

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUR OCCIDENTE
INGENIERIA EN AGRONOMÍA TROPICAL

TRABAJO DE GRADUACIÓN



Evaluación de medios de cultivo y tipos de envases para almacenaje en la producción de *Beauveria bassiana* en Finca Santa Anita, Zunilito, Suchitepéquez.

T.P.A. PEDRO LEONARDO CALEL HERNANDEZ
CARNÉ: 201240686

Mazatenango, Septiembre de 2019.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUR OCCIDENTE**

AUTORIDADES

Ing. Murhpy Olimpo Paiz Recinos

Rector

Arq. Carlos Enrique Valladares Cerezo

Secretario General

**MIEMBROS DE CONSEJO DIRECTIVO DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE
SUROCCIDENTE**

Dr. Guillermo Vinicio Tello Cano

Director

REPRESENTANTES DE DOCENTES

M.Sc. José Norberto Thomas Villatoro

Secretario

Dra. Mirna Nineth Hernández Palma

Vocal

REPRESENTANTE GRADUADO DEL CUNSUROC

Lic. Vilser Josvin Ramírez Robles

Vocal

REPRESENTANTES ESTUDIANTILES

T.P.A. Angélica Magaly Domínguez Curiel

Vocal

PEM y TAE. Rony Roderico Alonso Solís

Vocal

AUTORIDADES DE COORDINACIÓN ACADÉMICA

M.Sc. Héctor Rodolfo Fernández Cardona
Coordinador Académico

M.Sc. Rafael Armando Fonseca Ralda
Coordinador Carrera de Licenciatura en Administración de Empresas

Lic. Edin Anibal Ortiz Lara
Coordinador Carrera de Licenciatura en Trabajo Social

PhD. René Humberto López Cotí
Coordinador de la Carrera de Pedagogía

M.Sc. Víctor Manuel Nájera Toledo
Coordinador Carrera Ingeniería en Alimentos

M.Sc. Erick Alexander España Miranda
Coordinador Carrera Ingeniería en Agronomía Tropical

M. Sc. Karen Rebeca Pérez Cifuentes
Coordinadora Carera Ingeniería en Gestión Ambiental Local

Lic. José David Barrillas Chang
Coordinador Carrera de Licenciatura en Ciencias Jurídicas
y Sociales, Abogacía y Notariado

Lic. José Felipe Martínez Domínguez
Coordinador de Área Social

CARRERAS PLAN FIN DE SEMANA

M. Sc. Tania Elvira Marroquín Vásquez
Coordinador de las Carreras de Pedagogía

M.Sc. Paola Rabanales
Coordinador Carrera Periodismo Profesional y
Licenciatura de la Comunicación

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA



Centro Universitario del Sur Occidente

Mazatenango, Agosto de 2019

CUNSUROC
Mazatenango, Suchitepéquez

Honorable Consejo Directivo
Centro Universitario del Sur Occidente
Universidad de San Carlos de Guatemala

Respetables Miembros del Consejo Directivo:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el Trabajo de Graduación titulado: **Evaluación de Medios de Cultivos Orgánicos y Medios de recipientes para la producción de *Beauveria bassiana* para el Control Biológico de *Hypothenemus hampei* en el cultivo de café, Finca Santa Anita, Zunilito Suchitepéquez**, presentado como requisito previo para optar al título de Ingeniero Agrónomo, en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Sin otro particular, me suscribo

Atentamente

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

T.P.A Pedro Leonardo Calel Hernández
Carné: 201240686

ACTO QUE DEDICO

A:

Dios: Por permitirme culminar la etapa como profesional, guiándome en todos los momentos de mi vida y fortaleciéndome para superar cada obstáculo.

Mis Padres: **Pedro Calel Gómez y María Estela Hernández Barrios**, por ser los pilares de ejemplos fundamentales en mi vida y enseñarme el camino de la sabiduría, y fortaleza para luchar por alcanzar mis metas y apoyarme en mi carrera como profesional.

Mis hermanos: **Eluvia, Orlando, Lorena y José**, por estar siempre apoyándome y creer en que podía lograr alcanzar el sueño de ser Universitario.

Mis sobrinos: Que este triunfo logrado se de inspiración para seguir superándose y creyendo en que las metas se pueden lograr.

Familiares: Por los consejos y el apoyo espiritual que en su momento me brindaron.

Compañeros: Por todo el esfuerzo, desvelos, dedicación y apoyo moral brindado para superar obstáculos.

Amigos: Por el apoyo moral, consejos y regaños brindados para poder superar obstáculos

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Universitario de Sur Occidente de la Universidad de San Carlos de Guatemala: por ser mi Alma Mater y darme la oportunidad de ser Profesional.

Al Claustro de Docentes de la Carrera de Agronomía Tropical: Por brindarme su valioso conocimiento en mi formación como profesional.

A mi Asesor Ing. Agr. Augusto Israel Solares: Por el asesoramiento en la elaboración del documento en el Ejercicio Profesional Supervisado.

A Finca Santa Anita: Por abrirme las puertas para realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado.

Al Equipo de Trabajo de Finca Santa Anita: Por brindarme su experiencia y compartir información, para la elaboración del documento.

Al Sr. Marco Antonio de León: Propietario de la finca por el apoyo y confianza brindada en mi persona para poder Ejercer el Ejercicio Profesional Supervisado.

INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1. El cultivo de café (<i>Coffea arabica</i>) de Guatemala.....	3
1.1 Características de las variedades del café de Guatemala	3
2. Plagas del Cultivo de Café.....	4
2.1 Cochinillas de la raíz <i>Dysmicoccus cryptus</i>	4
2.3 Minador de la hoja <i>Leucoptera coffeellum</i>	4
2.4 Gallina ciega <i>Phyllophaga spp</i>	5
2.5 Araña roja <i>Oligonychus yothersi McGregor</i>	5
2.6 Escamas <i>Pseudococcus sp.</i>	5
2.7 El chacuatete <i>Idiarthron subquadratum</i>	5
2.8 Barrenador del tallo <i>Plagiohammus colombiensis</i>	6
2.9 Tortuguilla <i>Diabrotica spp</i>	6
2.10 Grillo del cafeto <i>Paraecathus Dominicanae Sauss</i>	6
2.11 Las babosas <i>Colosius pulcher</i>	7
2.12 Pulgones <i>Aphis coffeae</i>	7
2.13 La broca del café <i>Hypothenemus hampei F.</i>	7
2.13.1 La broca como plaga del café en Guatemala	8
2.13.2 Importancia económica	8
2.13.3 Manejo integrado de la broca del café (MIB).....	9
2.13.3.1 Control cultural	9
2.13.3.2 Control manual	10
2.13.3.3 Control etológico (uso de trampas)	10
2.13.3.4 Control químico	10
2.13.3.4 Control biológico.....	10
2.13.3.4.1 Parasitoides	11
2.13.3.4.2 Entomopatógenos	11
3. ¿Que es <i>Beauveria bassiana</i> ?.....	11
3.1 Forma y modo de acción.....	13
3.2 Aspersiones del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	13
3.3 Producción de hongos entomopatógeno	13
3.4 Uso de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas agrícolas.....	14
3.5 Ventajas del uso de hongos entomopatógenos como agentes de control	15
3.6 Modo de acción de los hongos entomopatógenos sobre los insectos	16
3.7 Adhesión	17
3.8 Germinación.....	17
3.9 Penetración	18
3.10 Multiplicación del hongo en el homocelo.....	18
3.11 Producción de toxinas	18
3.12 Muerte del insecto	19
3.13 Colonización total.....	19

3.14	Emergencia del hongo hacia el exterior	19
3.15	Matrices y bolsas	20
3.16	Control de calidad en la etapa de producción	20
3.17	Control de calidad de matriz.....	20
3.18	Control de calidad de bolsa.....	21
3.19	Colecta de insectos.....	21
3.19.1	Colocación de los insectos en jaulas o cajas	22
3.19.2	Exposición del insecto al hongo	22
3.19.2.1	Inmersión	22
3.19.2.2	Aspersión	23
3.20	Aspectos fundamentales a tomar en cuenta para la producción del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en el campo o laboratorio	24
3.20.1	Asepsia	24
3.20.2	Lavado	24
3.20.3	Esterilización	24
3.20.4	Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento)	25
3.21	Características morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i>	25
3.21.1	Raquis.....	26
3.21.2	Conidias	26
3.22	Conteo de conidias en el hematocímetro o cámara de Neubauer	27
3.22.1	Procedimiento	27
3.22.2	Multiplicación de hongos entomopatógenos sobre sustratos naturales	28
3.22.3	Inoculación del sustrato.....	29
3.22.4	Preparación del inóculo.....	29
3.22.5	Inoculación al sustrato.....	29
3.22.6	Conteo del número de estructuras propagativas.....	29
4.	Bioensayos.....	30
III.	OBJETIVOS	32
IV.	HIPÓTESIS.....	33
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
1.	Materiales.....	34
2.	Métodos.....	35
2.2	Preparación de laboratorio.....	38
2.3	Obtención de materiales a utilizados en el laboratorio.....	39
2.4	Obtención de la Cepa de <i>Beauveria bassiana</i>	40
2.5	Limpieza y desinfección de los medios de cultivos y envases.....	41
2.6	Medios de cultivo	43
2.7	Conteo de conidias	44
2.8	Introducción del sustrato en envases.....	45
2.9	Siembra de conidias	45
2.10	Almacenaje de los medios en estudio.....	46
2.11	Conteo de conidias obtenidas por sustratos	48
3.	Comprobación del porcentaje de mortalidad de <i>Beauveria bassiana</i> sobre el insecto <i>Hypothenemus hampei</i> F. a nivel de laboratorio y en campo definitivo en el cultivo de café en producción... ..	50

3.1 Recolección de frutos e insectos.....	50
VI. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	53
VII. CO NCLUSIONES	65
VIII. RECOMENDACIONES.....	67
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
X. ANEXOS.....	71

Índice de Figuras

No.	Contenido	Pág.
1	Ciclo de vida de la broca del café <i>Hypothenemus hampei</i> F.....	8
2	Ploriferación de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i> F. Conidias del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	12 12
3		26
4	Sectorización de la cámara Neaubeauer en donde se realiza el conteo de conidias.....	28
5	Preparación y desinfección del área de trabajo.....	39
6	Equipo y materiales a utilizar en el laboratorio.....	40
7	Cepa de <i>Beauveria bassiana</i>	41
8	Lavado, limpieza y desinfección de envases.....	43
9	Eliminación de impurezas y pre-cocción de los sustratos orgánicos.....	44
10	Introducción de sustratos en los envases.....	45
11	Esterilización de materiales a utilizar e inocuación de la cepa <i>Bauveria bassiana</i>	46
12	Almacenamiento de los ejemplares en investigación.....	47
13	Recipiente de muestra para medir colonización de <i>Beauveria bassiana</i>	48
14	Observación y conteo de conidias.....	49
15	Comprobación de virulencia de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i> F.....	51
16	Croquis de los lugares más afectados por <i>Hypothenemus hampei</i> ...	51
17	Porcentaje de infestación de <i>Hypothenemus hampei</i> F. cosecha 2018-2019 en finca Santa Anita.....	62
18	Medio de cultivo Sorgo.....	72
19	Contaminación del sustrato pulpa de café.....	72
20	Preparación de suspensión de <i>Beauveria bassiana</i> 1×10^4	73
21	Colocación de colonias de broca <i>Hypothenemus hampei</i> F. en cajas de Petri.....	73
22	Broca alimentándose del fruto de café.....	74

Índice de Cuadros

No.	Contenido	Pág.
1	Factores a Evaluar en la producción de <i>Beauveria bassiana</i>	35
2	Distribución del ensayo colocadas en el área de laboratorio.....	36
3	Conteo y cálculo de conidias obtenidas en el laboratorio sin transformación de datos	53
4	Conteo y cálculo de conidias obtenidas en el laboratorio con datos transformados.....	54
5	Anova del cálculo total del promedio de conidias obtenidas por tratamiento.....	55
6	Resumen análisis de varianza.....	55
7	Matriz de diferencia de colonización de <i>Bauveria bassiana</i> sobre los sustratos evaluados	56
8	Presentación de resultados del factor A	56
9	Matriz de diferencia de datos los datos de recipientes para envasar y colonizar <i>Beauveria bassiana</i>	57
10	Presentación de resultados del factor B.....	57
11	Porcentaje de brocas muertas por repetición a nivel de laboratorio....	58
12	Determinación de los costos por unidad producida.....	59
13	Costo por unidad y porcentaje de mortalidad del insecto.....	60
14	Porcentaje de Mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> obtenidos luego de la aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> en el cultivo de café.....	61
15	Comparación de pérdidas por cosecha debido a <i>Hypothenemus hampei</i> F	63
16	Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> sobre los sustratos y tipos de envase utilizado en el experimento.....	72

Summary

Finca Santa Anita is located in the municipality of Zunilito in the department of Suchitepéquez, 175 km from Guatemala City, at coordinates North latitude 14 ° 39'2.16 "and west longitude 91 ° 29'34.1", at 1198 m. height above sea level. (amsl), with an extension of 135.39 hectares of which 131.45 hectares are occupied with the coffee crop *Coffea arabica*, with the varieties, Caturra, Catuaí, Sarchimor and Borbón.

Finca Santa Anita not having different control alternatives for the *Hypothenemus hampei* F. coffee berry borer, many times the plague shoots up towards its high levels of population, mainly affecting coffee fruits, causing high levels of economic losses in the production on the farm.

According to the importance value of the problems detected within the farm, it was determined, among which the problem with the coffee borer *Hypothenemus hampei* F., is the one that stands out for the economic losses that this insect represents, being able to notice in a sampling carried out in the month of February 27% of infestation. If you look for the economic side are 1237.14 quintals of coffee cherry affected from the 4590 obtained in the 2016-2017 harvest according to the yields obtained within the farm corresponding to 257 quintals of coffee parchment. This in the local market achieves a total of Q192,879.00 at a price of Q750.00 per quintal for the aforementioned harvest. Therefore, the methodology of the biological control of the insect *Hypothenemus hampei* F. was implemented through the production and use of the fungus *Beauveria bassiana*.

Beauveria bassiana is an entomopathogenic agent that contributes to the biological control of *Hypothenemus hampei* F., this insect being susceptible to the attack of this entomopathogen. For the production of the fungus, an artisan laboratory was implemented that served as an experimentation center to evaluate six different culture media (organic substrates); broken corn, rice, poultry manure, sorghum, coffee pulp, and corn flour, and where three different containers were used for storage; (plastic bags

resistant to high temperatures of two pounds, bottles of glass of a liter and bottles pets of 2.5 liters).

For the evaluation, an experimental design was established, from which data were obtained to which an analysis of variance was made, and as they showed significance, the Tukey test was performed at 5% and an analysis of production costs that helped to establish which organic substrate was the most effective for the proliferation of the fungus and which container was the most suitable for its storage. These culture media were used in order to contribute to *Beauveria bassiana* production strategy and control of the *Hypothenemus hampei F.* insect in economic terms and easy access to elaborate them within the farm, it is also friendly to the environment contributing to maintain the agroecosystem in a productive and sustainable way.

