

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS  
DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL**



**TEMA:**

**AISLAMIENTO Y PATOGÉNICIDAD DEL HONGO NATIVO *Beauveria bassiana*  
(Bals) Vuill. CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFETO  
*Hypothenemus hampei* (Ferrari).**

**POR:**

**ELMER MOISES ARIAS ZEPEDA.**

**PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO AGRONOMO.**

**SAN SALVADOR CIUDAD UNIVERSITARIA, ENERO DE 2007.**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.**

**RECTORA:**

*Dra. Maria Isabel Rodríguez.*

**SECRETARIO GENERAL:**

*Lic. Alicia Margarita Rivas de Recinos.*

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS.**

**DECANO:**

*Ing. Agr. Jorge Alberto Ulloa Erroa.*

**SECRETARIO:**

*Ing. Agr. Santos Alirio Sandoval.*

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL.**

*Ing. Agr. Msc. Rafael Antonio Menjivar Rosa.*

**DOCENTES DIRECTORES.**

*Ing. Agr. Dr. Adán Hernández*

*Ing. Agr. Blanca Deysi de Solano.*

## RESUMEN.

La investigación se realizó en su primera parte en las instalaciones de los laboratorios de investigación de PROCAFE Fundación Salvadoreña para la investigación del café; ubicada en la ciudad de Santa Tecla. El objetivo de la presente investigación fue el de aislar el hongo nativo *Beauveria bassiana* que se encuentra naturalmente infectando la broca, proveniente de fincas cafetaleras a partir del cual posteriormente se desarrolló la técnica de producción de esporas en medio sólido arroz precocido. Para determinar la patogenicidad, sintomatología, crecimiento del micelio y que dosis causa mayor mortalidad por la actividad fúngica sobre los insectos diaria en el transcurso de diez días. Se instaló un bioensayo en condiciones de laboratorio bajo un diseño completamente al azar con cinco tratamientos los cuales consistían en suspensiones de esporas en agua del aislado "Esmeralda" sobre una población de brocas las cuales se inocularon por inmersión durante dos minutos en cada uno de los siguientes tratamientos: *T1*: testigo, *T2*: 1gr de *B. bassiana*/ lt de agua, *T3*: 5gr de *B. bassiana*/ lt de agua, *T4*: 10 gr. de *B. bassiana*/ lt de agua y *T5*: 15gr de *B. bassiana*/ lt de agua. Cada uno de los cuales contó con 23 repeticiones las cuales fueron brocas inoculadas por inmersión y confinadas individualmente en tubos de vidrio.

Una vez determinada la patogenicidad en laboratorio del aislado esmeralda, se evaluó en condiciones de campo en la finca Esmeralda ubicada en el municipio de Antiguo Cuscatlán. El ensayo se realizó bajo un diseño completamente al azar, seleccionando cuatro parcelas para cada uno de los tratamientos, dentro de las cuales se eligieron diez árboles de cafeto como parcela efectiva, cada uno de los cuales constituía una repetición. Se asperjó directamente el aislado producido en arroz con cuatro diferentes dosis y concentración de esporas por litro de agua las cuales fueron aplicadas con bomba de mochila directamente a los árboles y frutos un volumen de 200 cc. de los tratamientos *T1*: testigo, *T2*: 1gr de *B. bassiana*/ lt. de agua (20gr. /bombada), *T3*: 5gr de *B. bassiana*/ lt de agua (100 gr./bombada), *T4*: 10 gr. de *B. bassiana*/ lt. de agua (200 gr. /bombada).

La variable evaluada fue el número de brocas muertas por el hongo sobre el orificio de entrada, la cual se cuantificó a los 17 días después de la aspersión.

Los resultados de la investigación nos indican que el hongo *B. bassiana* se puede aislar en medio cultivo (PDA) y producir en medio sólido arroz en un periodo de 20 días al término del cual puede ser empaquetado y almacenado en refrigeración a una temperatura de 4 °C. o puede ser utilizado para aplicaciones de campo. De acuerdo a los resultados de patogenicidad tanto de laboratorio como de campo nos indican que las diferentes dosis y concentraciones del hongo producido en arroz causan mortalidad sobre la broca no existiendo entre ellas diferencia estadísticamente significativa; por lo cual se puede utilizar para el control biológico de la broca en campo cualquiera de las dosis para causar infecciones fúngicas sobre dicha plaga.

## DEDICATORIA.

► **A DIOS TODO PODEROSO:** *por estar siempre a mi lado tanto en los malos como en los buenos momentos de mi vida y darme la fortaleza para salir adelante en mi formación profesional.*

► **A MIS PADRES: Gloria Vilma Zepeda de Arias y José Moisés Arias.** *Por sus consejos, ejemplo y amor que me han brindado durante toda mi vida, por el enorme sacrificio que han realizado para guiarme por el camino del bien y ver a otro de sus hijos formarse como profesional.*

CON TODO MI AMOR Y CARIÑO LES DEDICO ESTE NUEVO TRIUNFO EN MI VIDA.

► **A MIS ABUELOS: Margarita Zepeda y Víctor Manuel Gómez; Juana Mejía y Moisés Arias (Q.E.P.D).** *Por su amor y cariño que me brindaron en vida y por sus sabios consejos.*

► **A MIS HERMANAS Y SOBRINOS:** *por su apoyo y cariño brindado.*

► **A MI DEMAS FAMILIA:** *por su apoyo y consejos.*

## AGRADECIMIENTOS.

*Deseo brindar mis más sinceros agradecimientos a quienes de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de la presente investigación:*

► **A MIS ASESORES:**

**“Ing. Agr. Deysi de Solano”:** *por estar siempre presente cuando necesite de su ayuda brindando valiosas horas de su tiempo para la realización del presente trabajo.*

**“Dr. Adán Hernández”:** *por su apoyo, enseñanza y orientación que me brindo desde el momento en que inicie con la investigación, por ser de las personas que siempre motivan a los demás a seguir adelante y haber dedicado su valiosa y desinteresada colaboración para la realización de este trabajo.*

*En las huellas de los triunfadores encontramos el camino de nuestro propio éxito.*

► **AL PERSONAL DE PROCAFE:** *Lic. Marisela Mejia, Don Orlando Orellana y Don David Valdés. Gracias por su ayuda y colaboración.*

► **AMIS COMPAÑEROS DE CARRERA:** *Roxana, Rebeca, Ada, Gaby, Rosario, Reina, Eunice, Aidé, Canales, Margarito, Juan, Cerafin, Rael, Will, Humberto, Mario, Oscar Che, Cesar, Aquino, Oswaldo, Julio, Oscar, Eleazar, Alan, Duarte y Ubense.*

► **A MIS AMIGOS:** *por su valiosa amistad, por acompañarme tanto en los buenos y malos momentos de mi vida y por estar siempre presente cuando más lo he necesitado sin importar a veces la distancia que nos separan:*

*Dr. Charlie Alfaro.  
Jorge Mulato.  
Agr. Orlando Muños.  
Misael Guevara.*

*Ing. Julio Contreras.  
Ing. Sabrina Cañas.  
Oscar Arce.  
Ismael Mulato.*

*Elmer Moisés Arias Zepeda.*





## INDICE

	PG.
Autoridades Universitarias.....	i
Asesores.....	ii
Resumen.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
<b>1 Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Revisión de literatura.....</b>	<b>3</b>
2.1 La broca ( <i>Hypothenemus hampei</i> ).....	3
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	3
2.2 Estados de desarrollo de <i>Hypothenemus hampei</i> .....	3
2.2.1 Huevos.....	4
2.2.2 Larvas.....	4
2.2.3 Ninfas.....	4
2.2.4 Adultos.....	4
2.3 Origen y distribución.....	5
2.4 Importancia económica de la broca.....	5
2.5 Programa de manejo integrado de la broca.....	6
2.6 Practicas culturales.....	7
2.7 Control etológico.....	8
2.8 Control químico.....	9
2.9 Control biológico.....	10
2.9.1 Control con parasitoides.....	11
2.9.2 Control microbiológico.....	12
2.10 Clasificación de los hongos entomopatógenos.....	13
2.10.1 Acción de los hongos entomopatógenos.....	14
2.11 <i>Beauveria bassiana</i> .....	16
2.11.1 Características del genero <i>B. bassiana</i> .....	18
2.11.2 El modo de infección de <i>B. bassiana</i> .....	18
2.11.3 Condiciones para el desarrollo de la enfermedad.....	21
2.11.3.1 Humedad relativa.....	21
2.11.3.2 temperatura.....	23
2.11.3.3 Luz.....	23
2.12 Aislamiento del hongo <i>B. bassiana</i> .....	24
2.13 Producción de <i>B. bassiana</i> .....	25
2.13.1 Producción industrial.....	25
2.13.2 Producción artesanal.....	26

<b>3</b>	<b> Materiales y métodos</b> .....	27
3.1	Fase I. Recolección del material.....	27
3.2	Fase II. Aislamiento del hongo <i>B. bassiana</i> .....	28
	3.2.1 Reproducción y producción de esporas en medio sólido arroz (arroz precocido). ....	29
	3.2.1.1 Preparación del Arroz.....	29
	3.2.1.2 Inoculación en botellas.....	29
	3.2.1.3 Obtención de esporas.....	30
	3.2.1.4 Recuento de conidias.....	31
3.3	Fase III. Bioensayo de patogenicidad de laboratorio.....	32
3.4	Fase IV. Ensayo de patogenicidad a nivel de campo.....	34
<b>4</b>	<b> Resultados y discusión</b> .....	36
4.1	Resultado del aislamiento el hongo nativo <i>B. bassiana</i> .....	36
4.2	Resultado de producción de esporas.....	37
4.3	Resultado del bioensayo de patogenicidad de laboratorio.....	38
4.4	Resultado del bioensayo de patogenicidad de campo.....	40
<b>5</b>	<b> Conclusiones</b> .....	43
<b>6</b>	<b> Recomendaciones</b> .....	44
<b>7</b>	<b> Bibliografía</b> .....	45
<b>8</b>	<b> Anexos</b> .....	50

## INDICE DE CUADROS.

	PAG.
<b>Cuadro 1</b> Dosis aplicadas por litro de agua en el bioensayo de laboratorio para determinar la patogenicidad de <i>B. bassiana</i> sobre la broca.....	32
<b>Cuadro 2</b> Dosis aplicadas por bombada en el estudio de campo para determinar la patogenicidad de <i>B. bassiana</i> sobre la broca.....	35
<b>Cuadro 3</b> Cuadro resumen de mortalidad diaria de bioensayo de Patogenicidad a nivel de laboratorio.....	39

## INDICE DE FIGURAS.

		PAG.
<b>Fig. 1</b>	Ciclo biológico de la broca del fruto del cafeto <i>H. hampei</i> .....	3
<b>Fig. 2</b>	Etapas de desarrollo de los hongos entomopatógenos.....	15
<b>Fig. 3</b>	Ciclo de infección de <i>B. bassiana</i> sobre insectos.....	19
<b>Fig. 4</b>	<i>B. bassiana</i> en crecimiento sobre adulto de la broca del café.....	20
<b>Fig. 5</b>	Frutos de café con exposición del hongo nativo <i>B. bassiana</i> sobre el orificio de entrada de la broca recolectados en la finca Esmeralda.....	27
<b>Fig. 6</b>	Aislamiento directo del hongo <i>B. bassiana</i> a partir del cuerpo de la broca.....	28
<b>Fig. 7</b>	Preparación y esterilización del arroz para la producción <i>B. bassiana</i> .....	29
<b>Fig. 8</b>	Inoculación del sustrato con el micelio del hongo.....	30
<b>Fig. 9</b>	Cosechado, secado, empaquetado y almacenado del sustrato conteniendo esporas del hongo.....	30
<b>Fig. 10</b>	Vista microscópica del esquema de la cámara Neubauer.....	31
<b>Fig. 11</b>	Instalación del bioensayo de patogenicidad a nivel de laboratorio.	33
<b>Fig. 12</b>	Estructura microscópica del hongo entomopatógeno <i>B. bassiana</i> ....	36
<b>Fig. 13</b>	Micelio del hongo <i>B. bassiana</i> purificado en PDA.....	36
<b>Fig. 14</b>	Crecimiento del micelio de <i>B. bassiana</i> sobre brocas tratadas en el bioensayo de laboratorio.....	40
<b>Fig. 15</b>	<i>Grafico.1</i> Distribución e mortalidad diaria de las brocas tratadas con <i>B. bassiana</i> .....	40
<b>Fig. 16</b>	<i>Grafico.2</i> Mortalidad acumulada de brocas de forma natural por la infección de <i>B. bassiana</i> e inducida después de la aplicación en el estudio de campo.....	43

## ÍNDICE DE ANEXOS.

	PG.
<b>Anexo.1</b> Numero de brocas muertas registradas por la infección de <i>B. bassiana</i> de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento testigo T1.	51
<b>Anexo.2</b> Numero de brocas muertas registradas por la infección de <i>B. bassiana</i> de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento T2	51
<b>Anexo.3</b> Numero de brocas muertas registradas por la infección de <i>B. bassiana</i> de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento T3.	52
<b>Anexo.4</b> Numero de brocas muertas registradas por la infección de <i>B. bassiana</i> de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento T3.	52

## 1. INTRODUCCIÓN.

El cultivo del café es uno de los más importantes de la agricultura tropical y subtropical, cultivándose en casi todos los países del trópico. Sin embargo se ve seriamente amenazado por el insecto plaga llamado broca del fruto *Hypothenemus hampei* ferr. (Coleóptero; Scolitidae) considerada una de las plagas mas dañinas del cultivo en muchas áreas productoras en el mundo (Gutiérrez, 1993). En El Salvador la broca del fruto es la plaga de mayor importancia económica que ataca el cultivo la cual fue reportada por primera vez en 1981. Actualmente se ha registrado su presencia en aproximadamente 126,000 Ha. Lo que representa casi el 80% del área cafetalera del país causando perdidas en la producción y calidad del café (Reyes *et, al.* 1995).

Actualmente los métodos de control se han limitado al uso de insecticidas químicos como lo es el Endosulfán, sin embargo el uso de plaguicidas conlleva a consecuencias como lo son contaminación del agua, aire, suelo, eliminación de enemigos naturales, especies benéficas y residuos de insecticidas en los frutos cosechados. Sumado a ello los altos costos de control y el descubrimiento de resistencia por parte de la broca a este insecticida, tal como ha pasado en Nueva Celedonia (Barrios y Centeno, 1999). Lo anterior ha llevado a varios países suramericanos y centroamericanos ha iniciar programas de control biológico con parasitoides y hongos entomopatogenos (Bustillo, 1995).

