



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS
NATURALES Y DEL AMBIENTE
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:

AISLAMIENTO DE DOS CEPAS NATIVAS DEL HONGO (*Beauveria bassiana*) PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei*) CON TRES TIPOS DE CONCENTRACIONES DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL BOLÍVAR.

AUTOR

LUIS ALEJANDRO YANEZ MARQUEZ

DIRECTOR:

ING. WASHINGTON DONATO ORTIZ MS.c.

GUARANDA - ECUADOR

2016



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS
NATURALES Y DEL AMBIENTE
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:

AISLAMIENTO DE DOS CEPAS NATIVAS DEL HONGO (*Beauveria bassiana*) PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei*) CON TRES TIPOS DE CONCENTRACIONES DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL BOLÍVAR.

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agronómica.

AUTOR

LUIS ALEJANDRO YANEZ MARQUEZ

DIRECTOR:

ING. WASHINGTON DONATO ORTIZ MS.c.

GUARANDA - ECUADOR

2016

AISLAMIENTO DE DOS CEPAS NATIVAS DEL HONGO (Beauveria bassiana) PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ (Hypothenemus hampei) CON TRES TIPOS DE CONCENTRACIONES DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL BOLÍVAR.

REVISADO Y APROBADO POR:

ING. WASHINGTON DONATO ORTIZ MS.c.

DIRECTOR

ING. KLÉBER ESPINOZA MORA. Mg.

BIOMETRISTA

ING. NELSON MONAR GAVILANES MS.c.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICADO DE AUTORÍA

Yo, Yánez Márquez Luis Alejandro, con CI. 1206489625, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con sus respectivos autor(es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamento y la Normativa Institucional vigente.

LUIS YÁNEZ MÁRQUEZ

CI. 1206489625

ESTUDIANTE

ING. WASHINGTON DONATO ORTIZ M.SC.

CI. 1801964550

DIRECTOR

ING. NELSON MONAR GAVILANES MS.c.

CI. 0201089836

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

A Dios, quien fue mi guía, mi fortaleza y me brindo un espíritu lleno de perseverancia para alcanzar esta meta propuesta, lo cual ha significado un punto de gran valor dentro de mi preparación intelectual.

A mi Madre, la Sra. Mariana de Jesús Márquez Abril, quien con todo su esfuerzo en el día a día me dio el impulso necesaria para seguir adelante, además brindándome todo el apoyo necesario que solo una madre ejemplar y responsable lo puede hacer. En memoria de mi padre, El Lic. Ángel Nicolás Yáñez Albán, por ser un gran hombre con grandes virtudes.

Dedico este título a todos y cada una de las personas que han estado a mi lado, en especial a mi enamora por su gran apoyo tanto físico como emocional, a mis tíos y familia en general, por haberme demostrado su gran aprecio y haber creído en mí, me siento muy grato y complacido de haber podido demostrarles en este documento, el gran valor que tienen para mí, todos y cada uno de ustedes.

Luis

AGRADECIMIENTO

Mi gratitud eterna a la Universidad Estatal Bolívar por darme la oportunidad de realizar mis estudios de nivel superior, me siento muy contento y orgulloso de esta Universidad, que ha sido para mí, el hogar del conocimiento.

Me siento muy complacido de haber formado parte de un gran grupo de alumnos y haber tenido un cuerpo de profesores de renombre, que siempre han demostrado estar a la altura y además, han mostrado el gran amor que tiene con la Universidad.

Un agradecimiento especial a los miembros del tribunal de tesis; Ing. Washington Donato Ortiz, Ing. Kléber Espinoza Mora, Ing. Nelson Monar, por haberme permitido realizar este trabajo de investigación, el cual ya forma parte de mi vida dentro de la investigación, por haber adquirido una gran experiencia, gracias por el apoyo y el conocimiento brindado, además del gran interés puesto en mi trabajo.

Igualmente agradezco al Ing. Víctor Cortes por el apoyo brindado en la realización de mi trabajo dentro del laboratorio, lo cual fue de gran importancia, razón por la cual estoy muy agradecido. De igual manera al Ing. Darwin Pomagualli ya que él me dio el impulso necesario para empezar este interesante trabajo, también hago público mi agradecimiento al Ing. Carlos Monar quien fue mi profesor de diseño experimental y me apoyo en este trabajo de investigación.

Agradezco a todos y cada uno de las personas que estuvieron a mi lado en todo momento, recalcándome lo importante que es prepararse para ser un hombre de bien, muchísimas gracias por haber formado parte de vida estudiantil, espero y aspiro seguir formando parte de ustedes dentro de mi vida profesional, Dios les pague.

ÍNDICE

CONTENIDOS	PÁG
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PROBLEMA.....	3
III. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Introducción.....	4
3.2. Taxonomía y descripción.....	4
3.3. Generalidades de <i>B. bassiana</i>	5
3.4. Modo de acción.....	6
3.5. Distribución de la broca del café.....	6
3.6. Generalidades sobre la biología de la Broca.....	7
3.7. Comportamiento reproductivo de la broca.....	8
3.8. Ciclo de vida y hábitos de la broca.....	8
3.9. La fenología del cafeto en relación con la broca.....	10
3.10. Efecto de la humedad y temperatura sobre la broca.....	11
3.11. Efecto de la broca sobre la producción de café.....	12
3.12. Manejo integrado de la broca del café.....	12
3.12.1. Control cultural.....	13
3.12.2. Control físico.....	13
3.12.3. Control legal.....	13
3.12.4. Control etológico.....	14
3.12.5. Control genético.....	14
3.12.6. Control químico.....	15
3.12.7. Control biológico.....	15

IV. MARCO METODOLÓGICO.....	17
4.1. Materiales.....	17
4.1.1. Localización de la investigación.....	17
4.1.2. Situación geográfica y climática.....	17
4.1.3. Zona de vida.....	18
4.1.4. Material experimental.....	18
4.1.5. Materiales de campo.....	18
4.1.6. Materiales de oficina.....	18
4.1.7. Materiales de laboratorio.....	19
4.2. Métodos.....	19
4.2.1. Factor en estudio.....	19
4.2.2. Tratamientos.....	20
4.2.3. Tipo de diseño experimental.....	20
4.2.4. Procedimiento.....	20
4.2.5. Tipo de análisis.....	21
4.3. Métodos de evaluación y datos a tomarse.....	21
4.4. Manejo del experimento.....	23
4.4.1. Recolección de insectos momificados y traslado al laboratorio...	23
4.4.2. Obtención del PDA.....	23
4.4.3. Aislamiento por dilución seriada.....	24
4.4.4. Siembra del hongo en el medio de cultivo.....	2
4.4.5. Preparación del medio de cultivo para los re aislamientos y los re aislamientos.....	25
4.4.6. Preparación de matrices.....	26

4.4.7. Preparación del sustrato de arroz para las matrices.....	26
4.4.8. Inoculación de matrices.....	27
4.4.9. Preparación de bolsas.....	28
4.4.10. Inoculación de bolsas.....	28
4.4.11. Incubación del hongo en las bandejas.....	29
4.4.12. Secado de bandejas.....	29
4.4.13. Cosecha manual del hongo.....	30
4.4.14. Evaluación del rendimiento del hongo.....	30
4.4.15. Evaluación de viabilidad del hongo.....	31
4.4.16. Inoculación del hongo en el insecto.....	32
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1. Agresividad de la cepa con la concentración y días a la esporulación del hongo.....	33
5.2. Días a la formación del micelio y días a la formación de unidades formadoras de colonias.....	38
5.3. Días a la momificación del insecto y porcentaje de brocas esporuladas.....	44
5.4. Porcentaje de brocas muertas.....	50
5.5. Coeficiente de variación.....	51
5.6. Análisis de polinomios ortogonales para el factor b.....	52
5.7. Análisis de correlación y regresión lineal.....	60
VI. COMPROBACION DE HIPOTESIS.....	62
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
7.1. Conclusiones.....	63

7.2. Recomendaciones.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°.	PÁG.
1. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo Beauveria bassiana en las variables ACC y DEH...	33
2. Resultados de la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos (AxB) en las variable DEH.....	36
3. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo Beauveria bassiana en las variables DFM y DFUFC.....	38
4. Resultados de la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos (AxB) en las variables DFM y DFUFC.....	41
5. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo Beauveria bassiana en las variables DMI y PBE...44	
6. Resultados de la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos (AxB) en las variables ACC y DEH.....	47
7. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo Beauveria bassiana en la variable PBM.....	50
8. ANÁLISIS DE POLINOMIOS ORTOGONALES PARA EL FACTOR B EN LAS VARIABLES DFM, DEH Y ACC.....	52
9. ANÁLISIS DE POLINOMIOS ORTOGONALES PARA EL FACTOR B EN LAS VARIABLES PBM Y PBE.....	57
10. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN Y REGRESIÓN LINEAL.....	60

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO Nº.	PÁG.
1. Cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en la variable de agresividad de la cepa con la concentración.....	34
2. Cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en la variable días a la esporulación del hongo.....	35
3. Tratamientos en la variable días a la esporulación del hongo.....	37
4. Cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en la variable días a la formación de micelio.....	39
5. Cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en la variable días a la formación de unidades formadoras de colonias.....	40
6. Tratamientos en la variable días a la formación del micelio.....	42
7. Tratamientos en la variable días a la formación de unidades formadoras de colonias.....	43
8. Cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en la variable días a la momificación del insecto.....	45
9. Cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en la variable porcentaje de brocas esporuladas.....	46
10. Tratamientos en la variable días a la momificación del insecto.....	48
11. Tratamientos en la variable porcentaje de brocas esporuladas.....	49
12. Cepas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en la variable días a la formación de micelio.....	50
13. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable DFM.....	53

14. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable DEH.....	54
15. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable ACC.....	55
16. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable PBM.....	58
17. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable PBE.....	59

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS N°.

1. Mapa físico de la localidad donde realizara la investigación
2. Base de datos
3. Formato de fichas de recolección de datos
4. Fotografías del manejo y evaluación del ensayo en el laboratorio
 - 4.1. Insecto momificado y grano con micelio del hongo
 - 4.2. Aislamiento por disolución seriada
 - 4.3. Preparación de medio de cultivo
 - 4.4. Siembra del hongo
 - 4.5. Incubación del hongo para su crecimiento
 - 4.6. Cajas petri a los 8 días de haber sido inoculadas
 - 4.7. Re aislamiento del hongo
 - 4.8. Cajas petri a los 8 días de haber realizado los re aislamiento
 - 4.9. Preparación del sustrato de arroz para las matrices
 - 4.10. Inoculación de matrices
 - 4.11. Incubación de matrices
 - 4.12. Matrices a los 8 días de haber sido inoculadas
 - 4.13. Preparación de bolsas
 - 4.14. Bolsas en la incubadora
 - 4.15. Bolsas a los 8 días de haber sido inoculadas
 - 4.16. Incubación en las bandejas
 - 4.17. Etiquetado de bandejas
 - 4.18. Bandejas en la incubadora

- 4.19. Destapado de bandejas
- 4.20. Bandejas destapadas en la incubadora
- 4.21. Retirado de bandejas de la incubadora
- 4.22. Cosecha del hongo
- 4.23. Evaluación del rendimiento
- 4.24. Evaluación de la viabilidad
- 4.25. Cajas petri con papel filtro y 1.5 gramos de café molido.
- 4.26. Disección de granos para la obtención de brocas.
- 4.27. Preparación de soluciones para el ensayo, pesado del hongo y tela tul para tapar las cajas petri.
- 4.28. Brocas muertas con presencia de micelio en las unidades experimentales
- 4.29. Brocas muertas por efecto de hongo vistas al microscopio de 40x
- 4.30. Brocas esporuladas vistas al microscopio de 40x
- 4.31. Visita del tribunal de tesis al laboratorio
5. Glosario de términos

RESUMEN Y SUMMARY

Resumen

El uso de organismos benéficos hoy en día está siendo aplicado en muchos países, sobre todo en temas de investigación sobre controles biológicos, razón por la cual mediante este proyecto se busca incentivar este tipo de trabajos, en este caso se usó un hongo entomopatógeno de muchas plagas como los es el Hongo (*Beauveria bassiana*), el cual fue reproducido en el laboratorio de microbiología de Universidad Estatal de Bolívar, para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) con el propósito de contar un una medida más para el manejo integrado de esta plaga, la cual tiene como iniciativa el control con un organismo vivo y a la vez orgánico, ya que en nuestro país todavía no se han creado leyes que impulsen alternativas agradables con el medio ambiente. En esta investigación se plantearon los siguientes objetivos 1) Separar dos cepas nativas de *Beauveria bassiana* presentes en suelos cafetaleros, en el Cantón Caluma. 2) Determinar la actividad entomopatógena de las especies de (*Beauveria bassiana*) sobre (*Hypothenemus hampei*). 3) Medir el efecto del hongo sobre la broca en el laboratorio. 4) Conocer cuál es la concentración ideal de unidades formadoras de colonias de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial 2x3x4 con 6 tratamientos y 4 repeticiones: Se realizó el análisis de varianza, prueba de tukey al 5% para comparar los promedios de los tratamientos, análisis de efecto para el factor A, análisis de correlación y regresión lineal y análisis de polinomios ortogonales para el factor B. Los rendimientos promedio más altos fueron para la cepa y la concentración del tratamiento; T3: Cepa granja el triunfo + $5 * 10^{-10}$ UFC/ml, seguido del tratamiento y la concentración; T6: Cepa finca Llaguno + $5 * 10^{-10}$ UFC/ml, los cuales al tener mayor concentración de unidades formadoras de colonias, mostraron mejores resultados en todas la variables.

Summary

The use of beneficial organisms today is being applied in many countries especially in the areas of research on biological controls, why by this project sought to encourage this type of work, in this case an entomopathogenic fungus many used pests such as is the fungus (*Beauveria bassiana*), which was reproduced in the laboratory of microbiology at State University of Bolivar, to control the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) for the purpose of counting a one step for management integrated pest, which is to control initiative with a living organism and the organic time, because in our country have not yet created laws that promote alternatives pleasant environment. In this research the following objectives 1 raised) separating two native strains of *Beauveria bassiana* in coffee soils present in the Caluma Canton. 2) Determine the activity entomopathogenic species (*Beauveria bassiana*) on (*Hypothenemus hampei*). 3) Measure the effect of the fungus on the bit in the laboratory. 4) Know what the ideal of colony forming units of *Beauveria bassiana* to control the coffee berry borer concentration. The design was completely random (DCA) with a factorial arrangement 2x3x4 with 6 treatments and 4 repetitions: analysis of variance, Tukey 5% effect analysis for the factor was performed to compare the average of treatments, A , correlation analysis and linear regression and analysis of orthogonal polynomials for factor B. the highest average yields were for strain and concentration of treatment; T3: farm Cepa win + $5 * 10^{-10}$ CFU / ml, followed by treatment and concentration; T6: Cepa farm Llaguno + $5 * 10^{-10}$ CFU / ml, which having higher concentration of colony forming units showed better results in all the variables.

I. INTRODUCCIÓN

El hongo entomopatógeno (*Beauveria bassiana*) de la familia Clavicipitaceae se encuentra presente en todo el mundo, parasita a varias especies de insectos, entre ellos a la broca del café. El hongo se desarrolla en el insecto, al cual mata en poco tiempo, se reconoce por el micelio blanco que desarrolla entre los tegumentos de su hospedero. El hongo puede atacar a la broca cuando esta se encuentra fuera del fruto, o bien si no se encuentra muy profunda en el fruto, ya que de otra forma es casi invulnerable al patógeno. Si la broca se contamina con el hongo, muere después de 3 a 6 días en condiciones de humedad saturada y dura hasta 9 días si las condiciones de humedad relativa son de 70 y 80%. Si la humedad es excesiva, la viabilidad de las esporas del hongo baja. (Borbón, O. 1991)

En el Ecuador el hongo se encuentra principalmente parasitando insectos a nivel de campo y de esta manera se ha producido una forma de control natural lo cual beneficia de manera directa al control de plagas como en el caso de la broca del café y la eficacia con que esta se ha presentado.

En la prov. de los Ríos Cantón Quevedo se realizaron pruebas para el control biológico del hongo sobre la plaga dando importantes y buenos resultados que terminaron no siendo satisfactorios a nivel de campo, porque las condiciones climáticas no fueron favorables y por lo tanto no obtuvieron los resultados esperados, razón por la cual el control que realiza el hongo sigue siendo de manera natural y lo podemos encontrar en el campo en lugares donde las condiciones se han favorables para el mismo o dándole estas condiciones para su desarrollo en el laboratorio.