After performing the analysis of the experiment and performing the mean tests it was determined that of the six culture media under study the most efficient for the colonization of the fungus *Beauveria bassiana* was the rice with a colonization growth of 75% with an average production of conidia of 1.99 conidia / gram diluted in a solution of 1×10^4 , observing in addition that greater virulence of the fungus was obtained in this substrate reaching a 60% mortality of the insect *Hypothenemus hampei F.* in the tests carried out in the laboratory and that the best container to store and produce the mushroom was the one liter glass container.

In addition, when analyzing the production costs between the interactions substrates and storage media, it was established that the rice substrate and the pet plastic container of 2.5 liters is the most recommended to be used on the farm, which has a production cost of Q 5.61 / unit this according to the economic needs of the farm, also highlighting that the pet container of 2.5 liters after the production of the fungus can be conserved to make ethological traps that contribute to the capture of the insect *Hypothenemus hampei F.* within the Established coffee plantations.

Finally, establishing the substrate and the type of storage to be used for the production of *Beauveria bassiana*, we proceeded to produce the fungus to apply it to the

coffee crop and evaluate the virulence and effect that it would have on the coffee berry borer, the results being obtained in insect mortality 44.83%, the mortality obtained in the laboratory being 15.17% lower, however, along with the application of the fungus, cultural techniques and ethological traps were used to control the insect, which in its effect helped to contribute to control the insect obtained in the last sampling to determine the level of insect infestation on coffee fruits made in May 2018 it was obtained that the insect was in 5.5% infestation.

It is important to mention that the production increased by 122% equivalent to 1149. quintals of parchment coffee in the 2017-2018 harvest, this determined that a total of Q336,948.03 was recovered and in losses it would only be Q86,196.98 of the Q423, 145.01 in total losses that would be obtained by not having implemented integrated management on the insect *Hypothenemus hempei* F. Therefore, it is recommended that Finca Santa Anita continue implementing the artisanal production practice of *Beauveria bassiana* and thus continue mitigating the proliferation of the insect on your coffee plantations

Resumen

Finca Santa Anita está ubicada en el municipio de Zunilito del departamento de Suchitepéquez, a 175 km de la ciudad de Guatemala, en las coordenadas latitud Norte 14°39'2.16" y longitud oeste 91°29'34.1", a 1198 metros sobre el nivel del mar (msnm), con una extensión de 135.39 hectáreas de las cuales 131.45 hectáreas están ocupadas con el cultivo de café *Coffea arabica*, con las variedades, Caturra, Catuaí, Sarchimor y Borbón.

Finca Santa Anita al no contar con diferentes alternativas de control de la broca del café *Hypothenemus hampei F.*, muchas veces la plaga se dispara hacia sus niveles altos de población afectando principalmente los frutos de café, causando niveles altos en pérdidas económicas en la producción en la finca.

De acuerdo al valor de importancia de los problemas detectados dentro de la finca se determinó, dentro de los cuales el problema con la broca del café *Hypothenemus hampei F.*, es el que más resalta por las pérdidas económicas que representa ese insecto, pudiéndose notar en un muestreo realizado en el mes de febrero un 27% de infestación. Si se observa por el lado económico son 1237.14 quintales de café cereza afectados de los 4590 obtenidos en la cosecha 2016-2017 de acuerdo a los rendimientos obtenidos dentro de la finca correspondientes a 257 quintales de café pergamino. Esto en el mercado local logra un total de Q192,879.00 a un precio de Q750.00 por quintal para la cosecha mencionada. Por lo cual, se implementó la metodología del control biológico del insecto *Hypothenemus hampei F.*, mediante la producción y utilización del hongo *Beauveria bassiana*.

Beauveria bassiana es un agente entomopatógeno que contribuye al control biológico de *Hypothenemus hampei F.*, siendo este insecto susceptible al ataque de este entomopatógeno. Para la producción del hongo se implementó un laboratorio artesanal que sirvió como centro de experimentación para evaluar seis diferentes medios de cultivo (sustratos orgánicos); maíz quebrantado, arroz, gallinaza, sorgo,

pulpa de café, y harina de maíz, y donde se utilizó tres recipientes distintos para su almacenaje; (bolsas de plástico resistentes a altas temperaturas de dos libras, botellas de vidrio de un litro y botellas pets de 2.5 litros).

Para la evaluación se estableció un diseño experimental de donde se obtuvo datos a los cuales se les realizó un análisis de varianza, y como mostraron significancia se practicó la prueba de medias de tukey al 5% y un análisis de costos por producción que ayudaron a establecer que sustrato orgánico era el más efectivo para la proliferación del hongo y que recipiente era el más adecuado para su almacenaje. Estos medios de cultivo se utilizaron con el objeto de contribuir a la estrategia de producción de *Beauveria bassiana* y control del insecto *Hypothenemus hampei* F. en términos económicos y de fácil acceso para elaborarlos dentro de la finca, además es amigable para el ambiente contribuyendo a mantener el agroecosistema de forma productiva y sostenible.

Luego de realizar el análisis del experimento y realizar las pruebas de media se determinó que de los seis medios de cultivos en estudio el más eficiente para la colonización del hongo *Beauveria bassiana* fue el arroz con un crecimiento de colonización del 75 % con un promedio de producción de conidias de 1.99 conidias/gramo diluido en una disolución de 1×10^4 , observándose además que se obtuvo mayor virulencia del hongo en este sustrato alcanzándose un 60% de mortalidad del insecto *Hypothenemus hampei* F. en las pruebas realizadas en el laboratorio y que el mejor recipiente para almacenar y producir el hongo fue el envase de vidrio de un litro.

Además, al realizarse el análisis de costos por producción entre las interacciones sustratos y medios de almacenajes se estableció que el sustrato arroz y el envase de plástico pet de 2.5 litros es el más recomendado para emplear dentro de la finca el cual tiene un costo de producción de Q 5.61/unidad esto acorde a las necesidades económicas de la finca, resaltando también que el envase pet de 2.5 lts luego de la producción del hongo pueden conservarse para realizar trampas etológicas que

contribuyen a la captura del insecto *Hypothenemus hampei* F. dentro de las plantaciones de café establecidas.

Por último, establecido el sustrato y el tipo de almacenaje a utilizar para la producción de *Beauveria bassiana*, se procedió a producir el hongo para aplicarlo al cultivo de café y evaluar la virulencia y efecto que este tendría sobre la broca del café, siendo los resultados obtenidos en mortalidad del insecto 44.83% siendo menor en un 15.17% la mortalidad obtenida en el laboratorio, sin embargo, junto a la aplicación del hongo se utilizaron técnicas culturales y trampas etológicas para el control del insecto el cual en su efecto ayudaron a contribuir a controlar el insecto obteniéndose en el último muestreo para determinar el nivel de infestación del insecto sobre los frutos de café realizado en el mes de Mayo 2018 se obtuvo que el insecto se encontraba en un 5.5% de infestación.

Es importante mencionar que la producción se incrementó en un 122% equivalentes a 1149. quintales de café pergamino en la cosecha 2017-2018 esto determinó que se recuperó un total de Q336,948.03 y en pérdidas únicamente serían Q86,196.98 de los Q423,145.01 en pérdidas totales que se estarían obteniendo de no haber implementado un manejo integrado sobre el insecto *Hypothenemus hampei* F. Por lo tanto, se recomienda que Finca Santa Anita continúe implementando la práctica de producción artesanal de *Beauveria bassiana* y así seguir mitigando la proliferación insecto sobre sus cafetales.

I. Introducción

Finca Santa Anita está ubicada en el municipio de Zunilito del departamento de Suchitepéquez, a 175 km de la ciudad de Guatemala, en las coordenadas latitud Norte 14°39'2.16" y longitud oeste 91°29'34.1", a 1198 metros sobre el nivel del mar (msnm), con una extensión de 135.39 hectáreas de las cuales 131.45 hectáreas están ocupadas con el cultivo de café *Coffea arabica*, con las variedades, Caturra, Catuaí, Sarchimor y Borbón.

En el diagnóstico realizado en la finca, se detectaron varios problemas en el cultivo de café, estos se enumeraron y listaron de acuerdo al valor de importancia, dentro de los cuales el problema con la broca del café *Hypothenemus hampei F.*, es el que más resalta por las pérdidas económicas que representa el insecto, pudiéndose notar en un muestreo realizado, un 27% de infestación, lo cual indica que de los 4590 quintales de café cereza cosechados 1237.14 quintales de café cereza se encontraban con problemas de broca. Sin embargo, el muestreo que se realizó fue en los últimos cinco días de cosecha que la finca realizó, pudiendo mencionarse que el número de granos de café cereza por libra varía dependiendo de la variedad y altura en que se encuentre la plantación.

Para combatir la plaga existen varios métodos de control tanto físicos, biológicos y químicos. Sin embargo, uno de los objetivos a mediano plazo de la finca es la exportación del aromático a los mercados mundiales, estos a su vez exigen el no uso del producto químico. Por lo cual, se implementó la metodología del control biológico del insecto *Hypothenemus hampei F.*, mediante la producción y utilización del hongo *Beauveria bassiana*.

Beauveria bassiana es un agente entomopatógeno que contribuye al control biológico de dicho insecto debido a que este es susceptible al ataque del hongo. Para la producción de *Beauveria bassiana* se utilizaron seis sustratos orgánicos como medio de cultivo (maíz quebrantado, gallinaza, harina de maíz, pulpa de café, arroz y sorgo), y

tres recipientes distintos para su almacenaje (bolsas de plástico resistentes a altas temperaturas de dos libras, botellas de vidrio de un litro y botellas pets de 2.5 litros). Los resultados obtenidos, de acuerdo al diseño experimental de bloques al azar con arreglo bifactorial y su análisis de varianza, prueba de medias de Tukey al 5% y un análisis de costos de producción, indican que el mejor sustrato de los seis en estudio es el arroz y el mejor recipiente para almacenar *Beauveria bassiana* es el envase pet de 2.5 litros, ya que su costo de producción equivale a Q7.24 por unidad, obteniéndose con este un 60% de mortalidad del insecto en el laboratorio y en campo un 44.83%.

II. Revisión de Literatura

1. El Cultivo de Café, *Coffea arabica* de Guatemala

Según Anacafé, (2010), Guatemala produce excelentes cafés, muy cotizados en los mercados internacionales. Su calidad proviene desde su origen, diferentes altitudes que permiten el cultivo de café de altura en casi toda la geografía nacional; variedad de microclimas con patrones de lluvia altamente beneficiosos para cultivo del café, suelos ricos en minerales, abundantes fuentes de agua, son algunas de las variables que hacen especiales a los cafés de Guatemala.

Anacafé ha realizado la promoción de los cafés de Guatemala, clasificándoles en ocho regiones:

- Acatenango.
- Antigua.
- Atitlán.
- Cobán.
- Fraijanes.
- Huehuetenango.
- Nuevo Oriente.
- San Marcos.

Todos los cafés de altura de Guatemala presentan una combinación de dulces, balanceados y elegantes sabores en la que desarrollan un delicioso aroma, acidez placentera, mucho cuerpo y delicada dulzura.

1.1 Características de las variedades del café de Guatemala

En cada una de las ocho regiones de Guatemala, los atributos que hacen especial al café se fusionan de manera particular, dando como resultado ocho exquisitos perfiles de taza.

2. Plagas del cultivo de café

El café al igual que otros cultivos, se ve afectado en su buen desarrollo por varios factores, entre ellos las plagas, las más importantes dentro del agroecosistema del café, según ANACAFE. (2010), están:

2.1 Cochinillas de la Raíz *Dysmicoccus cryptus*

La presencia de cochinillas en los cafetales se manifiesta en forma de “focos”. Los daños que ocasionan al cafeto, se traducen en una debilidad más o menos rápida de sus órganos. Se produce una decoloración de las hojas y necrosis en los bordes, dando a la planta invadida un aspecto marchito que puede provocar la caída parcial o total del follaje. A nivel de la raíz, en infestaciones crónicas, se desarrolla un complejo formado por cochinillas, hormigas y un hongo; desarrollando una gruesa “costra” que envuelve la raíz principal y raíces secundarias, provocando la destrucción de ésta y la muerte de la planta. (Anacafé, 2010)

2.2 Cochinilla aérea *Capnodium sp Fumagina*

Esta cochinilla es extremadamente polífaga, ataca principalmente los Citrus y el Café. En éste causan un amarillento y desecamiento de los tejidos; producen secreciones azucaradas, donde se desarrolla el hongo *Capnodium sp Fumagina* que forma una película color negro sobre las hojas, frutos y bandolas, que interfiere en la fotosíntesis de la planta. Una fuerte presencia de hormigas se desarrolla en esta asociación.

2.3 Minador de la Hoja *Leucoptera coffeellum*

La larva causa daño al cafeto, alimentándose de la hoja por espacio de unas tres semanas; estas se llenan de manchas oscuras que son bolsas de tejido muerto, que se conocen como “minas”. Se reduce el área activa del follaje y el cafeto se debilita provocando fuerte defoliación en ataques severos.

2.4 Gallina ciega *Phyllophaga spp*

Los daños al cafeto son causados por las larvas que producen lesiones a las raíces las cuales se presentan descortezadas y con pocas raicillas. Las plantas afectadas se tornan amarillentas, muestran síntomas de paloteo y falta de desarrollo. En el almácigo las plantas se tornan flácidas y mueren fácilmente. (Anacafé., 2010).

2.5 Araña Roja *Oligonychus yothersi* McGregor

La presencia de ácaros en el cafeto se nota cuando aparece en las hojas un color rojizo bronceado a óxido mate, que son las escarificaciones donde ha comido la araña. También se nota su ataque por las mudas blancas que en gran número se ven como polvillo. Cuando hay ácaros vivos se ven caminando sobre la hoja, afectando las funciones de la misma y provocan su caída.

2.6 Escamas *Pseudococcus sp.*

Son provocados por la succión de nutrientes. Las escamas succionan considerables cantidades de savia a la planta y en poblaciones numerosas, la desnutrición es notoria.

Además, la secreción azucarada que producen, constituye una mielecilla nutritiva y apetecida por las hormigas; que en muchos casos es indispensable para su desarrollo y reproducción, siendo un medio ideal para el desarrollo de hongos de los géneros *Capnodium* y *Meliola*, (fumagina). Infestaciones fuertes pueden provocar la muerte de plantas jóvenes en almácigo y el deterioro de la plantía. (Anacafé., 2010)

2.7 El Chacuatete *Idiarthron subquadratum*

Este insecto está dotado de fuertes mandíbulas con las que muerde y destruye las hojas, brotes y frutos. Cuando las infestaciones son leves, las hojas aparecen comidas en los bordes y en el centro; los brotes tiernos, rotos y las mordeduras en los frutos se limitan a la pulpa. Las infestaciones fuertes provocan la destrucción

completa de las hojas, brotes y ramas jóvenes y mucho fruto tierno cae al suelo; y el fruto maduro se ve completamente comido de la pulpa y de la semilla, quedando sólo un cascarón de pergamino. (Anacafé., 2010).

