

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

Trabajo de Graduación:

**“EFECTIVIDAD DE LA REPRODUCCIÓN EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO DE
LA CEPA NATIVA *Beauveria bassiana*, COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE
LA BROCA DEL FRUTO DE CAFETO, *Hypothenemus hampei*”**

PRESENTADO POR:

DELMY LISSETH PALACIOS ALAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, OCTUBRE DE 2009

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

Trabajo de Graduación:

**“EFECTIVIDAD DE LA REPRODUCCIÓN EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO DE
LA CEPA NATIVA *Beauveria bassiana*, COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE
LA BROCA DEL FRUTO DE CAFETO, *Hypothenemus hampei*”**

PRESENTADO POR:
DELMY LISSETH PALACIOS ALAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESOR: M.Sc. RHINA ESMERALDA ESQUIVEL

ASESOR ADJUNTO: Dr. ADÁN HERNÁNDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, OCTUBRE DE 2009

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

Trabajo de Graduación:

“EFECTIVIDAD DE LA REPRODUCCIÓN EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO DE LA CEPA NATIVA *Beauveria bassiana*, COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL FRUTO DE CAFETO, *Hypothenemus hampei*”

PRESENTADO POR:
DELMY LISSETH PALACIOS ALAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

JURADO EVALUADOR:

Licda. YOLANDA IVETTE BARRERA JIMÉNEZ

Licda. JENNY ELIZABETH MENJÍVAR CRUZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, OCTUBRE DE 2009.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

**M.Sc. Rufino Antonio Quezada Sánchez
RECTOR**

**Dr. René Madecadel Perla Jiménez
FISCAL GENERAL**

**Lic. Douglas Vladimir Alfaro Chacón
SECRETARIO GENERAL**

**Dr. Rafael Antonio Gómez Escoto
DECANO FACULTAD CIENCIAS NATURALES
Y MATEMÁTICA**

**M.Sc. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno
DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGIA**

TRIBUNAL EVALUADOR

M.Sc. RHINA ESMERALDA ESQUIVEL

Dr. ADÁN HERNÁNDEZ

Licda. YOLANDA IVETTE BARRERA JIMÉNEZ

Licda. JENNY ELIZABETH MENJÍVAR CRUZ

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial, por la bendición de permitirme culminar esta meta, por contar con su presencia y amor en cada momento, por darme la fortaleza para salir adelante en mi formación profesional.

A mis Padres, Noé Palacios y Delmy de Palacios, por brindarme siempre su incondicional amor, por todo su esfuerzo y dedicación, por sus consejos y apoyo, porque me han enseñado que “no hay mejor pedagogía que el amor y el ejemplo”.

A la memoria de mi tía Gilma Palacios (Q.D.D.G), por brindarme su cariño, por sus consejos y por su ejemplo.

Y a mis sobrinos Daniela y Diego Palacios, por su incondicional amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi Padre Celestial, por haberme dado la vida y la oportunidad de estudiar una carrera universitaria; a mi madre Delmy de Palacios, por su amor y su paciencia; a mi padre Noé Palacios, por su ejemplo y dedicación; a mi tía Gilma Palacios(Q.D.D.G) por sus consejos y ejemplo; a mi tío José Alberto Palacios por su apoyo y cariño y a mis sobrinos Daniela y Diego Palacios, por su incondicional amor; a mi familia de la Liga de Vencedores de mi Iglesia Aposento Alto y a los hermanos Menjívar, porque creyeron en mi y me brindaron su apoyo y motivación para desarrollarme profesionalmente.

A mis asesores M.Sc. Rhina Esmeralda Esquivel y Dr. Adán Hernández por su paciencia y dedicación, por ser mis guías a lo largo de mi carrera y por brindarme su valioso apoyo y conocimientos para la realización de mi Trabajo de Graduación.

A la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador; a la Fundación Salvadoreña para investigaciones del café PROCAFÉ, y a la Facultad de Ciencias Agronómicas, por apoyarme en el desarrollo de esta investigación.

A todo el personal de Procafé, en especial a don Orlando Orellana, y don David Valdés, por su valioso apoyo y colaboración durante esta investigación.

A todos los investigadores y maestros por apoyarme y compartir sus conocimientos conmigo a lo largo mi investigación M.Sc. Francisco Chicas, Licda. Martha Lidia de Amaya, Ing. José Manuel Meza, Licda. Rosmery Erroa, Ing. Rafael Menjívar, Dr. Nerys Funes, ya que sin su apoyo no sería posible el culminar mi investigación.

A de todo corazón a mis amigos por ser mi apoyo y por los consejos en mi desarrollo profesional y en la elaboración de esta investigación, especialmente a Iris Pérez, Iselda Vega, Stefany Henríquez, Lya Samayoa, Karen Franco, Pamela Nájera, César Guevara, Edwin Cornejo, Leonardo Alvarado y Robin Landaverde.

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	iv
RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	3
2.1. La broca del fruto del café.....	3
2.2. Programa de manejo integrado de la broca.....	3
2.3. El control biológico de la broca.....	3
2.3.1. Características del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	4
2.3.2. Modo de acción de <i>Beauveria bassiana</i>	5
2.3.3. Síntomas que ocasiona a la broca.....	7
2.3.4. Capacidad entomopatógena de <i>Beauveria bassiana</i>	7
2.3.5. Condiciones ambientales favorables para el desarrollo de <i>Beauveria bassiana</i>	8
2.3.6. Producción de <i>Beauveria bassiana</i>	9
2.3.7. Reproducción de hongos entomopatógenos en fermentadores artesanales.....	9
2.3.8. Producción de <i>Beauveria bassiana</i> en medio de cultivo líquido.....	10
III. OBJETIVOS.....	11
IV. METODOLOGÍA.....	12
4.1. Ubicación del Área de Estudio.....	12
4.2. FASE DE CAMPO.....	13
4.2.1 Recolección de frutos de café con brocas infectadas por <i>B. Bassiana</i>	13
4.2.2 Recolección de frutos de café infectados por brocas <i>Hypothenemus hampei</i>	14
4.3. FASE DE LABORATORIO.....	15
4.3.1. Aislamiento de la cepa de <i>B. bassiana</i> a partir de brocas infectadas, colectadas en campo.....	15
4.3.2. Purificación de la cepa del hongo <i>B. bassiana</i>	15
4.3.3. Reproducción de blastosporas y esporas de <i>B. bassiana</i> en medio de cultivo líquido.....	16
4.3.4. Evaluación de la producción de esporas y blastosporas en el fermentador.....	17

4.3.5. Bioensayo de patogenicidad en laboratorio.....	19
4.4. Análisis estadístico de los resultados.....	21
V. RESULTADOS.....	22
5.1. Aislamiento de la cepa de <i>B. bassiana</i> a partir de brocas infectadas, colectadas en campo.....	22
5.2. Evaluación diaria de la producción de esporas en cámara de Neubauer....	22
5.3. Sintomatología de brocas enfermas.....	24
5.4. Desarrollo de micelio sobre brocas.....	25
5.5. Mortalidad diaria de brocas infectadas.....	27
5.6. Prueba de hipótesis y análisis estadístico.....	29
VI. DISCUSIÓN.....	30
VII. CONCLUSIONES.....	33
VIII. RECOMENDACIONES.....	34
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35
X. ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.1	Ubicación con las coordenadas de los sitios en donde se realizo la investigación.....	12
Cuadro No.2	Cantidad de componentes utilizados por cada 1000 ml de agua destilada “Solución madre”	17
Cuadro No.3	Tratamiento y concentración a partir de la “Solución madre”.....	19
Cuadro No.4	Concentración diaria de esporas de <i>B. bassiana</i> por mililitro producidas en el medio de cultivo líquido “Solución madre” (Promedio de cuatro conteos).....	23
Cuadro No.5	Concentración diaria de esporas de <i>B. bassiana</i> por mililitro producidas en el medio de cultivo líquido, diluido según cada tratamiento (Promedio de cuatro conteos).....	23
Cuadro No.6	Sintomatología de brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	24
Cuadro No.7	Actividad de brocado en granos de café pergamino en % (Datos de cada bioensayo).....	25
Cuadro No.8	Desarrollo diario de micelio sobre las brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	26
Cuadro No.9	Porcentaje de desarrollo de micelio acumulado sobre las brocas inoculadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	26
Cuadro No.10	Porcentaje de mortalidad diaria de brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	27
Cuadro No.11	Porcentaje de mortalidad acumulada de brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	28
Cuadro No.12	Tabla ANOVA para la determinación significativa entre los diferentes tratamientos.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1	A) Broca sana y B) Broca infectada con el hongo <i>Beauveria bassiana</i>	5
Figura No. 2	Ciclo de infección de <i>B. bassiana</i> sobre insectos.....	6
Figura No. 3	Mapa de la Ubicación Geográfica del campo experimental de Procafé, Finca Las Margaritas y Centro Tecnológico Cafetalero.....	13
Figura No. 4	Frutos que presentan <i>B. bassiana</i> sobre el orificio de entrada de la broca.....	14
Figura No. 5	Frutos que presentan infección por brocas <i>Hypothenemus hampei</i>	14
Figura No. 6	Fermentador artesanal para reproducción de hongos.....	16
Figura No. 7	Vista microscópica de los cuadros de la cámara de Neubauer.....	18
Figura No. 8	Procedimiento de aplicación del medio de cultivo líquido para contabilizar la concentración de esporas en la cámara de Neubauer.....	18
Figura No. 9	Preparación de material para el proceso de desinfección de brocas.....	19
Figura No. 10	Montaje de Bionsayo.....	20
Figura No. 11	Colocación diaria de agua destilada estéril en cada vial.....	21
Figura No. 12	A) Micelio algodonoso de <i>B. bassiana</i> , purificado en PDA, y B) Vista microscópica del micelio típico de <i>B. bassiana</i>	22
Figura No. 13	Esporas y blastosporas de <i>B. bassiana</i> , en medio de cultivo líquido.....	22
Figura No. 14	Actividad diaria de brocas infectadas por <i>B. bassiana</i> , según cada tratamiento.....	24
Figura No. 15	Actividad diaria de brocado en los granos de café pergamino, por cada bioensayo.....	25
Figura No. 16	Desarrollo diario de micelio sobre las brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	26
Figura No. 17	Desarrollo de micelio acumulado sobre las brocas inoculadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	27
Figura No. 18	Mortalidad diaria de brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	28
Figura No. 19	Mortalidad acumulada de brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	28
Figura No. 20	Mortalidad vrs crecimiento de micelio observado en las brocas infectadas con <i>B. bassiana</i> (Datos promedio de los cinco bioensayos).....	29

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo No. 1	Cronograma de actividades que se realizan para el control de la broca del cafeto <i>Hypothenemus hampei</i>	39
Anexo No. 2	Hoja de anotación diaria por cada bioensayo con parámetros observados: sintomatología, crecimiento de micelio y mortalidad sobre las brocas infectadas con <i>B. bassiana</i>	40

RESUMEN

Esta investigación se llevo a cabo en las instalaciones de la Fundación Salvadoreña para investigaciones del café, (PROCAFE), en Santa Tecla y en la estación experimental Finca San Antonio en Santa Ana; se realizaron dos fases complementarias: A) Fase de campo que consistió en la recolección y aislamiento de cepas nativas de *B. bassiana* a partir de brocas infectadas de la cual se obtuvieron aislados puros. B) Fase de laboratorio en donde se realizaron dos fases: la 1ª consistió en la reproducción de *B. bassiana* en medio de cultivo líquido a base de levadura y azúcar en fermentadores artesanales. La 2ª fue la evaluación de patogenicidad de *B. bassiana* sobre brocas. Los resultados demostraron que el medio utilizado proporcionó los nutrientes necesarios para la reproducción del hongo. La mayor producción de blastosporas fue entre las 72 y 96 horas y de esporas a las 120 horas después de la inoculación.