El control biológico fue concebido a inicios del siglo XIX cuando algunos naturistas de diferentes partes reseñaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza. Con el empleo de la lucha o control biológico se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico,

mediante la utilización de organismos vivos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales. (Badii, M. *et, al.* 2006)

En esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Separar dos cepas nativas de (*Beauveria bassiana*) presentes en suelos cafetaleros, en el Cantón Caluma.
- Determinar la actividad entomopatógena de las especies de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*.
- Medir el efecto del hongo sobre la broca en el laboratorio.
- Conocer cuál es la concentración ideal de unidades formadoras de colonias de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café.

II. PROBLEMA

La broca del fruto del café uno de los problemas entomológicos en la caficultura mundial, ya que puede implicar pérdidas importantes en los rendimientos por cosecha que van desde 5% hasta 24%, según la infestación que se presente. En casos extremos se reportan pérdidas de hasta el 50% de la cosecha. (Ramírez, G. 2001)

Hoy en día el uso de sustancias químicas ha sido muy debatido debido a la gran contaminación que se da por el uso de los mismos, ante esto se creó un plan estratégico en el campo agrícola para el control de plagas que incluye un conjunto de métodos y técnicas llamado manejo integrado de plagas (MIP).

En nuestro país el uso de (*Beauveria bassiana*) como agente para el control biológico y a la vez orgánico no ha tenido mayor trascendencia, debido a esto no se han realizan las suficientes investigaciones sobre aislamiento de este hongo benéfico para el control de plagas, en nuestra provincia nunca se han realizados ensayos de este tipo, ni a nivel de laboratorio para el aislamiento de cepas y mucho menos en el campo para el control de la principal plaga del café conocida como la broca.

El aislamiento de este hongo benéfico se realiza debido a la gran necesidad que existe para poder realizar el control biológico y adecuado de la broca del café con una concentración ideal de UFC del hongo (*Beauveria bassiana*) para un eficaz control en el laboratorio.

III. MARCO TEORICO

3.1 Introducción.

(Beauveria bassiana) (Balsamo) *Vuillemin* es un hongo cosmopolita que infecta a más de 700 especies de insectos y ha sido evaluado a nivel de laboratorio contra un gran número de insectos plaga como el picudo de *algodnero Anthonomus grandis granis Boheman*, las mosquillas blancas *Bemisia spp*, y *Trialeurodes vaporariorum* (Wedtwood), la langosta *Schistocerca gregaria* (Forskál), la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Linnaeus) y áfidos, entre otros. (Córdova, G. 1995)

Actualmente se produce, formula y comercializa en varios países para el control de insectos plaga.

En México el interés por este hongo se ha incrementado sustancialmente a partir de las primeras evaluaciones contra broca del café (*Hypothenemus hampei*) en 1990.

3.2 Taxonomía y descripción.

Taxonomía de <i>(Beauveria bassiana)</i>	
Phylum	Deuteromycota
Clase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales
Genero	Beauveria
Especie	B. bassiana

(Collier, L. 1998)

En 1834 Agostino Bassi demostró por primera vez que una enfermedad en insectos era ocasionado por un hongo; de manera experimental

confirmo que la enfermedad (mal del signo) (calcino) o (muscardina blanca) del gusano de seda *Bombix mori* Linnaeus era ocasionada por un parasito vegetal el cual crecía en el insecto vivo y eventualmente le causaba la muerte, afirmado además que el agente infeccioso podía ser transmitido por contacto o por alimento contaminado y que las condiciones húmedas y calientes facilitan el crecimiento y desarrollo del patógeno. En 1835 Balsamo Crivel describió y llamo al hongo *Botrytis bassiana* en honor a Bassi. Posteriormente, en 1912. Vuillemin creo el género *Beauveria* considerando la forma y disposición de las esporas; seleccionando a *bassiana* como la especie tipo. (Córdova, G. 1995)

Para 1914 *Beauveria bassiana*, effusa, densa y globulifera. Hasta 1954 se habían descrito 14 especies de *Beauveria*, y McLeod las redujo a dos: *bassiana* y *tenella*, en tanto que de Hoog incluyo *B. Sanson* y Evans describieron *B. amorpha* de un coleóptero en Brazil y *B. velata* de una larva de lepidóptero en Ecuador. (Córdova, G. 1995)

3.3 Generalidades de (*Beauveria bassiana*).

El género *Beauveria* se caracteriza por presentar un micelio blanco, posee conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag, después que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares; *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) y las estructuras conidióforas forman densos grupos. (Carreño, I. 2003)

3.4 Modo de acción.

En general los hongos entomopatógeno penetran por las partes más blandas del integumento del insecto como las articulaciones, abdomen y protorax; las conidias del hongo entran en contacto germinando en la

exocutícula y formando un apresorio de donde crece el tubo germinativo que penetra por acción mecánica y la acción de enzimas, la cutícula y rápidamente llega al hemocele, produciendo toxinas, enzimas y dañando los órganos internos lo que finalmente causa la muerte del insecto. El micelio se ramifica sobre todos los órganos hasta infectar por completo el cuerpo y finalmente atraviesa de nuevo la cutícula para producir las conidias fuera del insecto. (Tanada, Y. 1993)

Bajo condiciones ambientales favorables: humedad relativa (HR) alta >90% y temperaturas óptimas 20 a 30 °C, las conidias germinan, el hongo crece fuera del cadáver del insecto, forma los conidióforos y posteriormente presenta la esporulación. (Goettel, M. *et al.* 2005)

3.5 Distribución de la broca del café.

La broca es originaria del África ecuatorial y fue introducida al continente americano a principios del siglo pasado. Actualmente se encuentra prácticamente en todos los países productores de café. (Bustillo, P. 1991)

En Ecuador se registró por primera vez en el sur en el año de 1981 y su dispersión ha sido rápida ya que encontró condiciones muy favorables para su desarrollo debido especialmente al clima, a la continuidad de la zona cafetera y su grado de tecnificación, que le aseguran suministro permanente de alimento. (Bustillo, P. *et al.* 1998)

Un análisis de la distribución de la broca a nivel mundial usando herramientas moleculares es presentado por. (Benavides, P. 2005)

Esta información sugiere una invasión en Asia de la broca procedente del oeste africano y se presume que algo similar ocurrió en América. Después de amplificar cientos de localidades a partir de muestras de broca provenientes de 17 países en tres continentes (África, Asia y América). Se confirmó el origen de esta plaga en Etiopía, y documentaron su

dispersión mundial y la invasión de Asia y América a partir de insectos del Oeste Africano. La distribución de las huellas dactilares y su relación genética, determinada por un análisis de Neighbor- Joining, indicó que dos introducciones de broca en Brasil se dispersaron posteriormente a través de las Américas y una tercera introducción en América fue evidente en Perú, Colombia y Ecuador. (Benavides, P. 2005)

3.6 Generalidades sobre la biología de la Broca.

En África el cafeto es una planta que en su estado natural debió encontrarse bajo sombra proporcionada por árboles grandes en la selva. Por esto se presume que la broca sea un insecto adaptado a las condiciones de sombrío, lo cual se ha comprobado en cafetales en América. Sin embargo, esto no quiere decir que sea más abundante en estos ecosistemas ya que la producción de frutos de los cafetos bajo esta condición es menor que a libre exposición. En los cafetales, a libre exposición plantados en altas densidades de las variedades Caturra y Castillo, se produce un auto sombrío que favorece el ataque de la broca pero debido a las altas producciones de frutos de café se pueden reproducir más brocas por unidad de superficie. (Bustillo, P. 1991)

Los compuestos volátiles son aquellos que se evaporan fácilmente en el aire. Las sustancias volátiles proporcionan señales a los insectos sobre su existencia, para poder dirigirse a ellos. La broca es primero atraída por metabolitos secundarios que produce el cafeto en su proceso de formación del fruto y luego por el color y la forma del fruto. Las que llegan después son atraídas por los mismos factores, pero también por los volátiles liberados por la primera broca. Hay evidencias que en los desechos fecales se producen sustancias que atraen otras hembras. Las hembras de la broca debido a esto tienden a agregarse al llegar a un cafetal concentrándose en ciertas ramas y árboles. (Bustillo, P. et al. 1998)

3.7 Comportamiento reproductivo de la broca.

La reproducción de *H. hampei* presenta una alta endogamia, en la que la broca colonizadora da lugar a una progenie de muchas hembras, y pocos machos. Los machos no vuelan y permanecen en el fruto y las hembras copulan con sus hermanos lo cual ocurre antes de salir de los frutos para ir a colonizar nuevos frutos de café. Este aspecto es acentuado por el mecanismo de la haplodiploidía funcional en el cual tanto las hembras como los machos son diploides, pero estos últimos fallan en expresar y transmitir los cromosomas paternos. (Bustillo, P. 1991)

Recientemente, se ha propuesto un mecanismo para explicar el comportamiento reproductivo de la broca que tiene que ver con la determinación sexual, en el que predominan las hembras sobre los machos. Ninguno de los siete cromosomas presentes en su forma haploide en la broca han sido ligados a la determinación sexual, se sugiere que probacterias del género *Wolbachia*, encontrada recientemente como un endosimbionte en la broca, es la causante de la determinación sexual, de la misma forma como ha sido descrita en otras especies de insectos. (Benavides, P. 2005)

3.8 Ciclo de vida y hábitos de la broca.

Existen considerables diferencias en cuanto a la información sobre la duración de sus estados, pero esto obedece fundamentalmente a diferencias en las condiciones ambientales de los diversos estudios, especialmente de temperatura. El adulto hembra de la broca del café una vez emerge de la pupa está listo para aparearse y unos tres días después puede iniciar posturas. Su período de oviposición es de unos 20 días y coloca entre dos y tres huevos/día. El número de días que puede permanecer ovipositando se estima en Colombia en 15 días, La incubación del huevo dura 7,6 días (23°C) y el estado de larva 15 días para los machos y 19 días para las hembras, la prepupa dos días y la

pupa 6,4 días (25,8°C). El ciclo total de huevo a emergencia de adulto se estima en 27,5 días (24,5°C). Sin embargo el tiempo generacional, o sea el tiempo que tarda en iniciarse otra generación del insecto, bajo condiciones de campo se estima para la zona cafetera colombiana en 45 días a una temperatura promedio de 22°C y de unos 60 días para una temperatura de 19°C. La relación de sexos es aproximadamente de 1: 10 en favor de las hembras. (Ruiz, C. 1996)

El adulto macho de la broca no tiene sino función reproductora. Es de menor tamaño, y se encuentra siempre en el interior de los frutos, además es incapaz de perforar un fruto. Debido a que los músculos de sus alas se encuentran atrofiados no puede volar. Este comportamiento explica por qué no es viable el uso de atrayentes sexuales para el manejo de este insecto. (Bustillo, P. *et, al.* 1998)

Una vez que la hembra colonizadora inicia su oviposición, permanece en el interior del fruto del café hasta su muerte cuidando de su progenie. Bajo condiciones de la zona central cafetera se ha determinado que en un fruto de café, desde el momento que es susceptible al ataque de la broca hasta la época de cosecha, se pueden producir dos generaciones de la broca. Si estos frutos no se cosechan y se dejan secar en el árbol, se puede llegar a cuatro generaciones. (Ruiz, C. 1996)

Lo anterior indica que hay una tendencia de la broca a penetrar con mayor rapidez en los frutos maduros. En estudios realizados en Colombia en cafetales a altitudes entre 1.200 y 1.350 m, se encontró la influencia directa que tiene la acumulación de la materia seca en el fruto de café sobre el tiempo que tarda el insecto desde el inicio de la perforación hasta iniciar la oviposición. Este tiempo fluctúa entre 91 días para frutos de 60 días de edad (11% de peso seco) hasta sólo cuatro días en frutos de 210 días de edad (33% de peso seco). (Ruiz, C. 1996)

Aquí también se debe tener en cuenta la diferencia que existe en el desarrollo de los frutos del café en Colombia, que harían variar estos datos. Cuando se encuentra el cafetal a unos 1200 m de altura (22°C) el desarrollo desde floración a cosecha puede tomar siete meses, pero a 1800 m de altura (19°C) este desarrollo puede ser de nueve meses. (Vélez, P. *et, al.* 1999)

Cuando la broca inicia ataques a frutos no muy desarrollados (<150 días) el tiempo de exposición en el canal de penetración es muy prolongado ya que espera a que la consistencia de las almendras sea la adecuada para iniciar su oviposición; este comportamiento hace vulnerable al insecto al tratamiento con insecticidas químicos y biológicos durante este tiempo. (Villalba, G. 2006)

La información anterior muestra la importancia de realizar labores de control dirigidas a los adultos a tiempo, ya que una vez la broca alcanza el endospermo sólo es controlable con la recolección oportuna del café o con la aplicación de organismos entomopatógenos que puedan entrar y atacar los estados de la broca dentro del fruto.

3.9 La fenología del cafeto en relación con la broca.

Aunque el árbol de cafeto suele florecer después de las lluvias que siguen a un periodo de sequía (déficit hídrico), en el año se presentan en la región cafetera central dos periodos definidos de floraciones correspondientes a la cosecha principal del segundo semestre y a la mitaca o cosecha del primer semestre. El primer período va de mediados de marzo a finales de mayo y el segundo desde principios de septiembre hasta finales de noviembre. (Vélez, P. *et, al.* 1999)

Estudios sobre el desarrollo del fruto del café, han demostrado que antes que el fruto madure transcurren 32 semanas y que el fruto alcanza un

20% de peso seco entre 110 y 140 días después de la floración. (Salazar, M. *et, al.* 1993)

Se comprobó que la broca puede atacar los frutos desde 70 días después de la floración, pero tan sólo en frutos mayores a 120 días cuando éstos tienen más del 20% de peso seco, los encuentra aptos para iniciar su reproducción mediante la oviposición. (Salazar, M. *et, al.* 1993)

Se demostró que la oviposición ocurre en menos de 4 a 5 días en frutos mayores a 150 días con un peso seco del 27%, mientras que esta toma hasta 90 días cuando se expone a frutos de 60 días de edad (Ruiz, 1996). El registro de las floraciones en las fincas es muy importante porque permite hacer predicciones sobre el tiempo de ocurrencia de la cosecha, sus picos y los momentos críticos de posibles ataques de la broca. (Bustillo, P. *et, al.* 1998)

Esta información es muy útil para un programa de manejo de la broca y lograr una mayor eficiencia para controlar las poblaciones de la broca que estén penetrando los frutos.