2.8 Barrenador del tallo *Plagiohammus colombiensis*

El daño al cafeto lo hace la larva al barrenar el interior del tronco y la raíz principal; al principio no se nota, pero conforme las galerías progresan el cafeto muestra síntomas de marchitez, amarillento y decaimiento general. Un ataque de Barrenador puede provocar la muerte del cafeto; lo que revela su infestación es la presencia de un volcancito de aserrín al pie del cafeto, que cae por el agujero que el insecto barrenador va haciendo dentro del tronco. (Anacafé, 2010).

2.9 Tortuguilla *Diabrotica spp*

Larvas y adultos se alimentan con su aparato bucal masticador, de hojas, frutos y brotes tiernos. Las hojas comidas muestran agujeros alargados, con una apariencia de encaje; cuando el fruto maduro es mordido, sólo la pulpa es afectada; pero en el fruto verde la lesión afecta el pergamino y penetra hasta el interior, dando un café vano. Los extremos de las ramitas son mordidos y cortadas, los brotes tiernos de las recepas pueden ser afectados, los daños de tortuguillas pueden afectar también en almácigo (Anacafé, 2010).

2.10 Grillo del cafeto *Paraecathus Dominicanae Sauss*

Se alimentan de las hojas del cafeto, haciéndole agujeros y cortando los bordes. El daño principal lo provocan las hembras al poner sus huevecillos en el tejido tierno y semileñoso de las ramas jóvenes, las cuales pueden quebrarse, cuando las perforaciones son numerosas.

2.11 Las Babosas *Colosius pulcher*

Las babosas provocan la destrucción de ramas terminales de cafetos y plantas en almácigo. Las ramas atacadas suelen quedar sin corteza y en los frutos destruyen más de la mitad de la pulpa.

2.12 Pulgones *Aphis coffeae*

El ataque de los pulgones se localiza en los brotes tiernos de los cafetos, debido a que estos chupan la savia en las nervaduras de las hojas y partes tiernas de las ramas. Las hojas atacadas presentan un “acolocamiento” y los brotes retardan su crecimiento. Infestaciones fuertes provocan enrollamiento de hojas tiernas. (Anacafé, 2010).

2.13 La Broca del Café *Hypothenemus hampei*

Según Anacafé (2010), la hembra inicia su perforación en la corona del fruto, abre una galería dentro del grano y deposita sus huevos. Si el grano no tiene la consistencia adecuada, la broca permanece en el canal de perforación, sin dañar aún al grano. Si la perforación se inicia cuando los frutos están pequeños, provoca la caída del fruto. El mayor daño es causado cuando el grano está en estado de semi-consistencia, ofreciendo un sustrato adecuado para la oviposición y alimentación de adultos y el desarrollo de los estados inmaduros (huevos, larvas y pupas). Este daño da como resultado la pérdida de peso del grano y deterioro de la calidad.

Descripción del ciclo de vida de la broca

Según Infoagro (2004), una vez fecundada la hembra coloca sus huevos dentro del fruto de café dando inicio a la etapa del ciclo de vida del café el cual constituye cuatro fases siendo estas; huevo siete días, larva once días, pupa cinco días, hasta llegar a su estado adulto que dura 65 días. Este ciclo de vida se cumple en un periodo de 30 a 90 días, según la temperatura y demás condiciones de clima. Ver figura uno en la página 8.

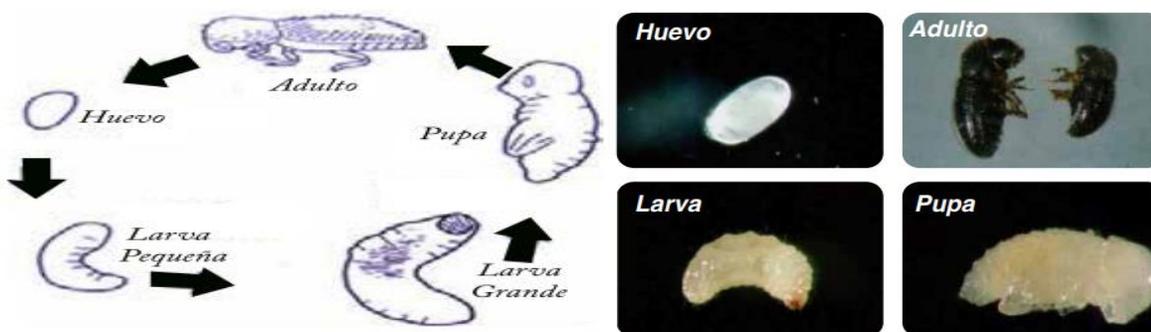


Figura 1: Ciclo de vida de la broca del café (*Hypothenemus hampei F.*)

Fuente: Cenicafé y Procafé

2.13.1 La broca como plaga del café en Guatemala

La broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei F.*, (Ferrari 1867) (Coleóptera: Scolytidae) es originaria del continente africano, reportándose oficialmente su presencia en Guatemala en septiembre de 1971. Actualmente este barrenador de las cerezas del cafeto, se encuentra presente en todas las regiones cafetaleras del país, causando daños con diferentes niveles de infestación. Esta plaga, por las cuantiosas pérdidas que ocasiona, es considerada como el principal problema entomológico de la caficultura en el mundo (Anacafé, 2010).

La broca adulta es un insecto diminuto de color negro, las hembras miden entre 1.4 a 1.85 milímetros de largo por 0.60 a 0.80 milímetros de ancho, tiene metamorfosis completa, es decir que pasa por los estados biológicos de huevecillo, larva, pupa y adulto (Anacafé, 2010).

2.13.2 Importancia económica

El cultivo del café constituye para Guatemala una de las principales fuentes de empleo y el mayor generador de divisas por concepto de agro exportaciones.

Para comprender la importancia económica de *Hypothenemus hampei F.*, debe indicarse que los daños provocados por las hembras al barrenar las cerezas del cafeto provocan la caída cuando se encuentran en las primeras fases de desarrollo. En la cosecha, los daños son más evidentes en el proceso de beneficiado se observa que el

nivel de flotes aumenta, debido en parte al daño ocasionado por el insecto en uno o los dos granos, los frutos que no flotan, presentan granos con imperfecciones ocasionadas por la broca. De acuerdo con el nivel de infestación, esto trae como consecuencia un incremento en la conversión de café maduro a pergamino y deterioro de la calidad, que se traduce en millonarias pérdidas para la economía de los países productores (Anacafé, 2010).

2.13.3 Manejo Integrado de la broca del café (MIB)

Con 38 años de presencia de la plaga, Guatemala cuenta con un Programa de Manejo Integrado de la Broca (MIB) basado en resultados de investigación, generados por más de tres décadas. El MIB, es una filosofía de control de plagas que se fundamenta en consecuencias económicas, ecológicas y sociológicas predecibles. El programa comprende las estrategias de: Muestreo, Control Manual, Control Cultural, Control Etológico (uso de trampas), Control Biológico (con parasitoides de origen africano y *Beauveria bassiana*) y Control Químico (Anacafé, 2010).

2.13.3.1 Control cultural

Según Anacafé (2010), las prácticas culturales evitan el incremento de las poblaciones de broca, al proporcionar un ambiente desfavorable para su desarrollo. Estas son:

a. Manejo de Sombra: El manejo de sombra al inicio del período de lluvias, proporcionará mayor ventilación e iluminación dentro del cafetal, afectando el desarrollo de las poblaciones del insecto.

b. Manejo de Tejido Productivo: Favorece mayor producción, ventilación e iluminación que afectan el comportamiento de la broca.

c. Control de Malezas: Esta práctica facilita la cosecha y permite realizar eficientemente la recolección de frutos caídos.

2.13.3.2 Control manual

Los frutos que quedan en la planta y los caídos al suelo después de la cosecha, constituyen fuente de infestación para la nueva cosecha. Debe interrumpirse este ciclo recolectando todos estos frutos, pues esto es determinante para reducir los niveles de infestación en el próximo período. Para un efectivo control, se recomienda que la pepena y repela sea supervisada, tratando de recolectar los frutos en toda el área cultivada.

Los frutos brocados, verdes y maduros, provenientes de las floraciones “locas”, también deben ser recolectados y tratarse por inmersión en agua hirviendo durante cinco minutos (Anacafé, 2010).

2.13.3.3 Control etológico (uso de trampas)

Se define como el conocimiento del comportamiento de las plagas para su control, ya que éstas responden a señales, estímulos visuales, físicos y químicos. El uso de trampas con semioquímicos (alcoholes) se viene aplicando con bastante éxito por los niveles aceptables de captura y su bajo costo.

2.13.3.4 Control químico

El uso del Control Químico se justifica, solamente cuando el muestreo reporta sitios con infestaciones iguales o mayores al nivel de 3% de infestación, utilizando productos poco tóxicos, con la dosis técnicamente recomendada, una sola aplicación, en el momento preciso y por focos, evitando aplicaciones generales.

2.13.3.4 Control biológico

Según Anacafé (2010), el manejo integrado de broca utilizando el control biológico con parasitoides, es una alternativa factible para Guatemala. *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta* son enemigos naturales actualmente utilizados; su liberación y establecimiento en campo regulan las poblaciones de broca,

manteniéndolas por debajo del nivel de daño económico. Estos penetran dentro del grano, depositando sus huevecillos sobre los estados inmaduros de la broca, destruyéndolos al eclosionar. Para la implementación de este sistema de control a nivel de finca, se requiere la instalación de un laboratorio rural, capacitación de personal y un pie de cría de parasitoides. La tecnología de producción en finca de estos enemigos naturales, está disponible para los productores.

2.13.3.4.1 Parasitoides

- *Cephalonomia stephanoderis* *Betrem*, comúnmente llamada avispa de Costa de Marfil.

- *Prorops nasuta* *Waterston*, llamada avispa de Uganda.

- *Phymastichus coffea*, la avispa de Togo.

Los dos primeros actúan como ectoparásitos de prepupas y pupas de la broca del café, y el tercero como endoparásito de adultos de broca. (Cenicafé, 1996).

2.13.3.4.2 Entomopatógenos

Según Bustillo, A. y Posada F. (1996), los hongos entomopatógenos usados para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), son una opción fundamental en el desarrollo de un programa de manejo integrado, cuya finalidad sea la preservación del ambiente y el uso racional de insecticidas químicos. Se considera que los hongos *Beauveria bassiana* (Balsamo) *Vuillemin* y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, pueden jugar un papel muy importante en el control de la broca.

3. ¿Qué es *Beauveria bassiana*?

Beauveria bassiana, hongo deuteromiceto que vive en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a insectos de diferentes especies, causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina.

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: Beauveria

Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como insecticida biológico para un gran número de plagas de los cultivos como son las orugas, las termitas, las moscas blancas, los áfidos, los escarabajos o los tisanópteros.

Beauveria bassiana en contacto con el insecto entra en competencia con la microflora cuticular, produciendo un tubo germinativo que atraviesa el tegumento del insecto y se ramifica dentro de su cuerpo, secretando toxinas que provocan la muerte del mismo, causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina.

Este control biológico se aplica a una buena variedad de cultivos de importancia agrícola como: Frutas, Cereales y Hortalizas.

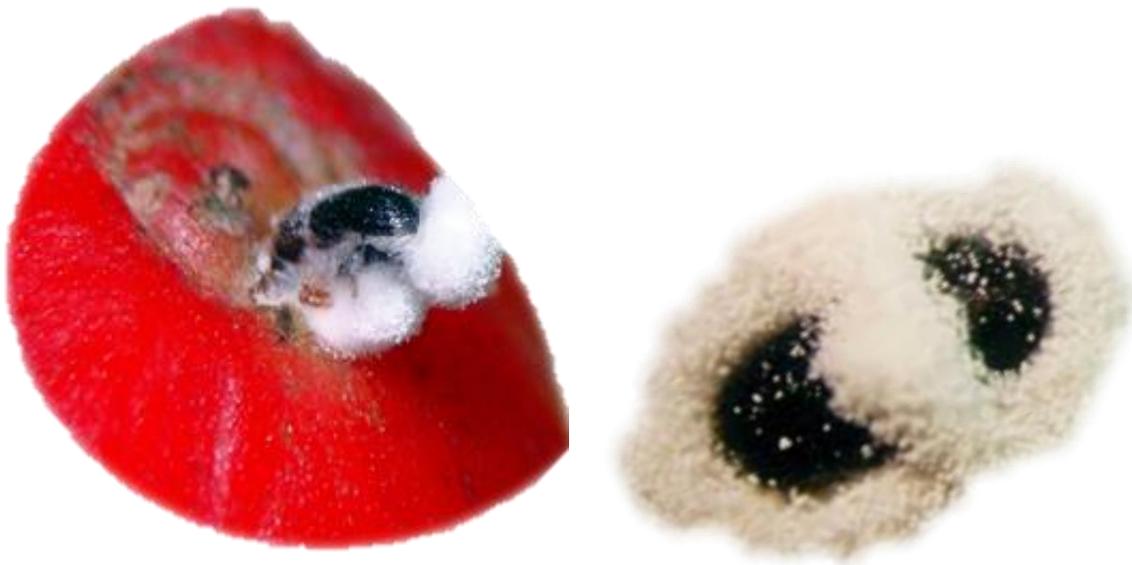


Figura 2: Proliferación de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*
Fuente: Luis Miguel Constantino (2005)

3.1 Forma y modo de acción

El hongo en contacto con el insecto entra en competencia con la microflora cuticular, produciendo un tubo germinativo que atraviesa el tegumento del insecto y se ramifica dentro de su cuerpo, secretando toxinas que provocan la muerte del hospedante.

El insecto muerto queda momificándolo y bajo condiciones de humedad, se cubre posteriormente de una esporulación blanquecina amarillenta.

3.2 Aspersiones del hongo *Beauveria bassiana*

Según Góngora C, Marín P. y Benavides P. (2009), la estimación de la concentración de esporas del hongo que se debe utilizar es el aspecto más importante a considerar antes de realizar una aspersión en el campo. De la misma manera que un producto químico requiere una concentración determinada para ser letal, el hongo será más eficaz dependiendo del número de esporas que se depositan sobre el insecto. Es fundamental asperjar la dosis de esporas que se indique en la etiqueta de los productos.

En general, los experimentos realizados en Cenicafé demuestran que una buena cepa causa mortalidad sobre la broca cuando se aplica una concentración de 2×10^7 esporas/rama del árbol. De esta manera, se debe preparar una solución con 2×10^{10} esporas/L de agua y asperjar 50 cc de ésta por cada árbol, para asegurar la dosis de 1×10^9 esporas/árbol recomendada para causar mortalidad de las brocas. La metodología de aspersión permite que se asegure un buen cubrimiento de los frutos de los Árboles. En general, como la mayoría de productos comerciales contienen un número de esporas mínimo indicado como 10^9 y máximo indicado como 10^{10} , se recomienda usar 20 g/L y 2 g/L, respectivamente.

3.3 Producción de hongos entomopatógeno

Según Monzón C. (2011), el uso de los hongos entomopatógenos, para el control de plagas agrícolas, como un componente de los programas de manejo integrado de

plagas, constituye una alternativa viable para los productores, ya que además de ser eficiente en el control de las plagas presenta muchos beneficios desde el punto de vista ambiental, agroecológico y de salud humana.

