

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE SEIS CEPAS DE *Beauveria bassiana*
SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ, *Hypothenemus hampei* (FERRARI), EN CHIAPAS,
MEXICO**

POR:

NORMA RAQUEL FERRERA GOMEZ

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO



CATACAMAS, OLANCHO,

HONDURAS, C. A.

DICIEMBRE, 2011.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE SEIS CEPAS DE *Beauveria bassiana*
SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ, *Hypothenemus hampei* (FERRARI), EN CHIAPAS
MEXICO**

POR:

NORMA RAQUEL FERRERA GOMEZ

JAIME GOMEZ Dr.

Asesor Principal en México

RAUL ISAIAS MUÑOZ M. Sc.

Asesor Principal en Honduras

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C. A.

DICIEMBRE, 2011.

ACTA DE SUSTENTACIÓN

DEDICATORIA

A DIOS, por darme la oportunidad de haber finalizado mi mayor sueño, por haberme brindado ese amor incondicional y porque en los momentos malos y buenos el estuvo allí, por haberme brindado esas fuerzas, fe y esperanza en momentos difíciles. Por haber brindado esa paciencia y fortaleza y poder vencer toda clase de obstáculos que se me presentaron en mí camino.

A MIS QUERIDOS Y APRECIABLES PADRES: JOSE PILAR FERRERA CANTARERO Y MARIA MARCOS GOMEZ

Que sin la ayuda de ellos no hubiera sido posible, culminar mi carrera y por haberme enseñado que todo en la vida se puede, por darme el ánimo, la fuerza y ese amor que nunca me faltó, los amo.

A MIS QUERIDOS HERMANOS, SUYAPA, FATIMA, LUZ, DEYSY, ROBERTO, JOEL, IMER Y MARVIN, por ese gran apoyo que me brindaron, que con tantas dificultades todo se hizo posible, por los consejos y el cariño que a cada momento me brindaron.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar le agradezco **A DIOS** por su inmensa misericordia al haberme brindado la confianza, fe y esperanza en momentos difíciles, y por haberme dirigido por el camino correcto guiando mis pasos.

A mi alma mater la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA** por prepararme y permitirme terminar mis estudios universitarios; así como a cada uno de los Profesores y Técnicos que me brindaron mucho de sus conocimientos de campo como en el salón de clase.

Mis mas sinceros agradecimientos a mis asesores aquí en Honduras, como en México.

A mi asesor en Honduras M.Sc. Raúl Isaías Muñoz, le agradezco por haberme ayudado en cada paso de mi tesis, por el conocimiento adquirido, por los consejos brindados, y por la confianza que me regalo, gracias por haber estado cuando lo necesite.

A mi asesor en México Dr. Jaime Gómez, por haberme enseñado muchas cosas, por esa paciencia brindada, y por estar con migo en cada paso de la realización del experimento, muchas gracias doctor, porque sin su ayuda se me hubiera hecho mas difícil, y por haber estado cerca de mi en los momentos de alegría y tristeza en México.

A mis asesores secundarios M.Sc. Héctor Fernández y Ph. D. Roy Menjivar, por los consejos y por haberme ayudado en momentos que los necesitaba y la comprensión brindada.

A mis amig@s Dina Morales, Nansy López, Thelma Figueroa, Iris Quintero, René Pérez, y Joel Aucedá también a mis amigos en México que me ayudaron mucho en especial a Ricardo Toledo. Gracias por esos ánimos que a cada momento me brindaban, y por esa amistad que me brindaron, los llevo en mi corazón, fueron una admiración para seguir. Que en buenos y malos momentos estuvieron cuando los necesite.

A mis compañeros que realizamos la tesis en ECOSUR, por haber compartido juntos momentos buenos.

CONTENIDO

pág

ACTA DE SUSTENTACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBEJTIVOS	3
2.1 General.....	3
2.2 Específicos	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Generalidades	4
3.2 Ciclo de vida de <i>Hypothenemus hampei</i>	5
3.2.1 Características morfológicas.....	5
3.2.2 Los huevos	5
3.2.3 Las larvas.....	6
3.2.5 Los adultos.....	6
3.3 Vida y hábitos de la broca.....	7
3.4 Bioecología	8
3.5 Control biológico de la broca de café con el hongo <i>Beauveria bassiana</i>	8
3.6 Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i>	10
3.7 Ciclo de vida de <i>Beauveria bassiana</i>	10
3.7.1 Germinación de las esporas	10
3.7.2 Adhesión y germinación de las esporas en la cutícula de los insectos.....	10
3.7.3 Penetración dentro del hemocèle	11
3.7.4 Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto	11
3.8 Morfología de <i>Beauveria bassiana</i>	12
3.9 Relación huésped – entomopatógeno - ambiente	13

3.9.1 Factores que afectan el desarrollo de los hongos	14
3.9.2 Factores ambientales	15
3.10 Toxinas de <i>Beauveria bassiana</i>	16
3.11 Dosis estudiadas del hongo y patogenicidad sobre diferentes plagas	17
3.11.1 Estudios a nivel de laboratorio	17
3.11.2 Estudios a nivel de campo	19
IV. MATERIALES Y METODO	20
4.1 Descripción del lugar	20
4.2 Metodología	21
4.2.1 Condiciones del cuarto de cría.	21
4.2.2 Obtención y desinfección de las brocas adultas.....	21
4.2.3 Bioensayos.....	21
4.2.4 Descripción de las cepas evaluadas.....	23
4.2.5 Pruebas de viabilidad	24
4.2.6 Patogenicidad de <i>B bassiana</i> y determinación de TL ₅₀	24
4.2.7 Determinación de la CL ₅₀	25
4.2.8 Determinación del tiempo letal medio (Tl ₅₀).....	26
4.3 Análisis estadístico	26
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1. Pruebas de patogenicidad.....	27
5.2. Tiempos letales.....	29
5.3 Concentraciones letales.....	30
VI. CONCLUSIONES	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. BIBLIOGRAFIA	34
ANEXOS	42

LISTA DE TABLAS

Tabla1. Origen de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i>	pág. 23
Tabla 2. Valores de CL50 con sus límites fiduciales inferiores y superiores.....	31

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Principales estructuras morfológicas del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	13
Figura 2. Mapa del estado de Chiapas y ubicación de la ciudad de Tapachula.	20
Figura 3 Mortalidad ocasionada por las diferentes cepas de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	28
Figura 4. Mortalidad diaria acumulada de adultos de <i>Hypothenemus hampei</i> expuestas a varias cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en laboratorio.....	30
Figura 5 Mortalidad provocada por <i>B. bassiana</i> sobre <i>H. hampei</i> a diferentes concentraciones de las cepas evaluadas.	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Análisis de varianza realizado a los porcentajes de mortalidad de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i> evaluadas sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	43
Anexo 2 Patogenicidad del hongo <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	43
Anexo 3 Ingredientes para hacer la dieta meridica, para la alimentación de la broca.....	43
Anexo 4 Prueba de Tukey, para la mortalidad de cada una de las cepas.....	44

Ferrera, N.R. 2011. Patogenicidad y virulencia de seis cepas de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Chiapas, México, Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras. 56p.

RESUMEN

Con el fin de determinar la patogenicidad y virulencia de seis cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) Ferrari, se realizó un estudio en el laboratorio de entomología de ECOSUR, Tapachula, México, utilizando seis cepas: (BbHond3, y BbHond4 de Honduras y Bb25, BbCryss, BbRhyss y BbCom, de México). Los datos obtenidos a los diez días después de la inoculación, mostró que las cepas BbHond3, BbRhyss, BbCryss y BbCom fueron las que tuvieron los mayores porcentajes de mortalidad por arriba del 50%, con el 60.6, 60.0, 53.3 y 51.8 % respectivamente. En tanto que las cepas que no alcanzaron el 50% de mortalidad sobre las brocas fueron la Bb25 y BbHond4, así como el testigo, los cuales obtuvieron los siguientes porcentajes, 47.8, 31.4 y 9.29 % en orden descendiente. Existiendo diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.05$). Los resultados muestran que BbRhyss es la cepa mas agresiva con una concentración de 4.68×10^6 conidias/ml ya que requiere menor número de esporas para matar al 50% de la población de adultos de *H. hampei*. El tiempo letal medio (TI_{50}) para las cepas bajo las condiciones de laboratorio fue de nueve días para las cepas, BbRhyss y BbHond3; concluyendo que estas fueron las mejores cepas por ocasionar la mayor mortalidad de los adultos de la broca.

Palabras claves *Hypothenemus hampei*, *Beauveria bassiana*, Virulencia, Patogenicidad, hongo.

I. INTRODUCCIÓN

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae) fue originalmente descrita por Ferrari en 1867 a partir de especímenes encontrados en café procesado, sin embargo, la primera noticia de su presencia como plaga data de 1901 cuando fue reportada en Gabón (Le Pelley 1968). Es la plaga más perjudicial para la caficultura regional y mundial, ya que coloniza los frutos desde que el grano está en estado lechoso y destruye gran parte de ellos, ocasionando fuertes pérdidas en la cosecha (Urbina 1989, Barrera 2005).

Aunque actualmente se dispone de varias estrategias para el manejo de la broca, en muchas ocasiones no se puede prescindir del uso de insecticidas el cual puede ser químico sintético, biológico y/o botánico (Rodríguez *et al.* 2006).

El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) y el Instituto Hondureño del Café (IHCAFE), así como en la mayoría de instituciones relacionadas con el cultivo de países productores de café, están orientando su tecnología cafetalera a la conservación del ambiente por medio del control biológico el cual incluye el uso de organismos benéficos tales como los parasitoides: *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta*, *Phymastichus coffea*; así como el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control de esta temible plaga.

Entre los hongos patógenos, *Beauveria bassiana* es el más utilizado para el control biológico de la plaga porque proporciona un buen control sobre la broca del café por su alta adaptabilidad a los agroecosistemas cafetaleros (Veles y Benavides 1990).

