

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA.

SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA

PROGRAMA DE POSGRADO

PRODUCCIÓN Y VIRULENCIA DE ALGUNAS CEPAS DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. CONTRA LA BROCA DEL CAFETO *Hypothenemus hampei* (Ferrari).

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

Mirna Barrios A.

CATIE

Turrialba, Costa Rica.

1992

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 aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

T. Zoebisch

Tomás Zoebisch, Ph.D.
Profesor Consejero

Assefaw Tewolde, Ph. D.
Jefe, Arca de Posgrado

Ramón Lastra Rodríguez, Ph. d.
Director, Programa de Enseñanza

M. Barrios

Mirna Barrios Aguirre
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres: Zoila Aguirre e Isaias Barrios por todo su amor, comprensión y confianza.

A mis amigos y hermanos: Isaias, Yovania, Dinora, Otoniel, Heydi, Verónica y Daniel por su cariño y solidaridad en todo momento.

A mis amigos: porque siempre han estado conmigo.

A mi pueblito Urbayte en la Isla de Ometepe, Rivas, Nicaragua.

AGRADECIMIENTOS

La ejecución de este trabajo requirió de la ayuda de mucha gente, con pequeños y grandes detalles para todos muchas gracias.

A los miembros de mi comité asesor: Dr. Tomás Zoebisch, Dr. Falguni Guharay, M. Sc. Phillip Shannon y Dr. Elkin Bustamante por el apoyo brindado para la finalización del presente trabajo.

Mi especial agradecimiento para el Dr. Falguni Guharay quien en todo momento fue solidario conmigo, por sus consejos y por el valioso tiempo dedicado. Muchas gracias Falguni.

A Phill Shannon por sus comentarios, por la revisión del documento final y por el tiempo que siempre me dedicó.

Al personal del Proyecto Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Protección Vegetal (Julio César, Israel, Mario y Cora María) por todas las facilidades brindadas en la fase experimental de este trabajo.

Al personal del Proyecto Plagas de Café del Centro Nacional de Protección Vegetal (Federico, Benito, "Chepito", Fernando y "Don" Mario) por su colaboración en las giras de campo.

A Isabel Rivas por su apoyo incondicional. Al personal del Proyecto MIP/CATIE de Nicaragua por todas las facilidades y apoyo brindado.

Al gobierno Noruego, por el financiamiento de mis estudios y particularmente al personal de su representación en Nicaragua, quienes mostraron particular interés en la gestión administrativa para la finalización de los estudios de sus becarios.

A mis amigos y compañeros de Promoción: Elida, Arnulfo, Georgina, Jorge, Pedro, Denis, Rafael y Schuichi por su solidaridad y compañerismo en todos los momentos de nuestros dos años de estudio.

A DIOS por que me permitió concluir una etapa más de mi vida.

INDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
A. Broca del cafeto.....	4
1 Distribución geográfica.....	4
2 Clasificación taxonómica.....	5
3 Descripción y ciclo de vida.....	5
4 Ecología.....	6
5 Comportamiento de los adultos.....	7
6 Daño al cultivo.....	8
B. Manejo integado de la broca del cafeto.....	8
1 Control cultural.....	9
2 Control mecánico.....	9
3 Control químico.....	10
4 Control biológico.....	10
C. Control microbiano de insectos con énfasis en <i>B. bassiana</i>	12
1 Sistemática y caracterización de <i>B. bassiana</i>	13
1.1 Ciclo de vida y biología.....	14
2 Mecanismos de infección.....	15
3 Patogenicidad de <i>B. bassiana</i>	16
4 Producción de hongos entomopatógenos.....	17
5 Virulencia de <i>B. bassiana</i>	18
6 Relación broca del cafeto- <i>B. bassiana</i>	20
III. MATERIALES Y METODOS.....	23
A. Introducción.....	23
B. Cría de broca.....	23
C. Estandarización del manejo de las cepas de <i>B.</i> <i>bassiana</i> del cafeto.....	24
1.1 Características y selección de las cepas de <i>B. bassiana</i> utilizadas en el estudio.....	24
1.2 Infección y reaislamiento de las cepas en la broca del cafeto.....	26
D. Producción de las cepas de <i>B. bassiana</i> en arroz entero.....	27
1.1 Preparación del inóculo de <i>B. bassiana</i>	27
1.2 Preparación e inoculación del arroz con <i>B. bassiana</i>	28
1.3 Recolección de las conidias producidas.....	27
1.4 Viabilidad de las conidias producidas.....	30
E. Virulencia de las cepas de <i>B. bassiana</i> contra la broca del cafeto.....	31

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
A. Producción de <i>B. bassiana</i> en arroz entero.....	33
1.1 Viabilidad de las conidias.....	37
B. Virulencia de <i>B. bassiana</i> contra la broca del cafeto..	37
V. CONCLUSIONES.....	46
VI. RECOMENDACIONES.....	47
VII. LITERATURA CITADA.....	48
VIII. ANEXOS.....	59

Barrios, M. 1992. Producción y virulencia de algunas cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. contra la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Thesis Mg. Sc. CATIE, Turrialba, C.R.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, Cepas, Producción, Virulencia, Broca del Cafeto *Hypothenemus hampei*.

RESUMEN

El presente estudio se realizó para conocer las características productivas de seis cepas de *Beauveria bassiana* cultivadas en arroz y para determinar la virulencia de dichas cepas, estimada por su Tiempo Letal medio (TL₅₀) contra la broca del cafeto *Hypothenemus hampei*

La producción de las cepas de *B. bassiana* se realizó en erlenmeyers conteniendo 50 g de arroz, usando para su inoculación aproximadamente 4×10^4 con/g. El sustrato inoculado, se incubó por diversos periodos de tiempo, observándose variaciones en la producción de conidias/g de arroz entre las diversas cepas. Se determinó que la producción y viabilidad de las conidias de *B. bassiana* fue influenciada por las cepas utilizadas. Las cepas denominadas IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 y BRAS 447 (de Honduras, Guatemala, Nicaragua y Brasil) registraron mayor producción de conidias en relación a las otras cepas evaluadas. Las diferencias en la viabilidad de las conidias no fue mayor a 7.7% y probablemente no será de importancia práctica en el proceso de selección.

La virulencia de las diferentes cepas de *B. bassiana* sobre la broca del cafeto fue evaluada utilizando dos concentraciones: 1×10^8 (concentración baja) y 1×10^9 (concentración alta) conidias viables/ml. La inoculación de los insectos se hizo por inmersión. Se detectaron diferencias en tiempo letal medio (TL₅₀) entre las cepas dentro de una misma concentración. La cepa BRAS 447 registró el TL₅₀ más bajo en la concentración de 1×10^9 con/ml, mientras, en la concentración de 1×10^8 el TL₅₀ más bajo correspondió a la cepa IIBC 035. La mortalidad de la broca del cafeto, fue mayor al utilizar la concentración alta respecto a la concentración baja.

Como resultado de este estudio, puede considerarse a las cepas IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 y BRAS 447 con mejores perspectivas de uso contra la broca del cafeto con relación a las otras cepas evaluadas, de acuerdo a las características de producción y virulencia registradas.

Barrios, M. 1992. Production and virulence of some strains of the entomopathogen fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Thesis Mg. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Key words: *Beauveria bassiana*, Strains, Production, Virulence, Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*.

SUMMARY

The main objectives of this study were to determine the characteristics of six *Beauveria bassiana* strains grown in rice, and also to evaluate their virulence, as estimated by median lethal time (LT₅₀) against the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*.

Beauveria bassiana were produced in erlenmeyer flasks containing 50 g of rice, inoculated with 4×10^4 conidia/g rice. The inoculated material was incubated for different periods of time. Production (in conidia/g rice) and conidial viability % were different for the different strains. The strains denominated IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 and BRAS 447 (from Honduras, Guatemala, Nicaragua and Brazil respectively) had the highest levels of conidia production. The maximum difference in conidial viability was 7.7% and is probably of little practical importance.

The virulence of the strains against the coffee berry borer was evaluated at two concentrations: 1×10^6 (low concentration) and 1×10^8 (high concentration) of conidia/ml. Inoculation was by immersion in a water suspension of conidia + 0.01% Tween-80. Differences in LT₅₀ were recorded between the strains for the same concentration. Strains BRAS 447 and IIBC 035 had the lowest LT₅₀ values respectively at the low and high concentrations. For all strains mortality was higher at 1×10^8 than 1×10^6 conidia/ml.

It was concluded that, on the basis of virulence and good conidial production characteristics, any of IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 or BRAS 447 have potential for development as control agents of coffee berry borer.

INDICE DE CUADROS.

Cuadro	Página
1. Código, origen y hospedante de donde fueron obtenidas las cepas de <i>B. bassiana</i> utilizadas en el estudio.....	25
2. Prueba preliminar de germinación de 6 cepas de <i>B. bassiana</i> con diversos periodos de incubación.....	31
3. Producción promedio de 6 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> cultivadas en arroz con diferentes periodos de incubación (PDI).....	36
4. Análisis de varianza, producción promedio y viabilidad de 6 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> cultivadas en arroz.....	38
5. Análisis de varianza para la mortalidad de la broca del cafeto causada por seis cepas de <i>Beauveria bassiana</i> usando 2 concentraciones (1×10^8 y 1×10^9 con/ml).....	39
6. Tiempos letales promedios (TL ₅₀) de la broca del cafeto causada por 6 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> con dos concentraciones (1×10^8 y 1×10^9 con/ml).....	41
7. Análisis de varianza para la esporulación de la broca del cafeto causada por seis cepas de <i>Beauveria bassiana</i> usando 2 concentraciones (1×10^8 y 1×10^9 con/ml).....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Producción promedio de 6 cepas de <i>Beauveria bassiana</i> cultivada en arroz con diversos periodos de incubación.....	34
2. Mortalidad corregida de la broca del cafeto expresada en probit y porcentaje contra el logaritmo del tiempo de mortalidad de la broca del cafeto causado por seis cepas de <i>Beauveria bassiana</i> usando 1×10^8 con/ml.....	40
3. Mortalidad corregida de la broca del cafeto expresada en probit y porcentaje contra el logaritmo del tiempo de mortalidad de la broca del cafeto causado por seis cepas de <i>Beauveria bassiana</i> usando 1×10^8 con/ml.....	40
4. Porcentaje de esporulación de seis cepas de <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de broca del cafeto muertos al usar 1×10^8 con/ml.....	44
5. Porcentaje de esporulación de seis cepas de <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de broca del cafeto muertos al usar 1×10^8 con/ml.....	44

I INTRODUCCION

El café *Coffea arabica* (L.), es el principal producto de exportación de Nicaragua, representando en el ciclo 88-89 aproximadamente 47% (95.4 millones de U.S. \$) de las exportaciones agrícolas. En Nicaragua, el área sembrada hasta el ciclo agrícola 89-90 fue de 69,413 ha con una producción en quintales oro de 981,921 (Ministerio de Agricultura y Ganadería 1990).

Aunque el café se siembra en todas las regiones del país, la que tiene mayor área sembrada es la VI Región seguida por la I y IV Región que en total representan 86% (59,785 ha) del área total cultivada a nivel nacional (Ministerio de Agricultura y Ganadería 1990).