El hongo *Beauveria bassiana* se ha registrado como un enemigo natural de la broca en todos los países cultivadores invadidos por la plaga siendo un factor de mortalidad de dicha plaga (Bustillo, 1995). En El Salvador se ha determinado que el hongo *B. bassiana* se encuentra de forma natural infectando la broca en toda la zona cafetalera (Memorias laborales de PROCAFE, 2004). Sin embargo la incidencia de epizootias de forma natural y su impacto sobre la plaga difiere de un área a otra en el mismo año y de ciclo a ciclo en la misma área; no esta clara la eficacia de las epizootias naturales para mantener bajo control la broca y su daño (Lacayo *et, al.*1994).

Este hongo tiene un gran potencial en el control biológico de la broca debido a su relativa facilidad de manejo, capacidad de esporulación y persistencia a nivel de campo (Méndez, 1990).

Es por ello que la presente investigación llevada a cabo desde junio del 2005 a febrero del 2006 tuvo como objetivo el aislamiento, producción y patogenicidad del hongo nativo proveniente de fincas cafetaleras aislado de brocas infectadas y purificándolo en medio nutritivo PDA. El cual posteriormente se produjo en medio sólido arroz para obtener suficiente cantidad de inóculo y comprobar mediante ensayos de laboratorio y de campo su patogenicidad sobre la broca del café.

## 2. REVISION DE LITERATURA.

### 2.1 La broca (*Hypothenemus hampei*).

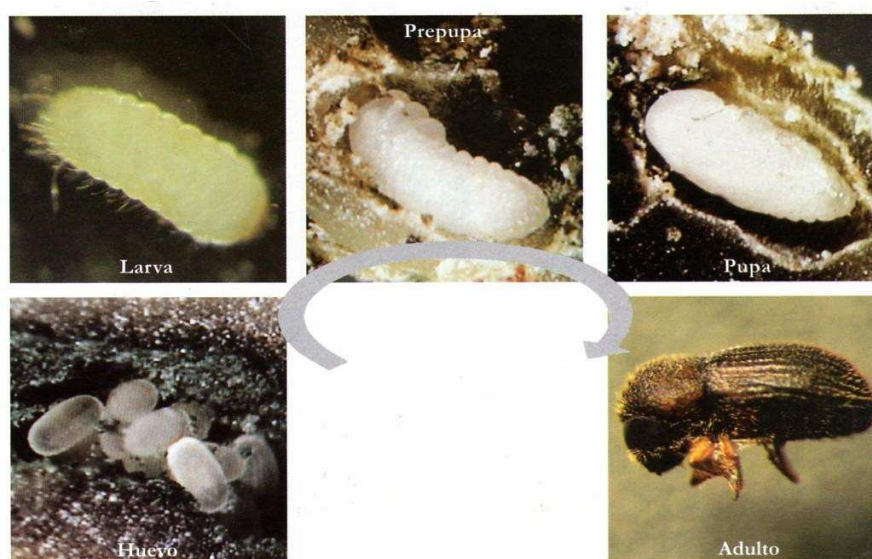
#### 2.1.1 Clasificación taxonómica.

La clasificación sistemática de la broca ha sido actualizada por Delvere y Alberlenc 1988, citado por Borbón, 1991.

Clase: ***Insecta***.  
 Orden: ***Coleoptera***. División ***Phylophaga***.  
 Sub.-orden: ***Polyphaga***.  
 Infra-orden: ***Cucujiformia***.  
 Súper-familia: ***Cucurlionidea***.  
 Familia: ***Scolytidae***  
 Sub.-familia: ***Ipine***.  
 Genero: ***Hypothenemus***.  
 Especie: ***Hampei***. (Ferrari, 1987).

### 2.2 Estados de desarrollo de *Hypothenemus hampei*.

La broca es un insecto holometábolo típico, ya que presenta un estado de huevo, varios estados larvarios un estado ninfal y un estado adulto (Borbón, 1991). Ver figura 1.



**Figura1.** Ciclo biológico de la broca del fruto del caféto *H. hampei*.



### **2.2.1 Huevos.**

Los huevos son de color blanco lechoso, recién ovipositados y a medida que el periodo de incubación progresa se tornan de color amarillento, midiendo de 0.54 a 0.83 mm de largo y 0.2 mm de diámetro (Barrientos *et.al*, 1995).

### **2.2.2 Larvas.**

La hembra tiene tres estados larvarios y los machos dos. Las larvas presentan el aspecto y color de un grano de arroz. Las larvas jóvenes son más o menos rectilíneas y ligeramente estrechas en la parte ventral. A medida que se desarrollan, la depresión ventral es menos marcada y se curvan en forma de "C". Las larvas adultas son blandas, de color blanco lechoso y su cabeza esta bien diferenciada. El cuerpo esta cubierto por grandes setas, que miden de 1.17 a 1.75 mm. de largo y 0.37 a 0.58 de grosor (Borbón, 1991).

### **2.2.3 Ninfas**

Son de color blanco y corresponden al tipo de Pupa libre, en el cual a medida progresa el desarrollo, se van diferenciando cada uno de los apéndices de la cabeza, las alas y las patas. Próximo a transformarse en adultos, tienen todos los apéndices bien diferenciados y se tornan de color amarillento pálido a café oscuro (Barrientos *et.al*, 1995).

### **2.2.4 Adultos.**

Existe un marcado dimorfismo sexual entre los adulto; la hembra es mas grande que el macho, ella mide 1.37 A 1.82 mm de largo y 0.62 a 0.80 mm de ancho, mientras que el macho mide 1.00 a 1.25 mm de largo y 0.50 a 0.60 mm de ancho. Ambos tienen en el cuerpo setas y en la cabeza tienen una corona de protuberancia como dientes. Los jóvenes adultos son de color amarillo al nacimiento y van oscureciéndose con el tiempo, hasta alcanzar el color negro brillante (Borbón, 1991).

### **2.3 Origen y distribución.**

La broca del café fue encontrada por primera vez en Francia por Ferrari, en 1867 en granos de café importados de África (Borbón, 1991). Según Ticheler 1961, citado por Borbón (1991) a inicios del siglo XIX, la broca fue considerada como una plaga importante del café, encontrándosele entre 1902 a 1943 en todo el continente africano especialmente en: Gabón, Angola, Uganda y Tanganika. La broca del café se encuentra presente en países como Malasia, Surinam, Vietnam, México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Ecuador entre otros (Hernández y Sánchez, 1978).

La broca es originaria de África Central de donde se diseminó a otros continentes como el Americano; donde fue introducida accidentalmente a Brasil a principios del siglo (Bustillo, 1991). Barriéntos *et,al.* (1995) menciona que la broca se detectó por primera vez en El Salvador en septiembre de 1981 en una zona fronteriza con Guatemala de donde se extendió a diferentes zonas cafetaleras. Dufour y González (2000) estiman que desde entonces se ha dispersado en un 85% de la zona cafetalera principalmente en zonas de bajo y media altura (de 500 a 1200 msnm).

### **2.4 Importancia económica de la broca.**

Cuando el ataque de la broca es elevado el caficultor sufre pérdidas por disminución del peso de café oro, baja calidad en la bebida, aumento en los costos de producción por combate de la plaga y luego por selección del café pergamino. Los ataques de la broca suelen ser muy precoces; provocan la caída de los frutos jóvenes, esas pérdidas pueden representar del 5 al 10% de la producción total del café; sin embargo es difícil precisar las pérdidas provocadas por la broca del café ya que el nivel de ataque varía todos los años (Borbón, 1991).

PROCAFE menciona que la plaga genera anualmente pérdidas entre 50 mil y 70 mil quintales del grano; y que para producir 1 quintal de café oro se puede necesitar hasta 6 quintales de café uva (Barrera, 2005).

## **2.5 Programa de manejo integrado de la broca.**

La manera más racional y económica de controlar la broca es a través del seguimiento de los principios del manejo integrado de plagas. El cual trata de un método ecológicamente orientado, utilizando diversas técnicas de control combinadas en un sistema de manejo tratando de proteger, preservar e incrementar los agentes bióticos de mortalidad natural; tales como parasitoides, depredadores y patógenos (Decazy, 1988).

La tecnología del manejo integrado es considerada como una tecnología basada en una estrategia de integración de tácticas no químicas, como lo es el control manual (recolección del fruto), y el control biológico (hongos y parasitoides) aplicándolos de acuerdo a muestreos y umbrales económicos (Barrera *et.al*, 2002). En el caso de *H. hampei*, el programa de manejo integrado de la broca (MIB), se ha enfocado dentro del siguiente marco teórico: el uso de una serie de medidas de control (cultural, biológico y químico) y de practicas agronómicas tendientes a reducir las poblaciones de la broca en los cafetales a niveles que no causen daño económica y que permitan la producción de café (Bustillo, 2002).

Desde la introducción de la broca a El Salvador, se consideró que su control debía ser a través de un programa de manejo integrado el cual comprendiera el conocimiento de los factores que componen el ecosistema cafetero y sus interacciones.

Por lo cual se estudió la biología de la broca en diferentes zonas y el efecto de los factores ambientales sobre la dinámica poblacional en los cafetales; siendo estos la base para la implementación del programa del manejo integrado el cual comprende practicas culturales, control biológico mediante la liberación de parasitoides, uso de trampas con atrayentes y control químico en cafetales con mas del 5% de infestación (Hernández, 2004).

La implementación intensiva del manejo integrado de la broca (MIB) es una actividad poco adoptada por los caficultores. En contraste con el control biológico, esta es una de las técnicas más frecuentemente adoptadas en los programas de combate contra dicha plaga, empleando ectoparásitos como *Cephalonomia stephanoderis* y el hongo *Beauveria bassiana* (Barrera, 2005). Por lo cual Dufour y González (2000) consideran que el manejo integrado de la broca es la alternativa del futuro, asociado a diferentes técnicas tales como el control cultural, el trapeo y el control biológico.

## **2.6 Prácticas culturales.**

En el cultivo del café se han desarrollado varios tipos de controles con la finalidad de reducir las poblaciones de la broca del fruto del café propiciando la formación desfavorable al desarrollo de este insecto plaga, utilizando diversas técnicas como: podas de árboles de sombra, podas de cafetos, recolección de frutos antes y después de la cosecha (repase, pepena y repela), cultivos trampas y regulación de sombra. Dichos controles podrían dar contribuciones importantes al sistema de manejo integrado de plagas cuyos beneficios económicos a largo plazo podrían valer más que algunos a corto plazo como la aplicación de Endosulfán y de los costos ambientales de los métodos de control actual, beneficiando la caficultura latinoamericana (Gutiérrez, 1993).

Según Hernández y Paz (2000) entre las actividades culturales que se realizan para reducir el daño de la broca se encuentran:

- Buen control de malezas.
- Recolección de los frutos del suelo y de la planta inmediatamente luego de realizada la cosecha.
- Recolección de los primeros frutos perforados por la broca que permanezcan en las fincas (maduros y verdes).
- Iniciar la recolección por los lotes más afectados por la broca.
- Sombra regulada en fincas.
- Poda de cafetos (sanitaria y de producción).

- Registro de floración.
- Muestreos para conocer los niveles de infestación.

Una de las causas de infestación de las nuevas cosechas es atribuida a una población remanente de adultos que permanecen en el suelo como consecuencia de la caída de frutos infestados. Donde los estados biológicos presentes pueden desarrollarse y provocar en el tiempo ataques severos (Bernal *et, al.* 1997).

Por lo cual las practicas culturales mas empleadas e importantes en el manejo integrado de la broca del cafeto son la “Pepena, repela y repase”, consistiendo en recolectar los frutos antes y después de la cosecha (Vega y Romeo, 1985; citado por De Cazy, 1988).

Cuando las condiciones climáticas le son favorables y cuando dispone de todo el año de fruto *H. hampei*; puede mantener una serie ininterrumpida de generaciones con un mínimo de ocho en su ciclo de vida. Por lo que las medidas de control cultural se han encaminado a interrumpir su multiplicación al no disponer de fruto tanto en árboles como en el suelo y propiciándole condiciones ambientales adversas para su desarrollo (Le Pelley 1968; citado por Gutiérrez 1993).

## **2.7 Control etológico.**

El control etológico o trampeo es una técnica que explota la sensibilidad olfativa de la broca adulta para atraerla y capturarla, utilizando atrayentes similares a aquellos elaborados en los frutos del café mas un sistema de difusión y un recipiente de captura (Dufour, 1998).

La trampa para la broca, permite la captura de hembras colonizadoras que emigran de los frutos secos en búsqueda de nuevos frutos. Este movimiento se intensifica cuando aumenta la humedad relativa ambiental y la temperatura, después de las primeras lluvias. Al capturar dichas poblaciones de brocas se logra evitar el daño a los granos de café de la futura cosecha (Bautista *et,al.* 2001).

Dufour (2004) menciona que el trapeo es un componente del manejo integrado de la broca (MIB) el cual es aplicado por lo general, en cafetales bajo sombra, este funciona con un atrayente compuesto de etanol y metanol. Dicho autor demostró que el trapeo aplicado en el marco de una estrategia de manejo integrado, logra bajar los niveles de infestación hasta límites aceptables, especialmente cuando está asociado a la cosecha sanitaria. De igual forma puede ser complementario al control biológico con parasitoides en el periodo de post-cosecha, idea planteada por Dufour, (1998) a raíz de los buenos resultados obtenidos de estudios realizados en 1997 en El Salvador.

La actividad del trapeo se realiza en el periodo de post-cosecha (finales de febrero – abril) partiendo de las primeras lluvias hasta cuando se tiene fruto de la nueva fructificación que inicia en la etapa de maduración del café (Borbón, 1991). Para lo cual Canjura *et,al.* (2003) afirma que para la captura de la broca entre dichos meses se colocan 12 trampas BROCAP por manzana.

## **2.8 Control químico.**

Almeida y Calvacante (1964) citado por Burgos (1998) introduce por primera vez, para el control químico de la broca del fruto del café, el insecticida Endosulfán.

La aplicación de este producto reduce el ataque de la plaga el cual ha sido aplicado en países como México, Guatemala, Honduras y El Salvador en los cuales ha dado buenos resultados a razón de 0.5 a 0.15 litros del producto por hectárea (Borbón, 1991).

El uso de insecticidas para el control de la broca se debe de llevar a cabo cuando técnicamente se requiera, justificándose por los niveles de infestación en forma localizada, durante el tiempo apropiado de ataque y con la tecnología recomendada de aspersión (Bustillo, 2002).

