

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

SUSCEPTIBILIDAD DE LA BROCA DEL FRUTO DEL CAFETO (*Hypothenemus hampei*) AL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*, Y SU TOLERANCIA AL OXICLORURO DE COBRE

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de:

Magister Scientiae

por

Rony Roberto Lazo A.

CATIE

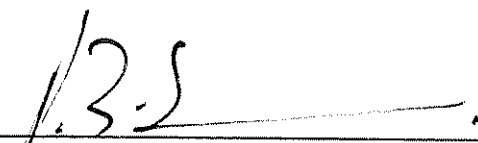
Turrialba, Costa Rica


1990


Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

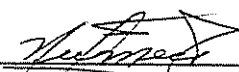
MAGISTER SCIENTIAE

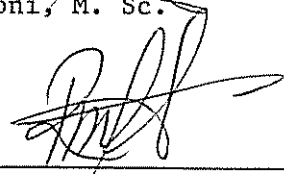
COMITE ASESOR:

  
Phillip Shannon, M. Sc.  
Profesor Consejero

  
Elkin Bustamante, Ph. D.  
Miembro del Comité

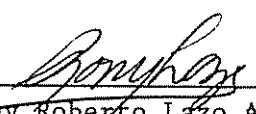
  
Miembro del Comité Marco Tulio Castro, Ph. D.

  
Nestor Macias Tronconi, M. Sc.  
Miembro del Comité

  
Raúl Isaias Muñoz, M. Sc.  
Miembro del Comité

Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.  
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado

Dr. José Luis Parisí  
Subdirector General Adjunto de Enseñanza

  
Rony Roberto Lazo A.  
Candidato

## DEDICATORIA

A mis padres: JOSE ROBERTO LAZO y DORCAS APLICANO  
"más no puedo pedir"

A mi esposa: MARIA ELENA "si te quiero es porque sos mi amor,  
mi complice y todo"

A mi hija: ELENA MARIA "tus manos son mi caricia contra la  
larga jornada" (que el futuro te  
sonria "negrita").

A mi familia: LAZO - APLICANO - ALFARO

"Gracias a la vida que me a dado tanto, me a dado el camino y  
el abecedario"

## AGRADECIMIENTOS

A Gran Bretaña, quien a través de la Overseas Development Administration (O.D.A.) financió mis estudios.

Al CATIE por permitirme realizar mis sueños de superación.

A PHIL, por su amistad, dedicación y dirección en la realización de este trabajo.

A "DON" ELKIN, GRACIAS MAESTRO.

A MARCO, RAUL y NESTOR, GRACIAS AMIGOS.

En toda investigación existen personas que desinteresadamente tienen una participación efectiva para el buen desarrollo del trabajo. Este es el caso del Doctor JACOBO CACERES CASTILLO. Gracias "DOCTOR".

Mi agradecimiento al DOCTOR KEITH ANDREWS, al personal técnico del DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL y a la ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA por haberme brindado las facilidades y colaboración para la realización de este trabajo.

A CARLOS PINEDA y FRANCISCO OSEGUERA por haberme brindado el apoyo logístico en la recolección de B. bassiana.

A todo el personal del IHCAFE que de una u otra forma colaboraron en este trabajo, GRACIAS COMPANEROS.

Al doctor AMADOR VILLACORTA (Brasil) y personal de ANACAFE (Guatemala) por el envío de muestras de B. bassiana.

Sobrevivir en "CAIMAN" no fue fácil, a todos mis amigos en CATIE, gracias por hacer de esos dos años los más inolvidables de mi vida.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
I. INTRODUCCION.	1
II. REVISION DE LITERATURA.	2
A. Biología y agroecología de <i>Hypothenemus hampei</i> .	2
1. Distribución geográfica en Centro América.	2
2. Ciclo de Vida.	2
3. Historia de Vida y Habitos.	3
4. Manejo Integrado de la broca del fruto del cafeto.	4
B. Los entomopatógenos, con énfasis en <i>Beauveria bassiana</i> .	6
1. Ciclo de vida.	6
2. Relación huésped - entomopatógeno - ambiente.	7
a. Factores del huésped.	8
b. Factores del entomopatógeno.	9
c. Factores del medio ambiente.	11
C. Efecto de fungicidas y otros pesticidas.	12
III. MATERIALES Y METODOS.	14
A. Localización.	14
B. Obtención de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> .	14
C. Reproducción de <i>Beauveria bassiana</i> .	15
D. Conservación de cepas.	16
E. Cria de <i>Hypothenemus hampei</i> .	16
F. Tiempo de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a 10 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> .	16
1. Metodología.	16
2. Diseño experimental y análisis de datos.	18
G. Tiempo de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a cultivos de origen mono-espóricico de <i>Beauveria bassiana</i> .	19
H. Tolerancia de <i>Beauveria bassiana</i> al oxicloloruro de cobre.	19
1. Metodología.	20
2. Diseño experimental y análisis de datos.	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.	22
A. Tiempo de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a 10 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> .	22
B. Tiempo de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a cultivos de origen mono-espóricicos de <i>Beauveria bassiana</i> .	26
F. Tolerancia de <i>Beauveria bassiana</i> al oxicloloruro de cobre.	33
V. CONCLUSIONES.	37
VI. RECOMENDACIONES.	38
VII. LITERATURA CITADA.	39
VIII. ANEXOS	46

LAZO, R.R. 1990. Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*) al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, y su tolerancia al oxiclورو de cobre. Tesis Mg. Sc. Turrialba, Costa Rica, C.A., CATIE. 59 p.

Palabras claves: Café, *Coffea arabica*, plagas, broca, *Hypothenemus hampei*, control microbial, *Beauveria bassiana*, tolerancia a fungicidas.

## RESUMEN

Los estudios que aquí se presentan fueron realizados para: (1) determinar la susceptibilidad de una muestra de la población hondureña de *H. hampei* a siete cepas hondureñas y tres cepas extranjeras de *B. bassiana*; (2) determinar si existían genotipos más efectivos dentro de las tres mejores cepas y (3) evaluar la tolerancia de las 10 cepas al fungicida oxiclورو de cobre (utilizado para el control de la roya del cafeto *Hemileia vastatrix*).

Para determinar el tiempo mediano de supervivencia ( $TS_{50}$ ) de *H. hampei* a las 10 cepas de *B. bassiana*, se inocularon, para cada cepa, 200 hembras de *H. hampei* con una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidias/ml, cuantificando la mortalidad, por miosis y total, a los cuatro, cinco, seis, siete y ocho días. El estimado del  $TS_{50}$  fue realizado por el análisis de probitos. Los resultados de este ensayo demostraron que existe variación en la virulencia entre cepas aisladas geográficamente, aun dentro de un área pequeña. Las cuatro cepas con menores valores de  $TS_{50}$  fueron: la número 14, 4, 15 y 10 (las dos primeras de Honduras, Guatemala y México respectivamente).

De cada una de las cepas 14, 4 y 15, se procedió a hacer cinco cultivos de origen mono-espórico, siguiendo la metodología propuesta por French y Hebert (1980). La metodología y análisis fue similar a la prueba anterior. No se detectaron genotipos de mayor virulencia en las cepas evaluadas.

Para evaluar la tolerancia de las 10 cepas al oxiclورو de cobre se procedió a inocular, sobre un medio de cultivo (semolina, agar, agua) con oxiclورو de cobre (0 y 1500 ppm de i.a.), para todas las cepas, 10  $\mu$ l de una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidias/ml. Las variables evaluadas fueron: tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) y esporulación a los 17 días después de la inoculación. Con base en estas variables los resultados demuestran que las cepas 9, 21, 14 y 10 presentaron las mejores tasas de crecimiento micelial. Las cepas 21, 14, 7, 10, 12, 18 y 15 presentaron los mejores promedios de esporulación, sin existir diferencias estadísticas entre ellas.

LAZO, R.R., 1991. Susceptibility of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, to strains of the entomopathogen, *Beauveria bassiana*, with evaluation of tolerance of the strains to copper oxychloride. MSc Thesis, Turrialba, Costa Rica, C.A., CATIR.

Key words: coffee, *Coffea arabica*, pests, coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, microbial control, *Beauveria bassiana*, fungicide tolerance.

## SUMMARY

Susceptibility of a population of *H. hampei* from Olancho, Honduras to seven Honduran, one Mexican, one Guatemalan and one Brazilian collection of *B. bassiana* was evaluated.

Insects bathed in a suspension of  $1 \times 10^7$  conidias/ml water + 0.01% Tween-80 were evaluated daily from 4 to 8 days after application for mortality due to *B. bassiana* mycosis and for total mortality. Probit analysis revealed significant differences in susceptibility to the strains as expressed by median survival time ( $ST_{50}$ ) values (range= 5.54-8.34 days for mycosis mortality and 5.13-7.65 days for total mortality). Susceptibility was greatest to strains 14, 4, 15 and 10 (two from Honduras, and one each from Guatemala and Mexico).

More virulent genotypes were not detected in isolates grown from single spores of the three most effective collections. Only one of 15 isolates possessed an  $ST_{50}$  value that differed significantly from that of the original collection, in this case showing lower virulence.

Tolerance of the 10 original collections to 1500 ppm copper oxychloride fungicide was evaluated in semolina-agar-water growth medium. There were differences in mycelial growth rate and colony sporulation of the strains in the presence of fungicide but in all cases there was a significant reduction compared with strains cultured in the absence of fungicide. Strains 9, 21, 14 and 10 had the highest rates of mycelial growth in the presence of fungicide while sporulation was greatest in strains 21, 14, 7, 10, 12, 18 and 15.

## LISTA DE CUADROS

Página

- Cuadro 1: Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base en mortalidad por micosis, a 10 cepas de *Beauveria bassiana*. 23
- Cuadro 2: Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base a mortalidad total, a 10 cepas de *Beauveria bassiana*. 23
- Cuadro 3: Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base en mortalidad por micosis, a 15 cultivos de origen mono-espórico *vs* cepas originales de *Beauveria bassiana*. 27
- Cuadro 4: Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base en mortalidad total, a 15 cultivos de origen mono-espórico *vs* cepas originales de *Beauveria bassiana*. 28
- Cuadro 5: Resultados parciales de análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) y esporulación del cultivo ( $\sqrt{\text{conidias/ml}}$ ) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* en dos concentraciones de oxiclóruo de cobre. 33
- Cuadro 6: Tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* sobre un medio de cultivo con 1500 ppm i.a. de oxiclóruo de cobre. 34
- Cuadro 7: Esporulación promedio (conidias/ml) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* después de 17 días de ser inoculadas sobre un medio con 1500 ppm i.a. de oxiclóruo de cobre. 34



## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Procedencia de las 10 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> utilizadas en los bioensayos.	15
Figura 2: Mortalidad por micosis y total <i>Vrs</i> logaritmo del tiempo de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a 10 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> .	25
Figura 3: Mortalidad por micosis y total <i>vrs</i> logaritmo del tiempo medio de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a la cepa 14 de <i>Beauveria bassiana vrs</i> cinco cultivos de origen mono-espóricos.	30
Figura 4: Mortalidad por micosis y total <i>vrs</i> logaritmo del tiempo de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a la cepa 4 de <i>Beauveria bassiana vrs</i> cinco cultivos de origen mono-espóricos.	31
Figura 5: Mortalidad por micosis y total <i>vrs</i> logaritmo del tiempo de supervivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> a la cepa 15 de <i>Beauveria bassiana vrs</i> cinco cultivos de origen mono-espóricos.	32
Figura 6: Tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) de 10 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> sobre un medio de cultivo con dos concentraciones de oxiclóruo de cobre (0 y 1500 ppm i.a.).	36
Figura 7: Esporulación promedio (conidias/ml) de 10 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> después de 17 días de ser inoculadas sobre un medio con dos concentraciones de oxiclóruo de cobre (0 y 1500 ppm i.a.).	36

## LISTA DE ANEXOS

### Página

Anexo 1: Mortalidad por micosis y total *vrs* logaritmo del tiempo de supervivencia, línea probit y medias observadas, de *Hypothenemus hampei* a 10 cepas de *Beauveria bassiana*. 47

Anexo 2: Mortalidad por micosis y total *vrs* logaritmo del tiempo de supervivencia, línea de probit y medias observadas, de *Hypothenemus hampei* a las cepas 14, 4 y 10 y sus respectivos cultivos de origen mono-espóricos. 52

Anexo 3: Análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* sobre un medio de cultivo con dos concentraciones de oxiclورو de cobre (0 y 1500 ppm i.a.). 59

Anexo 4: Análisis de varianza de la esporulación promedio ( $\sqrt{\text{conidias/ml}}$ ) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* después de 17 días de ser inoculadas sobre un medio con dos concentraciones de oxiclورو de cobre (0 y 1500 ppm i.a.). 59

## I. INTRODUCCION.

La broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*) fue reportada por primera vez en Honduras en el año de 1977, y debido a sus características biológicas y a su naturaleza de plaga exótica, ha tenido una rápida adaptación y un incremento acelerado de su población (Urbina, 1986).

La táctica generalizada para el manejo poblacional del insecto se basa en el empleo de químicos; esta táctica proporciona un efecto inmediato y confiabilidad. Sin embargo, su aplicación tiene efectos secundarios indeseables, lo que justifica el uso del control biológico, sea este por medio de parasitoides u organismos entomopatógenos (Castro 1990).

Debido a lo anterior se considera que las condiciones de la caficultura en Centro América son propicias para realizar esfuerzos en la implementación del control biológico, visualizado como táctica primordial del manejo integrado de plagas, y no como la "panacea" ó el método de control perfecto (Quezada, 1985).

Entre los agentes de control considerados como promisorios se encuentra el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Sin embargo, los estudios locales muestran resultados muy variables; esto posiblemente se debe, en parte, a que las cepas empleadas sean de patogenicidad desconocida. En otras palabras no se ha realizado una caracterización de la patogenicidad de las cepas presentes en la región. No hay que olvidar que se ha documentado que existe variación entre grupos de entomopatógenos aislados geográficamente (N.A.S. 1988).

Los estudios que aquí se presentan fueron realizados para: (1) determinar la susceptibilidad de una muestra de la población hondureña de *H. hampei* a siete cepas de *B. bassiana* hondureñas comparadas con tres cepas extranjeras; (2) determinar si existen genotipos más efectivos dentro de las tres mejores cepas y (3) evaluar la tolerancia de las 10 cepas al fungicida oxiclóruo de cobre (utilizado para el control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*)).

## II. REVISION DE LITERATURA.

### A. Biología y agroecología de *Hypothenemus hampei*.

#### 1. Distribución geográfica en Centro América.

La broca al igual que la planta del cafeto es originaria de Africa. El insecto es reportado por primera vez en Centro América en el año de 1971 en Guatemala, Honduras (1977), El Salvador (1983), y Nicaragua en 1988 (Castro 1990).

#### 2. Ciclo de Vida.

La broca del fruto del cafeto es un insecto holometábolo, es decir pasa por las fases de huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos son de forma globosa, ligeramente elípticos. Recien ovipositados son de color blanco lechoso y a medida que el período de incubación progresa se tornan blancos hialinos; próximos a su eclosión son de color amarillentos. El tamaño oscila entre 0.45 a 0.83 mm de largo y dura de 6 a 10 días (Urbina 1986).

Las larvas son de color blanco lechoso, de consistencia suave; cuando juvenes son más o menos rectas, ligeramente deprimidas en su parte ventral. Conforme crecen, su depresión ventral se acentúa, lo cual hace que se curven hasta tomar una forma de "C", midiendo de 1.17 a 1.75 mm de largo por 0.37 a 0.58 de ancho. Las larvas completamente desarrolladas miden de 1.80 a 2.26 mm de largo por 0.43 a 0.62 mm de ancho. Las hembras pasan por dos estadios, mientras que los machos unicamente por uno. El estadio larval dura de 10 a 26 días, los cuales pasa alimentandose dentro del endospermo (Hernández y Sánchez 1978a).

Las pupas tienen una coloración amarillenta al principio, cambiando a pardo pálido poco antes de la emergencia del adulto. Las dimensiones promedio de este estadio es de 1.37 a 1.93 mm de largo y de 0.51 a 0.82 mm de ancho. Las pupas permanecen dentro del endospermo y la duración del estadio es de 4 a 9 días (Urbina 1986).

Los adultos, recien emergidos, son de color pardo claro cambiando a negro conforme avanza su edad. El macho carece de alas funcionales, solo la hembra es capaz de volar. Los machos miden 1.0 a 1.25 mm y las hembras 1.37 a 1.82 mm de largo y de 0.66 a 0.88 mm de ancho. La duración del ciclo de vida,

dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas, es de 20 a 37 días (Urbina 1986).

### 3. Historia de Vida y Habitos

La broca es atraída al fruto por su olor, color y forma; así mismo, se ha comprobado que es atraída por los desechos de frutos brocados y las heces de las mismas brocas. En estudios de olfatometría se observó que existen diferencias en atractividad entre distintas especies y variedades de café (Castro 1990).

La reproducción puede ser consanguínea, o sea entre hermanos dentro de la misma cereza, lo cual reduce la variabilidad genética de la población. La cópula ocurre cuando la hembra alcanza la madurez sexual (tres a cinco días post-emergencia), la mayoría de las hembras abandonan el fruto luego de ser fecundadas. Los machos corrientemente no abandonan el fruto en el cual han nacido, pudiendo fertilizar uno solo a más de 30 hembras; no fecundan más de dos hembras por día (Castro 1990).

En Honduras, se ha encontrado que bajo condiciones de laboratorio, algunas hembras adultas de *H. hampei* son capaces de producir huevos fértiles, en forma partenogénica, hasta una segunda generación (Muñoz 1989). Este hallazgo contradice lo reportado por Bartra *et al.* (1982) quienes encontraron que huevos ovipositados por hembras vírgenes de *H. hampei* son infértiles y se desecan a los 35 días.

Cuando llega a un nuevo fruto, la hembra toma aproximadamente de tres a cinco horas para perforar el endospermo, donde construye una galería que la utiliza como cámara de oviposición (Penagos y Flores 1974).

La hembra oviposita dos a tres huevos por día, con un promedio de 74 huevos para un ciclo de vida. El período de pre-oviposición es de 20 días en promedio (Urbina 1986). La relación de sexos dentro de la progenie generalmente es de 10:1 a favor de las hembras (Castro 1990).

La longevidad promedio de las hembras es de 150 días, mientras que para los machos es de 90 días. El número de generaciones por año es de siete a ocho (Muñoz 1989).

La broca tiene una dispersión agregada; además, en las plantas de cafeto se observa, si dividimos la planta en tres tercios, que las bandolas del tercio medio son las más infestadas (Baker 1986).

Hernández y Sánchez (1978b) observaron que bajo condiciones de laboratorio la mayor actividad de adultos de broca era entre la una y las cinco de la tarde cuando la temperatura oscilaba entre 24 y 28°C; en este lapso de tiempo los insectos abandonaban los frutos en cereza, pergamino u oro; para caminar, volar y perforar otros frutos. Castro (1990) reporta una mayor actividad entre las cuatro y seis de la tarde, sin embargo no especifica bajo que condiciones.

Las hembras de la broca emigran bajo las siguientes condiciones: 1) las hembras fecundadas van en busca de frutos adecuados para su primera oviposición; 2) una vez que las hembras han iniciado su oviposición, pueden emigrar en busca de cerezas con mayor contenido de humedad, obligadas a abandonar cerezas demasiado calentadas por el sol; 3) hembras vírgenes en busca de machos; 4) debido a la destrucción avanzada de las semillas, aglomeración de adultos y larvas o si la cámara de cría se inunda de agua; 5) caída de frutos, introducción de larvas y/o insectos intrusos y 6) cuando está próxima a morir (De Oliveira 1927, citado por Hernández y Sánchez 1978b).

*H. hampei* parece ser específico a *Coffea* spp. Las hembras adultas se han encontrado en otras plantas y algunas veces se han registrado estados inmaduros, pero la relación exacta de *H. hampei* con otras plantas hospederas requiere de un examen más cuidadoso. Entre las especies de *Coffea* comerciales, *C. arabica* (café arábigo) es normalmente la más susceptible al ataque, seguido de *C. canephora* (café robusta) y luego por *C. liberica* y *C. excelsa*. Se han sugerido otros órdenes de susceptibilidad (CENICAFE 1990).

Las principales fuentes de infestación cuando no existen frutos en el campo son los frutos dejados en la planta, los caídos al suelo y los residuos del proceso de beneficiado (Castro 1990)

#### 4. Manejo Integrado de la broca del fruto del cafeto.

Actualmente, el manejo poblacional de la broca en el área Centroamericana depende en gran parte del control químico. En la mayoría de los países existen recomendaciones para el uso de endosulfan (Thiodán 35 C.E.), en combinación con ciertas

prácticas culturales, recolección de frutos del suelo y de la planta al pasar la cosecha, que disminuyen la fuente de infestación para la próxima fructificación. Sin embargo, la implementación de las prácticas culturales recomendadas no es generalizada y la principal táctica de manejo continúa siendo el uso de químicos. Recientemente, se han diseñado sistemas de control basados en el muestreo y el uso de umbrales de acción (umbrales de daño económico), como un intento a limitar el uso de insecticidas en café, pero todavía no están implementados en forma general (Castro 1990).

