cuenta dos comunidades, Villa Camacho y San Pedro Florida, puesto que estas zonas tenían la presencia del hongo en el cafetal.

4.2.1.1.1 Recolección de cepas nativas en Villa Camacho

La recolección de las cepas nativas de *B. bassiana* se la realizó en la comunidad de Villa Camacho ya que esta zona era la única que contaba con la presencia natural del hongo en el cafetal, se tomaron muestras en 10 sitios del cafetal llegando a obtener 60 frutos que tenían la presencia del hongo, cada muestra tomada se las acomodó en plastaformas que tenían perforaciones que igualaban el tamaño del fruto del café, cuidadosamente se acomodó cada fruto de manera que no se llegara a dañar durante el transporte al laboratorio.

4.2.1.1.2 Recolección de cepas asperjadas en el cafetal provenientes de la estación experimental de Coroico (COBIPLA).

Las cepas que se encontraban en el cafetal de San Pedro Florida como en las otras comunidades, fueron asperjadas anteriormente en los cafetales para el control de la broca del café. Estas cepas se las trajo de la estación experimental de Coroico (COBIPLA), que se dedica a la multiplicación del hongo *B. bassiana* para el control de la broca, lo que determino que se recolectaran estas cepas para su aislamiento y reproducción en laboratorio, las colectas de frutos con presencia del hongo fueron recolectadas en plastafórmos en pequeños orificios para su mejor transporte.



Figura10. Muestreo de frutos brocados con la presencia natural del hongo entomopatógeno en La Asunta Sud Yungas de La Paz, a=Variedad Catuai; b=Agricultor colectando muestras del hongo.

4.2.1.2 Determinación del porcentaje de infestación

Para determinar el porcentaje de infestación, se recolectaron 100 frutos al azar de la parte media de los árboles de café, donde se realizó una evaluación del porcentaje de infestación de la presencia natural del hongo como de la plaga en el cafetal, el cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Infestación} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de frutos afectados}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de frutos}} * 100$$



Figura 11. Frutos sanos de café.



Figura 12. Frutos Brocados.



Figura 13. Frutos con presencia de *B. bassiana*.

4.2.2 Estudio de laboratorio

4.2.2.1 Desarrollo y selección del hongo *B. bassiana*

Los granos colectados con presencia del hongo proveniente del laboratorio de COBIPLA que fueron asperjados al cafetal fueron aislados en medio nutritivos, como también el hongo nativo de la zona y el hongo obtenido del inculo en broca.

a) Preparación del ambiente

Para que el ambiente del laboratorio sea adecuado para el estudio se realizó la limpieza del laboratorio desinfectándolo con hipoclorito de sodio al 5%, como también de todo el equipo, dejándolo cerrado por unas 24 horas. La asepsia es esencial en el lugar de trabajo para evitar contaminación de hongos y bacterias.

También se procedió a desinfectar los frutos colectados (cerezas brocadas con manifestaciones del hongo *Beauveria bassiana*) en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % por inmersión durante treinta segundos, para luego ser enjuagadas en agua destilada y luego puestos sobre papel absorbente.

b) Preparación del medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado fue una solución MS de Murashige y Skoog (1962), que tiene un amplio rango de acción para muchas especies de organismos. Este medio fue el más adecuado para el desarrollo del hongo *B. bassiana* ya que mostró un desarrollo favorable. La preparación se inició con la mezcla de soluciones en 25.5cc con adición de sacarosa 3g y agar como gelificante (1g por cada 100 ml) todo para la cantidad requerida de 200 ml de medio, se reguló el pH a 5.7 para luego ser distribuido en cada placa petri empleando 30 ml de solución, las cuales fueron esterilizadas en olla a presión durante veinte minutos, a 15 psi de presión y 121 °C de temperatura con el fin de eliminar posibles contaminaciones, luego fueron llevadas a enfriar para su inoculación.

c) Siembra del hongo para la obtención de las matrices

Los frutos de café con presencia del hongo fueron colocados bajo observación en microscopio para la ubicación de los puntos donde se encuentra el hongo para luego ser aislado y puestos bajo observación, una pequeña porción del hongo se depositó en la parte central de cada caja petri con medio de cultivo para luego ser sellado con plastifilm, registrando los datos de identificación de la colecta.

Las placas son colocadas ordenadamente de acuerdo a la colecta en el área de crecimiento en condiciones controladas como muestra el cuadro 4, dejando un periodo de

incubación de 18 a 21 días tiempo en que ocurre el crecimiento y reproducción de conidios, se registró la identificación de la colecta y la fecha de inoculación.

Cuadro 4. Condiciones de laboratorio

Tº Máxima (°C)	Tº Media (°C)	Tº Mínima (°C)	H. Relativa (%)	Luz (hrs/día)
28	25	22	70	16

d) Siembra del hongo obtenida de la broca infectada

Se tomó muestras del hongo de la broca ya infestada y muerta, con la ayuda de un asa previamente flameada en mechero de alcohol se depositó la porción del conidio en la parte central de las placas petri con medio de cultivo, sellado posteriormente con una tira de parafilm, sobre la cual se registró la identificación de la colecta y la fecha de inoculación.

4.2.2.2 Evaluación de las muestras de *Beauveria bassiana*

La evaluación de las muestras tuvo como inicio la inoculación en medio nutritivo, donde se tomaron lecturas del crecimiento con la ayuda de un calibrador midiendo en diámetro de crecimiento diario de cada placa petri.

Tomando en cuenta las siguientes características:

Desarrollo.- Evaluándose a partir del segundo día luego de la inoculación y medio en (mm), con la ayuda de un calibrador.

Días a la esporulación.- Evaluándose a partir del día de inoculación.

Días a la maduración del conidio.- Evaluándose a partir de la esporulación de las conidias.

a) Selección de las cepas que mostraron un mejor desarrollo

Para la selección de las cepas en los tres tratamientos se tomó como punto de partida el desarrollo en cada placa petri, teniendo 30 muestras por cada tratamiento haciendo un total de 90 muestras, donde se seleccionó posteriormente 10 cepas representativas por tratamiento para su evaluación en los bioensayos de virulencia y patogenicidad, ya que estos mostraron superioridad en tiempo de desarrollo, esporulación y maduración del conidio, identificando de esta manera las cepas para los bioensayos.

4.2.2.3 Cría masiva del insecto plaga

Para la cría del insecto plaga se utilizó cámaras de cría en las cuales se colocaron bidones de plástico perforados lateralmente cubiertas con tela favoreciendo la ventilación, en la base de los bidones se colocó papel absorbente humedecido con agua destilada para la humedad necesaria para el insecto (figura 14).



Figura14. Cámara de cría para la broca del café.

Para la obtención de café pergaminado se colectó en campo café guinda y se procedió al despulpado (epicarpio) y fermentado por un lapso de 18 horas, lavándose con agua de grifo quitando el mucílago (mesocarpio) con el fin de que no proliferen agentes contaminantes. Los granos se orearon a sombra por 24 horas obteniéndose café pergaminado seco de agua (endocarpio), para ser incorporado como alimento para las brocas en los diferentes frascos de cría, colocándolas en los agujeros del plasta-formo en cada cámara de cría.

4.2.2.4 Producción de las cepas del hongo a partir de las matrices

La producción de las cepas del hongo se realizó en sustrato arroz por ser un sustrato que favorece el desarrollo del hongo, se emplearon 200 g de sustrato en bolsas de polietileno y bandejas de plástico para su multiplicación.

a) Preparación del sustrato

Para la producción del hongo se utilizó arroz, realizando una selección de impurezas para evitar posibles contaminaciones, posteriormente se procedió al lavado del mismo con agua de grifo para luego ser remojado con agua hervida durante quince minutos, luego escurrido con un colador plástico.

b) Cantidad de sustrato

La cantidad en cada bolsa de polipropileno (20x30 cm) fue de 200 g de arroz, asegurándose con plastifilm, para facilitar el intercambio de gases para obtener un buen desarrollo en la etapa de maduración. Esta misma cantidad se dispuso también en cada bandeja de plástico.

c) Esterilización del sustrato arroz

Para la esterilización se colocaron las bolsas y bandejas con sustrato en olla a presión (autoclave), durante 30 minutos a 15 psi de presión y 121 °C de temperatura con el fin de eliminar agentes contaminantes, esterilizado las bolsas y bandejas se dejaron enfriar 24 horas, para luego agitarlas evitando aglomeraciones de los granos de arroz al momento de la inoculación, lo que favorece al crecimiento homogéneo del hongo sobre el sustrato.

d) Inoculación del hongo

Antes de realizar la inoculación del hongo en el sustrato se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%, después se realizó la inoculación de las bolsas y bandejas empleando las cepas madre de cada tratamiento, para luego ser sacudidas ligeramente para una mejor distribución de las cepas del hongo en el sustrato.



Figura 15. Crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* en bandeja de plástico, a= Hongo con una pigmentación blanca cremosa; b= Hongo con una pigmentación blanca rosada.

e) Incubación y maduración de bolsas

Las bolsas y bandejas ya inoculadas se llevaron al área de crecimiento donde se mantuvieron bajo condiciones controladas temperatura de 22 a 28 °C, en un periodo de 7 días se revisaron las bolsas y bandejas diariamente donde se realizó la selección de las que mostraron buena calidad y eliminando las que presentaron contaminación y un crecimiento lento.

Todas las bolsas seleccionadas de la cámara de incubación se colocaron ordenadamente en estantes por un tiempo de 25 días, tiempo en el cual el hongo esta listo para su aplicación en campo.



Figura 16. Crecimiento del hongo en bolsas con sustrato de Arroz.

4.2.2.5 Concentración de conidios

Para el recuento de conidios se utilizó la “Cámara de Neubauer o Hematocímetro”, donde esta concentración determinará el número de unidades infectivas existente para así poder establecer una dosis.

Para el conteo de conidias se procedió a realizar diluciones evitando posibles aglomeraciones entre conidias para ello se mezcló 200 g de sustrato arroz inoculado en 1 litro de agua destilada, seguidamente se tomó muestras de 1 ml en tubos de ensayo que contenían 9 ml de agua destilada, repitiendo este procedimiento 5 a 6 veces para la concentración deseada, luego se agitó durante unos minutos para luego tomar una cantidad pequeña para ser depositada en la cámara para que entre por capilaridad dejando reposar 30 segundos y se lleva al microscopio para su respectivo conteo de conidias, este procedimiento se lo realizó varias veces hasta tener un promedio del número de conidias presentes.