La eficiencia de los insecticidas es muy errática debido al hábito de la broca de permanecer en el interior del fruto. Solo cuando sale el adulto a colonizar nuevos frutos se torna susceptible a estos productos por ello los niveles de control, considerando toda la población que existe en el interior de los frutos, son muy bajos. Por lo que se sugiere que debe realizarse cuando las hembras adultas están volando hacia nuevos frutos o durante el proceso de penetración (Bustillo *et, al.* 1998).

Para el manejo integrado de la broca del cafeto, se debe de tomar en cuenta y hacer uso de todas las medidas de control que estén disponibles, por lo tanto no se excluye el control químico (Hernández y Paz, 2000). Tomando en cuenta lo que sugieren algunos autores como Borbón (1991) y Bustillo (2002) de no abusar del uso de insecticidas como el Endosulfán ya que el, uso continuo de este producto puede causar resistencia por parte de la broca como los casos que se han registrado en Nueva Caledonia.

### **2.9 Control biológico.**

En el control natural los factores del ecosistema sobre las plagas se dividen en: factores bióticos aquellos que involucran otros organismos como parasitoides, predadores y entomopatógenos; y factores abióticos tales como el clima, suelo, viento y radiación solar. El control biológico a diferencia del natural implica la intervención del hombre en forma inteligente valiéndose de los enemigos naturales (factores bióticos) es decir parasitoides, predadores y entomopatógenos (Orozco, 1994).

El control biológico constituye una herramienta más de las alternativas del programa de manejo integrado de la broca, convirtiéndose en una alternativa sustancial al uso de insecticidas empleados en el control de la plaga. Por lo tanto constituye una variable en la situación actual de la crisis que atraviesan los productores de café (Barrera, 2005).

El desarrollo de técnicas de producción masiva de parasitoides y entomopatógenos para el control de la broca, con el fin de utilizarlos en el programa de manejo integrado, implica conocer las interacciones de estos organismos entre sí, para recomendar su empleo en campo con otros métodos de control como lo es la aplicación de insecticidas (Bustillo *et al.* 1998).

### **2.9.1 Control con parasitoides.**

El control biológico clásico es una forma de control biológico que comprende el descubrimiento, importación y establecimiento de enemigos naturales exóticos; con el fin de regular las poblaciones de plaga introducida o nativas en un país (Debach 1967; Quezada 1987; citado por Carrillo y Campos, 1990).

La broca es una plaga exótica en América, por lo que se encuentra libre de enemigos naturales que la atacan en su lugar de origen (Continente Africano); siendo por lo tanto el control biológico clásico una de las tácticas de manejo integrado (Carrillo y Campos, 1990).

La broca posee cuatro importantes especies de micro himenópteros parasitoides Africanos: *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta*, *Meterosopilus coffeicola* y *Phymastichus coffea* (Le Pelley 1968; Borbón 1989; citados por Carrillo y Campos, 1990). Con el fin de aumentar la fauna de enemigos biológicos de la broca se ha logrado introducir al país dos especies de parasitoides desde África: *C. stephanoderis* y *P. coffea* (Bustillo, 1995).

Los parasitoides atacan todos los estados de la broca cuando colonizan los frutos infestados. Primero matan el adulto alimentándose de su hemolinfa, luego consumen los huevos. Posteriormente paralizan las larvas del segundo instar, las prepupas y pupas sobre las cuales ovipositan y se desarrollan (Bustillo *et al.* 1998).



Bustillo (2002) determino que los parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta* realizan acción depredadora sobre los adultos que se encuentran colonizando frutos. Dicho autor detalla que el nivel de ataque puede variar del 48% hasta el 65% para *Cephalonomia stephanoderis* y en el caso de *P. nasuta* los niveles registrados son de 60% y 70%.

El parasitoide de la broca mas recientemente descubierto es *Phymastichus coffea* descrito por La Salle en 1990. Se encontró por primera vez en La Republica de Togo en 1987, donde se han registrado mediante estudios de campo mortalidades en adultos de broca del 29.655 % por *P. coffea*. Posteriormente fue reportado en La Republica de Kenia (Borbón 1987; La salle 1990; citado por Bustillo, 1991).

### **2.9.2 Control microbiológico.**

Una de las alternativas para reducir el uso excesivo de insecticidas y evitar daños secundarios al ecosistema y al hombre es la utilización de organismos entomopatógenos, los cuales tienen la capacidad de reducir las poblaciones de plagas. Existen varios de esto organismos como lo son: virus, hongos, bacterias, protozoarios y nematodos (Monzón, 2002).

La importancia de los hongos entomopatógenos como reguladores naturales de poblaciones ha sido reconocida por muchos años. Factores como el aumento de resistencia de insectos a insecticidas y efectos adversos en el uso generalizado de químicos en el control de plagas han fomentado el uso de los hongos entomopatógenos como sustitutos potenciales de los insecticidas químicos (Velas y Montoya, 1993). Dichos hongos se encuentran en la naturaleza, encontrándose en rastrojos de cultivos del suelo, las plantas, etc. Logrando estos un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol (Monzón, 2002).

Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas enfermedades causadas por los hongos entomopatógenos. Existen en la actualidad más de 400 especies de hongos los cuales atacan insectos y ácaros.

Lo que indica un gran potencial para el uso de estos organismos como insecticidas biológicos (Monzón, 2002). Los hongos son marcadamente superiores a otros microorganismos puesto que generalmente no son específicos en su acción sobre insectos, lo que les confiere importancia en el control de un amplio rango de insectos plagas. Los géneros más importantes para el control son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Verticillum* y *Zoophthora* (Estrada, Vélez y López, 1997).

El uso de estos hongos contra insectos fue sugerido desde hace mucho años, cuando en 1879, *M. anisopliae* se utilizó para el control del picudo de la remolacha *Cleonis punctiventis* (Barnet y Hunter, 1972). El rango de hospedantes de algunos géneros de hongos entomopatógenos es variable, y tiende a ser más común en áreas tropicales, en las cuales factores tales como la temperatura y la humedad relativa favorecen su crecimiento. Sin embargo pueden encontrarse en áreas templadas (Doberski y Tribe 1978; citados por Vélez y Montoya, 1993).

Los hongos entomopatógenos para el control de la broca del café son un componente fundamental en el desarrollo de un programa de manejo integrado que tenga por finalidad la preservación del medio ambiente y la racionalidad en el uso de insecticidas químicos (Bustillo *et al.* 1998).

## **2.10 Clasificación de los hongos entomopatógenos.**

La mayor parte de los hongos entomopatógenos como lo son: *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* tienen la siguiente clasificación (Robert 1989; Tanada y Calla 1992; citados por Parada, 1999).

División: ***Eumycota.***

Sub-división: ***Deuteromycotina.***

Clase: ***Deuteromycetes (Hypomycetes)***

Orden: ***Monilliales.***

Genero: ***Beauveria, Metarhizium y Paecilomyces.***

### **2.10.1 Acción de los hongos entomopatógenos.**

Fases en que se desarrollan los hongos sobre sus hospedantes son: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. El inóculo o unidad infectiva está constituida por las estructuras de reproducción sexual y asexual, esporas y conidias (Monzón, 2002).

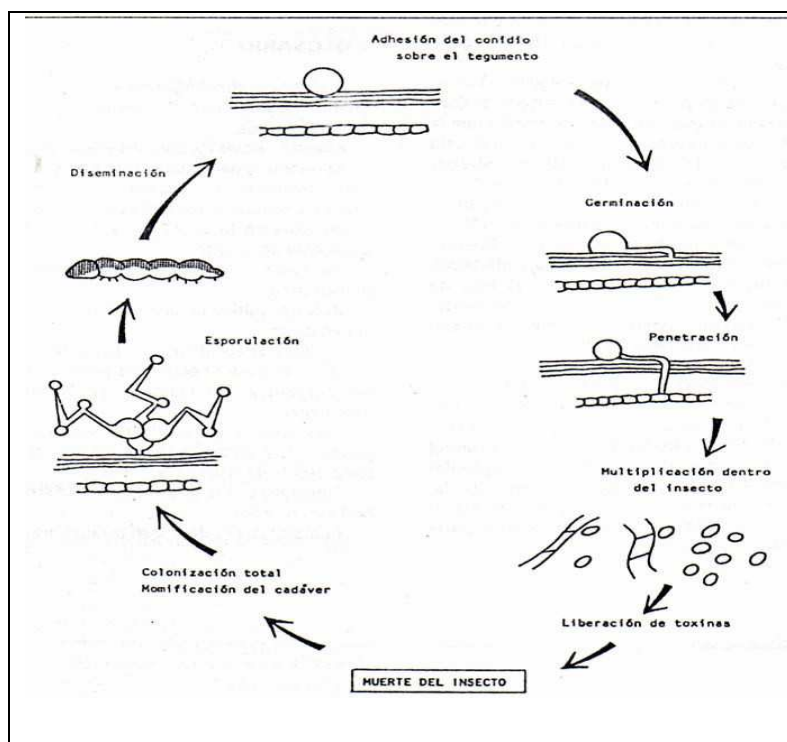
El proceso de infección de los hongos entomopatógenos sobre la plaga inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto; produciéndose posteriormente un tubo germinativo y un apresorio, con el que se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se 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 rompiendo el área esclerosada y membranosa de la cutícula; y el químico consiste en la acción enzimática, principalmente las proteasas, lipasas y quitinasas en la zona de penetración, facilitando la penetración física (Monzón, 2002).

Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto (Monzón, 2002).

La habilidad de un hongo entomopatógeno para sobreponerse a los mecanismos de defensa de sus hospedantes se debe en gran parte a la producción de toxinas. Los hongos sintetizan toxinas que son utilizadas en su ciclo de relación patógeno hospedante siendo uno de los componentes principales de la patogenicidad. Esta es otra forma mediante la cual el hongo causa la muerte al insecto y se puede determinar cuando los insectos mueren rápidamente después de la infección (Khachatourians 1988, citado por Gonzáles, Posada y Bustillo, 1993)

Entre estas toxinas se han encontrado destruxinas, demetildestruxinas y protodestruxinas, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Monzón, 2002).

Otros autores como Robert y Humber (1981) citado por Lecuona, Parierok y Riva, (1996) mencionan que el desarrollo de los hongos entomopatógenos en particular los Deuteromycetes puede dividirse en diez etapas: **adhesión** al tegumento del insecto, **germinación** de los conidios o esporas sobre este, **penetración** a través de la cutícula del insecto, **multiplicación** del hongo en el hemocéle y la producción de **toxinas** (en ciertos hongos). Sobreviniéndose **la muerte** del insecto y el hongo **coloniza** todo el interior del hospedante. Para posteriormente el micelio sale **hacia el exterior** pasando a través del tegumento, **esporula** sobre la superficie del insecto y finalmente los propágulos son **diseminados** al medio (Ver figura 2). Cada uno de estos pasos son importantes no solo para provocar la muerte del hospedante si no también, su posterior diseminación en el hábitat (Lecuona, Parierok y Riva, 1996).



**Figura 2.** Etapas de desarrollo de los hongos entomopatógenos.

### 2.11 *Beauveria bassiana*.

En 1834 Agostino Bassi demostró que *B. bassiana* (bals) Vuill. Era el agente causal de una enfermedad en el gusano de seda *Bombix mori*. A partir de sus estudios se inicia la patología de insectos como ciencia (Bassi 1835; Steinhaus 1963; citado Lecuona, Parierok y Riva, 1996).

Este hongo pertenece a la clase Deuteromycete, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae (Barnet y Hunter 1972; citado por Monzón, 2002). El genero *Beauveria* esta compuesto por varias especies, las más frecuentemente aisladas y estudiadas son: *B. bassiana* y *B. brongniartii*. El rango de hospedante de esta especie es amplio al igual que su distribución geográfica; en el mundo se ha registrado en más de 200 especies de diferente orden. *B. bassiana* se ha encontrado en mas de 60 especies de insectos en el mundo (Bustillo, 1995).

Este hongo se encuentra generalmente en poblaciones de plagas hipogeas o en plagas que viven en localidades con temperaturas, humedad y otras condiciones similares a las que existen en el suelo (Bustillo, 1995). *B. bassiana* es uno de los entomopatogenos mas estudiados para el control biológico de muchas plagas. En Europa ha sido utilizado para el control de *Laspeyresia pomonella* plaga de manzanos (Robets y Yendol 1971; citado por Gonzáles, Posada y Bustillo1993). Al igual en Brasil donde ha sido utilizado para el control de las plagas del fríjol y caupi, *Cerotoma sp.*, *Diabrotica speciosa* y *Chalcodermus ahenus* (Daouts y Pereira 1986; citado por Bustillo *et, al.* 1998).

*B. bassiana* se ha encontrado atacando *H. hampei* en los sitios de origen del café y en los países donde este ha sido llevado e introducido, con independencia de la variedad de café de que se trate. Los primeros registros de incidencia del hongo sobre la broca fueron realizados en el Congo Belga en la década del 1930 (Pascalet y Stevaert 1939; citado por González, Posada y Bustillo, 1993).

El hongo puede atacar a la broca cuando ésta llega por primera vez a un cafetal por que *B. bassiana* es un habitante natural del suelo y está presente en el ambiente ya que sobrevive en la materia orgánica en descomposición y atacando a insectos hospedantes como el picudo del plátano y larvas y adultos de gallina ciega (Calderón y Cortes, 1993).

*B. bassiana* se ha registrado como enemigo natural de la broca del café en todos los países cultivadores invadidos por esta plaga. En todos los registros de enemigos naturales de la broca donde ésta se ha distribuido, *B. bassiana* aparece como el mas asociado a las poblaciones y con acción permanente que alcanza niveles de epizootias de forma natural (Posada, 1996).

La incidencia del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café en condiciones de campo varía de un país a otro; como lo es en Costa de Marfil y en Kenya donde las infecciones han sido escasas. En contraste con otros países como Camerún, Honduras, México y Ecuador donde se han registrado altos niveles (Barrera 1990; Klein 1988; Troconi 1986; citados por González, Posada y Bustillo, 1993). Lo cual puede deberse a diferencia de los factores climáticos o a que la broca esta mejor adaptada que el hongo en su sitio de origen África, siendo susceptible al hongo exótico que encuentra cuando llega a un nuevo sitio (More y Prior 1988; citado por González, Posada y Bustillo, 1993).

El hongo *B. bassiana* puede jugar un papel importante en el control de *H. hampei* bajo condiciones de los sistemas cafeteros. Ya que estos Agroecosistemas son perennes debido al sombrío o auto sombrío del café, lo que le proporciona bastante protección de la radiación solar y la humedad relativa alcanza niveles óptimos durante ciertos momentos del día lo que favorece el ataque del hongo (Bustillo *et,al.* 1998).