Siendo *H. hampei* una plaga exótica en América, se considera que puede ser manejada a través de la implementación del control biológico clásico; es decir, la introducción de enemigos naturales que ocurren en su lugar de origen, pero no en el lugar que ha sido introducida. Recientemente, se ha iniciado un programa de introducción de dos parasitoides, *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), en Guatemala, El Salvador y Honduras; pero es prematuro predecir si estos se lograrán establecer, y al establecerse, que grado de control ejercerán (Castro 1990).

En cuanto al control microbial, se considera que *B. bassiana* es el entomopatógeno más promisorio para el manejo integrado de la broca (Fernandes *et al.* 1985).

En *H. hampei* la incidencia de *B. bassiana* tiene gran variación. Se ha considerado como el agente de control natural más efectivo en Camerún, pero otros registros indican que es relativamente raro en Costa de Marfil y también es poco común en Kenya. Se ha observado altos niveles del patógeno en el campo en México y Ecuador. Mientras estas diferencias parecen deberse a factores climáticos, es también posible que las razas de *B. bassiana* que atacan *H. hampei* en América no son las africanas, sino razas locales que han colonizado el nuevo hospedante ("razas" en este caso se refiere a aislamientos del hongo caracterizados por su comportamiento patológico específico que puede ser genéticamente determinado). No se ha llevado a cabo comparaciones de la virulencia de los aislamientos africanos y latinoamericanos, pero se conocen casos donde razas de hongos entomopatógenos de otros hospedantes son más virulentas a la plaga en estudio que al mismo hospedante original (CENICAFE 1990).

En Latinoamérica se ha hecho poco o ningún esfuerzo en la visualización del control microbial como táctica del manejo integrado de *H. hampei*. Los pocos trabajos de investigación son más bien esfuerzos individuales que no han contado con un buen apoyo institucional. Para el caso, a continuación se presentan los trabajos de *B. bassiana* en *H. hampei* registrados

en la base de datos de PROMECAFE, evidenciando que no existe una investigación sistemática.

En Brasil, Fernandes *et al.* (1985) evaluando tres métodos de inoculación en *H. hampei* bajo siete concentraciones de *B. bassiana* encontraron que, con concentraciones en el rango de  $2 \times 10^5$  a  $2 \times 10^8$  conidias/ml la mortalidad fue mayor al inocular los insectos que al hacerlo sobre los frutos y hojas.

Al inocular *Metarhizium anisopliae* sobre *H. hampei*, en las concentraciones de  $1.5 \times 10^5$  a  $1.5 \times 10^8$  se encontró mayor mortalidad al inocular los insectos que al hacerlo en las hojas o granos (Leucona *et al.* 1986).

En Honduras, bajo condiciones de campo, Tronconi *et al.* (1986) encontraron que a los 25 días después de haber inoculado una concentración de  $2 \times 10^7$  conidias/ml agua de *B. bassiana* sobre 125 frutos de café infestados con *H. hampei*, 86 frutos (68%) estaban infectados por el hongo.

Monterroso (1981) evaluando diferentes medios de cultivo para la reproducción de *B. bassiana*, con miras a utilizar el hongo en aplicaciones de campo para controlar *H. hampei*. Concluyó que copra de coco (*Cocos nucifera*) es el medio más barato para reproducir el hongo.

## B. Los entomopatógenos, con énfasis en *Beauveria bassiana*.

### 1. Ciclo de vida.

Según Alves (1986) los hongos entomopatógenos presentan las siguientes fases en su ciclo de vida:

**Germinación:** Cuando el hongo encuentra condiciones favorables de humedad y temperatura este germina sobre el insecto produciendo un tubo germinativo. La germinación ocurre en un mínimo de 12 horas a una temperatura de 23 a 30°C y una humedad relativa alta.

**Formación de apresorio:** en la extremidad del tubo germinativo ocurre una dilatación de la hifa formando una estructura denominada apresorio. Esta estructura puede no ocurrir en *Beauveria*, *Nomuraea* y *Erynia*, o cuando el tubo germinativo penetra por aberturas naturales.



**Penetración:** En la penetración están involucrados dos procesos principales: 1) El físico, debido a la presencia de hifas que rompen las áreas membranosas o esclerotizadas; 2) El químico, resultante de la elaboración de enzimas (proteasas, lipasas y quitinasas), que facilitan la penetración mecánica. La penetración via oral puede ocurrir para algunos hongos como *M. anisopliae*, *N. rileyi* y *B. bassiana*.

**Colonización:** a partir de la penetración se inicia el proceso de colonización del hospedero por el hongo. La hifa que penetra sufre un engrosamiento y se ramifica, inicialmente en el tegumento del insecto y posteriormente en la cavidad del cuerpo. A partir de este momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales, puede que no ocurra gran crecimiento hifal antes de la muerte del insecto; dentro del cadáver, todos los tejidos internos son penetrados por hifas filamentosas más no ocurre desintegración debido a que el patógeno segrega sustancias antibacterianas. La colonización de los órganos presenta la siguiente secuencia: cuerpos grasosos, sistema digestivo, tubos de malpighi, sistema nervioso, músculos y traquea. El tiempo para la colonización del insecto puede variar de tres a cinco días dependiendo del huésped, patógeno y de las condiciones ambientales.

**Reproducción del patógeno:** dos a tres días después de la muerte del insecto (la muerte del insecto ocurre a los cuatro o cinco días después de la inoculación) las hifas comienzan a emerger por los espiráculos y otras aberturas. La producción de conidias ocurre uno o dos días después de la emergencia de las hifas en condiciones de elevada humedad y con temperaturas en el rango de 20 a 30°C. Dependiendo del patógeno, la muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, modificaciones patológicas en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo debido al crecimiento vegetativo.

## 2. Relación huésped - entomopatógeno - ambiente.

Para Rodríguez (1975) la patogenicidad es atributo de una especie, género o grupo de parásitos. en tanto que virulencia expresa la patogenicidad de una cepa en particular en relación a un grupo de huéspedes de una especie y puede ser expresada cuantitativamente. Desde este punto de vista habría microorganismos patógenos más o menos virulentos.

La virulencia de un entomopatógeno puede ser evaluada en laboratorio a través de bioensayos con insectos susceptibles y puede ser expresada en DE<sub>50</sub> (dosis efectiva mediana), DL<sub>50</sub>

(dosis letal mediana) y  $TL_{50}$  (tiempo letal mediano) (Alves 1986).

Steinhaus y Martignoni (1970) definen el  $TL_{50}$  como el período de exposición a un estímulo patogénico (incluyendo toxinas) el cual produciría la muerte a la mitad de los sujetos de prueba. El tiempo de exposición es una medida directa de la dosis, y un incremento en el período de exposición resulta en un incremento en la toma de dosis verdadera en la misma tasa. En cambio, los mismos autores definen tiempo mediano de supervivencia ( $TS_{50}$ ) como el tiempo en el cual ocurre la muerte de la mitad de los sujetos de prueba después de la exposición a un estímulo patogénico.

Tanada (1963), citado por Alves (1986) asevera que el progreso de una enfermedad en una población de insectos puede ser demostrada por una curva denominada "curva epizootica". Esa curva puede ser dividida en tres fases: pre-epizootica, epizootica y post-epizootica.

La fase pre-epizootica se caracteriza por un bajo número de hospederos enfermos, resultando en focos primarios de la enfermedad. Esos focos primarios son formados debido a la inmigración de insectos enfermos, o por estructuras del patógeno que permanecen en el suelo.

La fase epizootica se caracteriza por un elevado índice de insectos enfermos como consecuencia de la multiplicación y diseminación del inóculo producido por los focos primarios.

La fase post-epizootica se caracteriza por la disminución del número de insectos enfermos en relación a la fase anterior.

Entre los factores que determinan una epizootia tenemos: los dependientes al huésped, entomopatógeno y los del medio ambiente (Jiménez 1985).

#### a. Factores del huésped.

Los hábitos y estado de desarrollo del huésped afectan su susceptibilidad hacia un patógeno. Debido a sus hábitos la fase más vulnerable de *H. hampei* es la fase adulta, la hembra pasa el período de post-cosecha en los frutos caídos al suelo y los dejados en la planta. Se ha sugerido que estas hembras pueden ser atacadas por *B. bassiana* y reducir la fuente de

infestación de la plaga para la próxima fructificación (Alves 1986). Respecto al estado de desarrollo se ha encontrado que, por ejemplo, las larvas del primer estadio de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Pyralidae), son más susceptibles a *B. bassiana* que las del quinto estadio (Feng et al. 1985)

Las condiciones fisiológicas del huésped son de gran importancia en la ocurrencia de la epizootia. Para el caso, insectos con un período sin alimentación son más susceptibles a *B. bassiana* que los alimentados (Ferron y Robert 1975). Así mismo; la cantidad y calidad del alimento puede afectar la susceptibilidad de los insectos a los patógenos. Hare y Andreadis (1983) observaron variación en la susceptibilidad de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleóptera: Chrysomelidae), al hongo *B. bassiana* cuando fue alimentada con diferentes especies de plantas.

Otro factor que influye es la edad del huésped. Por ejemplo, Ferron y Robert (1975) encontraron que adultos de *Acanthoselides obtetus* (Coleóptera: Bruchidae) de dos a cuatro horas de edad son más susceptibles a *B. bassiana* que los de dos y cinco días.

En cuanto a las "castas" Alves y Sosa (1983) expresan que "soldados" de *Atta sexdens rubreopilosa* (Hymenoptera : Formicidae), son más susceptibles a *B. bassiana* que las "cortadoras".

El tegumento del insecto es una barrera fisico-química que varía de insecto a insecto. Durante la estación lluviosa los hongos encuentran condiciones favorables para la penetración del huésped, debido a la baja secreción y deposición de ceras en el tegumento. En la época seca, la secreción de cera es activada y los insectos se vuelven más resistentes a la penetración del hongo (Alves 1986).

#### b. Factores del entomopatógeno.

Las condiciones del patógeno son un factor importante para la ocurrencia de la epizootia. Una fase favorable del patógeno debe coincidir con un período favorable del ambiente y con las condiciones de susceptibilidad del huésped (Alves 1986).

Se ha documentado que los grupos de entomopatógenos son diferentes en distintas zonas y se han descubierto grandes

diferencias entre grupos aislados geográficamente (N.A.S. 1988; McCoy *et al.* (1985).

Un entomopatógeno que presenta alta virulencia y gran capacidad de diseminación puede ser llamado "patógeno epizootico" y debe ser seleccionado para el control microbial. La virulencia de un patógeno puede ser aumentada por ingeniería genética, y provocando mutaciones o cruzamientos de patógenos (Alves 1986). Se ha planteado que la virulencia de *B. bassiana* esta relacionada con la producción de lipasa, y que esto facilitaría la selección de razas (Paris y Segretain 1978, citados por Alves 1986).

La efectividad de una cepa puede mejorarse provocando cambios de otras características como son susceptibilidad a luz ultravioleta, temperatura y los agroquímicos. Otras maneras de mejorar la efectividad de una cepa es através de formulaciones, con atrayentes del huésped.

Asi mismo, el cultivo seriado de hongos entomopatógenos propicia una disminución de la efectividad de los mismos (Morrow *et al.* 1989; Barbosa *et al.* 1985). Samsinakova y Kalalova (1983) encontraron, que al tercer cultivo de *B. bassiana* la mortalidad de larvas de *G. mellonella* nunca sobrepasó el 10%; en cambio con una pasada por medio de cultivo el  $TL_{50}$  fue de 6.5 días aproximadamente. Murayama *et al.* (1981) reportan que entre el segundo y octavo cultivo seriado de *M. anisopliae* la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* fue de 58%; del noveno al onceavo cultivo la mortalidad bajó a 22%. Posiblemente la pérdida de virulencia con el cultivo seriado se deba a la pérdida de genotipos virulentos, es decir que genotipos avirulentos o menos virulentos predominan en la mezcla de genotipos. Cuando se inoculan insectos susceptibles, se vuelve a aumentar la efectividad de la cepa, posiblemente por reestablecer la dominancia numérica de los genotipos virulentos.

La capacidad de supervivencia de los hongos entomopatógenos es variable. El género *Beauveria* posee en su ciclo de vida la fase de blastospora que es una estructura de resistencia. Asi mismo, se ha observado una gran cantidad de micelio de *B. bassiana* en forma de "rizomorfo" en adultos de *Cosmopolitus sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), concluyendo que esa estructura puede ser otra forma de supervivencia del hongo en el suelo.(Alves 1986).

Bunzli y Buttiker (1959), citados por Ayala y Monzon (1977) plantearon que *B. bassiana* es capaz de desarrollarse e

incluso incrementar su efectividad en suelos con alto contenido de materia orgánica nitrogenada.

### c. Factores del medio ambiente.

La temperatura óptima para la expresión de la patogenicidad de *B. bassiana* está en el rango de 15 a 25°C (Barson 1977; Dokerski 1981; Hurpin 1968; Ferron y Robert 1975).

La temperatura óptima para la esporulación parece ser algo mayor. A 25-30°C la esporulación de *B. bassiana* demora cinco días; a 35°C ocurre a los ocho días y a 10°C 15 días (Walstad *et al.* 1970).

Al contrario, la supervivencia de conidias es favorecida por bajas temperaturas. La supervivencia, en almacenamiento, de las conidias de *B. bassiana* expuestas a 8°C es de 12 meses; pero, a 21°C las conidias permanecen viables por 15 días (Walstad *et al.* 1970).

El punto de muerte termal (temperatura que causa el 100% de mortalidad de las conidias después de exponerlas por 10 minutos) de *B. bassiana* es de 50°C (Walstad *et al.* 1970).

La humedad relativa (H.R.) alta es necesaria para la germinación de las conidias de *B. bassiana*. La mejor germinación de conidias ocurre a 100% de H.R., a esta humedad las conidias se desarrollan en cuatro días; humedades por debajo de 92.5% inhiben la germinación (Walstad *et al.* 1970).

El efecto de la humedad sobre la germinación de las conidias probablemente sea el responsable de la expresión de la patogenicidad. Dokerski (1981) evaluando el efecto de la humedad en la patogenicidad de *B. bassiana* sobre larvas de *Scolytus scolytus* (Coleoptera: Scolytidae), encontró 93% de mortalidad a 95% de H.R.; en cambio, a 90% de H.R. la mortalidad fue de 27%.

La germinación de conidias en agua pura es indeseable cuando se esta pensando en usar esta como vehiculo de aplicación de hongos entomopatógenos en el campo. En este aspecto *M. anisopliae* y *B. bassiana* pueden ser aplicados en formulaciones usando como vehiculo agua, pues diversos trabajos de investigación demuestran que dificilmente germinan en agua pura (Alves 1986).

Alves y De Moraes (1979) estudiando la influencia de diversos fotoperíodos en la esporulación de *B. bassiana*; concluyeron que el mayor número de conidias se obtuvo con un régimen de luz continua.

La radiación solar, posiblemente el espectro ultravioleta, es letal para las conidias de *B. bassiana*, pudiendo ser el factor limitante en los intentos del control microbiológico (Chaves *et al.* 1981; Daoust y Pereira, 1986). Negreiros *et al.* (1980) encontraron que la luz ultravioleta afectó el crecimiento y esporulación de *B. bassiana*.

Sin embargo, se ha demostrado que existe variabilidad genética en la resistencia de luz ultravioleta entre aislados de *M. anisopliae* (Frigo y De Azevedo 1986; Sánchez y De Azevedo 1986).

Recientemente, y debido principalmente al efecto perjudicial de la luz ultravioleta, se ha planteado el uso de micelio cuando se hagan aplicaciones de *B. bassiana* en el campo (Robert y Wraight 1986; Jaronski 1986). Sin embargo; Rombach *et al.* (1986) reportan que la mortalidad de *Scotinophora coarctata* (Hemiptera: Pentatomidae) fue similar al emplear conidias *vrs* micelio.

### 3. Efecto de fungicidas y otros pesticidas.

En Brasil, *B. bassiana* se ha constituido en una plaga para los sericultores de ese país. En 1981 Corso y Moscardi llevaron a cabo una investigación con el objetivo de encontrar un fungicida que permita controlar el ataque de *B. bassiana* sobre el gusano de seda (*Bombyx mori*), Lepidoptera: Bombycidae); reportando que Neantina, Cerconil y una mezcla de maneb + Daconil ejercen un buen control de la epizootia.

Al evaluar el efecto de los fungicidas mancozeb, methiram, clorotalonil y metalaxil, en la supervivencia de *B. bassiana*, se encontró que mancozeb y methiram inhibieron totalmente al hongo bajo condiciones de laboratorio y de campo (Loria *et al.* 1983).

En Guatemala, Rodríguez (1983) evaluó, bajo condiciones de laboratorio, siete fungicidas usados comunmente en la caficultura de ese país, encontrando que el oxiclورو de cobre fue el que menos inhibió la esporulación de *B. bassiana*.

Gardner y Storey (1985) evaluando el efecto de 21 herbicidas, en las dosis de 0, 6, 12, 18, 24 y 30 mg de i.a./ml, encontraron que acifluorfen, alaclor, diclofob, dinoseb, fluazifob, metalaclor, oxifluorfen y paraquat inhibieron totalmente el crecimiento micelial de *B. bassiana* en todas las concentraciones evaluadas. El glifosato (Roundup), y Horyzalin (Surflan) inhibieron significativamente el crecimiento y germinación.

Los reguladores del crecimiento, flurprimidol, paclobutrazol y silaid, inhiben la germinación de *B. bassiana* en las concentraciones de 6 a 30 mg/ml. Concentraciones de 6 y 12 mg/ml de mefluidide no reducen significativamente la germinación. Así mismo, de ocho coadyuvantes evaluados (Ortho X77, Plyac, Miller-Aide, Nu-Film 17, Pro-Stik, Triton Ag-98, Triton CS-7 y Tween 80) solo Triton CS-7 fue el que inhibió la germinación de *B. bassiana* (Storey y Gardner 1986).

### III. MATERIALES Y METODOS.

#### A. Localización.

La recolección y procesamiento de las muestras de *B. bassiana* se realizó de Noviembre de 1989 a Enero de 1990. Esta actividad se efectuó en el laboratorio de fitopatología del Instituto Hondureño del Café (IHCAFE), ubicado en el Centro Experimental "Jesus Aguilar Paz", La Fe, Ilama, Santa Barbara, Honduras, C.A.

Las pruebas de virulencia y tolerancia al oxiclورو de cobre fueron realizadas en el laboratorio de fitopatología del Departamento de Protección Vegetal, de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras, C.A., en el periodo comprendido de Febrero a julio de 1990.

#### B. Obtención de cepas de *Beauveria bassiana*.

Entre Noviembre y Diciembre de 1989 se visitaron 15 plantaciones de café ubicadas en diferentes zonas productoras de Honduras, de donde se recolectaron frutos infestados con broca y con evidencias de infección de *B. bassiana*. Las muestras fueron transportadas en bolsas de papel "Kraft" al laboratorio del IHCAFE, las muestras colectadas en la zona del lago de Yojoa, debido a la cercanía del lugar de colecta, fueron procesadas el mismo día de colecta; las muestras de otras zonas fueron procesadas aproximadamente a los ocho días después de la recolecta. Durante ese tiempo las muestras fueron mantenidas al medio ambiente (22°C) en las bolsas de papel.

Ocho cepas adicionales, de otros países, fueron obtenidas gracias a la colaboración de varios investigadores.

El número de cepas recolectadas, entre Hondureñas y extranjeras fueron de 24, pero por facilidades en el manejo de los ensayos se trabajó únicamente con 10 cepas. Estas cepas fueron seleccionadas con base en una prueba preliminar de crecimiento visual (alto, medio y bajo) en medio (BAA) con oxiclورو de cobre y procedencia, se trató que todos los departamentos de Honduras, donde se colectó cepas, estuvieran representados. Información respecto a la procedencia de estas cepas se presenta en la figura 1.