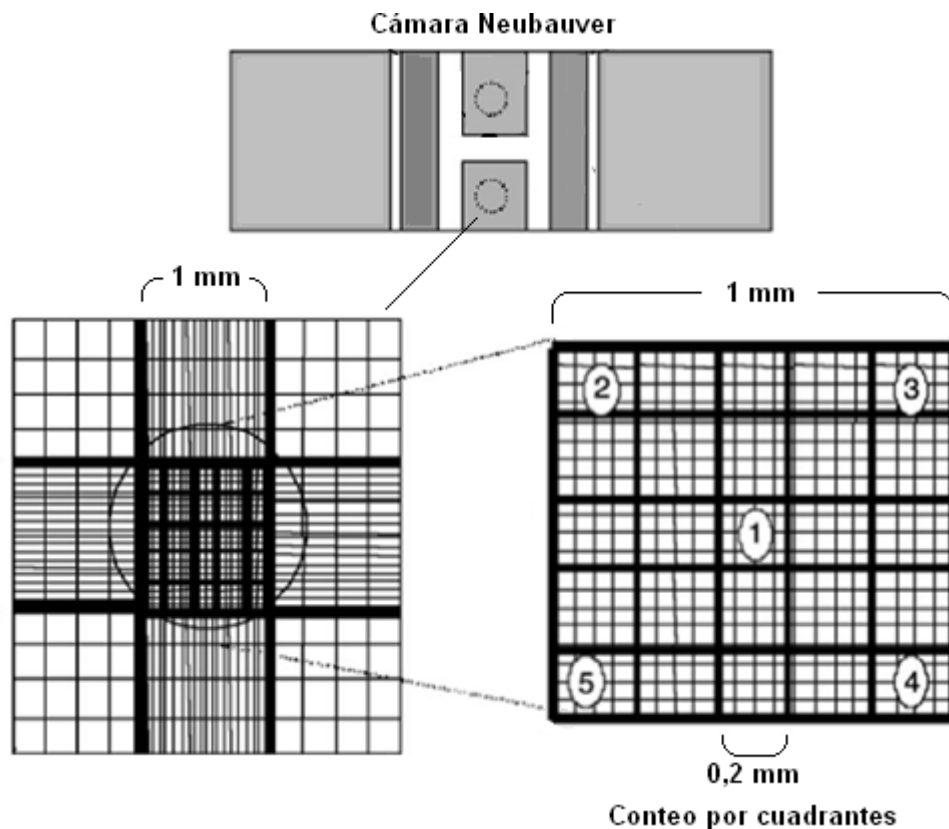


Figura 17. Cámara Nuebauer o hematocímetro

Para el recuento se tomó el cuadrante central sumando los cinco cuadrantes secundarios de la cámara obteniéndose así la concentración de conidias, mediante la siguiente relación (French, 1982).

$$\text{Suma de 5 C.S.} \times 50000 = \text{Número/cc}$$

Para los bioensayos se ajustó las dosis a 1×10^7 conidios/mililitro, obtenida por Jiménez y Gómez (1992); González (1993).

4.2.2.6 Infección del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café

Determinada la dosis de aplicación se procedió a la infección del hongo de acuerdo a cada tratamiento de estudio, previa a la infección se desinfectó a las brocas con una solución de hipoclorito al 0.5 (%) por un lapso de 30 segundos, para luego ser enjuagadas con agua destilada y secadas en papel absorbente, luego se seleccionaron las que mostraron mayor actividad.

Una vez seleccionadas se infectó las brocas con cepas del hongo puestas en solución en tubos de ensayo ya dosificadas, puestas bajo inmersión durante 15 segundos agitándose ligeramente. Seguidamente las brocas son extraídas y colocadas en cajas petri con papel húmedo absorbente, luego se observó el comportamiento del hongo sobre la brocas infectadas mostrando el desarrollo del hongo sobre el cuerpo del insecto llegando a cubrirlo con una capa blanca.

4.2.2.7 Parámetros de evaluación por la infección del hongo *B. bassiana*

Patogenicidad: Para la evaluación de la patogenicidad se determinó si el patógeno realmente afecta al insecto plaga a la que esta dirigida por la alteración ocasionada por el agente patógeno sobre una o varias funciones esenciales del hospedero (insecto broca), donde se evaluó por los postulados de Koch (Agrios, 1996):

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen.
2. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características, o bien debe permitirse que se desarrolle sobre el hospedante susceptible y registrar su presencia y los efectos que produzca.

3. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en el hospedante sano en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en el hospedante inoculado.

4. El patógeno debe aislarse una vez mas en cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

- **Virulencia:** Se define como la probabilidad que tiene de causar la muerte al hospedante en un periodo de tiempo determinado.

Se seleccionaron hembras adultas de la broca del café para ser desinfectadas y sometidas a bioensayos de tiempo letal (tiempo en que el insecto tiende a morir), viendo los síntomas de la enfermedad sobre los insectos tratados hasta su muerte.

- **Tiempo letal:** Es el tiempo en el cual un parasitoide tiende a matar al hospedante, para esta evaluación se utilizó 20 brocas desinfectadas para cada tratamiento, las cuales se sumergieron por un lapso de 15 segundos en las suspensiones conidiales y puestas en placa petri observando el desarrollo de la enfermedad causada por el hongo hasta su muerte.

El tiempo letal es medido en horas hasta la muerte del 50% y 100% de los insectos de cada aislamiento. Esto buscara favorecer a los tratamientos que causaron mayor mortalidad en los días después realizada la inoculación, de manera de aumentar la exigencia para elegir los aislamientos más agresivos. Los ensayos se evaluaron hasta el momento en que uno de los aislamientos logró el 100% de mortalidad de insectos.

4.2.2.8 Ciclo de infección del hongo *Beauveria bassiana*

El ciclo de infección del hongo se observó desde el momento en que se realizó la infección de las brocas con cepas del *B. bassiana* en las cajas petri, su desarrollo y comportamiento da inicio cuando las conidias del hongo entran en contacto con el cuerpo del insecto, germinan y penetran al cuerpo, llegando a cubrirlo totalmente con formaciones blanquecinas. Las fases del ciclo del hongo se dividen en: Inoculación a muerte, muerte a producción del micelio, muerte a cubrimiento del micelio, muerte a conidio génesis y muerte a liberación de conidias.

4.2.2.9 Producción masiva del hongo *B. bassiana*

Para la multiplicación masiva se seleccionaron las muestras las que mostraron ser más efectivas en el control de la broca del café, cuales se destinaron para ser producidas en bolsas de polipropileno.

4.2.3 Diseño Experimental

El análisis de los datos de patogenicidad, virulencia y tiempo letal medio se desarrolló mediante un Diseño Completamente al Azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones de acuerdo a Padrón (1996), el modelo estadístico lineal empleado es el siguiente:

$$Y_{ij} = u + a_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Observación cualquiera

u = Media general

a_i = Efecto del i-esimo tratamiento

E_{ij} = Error experimental

- **Características de la unidad experimental**

Las unidades experimentales y cada uno de sus tratamientos tuvieron las siguientes características:

A1	A3	A2	T
T	A2	A1	A3
A3	A1	T	A2
T	A2	A3	A1

Figura 18. Distribución de las unidades experimentales

- **Descripción de los tratamientos**

T = Testigo (T) como parámetro de comparación bajo desinfección.

A1 = Hongo proveniente de COBIPLA e infectado en broca.

A2 = Hongo nativo (condiciones de campo) e infectado en broca.

A3 = Hongo obtenido del inóculo de la broca e infectado en broca.

4.2.4 Variables de Respuesta

- Número de frutos con presencia de *Beauveria bassiana*.

Para el cálculo del número de frutos con presencia de *B. bassiana* se utilizó la siguiente ecuación: % **Infestación**= N° de frutos con *beauveria* / N° total de frutos * 100

- Concentración de unidades infectivas (conidios) del entomopatógeno.

Para determinar el número de unidades infectivas, se tomaron muestras de soluciones ya preparadas con conidios del hongo, para ser observadas y contadas en microscopio con ayuda de la cámara Neubauer o hematócmetro.

- Días a la esporulación.

Se evaluaron desde el día de inoculación del hongo al insecto plaga.

- Días a la maduración del conidio.

Se evaluaron a partir del día de esporulación de los conidios del hongo *B. bassiana*.

- Desarrollo del hongo en sustratos biológicos (arroz).
- Distribución de la mortalidad diaria de población de brocas.
- Mortalidad acumulada en tiempos letales y etapas de desarrollo del hongo y su acción sobre la broca.
- Fases de desarrollo del hongo entomopatógeno.

Para determinar el desarrollo del hongo se tomaron en cuenta cinco fases: Inoculación a muerte, muerte a producción del micelio, muerte a cubrimiento micelial, muerte a conidio génesis y muerte a liberación de conidios.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Estudio de campo

5.1.1 Porcentaje de infestación de la presencia natural hongo *Beauveria bassiana*

Para determinar el porcentaje de infestación se realizaron colectas en el cafetal de las comunidades Villa Camacho y San Pedro Florida, se tomó un total de 100 frutos de café de la parte media del árbol por ser más productiva (Figura 19). Los frutos colectados fueron sometidos bajo una observación minuciosa para determinar el porcentaje de infestación del hongo *Beauveria bassiana* como también del insecto plaga.



Figura 19. Frutos de café mostrando la parte media más productiva del árbol

Las zonas de estudio presentan rangos de altitud que varían entre los 1450 a 1500 msnm, donde la manifestación de la plaga en la comunidad de Villa Camacho, en la figura 21, se observa un porcentaje del 65% de infección de brocas de café. Guharay, (2000) menciona que el hongo ataca naturalmente a la broca, ocasionando entre el 40 y 50 % del control de la plaga, tomando en cuenta zonas húmedas y donde hay alta incidencia de la plaga. Mientras que en la comunidad de San Pedro Florida muestra un 57% de presencia de la plaga en el cafetal, el porcentaje de la zona San Pedro Florida resultó ser casi en un cincuenta por ciento debido a la aplicación reciente de cepas del hongo que se asperjaron en el cafetal para controlar la presencia de la plaga.

Mendoza (1993), indican que el hongo *B. bassiana* provoca hasta el 35% de mortalidad de broca. Lo que determina que al realizar aspersiones con cepas de *Beauveria bassiana* en el cafetal, la incidencia de la plaga tiende a bajar por el control biológico que realiza el hongo sobre el insecto plaga.

La presencia del hongo *B. bassiana* presenta una infección mayor en la zona de San Pedro Florida por ser una zona asperjada con cepas del hongo provenientes de la estación experimental de Coroico con un 34% de infestación del hongo en el cafetal, mientras que en la zona de Villa Camacho se registró un 26% de infestación natural del hongo en el cafetal (Figura 20). Bustillo (2002), señala que la presencia de *B. bassiana* en el campo está influenciada por las condiciones climáticas, en condiciones de alta humedad los niveles de control pueden llegar hasta un porcentaje del 75%. Guharay *et al.* (2000), indican que las conidias de *B. bassiana* permanecen sobre los frutos de 3 a 4 días después de la aplicación, lo que hace suponer que posteriormente a ello no afectarían a la broca del café.

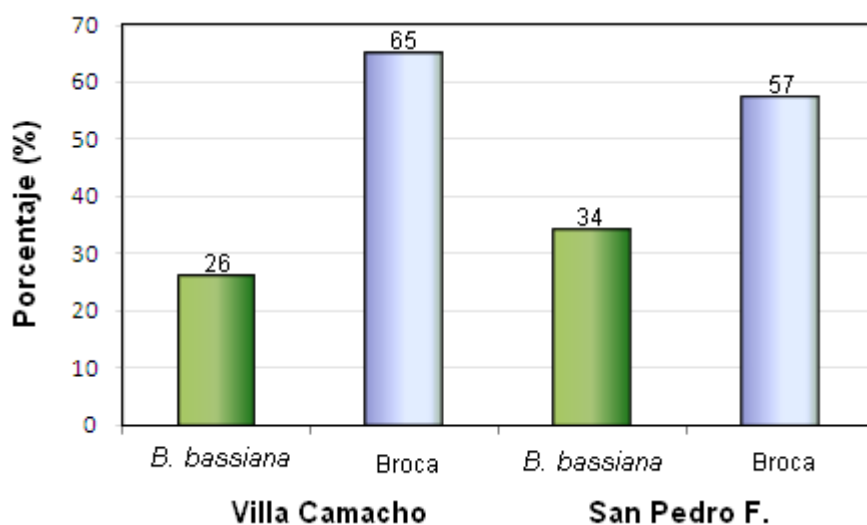


Figura 20. Comparación de infestación del hongo *Beauveria bassiana* y la broca del café en las zonas de recolección

Existe una diferencia de infestación del hongo en el cafetal entre las dos zonas por la aspersión de cepas de *B. bassiana* realizadas en la comunidad de San Pedro Florida entre la presencia natural del hongo en el cafetal de la zona Villa Camacho, por lo que cuando se realizan aspersiones de cepas del hongo en el cafetal existe un control mayor de la plaga y por consiguiente una presencia mayor de cepas en el cafetal, mientras que cuando existe la presencia natural del hongo esta tiende a estar relacionado a la plaga, lo que indica que a mayor presencia de la plaga existe un mayor control biológico natural relacionado con las condiciones climáticas que favorece el desarrollo del entomopatógeno.