### **2.11.1 Características del género *Beauveria bassiana*.**

El género se caracteriza por presentar micelio blanco, conidioforo sencillo, irregularmente agrupado o en grupo verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, el conidioforo presenta forma en zig-zag después de que varias conidias se producen. Las conidias son hialinas, el 50% son redondeadas a ovoides, unicelulares y emergen en pequeños estigmas (Barnet y Hunter, 1972).

Este hongo presenta unas estructuras que son visibles al microscopio llamadas fialidas o células conidiogenas que tienen una base globosa o en forma de botella y se extiende apicalmente en grupos densos (Barnet y Hunter, 1972).

### **2.11.2 Modo de infección de *Beauveria bassiana*.**

*B. bassiana* es el agente causal de una enfermedad sobre los insectos conocida como muscardinas blancas (Barnet y Hunter, 1972). Para que el hongo ataque a la broca, sus esporas deben entrar en contacto con el cuerpo del insecto (Narváez *et,al.* 1997) Ver figura 3.

Kouassi (2001) detalla que el modo de infección de *B. bassiana* se divide en cuatro etapas distintas que son:

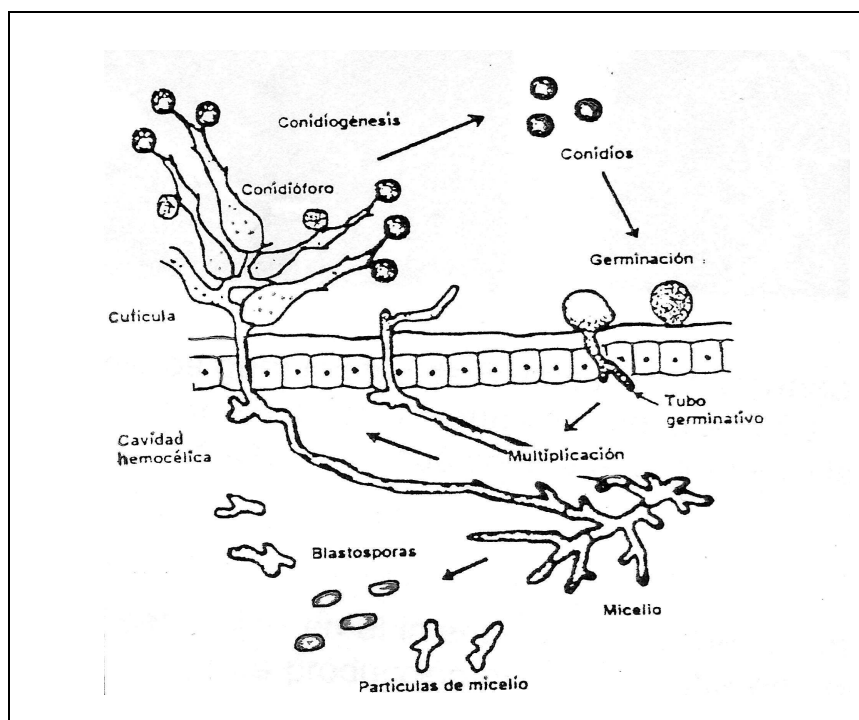
► **Adhesión:** se caracteriza por un mecanismo de reconocimiento y de compatibilidad de las conidias con las células del tegumento del insecto. Esta fase presenta dos etapas distintas: la primera donde la conidia se pega a la cutícula por medio de fuerzas hidrofobicas y electrostáticas y en la segunda esta caracterizada por que la conidia produce un mucílago que genera una modificación en la epicuticula lo cual ocasiona la germinación.

► **Germinación:** esta va ser dependiente de las condiciones del medio ambiente y también de la fisiología del hospedante (composición bioquímica del hospedante) la cual puede favorecer e inhibir la germinación.

► **Diferenciación:** esta es la penúltima fase la cual se caracteriza por la formación de un apresorió o estructuras terminales que van a servir de punto de agarre y remoción de la cutícula para favorecer la penetración. La producción de los apresoriós es dependiente del valor nutritivo de la cutícula. Una cutícula nutritiva estimula el crecimiento micelial más que la penetración.

► **Penetración:** la última fase es la penetración del huésped la cual se realiza por una combinación de presión mecánica y enzimática tales como las lipasas, proteasas, y quitinasas de las cuales la más importante en la penetración son las proteasas. Ciertas cepas producen toxinas no enzimáticas: beauvericina, bassianolides, e isarolides que actúan y aceleran el proceso de infección.

Las proteasas y las lipasas son enzimas constitutivas de *B. bassiana* que actúan degradando la cutícula del hospedante. La quitinasa puede actuar como una enzima constitutiva o adaptativa, dependiendo de la especificidad del hongo.



**Figura 3.** Ciclo de infección de *B. bassiana* sobre insectos.



El Integumento del insecto esta compuesto de quitinas y proteínas con lípidos asociados y compuestos fenolicos los cuales actúan como barrera contra organismos invasores. Los hongos filamentosos son capaces de penetrara esta barrera a través de la acción combinada de enzimas hidroliticas como lo son quitinasas, proteasas y lipasas. La presencia de las enzimas hidroliticas suelen facilitar cada una de las etapas de la infecci3n del hongo y adicionalmente, pueden ser importantes en la invasi3n del hemoc3ele del insecto (Valdez, Vélez y Montoya, 1999).

En general la germinaci3n de las conidias de *B. bassiana* ocurre en un per3odo de 12 horas despu3s de la inoculaci3n. El hongo penetra a trav3s del integumento del insecto por acci3n mecánica y efectos enzimáticos, lo cual toma otras 12 horas. Despu3s de 72 horas de la inoculaci3n el insecto esta totalmente colonizado (Ver figura 4). La duraci3n de las diferentes etapas del ciclo depende de la especie atacada y de las condiciones ambientales presentes durante la infecci3n (Alves, 1986).



**Figura 4.** *B. bassiana* en crecimiento sobre adulto de la broca del café.

### **2.11.3 Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.**

*B. bassiana* causa epizootias en poblaciones de la broca cuando las condiciones ambientales le son favorables es decir alta humedad relativa, alta nubosidad, temperatura y una abundante población de broca, se observan niveles importantes de parasitismo (Koch *et,al.* 1988). Pero estas infecciones naturales no son suficientes para detener el desarrollo de la plaga. Las condiciones de vida de la broca del café, la hacen naturalmente susceptible a las infecciones por el hongo ya que este como la broca se desarrollan de manera óptima bajo condiciones de alta humedad (Moore y Prior 1988; citado por Gonzáles, Posada y Bustillo, 1993).

Las infecciones causadas en los insectos por los hongos entomopatógenos ocurren de forma primaria a través de la cutícula; por esta razón es muy influenciada por las condiciones ambientales (Deancon, 1983; citado por Vélez y Montoya, 1993). Factores de tipo abiótico como la luz solar, la temperatura, el agua o la humedad, determinan el éxito o el fracaso de los hongos entomopatógenos en el campo (Couch 1981; citado por Vélez y Montoya, 1993).

La eficiencias de los hongos entomopatógenos en el campo esta relacionada principalmente con la temperatura y la humedad relativa, especialmente en condiciones tropicales y subtropicales; estos factores juegan un papel, básico en el inicio de una infección y la viabilidad de estos organismos (Ouedrago *et,al.* 1997; citado por Berlanga, Hernández y Velásquez, 2002). Sin embargo los hongos poseen una habilidad para permanecer viables a temperaturas del suelo, además se pueden adaptar a suelos con alto contenido de humedad o completamente secos (Fuxa 1987; citado por Parada, 1999).

Bustillo (1998), menciona que la utilización de *B. bassiana* como controlador biológico depende de factores como temperatura, humedad relativa y radiación solar optimas para que este sea eficaz en el control de la broca. Gonzáles, Posada y Bustillo (1993), recomiendan aplicarlo cuando la broca se encuentra volando en búsqueda para colonizar nuevos frutos o penetrándolos, ya que una vez haya entrado al fruto es difícil que el hongo realice el proceso de infección.

Es por ello que diferentes autores sostienen que el efecto de *B. bassiana* puede ser variable; ya que en diferentes estudios demuestran que se puede tener mortalidades de broca hasta de un 80% bajo condiciones de humedad y sombrío adecuadas; pero bajo condiciones no favorables su eficacia se puede reducir a niveles del 20% a 30%. (Bernal, Benavides, Arcila, Bustillo 1997).

### **2.11.3.1 Humedad relativa.**

Los hongos entomopatógenos requieren de alta humedad relativa para la germinación de los conidios y la formación de estructuras reproductoras, este factor afecta la estabilidad y la supervivencia del hongo. Las condiciones de humedad favorecen la presencia y persistencia de los hongos, por lo que se manifiestan como focos epizooticos (Clayton y Grove 1988; citado por Parada 1999).

La humedad relativa probablemente no es el mayor factor que influye en la supervivencia de las conidias de *B. bassiana* para el control de insectos del suelo. Excepto en condiciones de extrema sequía, la humedad relativa de la atmósfera del suelo llega a ser del 95% al 99% (Linn y Donalson 1981; citado por López *et,al.* 1995). Algunos autores consideran que la humedad relativa es de poca importancia en el proceso de infección, pero indispensable para el desarrollo y germinación de los conidios, además la humedad es importante para el desarrollo de las hifas y la producción de esporas, lo que resulta cuando la humedad esta cerca del 100% (Parada, 1999).

Se ha establecido que el límite inferior de humedad relativa para la germinación de esporas de los Deuteromycetes que infectan insectos terrestres es aproximadamente 92% y que el micro ambiente en la superficie del insecto puede proveer condiciones favorables para el desarrollo de estos hongos. Sin embargo algunos autores afirman que entomopatógenos como *B. bassiana* y *M. anisopliae* no requieren altas humedades relativas o presencia de agua libre para causar la infección (Auld 1991; Couch 1981; citados por Vélez y Montoya, 1993).

### **2.11.3.2 Temperatura.**

La influencia de la temperatura en infecciones de insectos con *Beauveria* depende de los requerimientos del hongo. El genero *Beauveria* normalmente se desarrolla en un rango de 0 a 40 °C de temperatura, con una óptima de 20 a 30 °C, lo cual depende del origen geográfico del aislamiento. Investigaciones realizadas con *Beauveria* mencionan que necesita temperaturas entre los 10 y 35 °C para la germinación de esporas.

Se ha comprobado que las esporas mueren a temperaturas cercanas a los 50 °C y pierden su viabilidad en pocos meses a temperaturas de 21 °C, pero al estar almacenados a 8 °C, se puede mantener viable por un año (Cayton y Grove 1988; citado por Parada, 1999). Estudios realizados sobre los requerimientos de temperatura y humedad relativa de *B. bassiana* indican que este hongo se desarrolla a 23 °C y 80% de humedad relativa, siendo estos los requerimientos similares a los de *H. hampei* (Walstad, 1970; citado por Barrios y Centeno, 1989).

### **2.11.3.3 Luz.**

La radiación solar, especialmente la de tipo ultravioleta, desempeña un papel importante en la mortalidad de esporas del hongo (Doberski y Tribe 1980; citado por Vélez y Montoya 1993). La vida media de diferentes inóculos de hongos expuesto a la luz solar se estima en un tiempo aproximado de una hora para el hongo más susceptible y de 96 horas para el más resistente.

La luz solar puede inactivar a los entomopatógenos en forma directa a través de deleciones, uniones cruzadas, rupturas de bandas y formación de sitios labiles en la molécula del ADN; y en forma indirecta debido a la formación de radicales altamente reactivos los que a su vez inactivan a los entomopatógenos, reduciendo la persistencia de este en el campo (Ignoffo 1992; citado por Vélez y Montoya 1993).

Vélez y Montoya, (1993) realizaron estudios en campo mediante aspersiones de diferentes formulaciones del hongo *B. bassiana*, observaron que a mayor tiempo de exposición de las conidias a la radiación solar hubo menor viabilidad de estas, que en condiciones de sombreado con 53% de luminosidad, en cual la supervivencia de propágulos del hongo perduro por mayor tiempo a través del estudio.

### **2.12 Aislamiento del hongo *B. bassiana*.**

El aislamiento consiste en la obtención del hongo a partir de la fuente de inóculo la cual puede ser: insecto y planta, en medios artificiales como PDA en (cajas de petri, tubos de ensayo u otros) o de preservación en seco como Silica - gel. A partir del aislamiento del hongo se procede a la inoculación de este en un medio de cultivo puro. El aislamiento de los hongos se puede hacer de dos maneras por dilución seriada y directo (Monzón, 2002).

El aislamiento directo consiste en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto, pasándolo a un medio nutritivo como PDA. Esta técnica es desventajosa debido a que la muestra que se toma del insecto puede estar sucia y contaminar el medio. Por lo que se hace necesario realizar una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio al 3.5% enjuagándolo con agua destilada estéril (Monzón, 2002).

El aislamiento de *B. bassiana* a partir de brocas muertas por el hongo en el cafetal por el caficultor es una técnica muy fácil y sencilla, la cual consiste en buscar en el cafetal granos atacados por la broca que tengan mota blanca en el ombligo u orificio de entrada de la broca; donde esta se encuentra muerta por acción del hongo estos son cortados y disectados con una navaja o cuchilla retirando las brocas muertas cubiertas por el hongo colocándolas en un frasco. Para luego ser desinfectadas con hipoclorito de sodio puro sumergiéndolas durante dos minutos, este no mata el hongo y permite tener cultivos puros (Calderón y Cortes, 1993).

Las brocas desinfectadas se colocan o siembran tres por botella preparada con medio de cultivo arroz bien cocido sin exceso de agua para evitar contaminación por bacterias u hongos (Calderón y Cortes, 1993).

### **2.13 Producción de *Beauveria bassiana*.**

Las especies de *Beauveria* se desarrollan fácilmente en medios de cultivo como PDA y Sabouraud, sin embargo se han desarrollado otros medios y técnicas de propagación. *B. bassiana* se produce comercialmente bajo el nombre de Boverin en La Unión Soviética y es ahí donde mas se ha adelantado la tecnología para la producción masiva de la especie de *Beauveria*. La producción de blastosporas en cultivos sumergidos se ha desarrollado hace unos 20 años, actualmente abandonado por la dificultad de almacenar este tipo de esporas (Ferron, 1981).

El uso extensivo de este patógeno ha sido en China en donde es producido por los mismos agricultores en unidades de producción muy sencilla en sus casas para el control de plagas del maíz y forestales (Hussey y Tinsley, 1981). Se han estudiado dos enfoques para la producción de *B. bassiana* industrial y artesanal (Bustillo *et,al.* 1998).