Se instalaron 5 bioensayos para evaluar la patogenicidad de *B. bassiana* mediante un diseño estadístico completamente al azar; cada uno con cinco tratamientos y 20 repeticiones. Cada tratamiento consistió en diluciones preparadas a partir de la solución madre obtenida del fermentador, de la siguiente manera: T1=testigo, T2=1:10, T3=1:100, T4=1:1000, T5=1:10000. Seguidamente brocas sanas desinfectadas fueron sumergidas en las diferentes diluciones; inmediatamente se colocó cada broca en un frasco vial de vidrio, en cuyo fondo había un disco de papel húmedo y un grano de café pergamino como alimento. Los viales se mantuvieron a temperatura de 27-30°C y se observaron cada 24 horas, durante 10 días, donde se evaluó: a) desarrollo de micelio sobre las brocas, b) sintomatología de las brocas enfermas y c) mortalidad de las brocas. Los resultados mostraron que los tratamientos T2 y T3 ocasionaron disminución en la actividad de las brocas en un lapso de tres días, en el T4 sucedió entre el quinto y sexto día y en el T5 a partir del sexto día. La actividad del brocado en las brocas infectadas con la mayor concentración de *B. bassiana* fue entre 15 a 30% de los granos, mientras que en el testigo fue entre 55 a 80%. La mortalidad de brocas en el T2 fue visible desde el tercer día de observación, en T3 y T4, coincidió en el cuarto día; en el T5 se inicio el quinto día. El desarrollo del micelio en T2 se observo a los 10 días colonizando las brocas en un 50% en T3 y T4, el crecimiento se observo a partir del cuarto día, y en el T5 fue escaso.

I. INTRODUCCION

Los hongos entomopatógenos son capaces de causar infección y muerte a sus hospederos a través de la germinación de esporas del hongo sobre el tegumento del insecto plaga. Dentro de las características que favorecen a los hongos entomopatógenos es su capacidad de multiplicación y dispersión de esporas en el ambiente a través del viento, la lluvia e incluso con individuos de la misma población (Parada & Serrano, 1998).

El control biológico actualmente esta teniendo una mayor participación en esta realidad debido a los beneficios que representa; por ello los hongos entomopatógenos han recibido mucha atención por su valoración como enemigos naturales de los insectos. Este control es una alternativa relevante en el manejo de insectos plagas en el mundo. En la actualidad existen más de 400 especies de hongos que atacan insectos y ácaros, lo que indica el gran potencial para el uso de estos organismos como insecticidas biológicos (Godoy, *et al.*, 2006).

Dentro de estas plagas se destaca la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei*, reportada como la más importante para este cultivo, ya que se trata de una plaga directa que ataca el fruto, reduce los rendimientos y calidad del café. Además el café y la broca se originaron en África, son especies exóticas en el continente americano; por lo tanto no poseen enemigos naturales en la región, por esto ha sido necesario introducir especies que demuestren un control efectivo (Díaz, *et al.*, 2007).

Es indispensable desarrollar las estrategias de control natural, que sirvan para proteger al cultivo del café a través de la formulación de bioinsecticidas para el control de este insecto.

Según González *et al.*, (1993), estudios de laboratorio indican que el hongo *Beauveria bassiana* podría utilizarse eficientemente en la reducción de las poblaciones de broca al depositarse suficiente cantidad de inóculo para inducir o acelerar el proceso de infección en campo; pero el comportamiento del hongo puede ser variable de acuerdo con las condiciones de temperatura, humedad y radiación solar presentes en el medio.

Además *B. bassiana* presenta problemas de contaminantes en la producción al realizarlo en sustrato sólido, y es un proceso que en la actualidad está resultando poco rentable por los altos precios en los que se cotiza cada vez el arroz en el mercado. Por lo anterior es importante investigar la reproducción en medios líquidos que sean accesibles y que proporcionen grandes cantidades de unidades infectivas.

En la actualidad el uso desmedido de plaguicidas ha constituido la principal alternativa para el control de organismos plagas; pero el uso excesivo de estos ha ocasionado diferentes problemas como: residuos tóxicos en las cosechas, intoxicaciones en humanos, contaminación ambiental, desequilibrios ecológicos con el apareamiento de nuevas plagas y resistencia genética; la tendencia actual de buscar opciones de manejo que reduzcan el uso de estos productos, propone un control mediante el uso de hongos entomopatógenos como una alternativa biológica (Carballo, *et al.*, 2001).

Por lo que este estudio se realizó con el objetivo de reproducir en medio de cultivo líquido la cepa nativa *B. bassiana*, como controlador biológico de la broca del fruto de café, *H. hampei*.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO.

2.1 La broca del fruto del café.

El ataque de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei*, se detectó por primera vez en granos de café de exportación de África hacia Europa en 1867. En la región de Centro América apareció en Guatemala en 1971, más tarde se propagó a los demás países del área: Honduras en 1977, México 1978, El Salvador 1981 y Nicaragua en 1988 (Sibaja & Jiménez, 1989).

Estos daños se reflejan en la pérdida de peso en las almendras que son atacadas por las larvas, caída de los frutos en estado acuoso y alteración en la bebida al beneficiar conjuntamente granos sanos y brocados (González, *et al.*, 1993). Los ataques de broca suelen ser precoces y debido a la caída de frutos jóvenes, es difícil precisar las pérdidas provocadas ya que el nivel de ataque varía todos los años (Arias, 2007).

2.2 Programa de manejo integrado de la broca.

Debido a la importancia económica de la broca, su control o combate se lleva a cabo a través de un programa de manejo integrado conformado por una serie de tácticas de control, tales como: a) Prácticas culturales como: poda de café y sombra, pepena y repela, b) Control etológico (uso de trampas con atrayentes), c) Control biológico con parasitoides y hongos entomopatógenos, d) Control mecánico (recolección de frutos brocados de floraciones anormales) y e) control químico con insecticidas.

2.3 El control biológico de la broca.

En la mayoría de países productores de café, el manejo de poblaciones de broca se basa en el control químico, el cual causa mortalidad inmediata, pero tiene efectos negativos en el agroecosistema y la fauna. El control biológico es una alternativa que a través del uso de organismos vivos regula la densidad de una población de determinada plaga y permite reducir costos económicos; este control se basa en uso de parasitoides y microorganismos (González, *et al.*, 1993).

Entre los controladores naturales de insectos se encuentran los hongos entomopatógenos, que han demostrado su capacidad para infectar y matar a cualquier insecto en alguno de sus estadios de vida, no producen efecto inmediato como los productos químicos, pero una vez establecidos en una determinada zona pueden sobrevivir e incrementarse (Parada & Serrano, 1998).

Los hongos entomopatógenos han desarrollado mecanismos de adaptación para multiplicarse en su huésped específico, algunos segregan toxinas que no matan al huésped hasta haber proliferado abundantemente; los cadáveres también son focos de infección (Parada & Serrano, 1998).

El hongo *B. bassiana*, es uno de los entomopatógenos más estudiados en el control biológico de muchas plagas y se ha encontrado atacando *Hypothenemus hampei*, en los sitios de origen del café y en los países donde este ha sido introducido, se considera que este entomopatógeno puede ser muy eficiente en programas de control de broca del café (González, *et al.*, 1993).

En China se produce para el control del perforador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hubner), saltamontes verde (*Turpilia opaca* Brunn.) y la oruga de los pinos (*Lymanthria dispar* L.). En la Unión Soviética se produce con el nombre de Boverin como agente biológico de control de la polilla del manzano (*Cydia pomonella* L.). Actualmente Colombia produce masivamente el hongo *B. bassiana* para el control de la broca del café, *H. hampei*, a partir de un cultivo multiespórico utilizado como sustrato arroz (Godoy, *et al.*, 2006).

2.3.1 Características del hongo *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 de zig-zag. Las conidias son hialinas, el 50% son redondeadas a ovoides, unicelulares y emergen en pequeños estigmas (Arias, 2007).

B. bassiana, presenta unas estructuras que son visibles al microscopio llamadas fialides o células conidiogenas que tiene base globosa o en forma de botella y se extiende apicalmente en grupos densos (Arias, 2007). Crece de forma natural, se

localiza en el suelo, aunque se puede reproducir o cultivar en el laboratorio ya que es un hongo saprofita facultativo. Pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, se reproduce asexualmente por conidios, presenta un micelio de color blanco cremoso; parasita varias especies de insectos, entre ellos a la broca del fruto del café (Godoy, *et al.*, 2006).

El hongo se desarrolla en el insecto ocasionándole la muerte, y a diferencia de otros organismos, *B. bassiana* infecta al insecto con el simple contacto, por lo que no tiene que ser consumido por su anfitrión para causar la infección (Hernández, 2000).

Se reconoce por el micelio blanco que se desarrolla entre los tegumentos de su hospedero que a su vez produce millones de nuevas esporas que son liberadas al ambiente (Figura No.1). *Beauveria* ha sido recuperado de muchos insectos del orden Coleóptera, Lepidóptera y Homóptera y probablemente ataca a todos los artrópodos. De acuerdo a la literatura existen dos especies: *Beauveria bassiana* y *B. brogniartii* (Godoy, *et al.*, 2006).

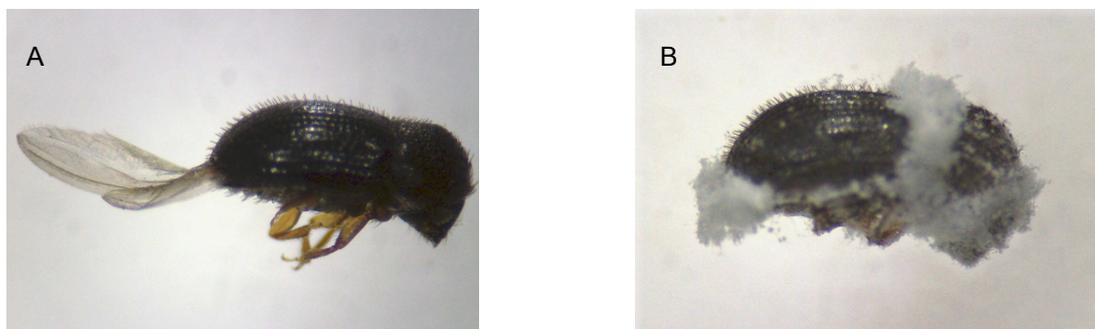


Figura No.1. A) Broca sana y B) Broca infectada con el hongo *Beauveria bassiana*

2.3.2. Modo de acción de *Beauveria bassiana*.

Según Narváez *et al.*, (1997), para que el hongo ataque a la broca, sus esporas deben entrar en contacto con el cuerpo del insecto (Figura No. 2).

A continuación se detalla el modo de infección de *B. bassiana* que según Kouassi, (2001), se divide en cuatro etapas:

1. **Adhesión:** tiene un mecanismo de reconocimiento y compatibilidad de las conidias con células del tegumento del insecto. Esta fase presenta dos etapas: en la primera la conidia se pega a la cutícula por medio de fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas, y la segunda se caracteriza porque la conidia produce un mucílago que genera una modificación en la epicutícula, lo que produce la germinación.
2. **Germinación:** ésta es 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.
3. **Diferenciación:** es la penúltima fase y se caracteriza por la formación de un apresorio o estructura terminal que va a servir de punto de agarre y remoción de la cutícula para favorecer la penetración. La producción de los apresorios es dependiente del valor nutritivo de la cutícula del hospedante.
4. **Penetración:** es la última fase y 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.

Las proteasas y las lipasas son enzimas constitutivas de *B. bassiana*, que actúan en mayor grado degradando la cutícula del hospedante. La quitinasa puede actuar como una enzima constitutiva o adaptativa, dependiendo de la especificidad del hongo (Díaz, *et al.*, 2007).