En el presente estudio, se evaluó la patogenicidad y virulencia de seis cepas del hongo *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* las que fueron colectadas del cuerpo de insectos plaga de importancia económica en diferentes cultivos.

II. OBEJTIVOS

2.1 General

- ✓ Determinar la patogenicidad y virulencia, bajo condiciones de laboratorio de seis cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) Ferrari.

2.2 Específicos

- ✓ Determinar el grado de susceptibilidad que tienen los adultos de (*H. hampei*) a las cepas de *B. bassiana*, estudiadas.
- ✓ Identificar la o las mejores cepas de *B. bassiana*, en base al grado de patogenicidad mostrada en laboratorio contra la broca de café (*H. hampei*).
- ✓ Seleccionar la dosis optima de las mejores cepas de *B. bassiana* para el control de la broca de café (*H. hampei*).

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades

El cultivo del café (*Coffea arabica* y *C. canephora*) tiene importancia económica, social, cultural y ambiental en todo el mundo. La broca del café *Hypothenemus hampei* destaca entre las limitantes más importantes de este cultivo y es considerada como el insecto plaga más dañino del fruto del café (Le Pelley 1968).

H. hampei fue reportado por primera vez en Centro América, en 1971 Guatemala y en 1977 Honduras. En 1978, la broca entró a México desde Guatemala a través del Soconusco, Chiapas. De acuerdo con (Villaseñor 1987), el insecto fue detectado en agosto de ese año en una cereza recogida en un beneficio de café húmedo (Barrera 2005). En 1983 fue reportado en el Salvador y en 1988 en Nicaragua. Actualmente la broca está presente en más de 60 países productores de café distribuidos en las regiones tropicales de África, Asia, América y Oceanía (Castro 1990).

Una alternativa biológica para el manejo integrado de la broca del café es la aplicación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals Buill) (De la Rosa *et al.* 2000). Estudios realizados en Camerún, Guatemala, Brasil y Costa Rica demuestran que *B. bassiana* puede matar a la broca en condiciones de laboratorio y de campo (Jiménez 1992). En México, esta plaga ha sido objeto de diversas investigaciones sobre su bioecología bajo las condiciones de los cafetales del sureste de Chiapas (Barrera 1995).

3.2 Ciclo de vida de *Hypothenemus hampei*

El ciclo de vida (de huevo a adulto) de este insecto dura entre 21 y 63 días variando en función de las condiciones climáticas. Generalmente la hembra perfora el fruto por la corona o disco, aunque también lo puede perforar por un lado si este presenta un 20% o más de materia seca. Dos días después de instalarse en el fruto, la hembra comienza a poner los primeros huevos, poniendo entre 1 a 3 huevos por día, que eclosionarán en una proporción de 10 hembras por cada macho (Barrera *et al.* 2008).

3.2.1 Características morfológicas

Los adultos tienen su cabeza en forma globular escondida dentro del protórax. Las antenas son en forma de codo, con los últimos cinco segmentos unidos formando una diminuta bolita. Los ojos son planos y no convexos la sutura media frontal de la cabeza es larga y bien definida, el protórax, en su margen delantero, está armado con 4 a 7 dientes o espinas.

Los élitros presentan pequeñas cantidades deprimidas longitudinales; siendo por lo menos ocho veces más largas que anchas, el segundo par de alas membranosas, está presente solo en las hembras y atrofiada en los machos, por lo que estos no pueden volar (Urbina 1989).

3.2.2 Los huevos

Son de forma globosa, ligeramente elípticos de cutícula brillante. Recién ovipositados son de color blanco lechoso y a medida que el período de incubación progresa se tornan blancos hialinos; próximos a su eclosión son de color amarillentos. El tamaño oscila entre 0.45 a 0.83 mm de largo y la etapa dura de 6 a 10 días en condiciones de laboratorio.

Los huevos provenientes de hembras vírgenes difieren de los fecundados por presentar éstos un aspecto lechoso, sin brillo. Antes de la eclosión los huevos fecundados se tornan amarillentos (Urbina 1989).

3.2.3 Las larvas

Las larvas son apodas de color blanco cremoso con la cabeza mas oscura; recién emergidas su tamaño promedio es de 0.83mm, esta es la fase fisiológica en la cual la broca causa el mayor daño al fruto del café. Las hembras pasan por dos estadíos, mientras que los machos solo por uno, el estado larval dura de 10 a 26 días, los cuales pasa alimentándose dentro del endospermo (Fernández y Cordero 2007).

Las larvas se alimentan de los granos excavando pequeñas galerías, a partir de la galería principal dejada por el adulto, el número de mudas larvarias es de una para los machos y dos para las hembras (Le Pelley 1968).

3.2.4 Las pupas

Tienen coloración amarillenta al inicio, cambiando a pálido poco antes de la emergencia del adulto (Urbina 1989). Según Fernández y Cordero (2007), las pupas de la broca son de color blanco y se tornan marrones a medida que se formaron los apéndices externos (antenas, patas y alas), indicando que el adulto esta próximo a emerger. El tamaño de las pupas varia según el sexo, con un promedio de 1.89 mm las hembras y 1.22 mm los machos.

3.2.5 Los adultos

Según Urbina, (1989) los adultos recién emergidos son de color pardo claro cambiando a negro conforme avanza su edad. El macho carece de alas funcionales, por lo que solo la

hembra es capaz de volar y es quien realiza la infestación de los nuevos frutos. Los machos miden 1.0 a 1.25 mm y las hembras 1.37 a 1.82 mm de largo y de 0.66 a 0.88 mm de ancho, (Barrera *et al.* 2006).

3.3 Vida y hábitos de la broca

La broca es atraída al fruto por estímulos visuales y olfativos, donde intervienen el olor, color y la forma de los frutos (Mathieu *et al.* 2001). En estudios de olfatometría se observó que existen diferencias en atraktividad entre distintas especies y variedades de café (Castro 1990).

Las hembras penetran en el grano, por un agujero circular, donde posteriormente colocan sus huevos, los cuales eclosionan a los 5 a 9 días después. Las hembras alcanzan su madurez sexual a los 3 o 4 días después de haber emergido, para lo cual, después de aparearse, son capaces de poner huevos. El apareamiento se realiza entre hermanos y dentro del fruto donde se desarrollaron. Después de la cópula, las hembras abandonan los frutos y buscan nuevos frutos para continuar su descendencia. No requieren realizar largos vuelos para la búsqueda, pero bajo condiciones experimentales se ha observado que pueden desplazarse hasta 346 m. Los machos en cambio, no abandonan el fruto en que nacieron porque no pueden volar (Le Pelley 1968).

Las hembras siempre predominan, variando la proporción de sexos según el grado de infestación. En períodos de reproducción plena sobre el cultivo, se encuentran diez hembras por cada macho, en cambio, cuando la población ha sido reducida por la recolección de cerezas, la población residual puede estar compuesta principalmente por hembras, ya que estas viven más que los machos. La vida media de una hembra es de 156 días mientras que los machos viven 103 días, si las condiciones son favorables pueden darse siete generaciones por año (Le Pelley 1968).

En Honduras, se ha encontrado que bajo condiciones de laboratorio, algunas hembras adultas de *H. hampei* son capaces de producir huevos fértiles, en forma partenogenética, hasta una segunda generación. Entre los huevos ovipositados partenogenéticamente, algunos pueden ser fértiles y otros infértiles (Muñoz 1989).

Cuando la hembra llega a un nuevo fruto, le toma aproximadamente de 6 a 7 horas para penetrar el endospermo donde construye una galería en forma piriforme, la que utiliza como cámara de oviposición (Urbina 1989).

3.4 Bioecología

En México, esta plaga ha sido objeto de diversas investigaciones sobre su bioecología bajo las condiciones de los cafetales en Soconusco, Chiapas. Resumiéndose de la siguiente manera. Las hembras de *H. hampei* son estimuladas por las primeras lluvias del año, entre marzo y mayo, para dejar los frutos viejos de café de la cosecha anterior e infestar a los nuevos frutos. Normalmente una sola hembra ataca a un fruto, perforándolo por su parte apical para introducirse a una de las semillas y construir galerías donde va a ovipositar 1 a 2 huevos diarios hasta alcanzar de 25 a 35 en un mes (Barrera *et al.* 1997).

Las hembras vírgenes llegan a poner huevos pero éstos no son fértiles. Las larvas son apodas y se alimentan de la semilla durante unas dos semanas; el estado de pupa transcurre en las galerías y los nuevos adultos se aparean entre hermanos antes de abandonar el fruto. Los machos son más pequeños y menos abundantes que las hembras (Barrera, *et al.* 1997).

3.5 Control biológico de la broca de café con el hongo *Beauveria bassiana*

Los hongos del grupo mycota usados para el control de insectos son llamados entomopatogenos, y son microorganismos ampliamente estudiados, existiendo más de 700 especies, distribuidos en 100 géneros, (De la Rosa y Alatorre 2008).

Muchos hongos patógenos se encuentran en las siguientes subdivisiones; Zygomycotina, Ascomycotina, y Deuteromycotina, dentro de las clases Zygomycetes, Hyphomycetes, Pyrenomycetes y Laboulbeniomycetes, y los órdenes Entomophthorales, Moniliales, Sphaeriales, y Laboulbeniales (Tanada y Kaya 1993).

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. Vuill. (Hyphomycetes) es un entomopatógeno generalista y cosmopolita que se puede encontrar en todo el planeta, pero solo en condiciones propicias para su reproducción. Se han recolectado varias decenas de cepas en cafetales de diversos países (De la Rosa *et al.* 1997, Bustillo *et al.* 2002). Se le considera como un agente de control biológico efectivo cuando se usa dentro de un plan de manejo integrado de la broca (*H. hampei*) (Coleóptera: Curculionidae, Scolytinae), y como tal, su uso ha sido ampliamente extendido (Castillo *et al.* 2009).