#### **2.13.1 Producción industrial.**

Para la producción industrial de *B. bassiana* se inicia en cultivos puros en platos de petri en medio SDA. Luego, este inóculo se utiliza para el crecimiento del hongo en frascos que tienen un medio líquido nutritivo aséptico, bajo condiciones de fermentación y agitación a 110 rpm. durante 72 horas; este cultivo produce blastosporas que sirven para inocular bandejas con un sustrato sólido químicamente definido para la producción de esporas aéreas. Después de 15 días (dependiendo de la temperatura) el hongo esta listo para ser cosechado, homogenizado, formulado y secado en forma de polvo. Esta tecnología ha sido transferida a productores particulares para que produzcan industrialmente el hongo (Morales *et,al.* 1991).

En Francia se patentó un medio líquido para la producción masiva de blastosporas. En el cual se produce aproximadamente  $10^9$  blastosporas/ ml. luego de 12 horas. Las cuales son colectadas por centrifugación y la pasta resultante se seca a bajas temperaturas por ventilación seca después de mezclarla con polvo de Silica, materiales osmóticos activos (p.e., sucrosa y glutamo de sodio), agentes antioxidantes (p.e., escorbato de sodio) y una mezcla de parafina líquida y polioxtileno glicerol oleato (Hussey y Tinsley, 1981).

Esta preparación es almacenada al vacío en nitrógeno líquido; las blastosporas en esta preparación son secadas a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a la cual pueden permanecer viables durante ocho meses (Hussey y Tinsley, 1981).

### **2.13.2 Producción artesanal.**

Antia *et,al.* (1992) estudio la metodología de producción artesanal del hongo en fincas. Dicha metodología es muy sencilla: el sustrato esta compuesto de arroz y agua, los que se introducen en botellas desechables de vidrio, taponadas con algodón absorbente y se someten a un proceso de esterilización al “baño de maría”; la producción de esporas en botellas es de  $4 \times 10^{11}$  esporas/gr. de sustrato a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y después de un periodo de 24 días. Una vez el hongo completa su desarrollo esta listo para ser utilizado.

Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustrato naturales para la producción de hongos entomopatogenos entre los cuales destacan principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya; de los cuales los más utilizados han sido el arroz y el trigo (Monzón, 2002). La producción artesanal ha tenido un rápido desarrollo por lo simplificado y barato del sistema el cual permite al productor la producción del hongo en la finca y disponer así de este insumo en el momento necesario (Posada y Bustillo, 1994).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente estudio se desarrolló en cuatro fases, dos de campo y dos de laboratorio realizadas en las instalaciones de la fundación PROCAFE, ubicada en La Ciudad de Santa Tecla; latitud 13° 40' 59.9" N. y longitud 89° 17' 14.8" W.

#### 3.1 FASE I. Recolección del material

Se visitaron y se recorrieron con personal técnico de PROCAFE diferentes fincas cafetaleras con el objetivo de recolectar muestras de insectos y frutos de café que presentaran las características de ataque por el hongo (*Beauveria bassiana*) como lo es el crecimiento de micelio algodonoso de color blanco sobre ellos y en el caso de los frutos de café con exposición de un taponamiento de color blanco sobre el orificio de entrada de la broca, donde esta se presenta muerta por la infección del hongo. Se recolectaron frutos con brocas atacadas en la finca Esmeralda, ubicada en el municipio de Antiguo Cuscatlán (Figura 5). Dicho material fue transportado a los laboratorios de PROCAFE para su aislamiento.



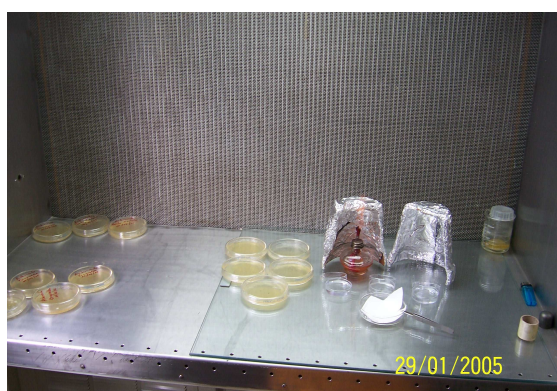
**Figura 5.** Frutos de café con exposición del hongo nativo *B. bassiana* sobre el orificio de entrada de la broca recolectados en la finca Esmeralda.



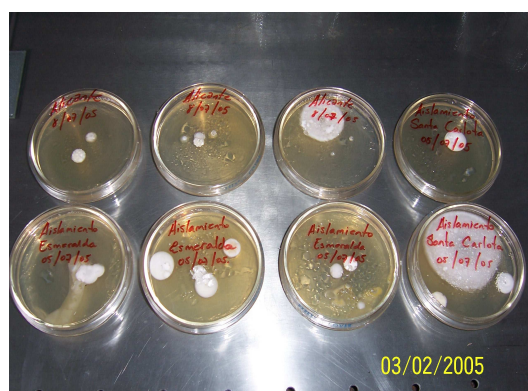
### 3.2 FASE II. Aislamiento del hongo *B. bassiana*.

Frutos de café presentado taponamiento de color blanco en el orificio de entrada de la broca se disectaron y se extrajeron las brocas momificadas (infectadas por el hongo *B. bassiana*). Una vez obtenidas se procedió a desinfectarlas para completar el proceso de aislamiento mediante la ayuda de la cámara de flujo laminar. Las brocas infectadas fueron tratadas durante un minuto en tres diferentes sustancias en orden sucesivo de la siguiente manera: un minuto en agua destilada estéril, un minuto en alcohol al 90% y un minuto en agua destilada estéril. Posteriormente el exceso de humedad se eliminó al pasarlas por papel filtro estéril.

Inmediatamente después, las brocas se recolectaron con pinzas estériles y se colocaron en cajas de Petri conteniendo el medio nutritivo PDA (Papa, Dextrosa, Agar). Las cajas se sellaron con cinta parafilm; se rotularon según el lugar de origen de las brocas para la identificación de los diferentes aislados y se colocaron en incubación en cuarto de crecimiento a temperatura de 28 a 30 °C para que el hongo se desarrollara (Ver figura 6). Seis días después se colectó un pedazo de micelio aislado directo, libre de contaminación con un aza y se colocó en una nueva caja petri con medio de cultivo PDA con el objetivo de purificar el hongo. De los aislados puros se realizaron preparaciones de laminillas para observar al microscopio las características morfológicas del micelio y esporas.



Material para el aislamiento.



Aislados de *B. bassiana* en medio PDA.

**Figura 6.** Aislamiento directo del hongo *B. bassiana* a partir del cuerpo de la broca.

### 3.2.1 Reproducción y producción de esporas de *B. bassiana* en medio sólido (Arroz precocido).

#### 3.2.1.1 Preparación del Arroz.

Se utilizó arroz precocido, el cual se lavó con agua destilada, se escurrió y se dejó secar por diez minutos en bandeja plástica. Posteriormente se colocaron 40 gr. y 20 ml. de agua destilada dentro de una botella desechable de vidrio con capacidad para 250 ml y se tapo con algodón a presión. Una vez preparado el sustrato dentro de las botellas, estas se sometieron a un proceso de esterilización al autoclave a una temperatura de 120 °C y 15 libras de presión por un periodo de 20 minutos (Figura 7).



**Figura 7.** Preparación y esterilización del arroz para la producción *B. bassiana*.

#### 3.2.1.2 Inoculación de *B. bassiana* en botellas.

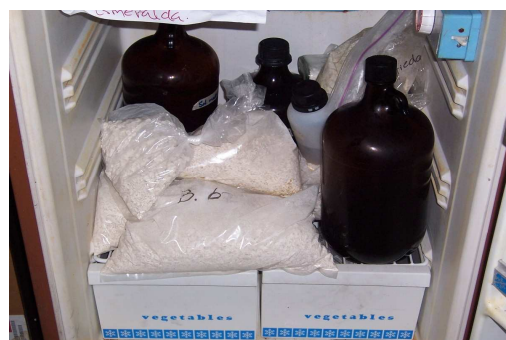
La inoculación se realizó a partir de una caja Petri conteniendo el hongo completamente desarrollado y puro. Se tomó una pequeña porción con asa estéril y se inoculó en cada una de las botellas. Para realizar dicha actividad se trabajó en cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70%. Una vez realizada la inoculación las botellas se colocaron en cuarto bajo condiciones de temperatura ambiente para el desarrollo del hongo (Figura 8).



**Figura 8.** Inoculación del sustrato con el micelio del hongo.

### 3.2.1.3 Obtención de esporas.

Doce días después de la inoculación, los granos de arroz conteniendo las esporas del hongo fueron cosechadas extrayendo; de cada una de las botellas con ayuda de pinza y se depositaron en bandejas plásticas. Luego se secaron por medio de ventilación y bajo sombra a temperatura ambiente sobre zarandas. Una vez secado fue empaquetado en bolsas plásticas y almacenadas en refrigeración a una temperatura de 4 a 8 °C (figura 9).



**Figura 9.** Cosechado, secado, y almacenado del sustrato conteniendo esporas del hongo.

### 3.2.1.4 Recuento de conidias.

Para la realización del conteo de conidias se preparo una suspensión de esporas en agua. Pesándose un gramo de arroz conteniendo esporas del hongo *B. bassiana* y se coloco en un Erlenmeyer conteniendo un litro de agua al cual se le aplico una gota de Tween 80; para facilitar la suspensión de las esporas por agitación.

Posteriormente se tomó una muestra de la suspensión con una pipeta, deposito una pequeña gota en cada uno de los depósitos de la cámara Neubauer, cuyo esquema se puede ver en la (figura 10). Para determinar la concentración de las conidias de la suspensión. Se realizó el recuento en los cinco cuadros de la cámara Neubauer, en el siguiente orden: primero los extremos izquierdo y derecho de la parte superior, el cuadro central y luego los extremos inferiores izquierdo y derecho. Por medio de dicha técnica se obtuvo las concentraciones de las dosis en estudio.

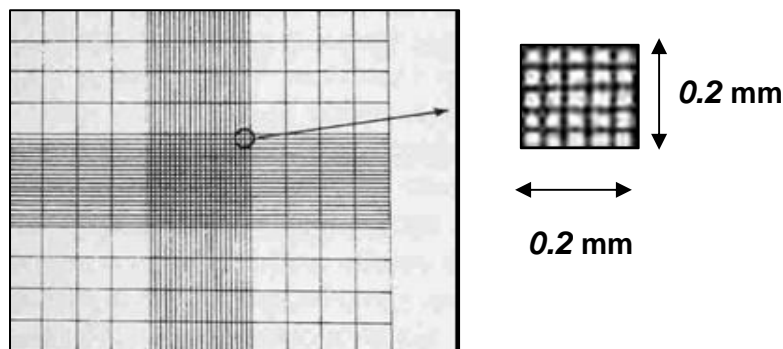
La concentración de esporas de la suspensión se calculo de la siguiente forma:

$$NC = (SC/5) * 50,000.$$

Donde:

**NC** = numero de esporas por mililitro de la suspensión.

**SC** = Sumatoria de las conidias contenidas en los cinco cuadros de la cámara Neubauer.



**Figura 10.** Vista microscópica del esquema de la cámara Neubauer.

### 3.3 FASE III. Bioensayo de patogenicidad de laboratorio.

Para evaluar la patogenicidad del aislado del hongo *B. bassiana* sobre poblaciones de broca, se instaló un bioensayo bajo condiciones controladas de laboratorio (temperatura y humedad relativa ambiente) mediante un diseño estadístico completamente al azar con cinco tratamientos y 23 repeticiones para cada uno.

**Cuadro 1.** Dosis aplicadas por litro de agua en el bioensayo de laboratorio para Determinar la patogenicidad de *B. bassiana* sobre la broca.

<b>Tratamientos</b>	<b>Dosis del hongo</b>	<b>Concentración de esporas/ml.</b>
<b>T1</b>	Testigo	0 ml.
<b>T2</b>	1 gr. de <i>B. bassiana</i> /lt de agua.	$3.69 \times 10^7$ ml.
<b>T3</b>	5 gr. de <i>B. bassiana</i> /lt de agua	$1.84 \times 10^8$ ml.
<b>T4</b>	10 gr. de <i>B. bassiana</i> /lt de agua	$3.69 \times 10^8$ ml.
<b>T5</b>	15 gr. de <i>B. bassiana</i> /lt de agua	$5.53 \times 10^8$ ml.

Los adultos de las brocas utilizadas en el experimento se obtuvieron del laboratorio de cría de parasitoides de PROCAFE; criados en café pergamino, tomando 150 brocas del mismo tamaño y edad para asegurar la homogeneidad del material. Las brocas se desinfectaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron en caja con papel toalla para eliminar el exceso de agua y el secado de los insectos.

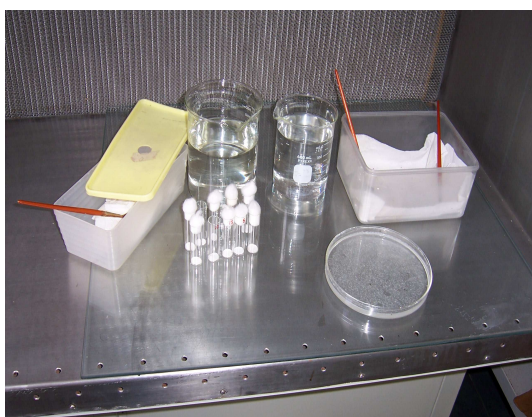
Para la instalación del bioensayo, se tomaron 23 brocas previamente desinfectadas (repeticiones cada una como unidad experimental); se sumergieron en beakers conteniendo suspensión de conidias de acuerdo al tratamiento durante un minuto. Posteriormente una broca individual fue colocada con la ayuda de un pincel dentro de un tubo de vidrio esterilizado de 2 cm. de diámetro por 4 cm. de altura dentro del cual se depositó un disco de papel filtro humedecido para mantener la humedad relativa adecuada para la infección del hongo.



Además se colocó un grano de café pergamino como sustrato alimenticio e inmediatamente fue taponado con algodón absorbente para evitar la salida de la broca (Figura 11).

Esta metodología ha sido propuesta por Méndez, (1990) quien sostiene que individualizando las brocas permite establecer el efecto directo del hongo sobre cada broca, evitando el contagio que pueda ocurrir cuando se evalúan poblaciones en la que una broca infectada puede enfermar a otra población.