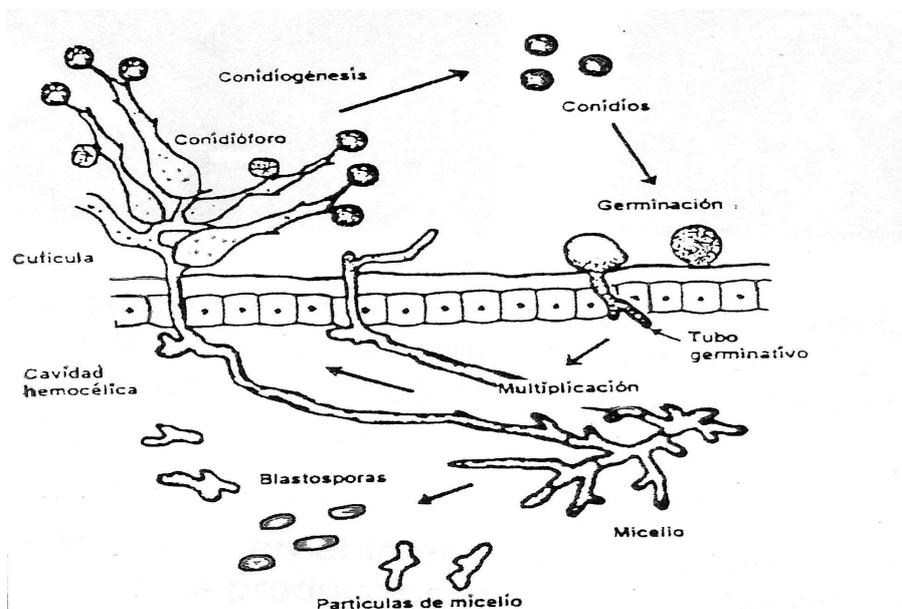


Figura No.2. Ciclo de infección de *B. bassiana* sobre insectos.

Una vez que el huésped muere, el hongo emerge de su cuerpo para producir esporas, las cuales son llevadas por el viento, lluvia o por otros insectos de la misma población para expandir la dispersión (Parada & Serrano, 1998).

La germinación de las conidias de *B. bassiana* ocurre en un período de 12 horas después de la inoculación. El hongo penetra a través del integumento por acción mecánica, lo cual toma 12 horas, después de unas 72 horas de la inoculación el insecto está totalmente colonizado. La duración de las diferentes fases de este ciclo depende de la especie atacada y las condiciones ambientales presentes durante la infección (González, *et al.*, 1993). Cuando la infección del hongo se produce en las etapas iniciales, la broca muere antes de ingresar al grano reduciendo pérdidas a la cosecha (Díaz, *et al.*, 2007).

2.3.3. Síntomas que ocasiona a la broca.

Cuando las esporas del hongo entran en contacto con la cutícula de los insectos, éstas germinan y proliferan en todas partes, produciendo toxinas y agotando sus sustancias nutritivas (Hernández, 2000).

Las brocas que son infectadas dejan de alimentarse y entran en un estado letárgico, pierden sensibilidad y coordinación. Cuando el insecto muere queda momificado. Los cuerpos de los insectos muertos pueden ser encontrados sobre el follaje. En algunas ocasiones se encuentran cubiertos por el micelio del hongo, en otras se observa emergiendo de las articulaciones y segmentos del cuerpo (Calderón & Cortés, 1993).

2.3.4. Capacidad entomopatógena de *Beauveria bassiana*.

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

Según Posada (1996), *B. bassiana* se ha registrado como enemigo natural de la broca del café en todos los países cultivadores que han sido invadidos por esta

plaga. En los registros de enemigos naturales de la broca, donde ésta se ha distribuido *B. bassiana* aparece como el más asociado a las poblaciones y con acción permanente que alcanza niveles de epizootias de forma natural.

La habilidad de un hongo entomopatógeno para sobreponerse a los mecanismos de defensa de sus hospedantes se debe gran parte a la producción de toxinas, que es uno de los componentes principales de la patogenicidad y uno de los más difíciles de establecer. (González, *et al.*, 1993). El hongo *B. bassiana* presenta variaciones en su eficiencia para atacar, estas diferencias en patogenicidad podrían deberse a respuestas internas del hospedante y a las características fisiológicas o genéticas del hongo.

2.3.5. Condiciones ambientales favorables para el desarrollo de *Beauveria bassiana*

El hongo puede atacar a la broca cuando está fuera del fruto, o bien si no se encuentra muy profunda en el fruto, ya que de otra forma es casi invulnerable al patógeno; cuando la broca se contamina con el hongo muere después de 3 a 6 días en condiciones de humedad saturada, dura hasta 9 días si las condiciones de humedad relativa son de 70 a 80%. (Díaz, *et al.*, 2007). Sin embargo el comportamiento del hongo puede ser variable de acuerdo con las condiciones de temperatura, humedad y radiación solar presentes. La temperatura se considera óptima entre 20 y 30°C, y las condiciones de humedad superiores al 90% favorecen la esporulación del hongo (González, *et al.*, 1993).

Según Koch, *et al.*, (1988) causa epizootias en las poblaciones de broca cuando las condiciones ambientales le son favorables, es decir alta humedad relativa, alta nubosidad, temperatura que no exceda los 30°C y abundante población de broca, en estas condiciones se han observado niveles importantes de parasitismo (Arias, 2007).

González, *et al.*, (1993), mencionan que las infecciones naturales no son suficientes para detener el desarrollo de la plaga; las condiciones de vida de la broca del fruto del café la hacen susceptible a las infecciones por el hongo ya que tanto el hongo, como la broca se desarrollan de manera óptima bajo condiciones de alta humedad.

2.3.6. Producción de *Beauveria bassiana*

Las especies de *Beauveria* se han desarrollado fácilmente en medios de cultivo como PDA y Sabouraud, pero se han desarrollado otros medios y técnicas de propagación. Antia, *et al.*, (1992) estudió la metodología de producción artesanal del hongo en fincas; es una metodología sencilla en donde el sustrato se compone de arroz y agua, estos se introducen en botellas desechables de vidrio taponadas con algodón absorbente y se someten a un proceso de esterilización a “baño maría”, la producción de esporas en botellas es de 4×10^{11} esporas/gr. de sustrato a 25°C, y luego de 24 días el hongo completa su desarrollo y está listo para ser utilizado.

Actualmente se han evaluado diferentes tipos de sustrato naturales para la producción de hongos entomopatógenos entre los que se destaca el arroz, trigo, maíz, frijol y soya; de los cuales los más utilizados han sido el arroz y el trigo (Monzón, 2001).

2.3.7. Reproducción de hongos entomopatógenos en fermentadores artesanales.

Gallegos, *et al.*, (2005), manifiestan el interés que existe por emplear hongos entomopatógenos como agentes de control biológico, plantean que estos deben ser formulados para mantenerse en forma viable y activa. El uso de fermentadores para la producción de hongos es contrario a los métodos de producción más usados como el uso de sustrato sólido, pero estos implican más costos, por lo que es necesario implementar la alternativa de medios de cultivos líquidos para la producción de blastosporas (Lozano, *et al.*, 2007).

Los fermentadores artesanales representan un método simple y de bajo costo que ha sido utilizado para el cultivo de bacterias y hongos entre ellos especies de *Trichoderma*, para aplicación en cultivo de cacao y de *Verticillium*, en el cultivo del café, como alternativa de control biológico para producir agentes de biocontrol (Canjura, 2000).

La formulación de microorganismos es un proceso que mezcla uno o varios ingredientes con el microorganismo, para dar como resultado un preparado cuyo

objetivo es brindar una forma económica y de fácil utilidad de un principio activo, con viabilidad prolongada, que contribuya a incrementar su efectividad (Carballo, 1998). También permite realizar la aplicación del producto de una manera más fácil, aumentando la persistencia, humectabilidad y adhesividad al insecto (Canjura, 2000).

2.3.8. Producción de *Beauveria bassiana* en medio de cultivo líquido.

B. bassiana es uno de los hongos más promisorios dentro del control biológico de insectos plaga. La producción que actualmente se realiza es en sustrato sólido “arroz precocido”, el cual es un método costoso y lento, mientras que la producción de esporas en fermentación sumergida ha resultado ser mas económico y rápido (Chong, *et al.*, 2006).

Solís, *et al.* (2006), mencionan que para el control biológico de la palomilla del manzano y otros insectos, se ha utilizado otros productos que como ingrediente activo contienen esporas de *B. bassiana*, producidas en sustrato sólido o sistemas difásicos de fermentación.

La producción de blastosporas de hongos entomopatógenos en medio líquido es un proceso conveniente por la eficiencia y rentabilidad, en medio de cultivo líquido se han obtenido buenos resultados con *B. bassiana* (Solís, *et al.*, 2006)

El cultivo sobre medios sólidos permite disponer inmediatamente del microorganismo, en los líquidos, los microorganismos quedan en suspensión. Para la producción de hongos entomopatógenos se considera que el crecimiento o rendimiento está influenciado por la actividad metabólica del microorganismo; en medio líquido el crecimiento suele ser mayor debido a que la disponibilidad de nutrientes también es superior y facilita el intercambio gaseoso, Solís, *et al.*, (2006).

III. OBJETIVOS

General:

- Reproducir en medio de cultivo líquido la cepa nativa *Beauveria bassiana*, como controlador biológico de la broca del fruto de cafeto, *Hypothenemus hampei*.

Específicos:

- Obtener unidades infectivas “esporas y blastosporas” a partir de *Beauveria bassiana* en medio de cultivo líquido en fermentadores artesanales.
- Evaluar la patogenicidad de esporas y blastosporas obtenidas en el fermentador artesanal, sobre poblaciones de broca bajo condiciones controladas.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Ubicación del Área de Estudio

Esta investigación se llevo a cabo en dos fases, en las que se realizaron diferentes actividades:

Fase de Campo: Las brocas infectadas por el hongo *B. bassiana*, se colectaron en la Finca “Las Margaritas” ubicada en cantón las Aradas, Santa Ana. La colecta de brocas sanas para el bioensayo, se realizó en el campo experimental de Procafé en Nueva San Salvador, La Libertad.

Fase de laboratorio: se realizó en el Centro Tecnológico Cafetalero ubicado en el kilómetro 56 ½ carretera a Santa Ana, cantón Las Aradas, Santa Ana. (Cuadro No.1 y Figura No.3).

Cuadro No.1. Ubicación con las coordenadas de los sitios en donde se realizo la investigación.