En 1993 se iniciaron estudios con entomopatógenos para el manejo de la broca del café, particularmente con *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff Sorokin) (De la Rosa *et al.* 1995; De la Rosa *et al.* 1997; De la Rosa *et al.* 2000). Evaluándose varias cepas en laboratorio y las más promisorias fueron aplicadas en campo. Por lo general las cepas de *B. bassiana* fueron más agresivas contra la broca del café que las cepas de *M. anisopliae*, (Barrera 2005).

En los últimos años ha aumentado el interés en las investigaciones sobre hongos entomófagos, debido a que las epizootias causadas por ellos han jugado un papel determinante en la regulación de poblaciones de insectos. Echeverría (2006) menciona que la utilización de *B. bassiana* como controlador biológico, ha llevado una gran inversión en investigación y producción en diferentes países, debido a su gran potencial y efectividad para el control de muchas plagas insectiles. Además de su facilidad de producción en masa, disponibilidad para aislarla y adaptabilidad para producirla en diferentes medios.

3.6 Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*

Phyllum	Plantae
División	Mycota
Sub division	Eumicotina
Clase	Deuteromicetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Genero	Beauveria
Especie	bassiana (Bálsamo)
Fuente: Ames, 1984	

3.7 Ciclo de vida de *Beauveria bassiana*

Según Carballo y Guharay (2004). El ciclo de *B. bassiana* comprende dos fases: una patogénica y la otra saprofítica. La fase patogénica involucra cuatro pasos: Adhesión, germinación, diferenciación y penetración, mientras que en la fase saprofítica ocurre la germinación y esporulación fuera del hospedante. El proceso de infección se inicia con la unión de los conidios del hongo a la cutícula del insecto.

3.7.1 Germinación de las esporas

Según Tanada y Kaya (1993). La enfermedad producida por hongos se llama micosis, la cual puede ser separada en tres fases, adhesión, penetración y colonización. Cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables, las conidias germinan produciendo conidias infectivas, dando inicio nuevamente al ciclo biológico del hongo.

3.7.2 Adhesión y germinación de las esporas en la cutícula de los insectos

El proceso de adhesión es el primer contacto que tiene las conidias con la superficie cuticular del hospedero, mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer y alargarse da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura

ambiental. Las esporas que germinan en el insecto forman un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula en los puntos de contacto o simplemente es una transición hacia la formación del pico o estaquilla de penetración Carballo y Guharay (2004). La germinación ocurre en un mínimo de 12 horas, las condiciones óptimas para la germinación son: temperatura de 23 a 25°C y humedad relativa del 92%. (Carballo y Guharay 2004).

3.7.3 Penetración dentro del hemocele

La penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula principalmente por las partes frágiles y la participación de la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. Además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización, presencia de sustancias nutricionales y antifungosas y estado de desarrollo del insecto (Charnley 1984).

La digestión del integumento se produce mediante las enzimas producidas durante la germinación y penetración que son (proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y quitinasas) que actúan en un orden determinado por el sustrato de la cutícula primero sobre la porción cerosa de la epicutícula y luego sobre la matriz de proteína y quitina. Cuando la hifa ha llegado al hemocele, se pueden producir diferentes reacciones de defensa del insecto frente a un cuerpo extraño: la fagocitosis, encapsulación celular y la formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. En este caso, el hongo debe vencer el sistema inmunológico del hospedante antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto (Tanada y Kaya 1993).

3.7.4 Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto

A partir de la penetración se inicia el desarrollo del hongo, luego de que llegue al hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente, desarrollando

protoplastos, elementos discretos ameboideos, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante y produciendo micotoxinas (Pérez 2004). La hifa que penetra sufre un engrosamiento y se ramifica, inicialmente en el tegumento del insecto y posteriormente en la cavidad del cuerpo. A partir de ese momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales, puede que no ocurra gran crecimiento hifal antes de la muerte del insecto (Tanada y Kaya 1993).

La colonización de los órganos presenta la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de malpighi, sistema nervioso, músculos y tráquea. El tiempo para la colonización del insecto puede variar de 3 a 5 días dependiendo de huésped, patógeno, y de las condiciones ambientales (Tanada y Kaya 1993).

Después del crecimiento del hongo en el hemocele, se producen los síntomas fisiológicos del insecto afectado como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (deja de alimentarse, reduce su movimiento), entra en un estado letárgico y finalmente muere, lo que puede ocurrir relativamente rápido o en unos cuantos días.

Con la muerte del insecto termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza la fase saprofítica: el hongo crece en el hemocele formando masas micelianas que salen al exterior fundamentalmente por las regiones intersegmentales (esporulando sobre el cadáver y produciendo inóculo para infectar a otros insectos) y por las aberturas naturales (espiráculos, boca y ano). La gran dependencia de la humedad es el mayor factor limitante que presentan los hongos, ya que para que se produzca la germinación y esporulación fuera del hospedante se requieren valores de humedad relativa superiores a 90% (Tanada y Kaya 1993).

3.8 Morfología de *Beauveria bassiana*

Morfológicamente, *B. bassiana* está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25 μm de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de

jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zig-zag al raquis (Echeverría 2006).

Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas. Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blanquizca para el ojo humano (Echeverría 2006). (Figura 1).

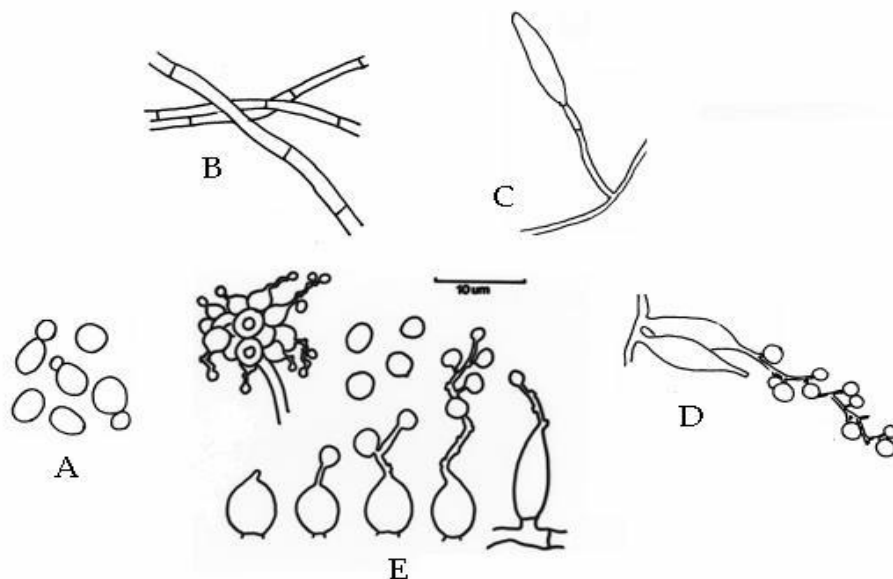


Figura 1. Principales estructuras morfológicas del hongo *Beauveria bassiana*. A. Esporas esféricas levemente ovaladas. B. Hifas septadas. C. Conidióforo simple. D. Proliferación simpodial del conidióforo. E. Esquema del proceso de maduración de conidióforo a partir de un conidio (inferior) y vista de un conidióforo completo (superior izquierda). Según por Echeverría 2006.

3.9 Relación huésped – entomopatógeno - ambiente

La virulencia de un entomopatógeno puede ser evaluada en laboratorio a través de bioensayos con insectos susceptibles y puede ser expresada en DE_{50} (dosis efectiva media), DL_{50} (dosis letal media) y TL_{50} (tiempo letal medio) (Alves 1986).

Tanada (1963), asevera que el progreso de una enfermedad en una población de insectos puede ser demostrado por una curva denominada “curva epizoótica”. Esta puede ser dividida en tres fases: pre-epizoótica, epizoótica y post- epizoótica.

La fase pre-epizoótica se caracteriza por un bajo número de hospederos enfermos, resultando en focos primarios de la enfermedad, esos focos primarios son formados debido a la inmigración de insectos enfermos, o por estructuras del patógeno que permanecen en el suelo. La fase epizoótica se caracteriza por un elevado índice de insectos enfermos como consecuencia de la multiplicación y diseminación del inóculo producido por los focos primarios. La fase post-epizoótica se caracteriza por la disminución del número de insectos enfermos en relación a la fase anterior (Tanada 1963).

3.9.1 Factores que afectan el desarrollo de los hongos

Estos organismos requieren ciertas condiciones para completar su ciclo de vida, las condiciones ambientales adversas, pueden restringir la infección en cualquier estado del ciclo del patógeno. También existe una interrelación entre todos los factores bióticos y abióticos. Los abióticos incluyen: la temperatura, la humedad, la luz, la materia orgánica, el pH, la aireación, y la presencia de pesticidas. Los factores bióticos incluyen; las poblaciones de la plaga hospedera y otros entomopatógenos; otros factores que limitan la susceptibilidad del insecto son: la densidad poblacional, el hábitat, sus hábitos y su resistencia (Molina 1997).

Cuando la condición de enfermedad ocurre en un insecto, no somos capaces de determinar que factor causó el estrés en el insecto, que fuerzas actuaron para disminuir la resistencia del insecto, o si el estimulador fue el propio patógeno. Los factores que pueden actuar, como estresadores o estimuladores según el caso son: la temperatura, la humedad, la superpoblación, las hambrunas, la nutrición, el oxígeno, el desbalance hormonal, las sustancias químicas y drogas, intoxicación por proteínas, la luz ultravioleta, los rayos x, las heridas o hiperactividad. Hay una gran variabilidad de cada factor de estrés que diferirán

en intensidad y tiempo, y cualquiera de ellos puede convertirse en el más importante bajo ciertas condiciones (Molina 1997).