3.10 Efecto de la humedad y temperatura sobre la broca.

Los periodos prolongados de sequía en los cafetales causan la caída de frutos, se acelera la maduración y las almendras resultan mal formadas y de calidad inferior. Si estos están infestados con la broca su desarrollo también es más rápido o sea que el tiempo generacional es más corto, hay una mayor reproducción dentro de los frutos caídos al no recibir humedad por las lluvias. La broca, como se dijo antes, no emerge de los frutos durante los periodos secos generando una gran descendencia la cual inicia su salida cuando comienzan las lluvias. Durante los periodos lluviosos se presenta una emergencia muy continua pero en cantidades muy bajas debido a que por efecto de las precipitaciones la broca no se reproduce en grandes cantidades dentro de los frutos. (Cenicafé. 2010)

3.11 Efecto de la broca sobre la producción de café.

El daño que ocasiona la broca al fruto de café, consiste en perforaciones a los frutos y caída de estos cuando atacan frutos jóvenes. Se encontró que cuando la broca ataca frutos de café de dos meses de edad, más del 50% de los frutos afectados se caen de las ramas y muchos de ellos toman un color característico de madurez; pero si el ataque ocurre después de los tres meses de edad, la caída de frutos es menor al 23,5%. La pérdida de peso del café pergamino seco por causa de la broca fue en promedio de 18,1%, y los frutos que fueron atacados tempranamente se maduran prematuramente, lo cual repercute en un manchado del pergamino de los granos sanos. (Cenicafé. 1993)

3.12 Manejo integrado de la broca del café.

El control de la broca del café no ha sido una tarea fácil debido a sus hábitos de vida en el interior del fruto. Los altos niveles de población y el desarrollo de todo su potencial biótico sin restricciones en condiciones favorables, hizo que Cenicafé planteara una estrategia de control denominada Manejo Integrado de la Broca del Café (MIB) la cual comprende diferentes métodos de manejo como son prácticas agronómicas, control cultural, físico, legal, etológico, genético, químico y biológico. (Bustillo, P. *et, al.* 1998)

Se afirma, en relación con la estructura de costos de producción, que el manejo integrado de la broca del café equivale al 7% de los costos anuales por hectárea, donde el control cultural emplea el 54%, siendo el componente con mayor participación; el control químico 26%, el biológico el 10%, las evaluaciones el 7% y los equipos de aspersión el 3%. (Bustillo, P. 1991)

3.12.1 Control cultural.

El control cultural está sustentado en prácticas encaminadas a minimizar la disponibilidad de alimento y refugio de la plaga y modificar las condiciones favorables para la reproducción de la broca. Estas labores incluyen podas frecuentes, zoqueo, cosechas oportunas, condiciones de higiene y cubrimiento del café durante el beneficio y secado para evitar el escape de la broca y métodos de muestreo en campo, entre otras. (Bustillo, P. *et, al.* 1998)

3.12.2 Control físico.

Se refiere a métodos mecánicos para remover o eliminar una plaga. Normalmente estos métodos son costosos y poco utilizados. Sin embargo, en cultivos de café, se ha validado el uso de aspiradoras mecánicas para recoger del suelo los frutos de café infestados por broca. (Duque, O. 2004)

3.12.3 Control legal.

Todos los programas de manejo deben basarse en medidas gubernamentales que garanticen el empleo de estas medidas en toda la región. Para el caso del café han existido normas legales para contrarrestar la broca. Además de las medidas que obliga a realizar prácticas como la cosecha total de frutos secos y sobre maduros, la cosecha periódica y el beneficio oportuno de los frutos cosechados y no transportar frutos infestados a sitios libres de la plaga. (Bustillo, P. *et, al.* 1998)

3.12.4 Control etológico.

Se refiere al uso de sustancias químicas, naturales o sintéticas, para repeler o atraer plagas a un determinado sitio para eliminarlas, modificar

su actividad sexual o alterar su orientación. Varias investigaciones han demostrado que la broca es fuertemente atraída por una mezcla de metanol y etanol en proporción 3 a 1. Se han diseñado trampas de captura utilizando estos alcoholes. (Cárdenas, R. 2000)

Sin embargo los resultados obtenidos han permitido recomendar estos dispositivos solo para el monitoreo de las poblaciones en cafetales en Colombia donde la distribución de la cosecha está dispersa a lo largo del año. (Cenicafé. 2010)

3.12.5 Control genético.

Una de las alternativas para el control genético de insectos ha sido el desarrollo de plantas transgénicas, que expresen genes de resistencia. (Góngora, B. *et, al.* 2008)

Un gen inhibidor de α -amilasas aislado *Brachiaria decumbens* Stapf cuya proteína también inhibe el crecimiento y desarrollo de la broca, se consideran buenos candidatos para ser introducidos al genoma del café. (Padilla, B. *et, al.* 2006)

Se ha explorado también la posibilidad de un control autocida mediante la manipulación del genoma del insecto; los tipos de control que se han contemplado incluyen técnicas como esterilidad inducida mediante mutagénesis, genes letales condicionales e incompatibilidad citoplasmática. (Benavides, P. 2005)

3.12.6 Control químico.

Incluye el uso de insecticidas del tipo clorpirifos, fenitrotion y fentoato, los cuales son recomendados por Cenicafé. (Villalba, G. 2006)

El uso de insecticidas en la mayoría de los países cafeteros a los que ha llegado la broca, ha presentado ciertos efectos negativos sobre el ecosistema. (Bustillo, *et, al.* 1998)

Esta situación es compleja, ya que la mayoría de las familias cafeteras viven en las fincas exponiéndose a la contaminación por los productos químicos, causando a su vez daños ambientales y desequilibrios biológicos al eliminar la fauna benéfica e incrementar las poblaciones de insectos plaga y el desarrollo de resistencia de estos a los productos utilizados. (Bustillo, P. 1991)

Los insecticidas deben usarse como último recurso cuando los niveles de infestación son muy altos; se recomienda por lo tanto, aplicarlos de manera localizada en el tiempo apropiado, con equipos de aspersión calibrados y utilizando formulaciones de categoría toxicológica III y con una actividad biológica no mayor a 15 días. (Bustillo, P. *et, al.* 1998)

3.12.7 Control Biológico.

Los hongos entomopatógenos para el control de la broca son un componente fundamental en el desarrollo de un programa de manejo integrado que tenga por finalidad la preservación del medio ambiente y la racionalidad del uso de insecticidas químicos. Se considera que los hongos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vullemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin juegan un papel importante en el control de *H. hampei* bajo la condiciones de los ecosistemas cafeteros colombianos. (Bustillo, P. *et, al.* 1998)

Desde la llegada de la broca al país, el hongo *B. bassiana* ha sido asociado con el insecto y fue reportado atacando la broca en 1990. (Vélez, P. *et, al.* 1999)

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1. Materiales.

4.1.1 Localización de la investigación.

Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Ángel Polivio Chávez
Sitio	Laboratorio de biotecnología de la UEB
Sector	Laguacoto II

4.1.2. Situación geográfica y climática.

Localidad	Laboratorio de biotecnología de la UEB
Altitud	2622 msnm
Latitud	01°36'52"S
Longitud	78°59'54"W
Temperatura media anual	14.4 °C
Temperatura máxima	21 °C
Temperatura mínima	7 °C
Precipitación media anual	896 mm
Heliofania media anual	900 horas /luz/año
Humedad relativa	70 %
Velocidad promedio del viento	6 m/s

Fuente: Estación Meteorológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente de la Universidad Estatal de Bolívar. 2012

4.1.3 Zona de vida

La vegetación según la clasificación Ecología de Holdridge esta zona ecológica corresponde a bosque húmedo montano bajo (bh-MB). (Holdridge. 2015)

4.1.4 Material experimental.

Se utilizó 2 cepas nativas del hongo (*Beauveria bassiana*) que fueron recolectadas de suelos cafetaleros de la Universidad Estatal de Bolívar, Campus Caluma y de la finca del Señor Llaguno.

4.1.5 Materiales de campo.

Cámara digital

GPS

Libro de campo

Machete

Rozadora

Botellas platicas

Fundas

Cinta adhesiva

4.1.6 Materiales de oficina.

Calculadora

Computadora con sus respectivos accesorios

Lápices

Memoria flash

Papel boom

Regla

4.1.7 Materiales de laboratorio

Microscopio

Porta y cubre objetos

Cajas Petri

Autoclave

Erlenmeyer

Incubadora

Cámara de flujo laminar

Pinzas

Espátulas

Papel aluminio

Micro pipeta

PDA

Solución dispersante (Twin 80)

4.2. Métodos

4.2.1 Factores en estudio

Factor A ; Cepas
A1= Granja el Triunfo
A2= Finca Llaguno
Factor B ; Concentraciones
B1= $3 * 10^{-10}$ UFC/ml
B2= $4 * 10^{-10}$ UFC/ml
B3= $5 * 10^{-10}$ UFC/ml

4.2.2. Tratamientos

T#	CODIGO	DETALLE
T1	A1;B1	Cepa granja el triunfo con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml
T2	A1;B2	Cepa granja el triunfo con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml
T3	A1;B3	Cepa granja el triunfo con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml
T4	A2;B1	Cepa finca Llaguno con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml
T5	A2;B2	Cepa finca Llaguno con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml
T6	A2;B3	Cepa finca Llaguno con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml

4.2.3. Tipo de diseño experimental o estadístico

Se usó un diseño completamente al azar (DCA) en un arreglo factorial de $2 \times 3 \times 4$.

4.2.4. Procedimiento

Número de localidades	1
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	4
Número de unidades experimentales	24
Número de brocas por unidad experimental	10
Número total de brocas para el ensayo	240

4.2.5. Tipos de análisis

4.2.6 Análisis de varianza (ADEVA) según el siguiente detalle

Fuentes de variación	Grados de libertad	C M E
Repeticiones (r-1)	3	$\frac{1}{2}e + 6 \frac{1}{2}$ Repeticiones
Factor A (a-1)	1	$\frac{1}{2}e + 6 0^2A$
Factor B (b-1)	2	$\frac{1}{2}e + 6 0^2B$
A*B (a-1)(b-1)	2	$\frac{1}{2}e + 2 0^2A*B$
Error experimental (t-1)(r-1)	15	$\frac{1}{2}e$
Total (t x r) – 1	23	

*Cuadrados medios esperados. Modelo fijo. Tratamientos seleccionados por el investigador.

4.2.7 Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de los tratamientos, en las variables que sean significativas (Fisher Protegido).

4.2.8 Análisis de correlación y regresión lineal.

4.2.9 Análisis de efecto principal para el Factor A.

4.2.10 Análisis de polinomios ortogonales para el Factor B.

4.3 Métodos de evaluación y datos a tomarse.

4.3.1 Porcentaje de brocas muertas.

Esta variable se registró al séptimo día de haber sumergido las brocas en las disoluciones, observando el número de brocas muertas por cada unidad experimental y los resultados se expresaron en porcentajes.

4.3.2 Porcentaje de brocas esporuladas por el hongo.

Se registró a los 15 días de haber sido inoculadas las brocas, observando si las brocas presentaron micelio por cada unidad experimental y los resultados fueron expresados en porcentajes.

4.3.3 Días a la formación del micelio del hongo.

Esta variable se identificó cuando existió el 50% de la formación del micelio del hongo por cada unidad experimental, determinando el número de días a partir del aislamiento.

4.3.4 Días a la formación de unidades formadoras de colonias.

Esta variable se identificó cuando existió el 50% de la formación de una colonia del hongo por cada unidad experimental, determinando el número de días a partir del aislamiento.

4.3.5 Días a la esporulación del hongo en el insecto.

Esta variable se registró cuando se identificó el 50 % de insectos esporulados por cada unidad experimental.

4.3.6 Días a la momificación de insectos por efecto del hongo.

Esta variable fue tomada cuando el 50% de los insectos de cada unidad experimental estuvieron momificados.

4.3.7 Agresividad de la cepa con la concentración.

Este dato se tomó por cada unidad experimental, teniendo en cuenta la cepa que presentó mayor desarrollo en el insecto.

4.4 Manejo del experimento.

4.4.1 Recolección de insectos momificados y traslado al laboratorio.

Se realizó la recolección de insectos momificados y granos contaminados por el hongo en el campo de manera natural en el Cantón Caluma, para luego llevarlos al Laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal Bolívar.

Posteriormente se trasladaron los insectos momificados y los granos contaminados por el hongo al Laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal Bolívar en la Ciudad de Guaranda.

4.4.2 Obtención del PDA.

Se utilizó el reactivo (PDA) el cual ya viene preparado y se encuentra en el laboratorio de microbiología de la UEB y luego se pesó 40 gramos del reactivo (PDA), mezclando con un litro de agua destilada, agitando la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea. Procediendo a sellar el frasco con papel aluminio y luego poniendo a esterilizar la mezcla en autoclave por 20 minutos, a 121 °C y 1.2 bar de presión.

Después de esto se procedió a verter el medio en platos Petri, además de guardar el frasco con el medio de cultivo para su uso posterior. En este caso el frasco se debe poner en baño de maría al momento que se vaya a verter.

Se vertió aproximadamente de 10 a 20 cc del medio en cada plato Petri: esto se lo hizo cuando la temperatura del medio permitió su manipulación, evitando que se enfríe completamente, o sea antes que se inicie la solidificación del agar. Dejamos solidificar el medio en los platos petri. Para un mejor manejo del cultivo y evitar contaminación, se recomienda

usar el medio (realizar la siembra del hongo) después de 12 horas de haber vertido el medio en los platos petri.

4.4.3 Aislamiento por dilución seriada.

Se colocó el insecto momificado en un recipiente que contenía 10 ml de agua destilada con 0.01 % de Tween - 80 y se agito durante 1 minuto. Transferimos luego con una pipeta estéril 1 ml de la solución a un Erlenmeyer que contenía 9 ml de agua destilada con 0.01 % de Tween - 80 y luego se agito fuertemente durante 1 minuto. Repetimos el segundo paso hasta lograr obtener una segunda dilución de 10^{-2} y repetimos nuevamente la operación durante cuatro veces más (hasta lograr obtener un total de cinco diluciones en serie).

4.4.4 Siembra del hongo en el medio de cultivo.

Esto se lo realizó dentro de la cámara de flujo laminar vertical, Se sembró a partir de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en platos petri con medio de cultivo (en un total de 3 a 5 platos petri por cada dilución). La siembra del hongo se realizó tomando de la dilución, una gota (0.1 ml) con una pipeta estéril y depositándola sobre el medio de cultivo.

Luego se almaceno las cajas petri inoculados, en una incubadora a 25 °C durante un periodo de incubación aproximado de 5 a 6 días, hasta obtener el crecimiento característico del hongo.

4.4.5 Preparación del medio de cultivo para los re aislamientos.

Procedimos a retirar las cajas petri inoculadas, de hace ocho días de la incubadora para realizar los re aislamientos, lo cual lo se realizó de la siguiente manera:

Se utilizó el reactivo (PDA) el cual ya viene preparado y se encuentra en el laboratorio de microbiología de la UEB y empezamos pesando 40 gramos del reactivo (PDA) y mezclando con un litro de agua destilada, agitando la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea. Sellamos el frasco con papel aluminio y luego se puso a esterilizar la mezcla en autoclave por 20 minutos, a 121 °C y 1.2 bar de presión.

Después de esto se procedió a verter el medio en platos Petri, se puede guardar en el frasco con el medio de cultivo para su uso posterior. En este caso el frasco se debe poner en baño de maría al momento que se vaya a verter.

Se vertió aproximadamente de 10 a 20 cc del medio en cada plato Petri: esto se lo hace cuando la temperatura del medio permitió su manipulación, evitando que se enfríe completamente, o sea antes que se inicie la solidificación del agar. Dejamos solidificar el medio en los platos petri, para un mejor manejo del cultivo y evitar contaminación, se recomienda usar el medio (realizar la siembra del hongo) después de 12 horas de haber vertido el medio en los platos petri.

Una vez que ya se vertió el medio de cultivo en las cajas petri, las mismas fueron llevadas a la cámara de flujo laminar vertical junto con las cajas petri que estaban inoculadas., Ya en la cámara de flujo laminar se procedió a destapar las cajas, asegurando que el lugar este totalmente esterilizado y con la ayuda de una pinza se procedió a tomar una parte blanquecina del hongo para sembrar en el medio de cultivo nuevo, esto se lo realizó en forma de zigzag para que el hongo se pueda desarrollar de manera efectiva, luego de haber sembrado en todas las cajas petri, se selló y se etiquetó para luego dejarlas en la incubadora durante 8 días más a 25 °C.

4.4.6 Preparación de matrices.

Se retiró las cajas petri inoculadas hace ocho días de la incubadora para realizar la inoculación de matrices.

En esta etapa del proceso de producción del hongo, se lo reproduce masivamente en un sustrato de arroz entero, para obtener las unidades infectivas, o sea las conidias del entomopatógeno. En la matriz se reproduce el hongo que se utiliza para inocular después las bolsas, y en las bolsas se reproduce el hongo que luego es pasado a las bandejas y que será cosechado al final del proceso de producción.

La matriz se establece en recipientes de vidrio (Erlenmeyer) y las bolsas en bolsas de polipropileno. Para la matriz se utilizaron 100 gramos de arroz en cada Erlenmeyer. La cantidad de arroz a colocar en la bolsa, depende del tamaño de ésta, generalmente se usan 200 gramos por bolsa.

4.4.7 Preparación del sustrato de arroz para las matrices.

El arroz que se utilizó en las matrices, debía ser pre cocido, para lo cual se colocó un recipiente que contenía 250 ml de agua potable, en un calentador magnético, cuando el agua comienza a hervir, se depositó 300 gr de arroz y se mantiene hasta que el arroz presento una consistencia suave, lo cual tomo aproximadamente 5 minutos. Posteriormente el arroz lo pusimos a escurrir en una zaranda hasta que estuvo totalmente frío y seco, con el objetivo de procurar que las matrices no adquieran humedad durante su incubación. En cada Erlenmeyer de 500 ml se depositó 50 gramos del arroz pre-cocido y seco, lo cual constituyo la matriz. Las matrices fueron esterilizadas en el autoclave, durante 4 a 5 minutos, a 121°C y 1.2 bares de presión, con el fin de eliminar contaminantes, al igual que el asa de hockey y la jeringa veterinaria.