LUGAR	LATITUD NORTE	LONGITUD OESTE	ALTITUD (msnm)
Campo experimental “Procafé”	13° 40' 48"	89° 17' 24"	955
Finca “Las Margaritas”	13° 55' 12"	89° 32' 24"	845
Centro Tecnológico Cafetalero	13° 55' 48"	89° 32' 24"	825

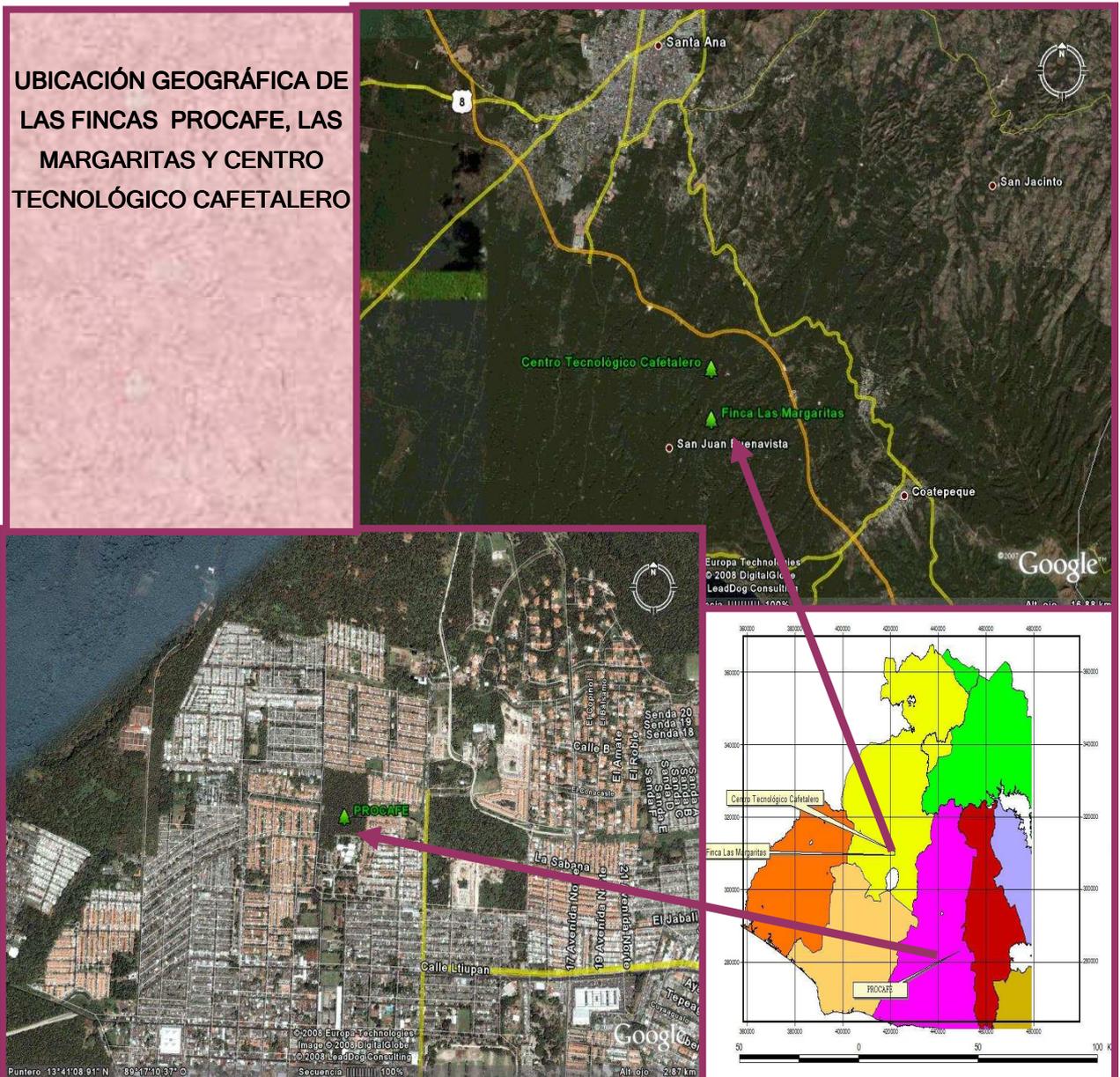


Figura No.3. Mapa de la Ubicación Geográfica del campo experimental de Procafé, Finca Las Margaritas y Centro Tecnológico Cafetalero (Google Earth, 2007).

4.2. FASE DE CAMPO

4.2.1. Recolección de frutos de café con brocas infectadas por *B. Bassiana*.

Se realizaron recorridos en la finca “Las Margaritas”, para recolectar brocas infectadas por el hongo *B. bassiana*, las cuales fueron identificadas en los frutos de café que presentaron taponamiento de color blanco en el orificio de entrada de la broca (Figura No.4).

Los frutos de café se disectaron y se le extrajeron las brocas que presentaron micelio algodonoso de color blanco sobre su cuerpo (infectado por el hongo *B. bassiana*); luego se colocaron en tubos viales los cuales se trasladaron al laboratorio del Centro Tecnológico Cafetalero.



Figura No.4. Frutos que presentan *B. bassiana* sobre el orificio de entrada de la broca.

4.2.2. Recolección de frutos de café infectados por brocas *Hypothenemus hampei*.

Se realizaron recorridos en la finca cafetalera del campo experimental de Procafé, con el objetivo de coleccionar frutos infectados por brocas *H. hampei*, los cuales fueron identificados por presentar el orificio de entrada de la broca (Figura No. 5).



Figura No.5. Frutos que presentan infección por brocas *Hypothenemus hampei*.

4.3. FASE DE LABORATORIO

4.3.1. Aislamiento de la cepa de *B. bassiana* a partir de brocas infectadas, colectadas en campo.

Esta actividad se realizó bajo una cámara de flujo laminar para evitar contaminación. Las brocas que fueron seleccionadas presentando infección por *B. bassiana*, fueron procesadas para aislar el hongo.

Para ello se utilizó la metodología propuesta por Monzón, (2001), de la siguiente manera:

- a) inmersión en agua destilada estéril, durante 1 minuto.
- b) inmersión en alcohol 90°, durante 1 minuto.
- c) inmersión en agua destilada estéril, para eliminar residuos de alcohol.
- d) Colocación de las brocas en papel filtro estéril para eliminar excedente de humedad.

Este proceso permite la eliminación de otros microorganismos ajenos a *B. bassiana* sin causar la muerte de éste último, el cual desarrolla su micelio de manera óptima en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar).

Seguidamente utilizando pinzas esterilizadas, se colocaron de 3 a 4 brocas en cajas petri que contenían medio de cultivo PDA, previamente esterilizado en autoclave (121°C, 15 lbs. de presión, durante 15 minutos). Las cajas se sellaron con cinta parafilm, se rotularon y se dejaron en incubación a una temperatura de 26 a 29 °C, para que el hongo se desarrollara.

4.3.2. Purificación de la cepa del hongo *B. bassiana*.

Después de 4 a 6 días de incubación se observó el crecimiento del hongo en las cajas petri, y se procedió a realizar preparaciones microscópicas para observar las características morfológicas del micelio y esporas de *B. bassiana*.

Luego con un haza previamente esterilizada se colectó una parte de micelio aislado, y se colocó en cada una de 20 cajas petri con medio de cultivo PDA, para obtener una cepa pura.

4.3.3. Reproducción de blastosporas y esporas de *B. bassiana* en medio de cultivo líquido.

Una vez que se identificaron las características morfológicas del micelio y esporas de *B. bassiana*, se inoculó el hongo en cinco fermentadores artesanales que están compuestos de la siguiente manera (Figura No.6):

Cada fermentador contenía un tubo largo que llega hasta el fondo del recipiente y posee en el extremo externo del tubo un filtro de 0.2 μm para hacer pasar aire estéril por medio de un burbujeador conectado al mismo; un segundo tubo fue insertado para liberar aire que se produce dentro del recipiente con los sustratos y posee también un filtro de 0.2 μm en el extremo externo, para evitar contaminación con bacterias (Canjura, 2000; Barrera & Menjívar, 2004). Se identifico a cada fermentador como un bioensayo.

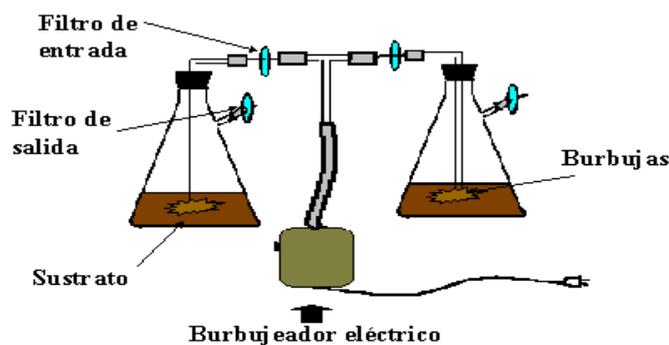


Figura No.6. Fermentador artesanal para reproducción de hongos.

Fuente: Barrera & Menjívar, 2004.

El sustrato alimenticio fue, el medio de cultivo líquido que es utilizado en la producción de entomopatógenos del Instituto del café de Costa Rica, y estaba compuesto por: agua destilada, levadura y azúcar, estos materiales se mezclaron y se esterilizaron en autoclave en un erlenmeyer a 121°C, 15 lbs. de presión, durante 15 minutos. Las cantidades utilizadas por cada litro de medio de cultivo se presentan en el Cuadro No.2.

Cuadro No. 2. Cantidad de componentes utilizados por cada 1000 ml de agua destilada "Solución madre"

CANTIDAD POR 1000ml	REACTIVO
20 gr.	azúcar
5 gr.	levadura
1000 ml	agua destilada

Los materiales se pasaron al fermentador artesanal de vidrio, el cual se sometió a las siguientes condiciones: temperatura ambiente (27- 30°C), aireación constante, agitación de 200 rpm y pH del medio de cultivo 5.5.

4.3.4. Evaluación de la producción de esporas y blastosporas en el fermentador.

Se observó el crecimiento del hongo *B. bassiana* y realizando un conteo de esporas cada 24 horas durante 5 días, con la ayuda de una cámara de Neubauer (Figura No.7) Solís, *et al.*, (2006).

Para realizar el conteo de esporas se extrajo con una pipeta 1 ml. del medio de cultivo líquido, el cual se colocó en un vial y se le aplicó una gota de Tween 80, para facilitar la dispersión de esporas por agitación. Luego se colocó una gota en cada uno de los depósitos de la cámara de Neubauer (Figura No.8), para realizar el conteo a través del microscopio.

Para determinar la concentración de esporas del medio de cultivo líquido, se realizó el conteo en los cinco cuadros de la cámara de 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 esta técnica se obtuvieron las concentraciones de las dosis de éste estudio (Arias, 2007).

La concentración de esporas del medio de cultivo líquido se calculó de la siguiente forma:

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

Donde:

NC= Número de esporas por mililitro de la suspensión.

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

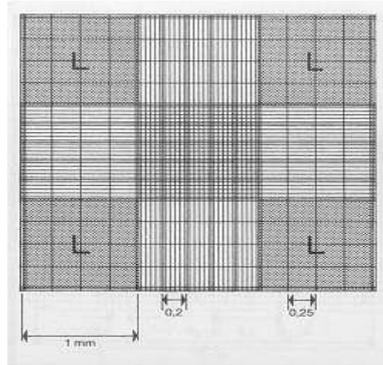


Figura No.7. Vista microscópica de los cuadros de la cámara de Neubauer.

Después de la inoculación de la cepa en el medio de cultivo líquido, se realizaron observaciones de preparaciones microscópicas cada 24 horas, para verificar que el hongo que se producía era efectivamente *B. bassiana*, al mismo tiempo se realizó la evaluación del crecimiento del hongo y conteo de esporas utilizando cámara de Neubauer.