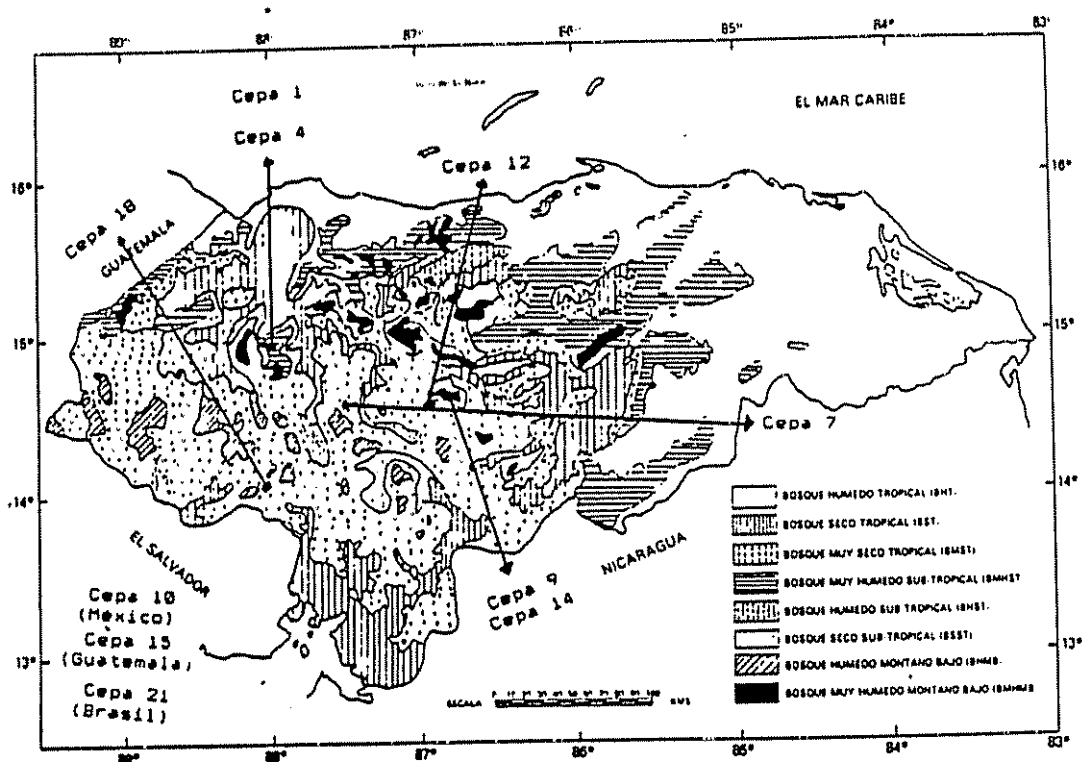


Figura 1. Procedencia de las 10 cepas de *Beauveria bassiana* utilizadas en los bioensayos.

### C. Reproducción de *Beauveria bassiana*.

El procesamiento de las muestras para conseguir un cultivo puro de *B. bassiana* consistió en tomar, de cada uno de los frutos, porciones de micelio y partes de cuerpo del insecto infectado por el hongo, los que fueron sembrados en medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado en la reproducción del hongo fue 60 g de semolina + 12 g de Agar + 1000 ml de agua destilada (SAA). La preparación del medio consistió en calentar el agua, la cual, una vez próxima al punto de ebullición, era transferida a una licuadora donde se le adicionaba el Agar y la semolina; el aparato era accionado por cinco minutos hasta obtener una mezcla homogénea.

La mezcla fue esterilizada en un autoclave a 15 lbs/plg<sup>2</sup> por espacio de 25 minutos; una vez que la mezcla estuvo fría (al tacto) fue transferida a los platos de petri (80 cm de diámetro). Al solidificarse el medio en los platos, estos

fueron colocados en forma invertida en un horno con una temperatura de 30°C durante 72 horas. Esto con la finalidad de evaporar el agua condensada en la tapa del plato y de poder detectar contaminantes, comunmente bacterias.

El hongo fue pasado por medio de cultivo de cuatro a seis veces, desde su recolección en el campo hasta la utilización en los ensayos.

Una vez obtenido el cultivo puro de *B. bassiana*, las muestras a utilizar en los bioensayos fueron guardadas en platos de petri en una incubadora a temperatura de 27°C aproximadamente.

#### D. Conservación de cepas.

Las 24 cepas recolectadas se conservan en el Laboratorio de Fitopatología del IHCAFE en Honduras; Laboratorio de Diagnostico del Area de Fitoprotección en CATIE, Turrialba, Costa Rica y en el C.I.B.C. en Gran Bretaña.

#### E. Cria de *Hypothenemus hampei*.

Frutos brocados fueron colectados de una finca del municipio de Campamento, departamento de Olancho, Honduras, donde no se habia aplicado insecticidas. Los frutos recolectados fueron confinados en envases de vidrio (25 cm de alto y 16 cm de diametro), tapados con malla y mantenidos a temperatura ambiente (27°C±2). Se realizó solamente una recolección de frutos brocados.

Cuando se necesitaban insectos para la prueba, los frutos eran disectados para recobrar las hembras adultas con mayor actividad motora.

#### F. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei* a 10 cepas de *Beauveria bassiana*.

##### 1. Metodología.

Por cada una de las 10 cepas seleccionadas se inoculó un total de 200 hembras adultas (hembras de color negro y activas) con una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidias/ml de agua destilida, la concentración fue igual para todas las cepas. La

suspensión fue preparada 12 horas antes de la inoculación del insecto. Con la finalidad de tener una mejor dispersión de las conidias, en la suspensión original, se adicionó una gota (con gotero) de Tween-80. Para determinar la concentración inicial de la suspensión se realizaron conteos de conidias con el auxilio de un hemacitómetro, luego, para estandarizar la concentración deseada se realizaron diluciones con agua destilada.

La metodología empleada para la inoculación de los insectos consistió en colocar las 200 hembras en un plato de petri. Se agitaba la suspensión y con ayuda de una pipeta se adiciono 1 ml de dicha suspensión al plato de petri, el cual se agitó por 10 segundos.

Para retirar el exceso de inóculo de los insectos, el plato de petri fue invertido sobre un papel toalla. Luego, con la ayuda de un pincel, los insectos fueron divididos en 20 grupos de 10 insectos cada uno; cada grupo fue confinado en un vaso entomológico que contenía 10 cerezas de café en estado "verde", esto como fuente de alimento.

Para proveer una humedad adecuada en el interior del vaso, se procedió a humedecer su tapa de carton. Durante el tiempo de duración de las pruebas los vasos fueron invertidos con la finalidad de que la humedad se condensara en el interior de los mismos. Los insectos inoculados, dentro de los vasos entomológicos, fueron mantenidos en una habitación con aire acondicionado ( $23^{\circ}\text{C}\pm 2$ ), sin luz artificial por la noche (4:30 pm - 6:00 am).

La mortalidad del insecto fue evaluada a los cuatro, cinco, seis, siete y ocho días después de su inoculación, en dos categorías: porcentaje de mortalidad debido a micosis (insectos con micelio blanco visible) y porcentaje de mortalidad total (mortalidad por micosis + mortalidad no asociada con la visualización de micelio). Al hacer las evaluaciones, se tomaba como insecto muerto aquel que no movía ningún apéndice. La mayoría de insectos se encontraban en galerías dentro de los frutos; por lo tanto, para poder evaluarlos se procedió a disectar las cerezas con la ayuda de un bisturí. Tanto insectos que se encontraban dentro como aquellos que se quedaron fuera de los frutos fueron considerados para calcular la mortalidad. Con base en lo anterior, en esta investigación se cuantificó la virulencia de *B. bassiana* sobre una muestra de la población Hondureña de *H. hampei* con base en el  $\text{TS}_{50}$  (Steinhaus y Martignoni 1970).

## 2. Diseño experimental y análisis de datos.

El diseño experimental empleado fue completamente al azar con 10 cepas de *B. bassiana* más el testigo (agua destilada + Tween-80) y cinco fechas de evaluación de mortalidad. Por cada fecha de evaluación los tratamientos estuvieron representados por cuatro repeticiones, siendo la unidad experimental un vaso entomológico que contenía 10 insectos; o sea 40 insectos/tratamiento/fecha. El arreglo antes mencionado se debió a que la evaluación involucraba la destrucción de las cerezas de café y/o el insecto; de esta manera la mortalidad fue evaluada con un nuevo grupo de insectos en cada fecha de evaluación.

Antes del análisis, se procedió a corregir el porcentaje de mortalidad de cada réplica mediante la fórmula de Abbot  $[(\text{mortalidad del tratamiento (\%)} - \text{mortalidad del testigo (\%)}) / (100 - \text{mortalidad del testigo (\%)})] \times 100$ , usando como testigo la media de las cuatro repeticiones del tratamiento testigo para esa fecha de evaluación, la mayor mortalidad del testigo fue de cinco por ciento. Esta corrección fue realizada para los datos de mortalidad por micosis de los tratamientos vrs. mortalidad por micosis del testigo; mortalidad total de los tratamientos vrs. mortalidad total del testigo. De esta manera, no fue necesario emplear ninguna opción de corrección cuando los datos fueron analizados con PROC PROBIT de SAS (SAS Institute 1990).

El procedimiento PROBIT automáticamente promedia los datos provenientes de repeticiones de la misma variable independiente (en este caso la fecha de evaluación). Esto elimina las ventajas de tener repeticiones y produce un estimado impreciso de la heterogeneidad debido a muy pocos grados de libertad. Con el fin de forzar a que el PROC PROBIT considerara a cada repetición de manera separada, la modificación propuesta por Tabasnik *et al* (1987) fue utilizada en estos análisis. Esta modificación consiste en alterar en forma mínima (al quinto o mayor decimal) el valor de la variable tiempo. Por ejemplo, los datos de mortalidad de las cuatro réplicas de la cepa "x", en la lectura a los cuatro días fueron entrados como:

cepa	tiempo	insectos totales	insectos muertos
"x"	4.0	10	4
	4.00001	10	6
	4.000001	10	5
	4.0000001	10	4
	etc..		

El efecto de esta modificación sobre los análisis es, principalmente, la de producir límites de confianza más estrechos, debido al mayor número de grados de libertad. Tabashnik *et al* (1987) reportan que el efecto sobre el  $TS_{90}$  y la pendiente es menor del 0.01%.

#### G. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei* a cultivos de origen mono-espóricos de *Beauveria bassiana*.

De las tres cepas que presentaron mayor virulencia en la prueba antes descrita ( cepa 4, 14 y 15) se procedió a derivar cinco cultivos provenientes de una sola conidia que fue aislada según la metodología propuesta por French y Hebert (1980). El problema encontrado al implementar dicha metodología fue la dificultad en extraer las conidias, ya que al bajar el carro se perdía la ubicación de las conidias. Este problema fue solucionado con el "punteado" al azar, con un marcador (pilot) de punta fina, del fondo del plato de petri; de esta forma se procedía a ubicar la conidia que se encontraba alrededor o sobre el "punto", se bajaba el carro y se extraía la conidia la cual era transferida a un plato de petri con medio de cultivo para su posterior ubicación y comprobación que solo se había extraído una conidia.

La metodología y análisis de los datos para la prueba de virulencia de las tres cepas originales ("madres), más las 15 cepas de origen mono-espóricas en adultos de *H. hampei* fue idéntico a lo expuesto en el inciso "F"

#### H. Tolerancia de *Beauveria bassiana* al oxiclóruo de cobre.

El fungicida más utilizado para el control de la roya del Café (*Hemileia vastatrix*), para el caso de Honduras, es el producto comercializado como oxiclóruo de cobre al 50%. De trabajos anteriores (Rodríguez 1983; Alves 1986) sabemos que *B. bassiana* presenta características de tolerancia a dicho producto.

Debido a lo anterior se dispuso caracterizar la tolerancia de las 10 cepas de *B. bassiana*, utilizadas en la prueba de virulencia descrita en el inciso "F", al oxiclóruo de cobre. La elección de la dosis empleada en la prueba se determinó por medio de una prueba preliminar donde se puso a crecer *B. bassiana* en medio de cultivo que contenía 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm de i.a., observando que 1500 era el punto para discriminar las cepas ya que con 2000 y 2500 se afectaba el crecimiento de las cepas.

## 1. Metodología.

Se prepararon platos de petri que contenían medio de cultivo con y sin oxiclóruo de cobre en suspensión a una concentración de 1500 ppm de i.a. de oxiclóruo de cobre con la misma metodología expuesta en el inciso "C". La única diferencia fue que, al medio que contenía oxiclóruo de cobre, el producto fue adicionado al momento de homogenizar la mezcla en la licuadora (3 g de una formulación comercial al 50% por litro de medio).

Se preparó inóculo a  $1 \times 10^7$  conidias/ml para todas las cepas, usando la misma metodología descrita anteriormente. El inóculo fue preparado 12 horas antes de ser utilizado, durante ese tiempo fue guardado en una incubadora a una temperatura aproximada de 22°C.

Con ayuda de una micropipeta se depositaron 10  $\mu$ l de la suspensión de inóculo en el centro de cada plato de petri, en la siembra de cada plato se realizaba una re-suspensión del inóculo, los cuales una vez inoculados fueron mantenidos en una habitación a una temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La tolerancia, al oxiclóruo de cobre, de las cepas fue evaluado por medio de la tasa de crecimiento micelial y la esporulación. El diámetro del crecimiento de micelio fue tomado, con ayuda de una regla graduada en mm ("pie de rey"), a partir de los ocho días después de haber inoculado los platos de petri. Se realizó un total de cinco lecturas espaciadas cada dos días sobre las mismas unidades experimentales.

La esporulación de la colonia fungal entera fue medida un día después de haber tomado la última lectura de crecimiento; es decir, 17 días después de haber inoculado los platos. Para tomar dicha variable se depositó, en cada plato, 10 cc de agua destilada más 3 gotas (con gotero) de Tween-80 y con ayuda de un pincel se suspendió el crecimiento micelial. Para facilitar el conteo de las conidias se efectuaron tres diluciones seriadas ( $10^{-3}$ ) a partir de la suspensión original.

## 2. Diseño experimental y análisis de datos.

Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial ( $10 \times 2 \times 4$ ), compuesto por las 10 cepas de *B. bassiana* por dos concentraciones de oxiclóruo de cobre (0 y 1500 ppm de i.a.). Cada tratamiento estuvo representado por

cuatro repeticiones, siendo la unidad experimental un plato de petri.

Para el análisis del crecimiento micelial se calculó el coeficiente de regresión (b) de la pendiente de la regresión lineal del diámetro sobre fecha de lectura para cada plato de petri. Dicho análisis se hizo usando el PROC REG de SAS (SAS Institute 1990). Los coeficientes fueron sometidos a un análisis de varianza, de acuerdo al diseño completamente al azar descrito anteriormente. El análisis de los residuales, usando la opción PLOT NORMAL de PROC UNIVARIATE de SAS, reveló que no hubo desviación significativa de la distribución normal; por lo tanto se analizaron los datos originales.

El número de conidias en un mililitro de la suspensión de micelio fue analizado con base en el diseño completamente al azar descrito anteriormente, teniendo como fuente de variación 10 cepas, dos concentraciones de oxiclورو de cobre y su interacción; usando la opción PROC GLM de SAS. El análisis de los residuales, con base a la opción antes mencionada, reveló una falta de normalidad; por lo tanto los datos fueron transformados a la raíz cuadrada antes de realizar el análisis de varianza.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

A. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei* a 10 cepas de *Beauveria bassiana*.

En este ensayo existieron diferencias del tiempo mediano de supervivencia ( $TS_{50}$ ) de *H. hampei* expuestos a cepas de *B. bassiana* provenientes de diferentes zonas geográficas.

Las cuatro cepas que mostraron los menores valores de  $TS_{50}$ , con base en la mortalidad por micosis como de la mortalidad total, fueron la 14, 4, 15 y 10, en orden decreciente de  $TS_{50}$ . Con base en el criterio de traslape de los límites de confianza, la cepa 14 no mostró diferencia significativa en comparación con las cepas 4, 15 y 10, aunque el  $TS_{50}$  fue significativamente menor que en las demás cepas (Cuadros 1 y 2).

De las cepas extranjeras evaluadas, la de Brasil (21) está en el grupo de las menos virulentas, mientras que la proveniente de Guatemala (15) y la de México (10) pertenecen al grupo de mayor virulencia.

Estos resultados concuerdan con otros estudios (NAS 1978; McCoy *et al.* 1985; Da Silva y Diehl-Fleig 1988) en el sentido de que existen diferencias en la virulencia de las cepas de *B. bassiana* que están aisladas geográficamente.

Para el caso, las cepas 4 y 1 (hondureñas) mostraron un  $TS_{50}$  de 5.72 días y 7.62 días respectivamente. Estas cepas fueron colectadas en sitios distanciados por 10 Km aproximadamente uno del otro. Esto demuestra que aun dentro de una pequeña área pueden existir cepas que muestran efectos específicos al sitio de colecta, quizás las condiciones locales de clima o manejo del cultivo, parecen ser más importantes que la magnitud geográfica en determinar niveles de virulencia.

La habilidad para causar la muerte rápida del insecto puede no ser la única característica deseable de un agente de control microbial. Sin embargo, el tiempo corto entre las generaciones del patógeno es uno de los factores que debería favorecer el uso del agente para inducir epizootias en el campo. Resultados rápidos también son deseables si una cepa se contempla para uso en un insecticida microbial; entre menor el



Cuadro 1. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base en mortalidad por micosis, a 10 cepas de *Beauveria bassiana*.

Cepa (No)	TS <sub>50</sub> (días) <sup>1</sup>	L. C. (95%) <sup>2</sup>		
		(Inf.-Sup.)	Pendiente ± EE	X <sup>2</sup>
14	5.54a	(5.27-5.80)	10.81 ± 1.22	18.22
4	5.72a	(5.49-6.01)	11.81 ± 1.35	23.77
15	6.08ab	(5.79-6.36)	11.05 ± 1.33	19.55
10	6.14abc	(5.79-6.52)	7.95 ± 1.08	18.39
18	6.56 bcd	(6.21-6.99)	8.33 ± 1.16	19.93
12	6.80 cde	(6.45-7.25)	8.90 ± 1.26	9.94
7	6.96 de	(6.58-7.46)	8.60 ± 1.28	6.92
21	7.60 ef	(7.10-8.44)	7.87 ± 1.33	11.39
1	7.62 ef	(7.14-8.44)	8.18 ± 1.41	11.93
9	8.34 f	(7.66-9.80)	7.77 ± 1.54	8.30

<sup>1</sup> TS<sub>50</sub> con la misma letra no son diferentes con base en el criterio de traslape de los límites de confianza con otras cepas de la misma agrupación

<sup>2</sup> Límites de confianza al 95% de probabilidad

X<sup>2</sup> = Chi-cuadrada de Pearson

Cuadro 2. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base en mortalidad total, a 10 cepas de *Beauveria bassiana*.

Cepa (No)	TS <sub>50</sub> (días) <sup>1</sup>	L. C. (95%) <sup>2</sup>		
		(Inf.-Sup.)	Pendiente ± EE	X <sup>2</sup>
14	5.13a	(4.84-5.39)	9.84 ± 1.18	24.14
4	5.30a	(5.00-5.58)	9.62 ± 1.13	19.14
15	5.58ab	(5.28-5.87)	9.37 ± 1.11	17.30
10	5.60ab	(5.25-5.94)	7.64 ± 1.03	24.87
18	5.99 bc	(5.62-6.39)	7.17 ± 1.00	24.08
12	6.44 cd	(6.03-6.88)	7.26 ± 1.04	12.14
7	6.41 cd	(6.06-6.92)	7.18 ± 1.04	10.13
21	7.03 de	(6.61-7.64)	7.65 ± 1.14	19.06
1	7.36 de	(6.82-8.27)	6.38 ± 1.09	20.15
9	7.65 e	(7.04-8.95)	6.29 ± 1.12	12.36

<sup>1</sup> TS<sub>50</sub> con la misma letra no son diferentes con base en el criterio de traslape de los límites de confianza con otras cepas de la misma agrupación

<sup>2</sup> Límites de confianza al 95% de probabilidad

X<sup>2</sup> = Chi-cuadrada de Pearson

lapso de tiempo entre la aplicación y el efecto, mayor percepción de eficacia. Con base en este criterio se debería considerar a las cepas 14, 4 y 15 como las más promisorias, de las cepas estudiadas, para usarlas en futuras pruebas del control microbiano de *H. hampei*. Es de mencionar que la cepa 10 no fue significativamente diferente de las antes mencionadas con base en el valor de  $TS_{50}$ .

Las Cepas 14, 4 y 15 mostraron, para ambas mediciones de mortalidad, las pendientes con mayor ángulo de las líneas de probit; esto sugiere que la mayor virulencia de estas cepas fue asociada con la respuesta más homogénea de los insectos. En futuros trabajos sería útil averiguar si esto se deba a que las cepas menos virulentas sean más heterogéneas, es decir que contengan una proporción mayor de genotipos de menor virulencia. Otra posible explicación podría ser que exista alguna interacción no especificada entre cepas genéticamente homogéneas y variación genotípica o fenotípica de la población de insectos (figura 2).