Las principales plagas que limitaban la producción cafetalera mencionadas hasta 1987 para Nicaragua incluían: enfermedades (roya, mancha de hierro, ojo de gallo y antracnosis), malezas, nematodos, insectos de suelo y del follaje. A este conjunto de limitantes se añade en 1988 la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) (Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria 1989).

Inicialmente, la broca del cafeto fue detectada en la zona norte del país (Regiones I y VI) en 1988, posteriormente en 1990 fue detectada en la zona sur del país (Región IV) por lo que actualmente, las principales regiones cafetaleras del país se encuentran afectadas por esta plaga.

A partir de su detección la broca del cafeto se convirtió en la plaga insectil más importante para las regiones I y VI, mientras que en la IV Región forma parte del complejo de plagas insectiles (minador de la hoja-cochinilla aérea-broca)

por lo que se requieren acciones de manejo que minimicen su impacto sobre la producción cafetalera nacional.

Hypothenemus hampei es considerada la principal plaga del café a nivel mundial (LePelley 1964). La hembra perfora el fruto generalmente por la corona (extremo opuesto a la base de la cereza) penetrando hasta el endospermo, donde empieza a depositar sus huevos. Si la perforación se inicia cuando los frutos están muy pequeños, el principal daño consiste en la caída del fruto.

El mayor daño ocurre cuando el fruto tiene más de 20% de peso seco, debido a que es un sustrato adecuado para la oviposición y alimentación de los adultos y el desarrollo de los estados inmaduros, lo cual afecta el peso y calidad del grano.

Tradicionalmente el control de la broca del café se ha hecho mediante prácticas culturales e insecticidas químicos, siendo el insecticida mundialmente recomendado el Endosulfan (Castro 1990). También se han utilizado parasitoides pertenecientes a la familia Bethyridae, *Prorops nasuta* (Waterson) conocida como "avispa de Uganda" y *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem). También existen hongos que atacan a *H. hampei* especialmente en época lluviosa siendo los más comunes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Spicaria javanica* (Bally) (Ramírez y Araya 1989).

Beauveria bassiana, aparece atacando naturalmente a la broca del café en los diferentes países en que ésta se ha presentado; aunque los niveles de infestación no se han cuantificado, podría considerarse como una alternativa dentro del manejo integrado para esta plaga (Monterroso 1981).

En Nicaragua, existe un proyecto de hongos entomopatógenos, en donde se realizan evaluaciones con *B.*

bassiana para determinar sus posibilidades de uso contra la broca del cafeto. El presente estudio se desarrolló en el marco de ese proyecto y tuvo como objetivos: determinar el comportamiento de seis cepas de *B. bassiana* durante su producción masiva, así como la virulencia de las mismas contra la broca del cafeto.

II REVISION DE LITERATURA.

A. Broca del cafeto.

La broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) ha causado muchas pérdidas en varios países donde es endémica y en los que ha sido introducida. Se presume, que al igual que el cafeto, es originaria de Africa Ecuatorial señalándose como posible centro de origen: El Congo, Uganda y Kenia. En América la broca es considerada como una plaga exótica.

Debido a los hábitos de la broca, no es posible erradicarla por lo que la disminución de sus perjuicios es la única alternativa viable. Esto puede lograrse mediante la estructuración de estrategias de manejo integrado de plagas, para ello se requiere conocer diversos aspectos de la plaga y de los métodos de manejo involucrados.

1 Distribución geográfica de la broca del cafeto.

La primera referencia que se tiene acerca de la broca del cafeto es dada por Ferrari en 1867, quien clasificó y describió esta plaga de especímenes encontrados en café almacenado, no obstante, su presencia en el campo fue detectada hasta 1901 en Gabón. A partir de esa fecha, se ha mencionado la presencia de la plaga en diversas partes del mundo (Bergamin 1943).

La broca del cafeto fue introducida a Brasil de Africa, de Brasil se distribuyó a diversos países del continente americano. El punto inicial de distribución de la broca en Centroamérica fue Guatemala (1971), siendo el primer país afectado en el área. Actualmente, la plaga se ha distribuido a casi todos los países productores de café de América, a excepción de Costa Rica y Panamá en donde aún no se ha encontrado.

2 Clasificación taxonómica de la broca del cafeto.

Inicialmente, la broca del café fue clasificada por Ferrari en 1867 como *Cryphalus hampei*, posteriormente en 1871 Eichnoff estableció el género *Stephanoderis* y con base en las características de la broca la ubicó en este género (Ticheler 1963). Posteriormente surgieron numerosos desacuerdos en cuanto a la taxonomía de la broca del cafeto. Actualmente, se ubica la broca del cafeto de la siguiente manera: Orden Coleoptera, sub-orden Polyphaga, superfamilia Scolytoidea, familia Scolytidae, subfamilia Ipinæ, super-tribu Ipinini, género *Hypothenemus*, especie *hampei*.

3 Descripción y ciclo de vida.

La broca del cafeto es holometábola (metamorfosis completa), todo su ciclo transcurre dentro de las cerezas de café. Los adultos de broca tienen coloración castaño clara recién emergidos y a medida que avanza su edad, cambian a pardo oscuro hasta volverse de color negro. Los machos miden entre 1.0 y 1.25 mm y las hembras 1.37 a 1.82 mm (Alonso 1982). Los adultos tienen la cabeza globular escondida dentro del protórax, las antenas son geniculadas. Los élitros presentan pequeñas cavidades deprimidas longitudinalmente, están cubiertos de setas cortas y planas que crecen por lo menos 8 veces más largas que anchas. El segundo par de alas está presente sólo en las hembras y atrofiado en los machos por lo que éstos no pueden volar.

La broca oviposita dentro del fruto de café, sus huevos tienen forma elíptica con cutícula hialina y brillante; generalmente los que no son brillantes son estériles. La duración del período de huevo varía de acuerdo a la temperatura pudiendo durar 4 días a 27 °C y 16 días a 18 °C (Vernalha et al. 1965).

Las larvas recién nacidas presentan cápsula cefálica más ancha que el resto del cuerpo con las mandíbulas visibles y dirigidas hacia adelante, son de color lechoso. El período larval se ve grandemente afectado por la temperatura y va de 9-17 días a 27 °C y de 12-22 días a 22 °C (Bergamin 1943). La medida de la cápsula cefálica permite establecer el número de mudas de piel para las larvas de broca. El proceso de muda explica la diferencia de tamaño entre machos y hembras ya que, las hembras tienen 2 mudas y los machos solamente una.

La prepupa marca el fin del estado larval. El período prepupal es corto, pudiendo ser de 2 días a temperatura de 22-27 °C y de 3-6 días a 18-21 °C (Vernalha *et al.* 1965).

El estadio pupal varía de acuerdo a la temperatura, oscilando entre 4 y 10 días a temperaturas medias de 8.7 y 22.8 °C respectivamente (Vernalha *et al.* 1965).

La longevidad de machos y hembras es diferente, pudiendo vivir el macho entre 40-50 días mientras que la hembra vive de 81-282 días (Vernalha *et al.* 1965).

4 Ecología.

Además de la temperatura, otro factor que influye sobre la broca del cafeto es la lluvia, aunque de forma indirecta. Las lluvias tienen su efecto sobre la floración y formación de frutos de café por lo que la plaga es afectada en su alimentación. Dado que casi toda la vida de la broca transcurre dentro del fruto de café, la escasez de éstos induce a la reducción de las poblaciones de la plaga (Ticheler 1963).

La sombra es otro factor que incide sobre la broca del cafeto, excesos de esta pueden favorecer la presencia de la plaga debido a la humedad presente que permite la reproducción

del insecto. La broca es más activa en la oscuridad y con alta humedad, no obstante, se ha observado que con 55% de humedad la actividad se reduce, aún en la oscuridad, asimismo, la mortalidad aumenta en condiciones de baja humedad (Castro 1990).

En lo referente a altitud, se menciona que el rango óptimo para el desarrollo de la broca está entre 800 y 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm); a alturas mayores de 1300 msnm la broca no representa un problema económico, debido principalmente a las bajas temperaturas (Decazy 1988).

5 Comportamiento de los adultos.

La broca del cafeto es monófaga, se alimenta y reproduce solamente en *Coffea* sp.; aunque existen 4 especies de *Hypothenemus* que pueden convivir con la broca en la planta de café, sólo la especie *H. hampei* perfora los frutos, alimentándose y reproduciéndose dentro de ellos (Castro 1990).

Las hembras de la broca del cafeto permanecen en la perforación por algunos días después de la emergencia, durante este período, son fertilizadas por los machos los que generalmente completan primero su desarrollo (LePelley 1964). Las hembras maduran sexualmente y son capaces de ovipositar 3 ó 4 días después de la emergencia. Después del apareamiento, las hembras generalmente abandonan los frutos en que se desarrollan y buscan otros para ovipositar.

Las hembras de la broca del cafeto predominan sobre los machos, variando la relación hembra-macho con el nivel de infestación. En períodos de reproducción total en el cultivo, la relación de hembras y machos es aproximadamente 10:1, mientras, cuando la población ha sido reducida por alguna práctica de manejo y el brote de la plaga aún no ha iniciado, la población existente puede estar total o casi totalmente

constituida por hembras. Los machos, generalmente viven en los frutos de donde emergieron; un macho puede fertilizar hasta 30 hembras, pero, no fertiliza más de dos por día (Bergamin 1943).

6 Daño al cultivo.

La broca del cafeto, reduce tanto el peso como la calidad del fruto de café, ya que se alimenta y reproduce dentro de sus semillas; puede causar la destrucción total de los frutos u ocasionar la caída de estos, si el ataque ocurre a frutos jóvenes. Aunque, las hembras adultas son las que inician el daño para ovipositar en la semilla, no son el único estado de la plaga que causa daño ya que, cuando las larvas emergen también éstas se alimentan de las semillas pudiendo llegar a destruir totalmente el fruto.

Los daños económicos causados por la broca, se traducen en el aumento de los costos de producción debido a los gastos para el manejo de la plaga, así como por la pérdida de peso por la destrucción de los granos de café y la pérdida de calidad del mismo. La calidad del café se ve afectada, bajando a calidades inferiores debido al mal aspecto que presenta, pudiendo llegar a ser rechazada en los mercados internacionales lo que produce pérdidas económicas al país.

B. Manejo integrado de la broca del cafeto.

En la mayoría de países productores de café en los cuales la broca ha sido detectada, las medidas de control han estado dirigidas a evitar su expansión. Usualmente, las prácticas de manejo para la broca del cafeto han incluido: control cultural, control mecánico, control químico y control biológico (estudios).

1 Control cultural.

El objetivo es reducir las poblaciones de broca por medio de la manipulación del agroecosistema del cafetal, siendo las prácticas más recomendadas: regulación de sombra, poda de cafetos y control de malezas (Decazy 1985). Tanto los árboles de sombra como las malezas constituyen elementos propiciadores de las condiciones ambientales que la broca requiere para su desarrollo. Se ha observado que en ambientes con sombra los niveles de infestación son mayores que en ambientes desprovistos de ésta (Zelaya 1989). La presencia de malezas dificulta la recolección de los frutos del suelo y asimismo favorece la conservación de humedad, lo que principalmente facilita la sobrevivencia de la broca en los períodos de inter cosecha. Asimismo, la poda de los cafetos permite una mejor ventilación del cultivo, contribuyendo a eliminar excesos de humedad que favorezcan el desarrollo y sobrevivencia de la plaga.