3.9.2 Factores ambientales

La temperatura es uno de los principales factores limitantes para los hongos entomopatogenos. Estudios de laboratorio demuestran que el rango optimo de temperatura para que ocurra la infección, el crecimiento y desarrollo en la mayoría de los entomopatogenos varia entre 10 y 30°C, en este rango no se afectan la estabilidad de los hongos, pero temperaturas superiores a 35°C y debajo de 10°C inhiben su crecimiento y desarrollo (De la Rosa y Alatorre 2008). El punto de muerte termal (temperatura que causa el 100% de mortalidad de las conidias después de exponerlas por 10 minutos) de *B. bassiana* fue de 50 °C (Walstad *et al.* 1970. Citado por Lazo 1990.)

La humedad relativa (H.R) alta es necesaria para la germinación de las conidias de *B. bassiana* y en consecuencia las humedades atmosféricas altas (mas del 90%) son indispensables para favorecer el desarrollo de epizootias en condiciones naturales (De la Rosa y Alatorre 2008). La mejor germinación de conidias ocurre a un 100% de H.R., a esta humedad las conidias se desarrollan en cuatro días; humedades por debajo de 92.5% inhiben la germinación (Walstad *et al.* 1970. Citado por Lazo 1990.)

La radiación solar, constituye el principal factor que afecta la persistencia de los hongos y los inactiva directa o indirectamente (De la Rosa y Alatorre 2008). Posiblemente el espectro ultravioleta, es letal para las conidias de *B. bassiana*, pudiendo ser el factor limitante en los intentos de control microbiológico.

3.10 Toxinas de *Beauveria bassiana*

B. bassiana produce varias toxinas, Entre las principales toxinas producidas por los hongos entomopatógenos se destacan la beauvericina, beauverolides, bassianolides, isarolides, ácido oxálico, destruxinas a, b, c y d.

a) Beauvericina: ha sido probada contra larvas de mosquitos, algunas bacterias y adultos de moscas caseras con las cuales ha dado buenos resultados, pero la DL_{50} no ha sido publicada. Este ha sido el compuesto con el cual se han realizado la mayoría de las investigaciones. Esta toxina ayuda a romper el sistema inmunológico del hospedante (Moreno 2008).

b) Los beauverolides: se han aislado dos, de los micelios *B. bassiana*, el H y el I. De los estudios que se han hecho, se han encontrado que son tóxicos para mosquitos y larvas de moscas.

c) El bassianolides: ha sido aislado del quinto instar de larvas del gusano de seda en las que causa un alto grado de mortalidad.

d) Los isarolides y las destruxinas A, B y C y D: no se han realizado pruebas de toxicidad. Todos estos fueron aisladas del micelio de *B. bassiana* (Carballo y Guaharay 2004).

e) Acido oxálico: ha sido encontrado en la superficie de insectos muertos por *B. bassiana*, es generalmente venenoso y su participación en el modo de acción de algunos hongos patógenos a plantas es bien conocido. Hasta el momento no se han encontrado evidencias de su rol en el modo de acción de *B. bassiana* (Burgués 1981.Citado por Molina 1997 y por Aguilar 2010).

3.11 Dosis estudiadas del hongo y patogenicidad sobre diferentes plagas

3.11.1 Estudios a nivel de laboratorio

En el Departamento de Entomología Tropical de: El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), se realizaron bioensayos de laboratorio con el fin de determinar si *B. bassiana* es patogénico al parasitoide *Phymastichus coffea*. El principal efecto del hongo resultó en la disminución de la longevidad de los adultos y en la mortalidad del 100% de los inmaduros del parasitoide.

La CL₅₀ para adultos de *P. coffea* fue de 0.11% equivalente a 9.53×10^7 conidias/ml de *B. bassiana* y un tiempo letal medio (TL₅₀) de 29.4h, equivalente a la reducción del 22% de su longevidad normal como adulto. *P. coffea* fue capaz de transmitir esporas de *B. bassiana* a brocas no infectadas con el hongo y originar indirectamente la muerte de su progenie (Castillo *et al.* 2009).

Lazo (1990) en Honduras, encontró diferencias significativas entre 10 cepas de *Beauveria bassiana* sobre la broca (*H. hampei*), utilizando una suspensión de 1×10^7 conidias/ml, cuantificando la mortalidad a los cuatro, cinco, seis, siete y ocho días, sin embargo, los resultados del trabajo demostraron que existe variación en la virulencia entre cepas aisladas geográficamente. Las cuatro cepas con menores valores de TL₅₀ fueron la número 14, 4, 15 y 10 (las dos primeras de Honduras, Guatemala y México respectivamente).

De la Rosa *et al.* (1997), en México, evaluaron bajo condiciones de laboratorio la virulencia de nueve cepas de *B. bassiana* contra *H. hampei*, utilizando una concentración de 1×10^8 conidias/ml para la patogenicidad, una concentración de 1×10^6 conidias/ml para el TL₅₀ y para la CL₅₀ se usaron las concentraciones 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidias/ml. Los resultados mostraron que *B. bassiana* es un agente microbiano potencial para ser incorporado en programas de control integrado para *H. hampei*.

Las tres cepas más agresivas fueron Bb-4 (Ecuador), Bb-25 (México), y Bb-26 (México) con LC_{50} de 0,003, 0,004 y 0,006%, que son equivalentes a 2.2×10^6 , 4.1×10^6 y 5.9×10^6 conidios/ ml respectivamente. Los tiempos letales medios (TL_{50}) fueron entre 4,3 y 7.5 días. El porcentaje máximo de cadáveres esporulados se obtuvo con la cepa Bb-25 (90%) seguidas de la Bb-17 (81.9%), Bb-26 (81.9%) y la de menor porcentaje de esporulación fue la cepa Bb-26 con un 62%.

Estudios realizados en Colombia, para evaluar la virulencia, mortalidad y tiempo letal medio del hongo *Beauveria bassiana* en concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios/ml sobre el gorgojo menor de los granos almacenados *Sitophilus zeamais* (Motsch) (Coleóptera: Curculionidae), encontraron que las concentraciones evaluadas ocasionaron una mortalidad promedio del gorgojo del 98,37%, no encontrando diferencias significativas entre ellas. El menor tiempo para matar el 50% de la población del *S. zeamais* fue de seis días a la concentración de 1×10^6 conidios/ml de *B. bassiana* lo cual indica una gran patogenicidad y un buen resultado para éste tipo de estudio (Suárez s.f).

En Honduras, se llevo a cabo un estudio en laboratorio donde se inocularon brocas por inmersión en una solución de *B. bassiana* a una concentración de 1.5×10^6 UFC/ml, (Unidades formadoras de conidios), obteniéndose una mortalidad de 86 y 88% para las cepas Catie 415 y El Salvador respectivamente, las cuales fueron significativamente diferentes a las demás cepas. En condiciones de campo se hicieron aplicaciones de la mejor cepa, a una dosis de 6×10^{11} UFC/ha, encontrándose resultados no satisfactorios, ya que el producto químico Endosulfan, con el que se comparó, ejerció el mayor control con 73% de mortalidad (Méndez 2008).

En la Escuela Agrícola Panamericana, Honduras se realizó un estudio utilizando a *B. bassiana* junto con el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* tanto en laboratorio como en campo. En laboratorio *B. bassiana* se aplicó a una concentración de 3×10^6 UFC/ml mientras que el nematodo a una concentración de 2×10^3 nematodos/ml de agua. En el campo, el hongo fue aplicado a una dosis de 6×10^{11} UFC/ha en tanto que el nematodo a

una dosis de 4×10^8 nematodos/ha, en unidades experimentales de café variedad caturra, utilizando 200 L de agua/ha. Los resultados de laboratorio mostraron una mortalidad corregida de 98 y 96%, respectivamente; sin embargo a nivel de campo *B. bassiana* ocasionó una mortalidad de 95%. El tratamiento con nematodos obtuvo una mortalidad corregida de 86%, (Ávila 2010).

3.11.2 Estudios a nivel de campo

En el Centro Nacional de Investigaciones de Café, (CENICAFÉ), Chinchiná, Colombia. Se realizó un aislamiento del hongo Bb9205 mantenido en laboratorio por cinco años y reactivado sobre broca. Los resultados de control de calidad en laboratorio mostraron una mortalidad del 100% para los aislamientos. Sin embargo, cuando fueron comparados bajo condiciones de campo se encontró una mortalidad de 64%. Lo anterior demuestra que bajo condiciones de campo el hongo está expuesto a diferentes condiciones ambientales lo que puede minimizar su efectividad y a su vez encontrarse con poblaciones más tolerantes, debido a la selección natural, por lo tanto es necesario tomar en cuenta este factor en el proceso de selección de entomopatógenos (Arcila y Bustillo 1997).

En el Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), se evaluó el efecto de tres cepas del hongo *Beauveria bassiana* y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff Sorokin) sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en condiciones de campo, en tres fincas de café a diferentes altitudes. El porcentaje promedio máximo de micosis varió según la altitud. A 450 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) se tuvo 14,3% de micosis para *B. bassiana* y 6.3% para *M. anisopliae*; a 880 m.s.n.m. hubo un 40,6% para *B.bassiana* y 12.6% para *M. anisopliae*, y a 1.100 msnm fue de 33,9% para *B. bassiana* y 22. 1% para *M. anisopliae*. Se encontró que a bajas altitudes las mejores cepas fueron Bb25 para *B. bassiana* y Ma4 para *M. anisopliae*; mientras que para alturas medias y altas fueron las mejores cepas Bb26 y Ma4 para *B. bassiana* y *M. anisopliae* respectivamente. En el caso de *B. bassiana* si encontró correlación positiva significativa ($P \leq 0,01$) entre los niveles de infestación de la plaga y la respuesta de micosis del entomopatógeno (De la Rosa *et al.* 2000).

IV. MATERIALES Y METODO

4.1 Descripción del lugar

La investigación se realizó en el laboratorio de patología de insectos de, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Tapachula, Chiapas, México (Figura 2) Sus coordenadas geográficas son 14° 54' N y 92° 16' W. Su altitud es de 170 msnm. Con una temperatura máxima de 35 C y mínima de 17 C. Las precipitaciones pluviales oscilan según el área municipal desde 2300 hasta 3900 mm anuales.