En forma general, los factores que contribuyeron para la manifestación de la enfermedad en este bioensayo y que fueron estandarizados durante la prueba son: (1) condiciones ambientales, mediante condiciones similares de prueba; (2) población de *H. hampei*, a través de la asignación aleatoria de insectos a los tratamientos (es de mencionar que probablemente la población insectil fue genéticamente heterogénea, ya que fue colectada originalmente del campo); y (3) las cepas de *B. bassiana*, es lo que probablemente más variación contribuyó, siendo compuesto de colectas de poblaciones del hongo de diversos lugares geográficos.

Así es evidente que, bajo estas condiciones controladas, las diferencias detectadas de tiempo de supervivencia se deben principalmente a la variabilidad genética presente en el grupo de cepas del hongo.

Es importante reconocer que un cambio de las condiciones de prueba o de la población de *H. hampei* podría cambiar la magnitud de la interacción y, por ende, los resultados de las pruebas. Debido a esto, cuando se habla de diferencias de virulencia entre las cepas, se entiende que esto debe condicionarse por "en esta población de *H. hampei* bajo estas condiciones de prueba".

Otra fuente potencial de variación fenotípica de las cepas no fue controlada: no se realizó verificación de la viabilidad de las conidias antes de la prueba. Ya que la

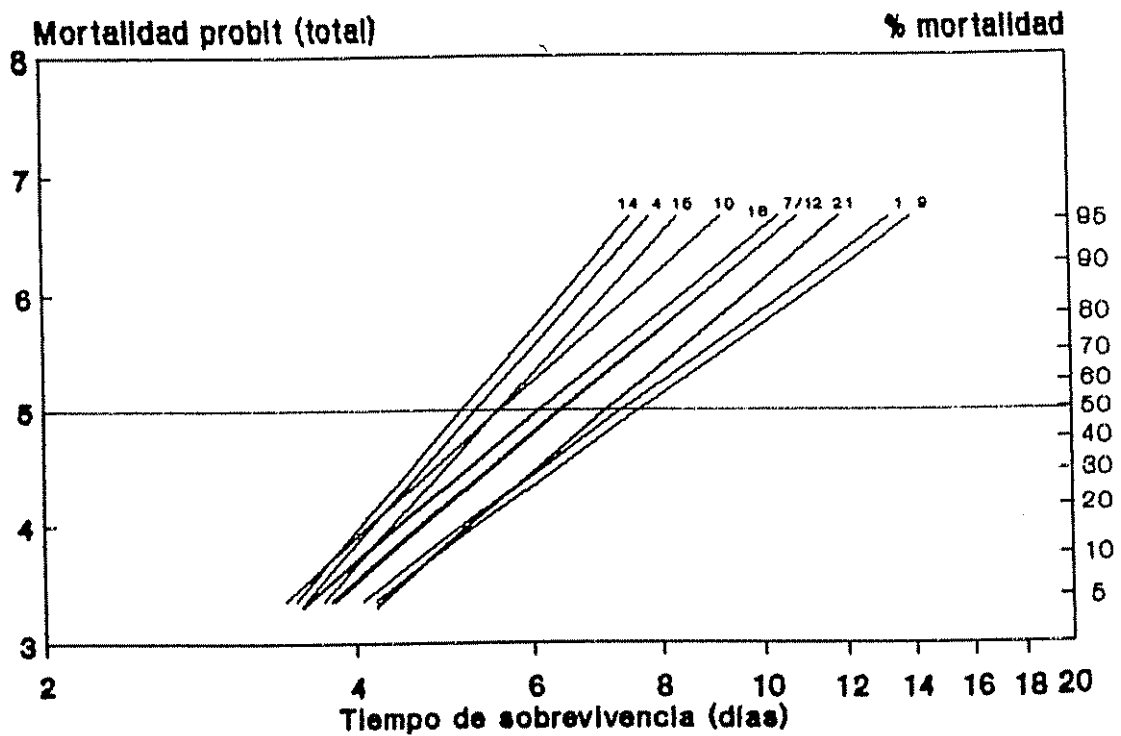
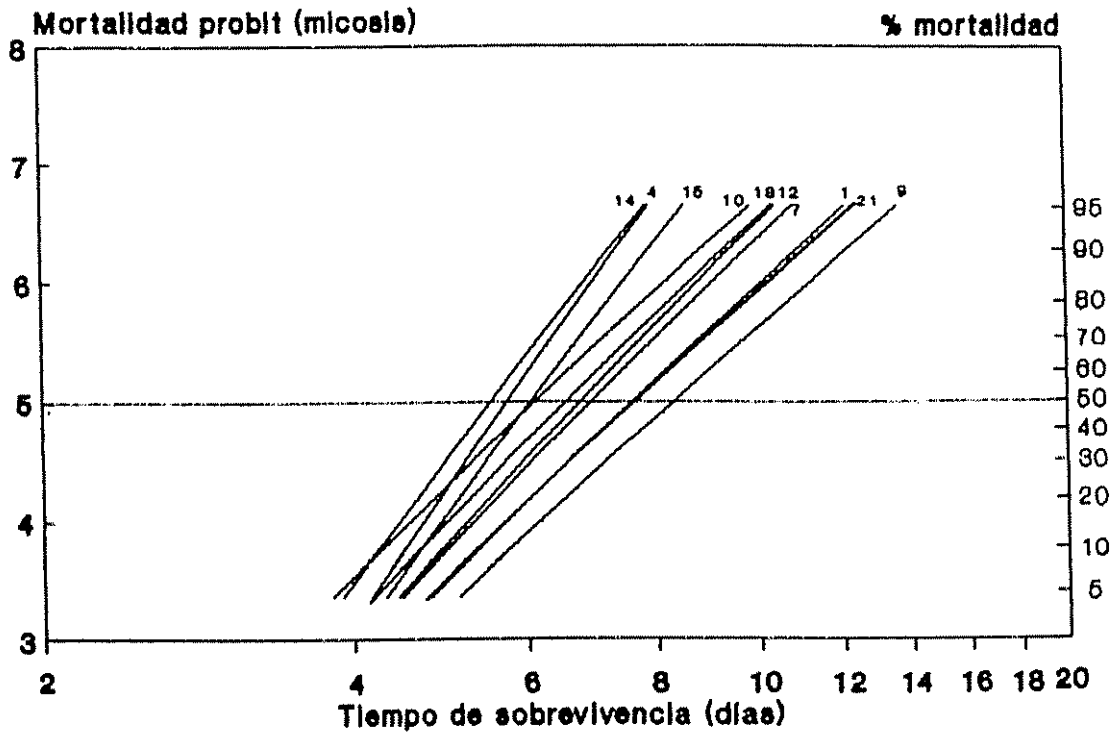


Figura 2: Mortalidad por micosis y total *vrs* logaritmo del tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei* a 10 cepas de *Beauveria bassiana*.

concentración de esporas viables a la cual se exponen los insectos se relaciona con el tiempo de supervivencia; diferencias en la viabilidad de las conidias potencialmente podría generar la variabilidad de respuesta que, en la discusión anterior, se atribuye a diferencias de virulencia entre las cepas aquí evaluadas. Existe evidencia indirecta que la contribución de este factor a la variabilidad total no fue mayor; los resultados reportados posteriormente sobre el crecimiento de micelio en medio de cultivo muestran diferencias entre las cepas que no se relaciona con las diferencias del tiempo de supervivencia. Si existieran diferencias mayores de viabilidad de las conidias entre las cepas, podría esperarse que tanto la respuesta en supervivencia y el crecimiento micelial serían afectados en forma similar. Considerado junto con el hecho que el manejo y manipuleo de las cepas antes de las pruebas fue estandarizado, la evidencia antes mencionada sugiere que no sea probable que diferencias de viabilidad de las conidias hubiera contribuido significativamente a la variabilidad del tiempo de supervivencia.

No obstante a lo anterior, es todavía posible que una parte o toda la variabilidad del tiempo de supervivencia sea debida a diferencias de viabilidad de las conidias y, por lo tanto, las conclusiones deberían aceptarse con cautela hasta confirmarse en otras pruebas.

#### B. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei* a cultivos de origen mono-espóricos de *Beauveria bassiana*.

Con base en la mortalidad ocurrida por micosis y mortalidad total, no existe variación del  $TS_{50}$  entre los cultivos de origen mono-espóricos en comparación con los cultivos "madres", a excepción de un cultivo mono-espóricos, derivado de la cepa 15 (15-5), que fue el menos virulento y mostró diferencia al ser comparado con los demás cultivos (mono-espóricos y cepas "madres"). Esto demuestra que la población de las cepas 4, 14 y 15 son bastante homogéneas en la expresión de la virulencia sobre la población de *H. hampei* de Campamento, Olancho (Cuadros 3 y 4).

Posiblemente estos resultados se deban a que todas las cepas fueron recolectadas de brotes de ataque de *B. bassiana* en el campo. Bajo estas condiciones, es de esperar que ha ocurrido cierto grado de selección natural a favor de genotipos del hongo con mayor virulencia y que estos tendrían una heterogeneidad reducida en comparación con la población total del hongo. Dicho de otra manera, habría una tendencia para que los brotes naturales sean causados principalmente por

Cuadro 3. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base en mortalidad por micosis, a 15 cultivos de origen mono-espórico *vrs* cepas originales de *Beauveria bassiana*.

Cepa (No)	TS <sub>50</sub> (días) <sup>1</sup>	L. C. (95%) <sup>2</sup>		
		(Inf.-Sup.)	Pendiente ± EE	χ <sup>2</sup>
4	6.07a	(5.77-6.38)	9.75 ± 1.20	17.86
4-1	5.99a	(5.70-6.29)	10.00 ± 1.21	13.98
4-2	6.13a	(5.82-6.45)	9.47 ± 1.19	12.89
4-3	6.24a	(5.92-6.60)	8.80 ± 1.15	13.25
4-4	6.13a	(5.82-6.45)	9.32 ± 1.18	15.10
4-5	6.09a	(5.83-6.36)	12.26 ± 1.46	11.45
14	6.17a	(5.89-6.45)	11.25 ± 1.38	13.34
14-1	5.97a	(5.70-6.24)	11.45 ± 1.34	14.45
14-2	6.19a	(5.90-6.49)	10.40 ± 1.29	12.85
14-3	6.22a	(5.94-6.52)	10.87 ± 1.34	17.18
14-4	6.05a	(5.77-6.32)	10.83 ± 1.24	10.41
14-5	5.98a	(5.70-6.28)	10.60 ± 1.32	9.31
15	6.23a	(5.89-6.60)	8.28 ± 1.09	16.30
15-1	6.23a	(5.95-6.52)	11.03 ± 1.34	11.37
15-2	6.25a	(5.97-6.50)	10.88 ± 1.33	16.29
15-3	6.36a	(6.04-6.74)	8.89 ± 1.17	11.43
15-4	6.24a	(5.93-6.59)	9.05 ± 1.17	13.72
15-5	7.98 b	(7.17-9.78)	5.04 ± 1.04	10.17

<sup>1</sup> TS<sub>50</sub> con la misma letra no son diferentes con base en el criterio de traslape de los límites de confianza con otras cepas de la misma agrupación

<sup>2</sup> Límites de confianza al 95% de probabilidad

χ<sup>2</sup> = Chi-cuadrada de Pearson

Cuadro 4. Tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei*, con base en mortalidad total, a 15 cepas de origen mono-espóricas *vs* cepas originales de *Beauveria bassiana*.

Cepa (No)	TS <sub>50</sub> (días) <sup>1</sup>	L. C. (95%) <sup>2</sup>		χ <sup>2</sup>
		(Inf.-Sup.)	Pendiente ± EE	
4	5.85a	(5.58-6.12)	11.30 ± 1.31	16.79
4-1	5.46a	(5.22-5.70)	12.62 ± 1.41	22.79
4-2	5.73a	(5.43-6.03)	9.42 ± 1.13	17.96
4-3	5.73a	(5.42-6.04)	8.90 ± 1.10	14.93
4-4	5.78a	(5.49-6.07)	10.02 ± 1.18	19.89
4-5	5.63a	(5.35-5.91)	10.24 ± 1.18	18.62
14	5.81a	(5.53-6.09)	10.48 ± 1.23	14.72
14-1	5.70a	(5.43-5.97)	10.88 ± 1.24	19.53
14-2	5.87a	(5.58-6.14)	10.47 ± 1.23	12.48
14-3	5.79a	(5.41-6.18)	9.93 ± 1.42	26.87
14-4	5.66a	(5.37-5.94)	9.81 ± 1.11	16.91
14-5	5.52a	(5.26-5.79)	11.00 ± 1.29	13.70
15	5.93a	(5.65-6.22)	10.36 ± 1.22	17.05
15-1	5.94a	(5.68-6.20)	12.00 ± 1.37	13.56
15-2	5.99a	(5.71-6.27)	10.85 ± 1.27	20.45
15-3	5.94a	(5.63-6.27)	8.82 ± 1.12	23.67
15-4	5.92a	(5.63-6.24)	9.37 ± 1.15	16.55
15-5	7.23b	(6.69-8.09)	6.18 ± 1.06	12.95

<sup>1</sup> TS<sub>50</sub> con la misma letra no son diferentes con base en el criterio de traslape de los límites de confianza con otras cepas de la misma agrupación

<sup>2</sup> Límites de confianza al 95% de probabilidad

χ<sup>2</sup> = Chi-cuadrada de Pearson

genotipos con mayor virulencia del hongo y que estos dominarían a otros genotipos en una muestra sacada de insectos muertos.

Resultados diferentes a estos fueron encontrados por Samsinakova y Kalalova (1983); estos autores reportan que cultivos de origen mono-espóricos de *B. bassiana* fueron más virulentos que las cepas "madres".

Las pendientes de la línea de probit para los datos de mortalidad por micosis y mortalidad total no evidencian ninguna diferencia significativa entre cepas "madres" (multi-espóricas) y las cepas mono-espóricas. La cepa mono-espórica 15-5 tuvo la pendiente menor en comparación con dos de las otras cepas mono-espóricas derivadas de la cepa 15 (15-2 y 15-3); pero, no hubo ninguna otra diferencia significativa entre cepas mono-espóricas derivadas de la misma cepa madre. Estos resultados apoyan la conclusión anterior de homogeneidad en su virulencia (Figura 3, 4 y 5).

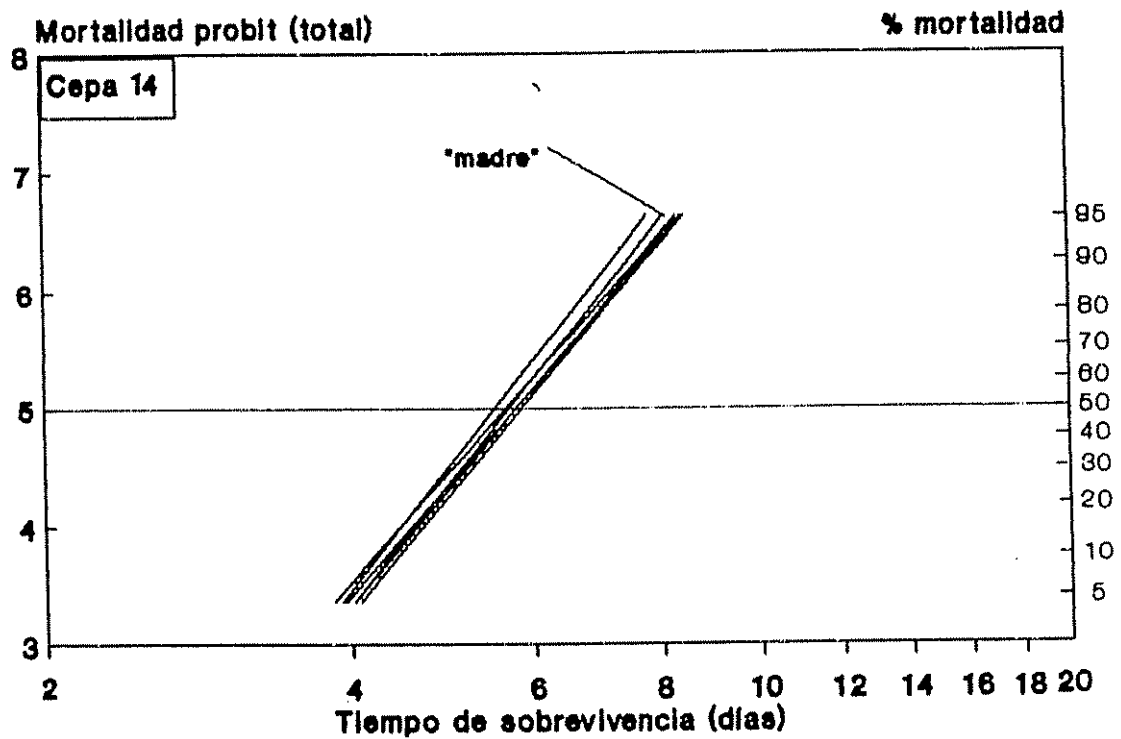
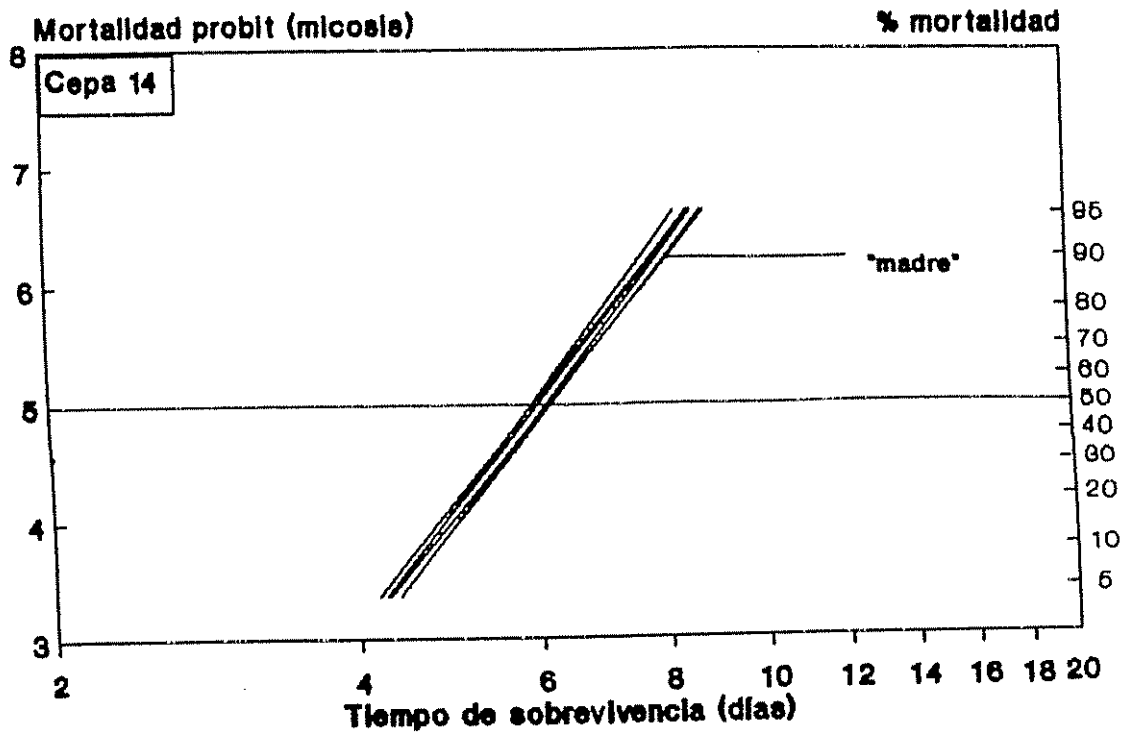


Figura 3: Mortalidad por micosis y total *vs* logaritmo del tiempo de supervivencia de *Hypothenemus haapei* a la cepa 14 de *Beauveria bassiana* *vs* cinco cultivos de origen mono-espóricos.