2 Control mecánico.

Tiene dos componentes principales: "repase" y "pepena". El "repase" consiste en la recolección cuidadosa de los frutos de café que han quedado en la planta después de la cosecha. Esta práctica va encaminada a impedir la existencia de focos de infestación para la broca, constituyendo un método preventivo de gran valor, sobre todo en cafetales de la especie *C. arabica* que presenta una maduración más o menos concentrada.

La "pepena" consiste en la recolección de los frutos que han caído durante la cosecha, y, al igual que el "repase" es un método preventivo en el manejo de la broca. El inconveniente de ambas prácticas es que requieren mucha mano de obra lo cual dificulta su ejecución, sobre todo en áreas grandes.

3 Control químico.

Los efectos positivos del control químico se reflejan en su efecto inmediato y en la confiabilidad, sin embargo, sus efectos negativos son considerables destacándose entre otros: contaminación ambiental, residuos en la cosecha, resistencia de la plaga y desequilibrio ecológico. A nivel general, el principal insecticida utilizado para el control de la broca del cafeto ha sido el insecticida ciclodiene Endosulfan, aunque existen otros insecticidas que pueden usarse, pero generalmente son menos efectivos y poco usados (Rhodes y Mansingh 1981). El uso continuo de insecticidas para el manejo de la broca del cafeto en Nueva Caledonia, ha provocado el desarrollo de resistencia al Endosulfan después de años de aplicación (Brun *et al.* 1989).

Debido a los problemas observados, actualmente se están diseñando estrategias de control integrado de plagas, que incluyan diversos componentes para manejar la plaga de forma efectiva tanto biológica como económicamente (Klein y Miranda 1989).

4 Control biológico.

En los sitios considerados como centro de origen de la broca del cafeto, se han encontrado sus enemigos naturales, destacándose principalmente los parasitoides *Prorops nasuta* Waterson y *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethilidae) y *Heyerosfilus coffeicola* (Hymenoptera: Braconidae). Se ha descubierto en Africa otra especie parásita de la broca del cafeto *Phymastichus coffeae* (Hymenoptera: Eulophidae) la cual podría ser otra alternativa para el manejo de la plaga (B. Duffor, MIP/CATIE Nic., comunicación personal).

En América *P. nasuta* y *C. stephanoderis* han sido introducidos para evaluar su posible rol en el control de la broca del cafeto. En varios países (México, Ecuador, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua etc.), existen proyectos de investigación en donde se realizan estudios tendientes a lograr la incorporación del control biológico de la broca con los parasitoides como una práctica común en el manejo de esta plaga. Inicialmente, las investigaciones se han concentrado en *C. stephanoderis*.

Cephalonomia stephanoderis, es considerado como el parasitoide más importante de la broca del cafeto, encontrándose que casi 50% de la progenie de la broca en frutos negros es parasitada (LePelley 1964). Las larvas de *Cephalonomia* viven como ectoparasitoide sobre el último estado larval de la broca del cafeto. Los adultos de *Cephalonomia*, también viven en los frutos de café y se alimentan de los adultos de broca, actuando así como depredadores.

El ciclo de vida de huevo a adulto dura aproximadamente un mes y se lleva a cabo dentro de los frutos que contengan larvas de *H. hampei* en su último estadio. Cada hembra de *S. stephanoderis* puede poner un promedio de 71 huevos en un período de 20 días; en un sólo día puede poner hasta 9 huevos; la hembra es ligeramente más grande que el macho. En las evaluaciones realizadas en México, *C. stephanoderis* es el más promisorio, debido a su mayor fecundidad y más fácil manejo (F. Barrera, CIES, Méx., comunicación personal).

Además de los parasitoides, la broca del cafeto también es atacada por hongos entomopatógenos, sobresaliendo entre ellos *Beauveria bassiana*. A este respecto, se cuenta con algunos estudios en donde se ha evaluado el potencial de *B. bassiana* para el manejo de la broca del cafeto. De dichos estudios se desprende que *B. bassiana* es un agente promisorio

para el manejo de la broca del cafeto, no obstante, aún se requiere la investigación de muchos aspectos que determinarán si éste hongo llegará o no a estar incluido en el manejo integrado de la broca del cafeto.

C. Control microbiano de insectos con énfasis en *B. bassiana*.

El control microbiano trata de usar racionalmente los patógenos (virus, bacterias, hongos, nematodos, protozoarios y rickettsias) para mantener las poblaciones de plagas por debajo de los niveles económicos. Asimismo, el control microbiano es considerado como la meta principal de la patología de insectos, la cual está definida como "el estudio de las enfermedades de los insectos involucrando etiología, sintomatología y epizootiología con vistas a utilizarlos en el control de plagas o con el objetivo de controlarlas cuando éstas ocurren en insectos útiles" (Alves 1986).

Aproximadamente 1500 microorganismos o productos microbiales de origen natural han sido identificados como agentes potencialmente útiles para el manejo de insectos plagas. La utilización de esos microorganismos para regular poblaciones de insectos dentro de un área geográfica definida constituye el campo del control microbiano de insectos (Miller *et al.* 1983). No obstante, la cantidad de organismos estudiados ampliamente es reducida.

El uso de microorganismos para el control de insectos requiere que una serie de pasos sean seguidos, estos se inician con el descubrimiento de un organismo como el agente causante de la enfermedad en el hospedante, utilizando los postulados de Koch (Harper 1987).

Los hongos fueron los primeros microorganismos que se reconocieron como causantes de enfermedad en los insectos. La mayoría de las micosis en los insectos son causadas por

hongos de los órdenes Hyphomycetes y Entomophthorales (Lipa 1975).

1 Sistemática y características de *B. bassiana*.

Pertenece a la clase: Deuteromycetes, Orden: Hyphomycetes, Género: *Beauveria*, especie: *bassiana*.

Los hongos imperfectos (Deuteromycetes: Fungi Imperfecti) son un grupo establecido provisional y artificialmente: se caracterizan porque su reproducción sexual aún no ha sido observada. Entre los Deuteromycetes se distinguen 4 subgrupos: Hyphomycetes, Sphaeropsidales, Coelomyces y Micelia Sterilia (Bessey 1950). Los Hyphomycetes (como parte de la clase Deuteromycotina) no son parte de la clasificación taxonómica de los hongos, son parte de una clasificación adicional de propósito especial en la cual, los estados conidiales de Ascomycotina, Basidiomycotina, algunas veces ciertos Zygomycotina son agrupados juntos (Bryce y Carmichael 1973). La mayoría de especies entomopatógenas pertenecen al subgrupo Hyphomycetes. Los géneros a los que pertenecen las especies más importantes son: *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Lipa 1975).

Del género *Beauveria*, dos especies son las más conocidas: *B. bassiana* y *B. tenella*. *Beauveria bassiana* fue descrita en 1935 por Balsamo como *Botrytis* y fue incluida en el nuevo género *Beauveria* establecido por Vuillemin en 1912 (DeBach 1964). *Beauveria bassiana* es uno de los hongos más citados como patogénicos para insectos plagas de muchos cultivos, así como por su amplia distribución geográfica (DeBach 1964). El género *Beauveria* generalmente es asociado con el término "muscardina blanca", lo cual indica que el micelio y las conidias del hongo cubren el cuerpo del insecto muerto con una delgada capa.

Las hifas de *B. bassiana* miden 3.5 μ de diámetro, son transparentes y septadas. Los conidióforos están solos o agregados, tienen forma elongada o de botella. Generalmente, sus esporas son esféricas aunque, las esporas ovales también pueden presentarse, midiendo 2.0-3.0 x 2.0-2.5 micrómetros de diámetro.

1.1 Ciclo de vida y biología de *B. bassiana*.

El ciclo de vida de los hongos entomopatógenos incluye las fases de: germinación, formación de apresorio, penetración, colonización, formación de hifas y reproducción. Cada fase requiere de condiciones ambientales específicas, en general temperaturas entre 23-30 °C y humedad relativa mayor al 90% son adecuadas para estos organismos (Alves 1986).

Germinación de la conidia: El hongo emite su tubo germinativo cuando las condiciones ambientales son favorables.

Formación de apresorio: la extremidad del tubo germinativo de la hifa se dilata formando el apresorio (en *B. bassiana* esto no ocurre).

Penetración: están involucrados dos procesos; el físico (las hifas rompen las áreas membranosas esclerotizadas) y el químico (la acción enzimática facilita la penetración mecánica, aunque la penetración oral también puede ocurrir).

Colonización: la hifa que penetra, sufre un engrosamiento y se ramifica formando pequeñas colonias del hongo y cuerpos hifales. Los tejidos internos son penetrados pero no ocurre desintegración debido a que el hongo segrega sustancias antibacterianas. El tiempo de colonización puede variar (3-5 días) dependiendo del hospedante, patógeno y de las condiciones ambientales.

Formación de hifas y reproducción del patógeno: dos o tres días después de la muerte del insecto, las hifas del hongo empiezan a emerger de los espiráculos y otras aberturas, emergiendo las conidias 2 ó 3 días después de la emergencia de las hifas dependiendo de las condiciones ambientales.

2 Mecanismos de infección. Contacto e ingestión.

La penetración del hongo al hemocele puede ocurrir por cualquier parte del cuerpo del insecto, pero, puede ser más concentrada en los pliegues intersegmentales donde las esporas son más fácilmente atrapadas. La penetración también puede ocurrir a través del aparato oral, las esporas ingeridas pueden germinar en el intestino medio del cuerpo de algunos insectos y el hongo penetra el hemocele a través de la pared intestinal.

Una vez que el hongo ha penetrado el integumento del insecto, este se difunde a través de los tejidos del hospedante y la muerte ocurre por hambre fisiológica 5 ó 7 días después que la(s) conidia(s) ha(n) hecho contacto con la cutícula del insecto dependiendo de las condiciones ambientales (Ferron 1980).

La infección es facilitada por la presencia de temperaturas cálidas y alta humedad atmosférica; aunque, si esas condiciones son mantenidas por más de 24 horas la tasa de infección usualmente es retardada (Steinhaus 1949). Los hongos, son altamente dependientes del microclima alrededor del insecto. Altas humedades, son críticas para la germinación de las esporas y para incrementar la producción de cuerpos fructíferos. La luz afecta la esporulación sobre el hospedante después de muerto, así como la longevidad de las esporas viables (Burgess y Hussey 1971).

Las condiciones del patógeno son muy importantes para el desarrollo de epizootias. Una epizootia es "la frecuencia excepcionalmente alta de una enfermedad en una población hospedante" (Newman y Carner 1975). En una epizootia, las propiedades más importantes del entomopatógeno son: modo de infección, virulencia, patogenicidad y replicación (Tanada y Fuxa 1987). Las características de la población hospedante tales como su biología, diversidad de ecosistema del insecto, comportamiento y distribución de los individuos de la población (uniforme, al azar o gregaria) son muy importantes para el desarrollo de epizootias (Watanabe 1987). Tanto la población del hospedante como la del entomopatógeno son influenciadas por las condiciones ambientales por lo que estas, son factores que deben considerarse al evaluar las interacciones de ambos.