Después de haber esterilizado las matrices, éstas las agitamos para evitar aglomeraciones de los granos de arroz, lo que va a favorecer el crecimiento homogéneo del hongo sobre las matrices inoculado.

4.4.8 Inoculación de matrices.

El objetivo de la matriz fue reproducir el inóculo para la inoculación de las bolsas. Para realizar la inoculación de las matrices se preparó una suspensión de inóculo a partir del cultivo puro (PDA), este inóculo debió ser de buena calidad, es decir de buen crecimiento y libre de contaminantes. El inóculo se lo obtuvo raspando cuidadosamente el hongo de la superficie del medio de cultivo hasta obtener un polvo de conidias del hongo, y este lo coloco en 60 ml de agua destilada estéril.

La inoculación de matrices lo realizamos con una jeringa veterinaria esterilizada a 121°C y 1.2 bar de presión. Se inoculo 10 cc de la suspensión del hongo por cada matriz que contenía 50 g de arroz precocido. La cantidad de inóculo obtenida a partir de un plato petri, fue suficiente para inocular cuatro matrices.

Después de la inoculación, las matrices fueron incubadas en una incubadora a una temperatura de 26 °C, por un período aproximado de 8 días. Durante este período el hongo se desarrolló y produjo estructuras reproductivas o conidias.

4.4.9 Preparación de bolsas.

Se procedió a retirar las matrices inoculadas de la incubadora, para posteriormente realizar la inoculación de las bolsas.

Depositamos 200 gramos de arroz entero en bolsas de polipropileno, agregamos 100 ml de agua destilada y sellamos las bolsas con abre fácil.

Se esterilizó las bolsas que contenían el arroz, con calor húmedo (autoclave) a 121 °C y 1.2 bar de presión, durante 4-5 minutos. Después de esterilizar las bolsas, agitamos para evitar aglomeraciones en el arroz y dejamos enfriarlas.

4.4.10 Inoculación de bolsas.

La inoculación de las bolsas se lo realizo con el inóculo producido a partir de la matriz. Para ello agreguemos a la matriz (colonizada) 300 ml de agua destilada estéril al 0.1 % de Tween 80. Agitamos el contenido hasta obtener una suspensión homogénea de conidias.

Se inoculo con el contenido de una matriz aproximadamente 10 bolsas, utilizando una jeringa veterinaria debidamente esterilizada. Cada bolsa fue inoculada con 20 cc de la suspensión del hongo.

Una vez inoculadas las bolsas, las colocamos en una incubadora a una temperatura de 26 °C, durante un periodo de 4 días.

Descartamos aquellas bolsas que estaban contaminadas y/o que su crecimiento fue muy lento o que no fue homogéneo. Se seleccionó las bolsas que presentaron crecimiento homogéneo y normal.

4.4.11 Incubación del hongo en las bandejas.

Retiramos las bolsas de la incubadora para seleccionar las mejores, es decir la que presentaron muy buenas características de crecimiento, (homogéneo, rápido y libres de contaminantes) para depositar su contenido en bandejas.

Se preparó las bandejas plásticas, desinfectando con alcohol y flameándola con el mechero. Tomamos las bolsas con crecimiento del hongo y las abrimos. Depositamos en cada bandeja de 70 cm de largo por

40 de ancho x 20 de alto, el contenido de 8 bolsas con hongo, después de su incubación y removimos con la ayuda de una espátula para poder tener mayor uniformidad en la esporulación.

Colocamos una bandeja sobre otra y la sellamos con cinta más King para evitar la penetración de luz. Etiquetamos las bandejas con el nombre de la cepa, número del lote y fecha de incubación. Colocamos las bandejas en un cuarto frío a temperatura de 26 °C durante un periodo de 6 días.

4.4.12 Secado de bandejas.

A los 7 días de haber permanecido las bandejas tapadas unas con otras, procedimos a destapar las bandejas con el objetivo de eliminar el exceso de humedad durante un tiempo de 12 a 15 días, hasta que se desprendan las conidias (aspecto polvoso) y facilite el proceso de cosecha del hongo.

Estas bandejas las ubicamos en una incubadora a 26 °C debido a que esta sería la temperatura óptima para el desarrollo del hongo.

4.4.13 Cosecha manual del hongo.

Se preparó todos los utensilios (tamiz, guantes, mascarillas, recipientes, etc.) para realizar la cosecha del hongo. El substrato colonizado (arroz con el crecimiento del hongo) lo colocamos en un tamiz con orificios de 1mm de diámetro, para separar el polvo (conidias) del hongo de los granos de arroz. El tamiz fue colocado en un recipiente, para facilitar la recolección del polvo del hongo.

Se agito fuertemente por varios minutos para tamizar el producto y obtener las conidias del hongo. Dejamos reposar por espacio de unos tres minutos, con el propósito que las conidias se asienten en el fondo del recipiente y luego se recolecto el polvo cosechado. Al polvo cosechado se realizó la evaluación de rendimiento y viabilidad del producto, para su

debida formulación. Al polvo cosechado también se lo peso y coloco en un recipiente limpio y completamente oscuro para evitar la entrada de luz.

Etiquetamos el recipiente (número de lote, cepa, fecha de cosecha, etc.) y almacenamos en refrigeración a temperatura de 5 a 6 °C.

4.4.14 Evaluación del rendimiento del hongo.

Se pesó la cantidad total de polvo cosechado por bandeja de arroz, determinamos la concentración de conidias del polvo cosechado, realizando el conteo de conidias por gramo de polvo cosechado, utilizando una cámara de conteo Neubauer.

Esto lo hicimos preparando diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del hongo, hasta obtener una dilución que permitiera realizar el conteo. Las diluciones las preparamos de la siguiente manera:

Colocamos un gramo del polvo cosechado en un Erlenmeyer que contenía 9ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.01%. Transferimos con una pipeta estéril 1ml de la primera dilución a un Erlenmeyer que contenía 9ml de agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80, éste lo agitamos fuertemente durante un minuto, hasta lograr obtener una tercera dilución de 10^{-3} de esta manera fuimos procediendo hasta encontrar la dilución adecuada (10^{-5} , 10^{-6}). De la dilución seleccionada, se tomó con una pipeta una alícuota de la suspensión y se llenó la cámara de conteo.

Se realizó el conteo de conidias a través del microscopio, utilizando el cuadro principal (cp.) central, el cual está dividido en 25 cuadrillos secundarios. Si se desea se puede contar el número de conidias solamente en algunos de los cuadrados secundarios y obtener el promedio. Este paso lo repetimos varias veces hasta obtener un rendimiento promedio. Para calcular la concentración de conidias por

gramo, multiplicamos el número de conidias observadas en el cuadro, por el factor de cámara, luego por el factor de dilución. El factor de cámara fue 10,000 para cuadros principales y 250,000 para cuadros secundarios.

4.4.15 Evaluación de viabilidad del hongo.

Se esterilizo platos petri, con papel filtro y porta objetos, todos en conjunto en el autoclave a 1.2 bar de presión y 121 °C por un tiempo de 60 minutos. Preparamos un medio de cultivo de agar más agua y esterilizamos durante 60 minutos.

Posteriormente con una pipeta deposite dos alícuotas del medio de cultivo en un porta objeto. Depositamos con una pipeta sobre las mismas alícuotas del medio, dos alícuotas de la suspensión del hongo y colocamos el montaje en una cámara húmeda, la cual consistió en un plato petri con papel filtro humedecido.

Se hizo el conteo de conidias totales, registrando las germinadas y las no germinadas.

4.4.16 Inoculación del hongo en el insecto

Mediante un corte minucioso de grano a grano se obtuvo las brocas necesarias para la realización del ensayo, para luego realizar la aplicación de *B. bassiana* en el laboratorio, utilizamos el método de inmersión, que consistió en sumergir 5 brocas colocadas dentro en una malla de tela en una solución de cloro al 0.01%, por un minuto, luego las mismas fueron sumergidas en 100 ml de agua destilada durante otro minuto para eliminar los residuos de cloro. Una vez desinfectadas procedimos a sumergir las brocas durante un minuto en 10 ml de agua destilada, más la dosis indicada de conidias de (*Beauveria bassiana*) para cada tratamiento.

Las brocas inoculadas fueron colocadas en platos petri con un pincel, a razón de 5 brocas por plato y 1.5 gramos de café, para evitar canibalismo

entre ellas y muerte por hambre, a la vez se colocó papel filtro estéril humedecido en la base del plato, para facilitar el desarrollo del hongo sobre la broca. Cada plato petri fue tapado con tela tul y se identificó cada tratamiento y repetición con códigos para los conteos posteriores.

Los platos petri fueron colocados en un cuarto de incubación a 26 °C durante siete días. Con un atomizador se roció el papel filtro con agua destilada, para mantenerle la humedad sin que haya saturación de agua.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Agresividad de la cepa con la concentración (ACC); Días a la esporulación del hongo (DEH).

Cuadro No. 1. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en las variables ACC y DEH.

ACC (**)		DEH (**)	
Cepas de Beauveria b.	Promedio	Cepas de Beauveria b.	Promedio
A1; Granja el triunfo	51,67	A1; Granja el triunfo	5.08
A2; Finca Llaguno	33,33	A2; Finca Llaguno	3.25
Efecto Principal: A1-A2=18,34 %		Efecto Principal:A1-A2= 1,83= 2 Días	

CEPAS DEL HONGO (*BEAUVERIA BASSIANA*).

La respuesta de las cepas de *Beauveria bassiana* en cuanto a la variable ACC, fue altamente significativa, así mismo fue altamente significativa para para la variable DEH (Cuadro No. 1).

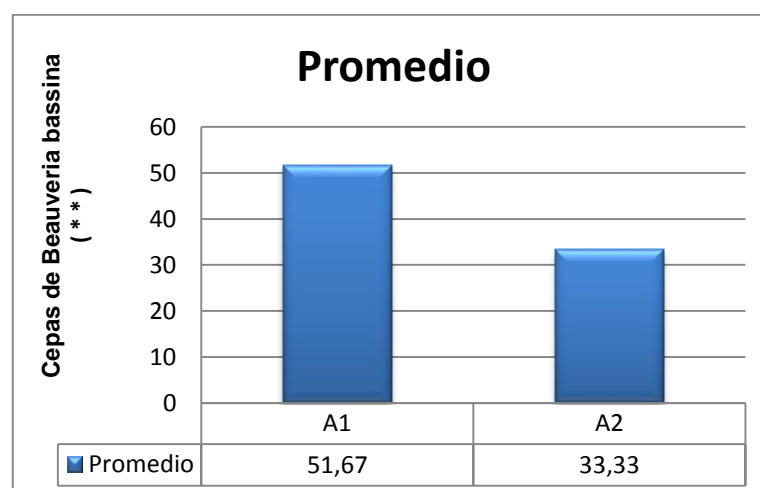


Grafico No. 1. Cepas del hongo *Beauveria bassiana* en la variable de agresividad de la cepa con la concentración.

Con el análisis de efecto principal, la cepa de *Beauveria bassiana* de la Granja el triunfo (A1), presentó en promedio general de 18.34% más de agresividad en comparación al A2; Cepa, finca Llaguno que se registró con el 33.33% de agresividad (Cuadro No. 1 y Gráfico No.1).

Estos resultados tienen lógica debido a que, las dos cepas disponían de un cuidado estéril, y a su vez las mismas tenían iguales condiciones para su desarrollo, de esta manera se evitó posible alteración en los resultados.

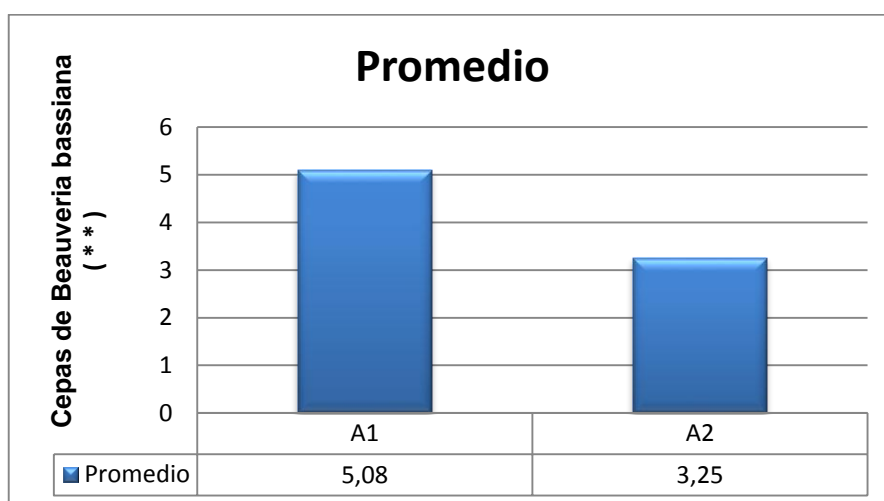


Grafico No. 2. Cepas del hongo *Beauveria bassiana* en la variable días a la esporulación del hongo.

Con el análisis de efecto principal para la variable días a la esporulación del hongo, la cepa granja el triunfo, demora 2 días más en esporular en comparación con la cepa finca Llaguno que esporulo a los 3 días luego de la muerte del insecto (Cuadro No. 1 y Gráfico No. 2).

Esto se debe a que la cepa Granja el triunfo obtuvo una esporulación completa en todas las unidades experimentales, a diferencia de la cepa finca Llaguno que no logro esporular por completo, debido a las características propias del hongo.

Cuadro No. 2. Resultados de la prueba de tukey al 5% para comparar promedios, tratamientos (AxB) en la variable días a la esporulación del hongo (DEH).

DEH (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango
T1: Cepa Granja el triunfo con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml	6,00	A
T5: Cepa Finca Llaguno con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml	5,50	A
T2: Cepa Granja el triunfo con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml	5,25	A
T6: Cepa Finca Llaguno con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml	4,25	B
T3: Cepa Granja el triunfo con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml	4,00	B
T4: Cepa Finca Llaguno con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml	0,00	C
CV = 8.94%		

TRATAMIENTOS (AxB).

Se calculó una dependencia de factores altamente significativa (**) en la variable días a la esporulación del hongo (Cuadro No. 2). Es decir, la respuesta de las cepas de *Beauveria bassiana* dependió de las concentraciones de unidades formadoras de colonias por mililitros.

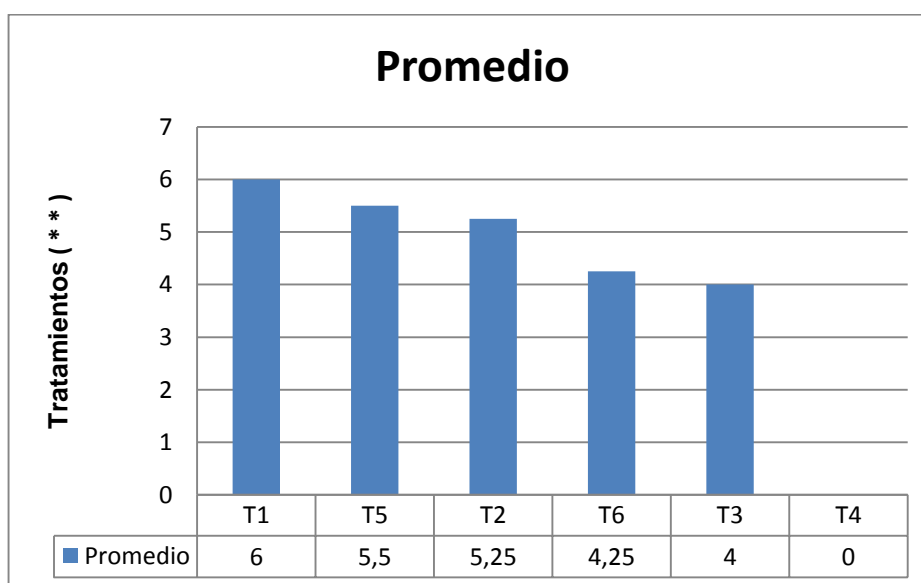


Grafico No. 3. Tratamientos en la variable días a la esporulación del hongo

Con la prueba de tukey al 5%, el valor promedio más alto de este componente, se registró en el tratamiento T1; Cepa Granja el triunfo con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml , esta esporulo a los 6 día, y es el cual está representado en la gráfica, pero el tratamiento T3; Cepa Granja el triunfo con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml tiene menos días en esporular, lo cual nos dice que este es el tratamiento más eficaz analíticamente observando y el valor más bajo fue el T4; Cepa Finca Llaguno con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml , la cual no esporulo por lo tanto se registra con un valor de cero. (Cuadro No.2 y Gráfico No. 3)

Está claro el efecto que tuvo los tipos de concentraciones en las cepas, ya que a mayor concentración, el hongo tiene la capacidad para esporular en menos días por la mayor concentración de esporas, según nos demuestra en este gráfico.