Para que los insecticidas a base de hongos estén disponibles para los usuarios, deben producirse en cantidades suficientes, es decir que se necesita implementar métodos de producción que además de obtener buenos rendimientos, proporcionen un producto de buena calidad. La producción de hongos entomopatógenos, se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas y/o conidias) en un substrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de substratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados actualmente.

Los métodos de producción desarrollados incluyen desde la multiplicación artesanal realizada por los mismos productores, la producción semi-industrial a mediana escala, hasta la producción industrial a gran escala que se realiza en empresas más grandes o compañías, para la cual se requiere de reactivos y equipos más especializados.

La diferencia entre estos métodos no se manifiesta en la calidad del producto obtenido, si no más bien en los procesos empleados y en los volúmenes de producción; ya que si se realiza un buen control de calidad con cualquiera de los métodos se obtiene un producto de alta calidad. De manera que utilizar uno de los métodos de producción depende de la disponibilidad de recursos humanos y materiales, equipos e instalaciones. A partir de estas consideraciones el método que mejor se ajusta a las condiciones de Nicaragua es el método de producción semi industrial.

3.4 Uso de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas agrícolas

El uso de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas agrícolas constituye una alternativa viable para el manejo de diversas plagas. Existen experiencias de

diversos países donde los hongos entomopatógenos forman parte de programas de manejo integrado de plagas de mucha importancia. En Nicaragua se han alcanzado logros importantes en este campo, de manera que cada día la demanda de este tipo de productos aumenta debido a que los consumidores demandan cada vez más, productos de consumo, libres de residuos de plaguicidas. Hasta el momento los mayores avances se han logrado en el manejo de la broca del café, picudo del plátano, picudo del algodón, picudo de la chiltoma y salivita en caña de azúcar entre otros.

En el cultivo de café el uso de hongos entomopatógenos se combina con uso de variedades de floración uniforme, actividades de graniteo, repela y pepena, muestreos sistemáticos de la plaga en la etapa de fructificación, así como muestreo de frutos caídos en la Época seca. En control de broca en café se ha demostrado que dos aplicaciones (junio y septiembre) combinadas con acciones anteriormente mencionadas son suficientes para el manejo de la plaga. Se ha encontrado además que el uso de los hongos mejora la calidad de la cosecha (Monzón C., 2011).

3.5 Ventajas del uso de Hongos Entomopatógenos como agentes de control

- Constituyen alternativas eficientes de manejo de las plagas: si se usan adecuadamente puede ser tan eficiente como cualquier otro insecticida.
- Se reducen los riesgos de contaminación al ambiente, el suelo, el agua: por ser productos elaborados a base de un organismo vivo, no sintético, no contamina el ambiente.
- Se reducen los riesgos de intoxicaciones, ya que los hongos entomopatógenos no afectan la salud de los trabajadores, ni de los animales domésticos.
- Se protegen los enemigos naturales, debido a que son productos bastante específicos y su acción no es inmediata.

- Los productos agrícolas se obtienen libres de residuos tóxicos: por tratarse de un organismo vivo no deja residuos en los cultivos, por lo tanto, los consumidores pueden estar seguros que los productos que consumen no tienen problemas de residuos químicos.

- Los costos pueden resultar más bajos, tanto para el país como para los usuarios, debido a que si se usan correctamente se puede requerir de menor número de aplicaciones, además que no se requiere de inversión de divisas por que pueden ser producidos localmente (Monzón C., 2011).

3.6 Modo de acción de los hongos entomopatógenos sobre los insectos

Los hongos entomopatógeno al igual que la mayoría de los hongos de plantas y vertebrados, infectan al hospedante a través de la cutícula externa. Esta forma de penetración es típica de los hongos ya que otros entomopatógenos como bacterias y virus penetran por la vía oral.

El contacto entre el inóculo del entomopatógeno y el insecto es fundamental para el inicio del proceso infeccioso; el contacto ocurre al azar, un clima favorable, suficiente cantidad de inóculo del entomopatógeno en el ambiente, así como la existencia de suficientes insectos hospedantes, son factores que favorecen el efecto de los hongos entomopatógenos.

La epicutícula o capa más externa del integumento del hospedante es el sitio inicial de la interacción patógeno-hospedante. El integumento es una estructura muy compleja, cuya composición química es muy importante para el proceso de penetración. Entre sus componentes se encuentran lípidos, lipoproteínas, polifenoles y proteínas. Se ha observado que esta capa posee finos canales por los cuales ocurre el suministro ceras, azúcares y proteínas, los cuales juegan un rol muy importante en las interacciones señal-receptor, entre la cutícula y la espora. Azúcares no-estructurales y compuestos nitrogenados producidos por las plantas o el insecto pueden contaminar la cutícula, afectando así el proceso de fijación.

En general en el proceso de la patogénesis (micosis), se observan tres fases:

- a) germinación de la espora en la cutícula del hospedante
- b) penetración del integumento del insecto por medio del tubo germinativo
- c) desarrollo del hongo dentro del cuerpo del insecto y su multiplicación.

En este proceso se pueden verificar los siguientes pasos: Adhesión, germinación, penetración, multiplicación del hongo, producción de toxinas, muerte del insecto, colonización, producción de micelio hacia el exterior, esporulación y diseminación del hongo (Monzón C., 2011).

3.7 Adhesión

Consiste en la fijación de los propágulos del hongo con la superficie del insecto. Esta constituye una de las fases más importantes del proceso infeccioso y está correlacionada con la especificidad hospedante - patógeno. Solo las cepas más virulentas logran exitosamente la adhesión. En el proceso de adhesión participan sustancias como lectinas (proteínas o glucoproteínas) y mucopolisacáridos, además de algunos lípidos. Estas sustancias o secreciones aparecen al inicio del contacto del hongo con el insecto.

En el cuerpo del insecto existen ciertas zonas preferidas para la adhesión, como son las regiones intersegmentales, en donde la composición y estructura son diferentes al resto del cuerpo del insecto.

3.8 Germinación

Luego de la adhesión de la espora sobre el integumento del insecto, ésta germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio. El tubo germinativo puede ser largo o corto y en algunos casos puede no llegar a formarse. En el proceso de germinación juegan un rol importante los requerimientos nutricionales de la espora y las condiciones ambientales presentes. En este sentido se ha observado que las

esporas de *Beauveria* son más exigentes en carbono y energía que las de *Metarhizium*.

3.9 Penetración

Después de la germinación se producen una serie de transformaciones físicas y químicas, tanto en el insecto como en el hongo, que permiten al patógeno penetrar la cutícula de su hospedante. Un conidio puede germinar, sin embargo si no se dan las condiciones físicas y químicas y los estímulos correspondientes no logra penetrar. Enzimas principalmente lipasas, proteasas y quitinasas, son producidas por la hifa y ocasionan una alteración de la cutícula, que facilita la entrada de la hifa de penetración (Monzón C., 2011).

3.10 Multiplicación del hongo en el homocelo

En el interior del insecto el hongo se multiplica, principalmente por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastosporas en los Deuteromycetes, también se pueden formar en el hifas, protoplastos y células sin pared.

Los insectos tienen un sistema inmunológico que les permite reconocer y reaccionar a partículas extrañas como propágulos de hongos, bacterias y virus, en el homocelo del insecto, las cuales pueden ser fagocitados, evitando así la presencia de otros organismos (Monzón C., 2011).

3.11 Producción de toxinas

Las toxinas son sustancias de baja toxicidad para mamíferos, pero muy tóxicas para artrópodos, por lo que pueden causar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas; además actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del insecto. La producción de toxinas es una característica de todos los hongos y cepas. Las toxinas producidas pueden ser de dos tipos: a) macromoléculas proteicas y b) sustancias de bajo peso molecular. Las primeras son enzimas

secretadas en cantidades significativas tanto en medios de cultivo como en el cuerpo del insecto. La serilproteasa y sulfidrilproteasa, han sido aisladas de metarhizium; otras enzimas encontradas son lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas. El segundo tipo corresponde a metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pero que puede ser afectada por factores como nutrientes, pH, temperatura, entre otras. Las toxinas más comunes de este tipo son principalmente las destruxinas, demetildextruxina y protodextruxina.

3.12 Muerte del insecto

La muerte del insecto parasitado, ocurre generalmente antes que el hongo colonice totalmente el homocelo del insecto. Esto se debe en gran parte a la acción de las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la saprofítica. Cuando el insecto muere no se observa evidencia del hongo causante de la muerte, sino posteriormente. La duración de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales.

3.13 Colonización total

Según Monzón C. (2011), luego de la muerte del insecto, el micelio invade todos los Órganos y tejidos, iniciando generalmente por el tejido graso. Pueden existir Órganos o tejidos que no son colonizados. Después de la colonización, el cadáver del insecto se transforma en una momia, la que es resistente a la descomposición bacteriana, aparentemente debido a la acción de antibióticos liberados por el hongo.

3.14 Emergencia del hongo hacia el exterior

Después de la colonización, si las condiciones externas son de baja humedad relativa, el hongo puede mantenerse en el interior del insecto, protegido por el integumento, pero en condiciones húmedas el hongo emerge del cuerpo del insecto principalmente a través de las zonas menos esclerosadas. Esporulación Después que las hifas atraviesan el integumento, si las condiciones son de alta humedad relativa, en un período de 24 a 48 horas ocurre la producción de esporas o conidias. Es en esta

fase el insecto muerto adquiere una coloración característica de acuerdo al hongo, por ejemplo, verde si es *metarhizium* y blanco si es *Beauveria bassiana* (Monzón C., 2011)

3.15 Matrices y bolsas

Estas dos etapas del proceso de producción, tienen como objetivo reproducir masivamente el hongo en un sustrato de arroz entero, para obtener las unidades infectivas, o sea las conidias del entomopatógeno. En la matriz se produce el hongo que se utiliza para inocular las bolsas, y en las bolsas se reproduce el hongo que luego es pasado a las bandejas y que es cosechado al final del proceso de producción. La matriz se establece en recipientes de vidrio (erlenmeyer) y las bolsas en bolsas de polipropileno. Para la matriz se utilizan 100 gramos de arroz en cada Erlenmeyer. La cantidad de arroz a colocar en la bolsa, depende del tamaño de ésta, generalmente se usan 200 gramos por bolsa (Monzón C., 2011).

3.16 Control de calidad en la etapa de producción

Los principales problemas de contaminación son ocasionados por bacterias y generalmente ocurren debido a mal manejo del sustrato, por ejemplo, aglomeraciones de arroz, exceso de humedad, mala esterilización del arroz, entre otras.

3.17 Control de calidad de matriz

El control de calidad se inicia seleccionando adecuadamente los materiales, principalmente los platos del cultivo puro a utilizar. Estos platos deben ser de crecimiento rápido y vigoroso; deben presentar las características de crecimiento del hongo (forma y color); además cada plato utilizado debe estar libre de cualquier tipo de contaminante. Una vez inoculada la matriz, se debe revisar diariamente a partir del tercer día después de la inoculación, durante el proceso de incubación, para la detección de contaminantes, principalmente bacterias. Si el crecimiento del hongo es lento y no uniforme o el sustrato adquiere una consistencia blanda, ocurre una coloración amarillenta que puede ser tanto localizada como generalizada, entonces se

debe descartar la matriz y esterilizarla para destruir el inóculo contaminante (Monzón C., 2011).

3.18 Control de calidad de bolsa

Los problemas de contaminación en bolsa son similares a los que ocurren en matriz, pero se pueden presentar con mayor frecuencia, debido a problemas de humedad o problemas en la inoculación. Durante la fase de bolsa se debe realizar control sistemático, para evitar problemas de contaminación y seleccionar adecuadamente el material, este control se realiza mediante la observación del crecimiento. El tipo de crecimiento observado puede: disparejo, lento, homogéneo. Un crecimiento disparejo es localizado sobre diferentes puntos del substrato. Este tipo de crecimiento puede deberse a la presencia de contaminantes y/o a una mala manipulación al momento de la inoculación. El crecimiento lento puede estar asociado a una mala agitación del substrato después de efectuada la inoculación, factores ambientales, estado de la cepa, presencia de contaminantes o calidad del inóculo. El crecimiento homogéneo y rápido, es el tipo de crecimiento apropiado para la selección de la bolsa que entrar en producción (Monzón C., 2011).

3.19 Colecta de insectos

Los insectos que se utilizan en las evaluaciones deben estar sanos, es decir libres de parásitos o patógenos, así como de plaguicidas. Para que las evaluaciones sean más precisas es conveniente reproducir los insectos en el laboratorio (cría) y descartar las primeras generaciones.

En el caso de utilizar directamente insectos provenientes del campo, éstos deben colectarse en áreas donde no exista incidencia del hongo y que no tengan aplicaciones de químicos, para evitar la muerte por causa ajenas al hongo que se está evaluando. La captura de los insectos se puede hacer de varias formas, dependiendo del tipo de insecto, por ejemplo, los chinches, generalmente se colectan directamente

con red entomológica; para plagas de frutos como los picudos o la broca se colectan los frutos afectados y los insectos se extraen en el laboratorio. (Monzón C., 2011).

3.19.1 Colocación de los insectos en jaulas o cajas

Los insectos deben colocarse en locales donde se permita su manipulación (aplicación del tratamiento, conteo, entre otros. A los insectos se les deben suministrar todas las condiciones que ellos requieran para su sobrevivencia, es decir aire, alimento, refugio, agua, entre otros. Generalmente lo que se usan son jaulas con malla de acuerdo al tamaño del insecto en estudio. Colocar dentro de las jaulas a las plantas hospederas (el cultivo que atacan). En el caso de insectos como broca o picudos se debe colocar el tejido del que ellos se alimentan (frutos).

El número de insectos que se usa es variable, depende del tipo y la disponibilidad de insectos. En plagas como picudo de chile se utilizan 100 insectos por cada repetición, para chinche del arroz se usan 150 insectos, para salivita en caña se usan un total de 50, entre otros.; entre mayor número de insectos se utiliza, se obtiene mayor disponibilidad de inóculo reactivado (Monzón C., 2011).

3.19.2 Exposición del insecto al hongo

Consiste en la inoculación del insecto con la cepa de hongo que se está reactivando. Los métodos o técnicas de exposición que se usan comúnmente son Inmersión y aspersion.

3.19.2.1 Inmersión

Este método es recomendable para insectos que tienen el cuerpo endurecido o que no son muy delicados, es decir que resistan la manipulación (picudos, broca, larvas de lepidóptera, entre otros). Los pasos que se sigue son:

a. Preparar en agua destilada la suspensión del hongo equivalente a 108 conidias de la cepa a utilizar.

b. Sumergir los insectos en la suspensión de conidias por dos a tres segundos y luego secarlos en papel toalla. La inmersión puede hacerse colocando los insectos en una malla y luego sumergiendo la malla en la suspensión del hongo.

c. En el caso de picudo los insectos se colocan en frascos de vidrio que contienen un vaso con tierra y plantas de chile con flores y frutos, el frasco se cierra con malla fina, para asegurar una buena circulación de aire. En el caso de broca se colocan en vasos descartables con frutos de café y se le hacen perforaciones al vaso para que circule el aire.

d. Los frascos se colocan en un lugar fresco donde se les hace el seguimiento establecido para el bioensayo (Monzón C., 2011).