Para mantener la humedad se colocó diariamente 0.2 ml. de agua destilada con una jeringa estéril en cada tubo, con el objetivo de brindar las condiciones adecuadas de humedad ( $> 90$  RH) para el desarrollo e infección del hongo sobre el insecto. Los parámetros evaluados fueron: a) mortalidad de las brocas diariamente, durante 10 días, b) sintomatología y c) Desarrollo del micelio sobre las brocas. Para ello se utilizó un microscopio estereoscópico facilitando con este la observación detallada y disección de los granos sin causar daño a las brocas que penetraron el fruto, los datos fueron analizados por análisis de varianza.



Materiales y tratamientos.



Inoculación y confinamiento de las brocas

**Figura 11.** Instalación del bioensayo de patogenicidad a nivel de laboratorio.

### **3.4 FASE IV. Ensayo de patogenicidad a nivel de campo.**

Después de conocer los efectos de *B. bassiana* en condiciones de laboratorio, se considero necesario determinar su patogenicidad a nivel de campo para lo cual se llevo acabo un estudio en la finca Esmeralda ubicada en el cantón Lomas de La Caldera del municipio de Antigua Cuscatlán (13<sup>a</sup> 40' 00" LN y 89<sup>a</sup> 14' 30" LO), San Salvador. En la cual la variable a estudiar fue la mortalidad de la broca *H. hampei* por la infección del hongo.

Previo a la aplicación se seleccionaron cuatro parcelas como unidades experimentales para cada uno de los tratamientos dentro de las cuales se eligieron 10 cafetos al azar cada uno como parcela efectiva, haciendo un total de 40 árboles; los cuales fueron marcados por tratamiento y repetición. A los árboles elegidos dentro de cada tratamiento se les contó y se elimino los frutos que presentaran brocas muertas por la infección de *B. bassiana* de forma natural, partiendo de cero en cada repetición; con el objetivo de observar el incremento de brocas muertas en los frutos por la infección del hongo de forma inducida luego de la aplicación. El hongo utilizado para el estudio fue un aislado de la misma finca y producido en sustrato arroz en los laboratorios de PROCAFE.

Las dosis aplicadas y concentración de esporas aplicadas en el estudio se describen en el (cuadro 2) las cuales se aplicaron con bomba de mochila un volumen 200 cc. del biopreparado *B. bassiana* directamente a ramas y frutos de cada árbol. Al cabo de 17 días después de la aplicación se efectuó el conteo de frutos los cuales presentaron el taponamiento de color blanco en el orificio de entrada donde las brocas se encontraron muertas por la infección de *B. bassiana* en cada uno de los árboles tratados en dicho estudio. Los datos fueron analizados por análisis de varianza y la prueba de diferencia mínima significativa (DMS).

La metodología empleada fue la descrita por (Bustillo, 1996) quien aplicó a un lote de 35 árboles escogidos al azar dentro de una parcela altas concentraciones de *B. bassiana* en dosis de  $2.37 \times 10^{10}$  conidias por mililitro. 20 días realizó observaciones evaluando, como unidad de muestreo las ramas productivas en las cuales se contaron los frutos con infección del hongo lo cual da una información real para el estudio de epizootiología.

**Cuadro 2.** Dosis aplicadas por bombada en el estudio de campo para determinar la patogenicidad de *B. bassiana* sobre la broca de café.

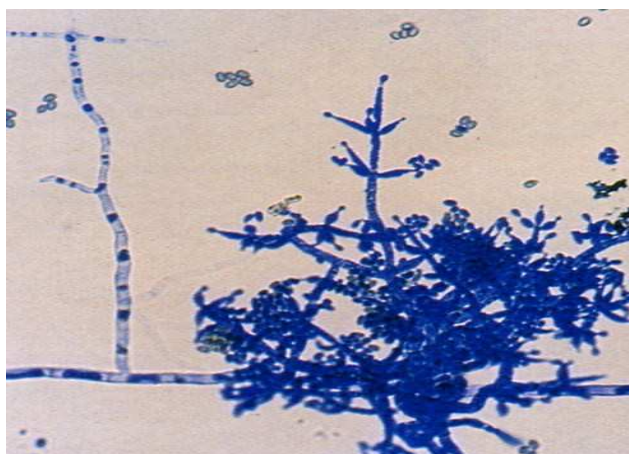
<b>Trata.</b>	<b>Dosis del hongo</b>	<b>Concentración de esporas</b>
<b>T1</b>	Testigo. Cero aplicación de <i>B. bassiana</i> .	0 ml
<b>T2</b>	1gr. de <i>B. bassiana</i> /lt de agua. 20gr./bombada	$3.69 \times 10^7$ ml.
<b>T3</b>	5 gr. de <i>B. bassiana</i> /lt de agua. 100 gr./bombada	$1.84 \times 10^8$ ml.
<b>T4</b>	10 gr. de <i>B. bassiana</i> /lt de agua. 200 gr./bombada	$3.69 \times 10^8$ ml.



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### 4.1 Aislamiento del hongo nativo *B. bassiana*.

Se logro aislamiento directo del hongo a partir de brocas infectadas recolectadas del campo. El micelio se desarrollo en periodo de cuatro a cinco días en el medio PDA a temperatura ambiente; presentó color blanco y crecimiento algodonoso (Figura 13). Al observarlo al microscopio presento las características descritas por Barnet y Hunter (1972), como lo son micelio blanco, conidioforo sencillo, el cual presenta forma de zig-zag al igual que las fílides de forma globosa en forma de botella, como se muestran en la (figura 12).



**Figura 12.** Estructura microscópica del hongo entomopatogeno *B. bassiana*.



**Figura 13.** Micelio del hongo *B. bassiana* purificado en PDA.

Este resultado comprueba lo que menciona Monzón (2001), con respecto a que el hongo *B. bassiana* se puede obtener de manera directa a partir del cuerpo del insecto y que para dicha actividad; debe de realizarse la desinfección con alcohol 90% o hipoclorito de sodio al 5%. Es una practica necesaria que se debe llevar acabo previo al aislamiento directo, ya que nos permite eliminar otro tipo de microorganismos ajenos a *B. bassiana* sin causar la muerte de este ultimo el cual una vez en el medio nutritivo (PDA); desarrolla su micelio de manera optima y pura.

#### **4.2 Producción de esporas.**

Bajo las condiciones donde se realizó el trabajo, se demostró que los aislados de *B. bassiana* obtenidos directamente de brocas recolectadas en fincas cafetaleras; se reproducen perfectamente en sustrato arroz precocido en un periodo de 10 días el cual produjo una concentración de esporas de  $3.69 \times 10^{11}$  por gramo de arroz cosechado. Este resultado es concordante con la experiencia de Colombia donde la producción en botellas es de  $4 \times 10^{11}$  esporas/gramo de sustrato a 25 °C. Después de un periodo de 15 días (Bustillo, 1995). Pero la reproducción en botellas cuenta con la limitante que se producen bajas cantidades, ya que únicamente se pueden producir 40g por unidad. Habría la necesidad de utilizar otro tipo de contenedor como bolsas de polipropileno en las cuales se puede producir 400 gr. por unidad o desarrollar otro método para la producción de mayores cantidades.

El estudio demuestra que la técnica es de fácil adopción e implementación por medio de la cual se puede producir gran cantidad de esporas de diferentes aislados de *B. bassiana* una vez que estos hallan sido aislados y purificados. El hongo *B. bassiana* cosechado y secado; se puede mantener viable hasta por un periodo de 5 meses al ser almacenado en refrigeración a temperaturas de 4 a 8 °C. o ser utilizado inmediatamente asperjándolo para el control de la broca en las fincas cafetaleras.

### 4.3 Bioensayo de patogenicidad de laboratorio.

La sobre vivencia de las brocas después de la desinfección fue del 100 %. La práctica de desinfección con hipoclorito de sodio al 5% durante dos minutos no ocasiono mortalidad en las brocas; ni inhibió el proceso de germinación de las conidias en los tratamientos. Lo anterior concuerda con lo mencionado por Jiménez, (1992) quien obtuvo una sobre vivencia del 80% en el testigo al efectuar la desinfección superficial de las brocas.

En el transcurso del segundo día luego de la inoculación fueron visibles los primeros síntomas de la actividad fúngica en las brocas tratadas con el hongo, entre los que se observaron menor actividad en el movimiento siendo lentos y torpes. La actividad de brocado de los granos de café pergamino fue afectado, las brocas tratadas con el hongo perforaron el 13% de los granos, mientras que las no tratadas el 65.2%. Indicando que las brocas infectadas por *B. bassiana* poseen una capacidad menor de causar daño y de penetrar los frutos, éstos resultados coinciden con los obtenidos por González, Posada y Bustillo (1993) de quienes fue tomada la metodología usada; ellos obtuvieron mortalidades al tercer y quinto día observando menor movilidad en las brocas tratadas y menor capacidad del brocado de los granos de café pergamino.

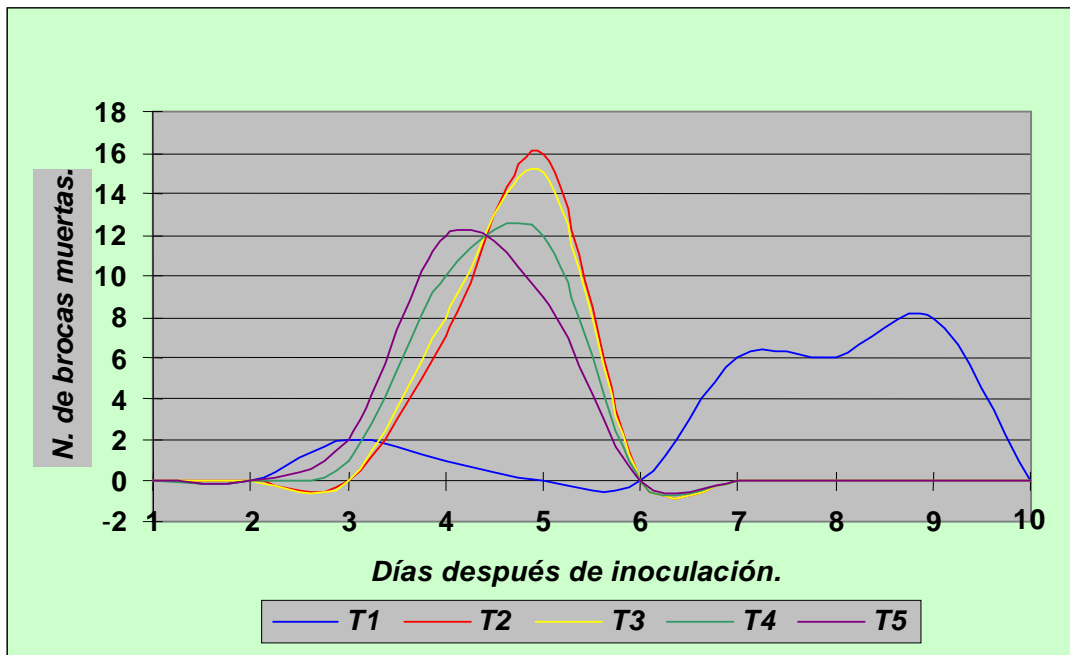
El análisis de varianza de los datos de mortalidad demuestra que para un nivel de confianza del 0.05% no existe diferencia estadísticamente significativa; entre los tratamientos en estudio sobre las brocas inoculadas con las diferentes concentraciones del hongo. En contraste comparando los tratamientos con el testigo los cuales son altamente significativos. Debido a que el análisis de varianza "F cal" fue no significativo no se hizo necesario realizar la prueba de (DMS), ya que esta se realiza solo cuando "F cal" es estadísticamente significativa y así poder comparar diferencias entre las medias de los tratamientos.

El 100% de la mortalidad de las brocas por infección del hongo se presento al cuarto y quinto día. En el cuarto día fue 30.43% para el T2, 34.78% para T3, 43.47% para T4 y un 52.17% para T5. En el quinto día se registraron porcentajes del 69.56% T2, 65.21% para el T3, 52.17% T4 y 39.13% para T5 respectivamente (Cuadro 3, Grafico1).

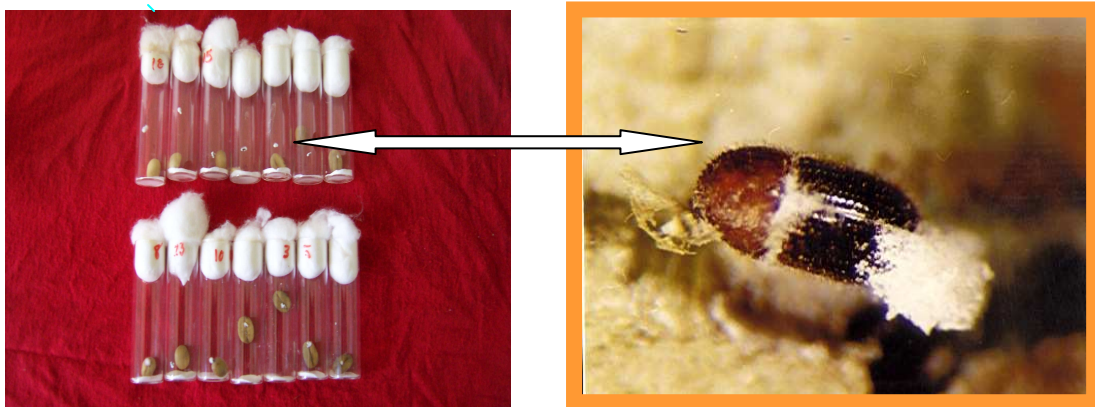
En el tratamiento testigo no se presento mortalidad por la infección del hongo ni por agentes contaminantes, sino que esa mortalidad se atribuyo a otras causas como perdida de patas y antenas. El micelio del hongo se desarrollo por completo sobre el cuerpo de las brocas tratadas en un periodo de 7 días, pudiendo observarse la aparición de este primeramente en las partes ínter segmentales y luego sobre todo el cuerpo (Ver figura 14). A los diez días el micelio tomo un aspecto algodinoso y color blanco.

**Cuadro 3.** Cuadro resumen de mortalidad diaria de bioensayo de Patogenicidad a nivel de laboratorio.

<i>tratamiento</i>	<i>Numero de brocas muertas diariamente.</i>									
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>T1 testigo</b>	0	0	2	1	0	0	6	6	8	0
<b>T2 1 gr/ B. bassiana</b>	0	0	0	7	16	0	0	0	0	0
<b>T3 5 gr/B. bassiana</b>	0	0	0	8	15	0	0	0	0	0
<b>T4 10 gr/B. bassiana</b>	0	0	1	10	12	0	0	0	0	0
<b>T5 15 gr/B. bassiana</b>	0	0	2	12	9	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>38</b>	<b>52</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>0</b>



**Grafico 1.** Distribución de Mortalidad diaria de broca tratadas con *B. bassiana* en el bioensayo de laboratorio.



**Figura 14.** Crecimiento del micelio de *B. bassiana* sobre brocas tratadas.

#### 4.4 Estudio de patogenicidad a nivel de campo.

El análisis de varianza realizado a los datos obtenidos luego de la aplicación del hongo *B. bassiana* para el control de la broca en campo, demuestran que existe una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos para un nivel de significancia del 0.05%.