La fase reproductiva del patógeno debe coincidir con un período favorable del ambiente y con las condiciones de susceptibilidad del hospedante para el desarrollo de una epizootia.

3 Patogenicidad de *B. bassiana*.

Patogenicidad es la capacidad de un organismo de provocar enfermedad. La patogenicidad de *B. bassiana* se ha probado contra más especies de insectos que cualquier otro hongo, conociéndose actualmente cerca de 500 hospedantes para este hongo (Vélez y Benavides 1990). El amplio espectro de acción de *B. bassiana* incluye muchos insectos del orden Coleoptera, entre los cuales están: *Clalcodermus bimaculatus* (picudo del caupí), *Anthonomus grandis* (picudo del algodón), *Artipus floridanus* (picudo de la raíz), *Cerotoma arcuata* (vaquitas), *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo dorado de la papa), *Pantorhytes plutus* (picudo del coco), *Hypothenemus hampei*

(broca del cafeto) y *Cosmopolites sordidus* (picudo del plátano) entre otros.

En estudios de patogenicidad realizados con *Artipus floridanus* se han encontrado diferencias considerables entre biotipos de *B. bassiana* de diversas localizaciones geográficas y hospedantes (McCoy *et al.* 1985).

4 Producción de hongos entomopatógenos.

La meta en la producción de microorganismos para el control de insectos, es obtener grandes cantidades del estado resistente del microorganismo (esporas generalmente). Las principales condiciones consideradas en la producción de hongos entomopatógenos son: selección de una cepa capaz de producir gran cantidad de esporas suficientemente virulentas; escogencia de un medio que aumente al óptimo la producción de conidias; fácil producción a bajos costos; adecuado diseño de la formulación y condiciones de almacenamiento (McCoy *et al.* 1975).

La naturaleza parasítica de los organismos infecciosos, no necesariamente excluye el crecimiento saprofítico, aunque la selectividad de los patógenos para ciertos hospedantes indican que condiciones muy específicas son requeridas para propagarlos "in vitro" (Dulmage y Rhodes 1971).

Beauveria bassiana se adapta bien a los medios artificiales sin perder su virulencia. Para la producción masiva de hongos entomopatógenos se han utilizado diversos sustratos naturales, entre ellos, el arroz cocido con el cual se producen gran cantidad de conidias, tanto en la superficie como entre los granos (Paiva 1983). *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* presentaron buena colonización cuando fueron cultivadas en botellas conteniendo como medio arroz esterilizado en tres condiciones: autoclave, baño maría y olla

de presión; asimismo, la viabilidad de los dos hongos fue similar y estuvo por encima del 90% (Batista *et al.* 1988).

Para la producción de *M. anisopliae* se ha utilizado arroz húmedo autoclavado y se han obtenido grandes cantidades del hongo. Con el uso de granos enteros de arroz como medio de cultivo, se forman poros que multiplican notablemente la superficie del medio y permiten al hongo penetrar totalmente la masa del sustrato (Bastos *et al.* 1983).

En Brasil, buscando alternativas de producción eficientes y de bajo costo, se cultivó una cepa de *B. bassiana* aislada de *A. grandis* en diferentes medios de cultivo naturales líquidos y se obtuvo que el caldo de frijol presentó las mejores perspectivas, en relación a la concentración de esporas. No obstante, la viabilidad de las conidias obtenidas de los diferentes medios fue estadísticamente similar (Batista *et al.* 1985).

5 Virulencia de *B. bassiana*.

Virulencia, es la capacidad potencial de un patógeno de producir enfermedad, esto es, la habilidad de invadir y dañar los tejidos del hospedante (Tanada y Fuxa 1987). En relación a esto, un patógeno es virulento cuando incide sobre un gran número de individuos produciendo una epizootia (Alves 1986).

La virulencia puede estar relacionada en parte a la producción de enzimas para la penetración cuticular, las cuales, también tienen un efecto degradativo virulento sobre los tejidos del hemocele durante la invasión fungosa (Ferron 1980).

En general, la virulencia puede incrementarse de diversas formas, incluyendo: pase del patógeno a través de los insectos; disocio de cepas más o menos virulentas;

introducción junto con el microorganismo de sustancias que puedan ayudar a incrementar su poder invasor; asociación del patógeno en una relación mutualista con otro microorganismo que resulte en una mayor capacidad de invadir los tejidos de otra manera (Tanada y Fuxa 1987).

Un patógeno que presenta alta virulencia y gran capacidad de diseminación puede ser llamado patógeno epizoótico y debe ser seleccionado para control microbiano. Además de esta característica debe considerarse la capacidad de producción, velocidad de crecimiento en medios de cultivo, estabilidad genética, supervivencia en condiciones de campo e interacción parásito-patógeno-depredadores entre otros (Alves 1986).

La virulencia, frecuentemente es medida por la respuesta del hospedante al inóculo del patógeno. La virulencia y patogenicidad están frecuentemente ligados con la multiplicación del patógeno dentro del insecto. Un entomopatógeno de rápida multiplicación, generalmente es más virulento que uno de lenta multiplicación en el hospedante, aunque otros factores (toxinas, importancia vital de tejidos, etc.) pueden jugar un papel importante.

Una de las diferencias mejor estudiadas entre cepas es su virulencia. El uso de cepas más virulentas aumentan las epizootias en corto tiempo (Tanada y Fuxa 1987). El concepto de cepas se puede usar como sinónimo de otros términos como "variantes genotípicas", "biotipos" y "patotipos". Para la identificación de cepas de hongos entomopatógenos se usan diversas técnicas tales como análisis enzimático (Soper *et al.* 1983) y cromatografía (Messis *et al.* 1983).

La virulencia de un patógeno puede ser evaluada en condiciones de laboratorio por medio de bioensayos con insectos susceptibles y puede ser expresado como DE₅₀ (Dosis efectiva media), DL₅₀ (Dosis letal media), TL₅₀ (Tiempo letal

medio) o por el cálculo de la Tasa de Potencia referida en UP (Unidad patrón de patogenicidad). Los resultados de DL₅₀ y TL₅₀ de un misma cepa pueden variar con la población de insectos sometidos al bioensayo y con las condiciones donde se realice el mismo. La TL₅₀ puede aumentar, cuando la humedad decrece (Zimmerman 1982).

En un estudio, aplicando conidias de *B. bassiana* obtenidas de cultivos mono y multiespóricos sobre *Galleria mellonella*, se observaron marcadas diferencias en los TL₅₀ de las dos fuentes de conidias, asimismo, se confirmó la disminución de la virulencia del hongo por cultivos sucesivos (Samsinakova y Kalavova 1982).

6 Relación broca del cafeto-*B. bassiana*.

Cuando *B. bassiana* ataca a *H. hampei* lo momifica antes de que alcance el pergamino, aunque también lo parasita una vez que está dentro de las semillas. Cuando esto ocurre, los orificios de penetración se encuentran tapados por una masa filamentosa blanca (micelio) que no cubre el resto de la pulpa y que tampoco excede el límite del nivel de profundidad de dichos orificios. Al germinar las conidias del hongo sobre el cuerpo de la broca, envían sus tubos germinativos a través de las aberturas naturales del mismo. El micelio alcanza la parte interna de la broca, crece y se ramifica rápidamente destruyendo los órganos internos del insecto, ya sea por acción mecánica o por la acción degradadora de las enzimas para obtener alimento. Muerta la broca, el hongo pasa de parásito a saprofítico y continúa produciendo conidias (Villanueva 1989). Las brocas muertas por *B. bassiana* dan el aspecto de estar cubiertas por un polvo blanco ("muscardina blanca").

El ataque del hongo sobre la broca del cafeto, fue observado inicialmente en Java por Van Der Weel en 1910. A

nivel de campo en Java se observaron niveles de infección entre 50-75% bajo humedad y temperatura alta (Villanueva 1989). En Nicaragua, durante 1988 se encontró *B. bassiana* atacando a la broca del cafeto en condiciones de campo y al año siguiente se realizaron pruebas preliminares con el fin de conocer las perspectivas de éste hongo para el control de esta plaga y se obtuvo hasta 80% de mortalidad del insecto en condiciones de laboratorio (Barrios y Centeno 1990). Sin embargo, a nivel de campo, en 1991, se observó que *B. bassiana* afectó adultos de broca del cafeto entre 1 y 10% con base al muestreo realizado en la región I de Nicaragua (M. Bustamante, CENAPROVE, Nic., comunicación personal).

En Ecuador, se señala a *B. bassiana* como un factor natural de control de la broca del cafeto con niveles de incidencia de 2.5 a 12% (Klein *et al.* 1987). En otros países (Honduras, Guatemala, Colombia) también se ha observado en forma natural la presencia de *B. bassiana*, sin embargo, no en todos se ha cuantificado.

En Brasil, bajo condiciones de laboratorio se han realizado aplicaciones de *B. bassiana* sobre *H. hampei* usando diferentes concentraciones. Se observó que la mortalidad fue mayor al inocular los insectos que al hacerlo sobre frutos y hojas para las concentraciones de 2×10^4 y 2×10^6 conidias/ml (Fernández *et al.* 1985). Asimismo, en otro estudio, se mostró que *B. bassiana* es altamente patógeno a la broca del café cuando es aplicado a los frutos (Batista *et al.* 1988).

Estudios realizados en Honduras evaluando la efectividad de diferentes cepas de *B. bassiana* para el control de *H. hampei* y su tolerancia al cobre, muestran que existe variación en la virulencia de cepas separadas geográficamente (Lazo 1990). Las cepas de *B. bassiana* de diferentes zonas

geográficas pueden diferir en diversos aspectos de su comportamiento debido a posibles características que hayan desarrollado al adaptarse a los diferentes ambientes de origen, lo cual podría hacer posible el uso de patotipos más eficaces para determinada plaga (Poprawski *et al.* 1988).

III MATERIALES Y METODOS

A. Introducción.

El estudio se realizó en los laboratorios del proyecto Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Protección Vegetal (CENAPROVE) ubicado en el kilómetro 12 1/2 de la carretera sur, Managua, Nicaragua.

La ejecución del estudio contó con las etapas de:

- 1) Estandarización del manejo previo de seis cepas de *B. bassiana*.
- 2) Producción de seis cepas de *B. bassiana* en arroz entero.
- 3) Virulencia de seis cepas de *B. bassiana* sobre la broca del cafeto.

B. Cría de broca.

Se estableció una cría de broca en el laboratorio para asegurar la disponibilidad de hembras adultas de broca para el ensayo de virulencia. Inicialmente se recolectaron frutos de café infestados por broca en lotes sin aplicación de fungicidas o insecticidas. Las áreas de recolección se ubicaron en el departamento de Matagalpa, situado en la zona norte de Nicaragua, a 136 kilómetros de Managua.

Una vez recolectados los frutos infestados, estos eran llevados al laboratorio en donde se lavaban con agua y detergente; posteriormente, eran colocados en bandejas de malla para que perdieran humedad. Tres días después de su recolección, se colocaban en cajas de madera para recuperar adultos, los cuales se utilizaban para la infestación de frutos de café sanos. Las cajas de recuperación de adultos utilizadas tienen 4 bandejas móviles de malla plástica, en la parte posterior y a la altura de cada bandeja se han insertado

vasos de vidrio en posición horizontal, por los cuales salen las brocas al ser atraídas por la luz.