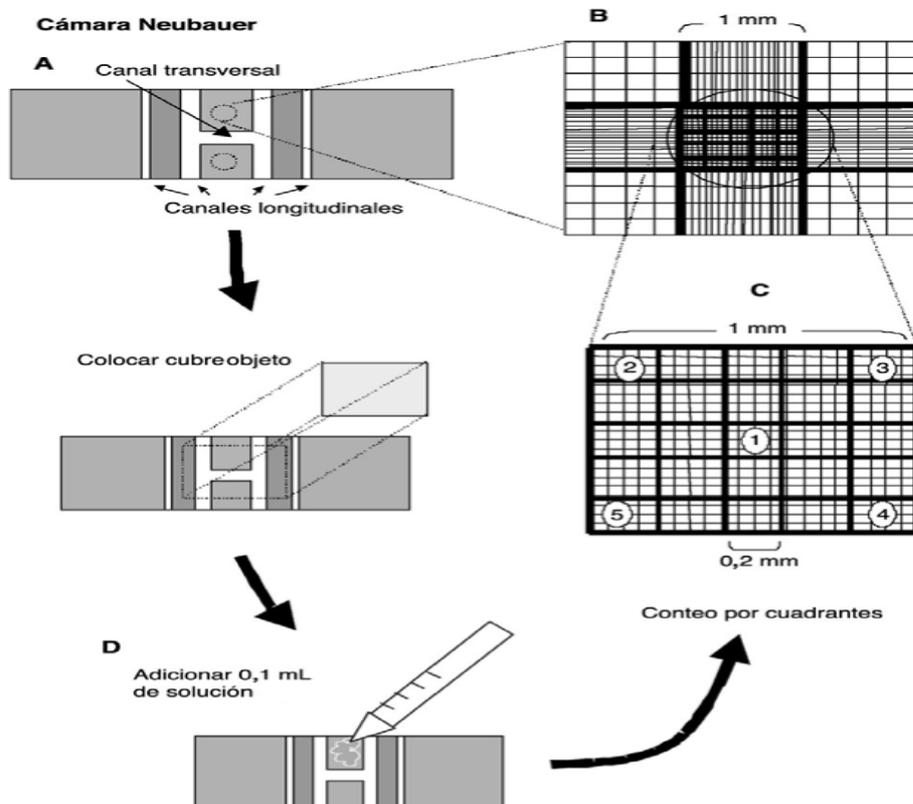


Figura No.8. Procedimiento de aplicación del medio de cultivo líquido para contabilizar la concentración de esporas en la cámara de Neubauer.

4.3.5. Bioensayo de patogenicidad en laboratorio.

Para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* en las brocas sanas se realizaron 5 bioensayos, de la siguiente forma:

Cada bioensayo consistió en los siguientes pasos:

1º Se prepararon diluciones a partir de la solución madre (suspensión de esporas y blastosporas), estos fueron: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000.

2º Se desinfectaron 100 brocas sanas (dejándolas sumergidas durante un minuto en agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 0.5% y agua destilada estéril). Finalmente se colocaron en papel filtro estéril para absorber el exceso de humedad (Figura No.9).



Figura No.9. Preparación de material para el proceso de desinfección de brocas.

3º Se seleccionaron 100 brocas sanas y se separaron en 5 grupos (cada grupo de 20 brocas), cuatro de estos grupos de brocas se sumergieron en las diferentes diluciones. Excluyendo a un grupo las cuales sirvieron de testigo (Cuadro No.3):

Cuadro No.3. Tratamiento y concentración a partir de la "Solución madre".

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN	Nº DE BROCAS
T1	Testigo (Sin aplicación del medio de cultivo líquido)	20
T2	1:10	20
T3	1:100	20
T4	1:1000	20
T5	1:10000	20

4º En un vial de vidrio previamente esterilizado de 2 cm. de diámetro por 4 cm. de altura, se colocó en el fondo un disco de papel humedecido para mantener la humedad relativa necesaria para infección del hongo; luego se colocó un grano de café pergamino como sustrato alimenticio. Seguidamente se introdujo individualmente con un pincel cada una de las brocas antes mencionadas. Inmediatamente cada vial fue taponado con algodón absorbente estéril, para evitar la salida de la broca (Figura No.10).

5º Los viales con las brocas sumergidas en los diferentes diluciones se mantuvieron a una temperatura entre 27-30°C y se observaron durante 10 días.



Figura No.10. Montaje de Bioensayo.

6º Para mantener la humedad se aplicó diariamente 0.2 ml. de agua destilada con una jeringa estéril en cada tubo, con el objetivo de brindar condiciones de humedad para el desarrollo e infección del hongo sobre el insecto (Figura No.11).

Los parámetros evaluados cada 24 horas, en cada uno de los 5 bioensayos fueron:

- a) desarrollo de micelio sobre las brocas.
- b) sintomatología de las brocas enfermas y
- c) mortalidad de las brocas.

Esta metodología fue propuesta por Méndez, (1990), y utilizada por Arias, (2007), quienes manifiestan que individualizando las brocas permite establecer el efecto directo del hongo sobre la broca.



Figura No.11. Colocación diaria de agua destilada estéril en cada vial.

4.4. Análisis estadístico de los resultados

Para determinar si existían diferencias significativas, entre las concentraciones utilizadas y la sobrevivencia de brocas, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) completamente aleatorio, (Bautista & Díaz 2001), utilizando el programa STATGRAPHICS plus 5.1.

V. RESULTADOS.

5.1. Aislamiento de la cepa de *Beauveria bassiana* a partir de brocas infectadas, colectadas en campo.

Se obtuvieron aislamientos directos de la cepa nativa de *B. bassiana*, los cuales presentaban micelio color blanco y crecimiento algodonoso; al observarlos al microscopio presentaron las características típicas de *B. bassiana*, conidióforo sencillo en forma de zigzag y fialides globosa en forma de botella (Figura No.12). Además produjeron esporas ovaladas hialinas en un periodo de cuatro a cinco días en medio de cultivo PDA a temperatura de 27 a 30° C.

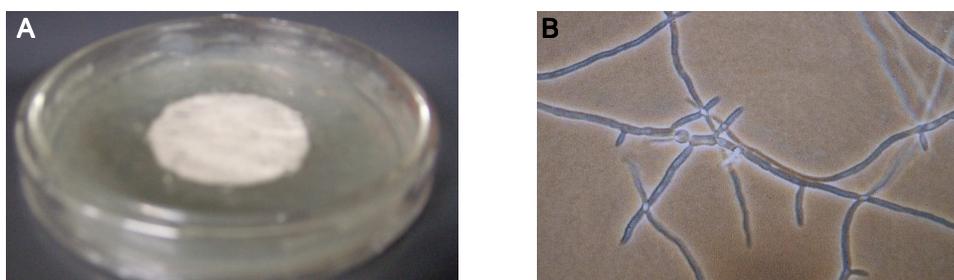


Figura No.12. A) Micelio algodonoso de *B. bassiana*, purificado en PDA, y B) Vista microscópica del micelio típico de *B. bassiana*

5.2. Evaluación diaria de la producción de esporas en cámara de Neubauer.

Durante la evaluación diaria de *B. bassiana* en el fermentador artesanal, se pudo observar la producción de blastosporas y esporas. Las blastosporas tenían forma alargada, otras como trozos de micelio en gemación y fueron visibles entre el tercer y cuarto día de desarrollo del hongo dentro del fermentador. Solo se pudieron contabilizar esporas, ya que las blastosporas por su forma más alargada fue difícil precisar el conteo dentro de los cuadros de la cámara de Neubauer (Figura No.13).

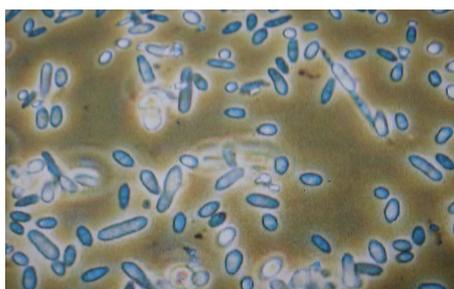


Figura No.13. Esporas y blastosporas de *Beauveria bassiana*, en medio de cultivo líquido.

En el Cuadro No. 4, se muestra el número promedio de esporas producidas por mililitro en medio de cultivo líquido. Se observa que en el primer bioensayo en las primeras 24 horas la producción promedio de esporas que se contó fue de 4.45×10^6 y a las 120 horas se contaron 6.97×10^6 . En el segundo bioensayo la producción promedio a las 24 horas fue de 3.75×10^6 finalizando a las 120 horas con 7.94×10^6 . Para el tercer bioensayo, a las 24 horas fue de 4.49×10^6 y al finalizar el conteo a las 120 horas fue 8.93×10^6 . En el cuarto bioensayo, a las 24 horas el conteo fue de 4.91×10^6 y a las 120 horas fue de 7.49×10^6 . En el quinto bioensayo se contaron a las 24 horas 4.42×10^6 y a las 120 horas de observación 8.17×10^6 esporas por mililitro.

El aumento en la producción de esporas fue notable en todos los bioensayos hasta llegar a las 72 y 96 horas, donde se observó un crecimiento estable.

Cuadro No.4. Concentración diaria de esporas de *B. bassiana* por mililitro producidas en el medio de cultivo líquido "Solución madre" (Promedio de cuatro conteos).

Bioensayo/ Horas	24h	48h	72h	96h	120h
1	4.45×10^6	5.56×10^6	6.10×10^6	6.37×10^6	6.87×10^6
2	3.75×10^6	6.21×10^6	7.54×10^6	7.75×10^6	7.94×10^6
3	4.49×10^6	6.01×10^6	7.27×10^6	8.11×10^6	8.93×10^6
4	4.91×10^6	5.75×10^6	6.54×10^6	7.14×10^6	7.49×10^6
5	4.42×10^6	5.59×10^6	6.89×10^6	7.49×10^6	8.12×10^6

En el Cuadro No. 5, se observan las diluciones que se prepararon a partir de la "solución madre", notándose que la concentración de esporas fue disminuyendo a medida que estas se encontraban más diluidas.

Cuadro No.5. Concentración diaria de esporas de *B. bassiana* por mililitro producidas en el medio de cultivo líquido, diluido según cada tratamiento (Promedio de cuatro conteos).

Tratamiento/ Horas	24h	48h	72h	96h	120h
T2 1:10	4.40×10^5	5.50×10^5	6.37×10^5	7.35×10^5	7.90×10^5
T3 1:100	4.49×10^4	5.71×10^4	6.94×10^4	7.43×10^4	7.82×10^4
T4 1:1000	4.05×10^3	5.55×10^3	6.81×10^3	7.57×10^3	7.71×10^3
T5 1:10000	4.34×10^2	5.92×10^2	6.77×10^2	7.42×10^2	7.87×10^2

5.3. Sintomatología de brocas enfermas.

En el cuadro No.6 se presenta la sintomatología de las brocas infectadas por *B. bassiana* producida en medio de cultivo líquido. En el primer día no se apreciaron cambios, fue hasta el segundo día que fueron notables los primeros síntomas en las brocas tratadas. Sin embargo en los tratamientos (T2) y (T3) se pudo observar el aumento en la actividad letárgica de las brocas, la cual fue notable entre el tercer y cuarto día.

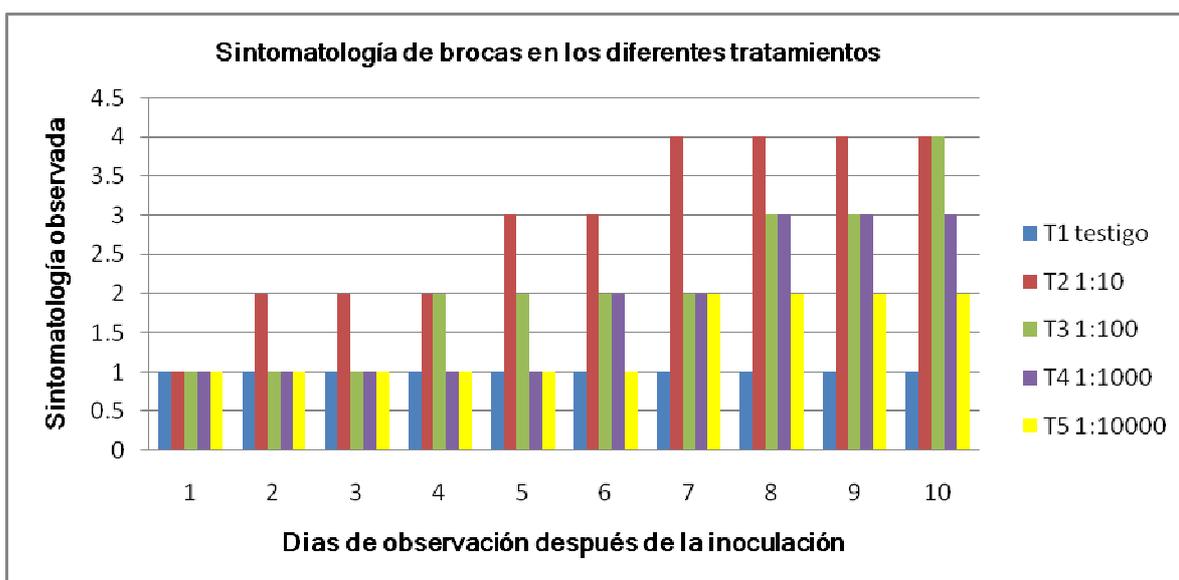
En el tratamiento 4 (T4) fue entre el quinto y sexto día que se observó la letargia y para el tratamiento 5 (T5) fue a partir del sexto día después de la aplicación. Este ritmo de actividad letárgica fue aumentando a medida incrementaba el tiempo a excepción del testigo, donde la actividad de las brocas se concentró en perforar el grano.