5.2 Estudio de laboratorio

5.2.1 Viabilidad y desarrollo del hongo *Beauveria bassiana*

Para determinar la viabilidad y desarrollo del hongo, se contó con un total 120 muestras en medio MS en los tres tratamientos, de las cuales se seleccionaron 30 muestras para cada tratamiento las que mostraron un mejor desarrollo en el medio nutritivo, posteriormente se trabajo con 10 muestras en cada tratamiento siendo las más representativas ya que mostraron un desarrollo adecuado en corto tiempo en el medio de cultivo (MS) llegando a un crecimiento del tamaño en 12 días (Cuadro 5).

De las observaciones realizadas en el estudio se llego a identificar el hongo *Beauveria bassiana* por las claves taxonómicas y caracteres morfológicos en los diferentes estudios realizados, donde las esporas son globosas además de ser patógeno específico de coleópteros. Se realizo bio-ensayos de infección del hongo en insectos adultos hembras de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) determinando de esta forma la identificación del entomopatógeno. Bustillo (2001), menciona que el género *Beauveria* se caracteriza por presentar un micelio blanco con conidias globosas, ovoides y unicelulares formando grupos densos (Figura 21).

En la investigación se comprobó que el hongo *Beauveria bassiana* llega a adaptarse con normalidad al ser sometido a aislamientos de medios semi-sólidos nutritivos y biológico (Arroz) favoreciendo su ciclo de desarrollo.

En el estudio se rescató las siguientes características:

Crecimiento en forma de discos concéntricos

Colonia blanca, cremosa y pulverulenta conforme el hongo va llegando a la maduración.

Colonia de crecimiento rápido (cepa proveniente de COBIPLA) 8.00 cm de crecimiento en diámetro y 4 cm² de superficie diametral.

Colonia de crecimiento de la cepa natural de la zona 7.3 cm de diámetro y 2.19 cm² de superficie.

Para comprobar la identificación de la especie se realizó observaciones bajo el microscopio, mostrando las siguientes características:

En cultivo semi-sólido se observa estructuras pequeñas de color amarillo cremoso mostrando así la maduración de las esporas (Figura 21), conidios globosos elipsoides, con pigmentación rosada y un pigmento amarillo en la maduración del género *Beauveria bassiana*.

El crecimiento diario y el diámetro que presentaron las cepas en el estudio se muestran en el cuadro 5; en un tiempo de doce días.

Cuadro 5. Crecimiento del hongo en tamaño (12 días)

Cepas	Numero de días evaluado											Color Colonia	Forma Cepa	Diámetro (cm)
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
HN/VC 24	0.8	1.3	1.6	2.5	3.5	4.2	5.0	5.8	6.4	7.0	7.3	Blanco	Disco	7.3
HN/VC 5	1.5	2.1	2.6	3.1	3.7	4.1	4.6	5.1	5.4	5.7	6.1	Blanco	Disco	6.1
HN/VC 2	1.3	1.8	2.3	2.7	3.1	3.4	3.8	4.5	4.9	5.3	5.8	Blanco	Disco	5.8
HN/VC 15	1.2	1.9	2.5	3.0	3.5	3.7	4.0	4.5	4.9	5.2	5.7	Blanco	Disco	5.7
HIB/LB 9	1.4	1.8	2.4	3.0	3.7	4.4	5.2	5.9	6.5	7.1	7.7	Blanco	Disco	7.7
HIB/LB 11	1.6	2.3	3.1	3.9	4.4	5.1	5.4	5.8	6.2	6.9	7.5	Blanco	Disco	7.5
HIB/LB 29	1.3	1.7	2.3	2.9	3.5	4.1	4.6	5.4	6.1	6.7	7.3	Blanco	Disco	7.3
HIB/LB 7	1.4	2.1	2.5	2.9	3.6	4.0	4.7	5.3	5.9	6.5	7.0	Blanco	Disco	7.0
HA/SPF 10	1.2	1.9	2.8	3.7	4.8	5.9	7.0	8.0	8.0	8.0	8.0	Blanco	Disco	8.0
HA/SPF 27	1.6	2.2	3.1	4.7	5.9	6.7	7.7	8.0	8.0	8.0	8.0	Blanco	Disco	8.0
HA/SPF 11	1.6	2.3	3.1	3.9	4.6	5.3	5.9	6.2	6.7	7.1	7.5	Blanco	Disco	7.5
HA/SPF 23	1.0	1.6	2.1	2.7	3.3	3.9	4.4	4.8	5.5	6.2	6.7	Blanco	Disco	6.7

HN= Hongo nativo; HIB= Hongo obtenido del inoculo de broca; HA= Hongo asperjado.

El patógeno inicia su desarrollo con bastante humedad mostrándose en la caja petri en forma de transpiración, a los 2 días la inoculación se ve influenciado por factores genéticos y ambientales. En el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) llega a presentarse el crecimiento en un lapso de 48 horas, donde el mayor diámetro alcanzado es de 8.00 cm con una superficie de 4.0 cm² de la cepa HA/SPF 27 siendo esta cepa proveniente de COBIPLA, en caso del hongo natural de la Asunta llega a un 7.3 cm de diámetro y 2.19 m² de superficie de la cepa HN/VC 24.

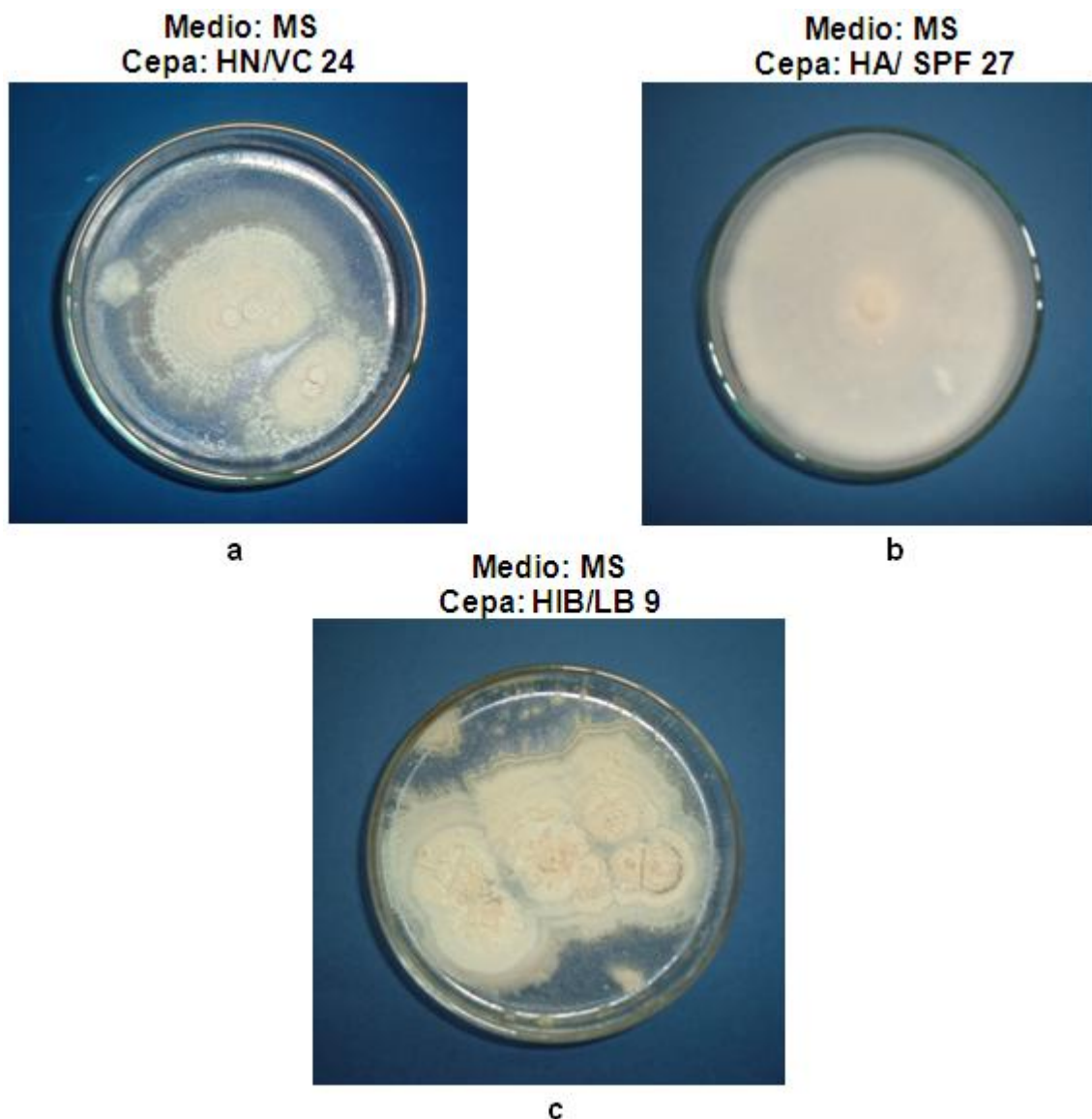


Figura 21. Crecimiento en diámetro y forma del hongo *Beauveria bassiana*, a=Cepa nativa de La Asunta, zona Villa Camacho; b= Cepa colectada en San Pedro Florida; c= Cepa obtenida del inóculo de la broca del café.

5.3 Evaluación de la patogenicidad del hongo (*Beauveria bassiana*) sobre la broca del café (*Hyphotenemus hampei*)

La evaluación de la patogenicidad del hongo *B. bassiana* permitió determinar los aislamientos que mostraron actividad efectiva sobre la broca del café, estableciendo la capacidad del hongo para matar a la broca, se seleccionó cuatro cepas representativas de cada tratamiento (Cuadro 6), siendo expuestas las brocas bajo infección con el hongo en sumersión en un tiempo de 15 segundos.

Este ensayo mostró que existe una variabilidad en la patogenicidad de los aislamientos de *Beauveria bassiana* hacia la broca del café para los cuatro tratamientos estudiados, mostrando una patogenicidad efectiva.