Además de los frutos de café infestados, también se recolectaban frutos sanos en estado sazón para infestarlos en el laboratorio. Los frutos sanos fueron infestados con brocas hembras en cajas plásticas conservando siempre una relación de dos brocas/ fruto. Después de 30 días de haber infestado los frutos sanos, estos eran trasladados a cajas de recuperación de adultos. Esto se hizo durante todo el período de estudio. Los frutos infestados, se limpiaban periódicamente para evitar la proliferación de hongos, para su limpieza, se utilizaba pinceles, algodón y una solución de hipoclorito de sodio al 5%.

La sala de cría de la broca tuvo un régimen de luz de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz; la temperatura osciló entre 22-25 °C y la humedad relativa fue superior a 75% durante todo el período, para mantener ésta última, se utilizaron bandejas con agua y piedras volcánicas dentro de éstas.

C. Estandarización del manejo de las cepas de *B. bassiana*.

1.1 Características y selección de las cepas de *B. bassiana* utilizadas en el estudio.

Para la realización del estudio se usaron 6 cepas de *B. bassiana* que resultaron promisorias en estudios previos realizados en Honduras (Lazo 1990); Costa Rica (F. Badilla, DIECA, C.R., comunicación personal) y Nicaragua (J. Mercado, CENAPROVE, Nic. comunicación personal). En la preselección de dichas cepas se utilizaron diversos criterios tales como: tolerancia al cobre y virulencia (IIBC 033, IIBC 035 e IIBC 036); patogenicidad (NICA 038 Y NICA 116); virulencia y producción de conidias (BRAS 447). Algunas cepas tienen

orígenes diferentes (Cuadro 1); el código presentado, corresponde parcialmente al utilizado por las instituciones donde las diferentes cepas están depositadas y en algunos casos, difieren del utilizado en estudios previos. Las cepas codificadas en este estudio como IIBC 033, IIBC 035 e IIBC 036 corresponden a las cepas 9, 14 y 15 utilizadas por Lazo (1990). Las cepas fueron obtenidas en medios de cultivo artificiales Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA).

Cuadro 1. Código, origen y hospedante de donde fueron obtenidas las cepas de *B. bassiana* utilizadas en el estudio.

Código estudio	Código Lab. MIP/CATIE	Origen	Hospedante
IIBC 033	882-885	Honduras	<i>Hypothenemus hampei</i>
IIBC 035	902-905	Honduras	<i>Hypothenemus hampei</i>
IIBC 036	906-909	Guatemala	<i>Hypothenemus hampei</i>
NICA 038	645-647	Nicaragua	<i>Dalbulus maidis</i>
NICA 116	647-650	Nicaragua	<i>Colaspis sp.</i>
BRAS 447	202-203	Brasil	<i>Solenopsis invicta</i>

Nota: El código utilizado para cada cepa corresponde a las cifras parciales o totales asignados por las instituciones en donde están depositadas las diferentes cepas.

El uso de dos cepas de Honduras y del mismo hospedante se debió a que en las muestras enviadas por el IIBC al CATIE, ambas tienen igual descripción para el lugar de donde fueron obtenidas (Olancho, Honduras), por lo que no se pudo distinguir entre las cepas 14 y 9 que habían resultado diferentes en el estudio de Lazo (1990), razón por la cual fue necesario incluir las dos cepas en las pruebas para evitar mayores complicaciones.

Otro aspecto importante de mencionar es que la cepa BRAS 447 ha sido seleccionada en Brasil para obtener una cepa con buenas características reproductivas (F. Badilla, DIECA,

comunicación personal). Las demás cepas utilizadas no han sufrido ningún manejo genético.

1.2 Infección y reaislamiento de las cepas en la broca del cafeto.

Como parte de la estandarización del manejo de las cepas utilizadas, se realizó su inoculación sobre hembras adultas de broca.

Las conidias de cada cepa fueron producidas en platos petri conteniendo medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA). Para la inoculación de los insectos se preparó una suspensión consistente en las conidias de cada cepa de *B. bassiana* más agua destilada estéril. No se determinó la concentración de las suspensiones aplicadas aunque, posiblemente osciló entre 1×10^6 y 1×10^7 conidias/ml, esto tomando como referencia las concentraciones obtenidas en la preparación de las suspensiones utilizadas en el estudio de producción que se detalla posteriormente. Las suspensiones fueron aplicadas a los insectos por inmersión utilizando para ello cuadros de malla fina de 4 cm^2 . Los insectos fueron colocados sobre la malla para sumergirlos por 2-3 segundos en la suspensión que previamente había sido colocada en un plato petri de vidrio.

Después de inoculados los insectos, estos fueron colocados en platos petri de vidrio, donde fueron dejados por 7 días. Para la alimentación de las brocas se colocaron frutos de café conservando siempre la relación de dos brocas/fruto de café.

El reaislamiento de las cepas se hizo a partir de brocas esporuladas; para ello, se utilizó el medio de cultivo artificial MEA. La inoculación se hizo de forma directa, tomando con un asa las conidias del cuerpo del insecto y

colocándolas sobre el medio de cultivo. Después de la inoculación, los cultivos se observaron diariamente, esto con el objetivo de eliminar los contaminados y transferir muestras de los limpios a medios estériles. La incubación de las cepas se hizo en incubadora a 26 °C y en oscuridad total.

El proceso de reaislamiento y purificación se hizo una vez y su duración fue de 30 días para 5 de las 6 cepas a excepción de la cepa BRAS 447 que tuvo que reaislarse dos veces, debido a que los cultivos siempre presentaban contaminación por bacterias.

Una vez purificadas las diferentes cepas, se almacenaron en refrigeración 10 cultivos/cepa a 4 °C, los cuales fueron utilizados paulatinamente como fuente de inóculo para los ensayos de producción de *B. bassiana*.

D. Producción de las cepas de *B. bassiana* en arroz entero.

Para este ensayo, se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), contando con 4 repeticiones de cada cepa/período de incubación; la variable evaluada fue producción de conidias/g de arroz. Las evaluaciones se hicieron cada 3 días, iniciando 7 días después de la inoculación (DDI) hasta 22 DDI (6 períodos de incubación). Por cada período de incubación, se seleccionaban 2 frascos/cepa, teniendo en total por cada repetición 12 frascos/cepa. Se hace una descripción gráfica del comportamiento productivo registrado para cada cepa; haciéndose también un análisis de varianza y una comparación de medias por Tukey para todas las cepas en los diferentes períodos de incubación.

1.1 Preparación del inóculo de *B. bassiana*.

Platos petri conteniendo las cepas cultivadas en MEA, provenientes del reaislamiento descrito anteriormente (sección

C) fueron usados para obtener las suspensiones e inocular el arroz. Las esporas fueron separadas de la superficie del medio, con una espátula previamente esterilizada y fueron colocadas en frascos de vidrio que contenían 100 ml de agua destilada estéril; la suspensión se homogenizó mediante agitación manual. De la suspensión obtenida, se tomaba 5 ml, de donde se extraía una muestra para preparar una dilución 1:100, que se utilizaba para determinar la concentración de la suspensión madre. La concentración de la suspensión se determinó haciendo 4 lecturas en una cámara de conteo Neubauer.

Una vez estimada la concentración de la suspensión madre, se procedió a ajustar cada una, hasta obtener la concentración de 2×10^5 conidias/ml, que fue la utilizada para la inoculación del arroz.

1.2 Preparación e inoculación del arroz con *B. bassiana*.

Para la producción de las cepas de *B. bassiana* se utilizó arroz entero (94 % grano entero). La producción se hizo en erlenmeyers de vidrio con capacidad de 500 ml.

Inicialmente, se pesó el total de arroz a inocular para todas las cepas, posteriormente se lavó con agua corriente y se dejó en remojo por 1 hora, después de lo cual se puso a secar en papel toalla. Una vez seco, se pesaba nuevamente para hacer la distribución en los erlenmeyers (50 g/frasco). La parte superior de los erlenmeyers fue cubierta con papel aluminio, procediéndose luego a su esterilización en autoclave usando 1.2 atm/20 min.

Después de esterilizar el material, se procedió a la inoculación en una cámara de flujo laminar. Cada 50 g de arroz se inocularon con 10 ml de la suspensión, lo que dió como resultado una concentración de 40, 000 conidias/g de

arroz. La suspensión de conidias, se aplicó a la parte superior del arroz usando pipetas estériles cada vez. Posteriormente se procedió a homogenizar su distribución por agitación manual. Después de inoculados los frascos, éstos fueron tapados con papel aluminio y sellados con cinta adhesiva, posteriormente fueron dejados en un cuarto de crecimiento. Las condiciones de temperatura y humedad relativa, del cuarto de crecimiento fueron registradas diariamente por medio de un termómetro de máximos y mínimos y uno de bulbo seco y bulbo húmedo. La humedad relativa que se registró durante el ensayo de producción fue de 89% con una desviación estandar de 6%. La temperatura mínima registrada fue de 25 °C y la máxima fue de 30 °C, registrándose para ambas una desviación estandar de 1.2 °C. El periodo de luz fue de 12 horas continuas y 12 de oscuridad.

1.3 Recolección de las conidias producidas.

Después de seleccionados los frascos de cada cepa/periodo de incubación, se procedió a la recolección de las conidias de *B. bassiana* de la siguiente forma: el arroz inoculado se lavaba manualmente, utilizando 1 litro de agua destilada estéril más Tween-80 al 0.01%. El lavado se hizo sobre un tamiz de 0.2 mm (200 micras), la suspensión obtenida se depositaba en frascos de vidrio con capacidad de 5 litros. Seguidamente, la suspensión se centrifugó a 4000 revoluciones/min durante 30 minutos. La centrífuga utilizada tiene capacidad de 500 ml (4 tubos con capacidad de 125 ml cada uno) por lo que ese fue el volumen de suspensión centrifugado cada vez. Una vez cumplido el tiempo de centrifugación, se esperaban 5 minutos para desechar el sobrenadante y guardar la crema de conidias. La crema así obtenida, se depositaba en frascos de vidrio, los que se guardaban en refrigeración a 4 °C para estimar posteriormente su concentración y volumen.

Para determinar la concentración se preparó una dilución 1:100; haciendo 4 lecturas/cepa en una cámara de conteo Neubauer. El volumen de la crema obtenida para cada frasco/cepa se midió utilizando una probeta graduada.

1.4 Viabilidad de conidias producidas.

Además de medir la producción de conidias/cepa, también se evaluó la viabilidad de dichas conidias por medio de pruebas de germinación. Para ello se utilizó un Diseño Completamente Aleatorio (DCA) con 4 repeticiones/cepa; cada repetición estuvo constituida por 4 platos petri. En cada plato petri se hicieron dos lecturas observando 200 conidias en cada una (400 conidias/plato petri). Por cada repetición se hicieron 8 lecturas para cada frasco/cepa (4 platos petri y 2 lecturas/plato petri); cada vez se utilizaron las conidias producidas por las diferentes cepas con 22 días de incubación. En cada caso se anotó el número total de conidias y el número de conidias germinadas para obtener el % de germinación.