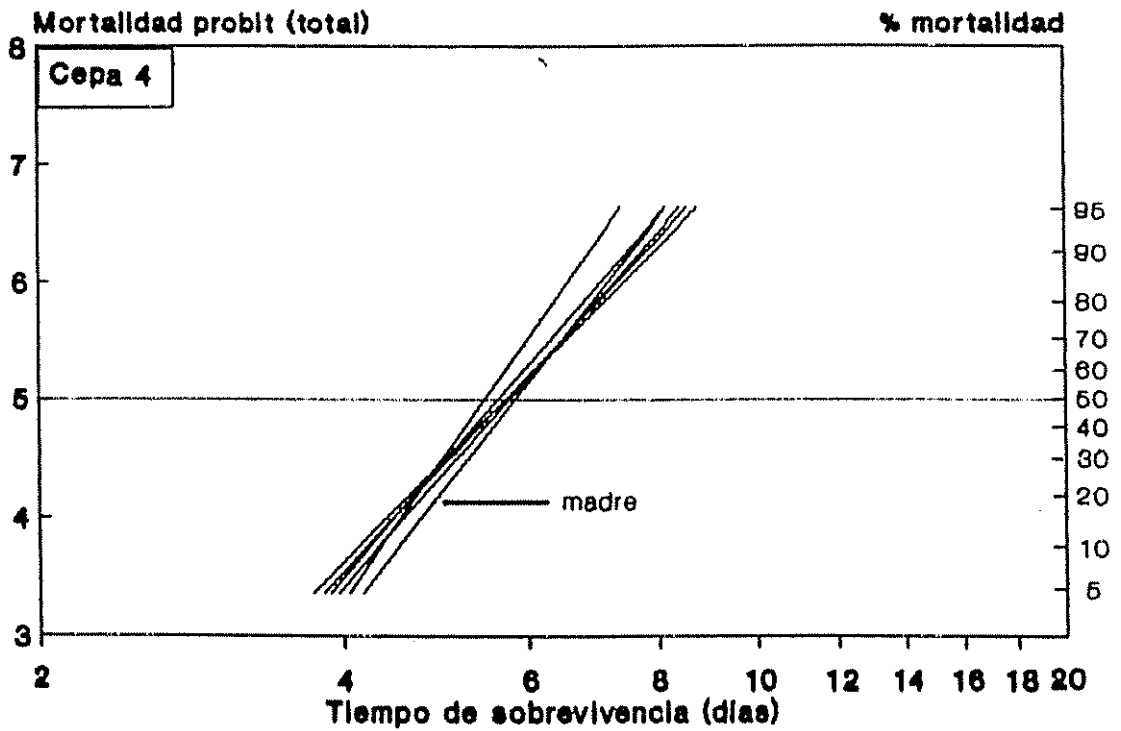
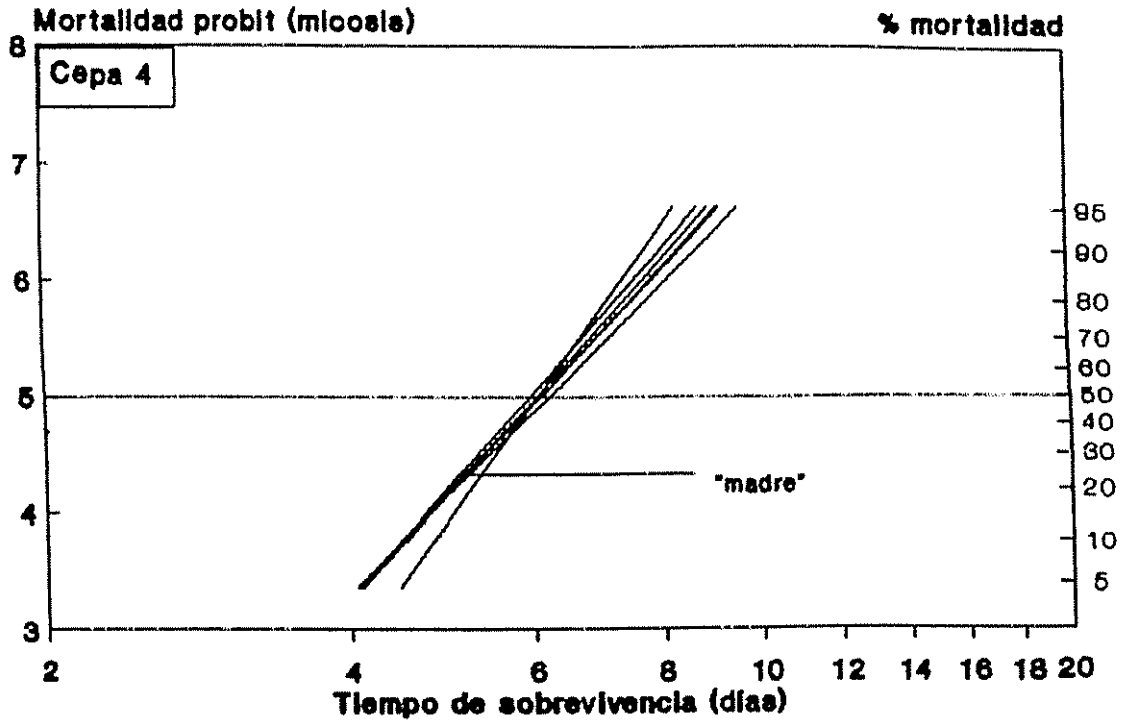


Figura 4: Mortalidad por micosis y total *vrs* logaritmo del tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei* a la cepa 4 de *Beauveria bassiana* *vrs* cinco cultivos de origen mono-espóricos.

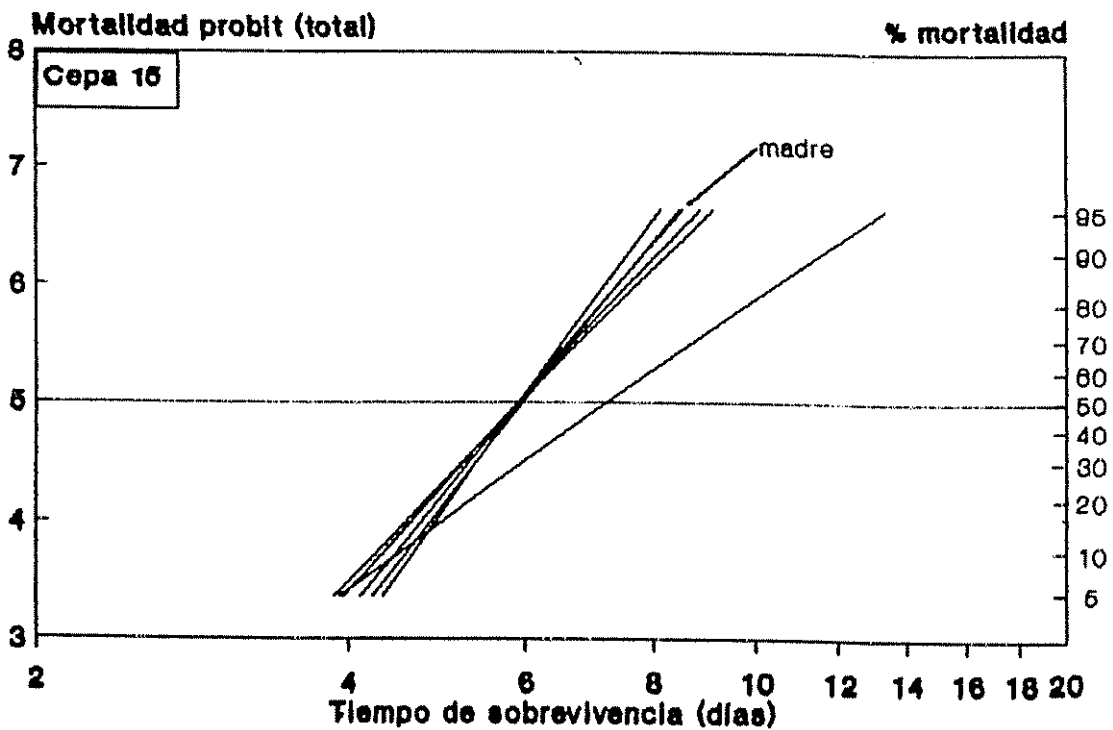
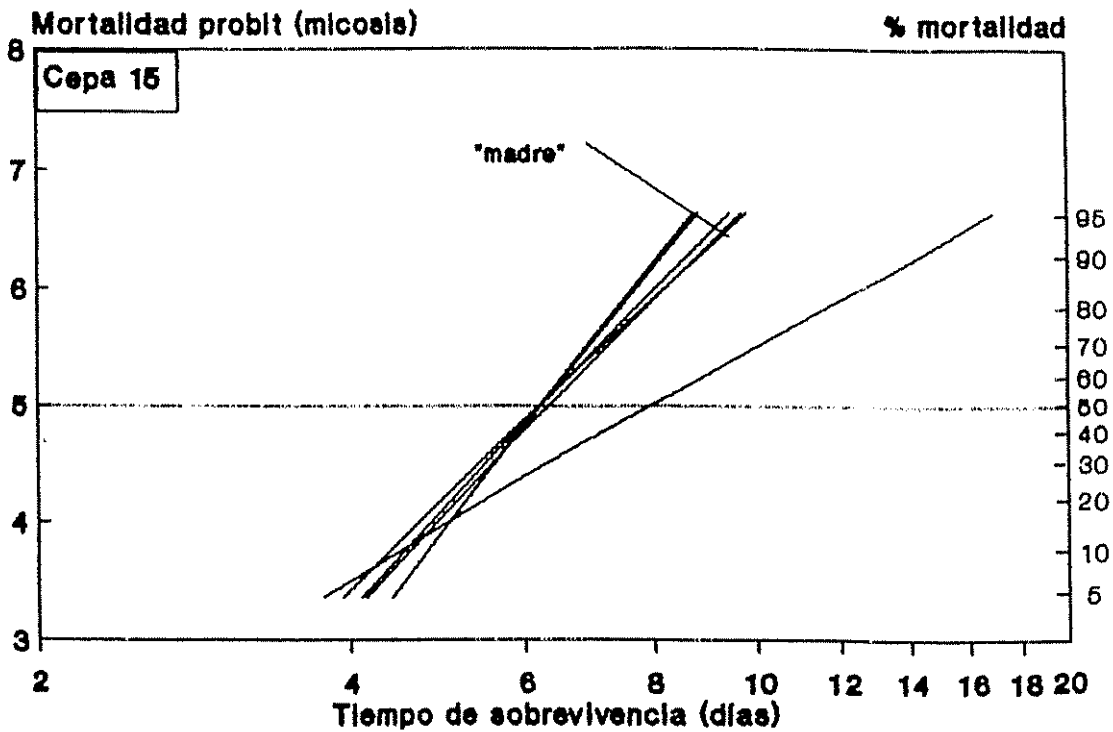


Figura 5: Mortalidad por micosis y total *vrs* logaritmo del tiempo de supervivencia de *Hypothenemus hampei* a la cepa 15 de *Beauveria bassiana* *vrs* cinco cultivos de origen mono-espóricos.

### C. Tolerancia de *Beauveria bassiana* al oxiclóruo de cobre.

Todas las cepas sufrieron una reducción significativa de la tasa de crecimiento micelial y de la esporulación en el medio contaminado con 1500 ppm de oxiclóruo de cobre (Cuadro 5). Sin embargo, las cepas poseieron diferentes grados de tolerancia a la concentración de 1500 ppm i.a. de oxiclóruo de cobre, con base a las variables evaluadas (Cuadros 6 y 7)

Las cuatro cepas que mostraron las mayores tasas de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días), en el tratamiento con oxiclóruo de cobre, fueron, en orden decreciente, la 9, 21, 14 y 10. No encontrando diferencia entre ellas (Cuadro 6).

En cuanto a la esporulación en presencia de oxiclóruo de cobre, existió poca variación en la respuesta entre las cepas. De las 10 cepas, siete presentaron los mejores promedios de esporulación sin existir diferencias estadísticas entre ellas. Las tres cepas que presentaron los menores promedios de esporulación y que según la prueba Duncan son estadísticamente diferentes que las siete cepas antes mencionadas son: la 1, 4 y 9 (Cuadro 7).

Es de hacer notar que las cepas 10 y 14 además de pertenecer al grupo de mayor virulencia se ubicaron en el grupo de cepas que presentaron las mayores tasas de crecimiento micelial y esporulación en presencia de oxiclóruo de cobre. Esta característica les confiere la condición de promisorias para ser incluidas en futuras investigaciones.

Cuadro 5: Resultados parciales de análisis de varianza de la tasa de crecimiento de micelio (diámetro en mm/ 2 días) y esporulación del cultivo ( $\bar{X}$  conidias/ml) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* en dos concentraciones de oxiclóruo de cobre.

F. V.	Tasa de Crec. Mic. gl	Mic. PR>F	Esporulación prom. gl	PR>F
Cepas (A)	9	0.0001	9	0.0001
Con. oxiclóruo de cobre (B)	1	0.0001	1	0.0001
A x B	9	0.0001	9	0.033
CV%	13.41		16.37	

Cuadro 6. Tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* sobre un medio de cultivo con 1500 ppm i.a. de oxiclورو de cobre.

Cepa (No)	Crecimiento (mm/2 días)	Duncan <sup>1</sup>
9	10.052	A
21	9.117	AB
14	8.907	AB
10	8.197	ABC
15	7.617	BC
4	6.937	BC
12	6.712	BC
7	6.262	CD
1	4.215	DE
18	3.687	E

<sup>1</sup> Medias con diferentes letras difieren significativamente al 0.05 según la prueba de Duncan.

Cuadro 7. Esporulación promedio (conidias/ml) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* después de 17 días de ser inoculadas sobre un medio con 1500 ppm i.a. de oxiclورو de cobre.

Cepa (No.)	conidiasx10 <sup>3</sup>	√conidias <sup>1</sup>
21	6175.0	2457.0 A
14	5000.0	2220.7 AB
7	4637.5	2145.2 AB
10	4625.0	2143.9 AB
12	4587.5	2131.1 AB
18	3437.5	1844.1 ABC
15	3237.5	1786.2 ABC
1	3100.0	1755.8 BC
4	2762.5	1652.0 BC
9	1912.5	1319.1 C

<sup>1</sup> Medias con diferentes letras difieren significativamente al 0.05 según la prueba de Duncan.

Parece que no existe relación consistente entre tasa de crecimiento y esporulación de las cepas. Por ejemplo, la cepa 9 que presentó la mayor tasa de crecimiento, tuvo el menor promedio de esporulación. Esta tendencia no es generalizada para todas las cepas, pareciera que esta relación esta

gobernada por factores intrínsecos de cada cepa, por lo que no podemos generalizar (Figura 6 y 7).

Lo observado puede explicarse por el hecho que se ha documentado que no existe relación entre crecimiento y esporulación. Para el caso, Peloso (1989) trabajando con *Cercospora coffeicola* encontró valores de coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), entre esporulación y diámetro de la colonia, próximos a cero e incluso valores negativos. Así mismo, Alves *et al.* 1979 evaluando el efecto del fotoperíodo en el crecimiento y esporulación de *B. bassiana*, encontraron que los tratamientos con medias de crecimiento, máxima y mínima (443.62 y 248.38 mm<sup>2</sup>) presentaron valores de esporulación de 0.53 y 3.97 x 10<sup>6</sup> conidias/ml (los valores mínimos y máximos de esporulación fueron 0.53 y 6.70).

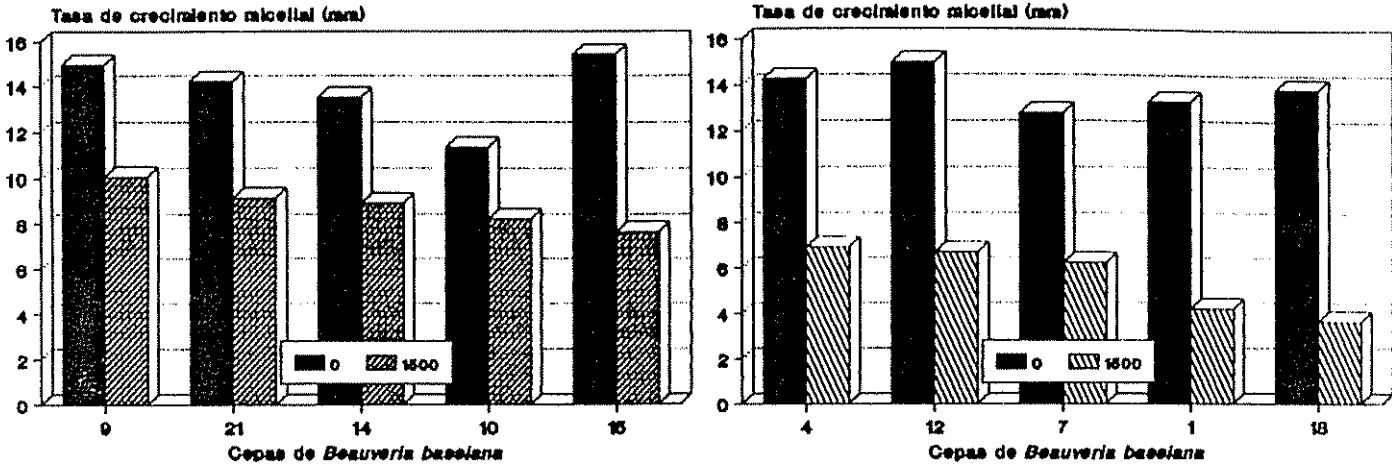


Figura 6: Tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* sobre un medio de cultivo con dos concentraciones de oxiclóruo de cobre (0 y 1500 ppm i.a.).

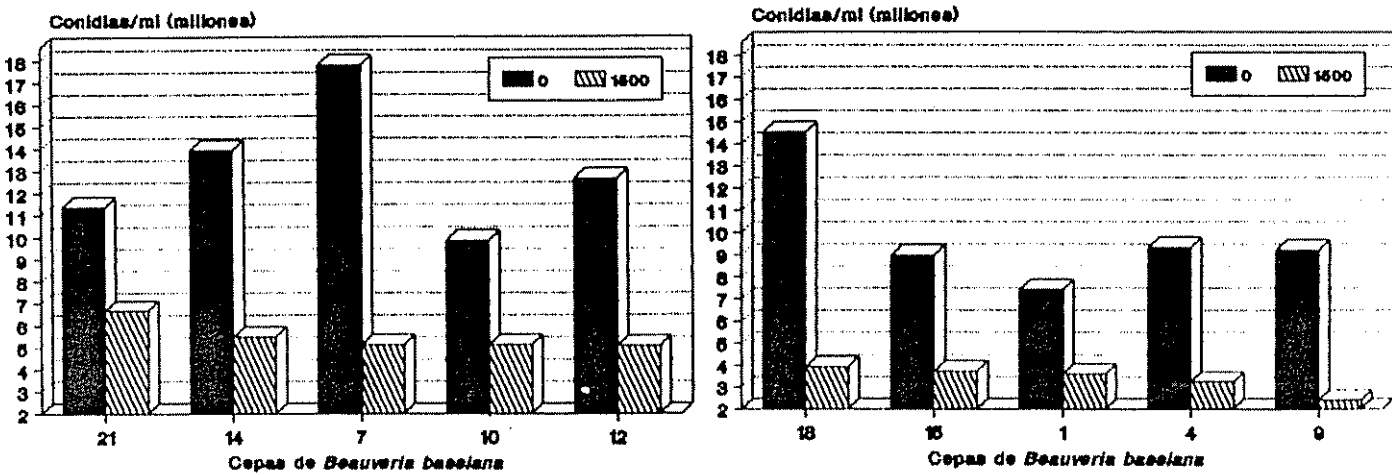


Figura 7: Esporulación promedio (conidias/ml) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* después de 17 días de ser inoculadas sobre un medio de cultivo con dos concentraciones de oxiclóruo de cobre (0 y 1500 ppm i.a.).

## V. CONCLUSIONES.

- 1.- Existen diferencias de virulencia entre cepas de *B. bassiana* aisladas geográficamente, aun dentro de un área pequeña, sobre la población de *H.hampei* de Campamento, Olancho.
- 2.- Las cepas 4, 14, 15 10 son las más virulentas sobre la población de *H. hampei* de Campamento, Olancho.
- 3.- Las cepas 4, 14 y 15 no presentaron genotipos de mayor virulencia, esto no descarta la utilización de cultivos mono-espóricos como técnica para separar genotipos con mayor virulencia.
- 4 Las cepas evaluadas poseen diferentes niveles de tolerancia a 1500 ppm i.a. de oxiclورو de cobre.
- 5.- Las cepas que presentaron las mayores tasas de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) en presencia de 1500 ppm i.a. de oxiclورو de cobre fueron la 21, 9, 10 y 14.
- 6.- Existió poca variación en la esporulación de las cepas en presencia de oxiclورو de cobre. De las 10 cepas evaluadas, siete presentaron los mejores promedios de esporulación sin existir diferencias estadísticas entre ellas. Las tres cepas que presentaron los menores valores de esporulación y que resultaron ser diferentes que las siete antes mencionadas fueron: la 1, 4 y 9.
- 7.- Las cepas 10 y 14 presentaron las mejores características: mejor tasa de crecimiento micelial; mayores promedios de esporulación en oxiclورو de cobre; y mayor virulencia, por lo que deben ser consideradas para futuras evaluación.
- 8.- En las cepas evaluadas no existe relación consistente entre tasa de crecimiento micelial y esporulación.