Cuadro 6. Evaluación de la patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre adultos de la broca del café

Tratamiento (Cepas)	Población expuesta	Mortalidad A las 64 hrs (%)
HIB 7	20	100
HN/VC 15	20	95,31
HA/SPF 27	20	92,25
HN/VC 20	20	89,14
HIB 5	20	87,11
HA/SPF 17	20	84,5
HA/SPF 25	20	82,94
HIB 22	20	82,93
HN/VC 11	20	79,84
HIB 21	20	77,51
HN/VC 24	20	76,74
HA/SPF 3	20	63,57
Testigo	20	1,14
Total mortalidad causada		84,41

HN= Hongo nativo; HIB= Hongo obtenido del inóculo de broca;
HA= Hongo asperjado.

La mortalidad causada por infección del hongo *B. bassiana* sobre adultos de hembras de la broca del café *Hypothenemus hampei*, mostraron un 100% de mortalidad a partir de las 64 horas de inoculación, observándose una disminución de los movimientos del insecto, donde las brocas ya muertas llegan aun estado momificado y posteriormente este queda cubierto totalmente con la presencia del hongo sobre todo el cuerpo del insecto. St Leger *et al.* (1992), sugieren que la susceptibilidad o resistencia de un insecto a un hongo en particular, puede estar determinada por los componentes de la cutícula al inicio de la infección.

Los índices del porcentaje de mortalidad registrados muestran que todas las cepas son altamente patogénicas ya que llegan a matar la totalidad de insectos, estos resultados indican que el hongo es una buena alternativa para el control de la broca del café.

Cuadro 7. Análisis de varianza de la Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F Cal.	Pr > F
Tratamientos	15	67419.25	4494.62	2680.02	0.0001**
Error	48	80.50	1.68	-	-
Total	63	67499.75	-	-	-

G.L. = Grados de libertad; S. C.= Suma de cuadrados, C. M. = Cuadrado medio; F Cal. = F calculada; Pr. F = Probabilidad de F ; ** = Altamente significativo; * = Significativo; ns = No significativo, C.V. = 2.309

La patogenicidad de los aislamientos de acuerdo al análisis de varianza del cuadro 7, advierte una clara diferencia entre los tratamientos del estudio con el testigo, donde las cepas son capaces de causar enfermedad y posterior muerte de las brocas, en una mortalidad total de la población expuesta en cada bioensayo, no siendo así el caso del tratamiento testigo que muestra una mortalidad del 1%.

Cuadro 8. Prueba de significancia de patogenicidad Duncan al 5%

Cepas	Promedios	Duncan (5%)
HA/SPF 3	88.00	A
HN/VC 24	79.50	B
HIB 21	79.00	B C
HN/VC 11	77.50	C
HA/SPF 25	75.50	D
HIB 22	75.50	D
HA/SPF 17	74.50	D
HIB 5	72.25	E
HN/VC 20	71.50	E
HA/SPF 27	69.50	F
HN/VC 15	67.50	G
HIB 7	64.50	H
Testigo	1.00	I

Promedios seguidos por la misma letra no son significativos

HN= Hongo nativo; HIB= Hongo obtenido del inoculo de broca; HA= Hongo asperjado.

Los promedios (cuadro 8) muestran una mortalidad total de la población expuesta en los tres tratamientos, en el caso del testigo se evidencia una muerte de 1.00 promedio debido a otras causas desconocidas, por lo que el agente microbiano tiende a actuar en contra de los adultos hembras de broca del café al ser expuestas a las cepas del hongo *Beauveria bassiana*.

Se evidencio que los hongos entomopatogenos cultivados en medios no enriquecidos o carentes de insectos reducen su patogenicidad, como ha sido demostrado con los hongos *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* por varios investigadores (Kawakami 1960; Schaerffenberg 1964; Hall 1980; Morrow *et al.* 1989).

En la figura 22, las cepas de los tratamientos muestran el porcentaje de mortalidad registrada de adultos hembras de broca, comparadas con el testigo.

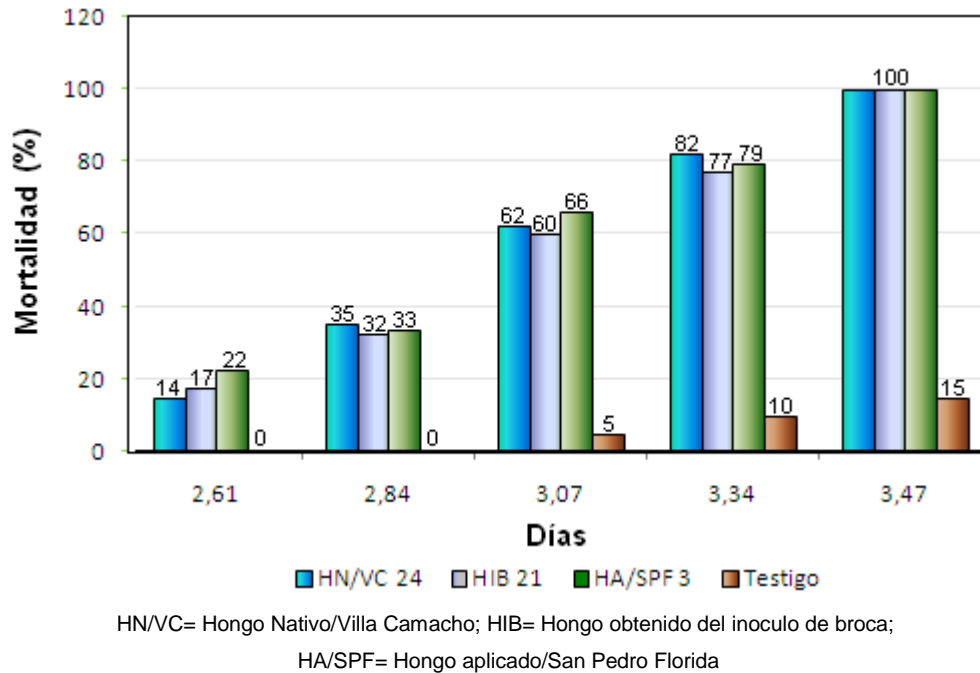


Figura 22. Comparación del porcentaje de mortalidad de brocas del café

El porcentaje de mortalidad total sobre la broca del café muestra cuan efectivo puede llegar a ser el hongo cuando la plaga es expuesta en condiciones adecuadas de ambiente, llegando a controlar la plaga en su totalidad.

Otro aspecto importante en el incremento de la patogenicidad, se debe a que el hongo *Beauveria bassiana* produce muchas enzimas extracelulares en medios nutritivos tales como proteasa, lipasa y quitinasa, las cuales están involucradas en la penetración del integumento del hospedante y en consecuencia en la infección y su expresión está influenciada por la concentración de la cutícula y el origen de la misma en el medio de cultivo (St Leger *et al.* 1992; El Sayed, 1993).

5.4 Evaluación del grado de virulencia del hongo (*Beauveria bassiana*).

La evaluación del grado de virulencia muestra cuan agresiva puede llegar a ser un controlador biológico cuando es expuesta en un ambiente adecuado, esta acción está representado en tiempos letales.

5.4.1 Evaluación del grado de virulencia en tiempo letal medio (TL₅₀)

Según el análisis de varianza (cuadro 9), existe alta significancia para el tiempo letal medio TL₅₀ de infección del hongo *B. bassiana* en una concentración 1×10^7 conidios por ml, donde se evidencia una superioridad de las cepa obtenidas del inóculo de broca en laboratorio comparadas con el testigo, siendo estas más agresivas en comparación con las demás cepas.

Cuadro 9. Análisis de varianza de la comparación en los tres tratamientos de tiempo letal medio (TL₅₀)

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F Cal.	Pr > F
Tratamientos	11	477.23	43.38	19.22	0.0001**
Error	36	81.25	2.26	-	-
Total	47	558.48	-	-	-

G.L. = Grados de libertad; S. C.= Suma de cuadrados, C. M. = Cuadrado medio; F Cal. = F calculada; Pr. F = Probabilidad de F ; ** = Altamente significativo; * = Significativo; ns = No significativo, C.V. = 2.726315

El análisis muestra que existe una variación en los tiempos letales medios de cada uno de los tratamientos como ser el caso del hongo obtenido del inóculo de broca que muestra ser mas virulento en menor tiempo de acción (cuadro 10).

Estos resultados muestran cuan agresiva llega a ser el hongo cuando es sometido a una infección al huésped susceptible.

Cuadro 10. Prueba de significancia de virulencia Duncan al 5%

Cepas	Promedios de Hrs. TL₅₀	Duncan (5%)
HN/VC 13	60.75	A
HA/SPF 11	59.50	A B
HA/SPF 10	57.50	B C
HA/SPF 27	56.50	C
HA/SPF 23	56.50	C
HN/VC 2	55.75	C D
HN/VC 5	55.50	C D
HN/VC 15	53.50	D E
HIB/LB 9	52.25	E F
HIB/LB 29	51.50	E F
HIB/LB 11	51.50	E F
HIB/LB 7	50.50	F

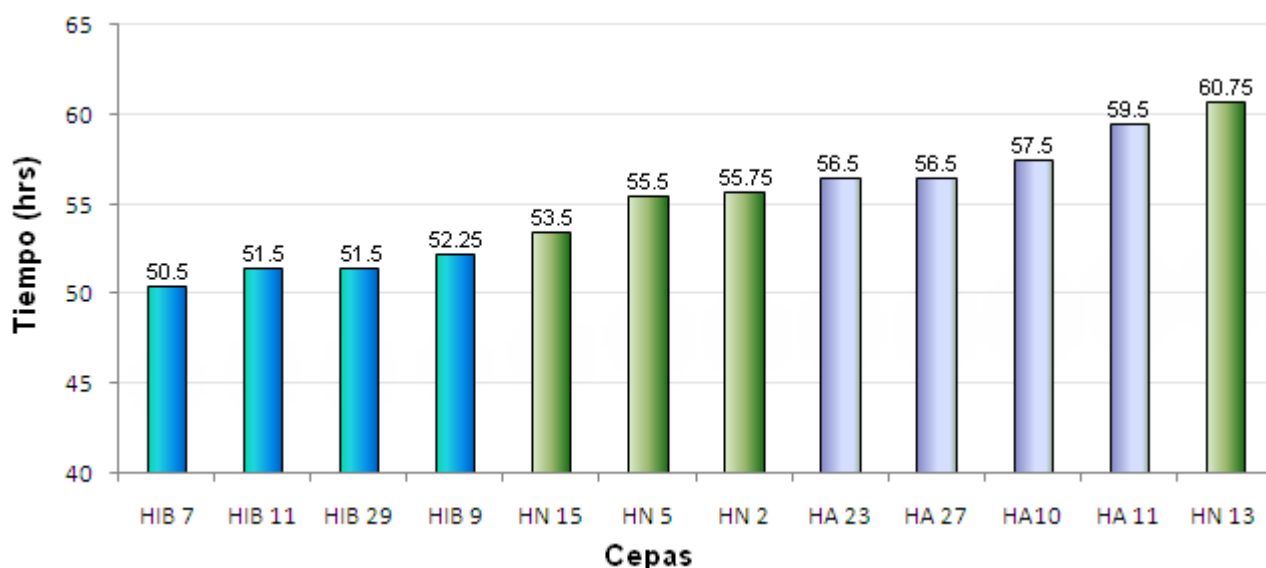
Promedios seguidos por la misma letra no son significativos
HN= Hongo nativo; HIB= Hongo inoculo de broca; HA= Hongo asperjado.