Se realizó un análisis de varianza con los datos de % de germinación, los que previamente fueron transformados mediante la fórmula arco seno $\sqrt{\%}$, también se hizo una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Para hacer las pruebas de germinación, se prepararon suspensiones en agua destilada estéril de concentración 1×10^6 conidias/ml para cada cepa.

Las pruebas de germinación se realizaron en portaobjetos colocados en forma de cruz sobre platos petri. En los extremos del portaobjeto superior se colocó 0.1 ml de MEA y 0.001 ml de la suspensión de conidias (aproximadamente 1000 conidias). Después de inoculado el medio, este se dejaba en el cuarto de crecimiento por 16 horas, período después del

cual se observaban al microscopio. Las condiciones de luz fueron: 10 horas de oscuridad continua y 6 horas de luz.

La germinación se anotó 16 horas después de la inoculación, esto debido a que en pruebas preliminares realizadas en diferentes períodos de tiempo, se observó que este tiempo, permitía contar el mayor número de conidias germinadas para todas las cepas sin que los micelios de éstas, estuviesen totalmente entrecruzados (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prueba preliminar de germinación de 6 cepas de *B. bassiana* con diversos períodos de incubación en medio de cultivo.

Cepa	% de Germinación		
	10(1)	12(1)	16(1)
IIBC 033	49.19	72.97	83.36
IIBC 035	44.76	69.00	88.09
IIBC 036	55.99	77.33	88.11
NICA 038	62.13	77.55	82.46
NICA 116	49.93	66.71	85.21
BRAS 447	56.79	75.35	90.26

Nota: las conidias utilizadas fueron cultivadas en arroz entero por 16 días.

(1) horas de incubación.

La capacidad física impidió hacer las lecturas de germinación simultáneamente para todas las cepas una vez cumplido el período de incubación, por lo que fue necesario detener la germinación de las conidias por medio del almacenamiento en refrigeración a 4 °C de los platos petri, los cuales fueron sacados paulatinamente conforme se iban haciendo las lecturas de germinación.

E. Virulencia de las cepas de *B. bassiana*.

Se evaluó la respuesta de mortalidad en el tiempo y la esporulación a las seis cepas, utilizando 2 concentraciones: una llamada alta (1×10^8 conidias/ml) y otra baja (1×10^6

conidias/ml). La selección de las concentraciones se hizo considerando que la literatura menciona que para hongos, éstas son suficientes para causar muerte por micosis a los insectos (Lipa 1975; Ferron 1981). Las evaluaciones se realizaron cada 2 días, partiendo desde el primer día hasta 15 días después de la inoculación.

Se obtuvieron 12 suspensiones al combinar cada cepa y concentración de conidias de *B. bassiana*. Cada combinación de cepa/concentración se aplicó a 50 brocas hembras en cada una de 4 repeticiones, anotando en cada evaluación la mortalidad y esporulación observada. Para cada repetición, se seleccionaron únicamente las brocas más móviles; asimismo, cada vez se contó con un testigo (sin aplicación de conidias del hongo). Cuando en el testigo de cada repetición se observaba 10% o más de mortalidad el bioensayo se descartaba, es decir, no se incluyó ninguno de los datos obtenidos al momento de realizar el análisis.

Los datos de mortalidad fueron corregidos con los datos del tratamiento testigo, utilizando para ello la fórmula de Abbott (1925). Con los datos de mortalidad corregidos se realizó un análisis Probit. Colateralmente al análisis Probit se realizó un análisis de varianza de arreglo bifactorial en bloques completos al azar, para los datos de mortalidad y esporulación por cada período de evaluación, previo a ello los datos fueron transformados por medio del arco seno (%).

Para preparar las suspensiones, se utilizó parte de la crema de conidias obtenida de los ensayos de producción. Las conidias utilizadas en el ensayo de virulencia tenían un día de almacenamiento, ya que inmediatamente después de su recolección se determinaba la concentración y seguidamente se evaluaba su viabilidad. Las concentraciones usadas en los bioensayos fueron ajustadas a conidias viables para todos los

casos, utilizando para ello, los porcentajes de germinación obtenidos para cada cepa en la evaluación de viabilidad.

La inoculación de los insectos fue similar a la descrita en la sección C de este capítulo, excepto que en este caso, después de inocularse, cada broca fue colocada en copas plásticas de 1 onza previamente esterilizadas, poniendo un fruto de café/copa para que le sirviera de alimento. En cada copa se colocó un cuadro de papel filtro de aproximadamente 0.5 cm², con el objetivo de humedecer el papel con agua destilada para favorecer la esporulación del hongo una vez que el insecto hubiese muerto.

En las evaluaciones se anotó el número de brocas muertas y el número de brocas con micosis aparente (esporuladas). Cada insecto se observaba al esteroscopio y se consideraba muerto cuando al tocarlo no se observaba movimiento, mientras que la esporulación podía observarse a simple vista ya que el insecto estaba cubierto por una delgada capa blanca.

En algunos casos, la broca penetró los frutos de café por lo que fue necesario disectarlos para observar su estado, la disección se hizo con bisturí y aguja de disección.

En el período de ensayo se anotó la humedad relativa y temperatura registrada en el laboratorio haciendo uso de un termómetro de bulbo seco y húmedo, y uno de temperaturas máximas y mínimas. La humedad relativa registrada durante el ensayo de virulencia fue de 90% con una desviación estandar de 4 %. Los promedios de las temperaturas mínimas y máximas registradas fueron 22 y 26 °C con una desviación estandar de 0.89 y 1.37 °C respectivamente.

III RESULTADOS Y DISCUSION.

A. Producción de *B. bassiana* en arroz.

La producción promedio de conidias registrados para cada cepa de *B. bassiana* en los diferentes períodos de incubación presentaron una tendencia ascendente hasta los 16 días de incubación (cepas IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 Y BRAS 447), período después del cual empiezan a observarse variaciones (Figura 1). El comportamiento en producción de conidias para las cepas IIBC 036 y NICA 038 fue ascendente hasta con 19 días de incubación, descendiendo su producción con 22 días de incubación.

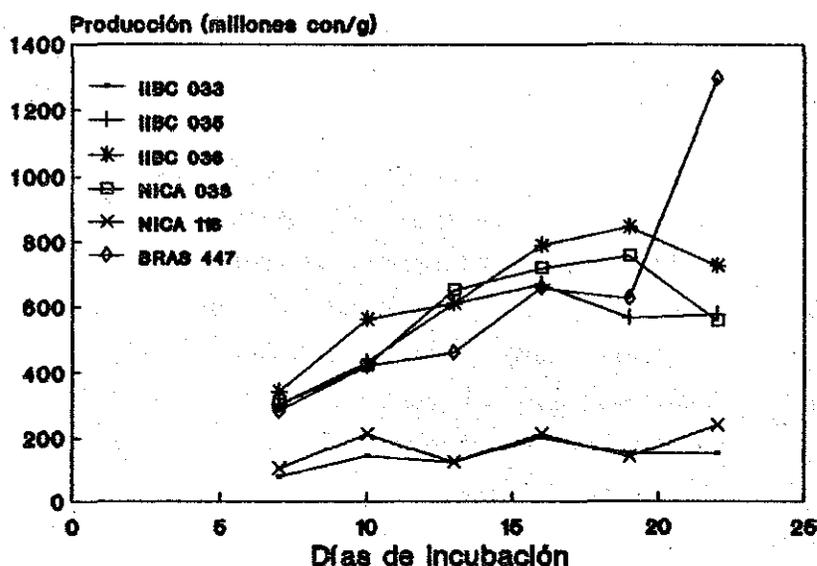


Figura 1. Producción promedio de las cepas de *Beauveria bassiana* cultivadas en arroz con diversos períodos de incubación.

La cepa BRAS 447 mostró en casi todos los períodos de incubación una producción ascendente, excepto con 19 días de incubación donde su producción de conidias se redujo ligeramente, sin embargo, en el último período de incubación

registró la máxima producción obtenida en el ensayo (Figura 1). Dicho resultado podría deberse principalmente a características propias de la cepa, ya que todas fueron cultivadas bajo condiciones similares. Aunque, la cepa BRAS 447 haya registrado la mayor producción de conidias, es importante señalar que hasta 19 DDI las cepas IIBC 035, IIBC 036 y NICA 038 presentaron similar tendencia respecto a ella.

La producción de conidias registrada por las cepas IIBC 033 y NICA 116 fue variable entre los diferentes períodos de incubación siendo en todos los casos inferior a la producción de conidias registrada por las demás cepas (Figura 1; Cuadro 3).

Es oportuno mencionar que visualmente se observaron diferencias en el comportamiento de las cepas; las cepas IIBC 033 y NICA 116 presentaron gran crecimiento de micelio y al momento de la recolección de conidias el sustrato se observaba mucho más compacto en relación a las demás cepas. Estos resultados no descartan la posibilidad de uso de éstas cepas, ya que en este estudio, solamente se consideró la producción de conidias. Para el caso de aplicaciones al suelo de *B. brogniartii*, se ha observado que más importante que la concentración de conidias es la aplicación de granos (cereal como medio de cultivo) cubiertos con micelio, ya que éstos tienen la posibilidad de seguir esporulando en el campo (Aregger 1992).

Aunque diversos factores son los que permiten la expresión del potencial productivo de una cepa, las características de cada una son importantes, ya que los factores ambientales y calidad del sustrato son fácilmente manipulados, no así las características genéticas de la cepa. Por lo que podría considerarse que los resultados obtenidos en estas pruebas evidencian la capacidad genética de las cepas.

IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 y BRAS 447 para una alta producción de conidias. Entre otras características, una alta tasa de producción de conidias por unidad de sustrato es importante en la selección de cepas (Prior 1991).

Cuadro 3. Producción promedio de 6 cepas de *Beauveria bassiana* cultivadas en arroz con diferentes periodos de incubación (PDI).

Cepa	D í a s d e i n c u b a c i ó n					
	7 con/g	10 con/g	13 con/g	16 con/g	19 con/g	22 con/g
IIBC 033	77b	140b	120c	200b	150b	150d
IIBC 035	300a	430a	610ab	670a	570a	580bc
IIBC 036	340a	560a	610ab	790a	850a	730b
NICA 038	300a	420a	650a	720a	760a	560c
NICA 116	100b	210b	120c	210b	140b	240d
BRAS 447	280a	420a	460b	660a	630a	1300a
Pr > f	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Nota: Promedios con la misma letra no son diferentes según prueba de Tukey ($p < 0.05$). La producción está expresada en millones de conidias/g de arroz.

Sin embargo, el sistema de producción utilizado también pudo haber influido en los resultados obtenidos ya que, otros sistemas de producción pueden permitir una mayor expresión de la capacidad productiva que el utilizado en este estudio. Por ejemplo, en Nicaragua, con la producción en bandejas se ha obtenido producciones de hasta 1×10^{11} con/g de arroz para la cepa NICA 038 (F. Guharay, Proyecto MIP/CATIE Nic., comunicación personal). La producción en bandejas brinda al hongo mayor superficie de crecimiento y sobre todo la recolección de conidias en seco es más eficiente (recolección en vibredor o 'zaranda') que al hacerlo con otros sistemas por lo que se obtiene mayor producción de conidias.