5.2 Días a la formación del micelio (DFM); Días a la formación de unidades formadoras de colonias (DFUFC).

Cuadro No. 3. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en las variables DFM Y DFUFC.

DFM (**)		DFUFC (**)	
Cepas de Beauveria b.	Promedio	Cepas de Beauveria b.	Promedio
A1; Granja el triunfo	3,08	A1; Granja el triunfo	3.08
A2; Finca Llaguno	1,66	A2; Finca Llaguno	1.66
Efecto Principal: A1-A2= 1,42 =1 Día		Efecto Principal: A1-A2= 1,42= 1 Días	

CEPAS DEL HONGO (BEAUVERIA BASSIANA).

La respuesta de las cepas de *Beauveria bassiana* en cuanto a la variable DFM, fue altamente significativa, así mismo fue altamente significativa para para la variable DFUFC. (Cuadro No. 3)

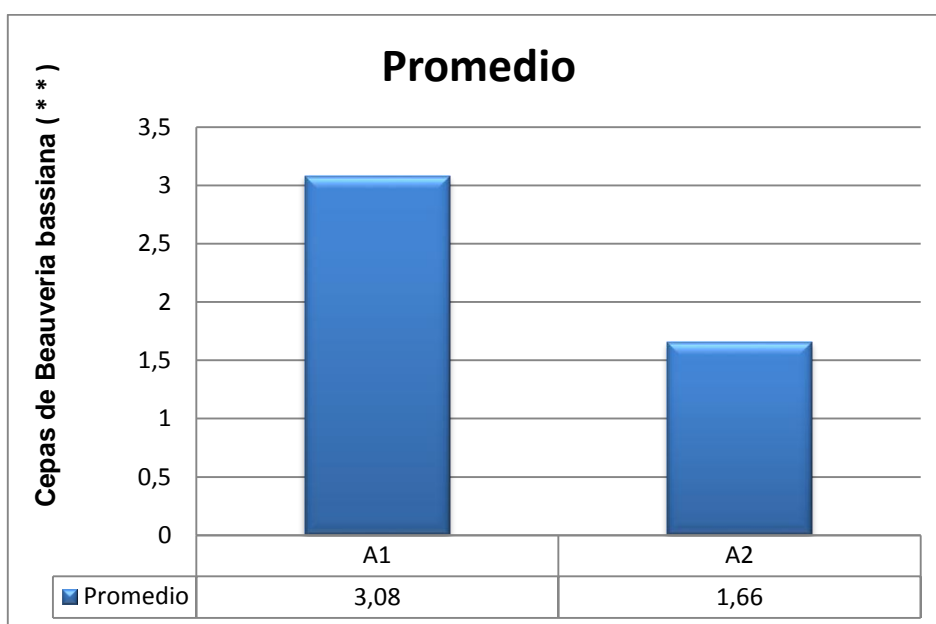


Grafico No. 4. Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en la variable días a la formación de micelio.

Con el análisis de efecto principal, para la variable días a la formación del micelio, vemos que la cepa granja el triunfo demora 1 día más en formar micelio el hongo, en comparación con la cepa finca Llaguno que formo micelio a los 2 días después de la inoculación del hongo en el insecto. (Cuadro No.3 y Grafico No. 4)

Esto se debe a que la cepa Granja el triunfo presento formación del micelio del hongo en todas las unidades experimentales, a diferencia de la cepa finca Llaguno que no logro formar micelio en todas las unidades experimentales, debido a las características propias del hongo.

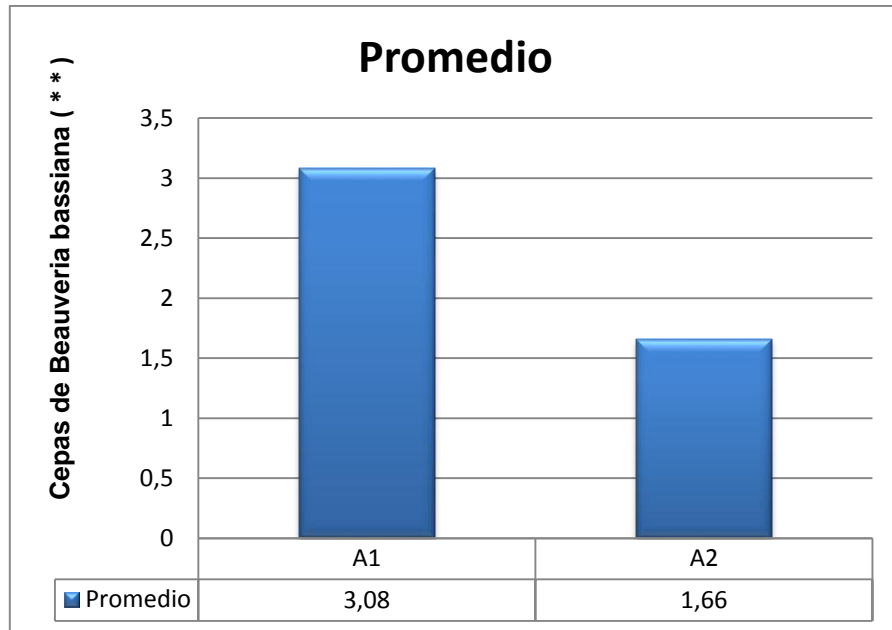


Grafico No. 5. Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en la variable días a la formación de unidades formadoras de colonias.

Con el análisis de efecto principal, para la variable días a la formación de unidades formadoras de colonias, vemos que demora 1 días más en formar micelio el hongo, en comparación con la cepa finca Llaguno que formo unidades formadoras de colonias a los 2 días después de la inoculación del hongo en el insecto (Cuadro No. 3 y Grafico No. 5).

Esto se debe a que la cepa Granja el triunfo presento formación de unidades formadoras de colonias del hongo en todas las unidades experimentales, a diferencia de la cepa finca Llaguno que no logro formar unidades formadoras de colonias en todas las unidades experimentales, debido a las características que posee el insecto.

Cuadro No. 4. Resultados de la prueba de tukey al 5% para comparar promedios, tratamientos (AxB) en las variables días a la formación del micelio (DFM) y días a la formación de unidades formadoras de colonias (DFUFC).

DFM (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango
T1: Cepa Granja el triunfo con $3 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	4,00	A
T2: Cepa Granja el triunfo con $4 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	3,25	B
T5: Cepa Finca Llaguno con $4 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	3,00	B
T3: Cepa Granja el triunfo con $5 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	2,00	C
T6: Cepa Finca Llaguno con $5 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	2,00	C
T4: Cepa Finca Llaguno con $3 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	0,00	D
CV = 8,59%		
DFUFC (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango
T1: Cepa Granja el triunfo con $3 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	4,00	A
T2: Cepa Granja el triunfo con $4 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	3,25	A
T5: Cepa Finca Llaguno con $4 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	3,00	A
T3: Cepa Granja el triunfo con $5 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	2,00	B
T6: Cepa Finca Llaguno con $5 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	2,00	B
T4: Cepa Finca Llaguno con $3 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml	0,00	C
CV = 8,59%		

TRATAMIENTOS (AxB).

Se determinó una dependencia altamente significativa (**) en la variable días a la formación del micelio y los días a la formación de unidades formadoras de colonias. (Cuadro No. 4)

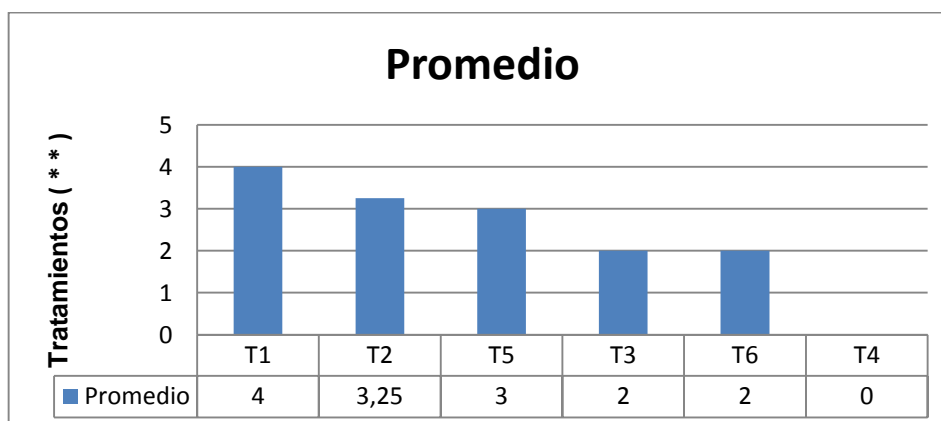


Grafico No. 6. Tratamientos en la variable días a la formación del micelio.

Con la prueba de tukey al 5%, el valor de promedio más alto de este componente, se registró en el tratamiento T1; Cepa Granja el triunfo con 3×10^{-10} UFC/ml , donde el micelio del hongo se formó al 4 día, el cual está representado en la gráfica, pero el tratamiento T3; Cepa Granja el triunfo con 5×10^{-10} UFC/ml y el tratamiento T6; Cepa Finca Llaguno con 5×10^{-10} UFC/ml , tiene menos días en esporular lo cual nos dice que es el tratamiento más eficaz analíticamente y el valor más bajo fue el T4; Cepa Finca Llaguno con 3×10^{-10} UFC/ml , la cual no formo micelio del hongo. (Cuadro No.4 y Gráfico No. 6)

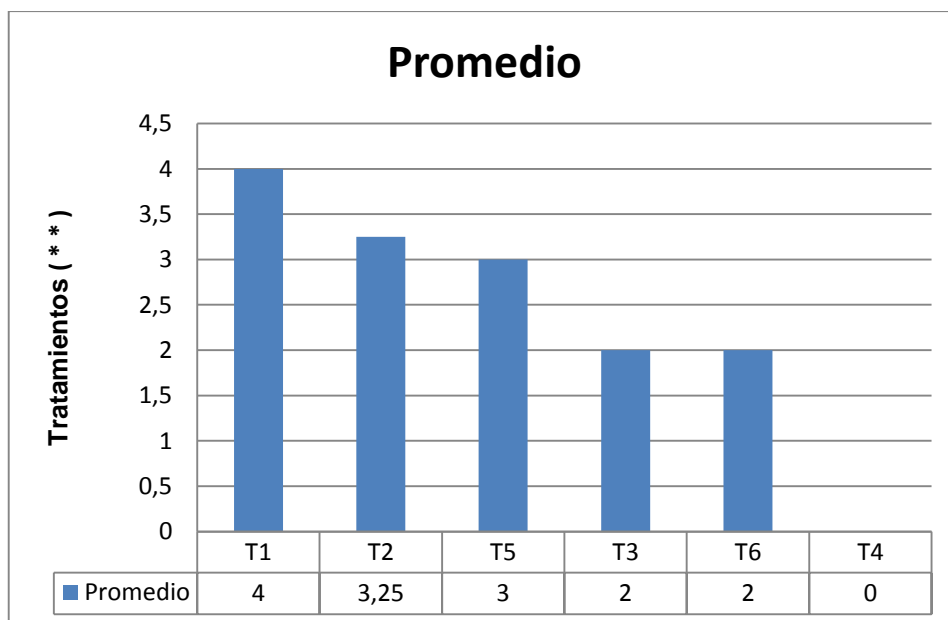


Grafico No. 7. Tratamientos en la variable días a la formación de unidades formadoras de colonias.

Con la prueba de tukey al 5%, el valor de promedio más alto de este componente, se registró en el tratamiento T1; Cepa Granja el triunfo con 3×10^{-10} UFC/ml , el cual presento formación de unidades formadoras de colonias al 4 día, el cual está representado en la gráfica, pero el tratamiento T3; Cepa Granja el triunfo con 5×10^{-10} UFC/ml y el tratamiento T6; Cepa Finca Llaguno con 5×10^{-10} UFC/ml , tiene menos

días a la formación de unidades formadoras de colonias, siendo estos los tratamientos más eficaces analíticamente observados en la gráfica y el valor más bajo fue el T4; Cepa Finca Llaguno con 3×10^{-10} UFC/ml , la cual no formo micelio del hongo. (Cuadro No.4 y Gráfico No. 7)

Con este resultado podemos ver que las dos variables antes expuestas presentan los mismos datos debido a que tienen relación una con otra, y de igual manera vemos que la concentración influye de manera directa para que haya una mayor eficacia.

5.3 Días a la momificación del insecto (DMI); Porcentaje de broca esporuladas (PBE)

Cuadro No. 5. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en las variables DMI Y PBE.

DMI (**)		PBE (**)	
Cepas de Beauveria b.	Promedio	Cepas de Beauveria b.	Promedio
A1; Granja el triunfo	9,75	A1; Granja el triunfo	46.67
A2; Finca Llaguno	6,75	A2; Finca Llaguno	30.00
Efecto Principal: A1-A2= 3 Días		Efecto Principal: A1-A2= 16.67%	

CEPAS DEL HONGO (*BEAUVERIA BASSIANA*)

La respuesta de las cepas de Beauveria bassiana en cuanto a la variable DMI, fue no significativa, a diferencia de la variable PBE que fue altamente significativa (Cuadro No. 5).

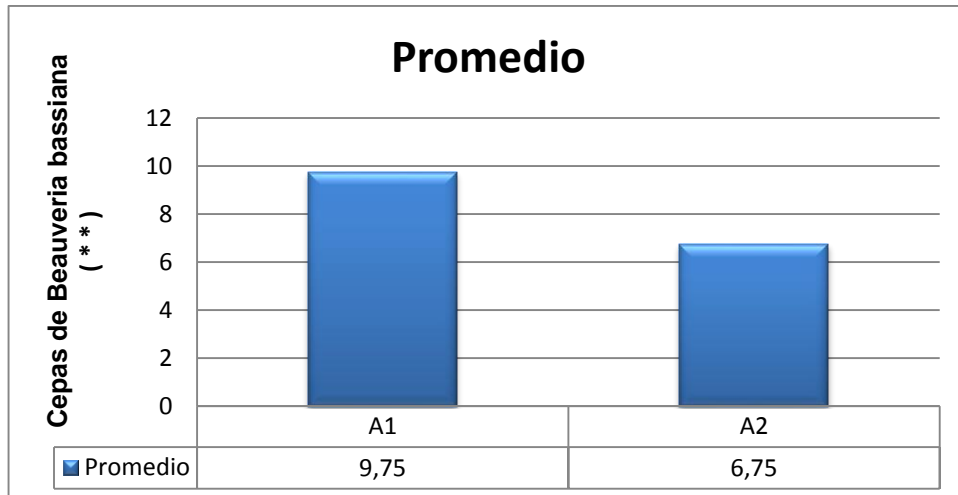


Grafico No. 8. Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en la variable días a la momificación del insecto.

Con el análisis de efecto principal, para la variable días a la momificación del insecto, vemos que la cepa granja el triunfo demora 3 días más en momificar al insecto, en comparación con la cepa finca Llaguno que momifico a los 7 días después de la muerte del insecto (Cuadro No. 5 y Grafico No. 8).

Esto se debe a que la cepa Granja el triunfo su momificación fue en todas las unidades experimentales, a diferencia de la cepa finca Llaguno su momificación no fue en todas las unidades experimentales, debido a las características que posee el insecto.

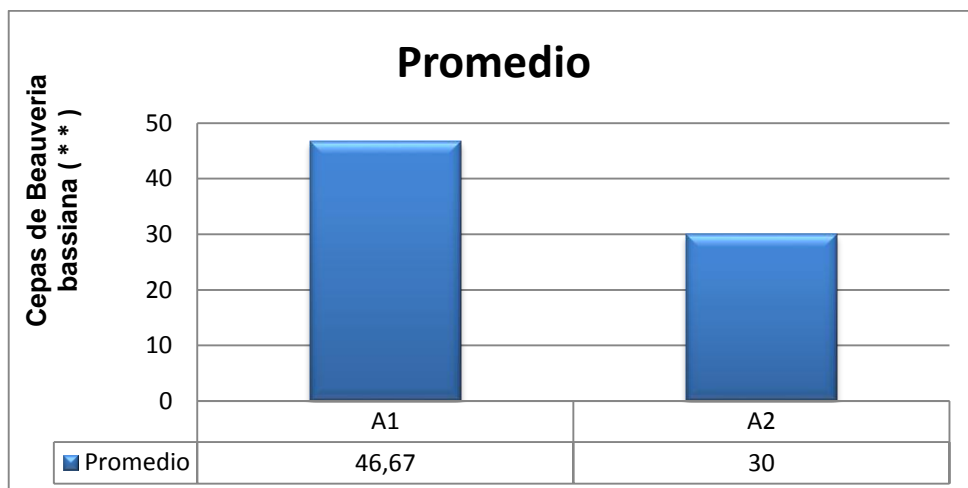


Grafico No. 9. Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en la variable porcentaje de brocas esporuladas.