Las cepas obtenidas del inoculo de la broca del café mostraron los mejores tiempos letales medios de acuerdo a la prueba de Duncan 0.5% fueron HIB/LB 7, HIB/LB 11 y HIB/LB 29 con tiempos de 50.5, 51.5, y 51,5 la cepa que mostró mayor tiempo de acción fue la HIB/LB 9 con un tiempo de 52,25 horas de muerte del cincuenta por ciento.

Mientras que las cepas nativas de la zona mostraron tiempos letales como ser las cepas HN/VC 15, HN/VC 5, HN/VC 2 con tiempos de 53.5, 55.5 y 55.75. La cepa que mostro el más alto promedio de muerte al 50% fue la HN/VC 13 con un tiempo de 60.75.

Las cepas asperjadas en el cafetal provenientes de la estación experimental COBIPLA (Coroico), mostraron tiempos letales las cepas HA/SPF 23, HA/SPF 27, HA/SPF 10 y HA/SPF 11 con tiempos de 56.5, 56.5, 57.5 y 59.5 horas de muerte al cincuenta por ciento (Figura 23).

El mayor tiempo registrado en los tratamientos fue de 68.5 horas de la cepa HIB/LB 21, 64.5 horas de la cepa HN/VC 11 y 79.5 horas de la cepa HA/SPF 9, siendo estos los tiempos más altos de acción del hongo *Beauveria bassiana*.



HN= Hongo nativo; HIB= Hongo obtenido del inoculo de broca; HA= Hongo asperjado.

Figura 23. Comparación del porcentaje de mortalidad (TL₅₀)

Estos resultados indican que las cepas obtenidas del inoculo de broca ocasionan la muerte de insectos brocas en menor tiempo después de la inoculación con 50.5 horas (2.1 días), el cual es una excelente alternativa para el control de esta plaga, como menciona Heale *et al.* (1989), para muerte rápida de la broca, existe una producción temprana de un gran número de esporas sobre el cadáver de insectos, lo que puede facilitar una mayor diseminación de la enfermedad sobre sus poblaciones.

En la figura 24, se muestra una comparación entre estudios realizados por diferentes autores de la virulencia del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café, donde muestra evidentemente que el hongo llega a matar el 50% insecto plaga en un tiempo de 54,72 horas, similares resultados se obtuvieron en el estudio realizado donde las cepas HIB7, HN/VC15 y HA/SPF23, registraron tiempos de 50.5, 53.5 y 56.5 lo que demuestra que cuando se realizan aislamientos de cepas de *B. bassiana* provenientes del inoculo de de la broca del café están tienden a ser siempre más agresivas.

Según Gonzales *et al.* (1993), se compararon una cepa de *B. bassiana*, proveniente directamente de *Diatraea saccharalis* (Bb-9205DS) (Lepidoptera: *Pyralidae*), frente a la misma cepa reactivada en broca del café (Bb-9205BFC), encontrando que el promedio de mortalidad causado por Bb-9205DS fue de 88.88% y por Bb9205BFC fue 100%. La diferencia entre las cepas fue atribuida a que el patógeno adquirió mecanismos de

agresividad al pasar por el huésped susceptible. El tiempo letal medio de 92.4 horas para Bb-9205DS y de 54,72 horas para Bb-9205 BFC. La disminución en el tiempo de mortalidad de las brocas tratadas con Bb-9205BFC puede ser también debida a la reactivación de la cepa al pasar por el huésped susceptible, indicando una mayor agresividad del hongo hacia el huésped susceptible influye en una mayor virulencia.

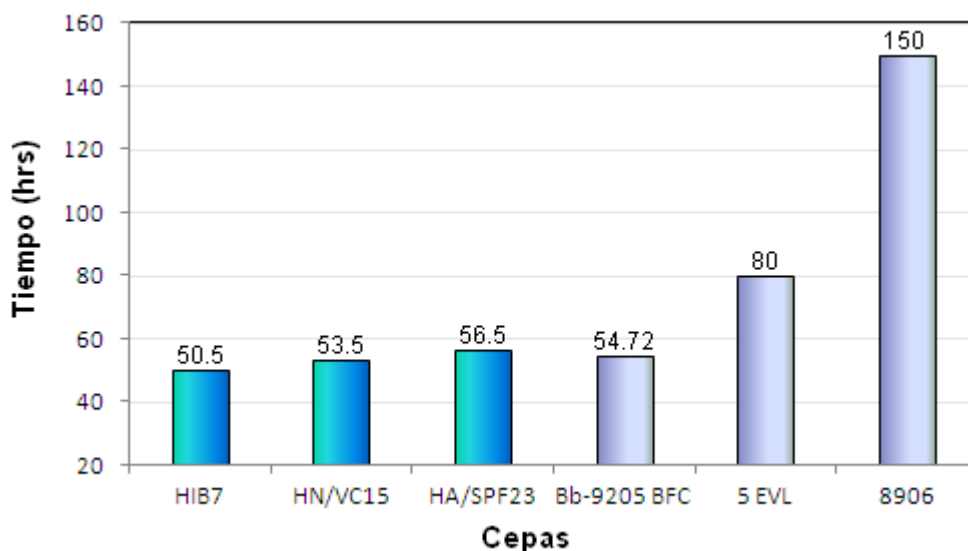


Figura 24. Comparación del porcentaje de mortalidad (TL₅₀) del hongo *B. bassiana* frente a estudios realizados por Gonzales, 1993 (Cepa Bb-9205BFC); Jiménez, 1992 (Cepa 5EVL); Verela y Morales, 1996 (Cepa 8906).

En el estudio se registró también el mayor valor obtenido en tiempo letal medio que fue de la cepa HA/SPF 9 con un tiempo de 79.5 horas, lo que corrobora también Jiménez (1992), donde evaluó la patogenicidad de 46 cepas de *B. bassiana*. provenientes de 13 países sobre adultos hembras de *Hypothenemus hampei*, encontrando que 16 cepas de *B. bassiana* mataron en menos de 5 días (120 Horas), al 50% de los insectos tratados y 5 de ellas lo hicieron en 80 horas (3.33 días). Donde un bioensayo posterior para determinar la TL₅₀ no permitió encontrar diferencias de patogenicidad entre las cinco mejores cepas.

También se realizó estudios que mostraron tiempos letales medios por encima de las 80 horas como menciona Verela y Morales (1996), donde caracterizaron 6 cepas de *Beauveria bassiana* (8505, 8906, 8911, 8905, 8904, 9006) sobre la *Hypothenemus hampei* para la cual evaluaron la virulencia del hongo, en la cual la cepa 8906 presentó el mayor porcentaje de mortalidad en un 75 (%) y un TL₅₀ de 6.25 días (150 hrs).

La disminución en el tiempo letal de mortalidad en brocas tratadas con las cepas HIB/SPF y HN/VC, indica una mayor agresividad del hongo hacia los hospedantes susceptibles, el cual puede ser un parámetro que favorezca al control en condiciones de campo.

5.4.2 Evaluación del grado de virulencia en tiempo letal acumulada (TL₁₀₀)

El grado de virulencia en tiempo letal acumulada en el análisis de varianza (cuadro 11), muestra ser altamente significativa, dando a entender que existe variabilidad del comportamiento del las cepas del hongo en los tratamientos en función al tiempo acumulado y la agresividad del agente causal, en una concentración de conidios al 1×10^7 bajo sumersión en una solución conidial durante 15 segundos.

Cuadro 11. Análisis de varianza de la comparación en los tres tratamientos de tiempo letal acumulado (TL₁₀₀)

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F Cal.	Pr > F
Tratamientos	11	721.75	65.61	32.14	0.0001**
Error	36	73.50	2.04	-	-
Total	47	795.25	-	-	-

G.L. = Grados de libertad; S. C.= Suma de cuadrados, C. M. = Cuadrado medio; F Cal. = F calculada; Pr. F = Probabilidad de F ; ** = Altamente significativo; * = Significativo; ns = No significativo, C.V. = 2.067080

Los promedios de tiempos letales en los tratamientos de virulencia del hongo *Beauveria bassiana* y la prueba de Duncan al 5% como se observa en el cuadro 12, como en la Figuras 25, muestran una comparación del tiempo total acumulado y la variabilidad del desenvolvimiento de la enfermedad de su capacidad de causar daño.

Cuadro 12. Prueba de significancia de virulencia Duncan al 5%

Cepas	Promedios de Hrs. TL ₁₀₀	Duncan (5%)
HN/VC 13	79.50	A
HA/SPF 11	72.50	B
HA/SPF 10	71.75	B
HA/SPF 27	69.50	C
HA/SPF 23	69.00	C
HN/VC 2	68.75	C
HN/VC 5	68.00	C
HN/VC 15	67.50	C D
HIB/LB 9	67.50	C D
HIB/LB 29	65.50	D E
HIB/LB 11	65.50	D E
HIB/LB 7	64.50	E

Promedios seguidos por la misma letra no son significativos

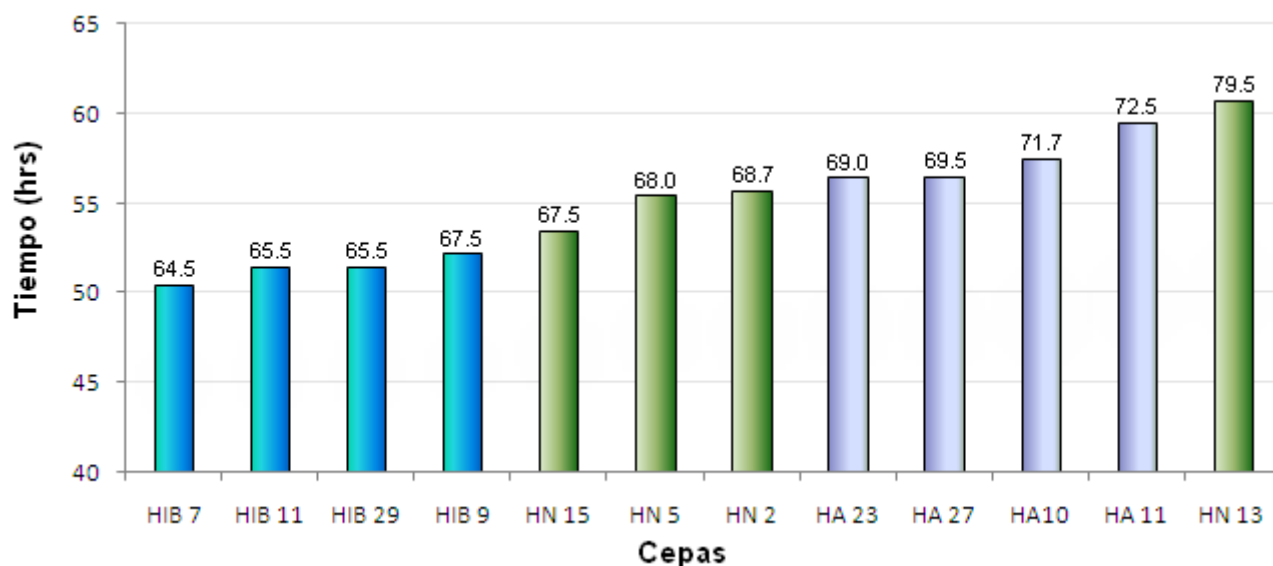
HN= Hongo nativo; HIB= Hongo inoculo de broca; HA= Hongo asperjado.