3.19.2.2 Aspersión

Este método se recomienda para insectos de cuerpo delicado como salivita, chinches, moscas, etc., ya que ocurre menos manipulación del insecto. Los pasos que se siguen son:

a. Preparar en agua destilada la suspensión del hongo equivalente a 108 conidias de la cepa a utilizar.

b. Seleccionar los insectos que serán utilizados en el bioensayo.

c. Realizar la aspersión. Esta puede realizarse colocando a los insectos dentro de la jaula en su planta hospedera y luego asperjar la suspensión del hongo, con un atomizador De Vilbis o un aspersor pequeño. También se pueden colocar los insectos en una bandeja y sobre ésta realizar la aspersión y posteriormente depositar los insectos en la jaula donde está la planta hospedera.

d. Colocar las jaulas a temperatura ambiente, en el lugar destinado para realizar el seguimiento correspondiente al bioensayo (Monzón C., 2011).

3.20 Aspectos fundamentales a tomar en cuenta para la producción del hongo *Beauveria bassiana* en el campo o laboratorio

3.20.1 Asepsia

Según Cañedo y Ames (2004), mantener el mayor cuidado en la limpieza del material y del laboratorio mismo es fundamental para realizar trabajos confiables. El medio ambiente se encuentra, por lo general, cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el ámbito de trabajo, por ello es conveniente no descuidar la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para el trabajo. Los materiales de vidrio y cualquier otro elemento deben estar profundamente limpios antes de comenzar el trabajo.

3.20.2 Lavado

Durante los trabajos con microorganismos, específicamente hongos, es necesario y fundamental trabajar con mucha asepsia, debido a que es indispensable el mantenimiento de los cultivos puros. Por lo tanto, es conveniente que luego de lavar todo el material de vidrio, éste sea enjuagado dos veces con agua destilada, para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado.

3.20.3 Esterilización

La esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivo nos asegura un estado de asepsia que permite trabajar sin dificultades cuando se ejecuta en forma eficiente. La forma más común de esterilización es por medio del calor seco o húmedo. La esterilización por calor seco se consigue con el uso de un horno o estufa y es útil en el caso de esterilizar placas Petri y otros materiales de vidrio. La temperatura

a la que se somete el material durante 90 a 120 minutos debe fluctuar entre 160 y 180 °C. Es eficaz, siempre y cuando se deje espacio libre para que el aire caliente circule alrededor de los materiales (Cañedo y Ames, 2004),

3.20.4 Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento)

Como ya se ha dicho, cuando se trabaja con hongos entomopatógenos es necesario tener los ambientes de trabajo, así como los utensilios, materiales de vidrio, etc. en completo estado de asepsia. Existe un conjunto de procedimientos para eliminar o reducir la contaminación por microorganismos ya sean hongos entomopatógenos, fitopatógenos, patógenos del hombre, saprofitos, entre otros. que puedan interferir con el trabajo que se desea realizar. Éstos pueden estar flotando en el aire, depositados sobre las superficies de trabajo y del ambiente como paredes, techos, estantes, entre otros. El alcohol es muy utilizado en trabajos de laboratorio para desinfectar la superficie de la cámara de flujo laminar, así como las superficies de trabajo. Los alcoholes actúan desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agentes deshidratantes (Cañedo y Ames, 2004).

3.21 Características morfológicas de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana (Bálsamo) *Vuillemin* Colonia: la colonia en Agar de Papa Dextrosa (PDA) a los 14 días es algodonosa a polvorienta, blanca. A medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillenta, cremosa. El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor. Conidióforos: de 1-2 μ de diámetro donde nacen células conidiógenas en grupos grandes. Células conidiógenas (c.cs.): están agrupadas formando grupos compactos grandes y a veces solitarias, en forma de botellitas de 3 a 6 x 3 a 5 μ . En ciertos casos, las c.cs. se ramifican formando c.cs secundarias. Al final de las c.cs se forma un raquis que sostiene las conidias. (Cañedo y Ames, 2004),

3.21.1 Raquis

Hasta de 20μ de longitud y 1μ de diámetro, denticulado, que sostiene una conidia en cada dentícula.

3.21.2 Conidias

Hialinas, globosas a subglobosas, de 2 a 3 x 2 a 2.3μ . que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta. Ver figura tres.

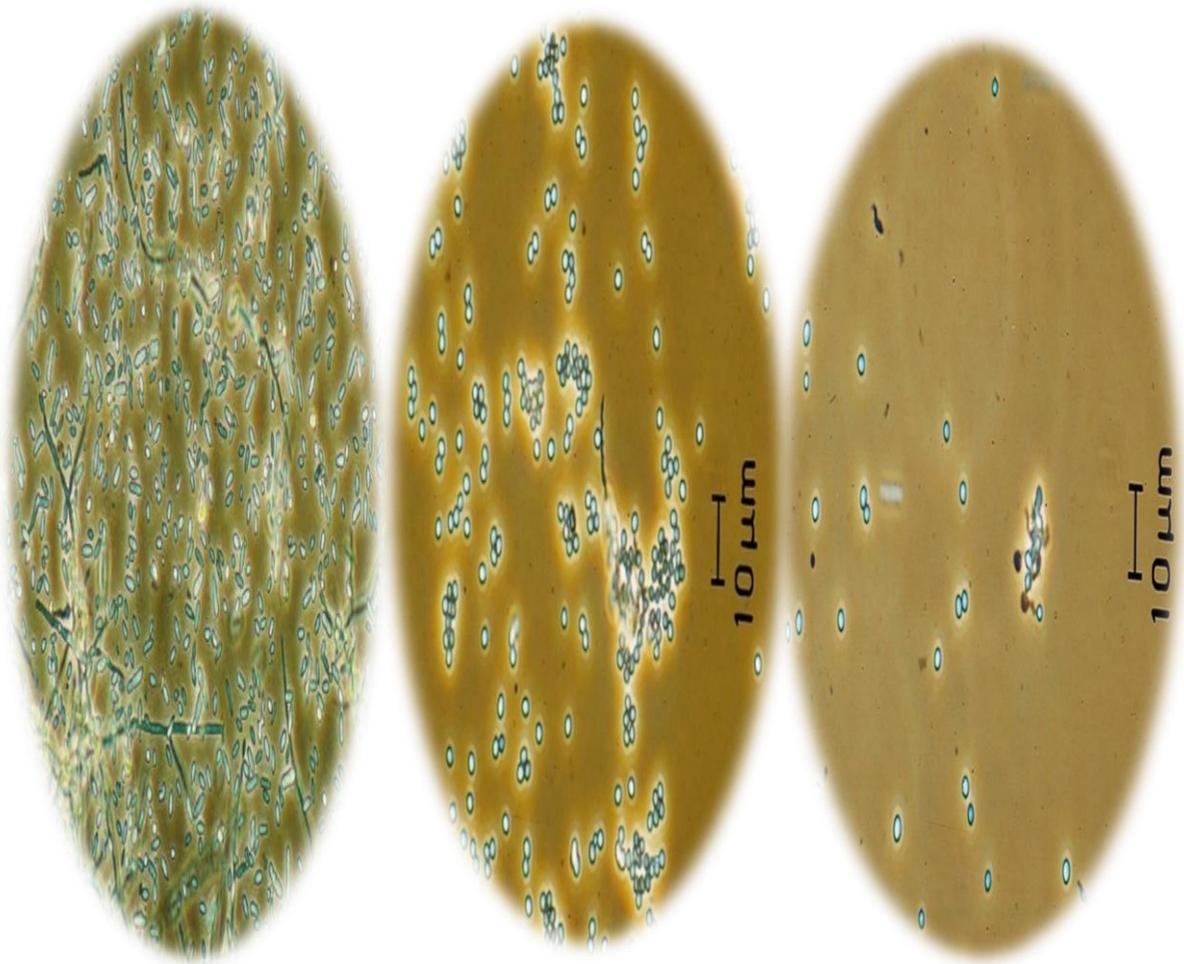


Figura 3: Conidias del hongo *Bauveria bassiana*
Fuente: Li, Z. Z., C. R. Li, B. Huang, and M. Z. Fan (2001)

3.22 Conteo de conidias en el hematocímetro o cámara de Neubauer

Para determinar el número de conidias por volumen contenidas en una determinada suspensión, se utiliza un hematocímetro o cámara de Neubauer. El hematocímetro es una lámina de vidrio que tiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en nueve cuadrados de 1 mm². La superficie cubre un área total de 9 mm². Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm de lado y una superficie de 0.04 mm² cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm² cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de las conidias. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son las conidias que se encuentran en el límite y que deben ser contadas. Generalmente se cuentan las conidias que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así las conidias que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda (Cañedo y Ames, 2004).

3.22.1 Procedimiento

1. Preparar una suspensión de conidias en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.
2. Con una pipeta Pasteur llenar la cámara con la suspensión de conidias y cubrirla con el cubreobjeto.
3. Observar al microscopio utilizando el aumento conveniente de acuerdo al tamaño de la estructura (40x es un aumento adecuado), ver figura 2.
4. Contar las conidias presentes en los cuadrados elegidos (generalmente se cuentan en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, o en forma diagonal empezando por el primero de la parte superior izquierda. También se deben contar las conidias que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del

cuadrado. Se cuentan en total diez cuadrados, cinco en cada cámara [cinco arriba y cinco abajo]). Ver figura dos.

5. Determinar el número de conidias por ml y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula: $\text{Conidias / ml} = \# \text{ de conidias contadas} \times 25,000 \times \text{factor de dilución}$
 $\text{Conidias total} = \text{conidias / ml} \times \text{Vol. de la suspensión original de conidias.}$
 Ver figura cuatro.

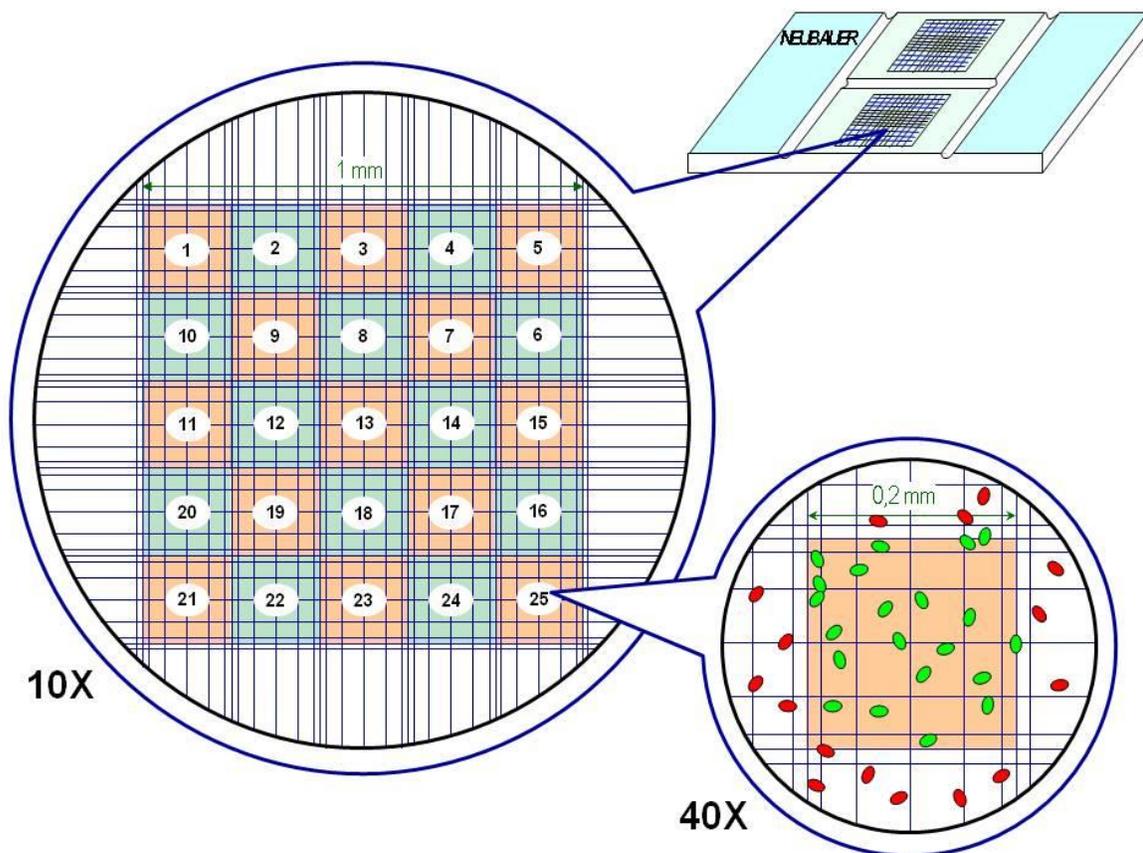


Figura 4: Sectorización de la cámara Neubauer en donde se realiza el conteo de conidias.

Fuente: Camara Neubauer (2018)

3.22.2 Multiplicación de hongos entomopatógenos sobre sustratos naturales

Los sustratos utilizados varían según la región y la finalidad de la multiplicación. Se han probado arroz pelado, trigo, cebada, maíz partido, hollejo de cereales, pasto seco picado, entre otros. También se tiene referencias de que el agricultor propaga el

hongo *B. bassiana* en rumas de estiércol (de ganado vacuno, cabrío, lanar o de aves) a un costado del campo y luego lo incorpora.

3.22.3 Inoculación del sustrato

1. Remojar el sustrato en agua con hipoclorito de sodio al 1% durante 16 horas.
2. Enjuagar varias veces con abundante agua, hasta que ya no se sienta el olor a hipoclorito.
3. Embolsar 800 gramos de sustrato por bolsa y agregar 200 ml de agua destilada.
4. Esterilizar durante 20 minutos a 15 libras de presión por dos días consecutivos.

3.22.4 Preparación del inóculo

1. Preparar un litro de medio de Agar Papa Dextrosa (PDA) líquido y mantener durante tres días en agitación.
2. Sembrar el hongo en el medio.

3.22.5 Inoculación al sustrato

1. Agregar en cada bolsa 20 ml del inóculo, en la cámara de flujo laminar.
2. Sellar las bolsas.
3. Incubar a 20 °C durante siete días.
4. A los siete días, realizar el primer conteo de número de conidias.

3.22.6 Conteo del número de estructuras propagativas

1. Agregar en un vaso de precipitados o en un tubo de ensayo un gramo del sustrato y 10 ml de agua destilada estéril.
2. Agitar enérgicamente, o con un agitador, por espacio de un minuto, para que las conidias se desprendan.

3. Tomar 100 μ l de la suspensión y completar a 1 ml con agua destilada más Tween al 0.1%.
4. Hacer las diluciones necesarias hasta poder contar las conidias en la cámara de Neubauer.
5. Realizar el cálculo correspondiente al peso de la bolsa.