Con el análisis de efecto principal, para la variable porcentaje de brocas esporuladas, vemos que la cepa granja el triunfo presento un 16,67% más de esporulación en los insectos, en comparación con la cepa finca Llaguno que presento un 26.67% de esporulación en los insecto. (Cuadro No. 5 y Grafico No. 9)

Estos resultados tienen lógica debido a que, las dos cepas disponían de las mismas condiciones para su desarrollo, y el hongo de cada cepa presento un desarrollo característico, propio de cada organismo, de esta manera se evitó posible alteración en los resultados.

Cuadro No. 6. Resultados de la prueba de tukey al 5% para comparar promedios, tratamientos (AxB) en la variable días a la momificación del insecto (DMI) y la variable porcentaje de brocas esporuladas (PBE).

DMI (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango
T1: Cepa Granja el triunfo con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml	12,00	A
T5: Cepa Finca Llaguno con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml	12,00	A
T2: Cepa Granja el triunfo con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml	10,25	B
T6: Cepa Finca Llaguno con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml	8,25	C
T3: Cepa Granja el triunfo con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml	7,00	D
T4: Cepa Finca Llaguno con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml	0,00	E
CV= 3.50 %		

PBE (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango
T3: Cepa Granja el triunfo con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml	75,00	A
T6: Cepa Finca Llaguno con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml	70,00	A
T2: Cepa Granja el triunfo con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml	45,00	B
T1: Cepa Granja el triunfo con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml	20,00	C
T5: Cepa Finca Llaguno con $4 * 10^{-10}$ UFC/ml	20,00	C
T4: Cepa Finca Llaguno con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml	0,00	D
CV= 19.44 %		

TRATAMIENTOS (AxB).

Se calculó una dependencia de factores altamente significativa (**) en las variables, días a la momificación del insecto y porcentaje de brocas esporuladas (Cuadro No. 6). Es decir, la respuesta de las cepas de *Beauveria bassiana* dependió de las concentraciones de unidades formadoras de colonias por mililitros.

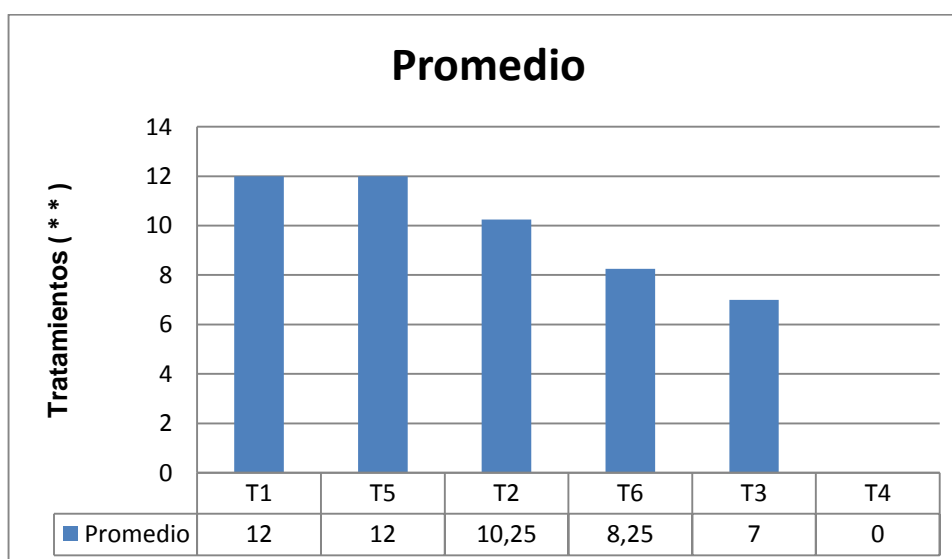


Grafico No. 10. Tratamientos en la variable días a la momificación del insecto.

Con la prueba de tukey al 5%, el valor de promedio más alto de este componente, se registró en el tratamiento T1; Cepa Granja el triunfo con 3×10^{-10} UFC/ml, el cual momifico al insecto a los 12 días, el cual está representado en la gráfica, pero el tratamiento T3; Cepa Granja el triunfo con 5×10^{-10} UFC/ml y el tratamiento T6; Cepa Finca Llaguno con 5×10^{-10} UFC/ml, tiene menos días a la momificación de insecto, siendo estos los tratamientos más eficaces analíticamente observando y el valor más bajo fue el T4; Cepa Finca Llaguno con 3×10^{-10} UFC/ml, la cual no momifico. (Cuadro No.6 y Gráfico No. 10)

La variable días a la momificación del insecto, mide los días que demora el hongo en momificar, y mediante este dato podemos saber la eficacia que puede existir del hongo luego de la muerte, ya que el proceso de esporulación viene seguido de la muerte del insecto.

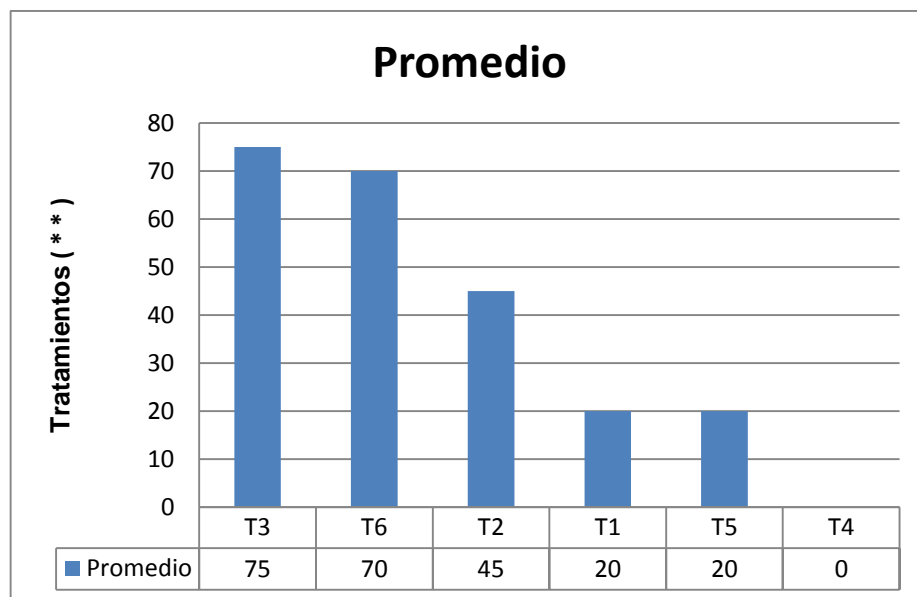


Gráfico No. 11. Tratamientos en la variable porcentaje de brocas esporuladas.

Con la prueba de tukey al 5%, los valores promedios más altos de este componente, se registró en el tratamiento T3; Cepa Granja el triunfo con 3×10^{-10} UFC/ml, el cual momifico al insecto a los 12 días, el cual está representado en la gráfica, pero el tratamiento T3; Cepa Granja el triunfo con 5×10^{-10} UFC/ml y el tratamiento T6; Cepa Finca Llaguno con 5×10^{-10} UFC/ml, tiene menos días a la momificación de insecto, siendo estos los tratamientos más eficaces analíticamente observando y el valor más bajo fue el T4; Cepa Finca Llaguno con 3×10^{-10} UFC/ml, la cual no momifico.

* 10^{-10} UFC/ml con el 75% de esporulación en los insectos y el tratamiento T6; Cepa Finca Llaguno con $5 * 10^{-10}$ UFC/ml con el 70% de esporulación en los insectos, el valor más bajo fue el T4; Cepa Finca Llaguno con $3 * 10^{-10}$ UFC/ml con un 0% de esporulación (Cuadro No.6 y Gráfico No. 11).

La variable porcentaje de brocas esporuladas es de mucha importancia ya que mediante esta, nos podemos dar cuenta la afectación del hongo en el insecto, puesto que esta variable se evaluó después de la muerte del insecto. Cabe destacar que la los tratamientos terminan funcionando de mejor manera en las concentraciones más altas del hongo.

5.4 Porcentaje de brocas muertas (PBM).

Cuadro No. 7. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios del factor A: Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en la variable PBM.

PBM (**)	
Cepas de Beauveria b.	Promedio
A1; Granja el triunfo	51,67
A2; Finca Llaguno	33,33
Efecto Principal: A1-A2= 18.33%	

CEPAS DEL HONGO (*BEAUVERIA BASSIANA*).

La respuesta de las cepas de Beauveria bassiana en cuanto a la variable PBM, fue altamente significativa. (Cuadro No. 7)

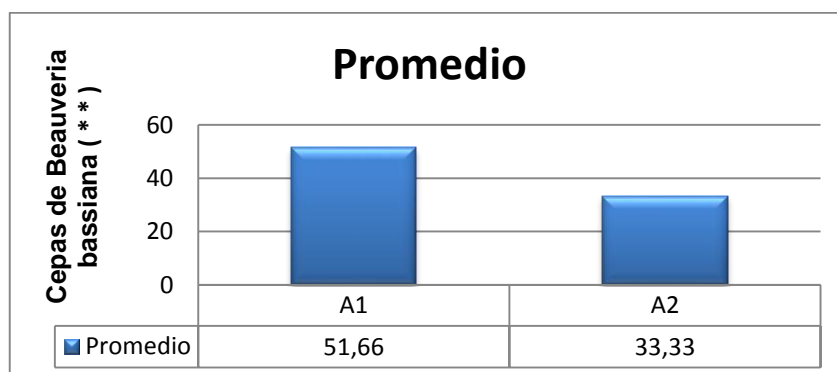


Grafico No. 12. Cepas del hongo (*Beauveria bassiana*) en la variable días a la formación de micelio.

Con el análisis de efecto principal, para la variable porcentaje de brocas muertas vemos que la cepa granja el triunfo presento un 18,33% más de mortalidad en los insectos, en comparación con la cepa finca Llaguno que presento un 33,33% de mortalidad en los insectos. (Cuadro No. 7 y Grafico No. 12)

Esto se debe a las características innatas de los hongos entre cepas que hace que exista una diferente eficiencia entre uno y otro.

5.5. COEFICIENTE DE VARIACION (CV%).

En esta investigación hemos encontrado un coeficiente de variación inferior al 20% en todas las variables, considerando una varianza aceptable dentro del desarrollo de la investigación. Por lo tanto las inferencias, conclusiones y recomendaciones para el control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), son válidas debido al buen manejo de la investigación, dentro del laboratorio.

5.6. ANALISIS DE POLINOMIOS ORTOGONALES.

Cuadro No. 8. Análisis de polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en las variables DFM, DEH y ACC.

Días a la formación del micelio (**)		Días a la esporulación del hongo (**)	
Concentraciones de UFC	Promedio	Concentraciones de UFC	Promedio
B2 (4 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	3	B2 (4 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	5
B1 (3 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	2	B3 (5 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	4
B3 (5 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	2	B1 (3 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	3

(**) = Altamente significativo

Agresividad de la cepa con la concentración (**)	
Concentraciones de UFC	Promedio %
B3 (5 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	85
B2 (4 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	32,5
B1 (3 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	10

(**) = Altamente significativo

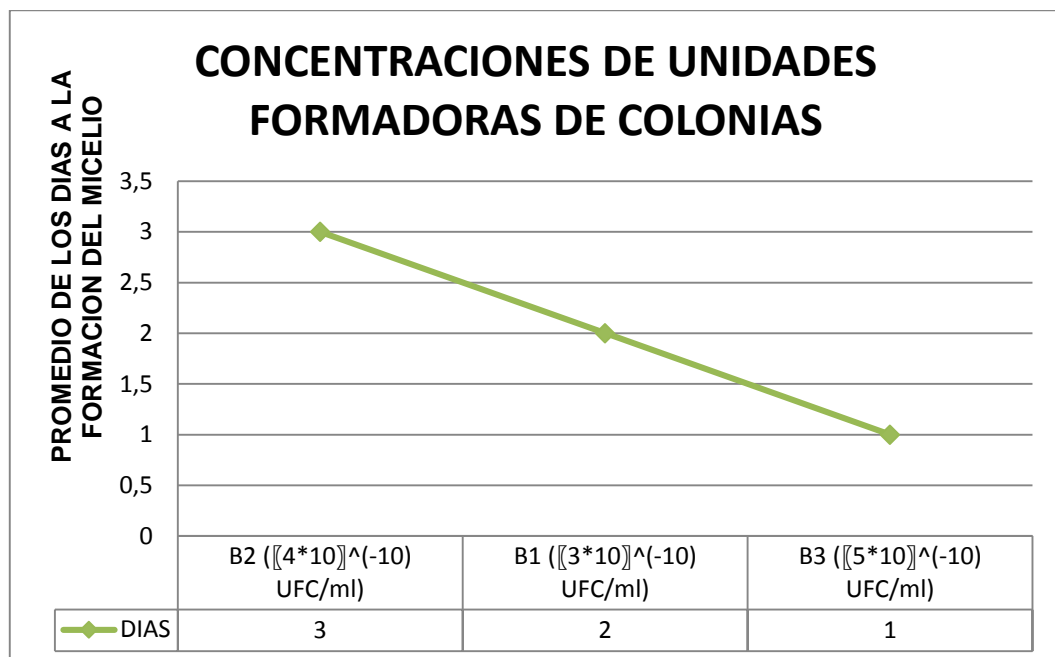


Grafico No. 13. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable DFM.

Al analizar el promedio de la variable DFM, se determinó que la concentración de unidades formadoras de colonia B3: (5 * 10⁻¹⁰ UFC/ml) presento mayor eficacia en el control de la broca del café, ya que demoro 2 días en formar micelio, en todas la unidades experimentales, a diferencia de la concentración B1: (3 * 10⁻¹⁰ UFC/ml) lo cual nos muestra en la gráfica con menos días a la formación del micelio, pero este dato es descartable, por cuanto esta concentración no formo micelio en uno de los tratamientos, perteneciendo este a la segunda cepa A2: (Finca Llaguno), con la concentración B1: (3 *10⁻¹⁰ UFC/ml), siendo la concentración B2: (4

10^{-10} UFC/ml) la que presento un promedio bastante considerable con 3 días a la formación del micelio (Cuadro N° 8 y Grafico 13).

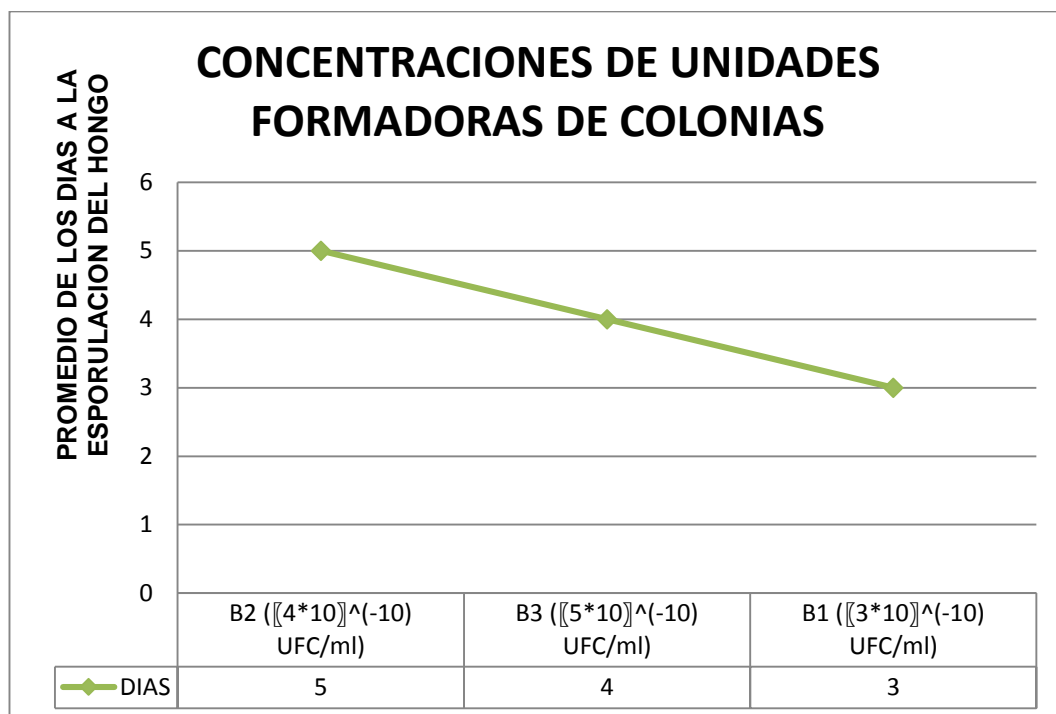


Grafico No. 14. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable DEH.