Las cepas que mostraron mayor agresividad fueron las obtenidas del inoculo de broca HIB/LB 7, HIB/LB 11, HIB/LB 29 y HIB/LB 9 que demostraron una alta virulencia en 64.5, 65.5, 65.5 y 67.5 como promedio en horas, sobre las brocas del café. Por lo que cepas infectadas en brocas y aisladas cuando llegan a la madurez conidial, tienden a ser más virulentas y por consiguiente más agresivas.

Las cepas nativas de la zona mostraron alta agresividad en tiempos letal acumulado como ser HN/VC 15, HN/VC 5 y HN/VC 2 con promedio de horas de 67.5, 68.0 y 68.7 demostrando ser muy virulentas, mientras que la cepa HN/VC 13 registro un tiempo en horas de 79.5. Las tres primeras cepas están por debajo del promedio de estudios realizados que indican un tiempo letal acumulado en 72 horas no así para la cepa HN/VC 13 que está por encima de las 72 horas.

El caso de cepas provenientes de COBIPLA asperjadas en el cafetal y extraídas del mismo, mostraron una virulencia alta como ser las cepas HA/SPF 23, HA/SPF 27 y HA/SF 10 con tiempos de 69.0, 69.5 y 71.7 como promedio en horas, la cepa HA/SF 11 con un tiempo de 72.5 que está por encima de las 72 horas (Figura 25).

Las cepas que registraron los tiempos de acción más altos son: HN/VC 11 con un tiempo de 79.5 horas, la cepa HIB/LB 21 con un tiempo de 79 horas y la cepa HA/SPF 9 llegó a un tiempo de 91 horas, este el registro más alto alcanzado.



HN= Hongo nativo; HIB= Hongo obtenido del inoculo de broca; HA= Hongo asperjado.

Figura 25. Comparación del porcentaje de mortalidad (TL₁₀₀)

De acuerdo con Bidochka y Khachatourians (1990), las proteasas son probablemente las enzimas más importantes en la patogenicidad de un aislamiento y su ausencia conduce a la prolongación del tiempo de mortalidad.

Estos resultados sugieren que es posible que la mayoría de los aislamientos de *B. bassiana* puedan causar altas mortalidades a la broca del café, si a través de su cultivo se le proporciona el sustrato requerido para su desarrollo e inducir así a las enzimas requeridas en el proceso de patogenicidad, con lo cual se lograría un mayor control de *H. hampei*.

5.5 Ciclo de infección del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café

El ciclo de infección del hongo sobre la broca del café se determinó por cinco fases: Inoculación a muerte, muerte a producción del micelio, muerte a cubrimiento micelial, muerte a conidio génesis y muerte a liberación de conidios.

Según Alves (1996), la germinación de las conidias ocurre en un periodo de 12 horas después de la inoculación, donde el hongo penetra a través del integumento por acción mecánica, el cual toma unas 12 horas más, ya a las 72 horas de la inoculación el insecto está totalmente colonizado.

De acuerdo al Cuadro 13, las fases de infección del hongo sobre el huésped, está determinado por el tiempo de duración en cada una de ellas, donde las brocas mueren por infección del hongo *Beauveria bassiana*.

La cepa HIB 7 del primer conglomerado registró en la primera fase de inoculación a muerte un tiempo de 64 horas, en la segunda fase muerte a producción del micelio 6.1 horas, en la tercera fase de muerte a cubrimiento micelial 5.6 horas, en la cuarta fase de muerte a conidio génesis 7.2 horas y en la ultima fase de muerte a liberación de conidias 6.12 horas haciendo un total de 89.02 horas de infección (3.10 días), siendo el menor resultado.

Cuadro 13 Ciclo de infección del hongo *Beauveria bassiana*.

Ciclo de infección (horas)	Conglomerados					
	H. I. Broca		H. Nativo		H. Aplicado	
	1	2	3	4	5	6
Inoculación - muerte	64	79	66	78	69	92
Muerte - producción del micelio	6.1	8.2	7.5	8.3	9.2	8.7
Muerte - cubrimiento micelial	5.6	6.4	6.1	6.9	7.0	6.8
Muerte - conidio génesis	7.2	9.1	8.2	8.7	6.9	10.1
Muerte - liberación de conidios	6.12	7.5	6.3	7.8	6.5	8.3
Horas acumuladas	89.02	110.2	94.1	109.7	98.6	125.9
Total en días	3.10	4.59	3.92	4.57	4.11	5.25
Código de cepas	HIB 7	HIB 21	HN 15	HN 11	HA 23	HA 9

H.I.= Hongo Inoculo; H= Hongo; HIB= Hongo inoculo de broca; HN= Hongo nativo; HA=Hogo aplicado.

En el conglomerado tres muestra un registro de las fases de infección del hongo nativo sobre la broca del café, la cepa HN/VC 15 con un tiempo de 66 horas en la primera fase de inoculación a muerte, en la segunda fase de muerte a producción del micelio se registró un tiempo de 7.5 horas, en la tercera fase muerte a cubrimiento micelial 6.1 horas, en la cuarta fase muerte a conidio-génesis 8.2 horas y en la última fase de muerte a liberación de conidias 6.3 horas, haciendo un total de 94.1 horas (3.92 días).

En el quinto conglomerado se evidencia la cepa asperjada en el cafetal como ser la HA/SPF 23 registro un tiempo de infección de inoculación a muerte de 69 horas en la primera fase, en la segunda fase de muerte a producción del micelio 9.2 horas, en la tercera fase muerte a cubrimiento micelial de 7.0 horas, en la cuarta fase muerte a conidio génesis 6.9 horas y en la última fase de muerte a liberación de conidias en 6.5 horas, mostrando así que esta cepa asperjada proveniente de la estación experimental de Coroico mantiene su agresividad sobre la plaga del café.

Los registros más elevados de las cepas son la HN/VC 11 con un tiempo de muerte a las 78 horas, la HIB/SPF 21 con 79 horas y la HA/LB 9 con 92 horas (cuadro 13).

Charnley, (1984) indica que las barreras estructurales constituyen la defensa primaria de los insectos contra los patógenos y endoparásitos, donde las principales barreras son el rígido exoesqueleto (cutícula) donde el modo de penetración principalmente depende de

las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales.

La manifestación del hongo sobre la broca del café comienza con la germinación y penetración de las hifas al cuerpo del hospedero a través de la cutícula invadiendo todos los tejidos por parte del micelio causando inmovilidad, muerte del insecto y por último el hongo se desarrolla externamente comenzando un ciclo nuevo.

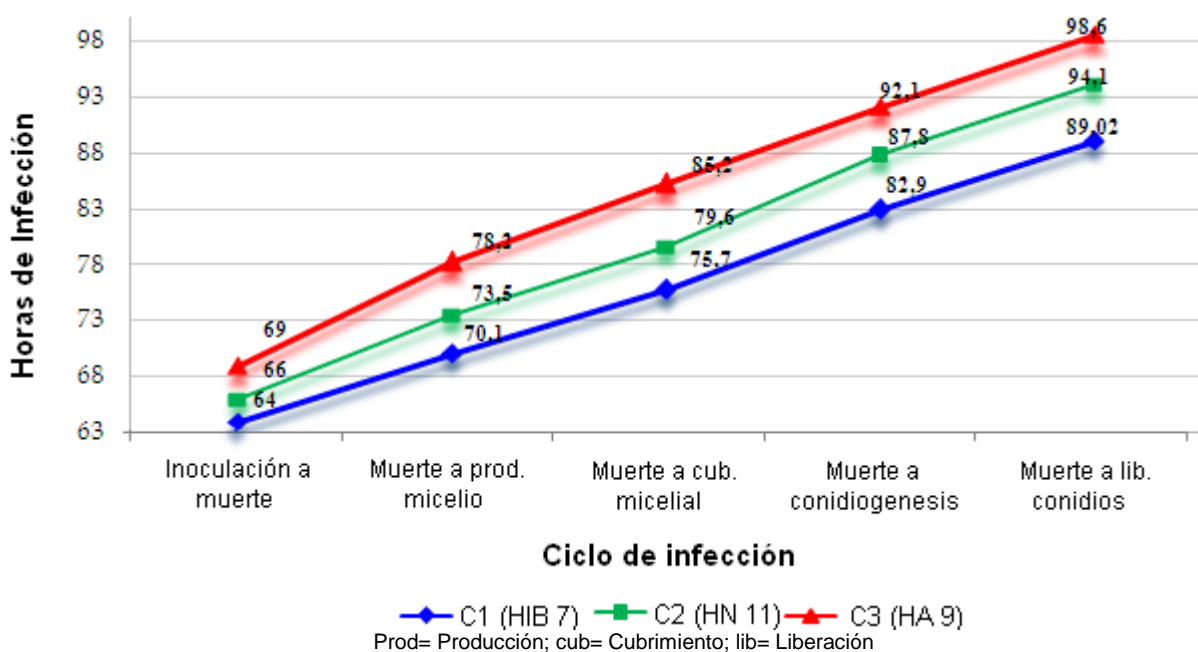


Figura 26. Desarrollo de la infección del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café

Las etapas de infección de acuerdo a la figura 26, muestra una comparación de los tres tratamientos con relación a las horas de infección, donde cepas obtenidas del inoculo, son las que registraron menor tiempo en cada una de las etapas del ciclo de infección, seguido por el hongo natural de la zona y consiguiente las cepas asperjadas provenientes de la estación experimental COBIPLA.

En el análisis de varianza de las diferentes etapas del ciclo de infección del hongo *Beauveria bassiana* sobre la *Hypothenemus hampei* (cuadro 14), muestra diferencias significativas entre grupos del ciclo de infección.

Cuadro 14. Análisis de varianza del ciclo de infección del hongo (*B. bassiana*)

Ciclo de infección	G.L.	S.C.	C.M.	Varianza	Sig.
Inoculación-muerte	6	448	74,667	110,267	1,68355*10 ⁻¹⁹ **
Muerte-prod. micelio	6	48	8	1,184	-
Muerte-cub. micelial	6	38,8	6,467	0,2947	-
Muerte-conidio génesis	6	50,2	8,367	1,4387	-
Muerte a lib. conidias	6	42,52	7,087	0,8099	-
Análisis de varianza				F Cal.	-
Entre grupos	4	21680,86	5420,215	237,741	-
Dentro de grupos	25	569,96	22,7987	-	-
Total	29	-	-	-	-

La manifestación del hongo sobre la broca del café se puede ver en la figura 27, como el hongo llega a cubrir al insecto la plaga, manifestándose el hongo sobre todo el cuerpo del insecto llegando a cubrirlo totalmente.

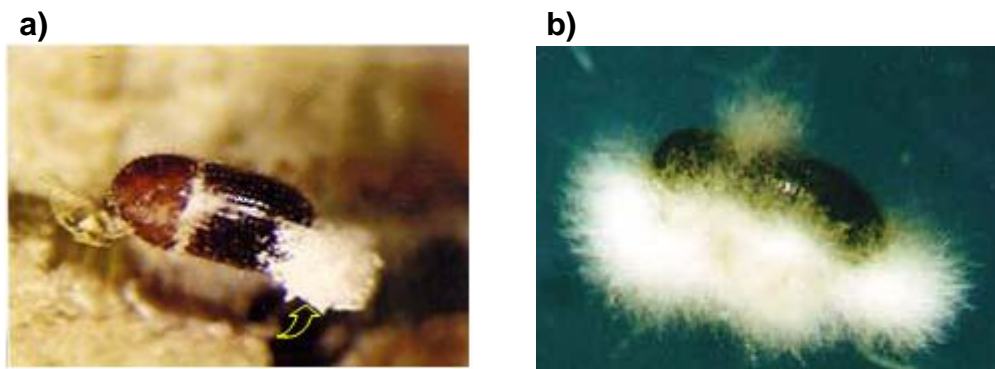


Figura 27. Manifestación de la infección de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *H. hampei*; a=hongo emergiendo al exterior del insecto ya muerto; b=hongo revistiendo totalmente al insecto (Bustillo, 1998; CATIE, 2002).