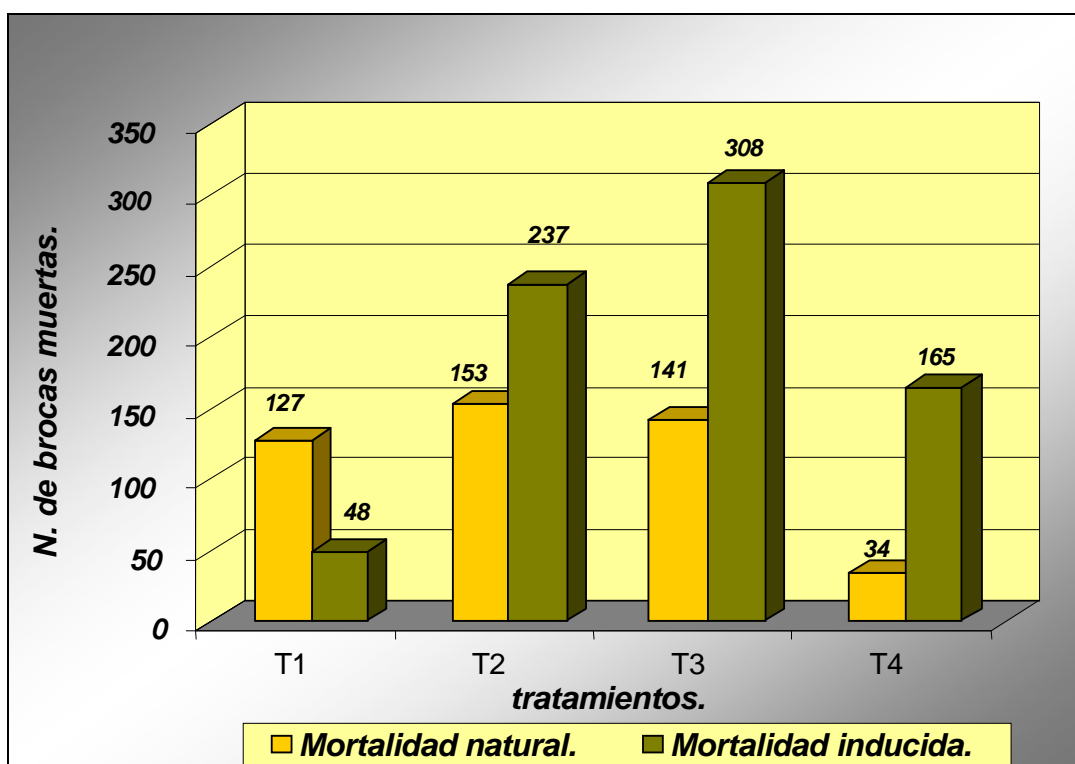
Por lo cual se realizó La Prueba de Medias (DMS); cuyos resultados demostraron una diferencia entre los tratamientos; T2 1 gr./ *B. bassiana*, T3 5 gr./*B. bassiana* T4 10 gr./*B. Bassiana*; con respecto al tratamiento T1 testigo es significativo con cero aplicación del hongo *B. bassiana*. Entre los tratamientos se demuestra que existe una diferencia siendo esta no significativa estadísticamente lo que demuestra la prueba DMS.

El efecto de *B. bassiana* en campo fue evidente, ya que causó la muerte de las brocas que se encontraban en proceso de penetración al fruto como lo demuestran los datos registrados 17 días después de la aplicación en donde; la mortalidad acumulada en los 30 árboles tratados en las parcelas experimentales fueron las siguientes: T2= 237, T3= 308 y T4= 165 brocas muertas; lo cual sobrepasa valores de 100% con respecto al conteo inicial es decir que se indujo de 0 a 710 brocas muertas en los en 30 árboles tratados con *B. bassiana*.

El testigo mostró niveles de mortalidad bajos T1= 48 brocas muertas lo cual puede deberse a la presencia de focos localizados del hongo naturalmente en la parcela experimental, a la diseminación de esporas por vectores o factores climáticos (viento) luego de la aplicación de los tratamientos (ver gráfico 2). Lo anterior indica que si *B. bassiana* es aplicado de forma artificial se puede inducir epizootias de forma generalizada como lo observado en los árboles tratados.

Lo anterior concuerda con lo registrado por (Vélez y Montoya, 1998) quienes obtuvieron similares resultados mediante preparaciones y aplicación de *B. bassiana* en concentraciones  $3 \times 10^{10}$  esporas/ml. aplicadas directamente a los árboles y frutos en campos experimentales y comerciales, mostraron el éxito en el control de *H. hampei*, ya que en sus estudios encontraron una alta proporción de brocas muertas (>85%) infectadas por el hongo. A si mismo evaluaciones realizadas en parcelas de manejo integrado mostraron que en promedio la reducción de la población de la broca fue de 50%.

La acción del hongo es influenciada por condiciones ambientales adversas lo cual puede reducir su eficacia en campo. Sin embargo en el periodo que se realizó el estudio; nos indica que estas fueron las óptimas en cuanto a temperatura, alta humedad, nubosidad, parcelas con el suficiente sombrero y en el periodo en el cual la broca se encontraba en el proceso de penetración al fruto con su parte posterior afuera o volando hacia este; lo que permitió que las esporas entraran en contacto con el cuerpo del insecto y por ende ocasiono la muerte por la infección fúngica. Lo cual ocurre en el mes de Agosto de todos los años.



**Grafico 2.** Mortalidad acumulada de brocas registrada de forma natural por la infección de *B. bassiana* e inducida después de la aplicación en el estudio de campo.

## 5. CONCLUSIONES.

- ▶ El hongo entomopatógeno *B. bassiana* se encuentra presente como un agente de control biológico natural de la broca en la zona cafetalera de El Salvador; debido a que estos Agroecosistemas brindan protección contra la radiación solar y la humedad relativa alcanza niveles óptimos durante el día para que se desarrolle la infección sobre las brocas.
  
- ▶ El estudio del aislamiento de hongo nativo *B. bassiana* en (PDA), ha sido fructífero ya que se logró aislarlo de forma pura; a partir del cual se desarrolló simultáneamente un método para la producción en medio de cultivo arroz lo que permitió adelantar la evaluación de su eficacia en laboratorio y campo.
  
- ▶ La técnica de producción en medio de cultivo sólido arroz precocido; es una forma sencilla y rápida de obtener esporas del hongo a los 20 días, las cuales a una temperatura de 4 °C. se pueden mantener viables hasta por un periodo de 5 meses.
  
- ▶ La metodología utilizada en el bioensayo de patogenicidad de laboratorio nos permite asegurar la evaluación de otro tipo de aislamientos y seleccionar así los más patogénicos para su producción, formulación y posterior evaluación en el campo.
  
- ▶ La patogenicidad de laboratorio y de campo nos indican que el hongo nativo es patogénico contra la broca; por lo tanto se puede utilizar como estrategia dentro del manejo integrado de la broca (MIB), bajo condiciones óptimas de humedad temperatura y cuando la broca se encuentre en el proceso de penetración al fruto o volando hacia estos.



## 6. RECOMENDACIONES.

- ▶ Dado que *B. bassiana* se encuentra en forma natural en El Salvador, se recomienda realizar más aislamientos de diferentes fincas y someterlos a pruebas de patogenicidad comparándolos con otros Aislados mediante ensayos de laboratorio y campo, determinando así aquellos que sean más patogénicos y virulentos para producción y formulación.
  
- ▶ Realizar un estudio económico de la producción de esporas en medio sólido arroz para optimizar la relación beneficio costo del producto.
  
- ▶ Emplear en la producción otro tipo de contenedor, como bolsas de polipropileno para aumentar la producción ya que en estas se puede producir 400 gr. de arroz con *B. bassiana* por unidad; ya que lo producido en botellas se limita únicamente a 40gr. /unidad y la tarea de cosecharlo es difícil por lo reducido de la boquilla.
  
- ▶ Incluir el hongo *B. bassiana* dentro del manejo integrado de la broca del fruto del cafeto asociado a otras practicas de control cultural y biológicos en las fincas cafetaleras de El salvador.
  
- ▶ De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda continuar las investigaciones; con el objetivo de ver cómo se comporta *B. bassiana* bajo condiciones adversas, fuentes de variación en cuanto a patogenicidad y producción de esporas e incluir en el estudio cepas monosporicas para garantizar la uniformidad genética, con el fin de proporcionar a los caficultores aislados altamente patogénicos y que sean aplicados e introducidos en aquellas áreas con poca presencia del hongo de forma natural.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Antia O.P.; Posada C.J.; Bustillo A.E.; González M.T. 1992. Producción en fincas del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avances técnicos Cenicafe. 51(182): 9-12.
- 2) Alves S.B. 1986. Fungos entomopatogenos.In. Ales S.B. editorial. Control microbiano de insectos, SAE Paulo editorial manole. P. 73-126.
- 3) Borbón Martínez, O.1991. La broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867). ICAFE-MAG, San José Costa Rica, Camaleón editoriales. 1edición. p. 3-43.
- 4) Barrientos E.E.; Dalton de Días V.; Palma U.N.; Mancía P.S.; Rizo E.G.; Montoya J.B. 1995. Manejo integrado de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) en El Salvador. Boletín técnico N° 1. 2° edición. P. 8.
- 5) Bustillo, A. 1989. Utilización de agentes Microbiológicos. In. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: estado actual y futuro, edit. Por. Keith Andrews y José Rutilio Quezada, Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras, Centro América. 623pp.
- 6) Bustillo Pardey A.E. 1991. Hacia un manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari, en Colombia. Cenicafe, Chichinas Colombia. P.268-277.
- 7) Barrera J.F. 2005. Situación actual y perspectiva de investigación y manejo de la broca del café en Costa Rica, Cuba, Guatemala y México. Tapachula México, editora la sultana. P. 31-25.
- 8) Barrera J.F.; Guanay F.; Jiménez L.; Jarquin R.; Figueroa M., Montes R. 2002. Manejo integrado de la broca del café bajo dos modelos de transferencia tecnológica. Tapachula México. P. 21-42.
- 9) Bustillo Pardey A.E. 2002. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia, Chichinas Caldas. Boletín técnico N°24. P. 24.
- 10) Bernal U.M.G.; Benavides M.P.; Arcila M.A.; Bustillo P.A.E. 1997. Regulaciones de la broca del café mediante la aplicación al suelo de *Beauveria bassiana* durante la cosecha principal. In. Congreso de la sociedad Colombiana de entomología. Paraná (Colombia) Julio 16-18, 1997. Maya M.L.A.; Delgado R.N.C.1998. Información científica y técnica producida por Cenicafe, resúmenes analíticos. Chichinas Caldas Colombia. N°3. P. 345 .

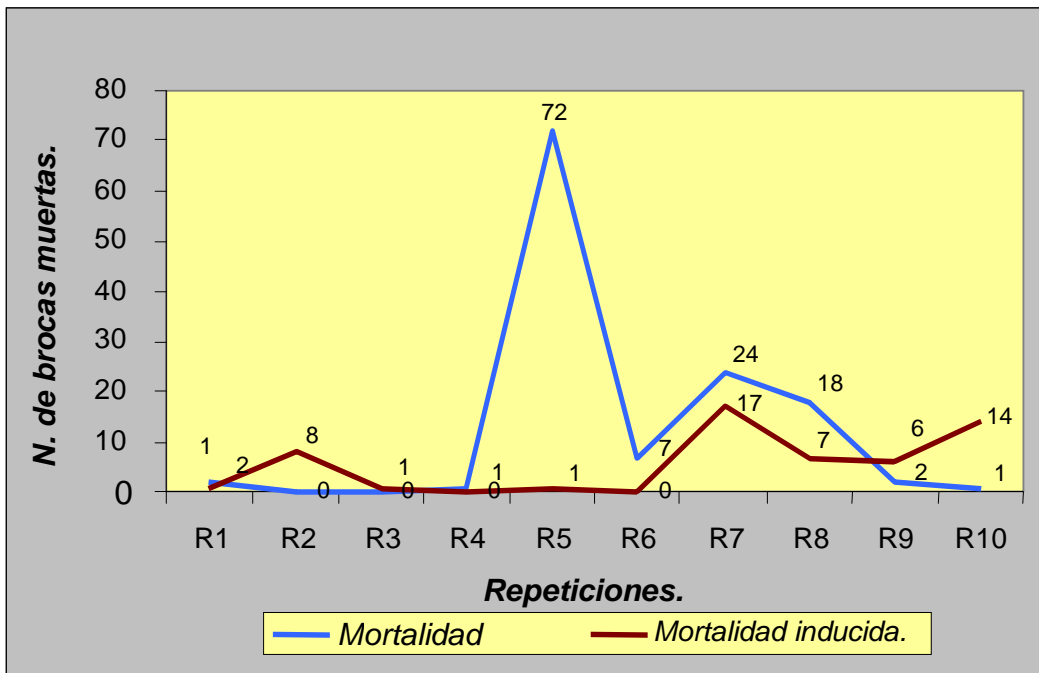
- 11) Bautista F.; González O.; Hernández A.; Rivera A.; Ramírez R. 2001. Combate integrado de plagas, enfermedades, nematodos y malezas del cafeto. PROCAFE, San Salvador, El Salvador. p. 30-33.
- 12) Burgos C.W.L.; Villanueva M.A.E. 1998. Pruebas de insecticidas para el control de la broca del grano del café *H. Hampei*. Ferr. 1867. En Sosonusco. Instituto Mexicano del café. Xalapa Veracruz México. p. 186.
- 13) Bustillo P.A.E.; Benavides M.P.; Cárdenas M.R.; Orozco H.J.; Posada F.F.; Villalba G.D. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Cenicafe Chichinas Caldas Colombia, editorial feriva s.a. p. 109- 122.
- 14) Bustillo P.A.E. 1995. El uso del hongo *Beauveria bassiana* como un componente en el programa del manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei*. In. Congreso encolen 22, Santa Fe de Bogotá julio 26-28. 1995. P. 79-85.
- 15) Barnett H.L., Hunter B.B. 1972. Illustrated genero of imperfect fungi. 3° edition Mineapolis, Burges public. Co. P.241.
- 16) Berlaga Padilla ABM.; Hernández Velásquez V.M. 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y virulencia de *Metarhizium anisopliae* Var. *Acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca peceifrons*. Manejo integrado de las plagas en Costa Rica. 7(63):51-55.
- 17) Barrios Aguirre M., Centeno F. 1989. Eficiencia de *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferr. En cuatro regiones de Nicaragua. CNIC- CONCAFE, XIV simposio de caficultura latinoamericana. P. 20-21.
- 18) Canjura M.; Hernández A.; Rodríguez M.; Pléitez C., Zarco E.; Salazar m.; Ramos O.; Quijano J. 2003. Manual del caficultor. PROCAFE, Nueva San salvador, El Salvador. P. 49-62.
- 19) Carrillo A.E.; Campos A.O.G. 1990. Control biológico clásico de la broca del fruto del cafeto. Anacafe, Guatemala. In. XIV simposio de caficultura latinoamericana. p.256- 259.
- 20) Calderón V.E.; Cortés S.L.F. 1993. Como aislar el hongo *Beauveria bassiana* directamente de la broca. Brocarta Cenicafe (Colombia). 40(8): 30-45.
- 21) Dufour B. 1998. Manejo integrado de la broca del café. IICA – Promecafe – PROCAFE. In. XVII simposio sobre caficultura Latinoamericana, San Salvador El salvador 1995. P. 28.