4. Bioensayos

Según Cañedo y Ames (2004), Se denomina bioensayos o pruebas de patogenicidad a las pruebas que se realizan con organismos vivos, con el objeto de determinar los siguientes parámetros: rango de hospedantes, virulencia, competencia ecológica (comportamiento en condiciones de campo), condiciones que incrementan o reducen la formación de epizootias y las barreras de infección. El desarrollo de un bioensayo requiere del entendimiento tanto del patógeno como del hospedante, de lo contrario se pueden producir resultados inconsistentes. Otros factores que pueden influenciar la viabilidad, virulencia y eficacia de los hongos son los métodos de producción, formulación y aplicación.

Es necesario tener en cuenta que cultivos sucesivos en medios artificiales pueden resultar en una atenuación o pérdida de la virulencia (CL50, TL50). Para evitar estos problemas, cuando sea posible, se debe producir grandes cantidades de inóculo utilizando el aislamiento inicial y almacenarlo. La pérdida de la virulencia depende del aislamiento y especie del patógeno pero frecuentemente se puede recuperar con el pasaje del hongo a través del hospedante apropiado, como se ha demostrado con *Metarhizium anisopliae*.

En los bioensayos se deben utilizar insectos provenientes de crianzas en laboratorio, de la misma edad y en buenas condiciones sanitarias. En caso de trabajar con larvas, éstas deben ser seleccionadas y separadas un día antes de la instalación

del ensayo y alimentarlas teniendo cuidado de no utilizar productos antifúngicos. Además, las larvas deben estar próximas a mudar, para que lo puedan hacer en el tiempo de espera y no en pleno desarrollo del ensayo.

La inoculación de los insectos se debe realizar por aspersión o inmersión por diez segundos en la suspensión de conidias.

Los insectos tratados deben ser mantenidos individualmente en incubadora o en ambiente con temperatura constante, de acuerdo a los requerimientos del hongo evaluado, que debe ser observado diariamente. La mortalidad del tratamiento testigo, es decir los insectos tratados con agua destilada estéril, no debe ser mayor al 10 % ni éstos deben presentar signos de micosis. La mortalidad de los tratamientos debe ser corregida mediante la fórmula de Abbott:

$$MC = \frac{\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \times 100$$

La suspensión de conidias debe ser obtenida de un cultivo fresco en esporulación, agregándole agua destilada estéril. Con la ayuda de un ansa se debe retirar todo el micelio para que las conidias estén en contacto con el agua. Luego, se agita enérgicamente para su homogeneización. Se deben hacer las diluciones necesarias que permitan un conteo fácil en la cámara de Neubauer, y realizar el cálculo correspondiente de la suspensión a utilizar. Las evaluaciones se deben realizar diariamente hasta que muera el 100 % de la población, de esta manera se determinará el TL 50 de los tratamientos. Según Cañedo y Ames (2004).

III. Objetivos

General

- Evaluar seis medios de cultivos y tres medios de almacenaje para la producción del hongo *Beauveria bassiana* para control broca del café *Hypothenemus hampei F.* en Finca Santa Anita.

Específicos

1. Determinar el medio de cultivo más eficiente para la colonización del hongo *Beauveria bassiana*.
2. Establecer el tipo de recipiente apropiado para el almacenamiento de los sustratos para la producción del hongo.
3. Comprobar la virulencia del hongo *Beauveria bassiana* sobre el insecto *Hypothenemus hampei F.* en el laboratorio y a nivel de campo.
4. Establecer la mejor interacción entre el tipo de envasados y medios para la producción de hongo.
5. Realizar un presupuesto de costos por producción del hongo *Beauveria bassiana* para implementarse en Finca Santa Anita.

IV. Hipótesis

Ho₁. Todos los medios de cultivo (sustratos orgánicos) en estudio tendrán el mismo efecto sobre la colonización del hongo *Beauveria bassiana*.

Ha. Al menos un medio de cultivo tendrá un efecto diferente sobre la variable colonización del hongo *Beauveria bassiana*.

Ho₂. Los tres recipientes de almacenaje en estudio serán favorables para el almacenaje en la producción del hongo.

Ha. Al menos uno de los tres recipientes en estudio tendrá un efecto diferente sobre la variable almacenaje de sustratos para la colonización del hongo.

Ho₃. Todos los medios de cultivos en estudio tendrán el mismo efecto sobre la variable en estudio virulencia de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei F.* a nivel de laboratorio y campo.

Ha. Al menos un medio de cultivo tendrá un efecto diferente sobre la variable virulencia de *Beauveria bassiana* en estudio sobre *Hypothenemus hampei F.* a nivel laboratorio y campo.

Ho₄. Ambos factores en estudio tendrán el mismo efecto sobre las variables colonización del hongo en los sustratos, medios de almacenaje y virulencia de *Beauveria bassiana* sobre la producción de la misma y tasa de mortalidad sobre *Hypothenemus hampei F.*

Ha. Al menos una combinación de ambos factores en estudio colonización de sustratos, medios de almacenaje y virulencia de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei F.* tendrá un efecto diferente.

V. Materiales y Método

1. Materiales

- 1 Espacio físico del laboratorio de 3m X 3m.
- 1 Cámara Neubauer.
- 1 caja de Papel filtro de 50 unidades.
- 2 Toallas de limpieza
- Agua limpia.
- 1 Recipiente de metal (para baño maría).
- 1 Pinzas.
- 2 pares de Guantes
- 1 Lupa o Microscopio.
- 1 Probeta.
- 36 Cajas Petri.
- Leña y fósforos.
- 24 Bolsas plásticas de 2 lb.
- 24 Botellas de Vidrio de un litro.
- 24 Botellas pets de 2.5 litros.
- 1 Atomizador.
- 4 Mascarilla (cubre boca).
- 11 libras de Maíz quebrantado.
- 11 libras de Harina de maíz.
- 11 libras de Pulpa de café.
- 11 libras de Arroz.
- 11 libras de Gallinaza.
- 11 libras de Sorgo.
- 4 Cajas de cartón.
- 2 Jeringas.
- 1 Termómetro.
- 1 Mesa de trabajo.
- 1 Estanterías.
- 1 Bata.
- 1 Desinfectante (cloro).
- 5 Brocas de café (insectos) por tratamiento.
- 72 Granos de café (cereza).
- 1 Libreta y un lápiz.
- 1 rollo Masking tape para rotular los diferentes tratamientos.
- 1 Computadora para procesar toda la información.
- 100 Hojas y una impresora.
- dos personas.

2. Métodos

2.1 Diseño experimental para la ejecución del proyecto

Primeramente y de acuerdo a la investigación planteada se diseñó el experimento acorde a las necesidades y condiciones que la investigación requería siendo el diseño Bifactorial Completamente al azar con arreglo combinatorio era el más adecuado para elaborar la investigación. Los factores a evaluar fueron: factor A lo constituyeron los medios de cultivos (Sustratos orgánicos) y el factor B, los recipientes. Los niveles de cada factor se muestran en el cuadro uno.

Cuadro 1. Factores a Evaluar en la producción de *Beauveria bassiana*

No.	Medios de cultivo	No.	Recipientes a utilizar	Tratamientos		
T1	Maíz quebrantado	1	Botellas de vidrio de 1 l. (B1)	1. (T1,B1)	7. (T1,B2)	13. (T1,B3)
T2	Gallinaza			2. (T2,B1)	8. (T2,B2)	14. (T2,B3)
T3	Harina de maíz	2	Bolsas siploc de 2 lb. (B2)	3. (T3,B1)	9. (T3,B2)	15. (T3,B3)
T4	Pulpa de café			4. (T4,B1)	10. (T4,B2)	16. (T4,B3)
T5	Sorgo	3	Botella pet de 2.5 l. (B3)	5. (T5,B1)	11. (T5,B2)	17. (T5,B3)
T6	Arroz			6. (T6,B1)	12. (T6,B2)	18. (T6,B3)

En el Diseño Bifactorial Completamente al Azar con arreglo combinatorio se establecieron cuatro repeticiones quedando un total de 72 tratamientos. Para ello se utilizó la siguiente fórmula. $Gl\ error = ab(r-1)$ en dónde:

Gl error = grados de libertad del error

a= factor A.

b= factor B.

r = repetición.

1= Constante.

D.C.A

$Gl\ error = ab(r-1)$ (6) (4) (4-1) = 72

Seguidamente, se procedió a realizar la distribución de los tratamientos al azar mediante el método de la tómbola que consiste en colocar los nombres de los 18

tratamientos a evaluar. Ya colocados se procede a extraer uno a uno los tratamientos para ver el orden en que serán colocados en el lugar donde se llevara el experimento. Se debe realizar cuatro veces el mismo procedimiento de la tómbola debido a que se realizaron cuatro repeticiones. Luego de realizar el sorteo se tiene una idea más clara de la distribución de los tratamientos. Ver cuadro dos en la siguiente página.

Cuadro 2. Distribución del ensayo colocado en el área de laboratorio.

REPETICIÓN 1			REPETICION 2			REPETICIÓN 3			REPETICIÓN 4		
T1,B2	T3,B1	T1,B5	T2,B4	T3,B2	T3,B4	T3,B3	T1,B3	T2,B3	T3,B6	T1,B3	T1,B1
T1,B1	T2,B5	T3,B2	T1,B6	T3,B5	T2,B3	T2,B6	T3,B4	T1,B6	T1,B6	T1,B2	T1,B4
T1,B4	T3,B5	T3,B6	T2,B6	T1,B2	T2,B2	T1,B2	T1,B5	T2,B5	T1,B5	T3,B4	T2,B2
T2,B3	T2,B2	T1B6	T1,B4	T2,B1	T3,B6	T1,B4	T2,B4	T3,B5	T3,B5	T2,B4	T2,B3
T2,B1	T3,B3	T2,B6	T1,B1	T2,B5	T1,B5	T2,B2	T3,B6	T3,B1	T3,B2	T3,B1	T2,B5
T2,B4	T3,B4	T1,B3	T3,B1	T1,B3	T3,B3	T1,B1	T2,B1	T3,B2	T2,B6	T2,B1	T3,B3

Establecida la distribución de los tratamientos las variables a evaluar fueron las siguientes:

- Virulencia sobre la broca de café (% de mortalidad, Presencia del hongo sobre la broca del café) a nivel de laboratorio y plantación de café establecida.
- Colonización del hongo sobre los sustratos orgánicos utilizados como medios de cultivo.
- Efectividad de los recipientes para almacenar los sustratos con inoculación de *Beauveria bassiana*.

Para evaluar las variables se realizó un análisis de varianza de acuerdo al diseño bloques al azar con arreglo bifactorial combinatorio, una prueba de medias de Tukey al 5% y un presupuesto de costos de producción para saber con exactitud cuál de los tratamientos fue el más eficiente para continuar ejecutándolo dentro de la finca.

2.1.1 Modelo Estadístico Utilizado

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = la puntuación del i sujeto bajo la combinación del j valor del factor A y el k valor del factor B.

μ = la media común a todos los datos del experimento.

α_j = el efecto o impacto de j nivel de la variable de tratamiento A.

β_k = efecto del k valor de la variable de tratamiento B.

$(\alpha\beta)_{jk}$ = efecto de la interacción entre el i valor de A y el k valor de B.

2.1.2 Fórmulas para realizar el análisis de varianza

ϵ_{ij} = error experimental o efecto aleatorio de muestreo.

Convertido los datos se procedió a realizar los cálculos correspondientes para realizar el análisis de varianza y poder determinar si existía diferencia significativa entre los tratamientos para ellos se utilizó el análisis de varianza correspondiente al diseño bifactorial completamente al azar con arreglo combinatorio el cual se muestra a continuación con su respectivo resumen en el cuatro cinco.

r.v	g.l.	SS	CM	r	E(CM)
Bloques	r - 1	SS _{BL}	SS _{BL} /(r-1)		
A	a - 1	SS _A	SS _A /(a - 1)	CM _A /CM _E	$\sigma^2 + rb \theta_a^2$
B	b - 1	SS _B	SS _B /(b - 1)	CM _B /CM _E	$\sigma^2 + ra \theta_b^2$
AB	(a-1)(b-1)	SS _{AB}	SS _{AB} /(a-1)(b-1)	CM _{AB} /CM _E	$\sigma^2 + r \theta_{ab}^2$
Error	Ab(n-1)	SS _E	SS _E /ab(n-1)		σ^2
Total	abn - 1	SS _T			

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2 - \frac{y_{...}^2}{abn}$$

$$SS_A = \frac{1}{bn} \sum_{i=1}^a y_{i..}^2 - \frac{y_{...}^2}{abn}$$

$$SS_B = \frac{1}{an} \sum_{j=1}^b y_{.j.}^2 - \frac{y_{...}^2}{abn}$$

$$SS_{AB} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y_{ij.}^2 - \frac{y_{...}^2}{abn} - SS_A - SS_B$$

$$SS_E = SS_T - SS_{AB} - SS_A - SS_B$$

$$SS_{bloques} = \frac{1}{t} \sum_{j=1}^t y_{..k}^2$$

2.1.3 Fórmula para realizar prueba de media de Tukey

Para la prueba de medias del factor A se utilizó la siguiente fórmula:

$$W = q(a, Glerror, \alpha) \times \sqrt{\frac{CMerror}{na}}$$

Luego de haber calculado Tukey al 5% se realizaron las comparaciones para eliminar que factores tenían los mejores resultados en cuanto al sustrato donde mejor se proliferó el hongo *Beauveria bassiana*, para ello los datos de cada factor fueron colocados en forma horizontal de mayor a menor cada tratamiento y menor a mayor los mismos tratamientos y así poder eliminar los que no correspondían o no tenían significancia. Esto se realizó mediante una resta la cual consistió en restar el primer factor del orden horizontal y el primero del orden vertical y así sucesivamente con todos los factores.

2.2 Preparación de laboratorio

- **Desinfección y Construcción del área de trabajo**

Una vez establecido el diseño experimental y las variables a evaluar se procedió a designar el área en finca Santa Anita donde se estableció el laboratorio siendo este un cuarto de 3x3 m para llevar el proceso de inoculación del hongo y otro cuarto de 3x5 m. para el área de almacenaje de los medios de cultivos ya envasados. Se construyó una mesa de trabajo con las medidas de 3mx0,5mx1m y dos estanterías de 3.5m de largo, 0.5 metros de ancho y dos metros de alto dejando 0.25 de altura del suelo hasta la primera división que esta iba a poseer para luego dejar 0.75 metros entre cada división. Ver figura cinco incisos a y b en la página.

Una vez realizado el equipo de trabajo a utilizar se procedió a la preparación de los desinfectantes a utilizar para desinfección, limpieza y preparación de los cuartos designados mediante la utilización productos químicos como cloro, detergente en polvo (fab) y agua en dosis de 240 ml de cloro + 240 ml de fab y 2000 ml de agua. Ya preparada la mezcla se procedió a la limpieza y desinfección de los cuartos mediante un lavado y cepillado de piso, lavado de estanterías y mesa de trabajo. Ver figura cinco incisos c y d en la siguiente página.