5.6 Producción Masiva del hongo *Beauveria bassiana*

Para la producción masiva del entomopatógeno se utilizaron cultivos puros de los hongos obtenidos del inóculo de broca del café cepas HIB 7, HIB11 y HIB 29, como también las cepas nativas HN 15, HN 5 y la HN 2, cepas asperjadas HA 23, HA 27 y la HA 10, debido a que mostraron un alto grado de virulencia en la muerte de los insectos adultos hembras de las brocas del café, estas cepas fueron multiplicadas en sustrato arroz. Se utilizaron bolsas de polipropileno con 200 g de sustrato de arroz, asegurando la abertura con plastifilm para garantizar el cierre y evitar contaminaciones.

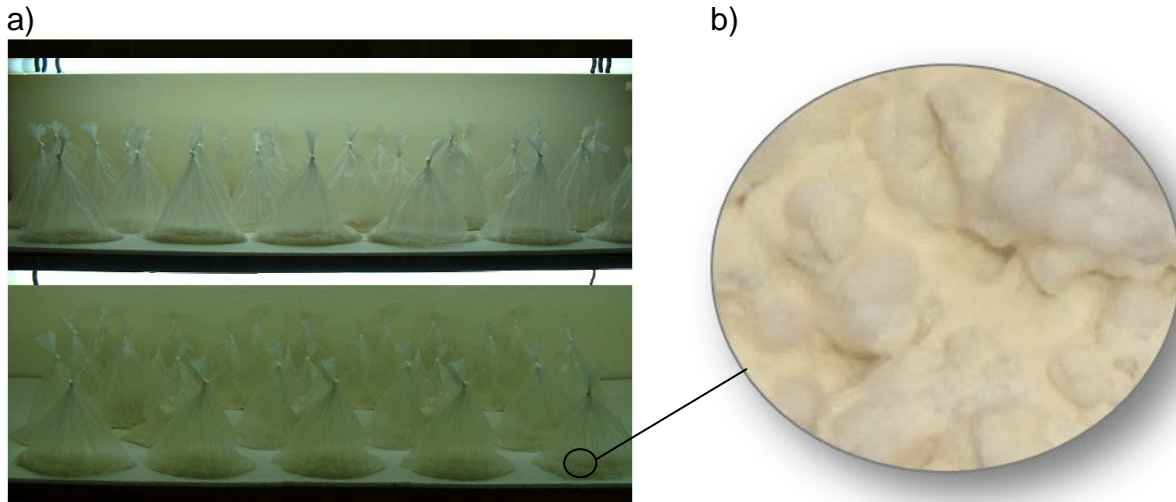


Figura 28. Bolsas inoculadas con cepas madres del hongo *Beauveria bassiana*, a= Bolsas ordenadas en el estante; b= Hongo con coloración cremosa al llegar a la maduración.

Toda bolsa que mostraron contaminaciones fueron descartadas, pero el resto que mostró uniformidad de crecimiento se las ubicó en estantes en forma ordenada (Figura 28a), el tiempo de maduración del hongo fue a los 23 días, inoculadas las bolsas mostraron formaciones de color blanco sobre los granos arroz, las cuales al llegar a la madurez mostraron un color cremoso característico del entomopatógeno (Figura 28b).

Los problemas de contaminación en bolsas se pueden presentar por intervención de agentes externos en el ambiente, durante esta fase se debe realizar un control sistemático para evitar contaminaciones para así obtener cultivos puros con buen crecimiento.

6. CONCLUSIONES

a). El porcentaje de infestación de la broca del café en la comunidad Villa Camacho muestran un porcentaje del 65% de infección y en San Pedro Florida un 57%. La presencia del hongo *Beauveria bassiana* en la comunidad de San Pedro Florida registró un 34% de infestación por ser una zona asperjada con el hongo y en Villa Camacho un 26% de infestación de la presencia natural del hongo en el cafetal.

b). La viabilidad y el desarrollo del hongo realizado en medio MS favoreció en la obtención de cultivos puros de *B. bassiana*, donde se obtuvo un crecimiento de 8.0 cm diámetro con una superficie de 4 cm² de la cepa HA/ PSF 27 la mayor registrada, la cepa natural de la Asunta mostro un crecimiento de 7.3 cm en diámetro y una superficie de 2.19 cm² la cepa HN/VC 24.

c). La patogenicidad del hongo en laboratorio estableció que la mortalidad de insectos brocas se dio con todas las cepas que fueron sometidas en los bioensayos, donde la cepa HIB/LB 7 registro un 100% de muerte de los insectos brocas esto a partir de las 64 horas después de la infección, también las cepas HN/VC 15 con un 95.31%, HA/SPF 27 con un 92.25%, utilizando una concentración de 1×10^7 conidias / mililitro mostrando una superioridad con relación a los demás aislamientos, siendo buenos controladores biológicos del insecto plaga.

d). La evaluación de la virulencia en tiempo letal medio (TL₅₀), mostro que las cepas que registraron menor tiempo fueron: La HIB/LB 7, HIB/LB 11 y HIB/LB 29 mostraron virulencia con tiempos de 50.5, 55.5 y 55.75, horas.

e). El grado de virulencia en tiempo letal acumulada (TL₁₀₀), la cepa HIB/LB 7 con 64.5 horas (2.69 días), fue la que mató la población expuesta en menor tiempo.

f). En el ciclo de infección se identificaron cinco fases de acción del hongo sobre la plaga: Inoculación a muerte, muerte a producción del micelio, muerte a cubrimiento micelial, muerte a conidio génesis y muerte a liberación de conidias, en la cual la cepa HIB 7 mostró un tiempo de 89.02 horas de infección (3.10 días), siendo superior a todas las cepas. Seguidas por la cepa HN/VC 15 nativa de la zona mostró un tiempo de 94.01 horas

de infección (3.92 días) y por último la cepa HA/SPF 23 con un tiempo de 98.06 horas de infección (4.11 días), mostrando un ciclo muy favorable sobre la brocas de café.

g). Para la producción masiva del entomopatógeno *Beauveria bassiana*, se tomaron en cuenta las cepas que mostraron un alto grado de virulencia en la muerte de los insectos adultos hembras de las brocas del café en menor tiempo, las cuales fueron las cepas HIB/LB 7, HIB 11 y HIB 29, como también las cepas HN/ 15, HN/VC 5 y HN 2 y por último las cepas HA/SPF 23, HA/SPF 27 y HA/SPF 10, la maduración de estas se alcanzó a los 23 días.

7. RECOMENDACIONES

- a). Demostrado el gran potencial de las cepas de hongo de la zona sobre la broca del café se recomienda la continuidad de este trabajo mediante la aplicación en los cafetales, para evaluar su comportamiento infectivo en condiciones de campo.

- b). Dada la evaluación de la virulencia del hongo *Beauveria bassiana* en laboratorio, no se conoce los niveles de infección del hongo sobre la broca ni su comportamiento en campo, por lo que se sugiere evaluar la adaptabilidad, agresividad y su dispersión en el cafetal.

- c). Se recomienda realizar evaluaciones de virulencia y patogenicidad variando los parámetros de humedad, temperatura, horas luz y condiciones nutricionales de medios de cultivo

- d). Se recomienda la utilización de los medios (MS) y Arroz, para obtener cultivos puros del hongo *Beauveria bassiana*.

8. BIBLIOGRAFIA

- ACEB (Asociación de Cafés Especiales de Bolivia), 2004. Programa de desarrollo de café especial. Consultado el 16 de Septiembre del 2008.
- AGRIOS, G. N. 1996. Fitopatología. Ed. Uteha, México, D. F. pp 35-36.
- ALVES, S. 1996. Control microbiano de insectos fungosos entomopatogenicos. San Paulo, Brasil. Editora Monole. pp 73-76.
- ANÓNIMO, 1986. Primera lista de insectos entomófagos de interés agrícola en México. Fitófilo DGSV, MEXICO. pp 48-53.
- BAKER, P. S.; BARRERA, J. F.; RIVAS, A. 1992. Life history studies of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Scolytidae) on coffee trees in southern Mexico. Journal of Applied Ecology. pp 656-662.
- BARNETT, H.; HUNTER, H. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. MacMillan Publ. Co., New York. p 218.
- BARRIENTOS, R. 2000. El cultivo del café en la región de los Yungas. La Paz-Bolivia. Ed. CIMA. pp 192.
- BARRERA, J.F., A. GARCÍA, V. DOMÍNGUEZ Y C. LUNA (EDS). 2007. La Broca del Café en América Tropical: Hallazgos y Enfoques. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur. México. p 141.
- BIDOCHKA, M.J; KHACHATOURIANS, G. G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factors in pathogenicity towards the migratory grasshopper *elanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology. pp 362-370.
- BORBÓN, O. 1991. La broca del fruto del cafeto: programa cooperativo ICAFE-MAG. 1ra ed. ICAFE. San José, Costa Rica. p 50.

- BORBÓN, O. 2001. Situación actual de la broca del fruto del cafeto en Costa Rica (*Hypothenemus hampei* Ferr.)
- BUSTILLO, A. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. CENICAFE, Chinchiná, Colombia. p 133.
- BUSTILLO, A. 1990-1991. Manual de capacitación en control biológico CENICAFE, Chinchina, Caldas, Colombia.
- BUSTILLO, A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. pp 30-53.
- BUSTILLO, A. 2002. Natural Enemies and Competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. Neotrop. Entomol. pp 635-639.
- CALANI, J. 1995. "Manual de cultivo de café con tecnologías nuevas para incrementar la productividad", Edit. Repta Producciones, La Paz-Bolivia. p129.
- CÁRDENAS, R. 2000. La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867). En: Seminario sobre broca del café. Socolen, Medellín, 21 de mayo de 1990. Miscelánea No.18. pp 1-13.
- CASTAÑER, J. 2007 Servicio en línea para una agricultura tropical libre de pesticidas químicos. Infografía
- CASTILLO, R. 2001. "Evaluación agroeconómica de insecticidas para el control de insectos plaga del suelo (*Scaptocoris talpa* (Hemiptera: Cydnidae) y *Agriotus* spp; *Conoderus* spp (Coleoptero: Elateridae)) en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*); concepción, escuintla, Guatemala". Tesis para optar el título de Ing. Agr. en sistemas de producción agrícola, Guatemala. p 81.
- CATIE, 2002 Manifestación de la infección de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Centro Agronómico Tropical de Investigación Costa Rica. p 228.