- 22) Dufour B. 2004. Condiciones de uso de trampas en el control de la broca del café. In. In. Androciolli F.A.; Correira Fogo N.B.; Bianco R.; Mosqueira V.A.; Meguin A.M. 2004. Workshop internacional sobre le manejo Da- broca -do- café. Londrina Paraná Brasil. P. 7.
- 23) Dufour B.P.; González M.O. 2000. Diseño, desarrollo y evaluación del trapeo en el manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari en El Salvador. In. XIX Simposio de caficultura latinoamericana ICAFE-PROMECAFE, San José Costa Rica. P. 11-15.
- 24) Decazy B. 1988. Control de la broca del fruto del café *H. Hampei*. In. Promecafe, San José Costa Rica *IICA*. P.53-72.
- 25) Estrada V.M.N.; Vélez A.P.E.; López N.J.C.1997. Estandarización de una metodología para obtener cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. Cenicafe (Colombia). 4881): 59-65.
- 26) Ferrón P. 1981. Biological control of insect's pest by entomogenous fungus. Annual review of entomology. 23(31): 409- 402.
- 27) González G.M.T.; Posada F.F.J.; Bustillo P.A.E. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafe (Colombia). 44(3): 93-102.
- 28) Gutiérrez M. 1993. Uso de controles culturales para el manejo de la broca del fruto del café realidad y perspectiva. In. Seminario taller regional sobre el control biológico de la broca del fruto del café. San Pedro Sula Honduras 25- 29 de abril 1994. *IICA* – Promecafe. P. 25.
- 29) Hernández A. 2004. Programa de manejo integrado de la broca del fruto del café (*H. Hampei*) en El Salvador, actividad permanente para la sostenibilidad de la calidad del café. In. Androciolli F.A.; Correira Fogo N.B.; Bianco R.; Mosqueira V.A.; Meguin A.M. 2004. Workshop internacional sobre le manejo Da- broca -do- café. Londrina Paraná Brasil. P. 26.
- 30) Hussay N.W., Tinsley B. 1981. Impressions of insect's pathology in the people's republic of China. In. Microbial control of pest and plants diseases 1980. p. 785- 795.
- 31) Hernandez M.R.I.; Paz Paz H.H. 2000. Informes de cursos recibidos y temas entomológicos escritos, Santa Bárbara Honduras *IICA* – Promecafe – Incafe. P.6-46.

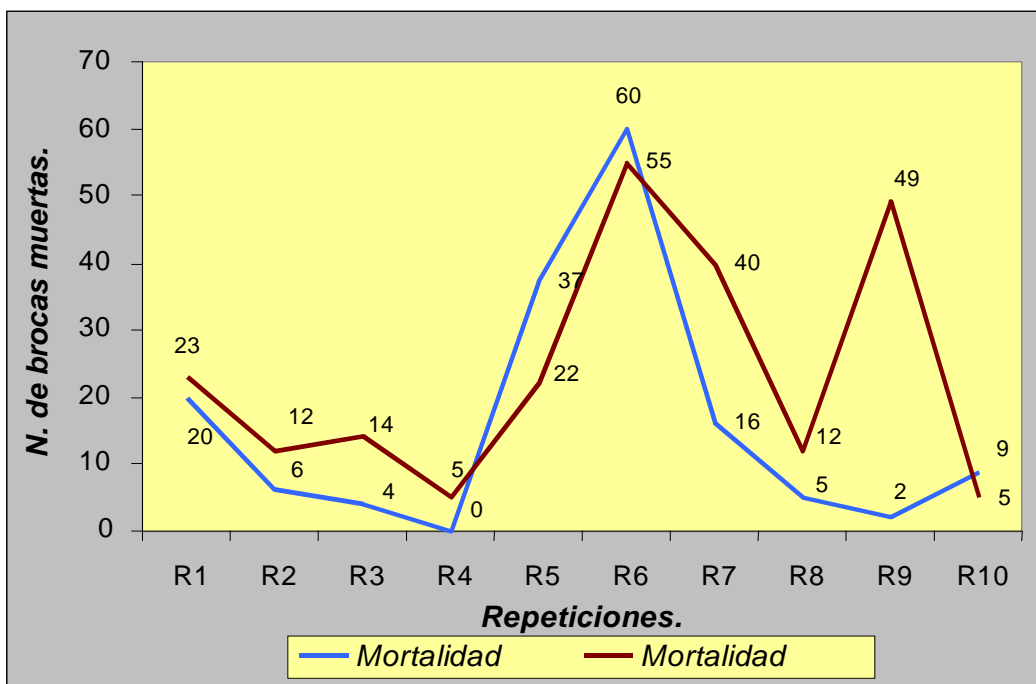
- 32) Jiménez, J.A. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. *Cenicafe (Colombia)* 43(3):84-98.1992.
- 33) Koch Klein C.; Espinosa O.; Tandazo A.; Peisneros D. 1988. Factores naturales de regulación y control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Sanidad vegetal*. 25(3):20-30.
- 34) Kuoassi Matías. 2001. La posibilidad del control microbiológico basándose en el hongo entomopatogeno (en línea) Québec Montreal. Consultado el 10 de octubre 2005. Disponible en [http://www.vertigo.ugam.ca/Vol. 2 Nº 2/ art. 3 vol. 2 n2/ mathias\\_de\\_kouassio.htm/](http://www.vertigo.ugam.ca/Vol.2/Nº2/art.3vol.2n2/mathias_de_kouassio.htm/).
- 35) Lecuona R.; Parierok B.; Riba g. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Editorial castelar, Buenos Aires Argentina. P. 35-56.
- 36) López N.J.C.; Rivera M.A.; Bustillo P.A.E.; Chávez C.V. 1995. Persistencia de *Beauveria bassiana* (bals) vuill. En el suelo con el transcurso del tiempo. *Revista Colombiana de entomología*. 21(4): 173-176.
- 37) Lacayo L.; Barrios M.; Jiménez C.; Sadaino V. 1994. Uso de los hongos entomopatogenos para el manejo de la broca. In. Resúmenes del V congreso internacional del manejo integrado de plagas. Costa Rica.1994.p.59.
- 38) Monzón A. 2002. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatogenos en Nicaragua. *Manejo integrado de plagas*. 51 (63): 95-103.
- 39) Morales E.; Cruz F., Ocampo A; Rivera G.; Morales B. 1991. Aplicación de la biotecnología para el control de la broca del café. In. Colloque Scientifique internacional sur café. San Francisco 14 – 19 de julio1991. P. 521- 526.
- 40) Méndez L. I. Control microbiano de la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Coleóptero: Scolitidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromicetes) en el Soconusco, Chiapas (México) Colegio de Postgraduados. 1990. p.135. Tesis de maestría.
- 41) Narváez G.M; González M.T.; Bustillo P.A.E.; Chávez C.B.; Montoya R.E.C.1996. Producción de esporas de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarrizium anisopliae* cultivados en arroz sobre la broca del café. In. Congreso de la sociedad Colombiana de entomología, 23 Cartagena julio 17-19, 1996. In. Maya M.A.L.; Delgado R.N.C. 1998. Información científica técnica producida por Cenicafe. P. 379.

- 42) Orozco H.J. 1994. La broca del café y sus posibilidades de controlarla biológicamente. In. Congreso de la sociedad Colombiana de entomología, Medellín Colombia, julio 27-29 1994. P. 55.
- 43) Posada F.F.; Bustillo P.A.E. 1994. El hongo *Beauveria bassiana* y su impacto en la caficultura Colombiana. Agricultura tropical. 31(3): 97-106.
- 44) Parada Jaco M.E. 1999. Potencialidad de los hongos entomopatogenos para el manejo de la gallina ciega *Phillophaga vetula*. Hurn (Coleóptero: melolontidae) en el cultivo del maíz. Montecillo Texcoco, México. Tesis. Msc. En ciencias Instituto de enseñanzas e investigación en ciencias.
- 45) Posada F.F.J: 1996. El hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. In. Curso de actualización sobre el manejo integrado de la broca del cafeto, Medellín (Colombia) octubre 23-25, 1996. Comité departamental de cafetaleros de Antioquia SIADA – Cenicafe. P. 25-26.
- 46) Vélez A.P.E.; Montoya R.E.C. 1993. Supervivencia del hongo *Beauveria bassiana* bajo radiación solar en condiciones de laboratorio y de campo. Cenicafe (Colombia). 44(3): 111-122.
- 47) Valdés B.E.; Vélez A.P.E.; Montoya R.E.C. 1999. Caracterización enzimática y patogenicidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Cenicafe (Colombia). 50(2): 106-118.

# 8. ANEXOS

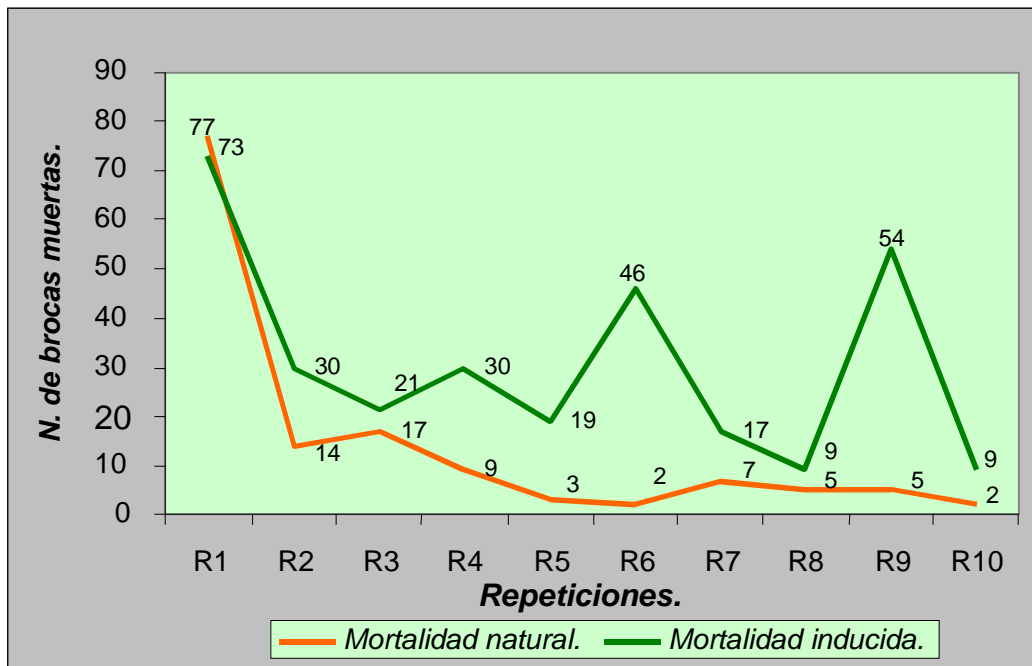


**8.1 Grafico1.** Numero de brocas muertas registradas por la infección de *B. bassiana* de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento testigo T1.

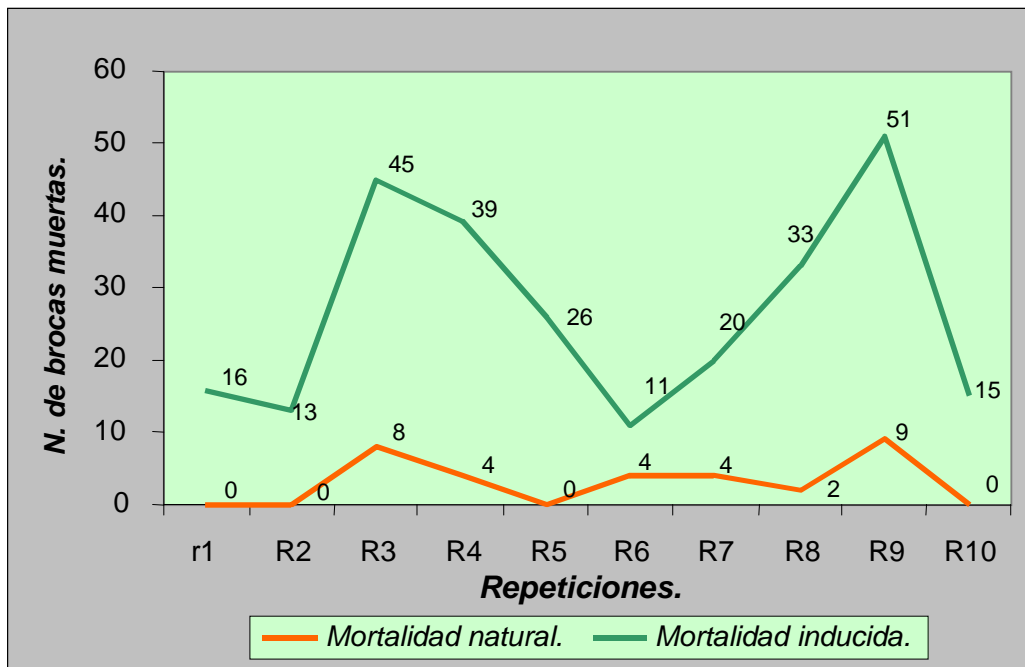


**8.2 Grafico 2.** Numero de brocas muertas por la infección de *B. bassiana* de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento T2.





**8.3 Grafico.** Numero de brocas muertas por la infección de *B. bassiana* de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento T3.



**8.4 Grafico.** Numero de brocas muertas por la infección de *B. bassiana* de forma natural e inducida después de la aplicación en el tratamiento T4.