Figura 5: Preparación y Desinfección del área de trabajo

2.3 Obtención de materiales a utilizados en el laboratorio

Los materiales utilizados en el laboratorio fueron, cajas de Petri, papel filtro, atomizadores, algodón, masking type, mascarillas cubre bocas, guantes de hule, bolsas plásticas, servilletas de papel, medios de cultivos (sustratos orgánicos), envases utilizaos, utensilios de plástico, entre otros equipos fueron proporcionados por el estudiante de E.P.S y el propietario de finca Santa Anita. Ver figura seis en la página siguiente.



Figura 6: Equipo y Materiales a utilizar en el laboratorio.

2.4 Obtención de la Cepa de *Beauveria bassiana*

Después de contar con todo lo necesario que se requería para implementar la fase del laboratorio se procedió a adquirir la cepa del hongo *Beauveria bassiana* en el laboratorio de Anacafé ubicado en la finca Buena Vista en el departamento de Retalhuleu, siendo la cantidad adquirida de 500 gramos, garantizando así que eran cepas viables, de calidad y patogenicidad y concentración de número de conidias para su aislamiento.

Sin embargo, para el traslado de la cepa se recomendó que esta se traslade a una temperatura no mayor a los 30°C para ello la cepa debió ser colocada en un contenedor con cubos de hielo para su traslado y así mantener una temperatura óptima para que el hongo no sufra cambios o alteraciones en su estructura. Se colocaron los cubos de hielo al fondo del recipiente para luego ser cubiertos con hojas

de papel periódico y luego se introdujo el hongo dentro del contenedor para luego cerrar el recipiente y trasladarlo al lugar de origen. Además, se recomendó que el hongo fuera utilizado el mismo día de su traslado de no ser así, el hongo debía ser almacenado en un refrigerador para su conservación. Ver figura siete.

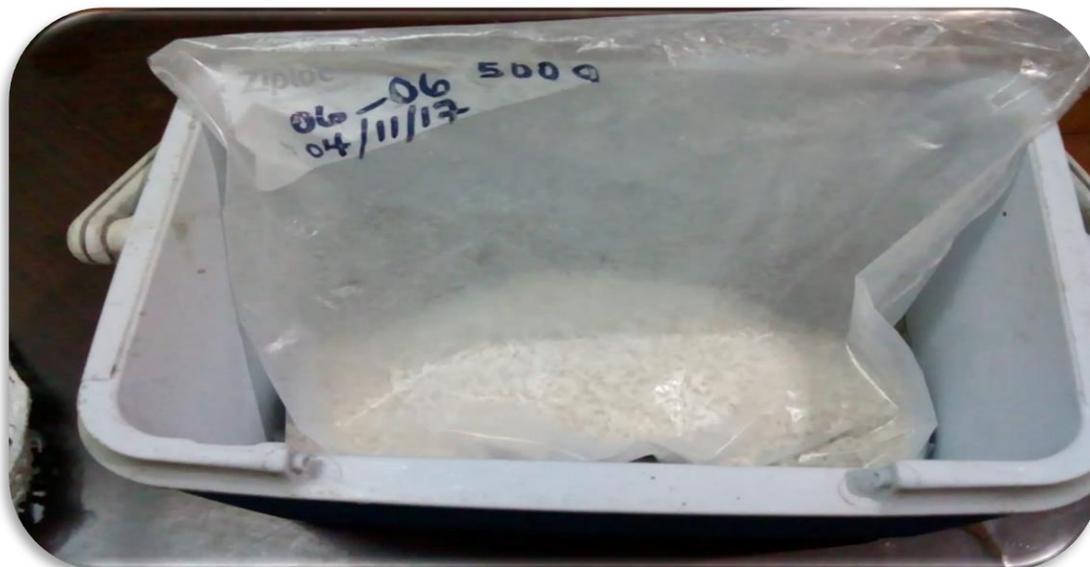


Figura 7: Cepa de *Beauveria bassiana* Bb-CA-0606

2.5 Limpieza y desinfección de los medios de cultivos y envases

- **Envases**

En el lavado, desinfección y esterilización de los recipientes que se utilizaron para el almacenaje de los medios de cultivos se procedió a preparar una mezcla de 200 ml de cloro, 200 ml de detergente en polvo “fab” y 50 litros agua diluidos en un recipiente con capacidad de 200 litros para luego continuarse con el lavado y desinfectado de los envases de la siguiente manera.

- **Botellas pets de 2.5 litros**

1. Se Introdujeron 300 ml de la solución preparada anteriormente dentro de las botellas pets, se agitaron para que el líquido pudiera ser esparcido en todo el interior del envase.
2. Seguidamente, se introdujo un cepillo de limpieza (cepillo para limpiar pachas de bebe), con objeto de eliminar cualquier impureza que este dentro del envase.

3. Luego, se enjuagó tanto el interior como el exterior de los envases pets con agua limpia para eliminar las impurezas como los residuos del desinfectante utilizado, se recomendó un mínimo de tres veces para garantizar la eliminación total de los residuos. Ver figura ocho inciso a en la página 43.
4. Por último, se almacenó cada envase en el área de inoculación la cual ya se encontraba desinfectada para evitar contaminación de este.

- **Botellas de vidrio de un litro**

1. Se introdujeron 300 ml de la solución preparada anteriormente dentro de las botellas de vidrio, se agitaron para que el líquido pudiera ser esparcido en todo el interior del envase.
2. Seguidamente, se introdujo un cepillo de limpieza (cepillo para limpiar pajas de bebe), con objeto de eliminar cualquier impureza que estuviese dentro del envase.
3. Luego, se enjuagó tanto el interior como el exterior de los envases pets con agua limpia para eliminar las impurezas como los residuos del desinfectante utilizado, se recomendó un mínimo de tres veces enjuagar para garantizar la eliminación total de los residuos.
4. Una vez limpio los envases se esterilizaron mediante un baño maría a 100°C durante 15 minutos después de que el agua empezó a hervir. Ver figura 8, inciso b en la siguiente página. Por último, se almacenaron los envases para su enfriamiento, introducción del sustrato e inoculación del hongo.

- **Bolsas**

1. Las bolsas de dos libras fueron nuevas y resistentes, se recomendó una desinfección mediante la utilización de una toalla limpia con alcohol al 90%.



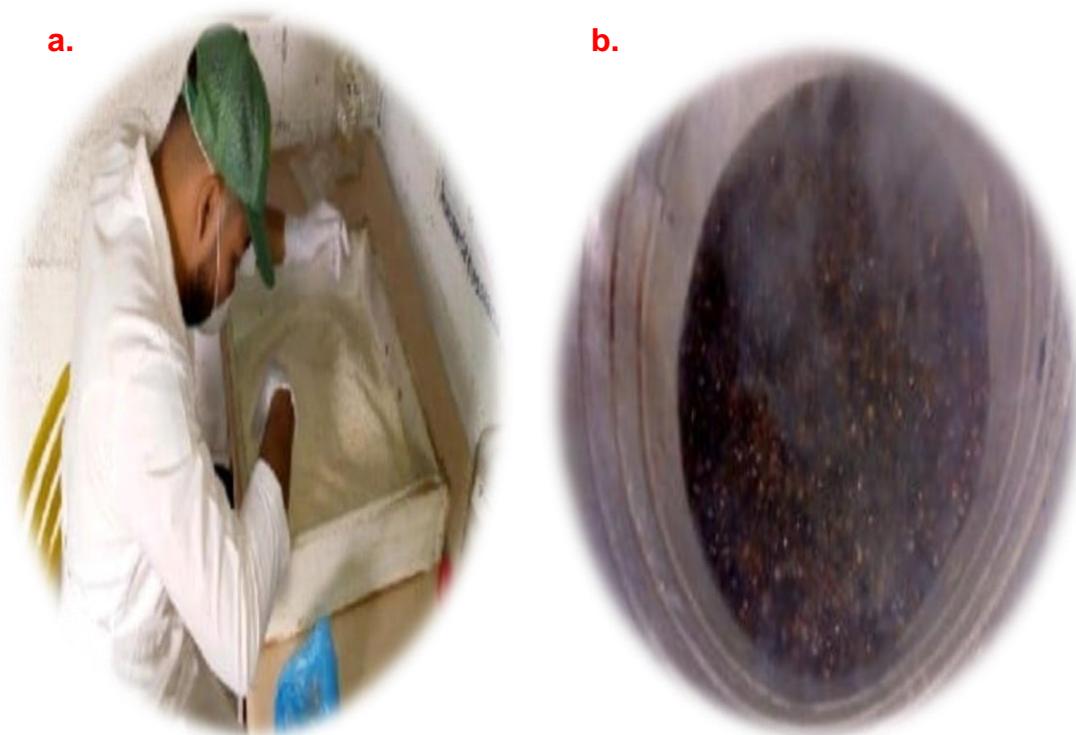
**Figura 8: a. Lavado, limpieza y desinfección de envases
b. Esterilización de envases de vidrio de un litro**

2.6 Medios de Cultivo

1. Seguidamente se procedió a limpiar tanto los medios de cultivos eliminando cualquier impureza que se observaron tales como; piedrecitas, semillas

muy deterioradas y cualquier otro material dentro de los sustratos que no correspondían al mismo. Ver figura nueve inciso a.

2. Luego, se procedió al lavado de los medios de cultivos (sustratos orgánicos), los cuales se lavaron tres veces con agua hervida, para luego ser precocidos durante cinco minutos. Ver figura nueve inciso b. Por último, se trasladaron los sustratos al laboratorio para que estos se enfriaran a temperatura ambiente para luego poder utilizarlos.



**Figura 9: a. Eliminación de impurezas en los sustratos
b. Pre-cocido de los sustratos**

2.7 Conteo de Conidias

Como siguiente paso, se procedió al conteo de número de conidias que se introdujo en los sustratos siendo este la misma cantidad para cada uno de los sustratos. Dicho conteo se llevará a cabo mediante la utilización de la cámara Neubauer la cual es especial para dicho procedimiento. Y se evaluó mediante la utilización de la siguiente fórmula: Número de conidias por ml y el número total de

conidias utilizando la siguiente fórmula: $\text{conidias/ml} = \frac{\text{\#de conidias contadas} \times 25,000 \times \text{Factor de dilución}}{\text{Conidias total} \times \text{ml} \times \text{Volumen de la suspensión original de conidias}}$.

2.8 Introducción del sustrato en envases

Seguidamente se introdujeron los sustratos en las botellas y bolsas para lo cual se utilizó 200 gramos del sustrato más 50 ml de agua y cinco gramos de la cepa de *Beauveria bassiana*. Ver figura 10, inciso a. No sin antes desinfectar los materiales que se utilizaron como lo fueron la servidora de acero inoxidable utilizada mediante el uso de alcohol el cual fue rociado sobre una bola pequeña de algodón de dos gramos para luego limpiar la servidora y posteriormente fue colocada al fuego para garantizar la desinfección y eliminación de cualquier impureza que afectara el proceso de inoculación de la cepa. Así mismo se utilizó el equipo necesario como: guantes de hule, mascarilla cubre boca, agua desmineralizada para evitar la contaminación mediante la manipulación de la cepa a inocular. Ver figura 11, inciso b, en la siguiente página.

2.9 Siembra de Conidias

Una vez establecido el número de conidias se procedió a la siembra del hongo en el medio de cultivo para luego ser almacenados en el cuarto de almacenaje donde se encontraba la estantería de madera construida para esta etapa del experimento. Ver figura 11, inciso c, en la siguiente página.



Figura 10: Introducción de los sustratos en los envases y bosas



**Figura 11: b. Esterilización de materiales a utilizar
c. Inoculación de la cepa de *Beauveria bassiana***

2.10 Almacenaje de los medios en estudio

Luego de haber inoculado todos los medios de cultivos en sus respectivos recipientes de almacenaje se trasladaron al cuarto de almacenamiento y colocados de acuerdo con el diseño experimental establecido para esta investigación como se presentó en el cuadro dos. Los medios en estudio permanecieron guardados durante 30 días libres de insectos, y contaminación para su buena reproducción, como se observa en la figura 12 en la página siguiente.



Figura 12: Almacenamiento de las unidades experimentales en investigación

2.11 Colonización de *Bauveria bassiana* sobre los medios de cultivos

Luego de la inoculación del hongo sobre los sustratos, se procedió a observar el crecimiento del hongo a los 15 y 30 días después de su inoculación, la forma en que se midió el crecimiento del hongo fue mediante marcaciones realizadas en los diferentes recipientes de almacenaje para determinar el porcentaje que este había colonizado. Por ejemplo, en el envase de un litro se dividió en ocho partes iguales agregando 125cc de agua con el objetivo de realizar las marcaciones al recipiente de un litro. Ver figura 13 en la siguiente página.

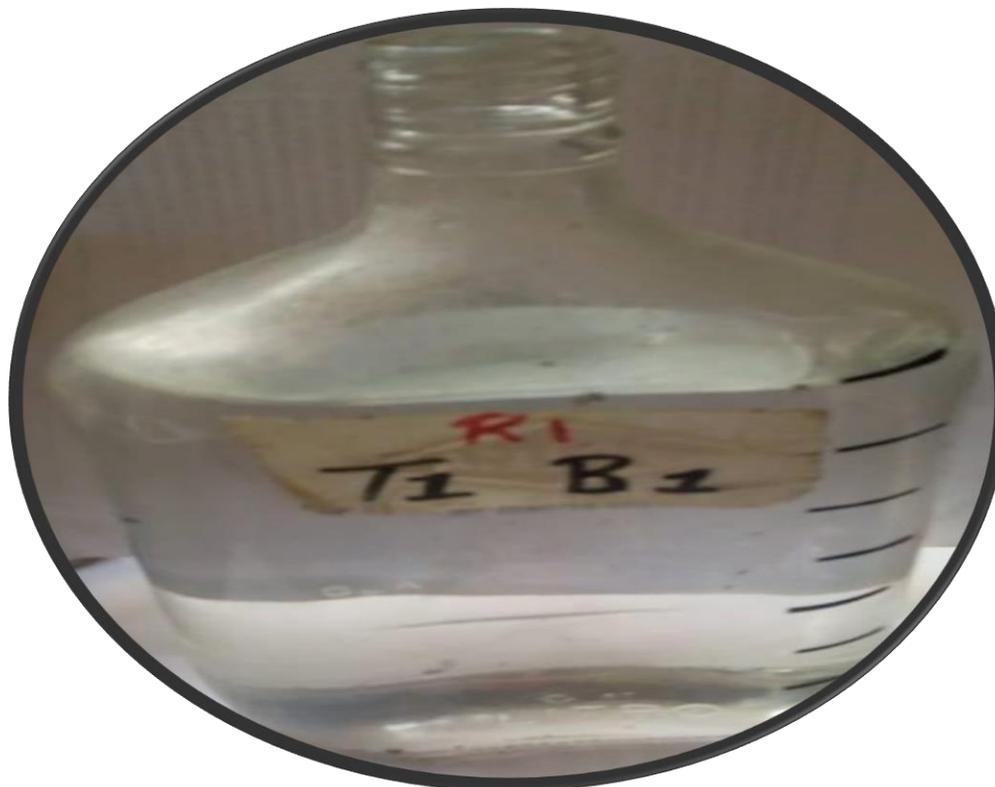


Figura: 13 Recipiente de muestra para medir colonización de *Beauveria bassiana*

2.11 Conteo de conidias obtenidas por sustratos

Al cabo de 15 y 30 días se procedió al conteo de conidias para observar el crecimiento del hongo el cual constituyó en extraer un gramo del sustrato y colocarlo sobre una caja Petri más diez ml de agua para luego ser diluido con movimientos circulares mediante la utilización de una varilla de vidrio para garantizar la suspensión de las conidias y poder ser contadas en la cámara de Neubauer. Luego de realizar la suspensión se realizó el traslado de 1 ml de la suspensión preparada más diez ml de agua hasta lograr una suspensión que permitió el conteo de conidias en la cámara, siendo esta la suspensión 1×10^4 . Luego se extrajo 0.1 ml de la suspensión mediante el uso de una pipeta la cual fue colocada en un porta objetos y cubierta con un cubre objetos para su observación en el microscopio, no sin antes haber colocado la cámara Neubauer y ser esta calibrada para su observación, ver figura 14 en la página siguiente. La observación se hizo en todos los sustratos mediante el mismo procedimiento para obtener los resultados requeridos.