El análisis de varianza y las pruebas de Tukey indican que hubo diferencia significativa en la producción de conidias/g de arroz entre las cepas para todas las fechas de evaluación ($P > 0.0001$); dicha variación fue determinada principalmente por las cepas de *B. bassiana* utilizadas (Cuadro 3).

En conclusión general, las cepas BRAS 447, IIBC 035, IIBC 036 y NICA 038 presentaron los mayores niveles de producción de conidias, por lo que su inclusión en futuras evaluaciones debe ser considerada si este aspecto es el deseado.

1.1 Viabilidad de las conidias de *B. bassiana*.

El análisis de varianza para la viabilidad de las conidias cosechadas a los 22 días después de la inoculación detectó diferencias entre las cepas ($p < 0.0046$) (Cuadro 4). No obstante, las diferencias fueron pequeñas, alcanzando 7.1-7.3% entre las cepas BRAS 447 y el grupo formado por las cepas (IIBC 036, NICA 038 y NICA 116) según la prueba de Tukey ($p < 0.005$).

Las conidias, constituyen las estructuras infectivas de diversos hongos, por lo que su viabilidad es de gran interés, sobre todo teniendo en cuenta que existe una relación directa entre la cantidad de conidias infectivas y la mortalidad de los insectos por micosis (Ferron 1978). La viabilidad de las conidias es un factor a considerar en la producción de hongos entomopatógenos, ya que, tanto el proceso de producción y recolección como las características propias de cada cepa pueden afectarla.

B. Virulencia de *B. bassiana* sobre la broca del cafeto

La concentración alta de conidias de *B. bassiana* provocó mayor mortalidad respecto a la concentración baja en todas las

cepas evaluadas (Figuras 2 y 3). Las diferencias debido a concentración fueron significativas en todas las fechas de evaluación (Cuadro 5).

Cuadro 4. Análisis de varianza, producción promedio y viabilidad de 6 cepas de *Beauveria bassiana* cultivada en arroz.

Fuente de var.	Producción gl	pr>f	Fuente de var.	Viabilidad gl	pr>f
repet.	3	0.4898 ns	repet.	3	0.33 ns
cepa	5	0.0001 **	cepa	5	0.0046 *

Cepas	Prod. prom 22 DDI con/ml (1)	Viabilidad (2)	
		% obser	arco seno $\sqrt{\%}$
IIBC 033	150 d	85.9	1.1906 ab
IIBC 035	580 bc	87.3	1.2110 ab
IIBC 036	730 b	83.8	1.1597 b
NICA 038	560 c	83.6	1.1568 b
NICA 116	240 d	83.8	1.1565 b
BRAS 447	1300 a	90.9	1.2686 a

Nota: Promedios con la misma letra no difieren entre si según prueba de Tukey ($p < 0.05$).

(1) Producción expresada en millones de conidias.

(2) Para el análisis de varianza de la viabilidad los datos se transformaron usando arco seno $\sqrt{\%}$ germ.

El tiempo letal promedio (TL₅₀) obtenido por las diferentes cepas varió dentro de una misma concentración, registrándose menores valores al utilizar la concentración alta respecto a la concentración baja.

Al utilizar la concentración baja de conidias de *B. bassiana* se observaron diferencias de TL₅₀ entre las cepas BRAS 447, IIBC 036 y NICA 116 (7.4, 7.5 y 10 días respectivamente). En la concentración alta la cepa IIBC 035 tuvo el menor TL₅₀ (5 días), mientras las cepas Nica 116 e IIBC 033 registraron los mayores valores (6.9 y 7.6 días

respectivamente), es decir, duraron más tiempo para causar 50% de mortalidad (Cuadro 6).

Cuadro 5. Análisis de varianza para la mortalidad de la broca del cafeto causada por 6 cepas de *Beauveria bassiana* usando 2 concentraciones (1×10^8 y 1×10^9 con/ml).

m o r t a l i d a d							
F de V	Días después de la inoculación						
	5	7	9	11	13	15	
GL	pr>f	pr>f	pr>f	pr>f	pr>f	pr>f	
Bloque	3	0.0227	0.0002*	0.0029*	0.0040*	0.0074*	0.0212*
Cepa	5	0.3453	0.2078	0.2436	0.0446*	0.0455*	0.1510
Concen.	1	0.0468*	0.0041*	0.0010*	0.0010*	0.0013*	0.0014*
C*Conc	5	0.7671	0.9934	0.9815	0.9404	0.9845	0.9986

Nota: los datos de mortalidad para este análisis fueron transformados al arco seno $\sqrt{\%}$; *= efecto significativo al 5%

Mientras, en la concentración alta la diferencia en los TL₅₀ obtenidos correspondió a las cepas IIBC 035 e IIBC 033 obteniéndose los valores de 4.96 y 7.60 días respectivamente (Cuadro 6).

La variación entre los TL₅₀ de algunas cepas dentro de una misma concentración podría evidenciar diferencias en su virulencia. La mayor mortalidad y menor TL₅₀ son características deseables para el manejo de una plaga, pudiéndose lograr niveles satisfactorios de ambos al seleccionar una cepa de alta virulencia o por incrementar la concentración en el caso de cepas con menor virulencia. En el caso de preferir una cepa de menor virulencia por alguna razón (por ejemplo características de producción), la posibilidad de mejorar su capacidad letal podría lograrse aumentando su concentración.

El TL₅₀ es una expresión cuantitativa de la tolerancia de una especie de insectos a un agente de control bajo ciertas condiciones (Busvine 1971). Altos valores de TL₅₀ indican baja virulencia de la cepa utilizada, no obstante, se ha

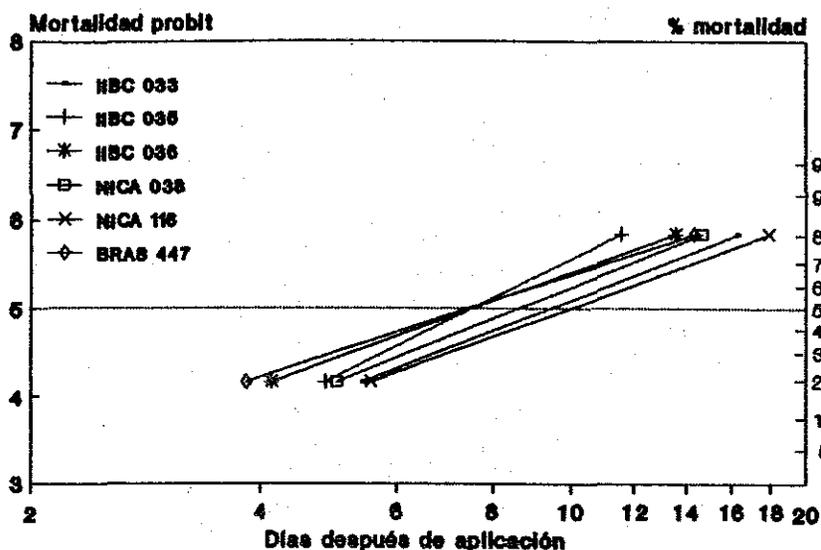


Figura 2. Mortalidad corregida de la broca del cafeto expresada en probit y porcentaje contra el logaritmo del tiempo de mortalidad causada por seis cepas de *Beauveria bassiana* usando la concentración de 1×10^6 con/ml.

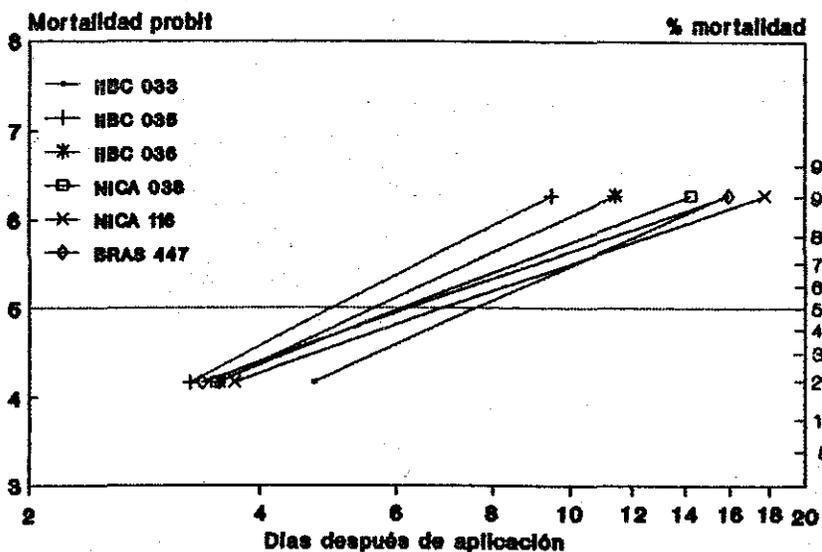


Figura 3. Mortalidad corregida de la broca del cafeto expresada en probit y porcentaje contra el logaritmo del tiempo de mortalidad causada por seis cepas de *Beauveria bassiana* usando la concentración de 1×10^8 con/ml.

observado que la mortalidad tiene correlación positiva en cuanto a la concentración de conidias utilizada (Bell y Hamale 1970).

Cuadro 6. Tiempos letales promedio (TL₅₀) de la broca del cafeto causados por 6 cepas de *Beauveria bassiana* con 2 concentraciones (1 x 10⁸ y 1 x 10⁹ conidias/ml).

Cepa	Conc. con/ml	TL ₅₀ (días)	I.C. <95%> inf. sup.	Pendiente ± E.E	X ²	Prob.
IIBC 033	1 x 10 ⁸	9.4 ab	8.35 10.60	3.5± 0.24	20.695	0.002
IIBC 035	1 x 10 ⁸	7.5 ab	6.55 8.60	4.4± 0.25	33.488	0.001
IIBC 036	1 x 10 ⁸	7.5 a	6.57 8.54	3.2± 0.20	20.677	0.002
NICA 038	1 x 10 ⁸	8.6 ab	7.75 9.50	3.6± 0.23	15.692	0.015
NICA 116	1 x 10 ⁸	10.0b	8.57 11.59	3.3± 0.23	29.239	0.005
BRAS 447	1 x 10 ⁸	7.41a	6.55 8.37	2.9± 0.19	15.275	0.018
IIBC 033	1 x 10 ⁹	7.6c	6.80 8.49	4.0± 0.23	19.798	0.003
IIBC 035	1 x 10 ⁹	5.0a	4.43 5.56	4.5± 0.23	15.899	0.014
IIBC 036	1 x 10 ⁹	5.6ab	5.32 5.94	4.1± 0.22	8.797	0.185
NICA 038	1 x 10 ⁹	6.1abc	5.41 6.90	3.4± 0.19	15.831	0.014
NICA 116	1 x 10 ⁹	6.9bc	5.79 8.20	3.1± 0.19	31.948	0.002
BRAS 447	1 x 10 ⁹	6.2abc	5.53 7.01	3.1± 0.18	13.516	0.035

Nota: TL₅₀ con la misma letra no son diferentes considerando el criterio de traslape de los intervalos de confianza con otras cepas de la misma agrupación.