Figura 2. Mapa del estado de Chiapas y ubicación de la ciudad de Tapachula.

4.2 Metodología

4.2.1 Condiciones del cuarto de cría.

La temperatura del cuarto experimental fué de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de 70-80% y el fotoperiodo fué de 12:12 horas luz-oscuridad.

4.2.2 Obtención y desinfección de las brocas adultas

Las brocas fueron extraídas de frutos de café perforados por la broca provenientes de cafetales de la región del Soconusco, Chiapas, que fueron cosechados dos semanas antes de la obtención de los adultos de *H. hampei*. Las brocas adultas extraídas de los frutos, fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.5%, para eliminar cualquier contaminación que ellas tenían ya que fueron colectadas en campo, sumergiéndolas en esta solución por cinco, minutos realizando dos lavados posteriores con agua destilada estéril por dos minutos cada uno. Posteriormente las brocas fueron colocadas sobre un trozo de papel absorbente esterilizado, este proceso se realizó el mismo día de los bioensayos.

4.2.3 Bioensayos

Los bioensayos consistieron en comparar la patogenicidad y virulencia de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) de dos cepas Hondureñas y cuatro cepas Mexicanas, las que fueron aisladas de insectos colectados en el campo (Tabla 1). Cinco de las cepas seleccionadas no habían sido evaluadas contra *H. hampei*, y se utilizo la cepa Bb25, como testigo relativo la cual en estudios previos mostró ser una de las mejores contra la broca en México (De la Rosa *et al.* 1997).

Todos los hongos fueron cultivados en tubos de vidrio (22 x 175 mm) conteniendo Agar-Destrosa Saboraud (ADS), e incubados por 20 días bajos las condiciones del cuarto experimental 12:12 horas luz-oscuridad. Para obtener el medio de cultivo se preparo

utilizando 16.25g de ADS, en 250 ml de agua, colocándola en la estufa para su calentamiento hasta que se torno a un color ámbar, posteriormente se vacio en cada tubo colocándole a este torundas de algodón para esterilizarlos en una autoclave durante 20 minutos con una T° 110°C. Cuando el medio ya estaba listo se procedió a la siembra del hongo con una asa bacteriológica en la cámara de flujo laminar, y colocándolos luego en el cuarto experimental durante 25 días, donde creció el hongo. Posteriormente se prepararon las soluciones de *B. bassiana* utilizando 15 ml de agua destilada estéril por cada tubo y se raspó con un asa bacteriológica las esporas contenidas en el.

La mezcla resultante fue una suspensión concentrada del inóculo la cual fue considerada como solución madre. Se prepararon diluciones en serie de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , hasta 1×10^{-6} Teniendo el signo negativo por que en ese momento no sabíamos que concentración tenía cada dilución. Al tubo de ensayo que contenía el hongo se le aplico 15 ml de agua destilada estéril mas Tween 80 al 0.05%, para preparar las diluciones se colocaron seis tubos de ensayo conteniendo 9 ml de agua estéril, adicionando un ml de la solución madre al primer tubo y de aquí se extrajo un ml de solución, el cual se adicionó al segundo tubo, y así sucesivamente hasta completar las seis diluciones mencionadas anteriormente

Las diluciones se hicieron con el fin de facilitar el conteo de conidias contenidas en la suspensión, a través de la cámara de Neubauer, con en el microscopio con una resolución de 40x, y aplicando la siguiente fórmula: $\text{Esporas /ml} = \text{Esporas contadas} \times 2.5 \times 1 \times 10^5 \times \text{factor de dilución}$

Se hacían tres repeticiones de conteo por cada dilución y se hacia el conteo en la cámara de Neubauer. Generalmente se contaron los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, o en forma diagonal empezando por el primero de la parte superior izquierda. También se contaban las conidias que estaban ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encontraban circundando el cuadrado, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadrado.

Tabla 1. Tratamientos evaluados y origen de las cepas de *Beauveria bassiana*.

Nº Trat	# Cepa	Lugar de procedencia	Insecto de donde se aisló	Orden: Familia
1	Bb25	Tapachula, México (Testigo relativo)	Hypothenemus hampei	Coleóptera: Curculionidae
2	BbRhyss	Tapachula, México	Rhyssomatus nigerrimus	Coleóptera :Curculionidae
3	BbCryss	Tapachula, México	Colaspis sp.	Coleóptera :Crysomelidae
4	BbHond3	Catacamas, Honduras	Metamasius hemipterus	Coleóptera: Curculionidae
5	BbHond4	Instituto control biológico Uruguay	Desconocido	Desconocido
6	BbCom	Cepa Comercial Bassianil	Desconocido	Desconocido
7	Agua estéril	(Testigo absoluto)	_____	_____

4.2.4 Descripción de las cepas evaluadas

Bb25 esta cepa fue aislada del insecto *Hypothenemus hampei*, proveniente de Tapachula Chiapas, con la que se han hecho investigaciones a nivel de campo y laboratorio. BbRhyss fue aislada del insecto *Rhyssomatus nigerrimus* que ataca a las plantaciones de soya en Tapachula, México. BbCryss se aisló del insecto *Colaspis* sp, que también se encuentra en las plantaciones de soya, provenientes de Tapachula, Chiapas. BbHond3 esta cepa es proveniente de Catacamas Honduras, y aislada del insecto *Metamasius hemipterus* que este insecto ataca a las plantaciones de musáceas de la Universidad Nacional de Agricultura.

BbHond4 esta cepa es proveniente del Instituto control biológico de Uruguay, desconociéndose de que insecto se aisló. BbCom esta es una cepa comercial de México el nombre comercial del producto es Bassianil (condios de Bb, polvo mojabable). Contiene 2,000 millones de conidios viable por gramo de producto (2×10^9). Ingredientes inertes microtalcó estéril. Viabilidad > 90%.

4.2.5 Pruebas de viabilidad

A cada una de las cepas se le hicieron las pruebas de viabilidad de los conidios antes de realizar los bioensayos, basándose en el método de microcultivos recomendado por (Jiménez 1989), el cual consiste en colocar un ml de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) sobre un portaobjeto, se deja solidificar y se le agrega una alícuota de una dilución seriada a 0.001 % de una suspensión inicial de 1%.

Se colocaron los portaobjetos conteniendo la dilución, dentro de una caja petri la que tenía papel filtro humedecido y se dejaron en el cuarto experimental por 16 horas, después se observó la germinación de los conidios con ayuda de un microscopio compuesto a una resolución de 40x. El criterio para considerar un conidio como germinado es que su tubo germinativo era de $\geq$ tamaño que el conidio. Se contaron los conidios germinados y no germinados de un total de 3 portaobjetos para estimar la viabilidad. Se consideró una cepa viable cuando presentó más del 80 % de esporas germinadas.

Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de germinación:

$$\% \text{ germinación} = a/(a+b) \times 100$$

Donde: a = conidios germinados y b = conidios no germinados.

4.2.6 Patogenicidad de *B. bassiana* y determinación de TL_{50}

Para determinar la patogenicidad de *B. bassiana* de cada una de las cepas sobre *H. hampei*, se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 en una solución de agua destilada estéril a la cual se le agregó Tween 80 al 0.05%. Dicha concentración fue seleccionada porque es la que ha sido utilizada en pruebas de patogenicidad previas contra *H. hampei* (Gaitán *et al.* 2005; Haraprasad *et al.* 2001) y por ser muy parecida a la concentración utilizada para la cepa Bb25 por (De la Rosa 1977). La concentración de cada una de las cepas se determinó utilizando una cámara de Neubauer y el microscopio.

Los bioensayos se realizaron, utilizando la metodología recomendada por De la Rosa *et al.* (1997), que consiste en exponer ciento cuarenta (140) brocas adultas de la misma edad (de color marrón oscuro a negras) con siete repeticiones cada cepa y el testigo 20 adultos/repetición. En total se utilizaron 980 brocas en los siete tratamientos (seis cepas mas el testigo absoluto). Las brocas adultas fueron sumergidas en un mililitro de la suspensión de esporas antes mencionada por 30 segundos; para ello las brocas fueron sumergidas utilizando tela de manta, luego fueron puestas sobre papel filtro para absorber el exceso de líquido, por un tiempo aproximado de un minuto, hasta que la broca ya no tuviera exceso de solución.

Posteriormente se colocaron en grupos de 20 brocas en un tubo de ensayo de (15ml) conteniendo trozos de dieta merídica (Anexo Elaboración de dieta), de 1 centímetros de grosor de dieta para su alimentación (Villacorta y Barrera 1993). Se observaron todos los días por 10 días y las brocas muertas fueron removidas y transferidas a una cámara húmeda para estimular la emergencia del micelio del hongo. Se tuvo un testigo absoluto donde las brocas adultas fueron sumergidas en una solución de agua destilada estéril más Tween 80 al 0.5%. La mortalidad de las brocas fue corregida utilizando la fórmula de Abbot (1925), que se describe a continuación

$$\% \text{Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{Mortalidad tratada} - \text{mortalidad del testigo}}{100 - \% \text{Mortalidad del testigo}} \times 100$$

4.2.7 Determinación de la CL₅₀

Las dos mejores cepas resultantes de las pruebas de patogenicidad, inicialmente fueron evaluadas para determinar la CL₅₀, sin embargo, dichas pruebas no dieron los resultados esperados, atribuyendo esto a que no se realizó la reactivación de dichas cepas y por motivos de tiempo se realizo el ensayo nuevamente tomándose la decisión de hacer las pruebas anteriores partiendo de una solución madre y diluciones seriadas de cada una de las cepas, lo que permitió, evaluar diferentes concentraciones de conidias, de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6} conidias/ml, adicionadas con Tween 80 al 0.5%,

Cada concentración tenía 9 ml de agua destilada estéril y 1ml de solución.