## VI. RECOMENDACIONES.

- 1.- Las cepas 10 y 14 deberían tener prioridad para ser incluidas en futuras evaluaciones de *Beauveria bassiana* para el control de *Hypothenemus hampei*.
- 2.- Evaluar las otras cepas recolectadas en este estudio.
- 3.- Para futuras evaluaciones, a nivel de laboratorio, tomar en cuenta:
  - a.- Trabajar con una población de *H. hampei* de reconocida homogeneidad genética.
  - b.- Tomar en cuenta la fuente de variación debido a la viabilidad de las conidias; potencial de inóculo y el número de pasadas por medio de cultivo de las cepas en estudio.



## VII. LITERATURA CITADA.

- ALVES, S.B. 1986. Patologia geral. *In*. Controle Microbiano de Insetos. Ed. por Sérgio Batista Alves. Sao Paulo(Brasil), Editora Manole., p. 10-73.
- ALVES, S.B.; MILANEZ, J.L.; KASTEN, P. Jr. 1979 Influencia do fotoperiodo no crescimento e esporulacao do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. An. Soc. Entomol. Brasil, 8(2):203-206.
- ALVES, S.B.; MORAES, S.A. de 1979. Influencia da luz sobre o crescimento e a esporulacao de *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. Ecossistema, (Bra.), 4(1):43-50.
- ALVES, S.B.; SOSA G., D.R. 1983. Virulencia do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubreopilosa* (Forel, 1908). Poliagro (Bra.), 5(1):1-9.
- AYALA, J.L.; MONZON, S. 1977. Ensayo sobre diferentes dosis de *Beauveria bassiana* para el control del picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*) (Germar). Centro Agrícola(Cuba), 2:19-24
- BAKER, P. 1986. Biología, Ecología y Hábitos de la broca. *In* II Curso regional sobre manejo integrado de plagas del cafeto con énfasis en Broca del fruto (*Hypothenemus hampei*, Ferr. (1986, San Pedro Sula, Hond.) [Memoria] Ed, por Norberto E. Urbina, PROMECAFE-IHCAFE. p. 119-147.
- BARBOSA, F.R.; MOREIRA, W.A.; SANTOS, G. 1985. Efeito de sucessivas repicagens em arroz na virulencia de *Metarhizium anisopliae* para *Deois flavopicta*. Pesq. agropec. bras., Brasilia, 20(10): 1115-1118.
- BARSON, G. 1977. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* as a pathogen of the larval stage of the large Elm Bark Beetle, *Scolytus scolytus*. J. Invertebr. Pathol., 29:361-366.

- BARTRA P., C.; URRELO G., R.; RODRIGUEZ S., R. 1982. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei*, Ferr. (Coleóptera: Ipidae), en Tingo Maria-Perú. *Tropicicultura* (Perú) 2(1):17-31.
- CASTRO, M.T. 1990. Manejo integrado de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei*, Ferrari. In. VIII Curso Regional sobre Fundamentos de la Caficultura Moderna. (1990, CATIE, C.R.) [memoria - modulo I]. Turrialba, C.R. IICA/PROMECAFE. s.p.
- CENICAFE (Col.). 1990. Manual de Capacitación en Control Biológico. Trad. del Ingles por Alex E. Bustillo P. y Peter S. Baker. Ed. por Héctor Fabio Ospina. Chinchiná, Col. CENICAFE. p. 147.
- CHAVES, G.M.; OLIVEIRA, D.P.; LOURES, G.Z. 1981. Estudio comparativo da sobrevivencia de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes tipos de solos. *Revista Theobroma*, 11:233-239.
- CORSO, I.C.; MOSCARDI, F. 1981. Teste de fungicidas para o controle da incidencia do fungo *Beauveria bassiana* em *Bombyx mori*, Linnaeus, 1758. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 61(2):137-147.
- DAoust, R.A.; PEREIRA, R.M. 1986. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on Beetle-attracting tubers and Cowpea foliage in Brazil. *Environ. Entomol.*, 15:1237-1243.
- DOKERSKI, J.W. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the Elm Bark Beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 37:195-200.
- FENG, Z.; CARRUTHER, R.I.; ROBERTS, D.W.; ROBSON, D.S. 1985. Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) on the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 46(3):259-264.

- FERNANDES, P.M.; LEUCONA, R.E.; ALVES, S.B. 1985. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera:Scolytidae). Ecosystema. (Bra.), 10:176-181.
- FERRON, P.; ROBERT, P.H. 1975. Virulence of entomopathogenic fungi (fungi imperfecti) for the adults of *Acanthoscelides obtetus* (Coleoptera:Bruchidae). J. Invertebr. Pathol., 25:379-388.
- FRENCH, E.R.; HEBERT, T.T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológicas. San José, Costa Rica, IICA. p. 165.
- FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. DE. 1986. Variabilidade natural para crescimento, conidiacao e sobrevivencia a luz ultravioleta em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorokin. Revista de Agriculture (Bra.), 61(2):137-147.
- GARDNER, W.A.; STOREY, G.K. 1985. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. J. Econ. Entomol., 78:1275-1279.
- HARE, J.D.; ANDREADIS, T.G. 1983. Variation in the susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera:Chrysomelidae) when reared on different host plants to the fungal pathogen, *Beauveria bassiana* in the field and laboratory. Environ. Entomol., 12:1892-1897.
- HERNANDEZ P., M.H.; SANCHEZ DE LEON, A. 1978a. La broca del fruto del café. ANACAFE (Gua.) 174:11.26.
- 1978b. La broca del fruto del café. ANACAFE (Gua.) 175:9-28.
- HURPIN, B. 1968. The influence of temperature and larval stage on certain diseases of *Melolontha melolontha*. J. Invertebr. Pathol. 10:252-262.

- JARONSKI, S.T. 1986. Comercial development of Deuteromycetous fungi of arthropods: a critical appraisal. In Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. (1986, Wageningen, The Netherlands). [Proceedings]. Ed. by Robert A. Samson, Just M. Vlak and Dick Peters. Wageningen, The Netherlands, Society of Invertebrate Pathology. p. 653.
- JIMENEZ G., J.A. 1985. El control microbiológico dentro del manejo integrado de insectos plagas. In Manejo integrado de plagas. (1985, Bogotá, Colombia). [Serie de ponencias, resultados y recomendaciones de eventos técnicos No. 352]. Ed. por Ramón Montoya H. Bogotá, Colombia, ICA. p. 296-317.
- LEUCONA, R.E.; FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; BLEICHER, E. 1986. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera:Scolytidae). An. Soc. Entomol. Brasil., 15(supl):21-27.
- LORIA, R.; GALAINI, S.; ROBERTS, D.W. 1983. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. Environ. Entomol. 12(6):1724-1726.
- MCCOY, C.W.; BEAVERS, G.M.; TARRANT, C.A. 1985. Susceptibility of *Artipus floridanus* to different isolates of *Beauveria bassiana*. Florida Entomologist, 68(3):402-409.
- MONTERROSO, J.L. 1981. Incidencia de *Beauveria bassiana* sobre la broca del Café y su reproducción en coco en Guatemala. ANACAFE(Gua.), 6(210): 10-13.
- MORROW, B.J.; BOUCIAS, D.G.; HEATH, M.A. 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, after serial in vitro passage. J. Econ. Entomol., 82(2):404-407.
- MUÑOZ, R. 1989. Ciclo biológico y reproducción partenogenética de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferr.). Turrialba (C.R.) 39(3):415-421.

- MURAYAMA, M.Y.; ALVES, S.B.; ALMEIDA, L.C. 1981. Effects of serial transfers in a rice medium in the pathogenicity, morphology, and spore production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Entomology Newsletter No. 11,16.  
Tomado de: Review of Applied Entomology (Series A) (G.B.) 70(10):768. 1982.
- NEGREIROS, J.; ALVES, S.B.; FERREIRA, M.J.M.; MENTEN, L.A.S. 1980. Influencia de luzes de diferentes cores na esporulacao de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Ecosistema (Bra.), 5(1):88-91.
- PELUSO, M.C. DEL; FERNANDES, C.D.; FILGUEIRAS, A.I.; CHAVES, G.M. 1989. Esporulacao de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. Fitopatol. bras. 14(1):41-44.
- PENAGOS D., H.; FLORES, J.C. 1974. Hábito y tiempo de penetración de la broca del café al fruto. ANACAFE (Gua.) 137:5-16.
- QUEZADA, J.R. 1985. Factibilidad del uso de enemigos naturales de la broca del café, (*Hypothenemus hampei*). Actividades en Turrialba, CATIE (C.R.) 13(4):1, 5-8.
- ROBERTS, D.W.; WRIGHT, S.P. 1986. Current status on the use of insect pathogens as biocontrol agents in agriculture. Fungi. In Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. (1986, Wageningen, The Netherlands). [Proceedings]. Ed. by Robert A. Samson, Just M. Vlak and Dick Peters. Wageningen, The Netherlands, Society of Invertebrate Pathology. p. 510.
- RODRIGUEZ L., M. 1975. Relación huésped-parasito; Mecanismo de patogenidad de los microorganismos. Ed. por Eva V. Chesneau. s.l. O.E.A., p.11
- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; SHEPARD, B.M.; ROBERTS, D.W. 1986. Entomopathogenic fungi (Deuteromycotina) in the control of the black bug of rice *Scotinophara coarctata* (Memiptera: Pentatomidae). In Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. (1986, Wageningen, The Netherlands). [Proceedings]. Ed. by Robert A. Samson, Just M. Vlak and Dick Peters. Wageningen, The Netherlands, Society of Invertebrate Pathology. p. 241.

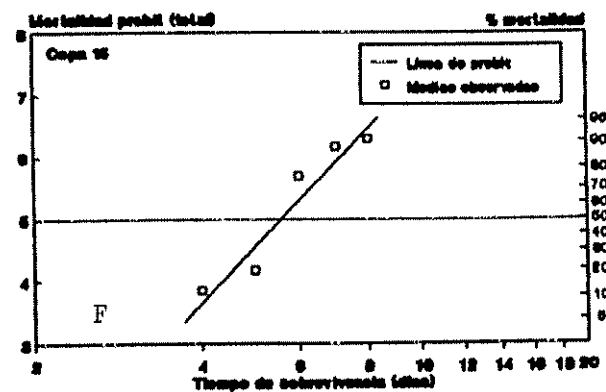
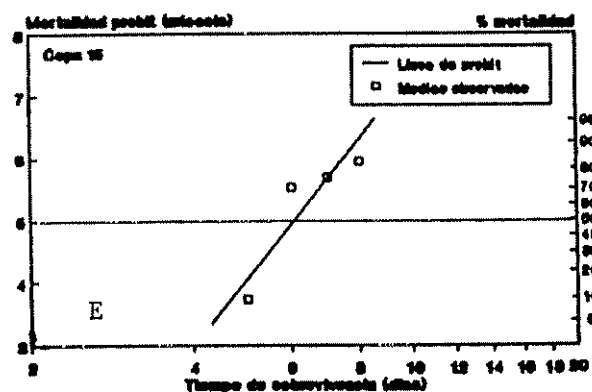
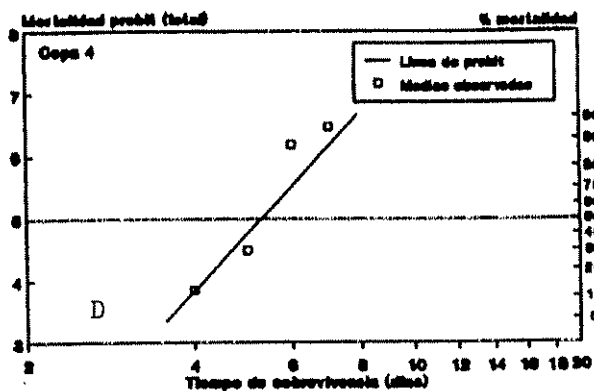
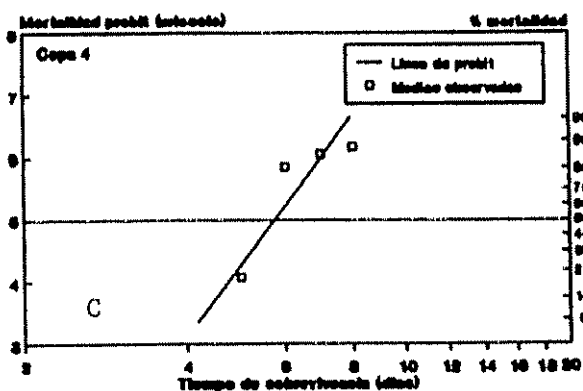
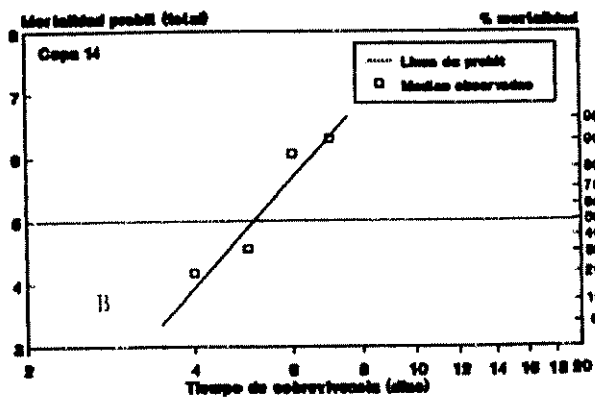
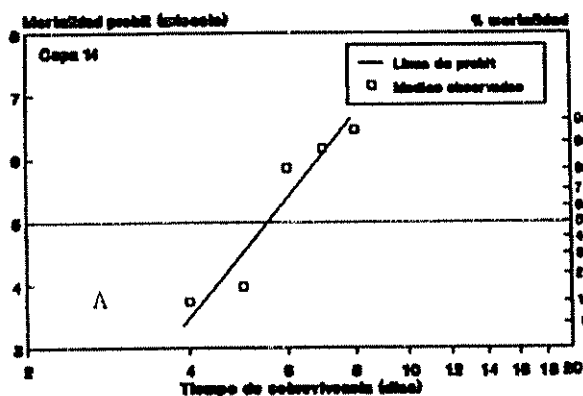
- SAMSINAKOVA, A.; KALALOVA, S. 1983. The influence of a single-spore and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol., 42:156-161.
- SANCHES C., G.; AZEVEDO, J.L. DE. 1986. Influencia da radiacao solar na viabilidade de conidios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Revista de Agricultura (Bra.) 61(2):119-130.
- SILVA, MARCIA E. da; DIEHL-FLEIG, E. 1988. Avaliacao de diferentes linhagens de fungos entomopatogenicos para controle de formica *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). An. Soc. Ento. Brasil, 17(2):263-269.
- STEINHAUS, E.A.; MARTIGNONI, M.E. 1970. An abridged glosary of terms used in invertebrate pathology. 2nd ed. USA, Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service.
- STOREY, G.K.; GARDNER, W.A. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plant growth regulators and spray additives. Applied and Environmental Microbiology, 52(1):1-3.
- TRONCONI, N.M.; AGURCIA, R.D.; MUÑOZ, R.I. 1986. Evaluación de la eficiencia de *Beauveria bassiana* (Balsamo)Vuillemin en el control de la broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*, Ferr. 1867). In II Curso regional sobre manejo integrado de plagas del cafeto con énfasis en Broca del fruto (*Hypothenemus hampei*, Ferr. (1986, San Pedro Sula, Hond.) [Memoria] Ed, por Norberto E. Urbina, PROMECAFE-IHCAFE. p. 167-174.
- URBINA, N.E. 1986. La broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei*, Ferr. (Coleóptera: Scolytidae). In II Curso regional sobre manejo integrado de plagas del cafeto con énfasis en Broca del fruto (*Hypothenemus hampei*, Ferr. (1986, San Pedro Sula, Hond.) [Memoria] Ed, por Norberto E. Urbina, PROMECAFE-IHCAFE. p. 148-166.
- WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). J. Invertebr. Pathol., 16:221-226.

TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N.L.; JOHNSON, M.W. 1987.  
Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to  
insecticides in Hawaii; Intra-island variation and cross-  
resistance. Journal of Economic Entomology. 80(6):1091-  
1099.

**VIII. ANEXOS**



Anexo 1: Mortalidad por micosis y total *vrs* logaritmo del tiempo de supervivencia, línea probit y medias observadas, de *Hypothenemus hampei* a 10 cepas de *Beauveria bassiana*



A: Cepa 14 (micosis)

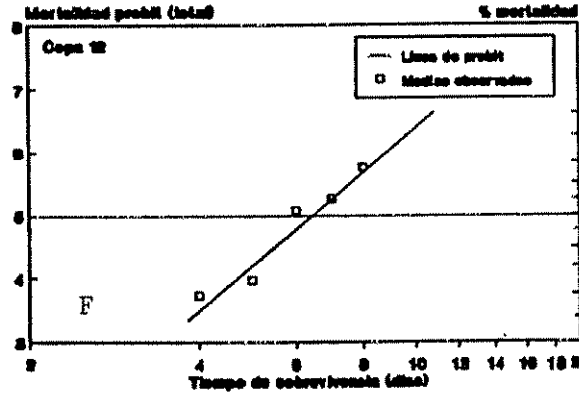
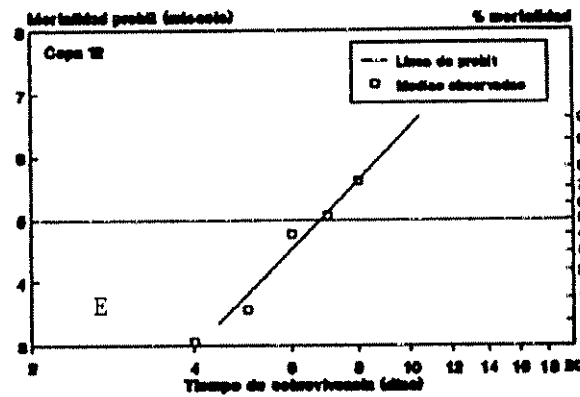
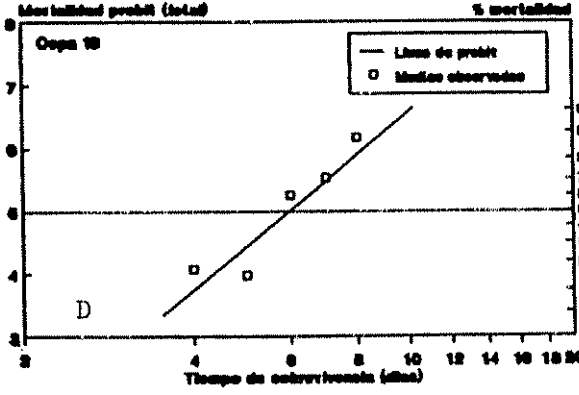
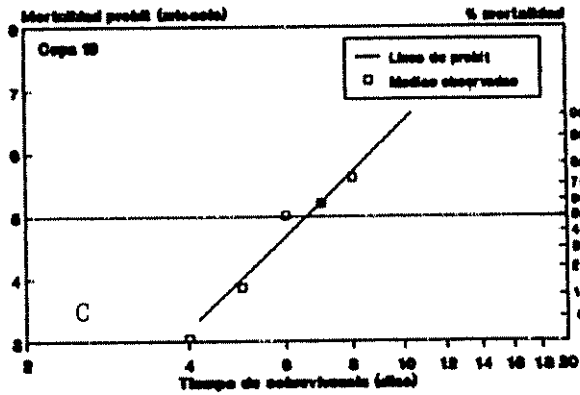
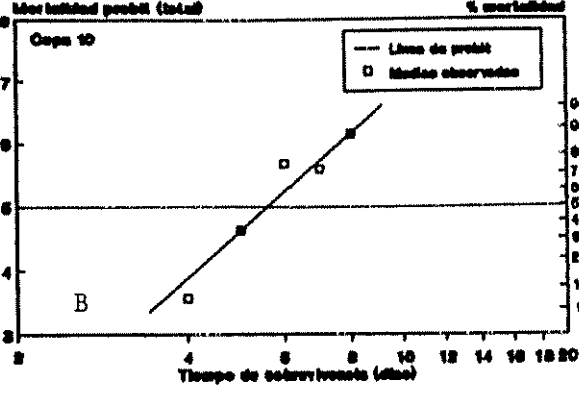
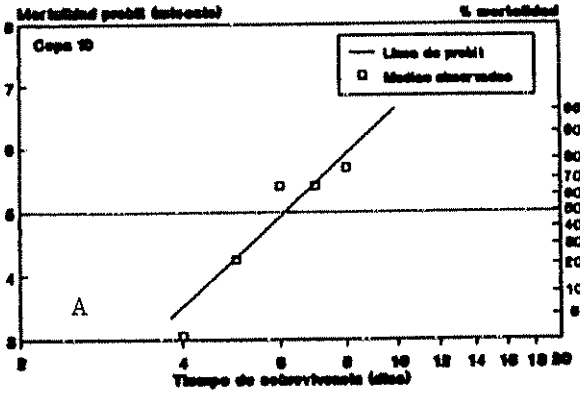
B: Cepa 14 (total)

C : cepa 4 (micosis)