Al analizar el promedio de la variable DEH, se determinó que la concentración de unidades formadoras de colonia B3: ($5 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml) presento mayor eficacia en el control de la broca del café, ya que demoro 4 días en esporular, en todas la unidades experimentales, a diferencia de la concentración B1: ($3 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml) lo cual nos muestra en la gráfica con menos días a la esporulación, pero este dato es descartable, por cuanto esta concentración no esporulo en uno de los tratamientos, perteneciendo este a la segunda cepa A2: (Finca Llaguno), con la concentración B1: ($3 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml), siendo la concentración B2: ($4 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml) la que presento un promedio bastante considerable con 3 días a la esporulación. (Cuadro N° 8 y Grafico 14)

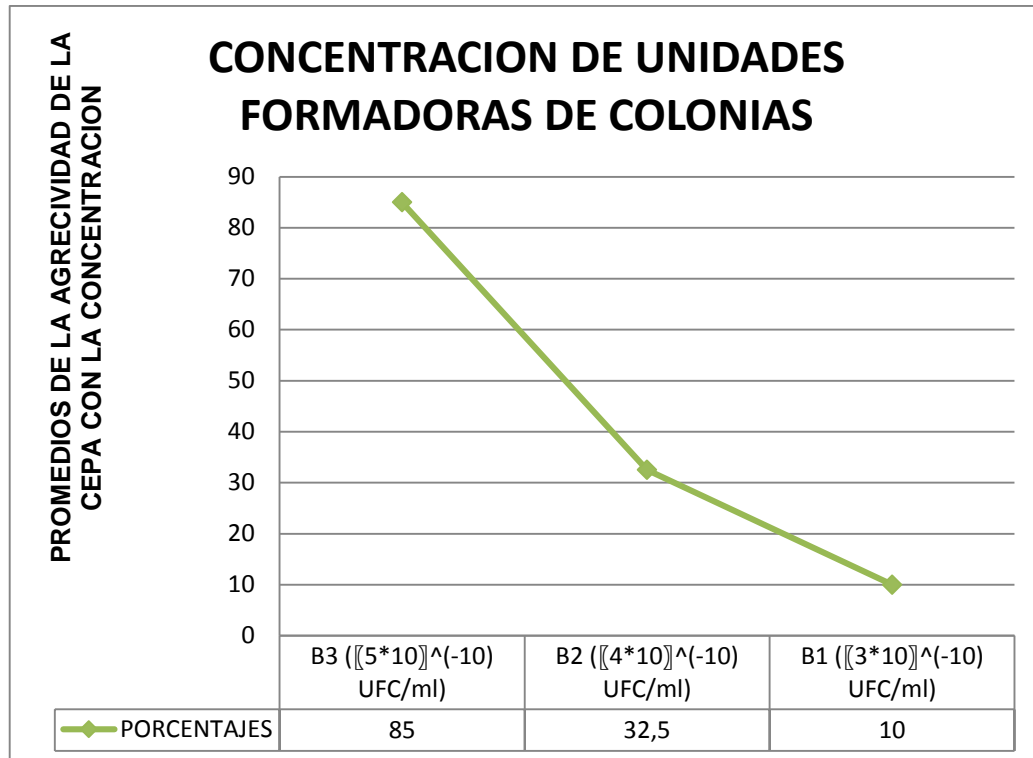


Gráfico No. 15. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable ACC.

Al analizar los promedios de la variable ACC, se determinó que las concentraciones de unidades formadoras de colonia B3: ($5 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml) presentaron mayor eficacia en el control de la broca del café, ya que presentaron el promedio más alto con un 85%, seguido por la concentración B2: ($4 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml) la cual presentó un 32,5 % y por último la concentración B1: ($3 \cdot 10^{-10}$ UFC/ml) la cual presentó el peor promedio con un 10% de eficacia en la agresividad de la cepa con la concentración (Cuadro N° 8 y Gráfico 15).

Como es lógico las concentraciones de unidades formadoras de colonias, si influyen sobre los días a la formación de micelio, días a la esporulación del hongo y la agresividad de la cepa con la concentración, debido a la mayor concentración de esporas del hongo.

Las respuestas de las concentraciones de unidades formadoras de colonias en relación a las variables DFM, DEH y ACC, fueron similares (**), con una tendencia de promedio tipo lineal. (Cuadro N° 8)

Cuadro No. 9. Análisis de polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en las variables PBM y PBE.

Porcentaje de brocas muertas (**)	
Concentraciones de UFC	Promedio
B2 (4 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	85
B1 (3 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	32,5
B3 (5 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	10

(**) = Altamente significativo

Porcentaje de brocas esporuladas (**)	
Concentraciones de UFC	Promedio
B2 (4 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	72,5
B3 (5 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	32,5
B1 (3 * 10 ⁻¹⁰ UFC/ml)	,10

(**) = Altamente significativo

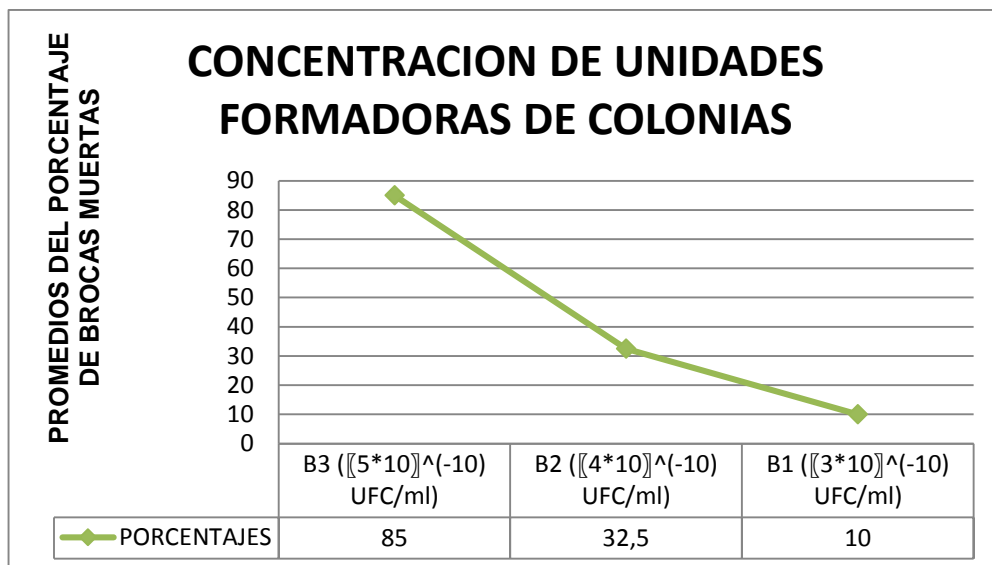


Grafico No. 16. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable PBM.

Al analizar los promedios de la variable PBM, se determinó que las concentraciones de unidades formadoras de colonia B3: ($5 * 10^{-10}$ UFC/ml) presentaron una mayor mortalidad en las brocas, ya que presentaron el promedio más alto con un 85%, seguido por la concentración B2: ($4 * 10^{-10}$ UFC/ml) la cual presentó un 32,5 % y por último la concentración B1: ($3 * 10^{-10}$ UFC/ml) la cual presentó el peor promedio con un 10% de eficacia en el porcentaje de brocas muertas. (Cuadro N° 9 y Grafico 16)

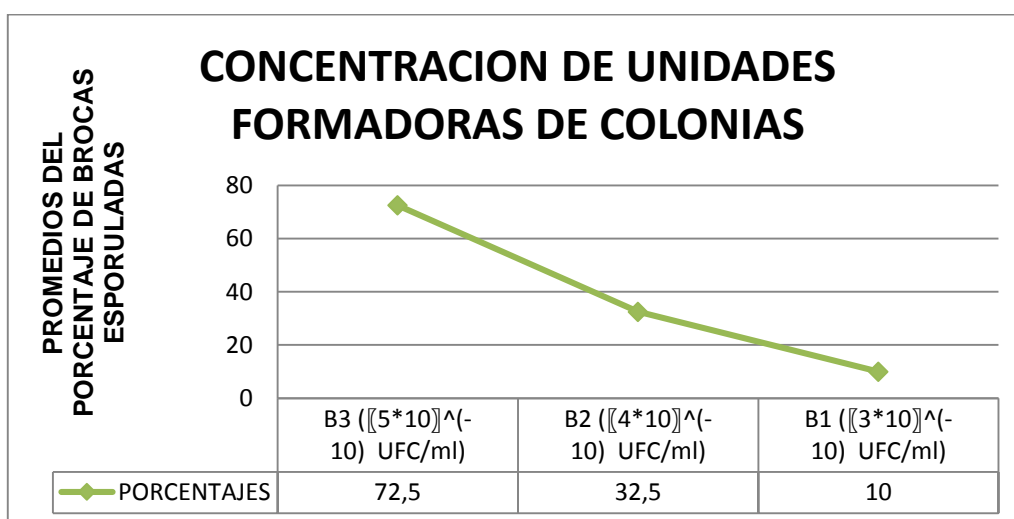


Grafico No. 17. Polinomios ortogonales para el factor B (Concentraciones de unidades formadoras de colonias) en la variable PBE.

Al analizar los promedios de la variable porcentaje de brocas esporuladas, vemos que tuvieron similitud con la variable porcentaje de brocas muertas ya que solo en la concentración B3: (5×10^{-10} UFC/ml) existió una diferencia la cual fue de un 72,5 % de esporulación y las dos concentraciones restantes presentaron los mismo promedios en cuanto al porcentaje de brocas muertas, en comparación con el porcentaje de brocas esporuladas. (Cuadro N° 9 y Grafico 17)

Las respuestas de las concentraciones de unidades formadoras de colonias en relación a las variables PBM y PBE, fueron similares (**), con una tendencia de promedio tipo lineal. (Cuadro N° 9)

5.7. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN Y REGRESIÓN LINEAL.

Cuadro N°. 9. Resultados del análisis de correlación y regresión lineal de las variables independiente (Xs) que tuvieron una significancia estadística sobre el porcentaje de brocas esporuladas. (Variable dependiente Y)

Variables independientes (Xs) (Componentes del porcentaje de brocas esporuladas)	Coeficient e de correlación (r)	Coeficient e de regresión (b)	Coeficiente de determinación (R ² %)
Agresividad de la cepa con la concentración.	0,9787**	0,82927**	96
Concentraciones de Unidades formadoras de colonias.	0,9037**	31,25**	81

5.7.1. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r).

En esta investigación las variables independientes que tuvieron una significancia o estrechez altamente significativa en el porcentaje de brocas esporuladas fueron: Agresividad de la cepa con la concentración y concentraciones de unidades formadoras de colonias (Cuadro N° 9).

5.7.2. COEFICIENTE DE REGRESIÓN (b).

Las variables que incrementaron el porcentaje de esporulación fueron: Agresividad de la cepa con la concentración y concentraciones de unidades formadoras de colonias. (Cuadro N° 9)

Esto quiere decir que en valores más altos de esta variable independiente, mayor fue el incremento en la esporulación del hongo en el insecto.

5.7.3. COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R² %).

El mayor incremento en la esporulación, o mejor ajuste que se tuvo en esta investigación fue la agresividad de la cepa con la concentración con el 96% de incremento de la esporulación. (Cuadro N° 9)

Las variables independientes que posiblemente redujeron la esporulación posiblemente fueron; contaminación, humedad, pureza de la cepa, etc. Los cuales no fueron evaluados o registrados en esta investigación.

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

Ho.- El control de la broca de café (*Hypothenemus hampei*) a nivel de laboratorio no está influenciado por la cepa ni la concentración de unidades formadoras de colonias del hongo (*Beauveria bassiana*).

Ha.- El control de la broca de café (*Hypothenemus hampei*) a nivel de laboratorio si está influenciado por la cepa y la concentración de unidades formadoras de colonias del hongo (*Beauveria bassiana*).

De las dos hipótesis planteadas al inicio de la investigación, sea demostrado que la hipótesis alterna resulto ser la acertada, debido a que en el análisis estadístico y en base a los resultados obtenidos, se pudo comprobar que; una mayor concentración de unidades formadoras de colonias y una cepa propia de la zona, influencia de manera directa en el control de la broca del café, pues los hongos entomopatógenos presentes en los suelos, suelen variar tantos en aspectos internos como externos y sus características cambian, es decir puede mantenerse el género pero la especie puede variar, además los distintos tipos de concentraciones que se utilice para la aplicación pueden resultar eficaces, puesto que determinadas tipos de hongos actúan de mejor manera con distintos tipos de concentraciones, por lo tanto esta hipótesis alterna planteada al inicio de la investigación resulto ser válida.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

- Existió una respuesta diferente entre las cepas del hongo (*Beauveria bassiana*), pues la cepa A1: Granja el triunfo mostro un mayor rendimiento debido a que presento más agresividad, mayor porcentajes de mortalidad y esporulación a diferencia de la cepa: A2: Finca Llaguno que presento resultados inferiores.
- La concentración $5 * 10^{-10}$ UFC/ml, fue la más eficiente, presentando un control más efectivo, seguido de la concentración $4 * 10^{-10}$ UFC/ml a diferencia de la concentración $3 * 10^{-10}$ UFC/ml la cual fue muy deficiente.
- En la interacción de factores, el rendimiento más ideal para el control de la broca del café, se registró en los tratamiento T3: Cepa granja el triunfo + $5 * 10^{-10}$ UFC/ml y el tratamiento T6: Cepa finca Llaguno + $5 * 10^{-10}$ UFC/ml ya que este presente mayor agresividad, muerte, esporulación en el insecto y en menor tiempo que el resto de concentraciones, destacando los tratamiento seguidos, como el T2: Cepa granja el triunfo + $4 * 10^{-10}$ UFC/ml y el tratamiento T5: Cepa finca Llaguno + $4 * 10^{-10}$ UFC/ml los cuales también obtuvieron resultados significativos.
- Finalmente con este investigación se dio a conocer un método de control biológico y a la vez orgánico, aislando cepas nativas del hongo (*Beauveria b.*) de la zona donde existe la incidencia de la plaga, en este caso la broca del café, y luego evaluando dentro del laboratorio, encontrando la concentración ideal para luego poder aplicarlo en el insecto y así contribuir como una medida adicional, sobre el control de esta plaga, dentro del manejo integrado de plagas (MIP).