Cada una de las diluciones realizadas con las cepas correspondientes a los fueron los tratamientos y se hicieron siete repeticiones con, 20 brocas cada una, (utilizando 140 brocas adultas/tratamiento), en total se utilizaron 5,880 brocas adultas para realizar estas evaluaciones. Se tuvo un testigo absoluto donde las brocas adultas fueron sumergidas en una solución de agua destilada estéril más Tween 80 al 0.5% y se siguió la metodología descrita anteriormente.

4.2.8 Determinación del tiempo letal medio (TL_{50})

Para la determinación del TL_{50} tiempo letal medio se realizó con los mismos tratamientos descritos anteriormente y contando todos los días la mortalidad ocasionada por las diferente cepas hasta obtener la mortalidad del 50% de los especímenes.

4.3 Análisis estadístico

La patogenicidad en los adultos de *H. hampei* fue analizada mediante un análisis de varianza seguida de una prueba de Tukey. Los cálculos de la CL_{50} y TL_{50} se realizó empleando el análisis Probit, después de corregir la mortalidad ocurrida en el testigo. Se comparo los tiempos letales medios con una prueba de Tukey, y al 5% de significancia.

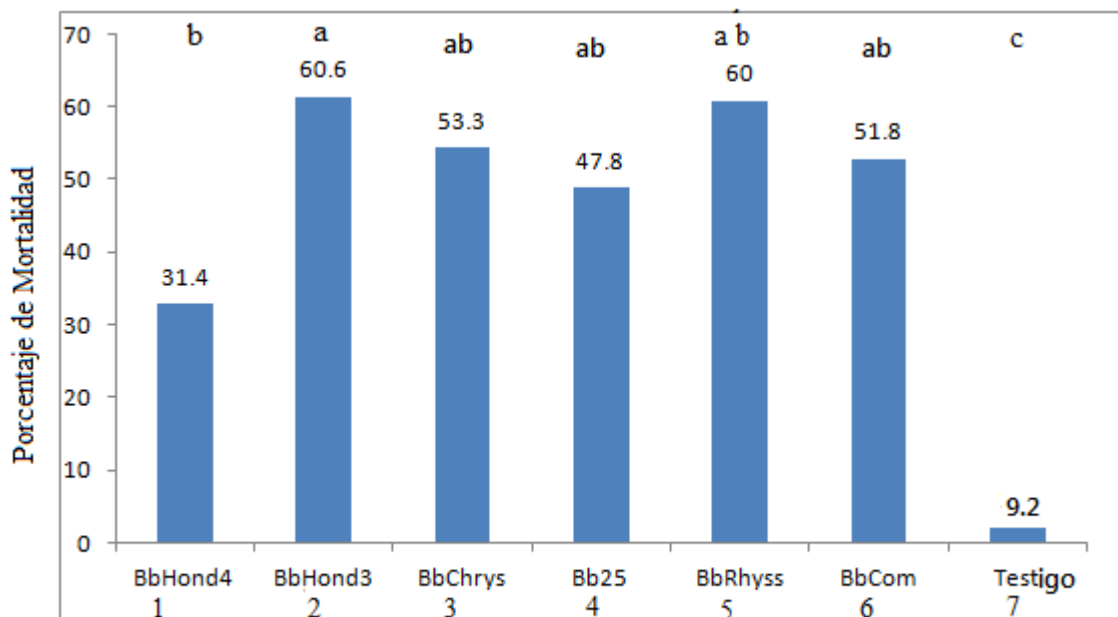
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Pruebas de patogenicidad

Al realizar el bioensayo utilizando la concentración de 1×10^6 en cada cepa no se encontró diferencias estadística ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos, debido a que no hubo mortalidad en ninguna de las cepas, ello debido posiblemente a que no se efectuó la reactivación de las cepas, por ello se efectuaron posteriormente diluciones seriadas, tomándose la concentración mas alta de cada una de las cepas, como base para los análisis de patogenicidad de las cepas del hongo *Beauveria bassiana*.

Los datos obtenidos a los 10 días después de la inoculación, nos muestra que la cepas BbHond3, BbRhyss, BbCryss y BbCom fueron las que tuvieron los mayores porcentajes de mortalidad por arriba del 50%, con el 60.6, 60.0, 53.2 y 51.8 % respectivamente. En tanto que las cepas que no alcanzaron el 50% de mortalidad sobre las brocas fueron la Bb25 y BbHond4, así como el testigo, los que obtuvieron una mortalidad de, 47.8, 31.4 y 9% en orden descendiente (Figura 3).

El análisis de varianza realizado a los porcentajes promedios de mortalidad nos indica que si existió diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.05$) (Anexo1), en tanto que la prueba de Tukey nos muestra que las mejores cepas fueron la BbHond3 y BbRhyss, aunque no se diferencia estadísticamente de BbCryss, BbCom y Bb25, pero si de Hond4 que fue la que ocasiono la menor mortalidad de broca (Anexo 2).



Cepas de *Beauveria bassiana*

Figura 3 Mortalidad ocasionada por las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* después de 10 días de inoculación.

Los valores seguidos por la misma letra no tienen diferencias significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($P < 0.05\%$).

Como se puede observar, las seis cepas de *Beauveria bassiana* variaron en su patogenicidad contra adultos de *Hypothenemus hampei*, presentando porcentajes de mortalidad corregida que variaron entre 31 a 61%. El porcentaje más alto de mortalidad proporcionado por *B. bassiana* sobre *H. hampei* está por debajo de otros porcentajes obtenidos por (De la Rosa *et al.* 1997, Haraprasad *et al.* 2001, Nava, 2005; Neves y Hirose 2005) quienes evaluaron cepas de *B. bassiana* sobre *H. hampei* y obtuvieron mortalidades mayores a 80%, incluso (De la Rosa *et al.* 1977), obtuvieron mortalidades de 100% con la cepa Bb25, (Nava 2005), también realizó quien también realizó pruebas con la cepa Bb25 contra *H. hampei*, encontrando mortalidades del 58% micosadas y con una concentración de 4.38, 6.27 y 9.47 $\times 10^6$ conidias/ml, que son similares a las de este trabajo. Estas diferencias se deben a las diferencias de concentraciones de esporas utilizadas y probablemente a que no se realizó la reactivación de la cepa garantizando la viabilidad y eficacia del hongo, (Moore *et al.* 1993).

Atribuyendo que no hubo una reactivación previa, y fueron concentraciones bajas que aun así se ve ilustrado en la grafica que la cepa BbHond3 presento una mortalidad mayor en cuanto a las demás, y que la BbRhyss con una menor concentración también se demuestra que se obtuvo 60% de mortalidad las brocas.

5.2. Tiempos letales

En la (gráfica 4), de mortalidad de las brocas que estuvieron expuestas al hongo *B. bassiana*, se puede observar que a los diez días de exposición, ninguna de las cepas provocó el 100% de mortalidad sobre los adultos de *H. hampei*. Así mismo, se puede notar que solo la cepa BbHond3 y BbRhyss lograron matar al 50% de la población a los nueve días después de la aplicación, mientras que las cepas BbCryss y BbCom mataron al 50% de las brocas hasta el decimo día. En tanto que la Bb25 y la BbHond4 no alcanzaron a matar el 50% de las brocas adultas durante el período de observación.

Trabajos previos donde se han evaluado cepas de *Beauveria bassiana* contra adultos de *Hypothenemus hampei* han obtenido tiempos letales diferentes a los que nosotros encontramos, y estos tiempos variaron desde 4 hasta 8.34 días (De la Rosa *et al.* 1997; Nava 2005), mientras que en el presente trabajo se obtuvo a los 9 y 10 días. Tomando como referencia la cepa Bb25 que fueron utilizadas en los dos trabajos mencionados anteriormente encontramos que (De la Rosa *et al.* 1997). Obtuvo un tiempo letal de 4.3 días a una concentración de 2.2×10^6 , en tanto que (Nava 2005) reporta un tiempo letal de 7.65 días a una concentración de 6.15×10^8 , por otro lado, nosotros obtuvimos con la misma cepa Bb25 un tiempo letal de 10 días a una concentración de 10.28×10^6 , de tal manera que la concentración que aplicamos fue muy baja con respecto a la de (Nava, 2005) y un poco alta que la utilizada por la (De la Rosa *et al.* 1997). Creemos que si las cepas que utilizamos en este trabajo se hubieran reactivado antes de los bioensayos, hubiéramos observado tiempos letales menores a los encontrados.

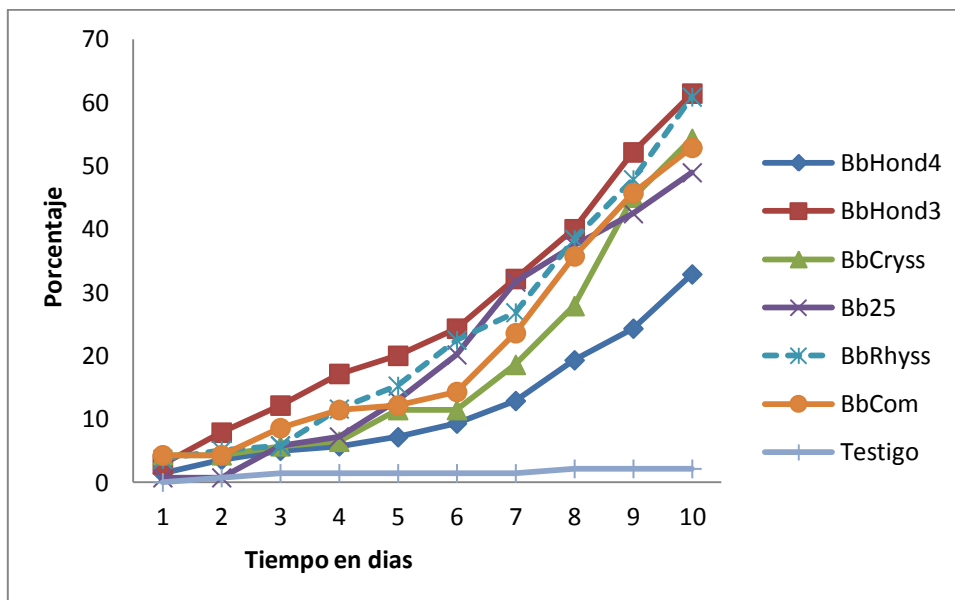


Figura 4. Mortalidad diaria acumulada de adultos de *Hypothenemus hampei* expuestas a varias cepas del hongo *Beauveria bassiana* en laboratorio.