- CENTRO DE PREPARACION DE CAFÉ, 1998. Manual del catador. / CENICAFE. Federación Nacional de cafetaleros de Colombia- Colombia. p 456.
- CHARNLEY, A. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: Invertebrate-microbial Interactions.
- COBOLCA, 1996. Exportación del café por empresas año cafetalero 1995-1996.
- DECAZY, B. 1990. Descripción, biología, ecología y control de la broca del fruto del cafeto, *Hypothenemus hampei* (Ferr.). pp 133-139.
- EL SAYED, G. N. 1993. Effects of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia*. pp149-152.
- EUTIMIO, G.; RAFAEL, C.; ANA, C.; HECNI, M.; JAVIER, P.; EUSTAQUIO, A.; FIDEL, R.; Y VICTOR, C. 2006. Imágenes para la identificación de la broca del café realizadas por LAMOFRU.
- FECAFEB (Federación de caficultores Exportadores de Bolivia), 2007. Organizaciones asociadas. Frente solidario. Consultado el 27 de Agosto del 2008.
- FERRON, P. 1981. Pest Control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burges, H. ed. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. pág.465-482. Academic Press, New York, p 949.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of entomology (United States). pág. 409-442.
- FLETHCHER, M.T., C.J. Moore and W. Kitching. 1977 Absolute configuration of sordidin and 7-episordidin emitted by the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. Tetrahedron lett. pp 38-39
- FRENCH, F.R. 1982. Métodos de investigación fitopatología IICA San Jose Costa Rica

- GILLESPIE, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England. p 269.
- GONZALES G. M. T. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* CENICAFE Chinchina Colombia. pp 93-102.
- GONZALEZ G, MT; POSADA, FJ; BUSTILLO, A.E. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. CENICAFE (Colombia). pp 93-102.
- GUHARAY, 2001. Manual Manejo de la Broca en los Cafetos. CATIE Turrialba, Costa Rica. p 27.
- GUHARAY, F., J. MONTERREY, D. MONTERROSO Y CH. STAVER. 2000. Manejo Integrado de Plagas de Café. Primera Edición. Managua. CATIE. p 272.
- HALL, R. A. 1980. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through and insect host on pathogenicity. Morphology and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. pp 216-222.
- HEALE, JB; ISAAC, JE; CHANDLER, D. 1989. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. *Pesticide Science*. pp 79-92.
- IBARRA, A. y A. VARELA. 2002. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones colombianas. *Revista Colombiana de Entomología*. pp 129-137.
- IBCE (Instituto Boliviano de comercio exterior), 2007. Comercio mundial de productos orgánicos. Asociación de cafés Especiales de Bolivia (ACEB).
- ICAFE-PROMECAFE, 2001. I Seminario latinoamericano sobre la broca, 1Ed. Editorama, S.A. San José, Costa Rica. p 51.
- INGOLD, C. T. 1978. The Biology of Mucor and its Allies.

- JIMÉNEZ, J. A. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Revista Cenicafé. pp 84-88.
- JIMENEZ, G; GOMES, 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. Cenicafe (Colombia). pp 84-98.
- KAWAKAMI, K. 1960. On the changes of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. Bulletin Sericultural Experimental Station pp 83-99.
- KOUASSI, M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Vertigo - La revue en sciences de l'environnement sur le WEB, Vol 2
- KUNO, G.; MULLEJ, J. 1979. Patología de insectos y su aplicación en el control biológico. Universidad del valle. Cali Colombia. p 165.
- LANDA, Z.; OSBORNE, L. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomologist. pp 456-471
- LE PELLEY, R. 2000. El cultivo del café en la región de los Yungas-La Paz Bolivia. Ed. CIMA. p 192.
- MATIELLO, J. 1990. Fluctuación poblacional café Do cultivo a consumo Editora Globo S.A. Sao Paulo Brasil. pp 139-140.
- MENDOZA, R. 1993. Efecto de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre el parasitoide de la broca del café *Cephalonomia stephanoderis*. Revista Colombiana de Entomología. pp 199-204.
- MONZON, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. pp 95-103.
- MORROW, B. J; BOUCIAS, DG; HEATH, M. A. 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, after serial in vitro passage. Journal of Economic Entomology. pp 404-407.

- MURASHIGE, T. Y SKOOG, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. pp 473-497.
- PADRON, C. E. 1996. Diseños experimentales. Ed. Trillas, México, D. F.
- PAZ, J. 1990. Base para discusión de líneas cafetaleras e identificación de áreas para la cooperación y armonización de políticas cafetaleras.
- PELCZAR, J. M. 1997. Elementos de microbiología. Mc Graw Hill, México. pp 253-283.
- RODRIGUEZ, M. 1995. Dinámica poblacional de la broca del café *Hypothenemus hampei* y la infestación del hongo *Beauveris bassiana*. en los yungas de La Paz.
- PROCAFE, 1997. Manual de caficultor Salvadoreño. San Salvador.
- RUIZ, R. 1996. Efecto de la fenología 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, Tesis: Ingeniero Agrónomo. Manizales, Colombia. pp. 87
- SAMSON, R.; EVANS, H.; LATGÉ, J. 1988. "Atlas of Entomopathogenic Fungi". Springer-Verlag, Berlin. p 300.
- SALAZAR, M. R.; ARCILA, J.; RIAÑO, N.; BUSTILLO, A. E. 1993. Crecimiento y desarrollo del fruto del café y su relación con la broca. Cenicafé. Avances Técnicos. 194 p.
- SCHAERFFENBERG, B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *Journal of Insect Pathology*. pp 8-20.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., J.R. FUXA, L.A. LACEY, D.W. ONSTAD AND HARRY K. KAYA. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*. pp 1-7.

- ST. LEGER, R. J; FRANK, D. C; ROBERTS, DW; SAPLES, R. C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticledegrading- protease structural gene from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. European Journal of Geochemistry pp 991-1001.
- TANADA, Y.; KAYA, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. (USA). p 660.
- THOMAS I.J; CASWELL E.P; BROWN R.H; KERRY, B. R. 2004. Principles of nematode control. Principles and practice of nematode control in Crops. (London: Academic Press). pp 87-130.
- TOVAR, N. 1999. "Control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) Con el hongo *Beauveria bassiana* , en la formulación de bioinsecticidas.
- VERELA A. MORALE E. 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffe berry borer *Hypothenemus hampei*. J Invert Pathol. pp 52-147.
- VOLCY. C.; PARDO, V. 1994. Principios de Micología. Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. p141.

ANEXOS

(12 días)

T	N ^o .	Número de días evaluado												Forma	Color	Maduración
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
H. N A T I V O	1	1.1	1.6	2.0	2.8	3.2	3.5	4.0	4.7	4.8	5.0	5.2		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	2	0.5	1.0	1.4	2.0	2.3	3.0	3.5	3.7	3.8	3.9	4.3		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	3	0.7	1.3	1.9	2.4	3.3	3.9	4.4	5.0	5.2	5.3	5.5		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	4	0.3	0.7	1.1	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1	2.4	2.7	3.0		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	5	0.8	1.3	1.6	2.5	3.5	4.2	5.0	5.8	6.4	7.0	7.3		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	6	0.9	1.4	1.8	2.3	2.8	3.3	3.7	4.0	4.4	4.7	5.0		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	7	0.4	1.0	1.3	1.8	2.4	3.0	3.3	3.9	4.2	4.6	4.8		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	8	1.0	1.4	1.7	2.2	2.7	3.2	3.8	4.5	5.0	5.5	6.1		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	9	1.2	1.7	2.1	2.7	3.0	3.4	3.9	4.3	4.9	5.3	5.9		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	10	1.3	1.9	2.4	2.9	3.4	3.9	4.5	4.9	5.2	5.7	6.3		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
H. A P L I C A D O	1	1.4	2.6	3.5	4.4	5.4	6.0	6.8	7.3	7.6	8.0	8.5		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	2	1.2	1.7	2.0	2.3	3.0	3.5	3.7	4.1	4.2	4.3	4.5		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	3	1.0	1.6	2.1	2.7	3.3	3.9	4.4	4.8	5.5	6.2	6.7		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	4	1.3	1.5	1.9	2.1	2.7	3.2	3.7	4.2	4.8	5.3	5.5		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	5	1.4	1.8	2.4	2.7	3.1	3.5	4.0	4.3	4.5	4.9	5.2		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	6	0.9	1.4	1.9	2.4	2.7	3.0	3.6	4.0	4.6	5.1	5.7		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	7	0.6	1.0	1.3	1.7	2.0	2.4	2.9	3.3	3.7	4.1	4.7		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	8	1.0	1.2	1.5	1.8	2.1	2.3	2.6	2.8	3.1	3.6	3.9		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	9	1.5	2.1	2.6	3.1	3.7	4.2	4.7	5.0	5.6	6.0	6.3		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	10	0.4	0.7	1.1	1.5	1.8	2.0	2.3	2.5	2.8	3.0	3.2		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
H. O. I. B R O C A	1	1.6	2.1	2.9	3.5	4.3	4.9	5.5	6.5	6.8	7.2	8.0		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	2	1.5	2.0	2.4	3.1	3.7	4.2	4.9	5.3	5.4	5.8	7.0		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	3	1.4	1.9	2.6	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	5.6	5.7	6.0		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	4	1.5	1.8	2.3	2.5	2.6	3.0	3.2	3.5	3.4	3.7	3.9		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	5	0.3	0.5	0.7	1.0	1.2	1.3	1.4	1.6	1.8	1.9	2.1		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	6	1.1	1.6	2.2	2.7	3.3	3.8	4.5	4.9	5.5	6.2	6.7		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	7	1.1	1.5	1.9	2.2	2.8	3.3	3.8	4.3	4.8	5.2	5.7		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	8	1.6	2.0	2.4	2.7	3.0	3.2	3.6	3.9	4.1	4.3	4.5		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	9	1.4	2.0	2.7	3.1	3.6	4.0	4.6	5.0	5.7	6.1	6.5		Disco	Blanco	Blanco Cremoso
	10	0.8	1.2	1.5	2.0	2.3	2.7	3.0	3.2	3.7	4.0	4.5		Disco	Blanco	Blanco Cremoso

Anexo 2. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

Solución para 200 cc de Medio de cultivo	
Materiales	Cantidades
Sol. A	10 cc.
Sol. D	5 cc.
Sol. B	5 cc.
Sol. E	0,5 cc.
Sol. C	5 cc.
Sacarosa	3 g.
Carragenina	2 g.

Sol. A = Solución concentrada A

Anexo 3. Preparación del medio de sustrato (Arroz)

Procedimiento	Tiempo (min)	Observaciones
Remojo	5	Agua hervida
Esterilización	30	Auto clave
Cerrado de bolsas	-	Plastifilm
Duración	60	--

Anexo 4. Análisis de varianza del ciclo de infección.

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F Cal.	Pr > F
Tratamientos	4	21680.86005333	5420.21501333	237.74	0.0001**
Error	25	569.96933333	22.79877333	-	-
Total	29	22250.82938667	-	-	-

G.L. = Grados de libertad; C. M. = Cuadrado medio; F Cal. = F calculada; Pr. F = Probabilidad de F ; ** = Altamente significativo; * = Significativo; ns = No significativo. **C.V.** = 22.827

Prueba de significancia del ciclo de infección al 5%

Cepas	Promedios de Hrs. TL100	Duncan (5%)
Inoculación a muerte	74.667	A
Muerte a conidio génesis	8.367	B
Muerte a producción del micelio	8.000	B
Muerte a liberación de conidios	7.087	B
Muerte a cubrimiento micelial	6.467	B

Promedios seguidos por la misma letra no son significativos

Anexo 5. Infestación de la broca sobre los frutos de café (Castañer, 2007).



Anexo 6. Ciclo de vida del hongo *B. bassiana* (Cepas 2687 Kenya, 5486 Ivory Coast y 1480 Brasil).