Cuadro No.6. Sintomatología de brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

TRATAM/ DDI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T2 (1:10)	1	2	2	2	3	3	4	4	4	4
T3 (1:100)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	4
T4 (1:1000)	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3
T5 (1:10000)	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2

DDI: Días después de Inoculación

Sintomatología según escala: Activas=1, Poco lentas=2, Lentas=3, Muy lentas=4.



Sintomatología según escala: Activas=1, Poco lentas=2, Lentas=3, Muy lentas=4.

Figura No.14. Actividad diaria de brocas infectadas por *B. bassiana*, según cada tratamiento.

En el Cuadro No.7 se observa la actividad de las brocas (brocado en los granos de café pergamino) afectadas por el hongo *B. bassiana*, reproducido en medio de cultivo líquido. Las que fueron inoculadas con mayor concentración de esporas mostraron poca actividad de brocado. Para el caso las brocas del tratamiento T2 perforaron del 15 al 30% de los granos, mientras que las testigos perforaron del 55 al 80%.

Este comportamiento de perforación de granos fue aumentando a medida disminuyo la concentración de esporas de la dilución del medio de cultivo líquido. Demostrando que las brocas que fueron infectadas por *B. bassiana* tienen una menor capacidad de ocasionar daño.

Cuadro No.7. Actividad de brocado en granos de café pergamino en % (Datos de cada bioensayo).

TRATAMIENTO	Bioensayo 1	Bioensayo 2	Bioensayo 3	Bioensayo 4	Bioensayo 5
T1 (testigo)	60 %	55 %	80 %	70 %	75 %
T2 (1:10)	15 %	30 %	30 %	25 %	25 %
T3 (1:100)	25 %	40 %	45 %	40 %	35 %
T4 (1:1000)	35 %	50 %	40 %	45 %	50 %
T5 (1:10000)	50 %	50 %	45 %	75 %	50 %

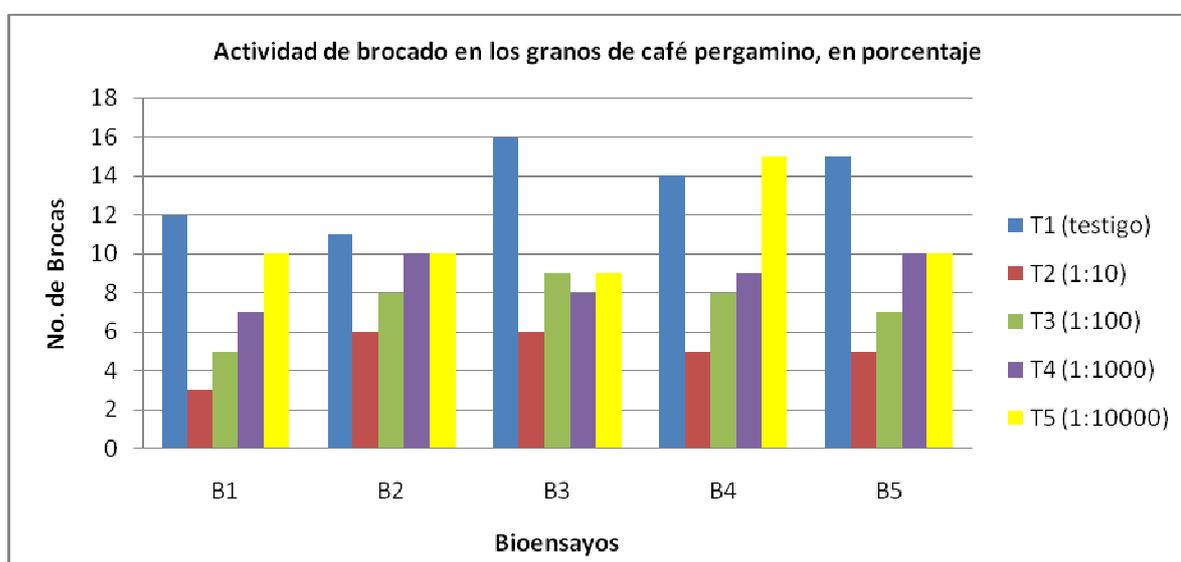


Figura No.15. Actividad diaria de brocado en los granos de café pergamino, por cada bioensayo.

5.4. Desarrollo de micelio sobre brocas.

En el Cuadro No.8 y Gráfico No.3, se observa el desarrollo de micelio en los tratamientos. En el testigo no se presentó crecimiento de *B. bassiana*. Sin embargo, en el T2 se observó que a partir del tercer día 14 brocas presentaban

desarrollo de micelio. Este fue desarrollándose gradualmente y a los 10 días de observación colonizó el 50% de brocas. En T3 y T4, el crecimiento comenzó a ser notable a partir del cuarto día, y fue escaso ya que ese día se observaron 2 insectos colonizados. En el T5 fue visible la disminución del crecimiento de micelio y se observó en el sexto día con un insecto, pero continuó desarrollándose durante todo el periodo de observación.

Cuadro No.8. Desarrollo diario de micelio sobre las brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

TRATAMIENTO/ DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2 (1:10)	0	0	9	5	8	11	7	10	4	5
T3 (1:100)	0	0	0	2	5	10	5	10	8	7
T4 (1:1000)	0	0	0	1	10	7	10	10	8	11
T5 (1:10000)	0	0	0	0	0	1	6	4	3	4

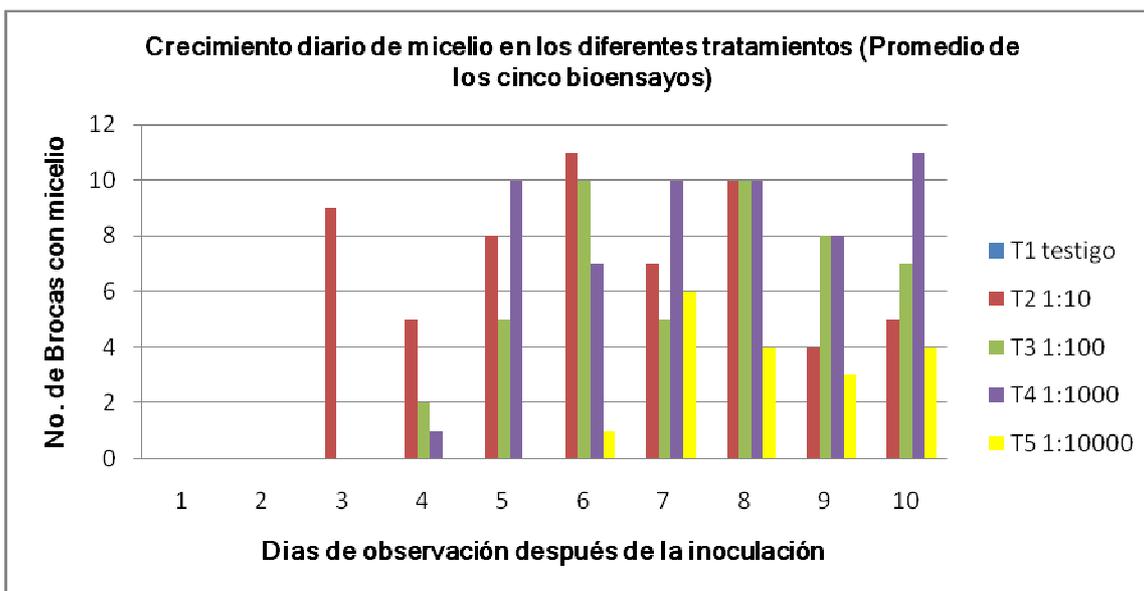


Figura No.16. Desarrollo diario de micelio sobre las brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

Cuadro No.9. Porcentaje de desarrollo de micelio acumulado sobre las brocas inoculadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

TRATAM/ DÍAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2 (1:10)	0	0	9	14	16	24	31	41	45	50
T3 (1:100)	0	0	0	2	7	17	22	33	41	48
T4 (1:1000)	0	0	0	2	4	7	9	13	21	26
T5 (1:10000)	0	0	0	0	0	1	7	11	14	18

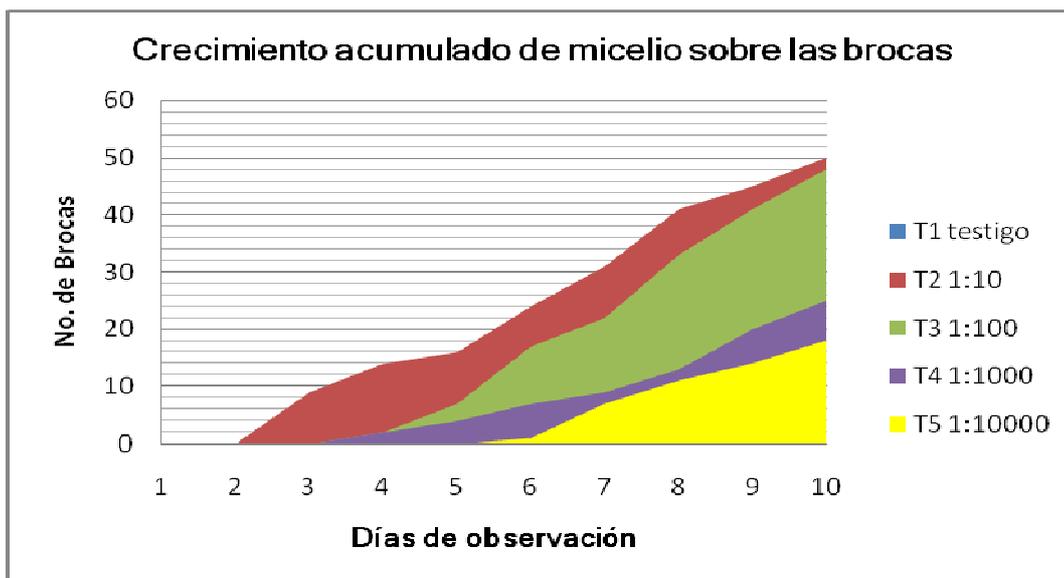


Figura No.17. Desarrollo de micelio acumulado sobre las brocas inoculadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

5.5. Mortalidad diaria de brocas infectadas.

En el Cuadro No.10 y Gráfico No. 2, se muestran que en el T1 no se observaron brocas muertas al finalizar el período de estudio. La mortalidad fue notable a partir del tercer día en el T2 con 9 brocas y continuo aumentando de tal manera que al finalizar la observación el 88% de las brocas estaban muertas. En T3 y T4, la mortalidad coincidió en el cuarto día, pero no con la misma eficacia ya que el T3 presento 9 brocas muertas y el T4 presento una y al finalizar de la observación el porcentaje de mortalidad fue de 76% y 57% respectivamente. En el T5, la disminución de la mortalidad fue notable ya que inicio a partir del quinto día y fue escasa con un insecto, pero fue aumentando durante el periodo de observación hasta llegar a un 39%.