En un estudio previo, usando una concentración de 1 x 10⁷ con/ml de las cepas IIBC 033, IIBC 035 e IIBC 036, los TL₅₀ (llamado tiempo de sobrevivencia o TS por el autor) de una población hondureña de broca fue de 8.34, 6.17 y 6.23 días respectivamente (Lazo 1990).

Esos valores, son intermedios entre los obtenidos en el estudio actual para la concentración alta (1 x 10⁸ con/ml) y baja (1 x 10⁶ con/ml). Las diferencias entre los resultados previos y los encontrados en este estudio podrían deberse a las condiciones de prueba o con mayor probabilidad a las concentraciones utilizadas. Similares resultados en cuanto a reducción de TL₅₀ se han observado con la cepa BRAS 447 al

utilizar concentraciones altas contra el picudo de la caña (*Sphenophorus levi*) (Badilla y Alves 1991).

Las diferencias en TL₅₀ detectadas al utilizar la concentración alta para las cepas IIBC 033 e IIBC 035 confirma los resultados obtenidos por Lazo (1990) en cuanto a la variación existente entre cepas recolectadas dentro de un área pequeña, las cuales posiblemente son provocadas por las condiciones específicas del sitio de recolección.

Las diferencias de pendiente entre la concentración alta y baja fueron inconsistentes. En los casos de las cepas NICA 116 y NICA 038 las pendientes sufrieron un ligero aumento cuando se utilizó la concentración baja. En los demás casos hubo una reducción que ligera (cepa IIBC 035) a una reducción de 12.5% (IIBC 033). Las pendientes de la respuesta de mortalidad indican la homogeneidad o heterogeneidad de la respuesta obtenida; altos valores indican mayor homogeneidad en la respuesta, se espera que menos insectos tarden más en morir, caso contrario ocurre cuando los valores son bajos, es decir, existe heterogeneidad en la respuesta, se espera que muchos insectos tardan más en morir.

La cepa BRAS 447 en la concentración baja presentó la menor pendiente (2.9). Mientras, con la concentración alta se observaron dos grupos, correspondiendo a las cepas NICA 038, NICA 116 y BRAS 447 los menores valores de pendiente mientras, las cepas IIBC 033, IIBC 036 e IIBC 035 registraron los valores más altos (Cuadro 6).

Los insectos afectados por *B. bassiana* no siempre muestran síntomas aparentes de micosis, (micelio sobre el cuerpo del insecto). En algunos casos el insecto no presenta síntomas de micosis debido a que el hospedante limita el crecimiento del hongo en el hemocele o porque las condiciones

de temperatura y humedad relativa no son favorables para la conidiogénesis (Roberts 1981).

La formación de estructuras reproductivas sexuales o no por parte de los hongos entomopatógenos, es esencial para completar el ciclo patogénico y, desde el punto de vista epidemiológico, es importante (Ferron 1985).

Se anotó el porcentaje de insectos muertos que esporularon, considerando que podría ser una característica deseable al seleccionar cepas para futuras evaluaciones de campo, asumiendo que las conidias podrían actuar como agentes de diseminación o de supervivencia del hongo.

La mayoría de cepas de *B. bassiana* iniciaron su esporulación sobre la broca del cafeto entre los 5 y 7 días después de su inoculación, aumentando hasta la finalización del período de prueba (15 días después de la inoculación) (Figuras 4 y 5). Al igual que en el caso de mortalidad la esporulación de *B. bassiana* sobre las brocas muertas fue mayor cuando se utilizó la concentración alta respecto a la concentración baja. La diferencia fue significativo o se aproximó a la significancia ($p < 0.05$) en todas las fechas después de 7 DDI (Cuadro 7).

Las cepas NICA 038 y NICA 116 registraron la menor esporulación con la concentración baja (26 y 28 % respectivamente) al finalizar el período de ensayo; mientras, las cepas IIBC 035 y BRAS 447 fueron las que alcanzaron los mayores porcentajes de esporulación tanto al usar la concentración baja (47 y 52%) como al usar la concentración alta (70 y 61 %) (Figuras 4 y 5).

Las cepas que produjeron la mayor mortalidad tendieron a ser las que también registraron el mayor % de esporulación (ejemplo: IIBC 035, BRAS 447, IIBC 036) y viceversa (ejemplo

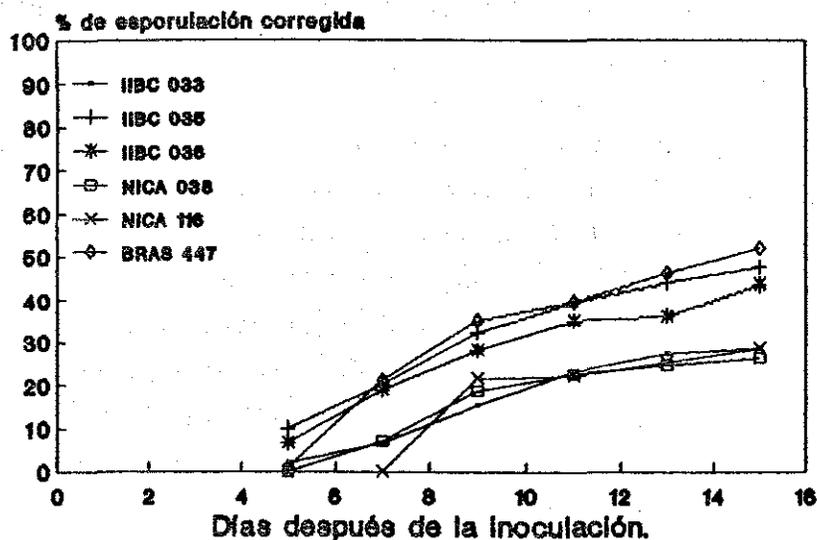


Figura 4. Porcentaje de esporulación de seis cepas de *Beauveria bassiana* sobre adultos de broca del cafeto muertos al usar 1×10^8 con/ml

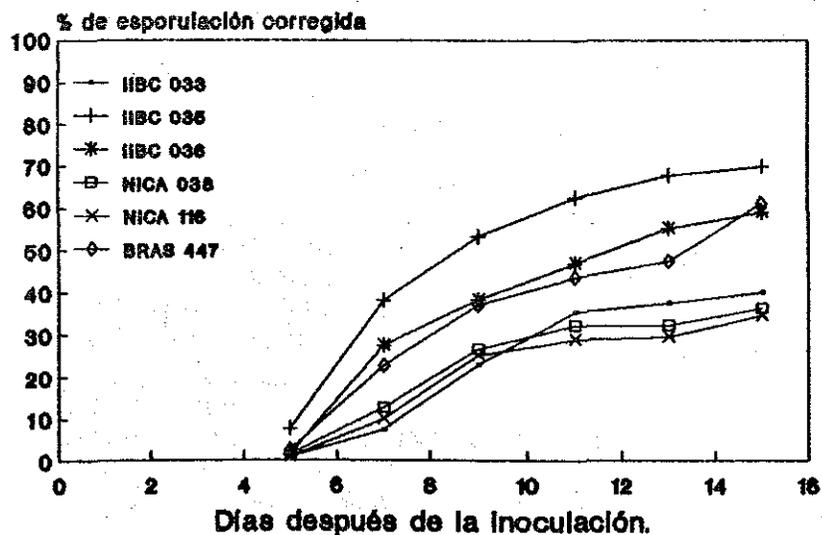


Figura 5. Porcentaje de esporulación de seis cepas de *Beauveria bassiana* sobre adultos de broca del cafeto muertos al usar 1×10^8 con/ml.

cepa NICA 116). Sin embargo, la cepa NICA 038, a pesar de ubicarse dentro del grupo de mayor virulencia según el valor de TL₅₀ (Cuadro 6) registró baja esporulación (Figuras 4 y 5). Podría pensarse que esta cepa difiere en algunos aspectos de su biología de las demás cepas probadas ya que produce alta mortalidad, pero, baja incidencia de micosis.

Varios factores pueden estar involucrados en causar la mortalidad de insectos infectados por entomopatógenos, Charnley (1991) considera que es imposible precisar con certeza una sola causa. Entre otros factores, se ha demostrado que algunas especies de entomopatógenos producen toxinas dentro del hospedante y que éstas contribuyen al efecto del hongo sobre el insecto (Roberts 1981).

Considerando los resultados obtenidos en el ensayo de producción, en el de virulencia y los antecedentes de las diversas cepas, se sugiere que futuros estudios se hagan con las cepas de mayor producción y las que presentaron menores TL₅₀ y mayor mortalidad.

Cuadro 7. Análisis de varianza para la esporulación de la broca del cafeto causada por 6 cepas de *Beauveria bassiana* usando 2 concentraciones (1×10^6 y 1×10^8 con/ml).

e s p o r u l a c i ó n %							
F de V	Días después de la inoculación						
	5	7	9	11	13	15	
GL	pr>f	pr>f	pr>f	pr>f	pr>f	pr>f	
Bloque	3	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*
Cepa	5	0.0821	0.0082*	0.1065	0.0458*	0.0138*	0.0021*
Concen.	1	0.5964	0.0411*	0.0744	0.0496*	0.0537	0.0160*
C*Conc	5	0.9351	0.8233	0.9064	0.9622	0.7929	0.9340

Nota: C*Conc = cepa * concentración.

* = efecto significativo $p < 0.05$

los datos de % de esporulación fueron transformados usando arco seno $\sqrt{\%}$ antes de análisis.

CONCLUSIONES

-Las cepas de *B. bassiana* IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 y BRAS 447 fueron las mejores productoras de conidias bajo el sistema de cultivo utilizado, la cepa BRAS 447 mostró una producción significativamente mayor que todas las demás cepas a los 22 días de incubación..

-Las cepas de *B. bassiana* cultivadas en arroz entero presentaron diferencias en su viabilidad. Sin embargo, la magnitud de las diferencias no fue mayor a 7.3% por lo que se considera de poca importancia práctica.

-La cepas de *B. bassiana* utilizadas contra la broca del cafeto presentaron variaciones en el tiempo letal medio (TL₅₀) obtenido dentro de una misma concentración. La cepa BRAS 447 tuvo el TL₅₀ más bajo en la concentración de 1×10^6 con/ml, mientras, en la concentración alta correspondió a la cepa IIBC 035. Estas dos cepas más la IIBC 036 y NICA 038 quedaron en el mejor grupo de ambas concentraciones.

-Con la excepción de la cepa NICA 038, las cepas de mayor virulencia también tuvieron alta esporuLa esporulación y las de menor virulencia, tuvieron baja esporulación. Para la cepa NICA 038 se sugieren diferencias biológicas en su proceso patogénico.

RECOMENDACIONES

-Incluir en futuras evaluaciones las cepas IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 y BRAS 447, ya que estas presentaron las mejores características de producción, mayor mortalidad y menor TL₅₀ en este estudio.

-Determinar la CL₅₀ para las cepas IIBC 035, IIBC 036, NICA 038 y BRAS 447, esto posiblemente permitirá seleccionar con mayor seguridad las cepas más virulentas, en caso de que sea la característica deseada.

-Determinar el período óptimo de incubación de las cepas de *B. bassiana*, considerando aspectos biológicos y económicos.

-Desarrollar y evaluar formulaciones básicas a nivel de campo y laboratorio con las cepas preseleccionadas para evaluar su comportamiento bajo tales condiciones.