5.3 Concentraciones letales

La gráfica de mortalidad realizada a todas las cepas de *Beauveria bassiana* contra adultos de *Hypothenemus hampei* nos muestra que conforme la concentración aumenta, la mortalidad de los adultos se incrementa (Figura 5). La concentración letal media de las cuatro mejores cepas con mayor actividad se muestra en la (Tabla 2), donde se puede observar que la cepa más virulenta corresponde a la BbRhyss con una concentración letal media de 4.68×10^6 conidios/ml, ya que requiere menor número de esporas para matar al 50% de la población de adultos de *H. hampei*, la segunda cepa mas virulenta fue, BbHond3 con una concentración letal media de 1.22×10^7 conidios/ml; continuándole en orden de importancia BbCom y BbCryss. Las cepas BbHond4 y la Bb25 no se metieron al análisis Probit debido a que no mataron al 50% de los adultos de la broca durante el tiempo de observación.

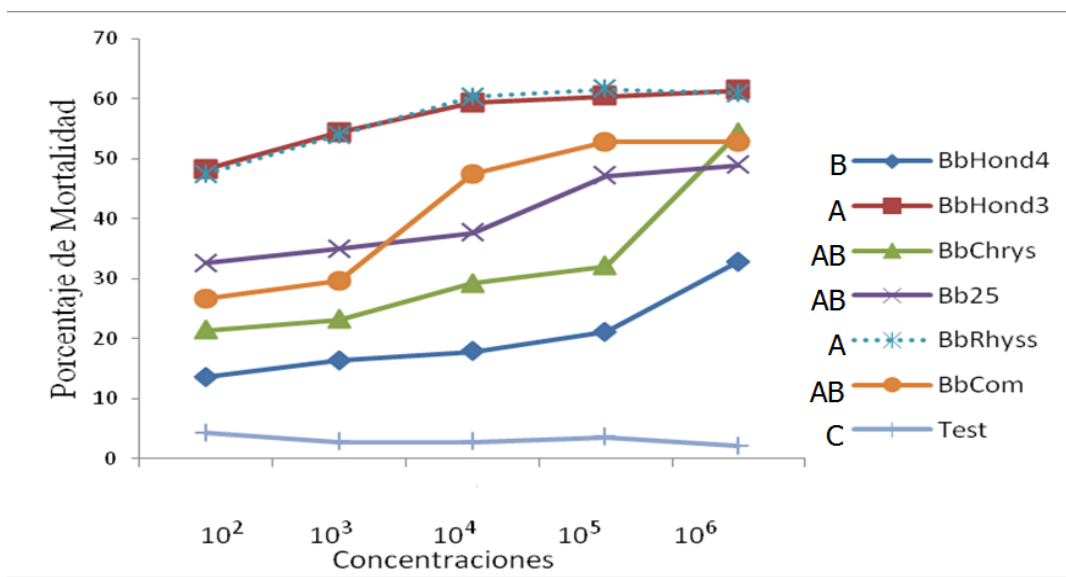


Figura 5 Mortalidad provocada por *B. bassiana* sobre *H. hampei* a diferentes concentraciones de las cepas evaluadas.

Tabla 2. Valores de CL50 con sus límites fiduciales inferiores y superiores de las cuatro mejores cepas de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Hypothenemus hampei*.

Cepa	Pendiente	Intersección	X ²	CL ⁵⁰	Límite inferior	Límite superior
BbHond3	0.21859	- 1.54877	< 2e-16	1.22 x 10 ⁷	3.79 x 10 ⁶	3.91 x 10 ⁷
BbRhyss	0.22793	- 1.52031	< 2e-16	4.68 x 10 ⁶	1.48 x 10 ⁶	1.48 x 10 ⁷
BbCom	0.22292	- 1.69652	< 2e-16	4.08 x 10 ⁷	1.24 x 10 ⁷	1.34 x 10 ⁸
BbCryss	0.20225	- 1.77536	<2e-16	6.00 x 10 ⁸	1.19 x 10 ⁸	3.02 x 10 ⁹

Tomando en cuenta la concentración obtenida del análisis Probit de la cepa BbRhyss que fue de 4.68×10^6 y comparándola con otras cepas de *Beauveria bassiana* utilizadas contra *Hypothenemus hampei*, podemos decir que dicha concentración es similar a las obtenidas en otros estudios, por ejemplo, (Neves y Hirose 2005) reportan CL₅₀ obtenida de varias cepas de *B. bassiana* usadas contra *H. hampei* que van de 2.5 hasta 62.8×10^6 , mientras que De la Rosa (1997) menciona concentraciones de 2.2 a 45.5×10^6 , así mismo, Nava (2005) obtuvo concentraciones de 4.38 a 9.47×10^6 , por ello se puede decir que la cepa BbRhyss es una cepa competitiva y que puede ser utilizada contra la broca del café con técnicas de manejo integrado. Se requiere hacer más pruebas con las tres mejores cepas utilizadas en este trabajo, realizando previamente la reactivación de las mismas antes de hacer los bioensayos.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Basado en los resultados obtenidos en el trabajo se concluye lo siguiente:
- ✓ Todas presentaron mayor patogenicidad comparadas con el control.
- ✓ Las cepas del hongo *Beauveria bassiana* BbRhyss, BbHond3, BbCom y BbCryss fueron en orden de importancia las más patogénicas contra los adultos de *Hypothenemus hampei*.
- ✓ Las cepas BbRhyss y BbHond3 lograron matar el 50% de la población a los nueve días después de la aplicación.
- ✓ La concentración letal media (CL₅₀) más baja obtenida en el análisis Probit y que mato satisfactoriamente a la broca de café fue para la cepa BbRhyss con una concentración de 4.68×10^6 conidios/ml, por lo que se considera la mas patogénica.
- ✓ La cepa más virulenta corresponde a la BbRhyss.
- ✓ Con la cepa BbHon4, de Honduras no se logro matar el 50%, de la población de las brocas a los 10 días posiblemente por que no se hizo una reactivación de las cepas.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar bioensayos en Honduras con la misma metodología, pero previamente se debe reactivar las cepas sobre un insecto para ver si se obtienen los mismos resultados o si concuerdan con bioensayos realizados por otros autores.
- ✓ Hacer pruebas utilizando diferentes especies de insectos a nivel de laboratorio y campo, porque seguramente hay diferencias de control entre las cepas, dependiendo del insecto.
- ✓ Utilizar concentraciones mayores a las utilizadas en el presente trabajo para obtener mejores resultados de control.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abbot, W.S. 1925. Method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology.18:265-267.

Aguilar, P. 2010. Caracterización molecular de 18 aislamientos de *Beauveria bassiana* asociado a *Cosmopolites sordidus* y *Metamasius sp.* Tesis Ingeniero. Agrónomo. Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras. 55p.

Alves, SB. 1986. Patología general .In Control microbiano de insectos. Sao, Paulo. Brasil, Editora. Manole. P. 10-73.

Ames, T. 1984. Convención Nacional de entomología. Resúmenes de los apuntes del curso de micología de la Universidad Nacional Agraria, Lima, Perú.

Arcila, A; Bustillo, A.E. 1997. Estudios básicos sobre *Beauveria bassiana* en cafetales de Colombia. Informe no publicado disciplina de Entomología. Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia 22p.

Ávila, S. 2010. Control de broca del café (*Hypothenemus hampei*) utilizando once cepas del hongo *Beauveria bassiana* y el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora*. Tesis Ing. Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano Honduras.14p.

Ayra, I; Cabrera, I; Gómez, M; Hernández, D. (s.f). Empleo de marcadores bioquímicos y de ADN en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. En línea, consultado el 11 de abril del 2010. Disponible en <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1056/cuf0019s.pdf>

Barrera, J.F. 1995. Los agentes de control biológico de la broca del café en México. *In*: Memoria del VI Curso Nacional de Control Biológico. 6-8 de noviembre 1995. ECOSUR. Tapachula, Chiapas, México. pp. 172-183.

Barrera, J.F; Infante, W; De la Rosa, A; Castillo, A; y Gómez, J. 1997. Control biológico de la broca del café: una revisión de antecedentes, avances y nuevos enfoques. Aceptado para Publicarse en: "Fundamentos de control biológico". Editor: M .H. Badii, Universidad Autónoma de Nuevo León. ISBN 968-6337-98-9).

Barrera, J.F.2005. Investigación sobre broca del café en México. Simposio sobre Situación Actual y Perspectivas de la Investigación y Manejo de la Broca del Café en Costa Rica, Cuba, Guatemala y México. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México. p. 1-13.

Barrera, J.F; Herrera, J; Villalobos, H; García, J. Gómez; E. López. 2006. La broca del café: una plaga que llegó para quedarse. El Colegio de la Frontera Sur, Proyecto Manejo Integrado de Plagas, México. Folleto técnico Número 11, 500 p.

Barrera J.F; Gómez J; Castillo A; López E; Herrera J; González G. 2008. Broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Curculionidae). Casos de Control Biológico en México. P 101-120.

Broca del café (en línea). Consultado el 20 de marzo del 2011. Disponible en www.iica.org.gt/promecafe/boletines/mib/boletin2_mib.pdf

Bustamante. 1995. Producción masiva del entomopatógeno *Beauveria bassiana*. *In*. I Taller Nacional de Control. Microbial (Memoria). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua). 6p.

Bustillo, A. 2005. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae), Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia. 14p.