D: Cepa 4 (total)

E: Cepa 15 (micosis)

F: Cepa 15 (total)



A: Cepa 10 (micosis)

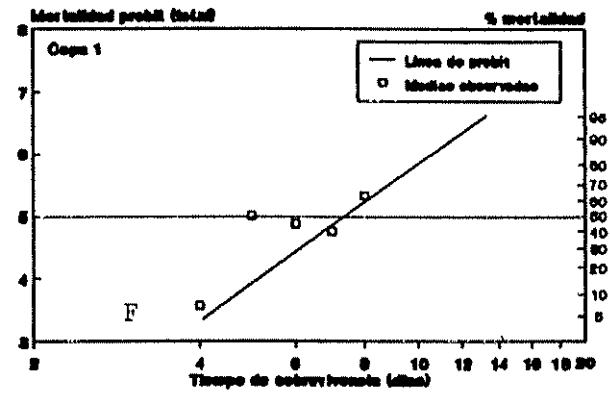
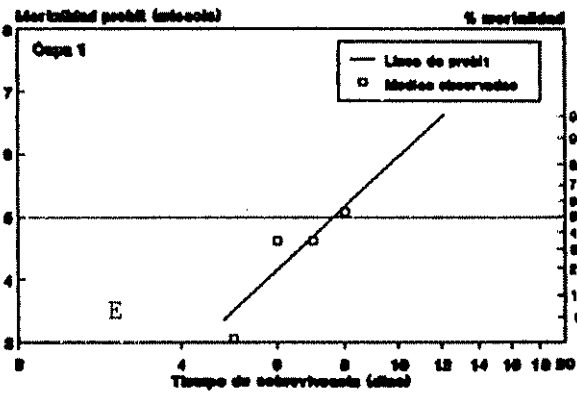
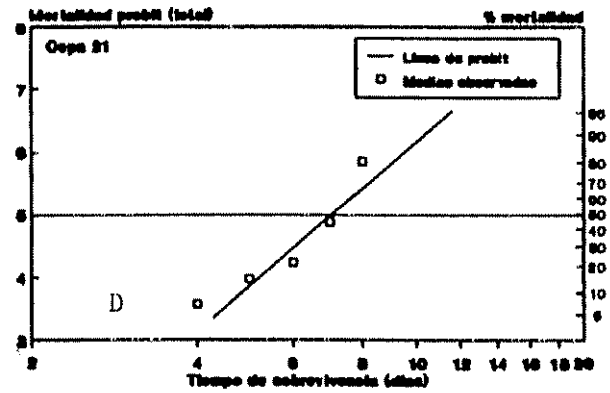
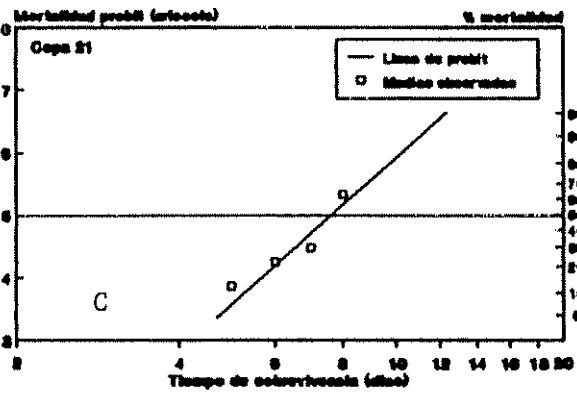
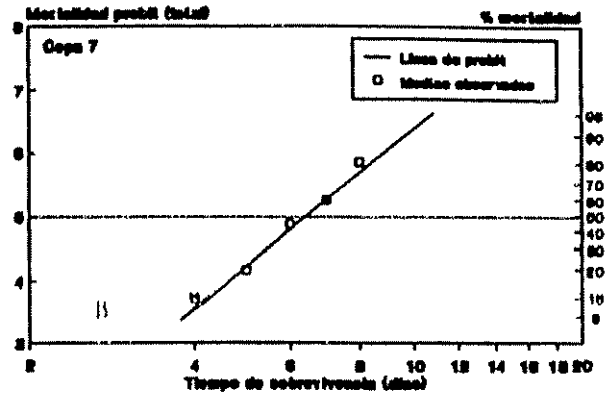
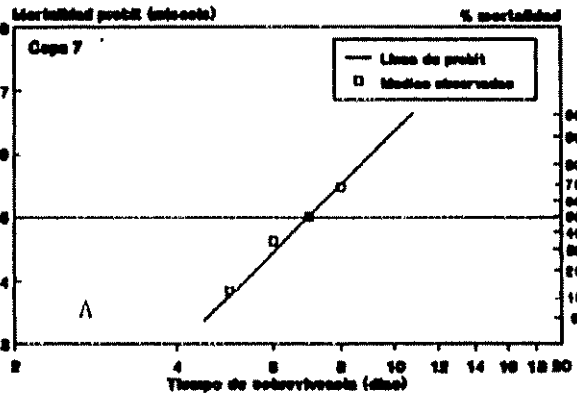
B: Cepa 10 (total)

C: Cepa 18 (micosis)

D: cepa 18 (total)

E: Cepa 12 (micosis)

F : Cepa 12 (total)



A: Cepa 7 (micosis)

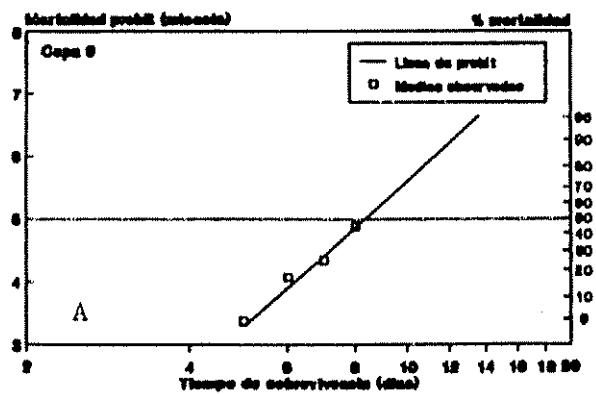
B: Cepa 7 (total)

C: Cepa 21 (micosis)

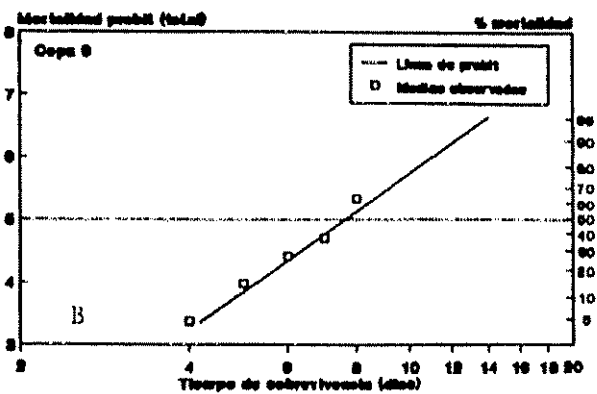
D: Cepa 21 (total)

E: Cepa 1 (micosis)

F: Cepa 1 (total)

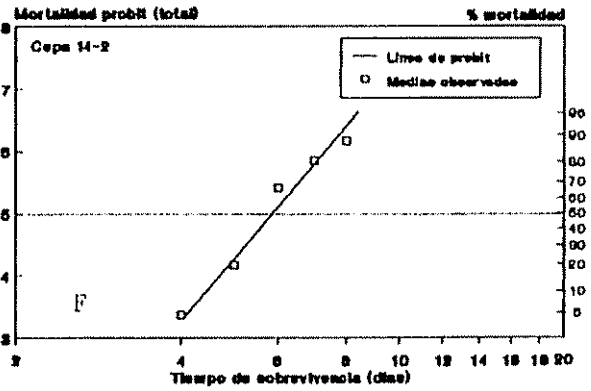
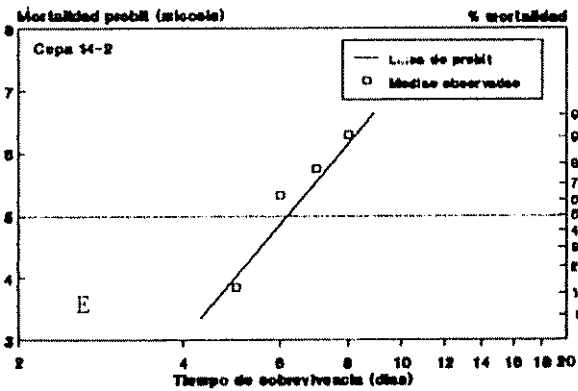
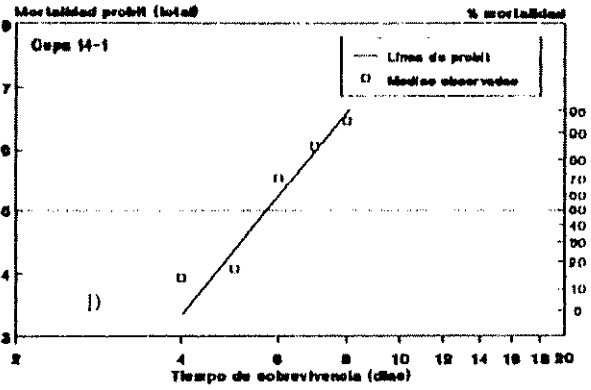
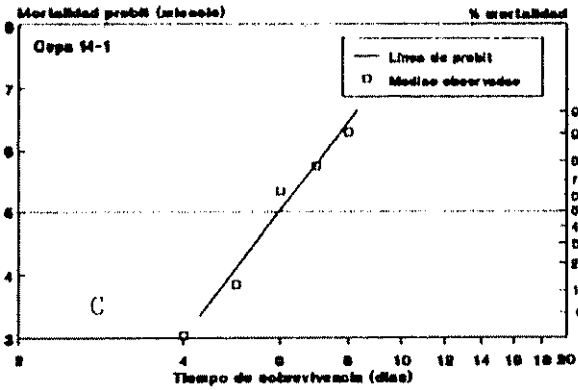
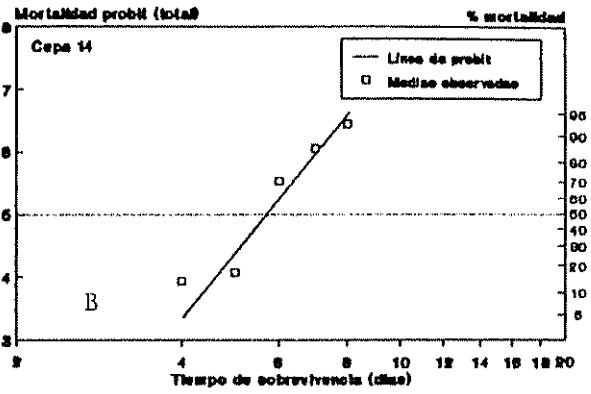
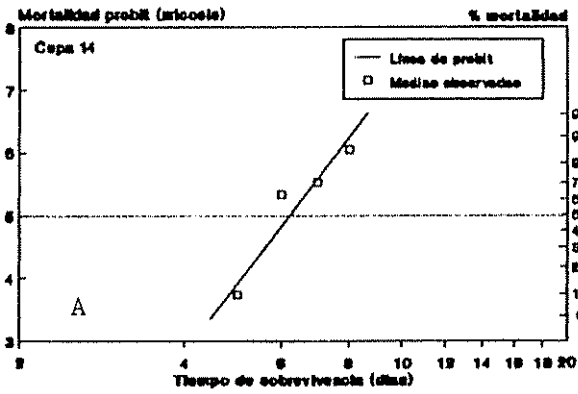


A: Cepa 9 (micosis)



B: Cepa 9 (total)

Anexo 2: Mortalidad por micosis y total *vrs* logaritmo del tiempo de supervivencia, línea de probit y medias observadas, de *Hypothenemus hampei* a las cepas 14, 4 y 15 y sus respectivos cultivos de origen mono-espóricos.



A: Cepa 14 (micosis)

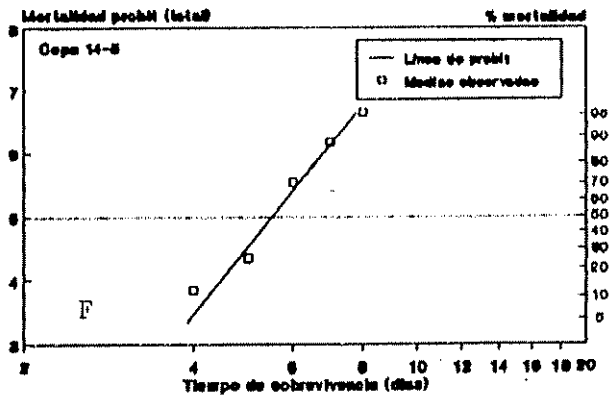
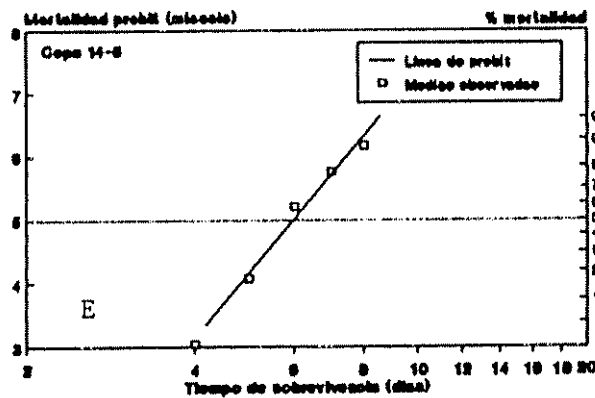
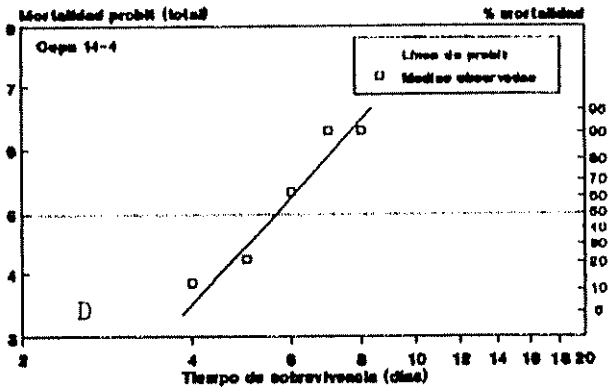
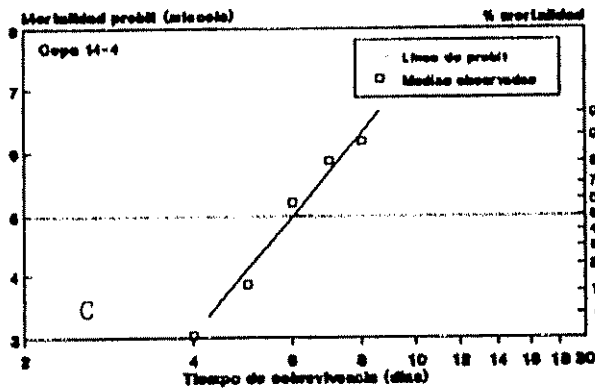
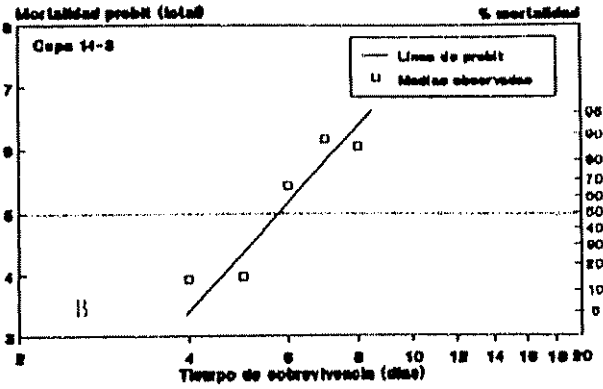
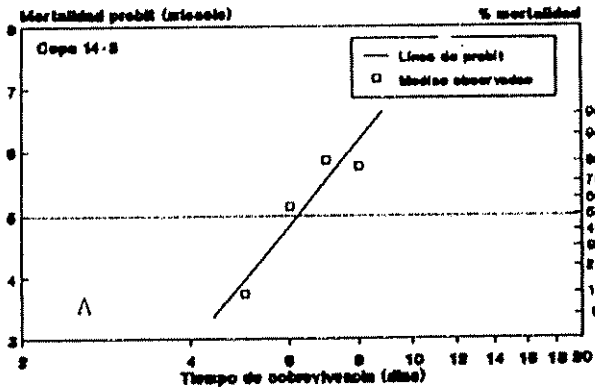
B: Cepa 14 (total)

C: Cepa 14-1 (micosis)

D: Cepa 14-1 (total)

E: Cepa 14-2 (micosis)

F: Cepa 14-2 (total)



A: cepa 14-3 (micosis)

B: Cepa 14-3 (total)

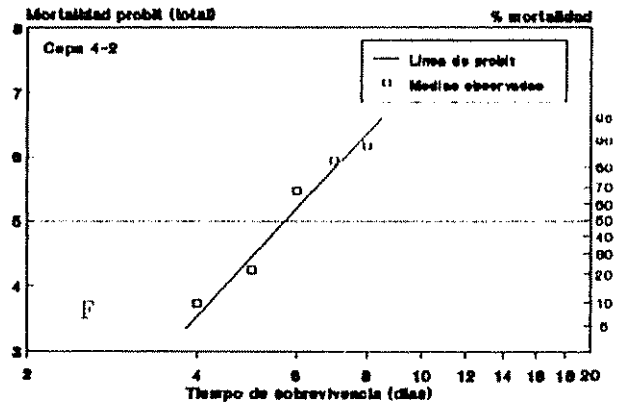
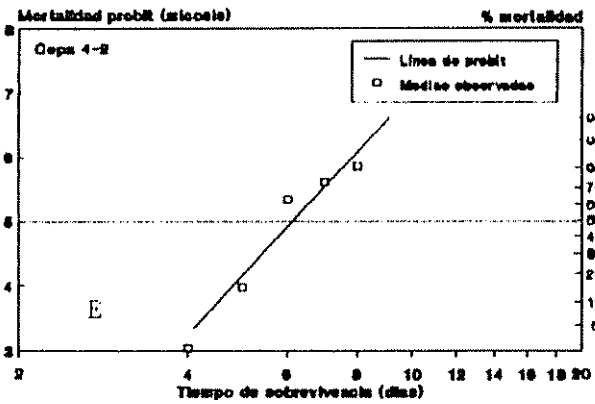
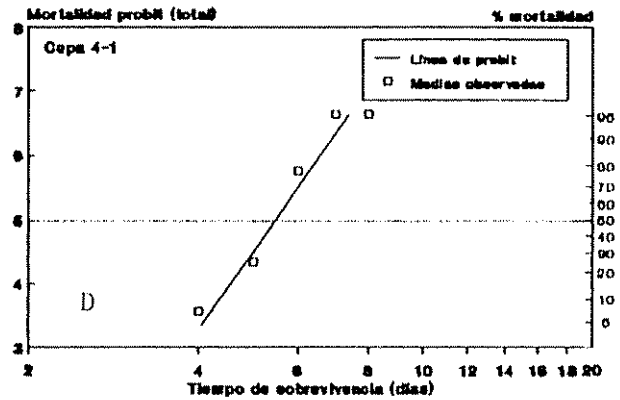
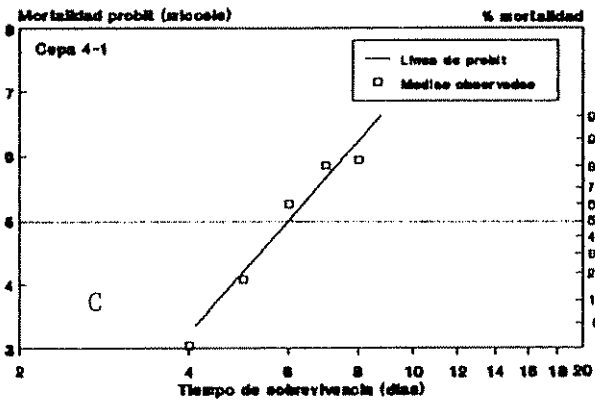
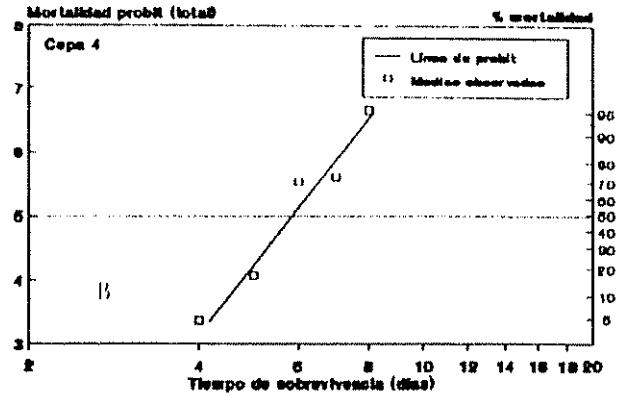
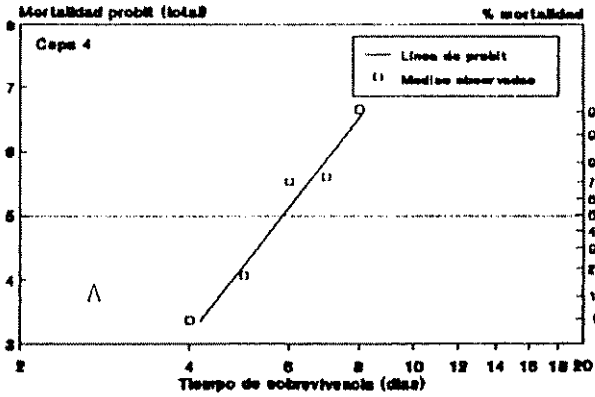
C: Cepa 14-4 (micosis)