7.2. Recomendaciones

- Realizar nuevos aislamiento de la misma zona agroecológica, para evaluarlos a nivel del laboratorio, utilizando concentraciones altas, para mejorar el control de la broca.
- Aislar cepas del hongo, de otras zonas y evaluar la compatibilidad para combinarlas, de esta manera poder obtener controles más eficaces para la plaga.
- Establecer un cepario de hongos entomopatógenos y probarlos a nivel de campo, para luego recomendarlos y constituirlos como una medida de control biológico.
- Realizar proyectos con miras a la creación de un laboratorio completo que cumpla con todos los requerimientos específicos, para poder aislar y obtener cepas puras del hongo y crear productos a base de organismos vivos, que controlen este tipo de plaga, productos agradables con el medio ambiente y así contribuir a una agricultura sana y sostenible.
- Producir café, con enfoque de un Manejo Integrado del Cultivo (MIC), donde prevalezcan las buenas prácticas agrícolas, lo que conlleva a obtener un producto de buena calidad y de esta manera reducir los graves problemas ambientales que actual mentales tenemos, por el uso indiscriminado de sustancias químicas en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. BADII, M.H. Abreu, J.L. 2006. Control Biológico una forma sustentable de control de plagas. International Journal of Good Conscience. P. 82-89.
2. BARRERA, F. 2002. Tres plagas de café: la broca de café una plaga que llego para quedarse. Colegio de la Frontera Sur, México. P 17.
3. BENAVIDES P. 2005. Aspectos genéticos relacionados con la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana: Chinchiná (Colombia), Cenicafé. P. 466.
4. BORBÓN, O. 1991. La broca del fruto del café: programa cooperativo ICAFE-MAG. ICAFE-MAG. San José, CR. P. 50.
5. BUSTILLO, P. 1991. Perspectivas de un Manejo Integrado de la Broca del Café *Hypothenemus hampei* en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen, Medellín, Colombia. Miscelánea No. 18 P 106-118.
6. BUSTILLO, P. ET AL. 1998. Desarrollo de un programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Cenicafé, Chinchina, Colombia. P. 93.
7. CARDENAS, R. 2000. Trampas y atrayentes para el monitoreo de poblaciones de broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Col: Scolytidae). en: Memorias del XIX simposio latinoamericano de caficultura. San José (Costa Rica): ICAFEPROMECAFE, P. 369-379

8. CARREÑO, I. 2003. Evaluación de la Patogenicidad de Diferentes Hongos Entomopatógenos para el Control de la Mosca Blanca de la Yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) Bajo Condiciones de Invernadero. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria.
9. CENICAFE. Centro Nacional de Investigaciones de Café. 2010. Resumen del informe anual de actividades. Chinchina, Colombia. P. 82-97.
10. CENICAFE (Centro Nacional de Investigaciones de Café): 1993. Pérdida de virulencia del hongo *Beauveria bassiana* cultivado sucesivamente en sustrato de arroz. Brocarta. P. 1402.
11. CORDOVA, G. 1995. Plan de trabajo del Centro Reproductor de Entomófagos y Entomopatógenos para 1995 ITA No. 23. Ex.-Hda. De Nazareno, Xoxocotlan, Oax. No publicado. P. 15.
12. COLLER, L. 1998. Microbiology and Microbial Infection. London, Sydney, New York. Topley & Wilson's. Vol. 4. Arnold.
13. DUQUE, O. 2004. "Como reducir los costos de producción en la finca cafetera" En: Colombia 2004. P. 102.
14. GOETTEL M.; EILENBERG J.; GLARE T. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Comprehensive Molecular Insect Science Vol. 6. P.361-405.
15. GONGORA B, C. E.; ACUÑA Z., J.R.2008. Uso de genes para incrementar la resistencia de plantas a insectos herbívoros, en: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchina (Colombia), Cenicafé, P. 242-271.

16. JULIAN P. P.; MARIA MERINO. PUBLICADO. 2014. Definición de saprofito (<http://definicion.de/saprofito/.htm>)
17. MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa, (CIP), Lima, Perú, 62p. (<http://cipotato.org/wpcontent/uploads/2014/09/AN65216.pdf>)
18. MÉNDEZ GONZALES. 2008. Evaluación de ocho cepas de Beauveria bassiana para el control de broca del café Hypothenemus hampei. Ing. Agr. Tesis. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. P. 17.
19. PADILLA, B. H.; ACUÑA, J.R.; VELASQUEZ, C. S.; RUBIO, J.D. 2006. Inhibidores de α -amilasas de la broca del café Hypothenemus hampei en diferentes especies de vegetales. Rev Colomb Entomol. P. 125-130.
20. PROCAFE (Fundación Salvadoreña para la investigación del café). 2000. Hoja técnica. El hongo Beauveria bassiana, una herramienta para el control de la broca del fruto del café. San Salvador, El Salvador. P.1.
21. RAMÍREZ, G. 2001. Boletín informativo. La broca del fruto del café nos amenaza. ICAFE. San José, Costa Rica. P.1.
22. RUIZ, C. 1996. Efecto de la Fenología del Fruto de Café Sobre los Parámetros de la Tabla de Vida de la Broca del Café Hypothenemus hampei (Ferrari). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. P. 87.

23. SALAZAR, M. R; ARCILLA J.; RIAÑO, N.; BUSTILLO, A. E. 1993. Crecimiento y desarrollo del fruto del café y su relación con la broca. Cenicafé. Avances Técnicos.
24. TANADA, Y. 1993. Insect pathology. Academic Press, Inc. San Diego Estados unidos. P. 666.
25. VILLALBA, G. 2006. Tecnología para la aplicación y equipos de aspersión de agroquímicos. En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchina (Colombia), Cenicafé. P. 201-225.
26. VELEZ P.E; BENSVIDES, G. M. 1999. Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei* en Ancuya, departamento de Nariño, Colombia. Cenicafé. Chinchina (Colombia). P. 50-57.

ANEXOS

ANEXO N° 1. MAPA FÍSICO DE LA LOCALIDAD DONDE REALIZARA LA INVESTIGACIÓN.



ANEXO N° 2. BASE DE DATOS.

V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
REP	FA	FB	DFM	DFUFC	PBM	DEH	PBE	DMI	ACC
1	1	1	4	4	20	6	20	12	20
1	1	2	3	3	40	5	40	10	40
1	1	3	2	2	100	4	80	7	100
1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
1	2	2	3	3	20	6	20	12	20
1	2	3	2	2	80	4	60	8	80
2	1	1	4	4	20	6	20	12	20
2	1	2	3	3	40	5	40	10	40
2	1	3	2	2	100	4	80	7	100
2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	3	3	20	5	20	12	20
2	2	3	2	2	80	4	80	8	80
3	1	1	4	4	20	6	20	12	20
3	1	2	4	4	60	6	60	11	60
3	1	3	2	2	80	4	60	7	80
3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
3	2	2	3	3	20	5	20	12	20
3	2	3	2	2	80	5	60	9	80
4	1	1	4	4	20	6	20	12	20
4	1	2	3	3	40	5	40	10	40
4	1	3	2	2	80	4	80	7	80
4	2	1	0	0	0	0	0	0	0
4	2	2	3	3	20	6	20	12	20
4	2	3	2	2	80	4	80	8	80

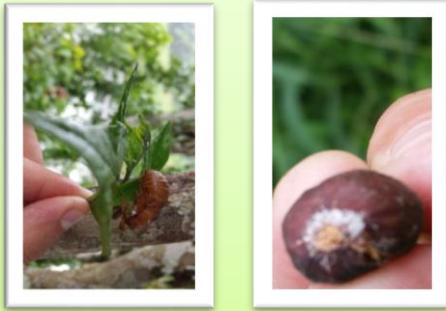
ANEXO N° 3. FORMATO DE FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Proyecto de Investigación.

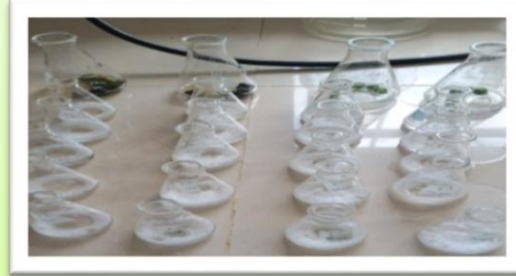
Tratamientos = 6				
Repeticiones = 4				
Tratamientos	Repeticiones			
N°	R1	R2	R3	R4
T1				
T2				
T3				
T4				
T5				
T6				

ANEXO Nº 4. FOTOGRAFÍAS DEL MANEJO Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO EN EL LABORATORIO.

4.1. Insecto momificado y grano con micelio del hongo.



4.2. Aislamiento por disolución seriada.



4.3. Preparación de medio de cultivo.



4.4. Siembra del hongo.



4.5. Incubación del hongo para su crecimiento.



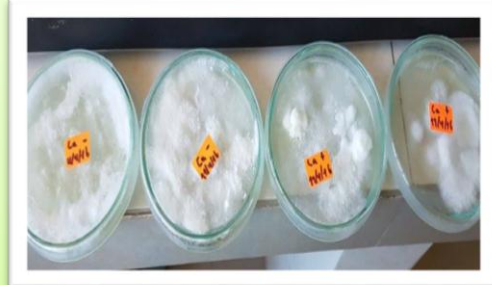
4.6. Cajas petri a los 8 días de haber sido inoculadas.



4.7. Re aislamiento del hongo.



4.8. Cajas petri a los 8 días de haber realizado los re aislamiento.



4.9. Preparación del sustrato de arroz para las matrices.



4.10. Inoculación de matrices.



4.11. Incubación de matrices.



4.12. Matrices a los 8 días de haber sido inoculadas.



4.13. Preparación de bolsas.



4.14. Bolsas en la incubadora.



4.15. Bolsas a los 8 días de haber sido inoculadas.



4.16. Incubación en las bandejas.



4.17. Etiquetado de bandejas.



4.18. Bandejas en la incubadora.



4.19. Destapado de bandejas.



4.20. Bandejas destapadas en la incubadora.



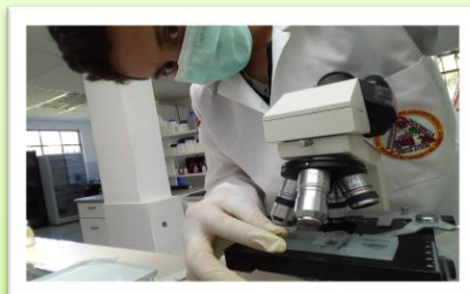
4.21. Retirado de bandejas de la incubadora.



4.22. Cosecha del hongo.



4.23. Evaluación del rendimiento.

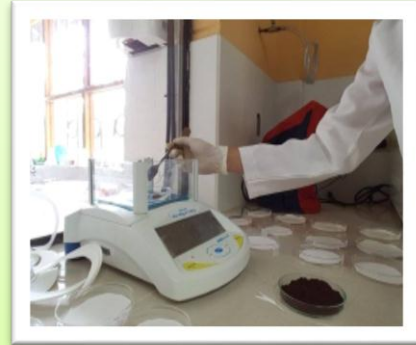


4.24. Evaluación de la viabilidad.



ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO EN EL LABORATORIO.

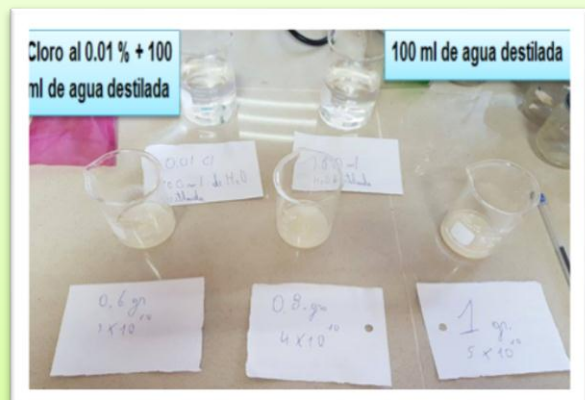
4.25. Cajas petri con papel filtro y 1.5 gramos de café molido.



4.26. Disección de granos para la obtención de brocas.



4.27. Preparación de soluciones para el ensayo, pesado del hongo y tela tul para tapar las cajas petri.

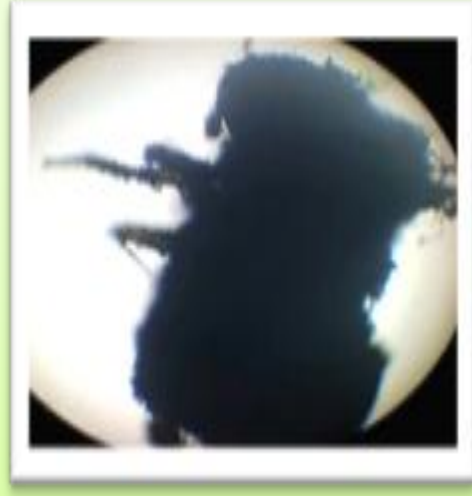
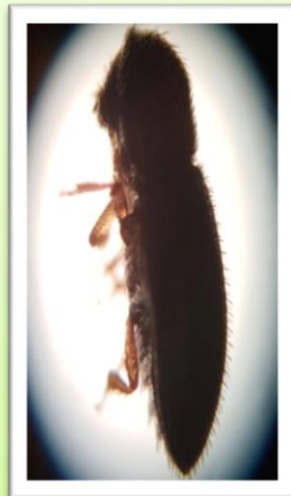


EFFECTOS DEL HONGO SOBRE LA BROCA DEL ENSAYO.

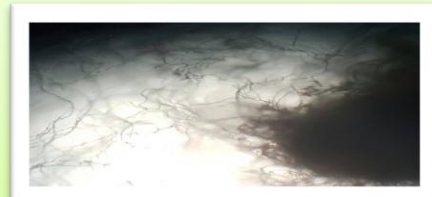
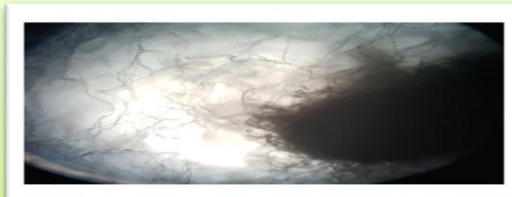
4.28. Brocas muertas con presencia de micelio en las unidades experimentales.



4.29. Brocas muertas por efecto de hongo vistas al microscopio de 40x.



4.30. Brocas esporuladas vistas al microscopio de 10x.



4.31. Visita del tribunal de tesis al laboratorio.



ANEXO N° 5. GLOSARIO DE TÉRMINOS.

Cepa.- Aislamiento de una especie de microorganismo de características conocidas que se conserva cultivado en el laboratorio para determinados ensayos.

Saprotitos.- Se emplea para calificar a los organismos cuya alimentación consiste en **ingerir sustancias orgánicas en estado de descomposición**

Invulnerable.- Que no resulta afectado por lo que se hace o dice contra él.

Patógeno.- Se denomina patógeno a todo agente biológico externo que se aloja en un ente biológico determinado, dañando de alguna manera su anatomía, a partir de enfermedades o daños visibles o no.

Disectado.- División en partes de una planta, un animal o un cuerpo humano sin vida para examinarlos y estudiar sus órganos.

Cutícula.- Cubierta externa de los insectos de tipo no celular secretada principalmente por la epidermis. La cutícula está formada por dos capas diferentes, una externa y delgada llamada epicutícula, y otra interna y más gruesa denominada procutícula

Densidad.- Número de individuos de la misma especie por unidad de superficie.

Entomopatógeno.- Microorganismo parasítico (virus, bacterias, hongos, protozoarios, protistas, riketsias, nemátodos) que frecuentemente matan a los insectos.

Espora.- Estructura reproductiva en ciertas bacterias, hongos y protistas, resistente a condiciones adversas del medio ambiente, la cual se activa bajo condiciones favorables.

Epicutícula.- Representa solo un 5% de la cutícula; está compuesta por ceras y lipoproteínas (en especial cuticulina). Carece de quitina. Dado que es impermeable, su función es evitar la pérdida de agua por transpiración. En general consta de cinco capas: epicutícula interna, epicutícula externa, capa de polifenoles, capa de ceras y capa de cemento.

Insecto.- Artrópodo de la clase Insecta; el estado adulto se caracteriza por tener tres pares de patas, cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen, y la mayoría de las especies con dos pares de alas. Numerosas especies de insectos son parasitoides o depredadores de otros insectos.

Medio de cultivo.- Composición nutritiva empleada para el crecimiento y multiplicación de microorganismos.

Micelio.- Masa de filamentos que forman la parte vegetativa de un hongo.

Plaga.- Organismo que interfiere con las actividades y propósitos del hombre.

Plaguicida.- Sustancia química utilizada para eliminar un organismo nocivo y puede ser insecticida (insectos), fungicida (hongos), bactericida (bacterias), herbicida (maleza), rodenticida (roedores), nematocida (nematodos) o acaricida (ácaros).

Endogamia.- Reproducción entre miembros de una misma población donde no hay migración.

Progenie.- Casta, generación o familia de la cual se origina o desciende una persona.

Copulan.- Acto sexual entre animales.

Haplodiploidía.- Haplodiploidía es un sistema de determinación del sexo en la que los machos desarrollan a partir de huevos no fecundados y son haploides.

Diploides.- Las hembras se desarrollan a partir de huevos fecundados y son diploides.

Endosimbionte.- Cualquier organismo que vive dentro del cuerpo o las células de otro organismo, es decir, formando una endosimbiosis.

Endospermo.- El Endospermo es un tejido existente en las semillas de la mayoría de las plantas. Este endospermo comúnmente rodea el embrión y sirve como su almacén de nutrientes durante la germinación y primeras etapas de la vida.

Hemocele.- Cavidad general secundaria de los artrópodos, que constituye un sistema lagunar lleno de líquido hemático y forma parte del aparato circulatorio abierto.