Bustillo, A; Cárdenas, R; Posada, F.J. 2002. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleòptera: Scolytidae) in Colombia. Neotrop Entomology 31: p 635-639.

Camilo, J.E. 2003. Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) (en línea). Consultado el 20 de marzo del 2011. Disponible en www.mag.go.cr/rev_meso/v14n01_059.pdf

Carballo, M; Hidalgo, E; Rodríguez, A s.f. Control Biológico de Insectos Mediante Hongos Entomopatógenos. CATIE, DIECA, San José CR. p. 34 – 57.

Carballo, M; Guharay, F. 2004. Control Biológico de Plagas Agrícolas. Primera ed. Managua. CATIE, 2004. 232p.

Castillo, A; Gómez, J; Infante, F; Vega, F. 2009. Susceptibilidad del parasitoide *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenóptera: Eulophidae) a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. Tapachula, Chiapas, México. 6p.

Castro, M.T. 1990. Manejo integrado de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei*, Ferrari. In VIII Curso Regional sobre Fundamentos de la Caficultura Moderna. CATIE, C.R. Memoria –modulo I. Turrialba, C.R. IICA/PROMECAFE. s.p.

Charnley, A.K. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi; A speculative review, in invertebrate Microbial Interection. ed. Cambridge University Press. Anderson, J.M. Rayner, A.D.M. and Walton, D.W.H. Cambridge. Bristish Mycological Society Symposium. 229 p.

Chaves, J. 1996. Evaluación de medios de cultivo para propagación del hongo entomopatògeno *Beauveria bassiana*. Tesis. Universidad Nacional de Agricultura Catacamas, Olancho, Honduras, C.A. 56p.

De la Rosa, W; Godínez, J.L; Alatorre, R. 1995. Biologycal activity of five strains of *Metarhizium anisopliae* upon the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleòptera: Scolytidae). Entomophaga. pág. 403-412.

De La Rosa, W; Alatorre, R; Trujillo, J and J.F, Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleòptera: Scolytidae). Journal. Economic. Entomology. 90: pág. 1534-1538

De La Rosa, W; Alatorre, R; Barrera, J.F; Toriello, C. 2000. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) sobre la broca del café (Coleóptera: Scolytidae) bajo condiciones de campo. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Apdo. Correos 36, 30700 Tapachula, Chiapas, México.6p.

De la Rosa, W. y Alatorre, R. 2008. Insecticidas microbianos en el manejo integrado de plagas. In. Toledo, J; Infante, F. Manejo integrado de plagas. Editorial Trillas. México.pag 105-124.

Echeverría, F. 2006. Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatògeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Informe, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.105p. Disponible

<http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/dspace/bitstream/2238/463/1/Trabajo+Final+de+Graduaci%EF%BF%BD%EF%BF%BDn+Biblioteca.pdf>

Fernández, S; Cordero, J. 2007. Biología de la broca de café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Laboratorio de Entomología INIA-Lara.Venezuela.Bioagro19 (1).6p.

Gaitán, A; Cruz, L; Góngora. 2005. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. Department of Entomology, CENICAFE-FEDERACAFE. Plan Alto, Chinchinas, Caldas, Colombia. 9p.

González, M. 2008. Evaluación de ocho cepas de *Beauveria bassiana* para control de broca del café *Hypothenemus hampei*. Tesis Ingeniero Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana. Tegucigalpa, Honduras. 9p.

Haraprasad, N; Niranjana, R; Prakash, H; Shetty, H. 2001. *Beauveria bassiana* -A Potential Mycopesticide for the Efficient Control of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. Biocontrol Science and Technology Volumen 11. p251-260.

Lazo, R.R. 1990. Susceptibilidad de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, y su tolerancia al oxiclورو de cobre. Tesis posgrado. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p1-21.

Le Pelley, R.H. 1968. Las plagas del café. Ed. Labor, S.A. Massom, Paris. p141-161.

Mathieu, F; Gaudichon, L; Frérot, B. 2001. Effect of physiological status on olfactory and visual responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. Physiol. Entomology. 26, p 189-193.

Méndez, N. 2008. Evaluación de ocho cepas de *Beauveria bassiana* para control de broca del café *Hypothenemus hampei*. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 8p.

Molina, J.D. 1997. Evaluación de *Beauveria bassiana* (Deuteromicete) en el combate de *Prostephanus truncatus* (Coleóptera: Bostrichidae). Tesis Ingeniero Agrónomo presentada como requisito para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Escuela Agrícola panamericana, Honduras. 50p.

Montilla, R; Quintero, A. 2006. Parasitismo por *Beauveria bassiana* sobre la broca del café, en el estado, de Trujillo. Agronomía, tropical. Vol 56(2) Venezuela. p183-198.

Moore, D; Bridge, P.D; Higgins, P.M; Bateman, R.P; Prior, C. 1993. Ultra violet radiation damage to *Metarhizium flavoviridae* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Annals of Applied Biology. p 605-616.

Moreno, W.E. 2008. Efecto de tres dosis de *Beauveria bassiana*, Azadirachtina y Abamectina contra la broca de café *Hypothenemus hampei* Ferr. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Honduras. 73p.

Muñoz, R.I. 1989. *Beauveria bassiana* Bals y sus posibilidades de uso en el control integrado de plagas. In Recopilación de las publicaciones entomológicas realizadas por el instituto hondureño del café (IHCAFE). Vol. I. La fe Llama, Santa Barbará. Julio.

Muñoz, R.I. 1989. Ciclo biológico y reproducción partenogenética de la broca del fruto de cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferr). In Revista Turrialba, Costa Rica. 39(3): p. 415-421.

Muñoz, R.I. 1990. Plagas del café. In Manual de plagas y enfermedades del café. IHCAFE (Honduras). 61p.

Nava, S. 2005. Evaluación de hongos entomopatógenos para el control de la broca de café *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Scolytidae), y propuesta de un plan para su manejo integrado. Tesis de maestría. Instituto politécnico Nacional Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. CIBA-IPN. Tlaxcala, México. 95p.

Neves, P; Hirose, E. 2005. *Beauveria bassiana* Strains Selection for Biological Control of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleòptera: Scolytidae). Neotropical Entomology 34(1). 6p.

Posada, F.F; Benavides, F. 1996. Biología y comportamiento de la broca del café en relación con su hospedante: El café. In. Manejo integrado de la broca del café. (*Hypothenemus hampei* Ferrari), Chinchiná, Caldas, Colombia. p18-22.

RDevelopment Core Team. 2011. A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Suarez, H. s.f. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleóptera: Curculionidae) Plaga de Maíz almacenado. Universidad de Magdalena, Santa Marta, Colombia.

Tanada, Y. 1963. Epizootiology of infectious Diseases. Insect Pathology. Volumen 2 New York and London.pag 423-463.

Tanada,Y; Kaya, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press.Inc. San Diego California. p. 318-336.

Urbina, N.E. 1989. La broca del fruto de cafeto *Hypothenemus hampei*, Ferr. (Coleóptera: Scolytidae). In II Curso regional sobre manejo integrado de plagas del cafeto con énfasis en broca del fruto (*Hypothenemus hampei*), Ferr. PROMECAFE-IHCAFE. San Pedro Sula Honduras. p.148-156.

Villacorta, A. Barrera. F. 1993. Nova dieta merídica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867). An. Soc. Entomol. Brasil 22: p 405- 409.

Villaseñor, L. A. 1987. Caficultura moderna en México. Ed. Futura, S.A. México. 469 p.

ANEXOS

Anexo 1 Análisis de varianza realizado a los porcentajes de mortalidad de las cepas de *Beauveria bassiana* evaluadas sobre *Hypothenemus hampei*

FUENTE DE VARIACION	S.C.	g.l.	C.M.	Fc	Prob.
Cepa	3.57593	6	0.595988333	31.225765	5.67361E-14
Error	0.80163	42	0.019086429		
Total	4.37756				

Anexo 2 Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*.

Cepa	Insectos tratados	UFC/ml	% mortalidad	Mortalidad (Abbot)* corregida
BbHond4	140	9.19 x 10 ⁶	32.86	31.39 b
BbHond3	140	11.58 x 10 ⁶	61.43	60.59 a
BbCryss	140	9.36 x 10 ⁶	54.29	53.29 ab
Bb25	139	10.28 x 10 ⁶	48.92	47.80 ab
BbRhyss	138	5.04 x 10 ⁶	60.87	60.01 a
BbCom	140	6.13 x 10 ⁶	52.86	51.83 ab
Testigo	140	0	2.14	00

*Los valores seguidos por la misma letra no tiene diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey (P=<0.05%).

Anexo 3 Ingredientes para hacer la dieta meridica, para la alimentación de la broca

Ingredientes	Cantidad
Parte A	
Café verde molido crudo	100gr
Caseína	20gr
Dextrosa	14 gr
Agar	18gr
Parte B	
Levadura de torula	20grr
Nipagin o p-Hydroxybenzoic	1gr
Sales de wesson	1gr
Benzoato de sodio	0.6gr

Procedimiento

Parte A. Se mezclaron todos los ingredientes y se diluyo en 600 ml de agua caliente, posteriormente se puso a hervir, durante 20 minutos o hasta que el Agar estuvo bien diluido.

La parte B se coloco en una licuadora agregándole 150 ml de agua caliente y 2 ml de formaldehido, y se mesclo, posteriormente a esta se le agrego la parte A ya diluida y se mantuvo en la licuadora por un tiempo de 5 minutos para que se, mezclaran las dos partes, echando esta mezcla en una pizeta para luego ser llenados los tubos de ensayo, aproximadamente 3cm en cada tubo.

Anexo 4 Prueba de Tukey, para la mortalidad de cada una de las cepas

PRUEBA DE TUKEY		
Cepa	Promedio	Comparaciones
BbHond3	0,9041	A
BbRhyss	0,8944	A
BbCryss	0,8281	AB
BbCom	0,8156	AB
Bb25	0,7739	AB
BbHond4	0,6025	B
Testigo	0,0782	C