Cuadro No.10. Porcentaje de mortalidad diaria de brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

TRATAM/ DÍAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2 (1:10)	0	0	9	7	10	11	19	12	5	25
T3 (1:100)	0	0	0	9	10	14	9	11	14	9
T4 (1:1000)	0	0	0	1	10	7	10	10	8	11
T5 (1:10000)	0	0	0	0	3	11	6	6	11	2

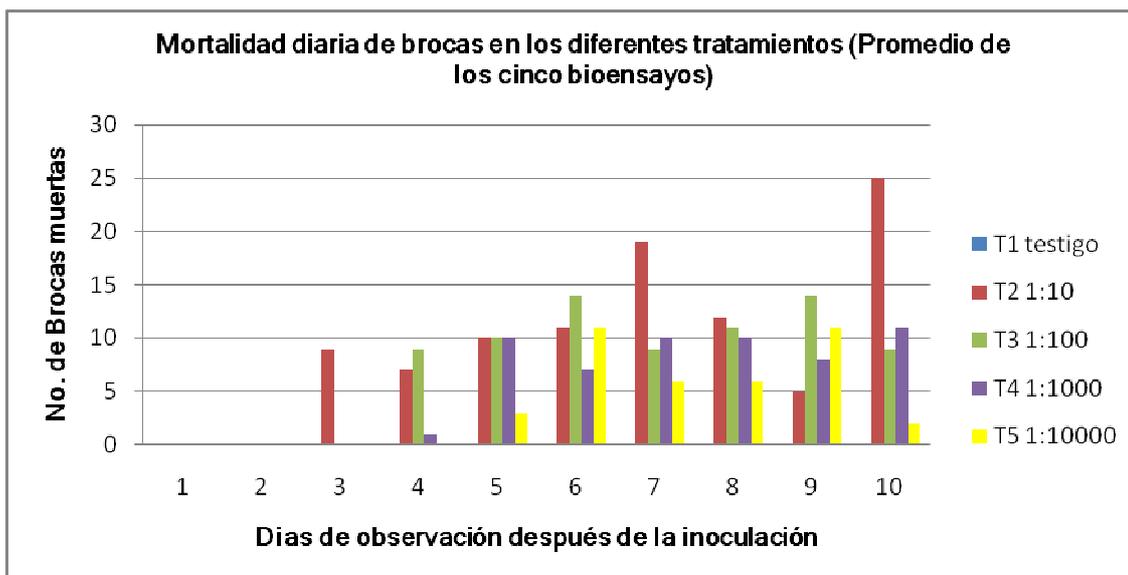


Figura No.18. Mortalidad diaria de brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

Cuadro No.11. Porcentaje de mortalidad acumulada de brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

TRATAM/ DÍAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2 (1:10)	0	0	9	16	26	37	56	68	73	88
T3 (1:100)	0	0	0	9	19	33	42	53	67	76
T4 (1:1000)	0	0	0	1	11	18	28	38	46	57
T5 (1:10000)	0	0	0	0	3	14	20	26	37	39

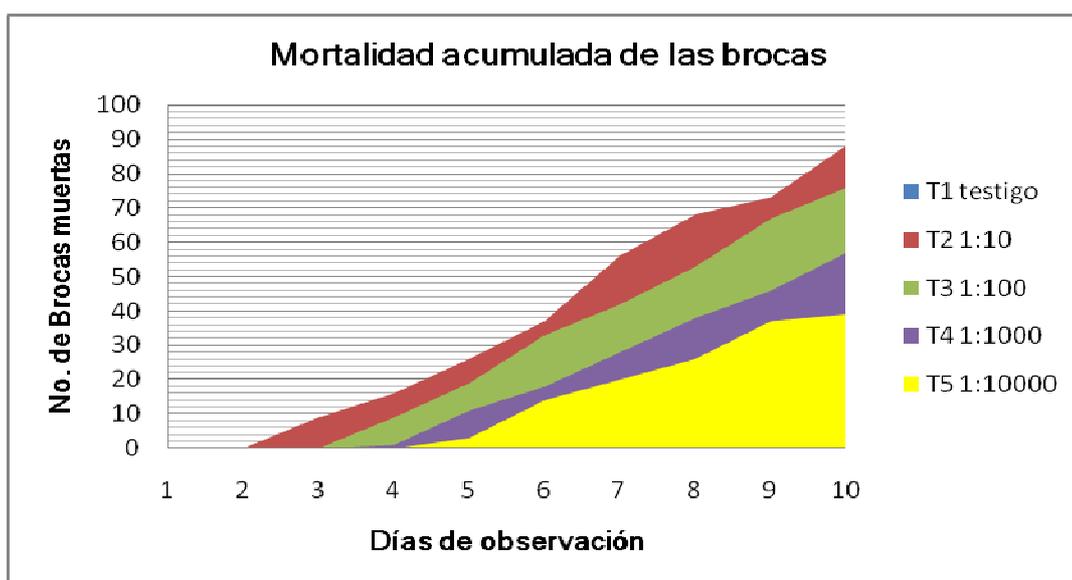


Figura No.19. Mortalidad acumulada de brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

5.6 Prueba de hipótesis y análisis estadístico.

En el análisis de varianza (ANOVA) el valor P es: 0.0063 de la prueba-F es menor que 0.05, por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 5 tratamientos utilizados con un nivel del 95.0% de confianza. Con este valor de P, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna, que demuestra que si existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Cuadro No.12. Tabla ANOVA para la determinación significativa entre los diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	327.801	4	81.9503	4.11	0.0063
Intra grupos	896.634	45	19.9252		
Total (Corr.)	1224.44	49			

Además el crecimiento de micelio y la mortalidad mantuvieron una relación directa con la mortalidad, según el índice de correlación de Pearson fue de 0.9854, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables mortalidad y crecimiento de micelio.

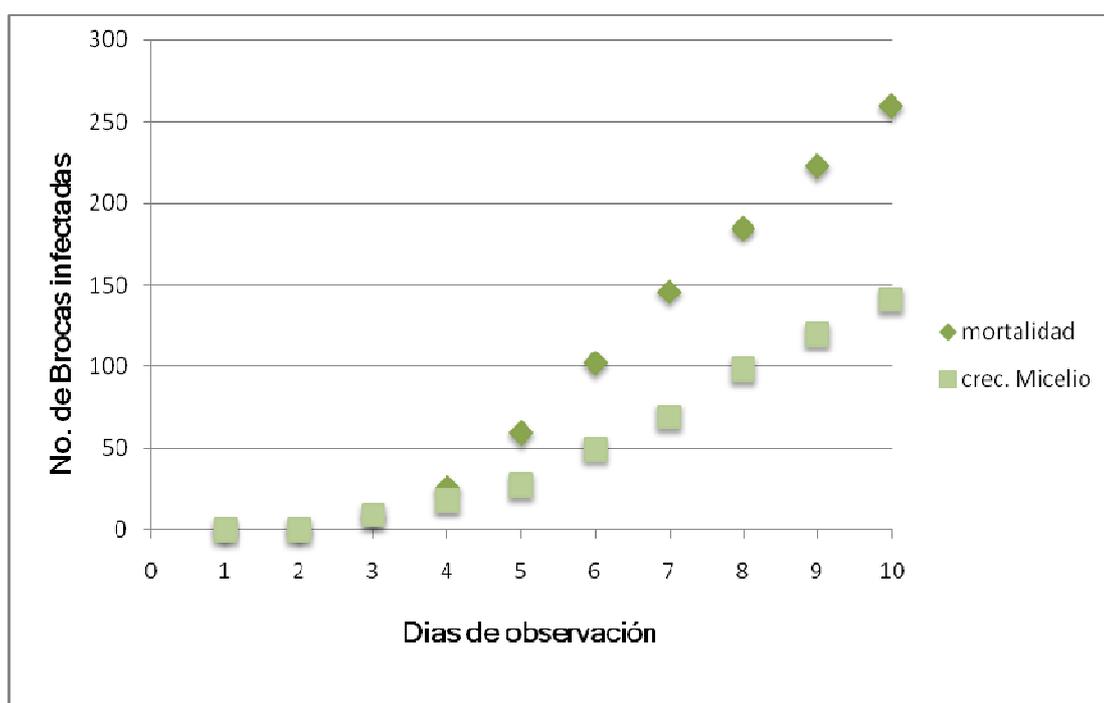


Figura No.20. Mortalidad vs crecimiento de micelio observado en las brocas infectadas con *B. bassiana* (Datos promedio de los cinco bioensayos).

VI. DISCUSIÓN.

El aislamiento del hongo *B. bassiana* a partir de las brocas recolectadas en campo fue un proceso efectivo y los resultados coinciden con González, *et al.*, (1993), y Arias, (2007), quienes aislaron el hongo a partir de brocas enfermas colectadas en campo, y observaron que se desarrolló el micelio en un periodo de cuatro a cinco días en medio de cultivo PDA. A través de esto se verifica lo que realizaron Monzón, (2001) y Arias, (2007), al aislar *B. bassiana* directamente a partir del cuerpo de la broca.

Las características morfológicas de *B. bassiana*, conidióforo sencillo en forma de zigzag, y fialides globosa en forma de botella en las cepas aisladas coinciden con las descripciones de Barnet & Hunter, (1992) y Arias, (2007).

La desinfección de las brocas con hipoclorito de sodio al 5% y agua destilada estéril, no inhibió la germinación del hongo *B. bassiana* en los diferentes tratamientos estudiados y los resultados son coincidentes con Jiménez, (1992) y Arias, (2007), quienes obtuvieron sobrevivencia de más del 80% de insectos en el tratamiento testigo al realizar la desinfección. Además concluyeron que este procedimiento permite dejar libres de cualquier organismo los insectos antes de aplicarles *B. bassiana*.

En cuanto a la reproducción de *B. bassiana* en medio de cultivo líquido a base de levadura y azúcar, se verificó que se reproduce en óptimas condiciones. Estos resultados coinciden con Solís, *et al.*, (2006), quienes manifiestan que la reproducción de este hongo en medio de cultivo líquido es un proceso conveniente y eficiente, si se compara con la producción de esporas de este mismo en medio de cultivo sólido. La máxima producción de esporas fue de 8.93×10^6 a las 120 horas, diferente a la determinada por Arias, (2007) y Bustillo, (1995), quienes produjeron 3.69×10^{11} y 4.0×10^{11} por gramo de arroz cosechado, respectivamente en un periodo de 10 días.

El hecho que *B. bassiana* mantuviera un crecimiento exponencial desde el primero hasta el tercer día; y que al cuarto y quinto día la tendencia de su crecimiento se mantuviera estable podría deberse a que la disponibilidad de nutrientes dentro del medio fue disminuyendo a medida se desarrollaba el hongo.

El hecho de haber observado que la mayor cantidad de esporas y blastosporas es a las 96 horas, concuerda con el rendimiento obtenido por Solís, *et al.*, (2006), aunque no en las mismas cantidades. Ellos obtuvieron un rendimiento máximo 4.3×10^8 de concentración de esporas por mililitro de *B. bassiana*. Sin embargo la diferencia es que utilizaron diferentes condiciones y componentes, fermentadores profesionales Marca Bioflo III de 71 y una combinación de impulsores Rushton Maxflo.

El haber encontrado esas cantidades en el lapso de 96 horas, indica que en ese tiempo es cuando se pueden extraer las esporas y blastosporas de los fermentadores artesanales para utilizarlas en aplicaciones a insectos o almacenarlas. Lo anterior fue evidente por el hecho de que en los cinco bioensayos realizados se observó un comportamiento similar en cuanto al crecimiento diario de esporas y blastosporas.

Los resultados de los bioensayos de patogenicidad de *B. bassiana* sobre las brocas sanas, concuerdan con los obtenidos por Arias, (2007) y Solís, *et al.*, (2006), quienes manifiestan que mientras mayor sea la concentración de esporas que se aplique sobre los insectos, mayores serán los niveles de infección y en menor tiempo.