D: Cepa 14-4 (total)

E: Cepa 14-5 (micosis)

F: Cepa 14-5 (total)





A: Cepa 4 (micosis)

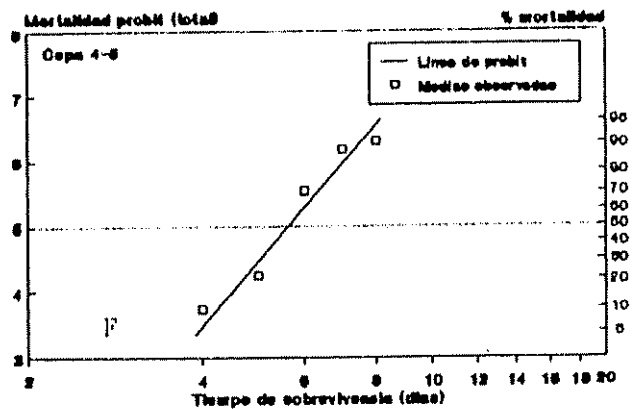
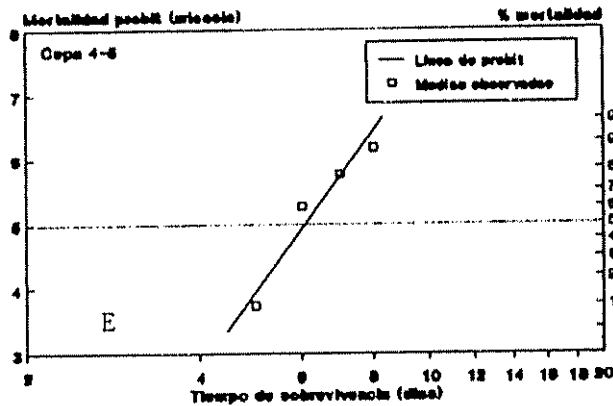
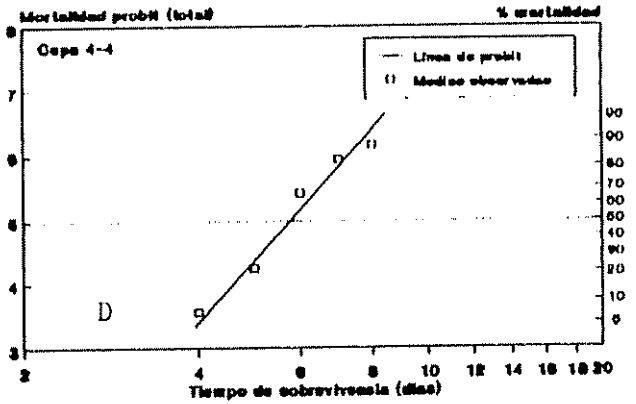
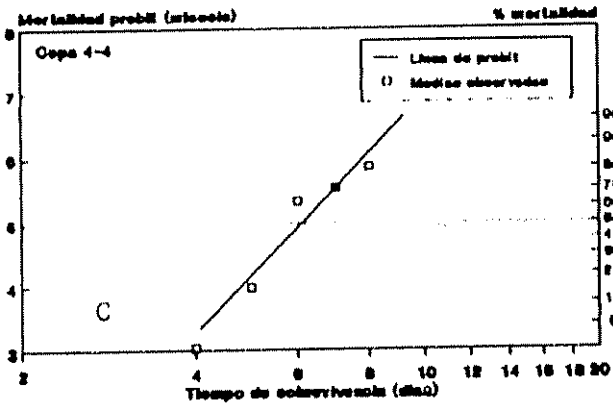
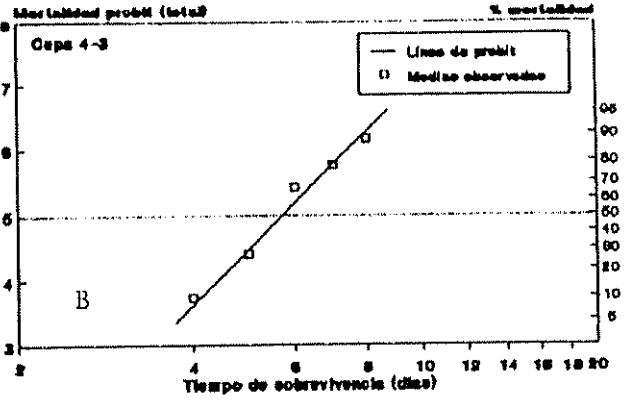
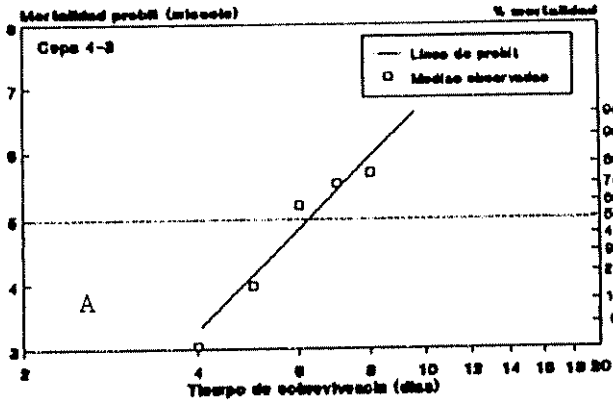
B: Cepa 4 (total)

C: Cepa 4-1 (micosis)

D: Cepa 4-1 (total)

E: Cepa 4-2 (micosis)

F: Cepa 4-2 (total)



A: Cepa 4-3 (micosis)

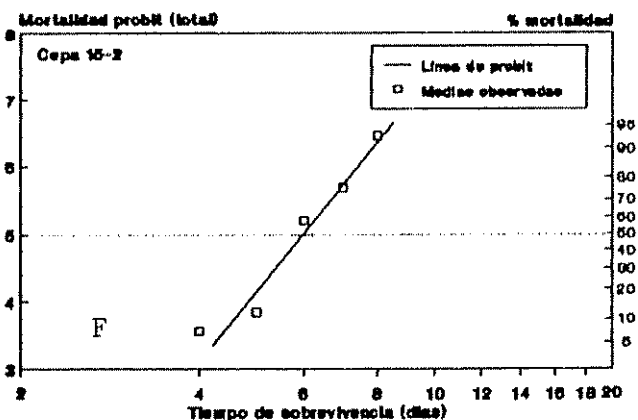
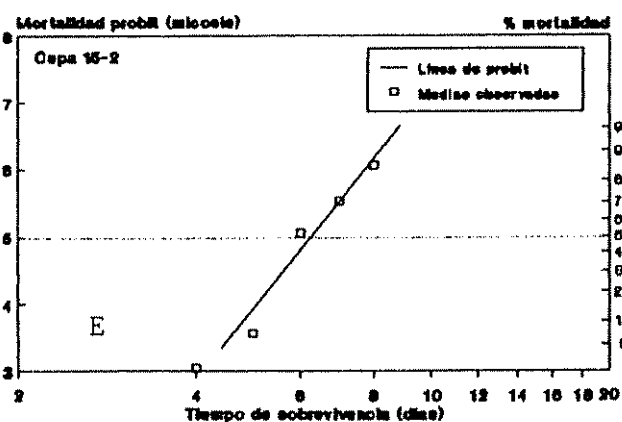
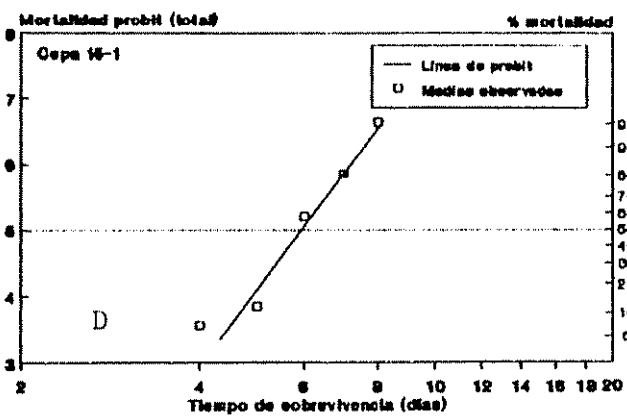
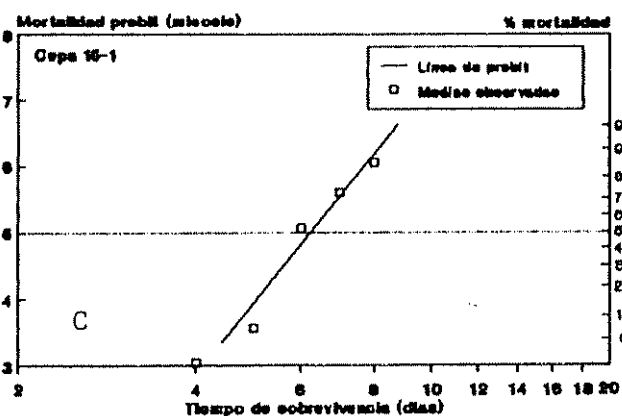
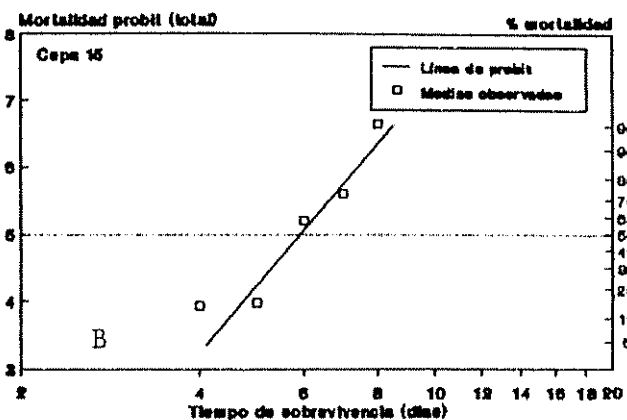
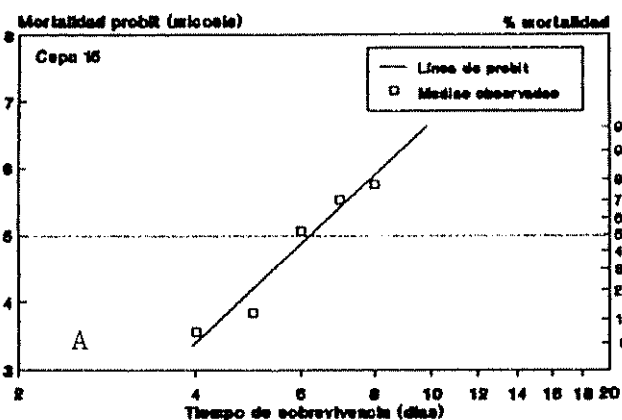
B: Cepa 4-3 (total)

C: Cepa 4-4 (micosis)

D: Cepa 4-4 (total)

E: Cepa 4-5 (micosis)

F: Cepa 4-5 (total)



A: cepa 15 (micosis)

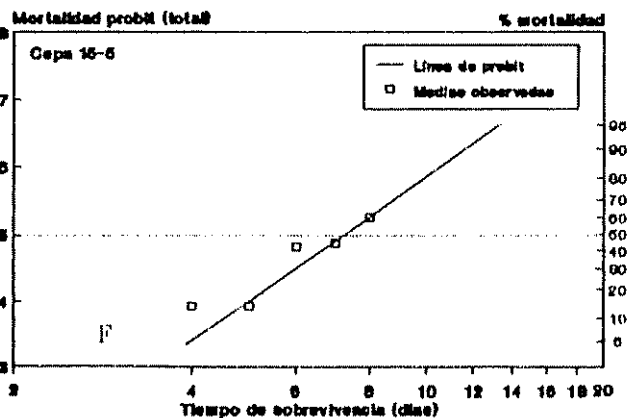
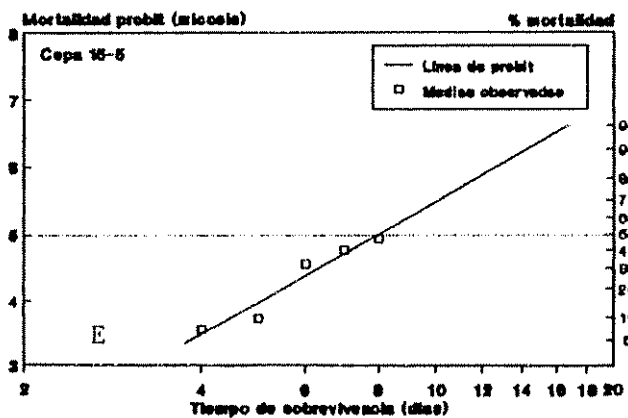
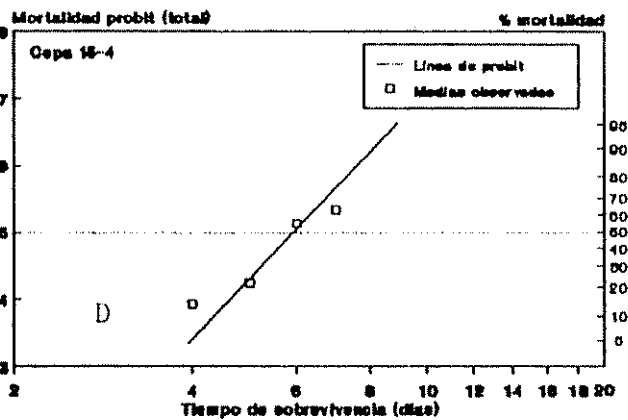
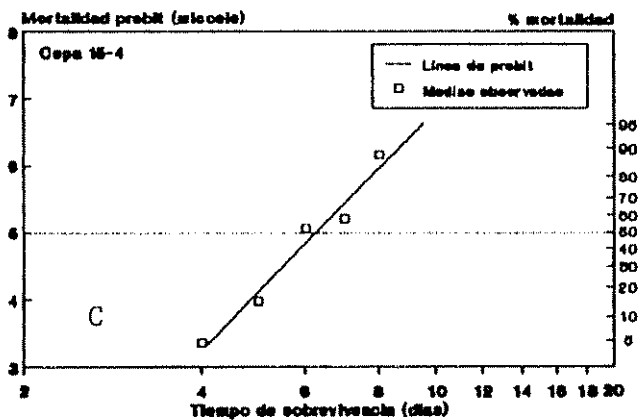
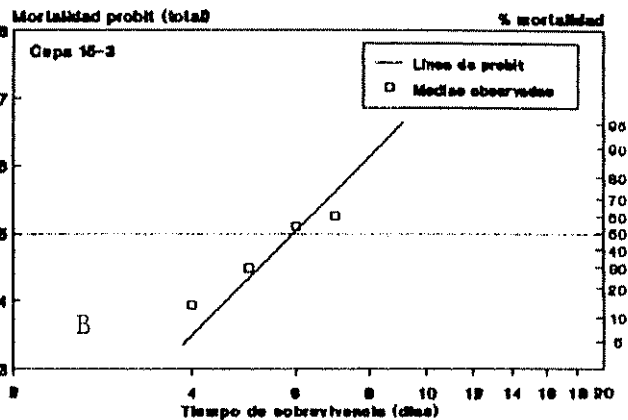
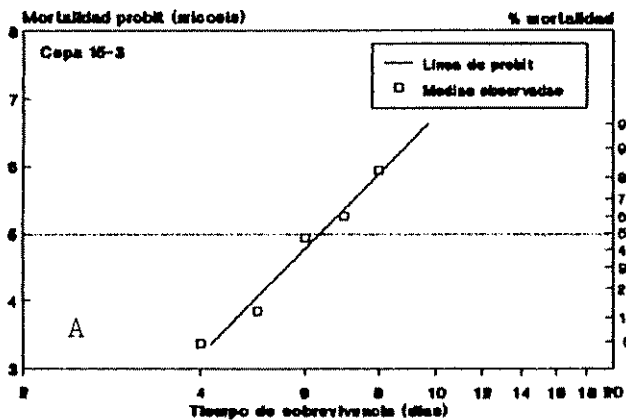
B: Cepa 15 (total)

C: Cepa 15-1 (micosis)

D: Cepa 15-1 (total)

E: Cepa 15-2 (micosis)

F: Cepa 15-2 (total)



A: Cepa 15-3 (micosis)

B: Cepa 15-3 (total)

C: Cepa 15-4 (micosis)

D: Cepa 15-4 (total)

E: Cepa 15-5 (micosis)

F: Cepa 15-5 (total)

Anexo 3: Análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial (diámetro en mm/2 días) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* sobre un medio de cultivo con dos concentraciones de oxícloruro de cobre (0 y 1500 ppm i.a.)

F. V.	gl	SC	F	PR>F
Cepas (A)	9	117.10	6.56	0.0001
Con. oxícloruro de cobre	1	889.38	448.35	0.0001
A x B	9	89.31	5.00	0.0001
Error	60	119.02		
C.V.(%)	13.41			
R <sup>2</sup>	0.90			

Anexo 4: Análisis de varianza de la esporulación promedio ( $\sqrt{\text{conidias/ml}}$ ) de 10 cepas de *Beauveria bassiana* después de 17 días de ser inoculadas sobre un medio de cultivo con dos concentraciones de oxícloruro de cobre (0 y 1500 ppm i.a.)

F. V.	gl	SC	F	PR>F
Cepas (A)	9	9658320.46	5.93	0.0001
Con. oxícloruro de cobre	1	34013379.03	187.98	0.0001
A x B	9	3617136.62	2.22	0.0327
Error	60	10856346.39		
C.V.(%)	16.37			
R <sup>2</sup>	0.81			

Codigos utilizados en el laboratorio de Diagnostico del Area de Fitoprotección en CATIE, Turrialba, Costa Rica, C.A.. Para identificar las 10 cepas utilizadas en el presente ensayo.

Cepa	Procedencia	Cod. Lab. M.I.P
1	- El Tigre, La Fe, Sta. Barbara, Hon.	850 - 853
4	- El Tigre, La Fe, Sta. Barbara, Hon.	862 - 865
7	- Loma Alta, Sn. Jerónimo, Com., Hon.	874 - 877
9	- Nva. Suyapa, Campamento. Olancho, Hon.	882 - 885
10	- Tapachula, Chiapas, México.	886 - 889
12	- La Nava, Guaimaca, Fco. Morazan, Hon.	894 - 897
14	- El Nance, Campamento, Olancho, Hon.	902 - 905
15	- Guatemala (ANACAFE)	906 - 909
21	- bb- Brasil (aislado de broca)	926 - 929

Para solicitud de cepas contactar con:

- 1.- Elkin Bustamante (Ph. D.)  
 CATIE, Turrialba, 7170  
 Proyecto MIP.  
 Costa Rica, C.A.
- 2.- Nestor Macias Tronconi (M. Sc.)  
 Instituto Hondureño del Cafe.  
 Lab. de Fitopatología,  
 San Pedro Sula, Honduras, C.A.

ANEXO 5. Los códigos de accesoión del Laboratorio de Diagnóstico del CATIE para cepas adicionales de *Beauveria bassiana* aisladas de *H. hampei* en Honduras (salvo que se especifica lo contrario) que no fueron evaluadas.

Lugar de origen	m.s.n.m.	Zona de Vida <sup>1</sup>	No de Accesoión
La Fé, Sta Barbara	650-700	bmh-st	854 a 857
Peña Blanca, Sta Barbara	675-725	bmh-st	858 a 861
Boquitas, Ilama, Sta Barbara	-	bmh-st	866 a 869
Las Crucitas, San Jerónimo, Comayagua	1000-1200	bh-st	870 a 873
Tres Pinos, San Jerónimo Comayagua	1000-1200	bh-st	878 a 881
Campamento, Olancho	800-1000	bmh-st	890 a 893
Campamento, Olancho	800-1000	bmh-st	898 a 901
Desconocido	-	-	910 a 913
Desconocido	-	-	914 a 917
Desconocido	-	-	922 a 925
Francia ( <i>Beauveria tenella</i> )			930 a 933
Brasil (huésped: <i>Cosmopolites sordidus</i> )			934 a 937
Brasil (huésped: <i>Atta sexdens</i> )			938 a 941

<sup>1</sup> según Holdridge