Por otra parte, con respecto a la actividad de las brocas sobre el café pergamino después de ser sumergidas en los diferentes tratamientos, se evidenció que las brocas que fueron infectadas con mayor concentración de esporas demostraron poca actividad de brocado en los granos de café, es decir presentaron menor capacidad de causar daño y de penetrar en los frutos; estos resultados son concordantes con los obtenidos por González, *et al.*, (1993) y Arias, (2007) y tuvo relación con la actividad letárgica demostrada por las brocas infectadas por *B. bassiana* reproducida en medio de cultivo líquido, ya que los que presentaron menor actividad, fueron las que se les aplicó mayor cantidad de esporas. Esta observación es coincidente con los trabajos de González, *et al.*, (1993) y Arias, (2007) quienes manifiestan que al cabo de las 24 horas se pueden observar los primeros síntomas de la infección en las brocas tratadas con *B. bassiana*.

En cuanto a la mortalidad de las brocas tratadas con *B. bassiana*, las del tratamiento 2 morían a partir del tercer día después de haber sido tratadas, situación similar ocurrió, en los resultados de González, *et al.*, (1993), quienes observaron que las brocas infectadas morían a partir del tercer día después de haber sido tratadas. El hecho que en el resto de tratamientos la mortalidad haya iniciado a partir del cuarto y quinto día, indica que mientras mayor sea la concentración de esporas que se aplique sobre los insectos, mas rápido será el proceso de infección y muerte de los mismos.

En lo que concierne al desarrollo de micelio de *B. bassiana* en las brocas tratadas; el crecimiento de micelio sobre las brocas se observó a partir del tercer día después de aplicación, estos resultados no son concordantes con los de Solís, *et al.*, (2006), quienes obtuvieron brocas invadidas por micelio del hongo desde las 24 horas, quedando totalmente cubiertas a los ocho días después de haber sido infectadas; esto probablemente porque las condiciones fueron diferentes. Este parámetro mantuvo una relación directa con la mortalidad, según el índice de correlación de Pearson que fue de 0.9854, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables mortalidad y crecimiento de micelio.

El conocimiento de estos diferentes aspectos es importante, porque a partir de ellos se puede inferir y/o determinar la forma de acción de *B. bassiana* reproducido en medio de cultivo líquido sobre la broca del fruto del cafeto. Además, permite observar las ventajas de utilizar medios líquidos para su reproducción, con respecto a los medios sólidos; al respecto Arias, (2007) y Barquero, (2008) mencionan que utilizando sustrato sólido se obtienen unidades infectivas a los 10 y 20 días respectivamente, posteriores a la inoculación mientras que en medio líquidos se obtienen en 5 días. Por lo tanto la fermentación en medio de cultivo líquido es la principal y más económica metodología para producir *B. bassiana*, ya que se obtienen mejores resultados en corto tiempo, comparada con el medio sólido.

VII. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- Se aisló *B. bassiana* a partir de brocas infectadas recolectadas en campo.
- Se obtuvieron esporas y blastosporas de *B. bassiana* en 24 horas en medio de cultivo líquido a base de azúcar, levadura y agua destilada utilizando fermentadores artesanales.
- La mayor cantidad de blastosporas se observó al tercer y cuarto día.
- La concentración máxima de esporas de *B. bassiana*, se obtuvo al quinto día de observación.
- La metodología empleada para los bioensayos de patogenicidad permitió establecer la evaluación directa del hongo sobre la broca.
- De las diluciones estudiadas la más efectiva fue la **T2 1:10**, lo que demuestra que a mayor concentración de esporas del hongo se obtendrá una infección más rápida y eficiente sobre la broca.
- En el **T2 1:10**, el 88 % de las brocas infectadas se murieron a los diez días de observación.
- La fermentación en medio de cultivo líquido es la principal y más económica metodología para reproducir *B. bassiana*, ya que se obtiene una mayor esporulación en menor tiempo comparada con el medio sólido.

VIII. RECOMENDACIONES.

- Continuar las evaluaciones de aplicación de *B. bassiana* producida en medio de cultivo líquido y observar en condiciones de campo.
- Realizar más estudios para perfeccionar la formulación y almacenamiento viable.
- Realizar un estudio de variabilidad de patogenicidad aislando cepas de diferentes sitios, para identificar cepas más patógenas y resistentes a las condiciones ambientales.
- Utilizar diferentes concentraciones de azúcar en el medio de cultivo líquido, para determinar el efecto en el crecimiento del hongo *B. bassiana*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Antia, O. P., Posada, C. J., Bustillo, A. E. & González, M. 1992. Producción del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avances técnicos Cenicafé. 51 (182): 9-12.
- Arias Zepeda, E. M. 2007. Aislamiento y patogenicidad del hongo nativo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Controlador biológico de la broca del café. *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador. (Tesis de Ingeniería) 52 p.
- Barnet, H. L. & Hunter, B. B. 1992. Illustrated genero of imperfect fungi. 3^o edition Mineapolis, Burges public. Co. 241p.
- Barrera Jiménez, Y. I. & Menjivar Cruz J. E. 2004. Reproducción masiva de tres cepas de *verticillium* sp. hiperparásito de la “roya del café” (*Hemileia vastatrix*), en fermentadores artesanales a tres concentraciones diferentes de melaza. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad de El Salvador. (Tesis de Licenciatura) 60 p.
- Barquero Miranda, M. 2008. Producción de *Beauveria bassiana* mediante fermentación líquida. Instituto del Café de Costa Rica. Icafe. Revista informativa. Costa Rica. 16 p.
- Bautista Martínez, N. & Díaz Gómez, O. 2001. Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas. Editorial Sagitario. México. 148 p.
- Bustillo Pardey, A. E. 1995. El uso del hongo *Beauveria bassiana* como un componente en el programa de manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei*. Congreso encolen 22, Santa Fe de Bogotá. 85 p.
- Calderón, V. E. & Cortés, L. F. 1993. Como aislar el hongo *Beauveria bassiana* directamente de la broca. Cenicafé. Colombia. 40 (8): 30-45.
- Canjura Sanabria, E. M. 2000. Reproducción Masiva de *Verticillium* sp. Hiperparásito de roya del café, *Hemileia vastatrix*. (Tesis de Maestría). Turrialba, Costa Rica. CATIE. 62p.

- Carballo, V. M., Rodríguez, L. & Durán, J. 2001. Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control del picudo del chile en laboratorio. México. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Costa Rica. 62: 54-59.
- Chong Rodríguez, M. J., Galán Wong, L. J. & Sandoval Coronado, C. F. 2006. Evaluación de la estabilidad al almacenaje de esporas de *Beauveria bassiana* producidas en cultivo líquido. Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, México. En Línea: csandova@ccr.dsi.uanl.mx. (Consultado en junio, 2008)
- Díaz Vicente, V. M., Blanco Hernández, C. N., Cabrera Alvarado, M. E., Magallanes, C. R., Pinson Rincón, E. P. & Pérez Quintanilla, J. N. 2007. Coadyudantes en la aplicación de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Para el control de *Hypothenemus hampei* Ferr. En Cacahoatán, Chiapas, México. 550- 554.
- Gallegos, M. G., Olayo Paredes, R. P., Guerrero, R. E., Sánchez Valdez, V. M., Sánchez Pérez, F. J., Cepeda, S. M. 2005. Evaluación de formulaciones de *Beauveria bassiana* (Vuill) en el campo contra el picudo de la yema del manzano *Amphidees spp.* En Arteaga, Coahuila, México. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Costa Rica. 76: 57-63
- Godoy, J. C., Valera, R. E., Guédez, E., Cañizalez, L. M. & Castillo, C. 2006. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. En línea: http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/29387892.html (Consultado en junio, 2008)
- González García, M. T., Posada Flores, F. J. & Bustillo Pardey, A. E. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafé. Colombia. 44(3): 93-100
- Hernández, G. J. 2000. Contra la broca del café. México. En línea: http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=46&id_art=984&id_ejemplar=61(Consultado en abril, 2008)

- Jiménez, J. A. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. *Cenicafé*. Colombia. 43 (3): 84-98.
- Kouassi, M. 2001. La posibilidad del control microbiológico basándose en el hongo entomopatógeno. Québec Montreal. En línea: [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/). (Consultado en Febrero, 2008)
- Koch, K. C., Espinosa, O., Tandazo, A. & Peisneros, D. 1988. Factores naturales de la regulación y control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Sanidad vegetal*. 25 (3): 20-30.
- Lozano Contreras, M. G., Elías Santos, M. & Nava Camberos, U. 2007. Evaluación de las blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus*, producidas en medios de cultivo líquido contra *Bemisia argentifolii* sobre cultivos de algodón. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 502- 507.
- Méndez, L. I. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Coleóptero: Scotilidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromicetes) en el Soconusco, Chiapas, México. (Tesis de Maestría) 135 p.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de plagas*. 51(63): 95-103
- Narváez, G. M., González, M.T., Bustillo Pardey, A. E., Chávez, C. B. & Montoya, E. C. 1997. Producción de esporas de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarrizium anisopliae* cultivados en arroz sobre la broca del café. Congreso de la sociedad Colombiana de entomología. 23 Cartagena. Julio 17-19. In. Maya M. A. L.; Delgado R. N. C. Información científica técnica producida por Cenicafé. P 379.
- Parada Jaco, R. Y. & Serrano, R. F. 1998. Hongos entomopatógenos: una alternativa para controlar insectos sin contaminar el medio ambiente.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. El Salvador. 27p.

Posada, 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) octubre23-25, 1996. Comité departamental de cafetaleros de Antioquia SIADA- Cenicafé. P. 25-26.

Sibaja, G. & Jiménez, M. 1989. La broca del café. MAG. San José, Costa Rica. 16pág.:En línea: <http://html.rincondelvago.com/control-biologico-de-la-broca-del-cafe.htm>. (Consultado en Marzo, 2008)

Solís Soto, A., García Gutiérrez, C., González Maldonado, M. B., Medrano Roldan, H. & Galán Wong, L. J. 2006. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* contra palomilla del manzano *Cydia Pomenella* L. (Lepidóptera: Tortricidae)

X. ANEXOS.

ACTIVIDADES	MESES DEL AÑO											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cosecha estricta (seria ideal)	■									■	■	■
Pepeña	■	■										
Énfasis en REPELA	■	■										
PODA DE CAFETOS	■	■	■									
REGISTRO DE FLORACIONES	■	■	■									
TRAMPEO			■	■	■	■						
CONTROL DE MALEZAS						■		■		■		
PODA DE ARBOLES DE SOMBRA					■	■	■		■			
Estimar NIVELES DE INFESTACIÓN (para decisión de aplicación de <i>B. bassiana</i>)				■	■	■	■	■				
CORTE DE FRUTOS de floraciones anormales					■	■	■					
APLICACIÓN de <i>B. bassiana</i>							■	■				
CONTROL BIOLÓGICO (<i>Cephalonomia stephanoderis</i>)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Anexo No. 1. Cronograma de actividades que se realizan para el control de la broca del cafeto *Hypothenemus hampei*.

SINTOMATOLOGIA

TRATAMIENTO/ DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)										
T2 (1:10)										
T3 (1:100)										
T4 (1:1000)										
T5 (1:10000)										

CRECIMIENTO DE MICELIO EN LAS BROCAS

TRATAMIENTO/ DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)										
T2 (1:10)										
T3 (1:100)										
T4 (1:1000)										
T5 (1:10000)										

MORTALIDAD DE BROCAS

TRATAMIENTO/ DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 (testigo)										
T2 (1:10)										
T3 (1:100)										
T4 (1:1000)										
T5 (1:10000)										

Anexo No 2. Hoja de anotación diaria por cada bioensayo con parámetros observados: sintomatología, crecimiento de micelio y mortalidad sobre las brocas infectadas con *B. bassiana*.