Para el conteo se utilizó un microscopio y utilizando el objetivo de aumento de 40x y una cámara Neubauer para determinar el número de conidias por ml y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{conidias/ml} = (\# \text{ de conidias contadas} \times 25,000 \times \text{Factor de dilución}), \quad \text{Conidias total} = \frac{\text{Conidias}}{\text{ml} \times \text{Volumen de la suspensión original de conidias}}.$$

Luego los datos fueron transformados mediante la fórmula $\sqrt{x + 1}$ en donde:

x es el número de conidias observadas y

1 es igual a una constante,

Esto con el propósito de transformar todos los datos a variables continuas y se distribuyeran continuamente para poder realizar los cálculos requeridos para realizar el análisis de varianza.



Figura 14. Observación y conteo de conidias

3. Comprobación del porcentaje de mortalidad de *Beauveria bassiana* sobre el insecto *Hypothenemus hampei* F. a nivel de laboratorio y en campo definitivo en el cultivo de café en producción

Luego de observar el número de conidias de todos los medios de cultivo se, se procedió a la comprobación de virulencia del hongo sobre el insecto a nivel laboratorio, para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

3.1 Recolección de frutos e insectos

1. Se hicieron caminamientos dentro de finca Santa Anita para recolectar frutos maduros en buen estado, así como frutos que se encontraban brocados para la extracción del insecto.
2. Ya recolectados tanto los insectos como los frutos se procedió a colocar un fruto de café dentro de cada caja Petri como medio de alimentación para las broca, por cada fruto se colocaron cinco insectos de *Hypothenemus hampei* F..
3. Una vez obtenidas las colonias de insectos y colocadas en las cajas Petri se procedió a realizar las suspensiones a aplicar sobre los insectos mediante la utilización de un atomizador para luego quedar en observación por 25 días.
4. Pasados los 25 días se procedió a examinar los frutos y extraer el insecto para su observación en el microscopio con objeto de observar si el insecto se encontraba muerto y si la causa de su muerte había sido por causa del hongo *Beauveria bassiana*. Ver figura 15 en la siguiente página.



Figura 15. Comprobación de virulencia de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*

5. Para la toma de datos del efecto de *Beauveria bassiana* en el cultivo de café se realizaron los siguientes procedimientos.
 - Localización y ubicación de los sitios dentro de la finca más afectados por *Hypothenemus hampei* dentro de la finca. Ver figura 16.



Figura 16. Croquis de los lugares más afectados por *Hypothenemus hampei*.

- Luego de conocer los porcentajes de nivel de infestación de la broca dentro de la finca se llevó a cabo la aplicación del hongo *Beauveria bassiana* para el control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei F.* utilizando una dosis de 500 gramos de cepa/manzana para poder contrarrestar y disminuir el 27% de infestación que el insecto *Hypothenemus hampei F.* estaba provocando en los frutos de café.
- Por último, la recolección se realizó 25 días después de la aplicación del hongo para luego ser llevados al laboratorio para observar el insecto mediante el uso de un microscopio y así verificar si el insecto se encontraba muerto y si efectivamente la causa de la muerte era el uso del hongo en estudio.

4. Presupuestos parciales por Producción

Con el propósito de desarrollar una recomendación para la producción de *Beauveria bassiana* para el control biológico de la broca del café *Hypothenemus hapei F.*, se condujo un experimento que considero los siguientes tratamientos para su evaluación.

T6B1. Envase de vidrio de un litro, 200 gramos de arroz y cinco gramos de cepa de *Beauveria bassiana* más 50 ml de agua.

T6B3. Envase pet de 3 l., 200 gramos de arroz, cinco gramos de cepa de *Beauveria bassiana* más 50 ml de agua.

A5B1. Envase de vidrio de un litro, 200 gramos de sorgo y cinco gramos de cepa de *Beauveria bassiana* más 50 ml de agua.

A5B3. Envase pet de 3 l., 200 gramos de sorgo, cinco gramos de cepa de *Beauveria bassiana* más 50 ml de agua.

A1B1. Envase de vidrio de un litro, 200 gramos de Maíz quebrantado y cinco gramos de cepa de *Beauveria bassiana* más 50 ml de agua.

A1B3. Envase pet de 3 l., 200 gramos maíz quebrantado, cinco gramos de cepa de *Beauveria bassiana* más 50 ml de agua.

VI. Presentación de resultados

- Determinación del medio de cultivo más eficiente para la colonización del hongo *Beauveria bassiana* y recipiente más adecuado para almacenar el hongo.

Cuadro 3. Conteo de conidias obtenidas sin transformación de datos

Tipo de Recipiente	Medio de Cultivo	Bloques				Total
		I	II	III	IV	
Botella de vidrio de 1 litro	Maíz Quebrantado	3	2	2	1	8
	Gallinaza	1	1	1	1	4
	Harina de Maíz	1	0	3	1	5
	Pulpa de Café	1	2	1	2	6
	Sorgo	3	3	2	1	9
	Arroz	3	2	4	3	12
Bolsa Siploc de 2 libra	Maíz Quebrantado	1	2	1	0	4
	Gallinaza	0	1	1	0	2
	Harina de Maíz	1	0	1	1	3
	Pulpa de Café	1	1	2	1	5
	Sorgo	2	2	1	0	5
	Arroz	2	3	1	2	8
Botella Pet de 2.5 l.	Maíz Quebrantado	0	2	1	2	5
	Gallinaza	2	0	1	1	4
	Harina de Maíz	0	2	0	2	4
	Pulpa de Café	1	2	0	1	4
	Sorgo	2	3	2	0	7
	Arroz	1	2	3	2	8

En el cuadro 3, se observan los resultados obtenidos correspondientes al número de conidias observadas en el laboratorio, sin embargo, se observa algunos valores con el número cero esto debido a que los tratamientos correspondientes a este valor sufrieron desperfectos como contaminación de los sustratos, (ver figura 19 en anexos),

y para evitar contaminación sobre los demás tratamientos, fueron extraídos del lugar de almacenaje.

En el cuadro cuatro que se presenta a continuación se observa que los datos fueron transformados debidos a que era necesario hacerlo para realizar los cálculos del diseño experimental planteado para esta investigación

Cuadro 4. Cálculo de promedio de conidias obtenidas transformadas la fórmula $\sqrt{(x + 1)}$ para su análisis

		Bloques				
Tipo de Recipiente	Medio de Cultivo	I	II	III	IV	Yij.
Botella de vidrio de 1 litro	Maíz Quebrantado	2	1.73	1.73	1.41	6.87
	Gallinaza	1.41	1.41	1.41	1.41	5.64
	Harina de Maíz	1.41	0.5	2	1.41	5.32
	Pulpa de Café	1.41	1.73	1.41	1.73	6.28
	Sorgo	2	2	1.73	1.41	7.14
	Arroz	2	1.73	2.23	2	7.96
Bolsa Siploc de 1 libra	Maíz Quebrantado	1.41	1.73	1.41	0.5	5.05
	Gallinaza	0.5	1.41	1.41	0.5	3.82
	Harina de Maíz	1.41	0.5	1.41	1.41	4.73
	Pulpa de Café	1.41	1.41	1.73	1.41	5.96
	Sorgo	1.73	1.73	1.41	0.5	5.37
	Arroz	1.73	2	1.41	1.73	6.87
Botella Pet de 2.5 l.	Maíz Quebrantado	0.5	1.73	1.41	1.73	5.37
	Gallinaza	1.73	0.5	1.41	1.41	5.05
	Harina de Maíz	0.5	1.73	0.5	1.73	4.46
	Pulpa de Café	1.41	1.73	0.5	1.41	5.05
	Sorgo	1.73	2	1.73	0.5	5.96
	Arroz	1.41	1.73	2	1.73	6.87
	y..k	25.7	27.3	26.84	23.93	
					Y...	103.77
					Ȳ...	1.44

Cuadro 5. ANOVA, cálculo total del promedio de conidias obtenidas por tratamiento

Tipo de Recipiente	Medios de Cultivo						Y.j.	Ȳ.j.
	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
B1	6.87	5.64	5.32	6.28	7.14	7.96	39.21	1.63
B2	5.05	3.82	4.73	5.96	5.37	6.87	31.8	1.32
B3	5.37	5.05	4.46	5.05	5.96	6.87	32.76	1.36
Yi..	17.29	14.51	14.51	17.29	18.47	21.7		
Ȳi..	1.44	1.2	1.2	1.44	1.53	1.8		

Cuadro 6. Resumen de Análisis de Varianza

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	F crítica 5%
Bloques	3	0.38			
A	5	3.03	0.6	*2.85	2.4
B	2	1.36	0.68	*3.23	3.18
AB	10	0.45	0.045	0.21	2.03
Error Experimental	51	10.71	0.21		
Total	71	15.93			

C.V = 18.91%

Al observar el crecimiento del hongo sobre los sustratos ver cuadro 16 en anexos y realizar los cálculos correspondientes al modelo estadístico utilizado D.C.A con arreglo combinatorio y con un nivel de significancia del 5 % se estableció que existen diferencias significativas en las variables, colonización del hongo sobre los sustratos y efectividad de los recipientes para almacenar el hongo *Beauveria bassiana*. Sin embargo, para establecer estadísticamente cual o cuales serían los sustratos y recipientes más adecuados para la producción de *Beauveria bassiana* se necesitó realizar una prueba múltiple de medias y así poder recomendar lo mejor a Finca Santa Anita. En cuanto al coeficiente de variación (C.V), se observa que es de un 18.91% lo cual indica que el experimento fue bien controlado debido a que este no debe exceder un 25%.

a). prueba de Tukey para el factor “A”

$$W = q(6,51,0.05) \times \sqrt{\frac{0.21}{(4)(3)}} = 4.23 \times 0.13 = 0.54$$

Cuadro 7. Matriz de diferencias de colonización de *B. bassiana* sobre los sustratos

		Factores de A					
		A6	A5	A1	A4	A3	A2
Factor A	Medias	1.8	1.53	1.44	1.44	1.2	1.2
A2	1.2	0.6*	0.33 Ns	0.24 Ns	0.24 Ns	0 Ns	0 Ns
A3	1.2	0.6*	0.33 Ns	0.24 Ns	0 Ns	0 Ns	
A4	1.44	0.36 Ns	0.09 Ns	0 Ns	0 Ns		
A1	1.44	0.36 Ns	0.09 Ns	0 Ns			
A5	1.53	0.27 Ns	0 Ns				
A6	1.8	0 Ns					

Cuadro 8. Presentación de resultados en prueba de medias factor A.

Tratamiento	Medias	Codificación
A6	1.8	A
A5	1.53	ab
A1	1.44	
A4	1.44	
A2	1.2	b
A3	1.2	

Luego de realizar la prueba de Tukey al 5% se establece que el mejor tratamiento en cuanto al medio de cultivo para la colonización del hongo *Beauveria bassiana* es el tratamiento A6, correspondiente al sustrato de arroz el cual tiene una producción de 1.8 conidias/0.1 mililitro, seguidamente se encuentran a los tratamientos A5, A1 y A4 los cuales son, sorgo, maíz quebrantado y pulpa de café y por último se encuentran los tratamientos A2 y A3 son los menos adecuados para la colonización del hongo en estudio siendo estos la gallinaza y harina de maíz. Se puede decir que el arroz es el medio de cultivo más utilizado en las diferentes fincas para producir *Beauveria bassiana* según Anacafé, sin embargo, con la investigación se esperaba que los resultados fueran distintos como por ejemplo que la pulpa de café tuviese

buenos resultados ya que es un sustrato en donde *Beauveria bassiana* se ha encontrado de forma natural entre los cafetales e incurriría en disminución de costos ya que los productores de café aprovecharían este sustrato para la producción del hongo y así combatir a la plaga del café que les afecta.

b). Prueba de Tukey para Factor "B"

$$W = q(3,51,0.05) \times \sqrt{\frac{0.21}{(4)(6)}} = 3.44 \times 0.093 = 0.30$$

Cuadro 9. Matriz de diferencia de los datos de recipientes para envasar y colonizar *B. bassiana*.

		FACTORES DE B		
		B1	B3	B2
Factor B	Medias	1.63	1.36	1.32
B2	1.32	0.31*	0.04 Ns	0 Ns
B3	1.36	0.27 Ns	0 Ns	
B1	1.63	0 Ns		

Cuadro 10. Presentación de Resultados

Tratamiento	Media	Codificación
B1	1.63	A
B3	1.36	ab
B2	1.32	b

En la prueba de medias del factor B correspondiente a tipos de envases para almacenar y colonizar el hongo *Beauveria bassiana* y realizar la prueba de medias de Tukey al 5%, se establece que el mejor tipo de envases es el tratamiento B1 correspondiente al envase de vidrio de un litro, en segundo lugar se encuentra al tratamiento B3 correspondiente al envase pet de 2.5 litros. Por último, se encuentra el tratamiento B2 correspondiente a las bolsas ziploc de dos libras. Se puede decir que el envase indicado y más adecuado para el almacenamiento del hongo es el envase de vidrio, sin embargo, se debe analizar los diferentes tipos de trabajo que conlleva la utilización de este recipiente, ya que a diferencia de los otros dos este recipiente requiere de mayor trabajo en cuanto a recolección, desinfección y esterilización del

recipiente. para ello es necesario hacer un análisis de costos por producción para determinar efectivamente que sustrato y que recipiente se pueden emplear en la finca Santa Anita para poder continuar con la producción del hongo en estudio.

2. Virulencia del hongo *Beauveria bassiana* sobre el insecto *Hypothenemus hampei* en el laboratorio y a nivel de campo.

Al realizar las pruebas correspondientes sobre la virulencia de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café se obtuvieron los resultados que en el cuadro once se presentan.

Cuadro 11. Porcentaje de Brocas muertas por repetición a nivel de laboratorio.

		Media	Total de Brocas	Repeticiones				Total de brocas muertas	% de mortalidad
				Total de Brocas muertas					
Tratamiento				I	II	III	IV		
T6B1	Envase de vidrio de 1 l. y arroz	1.99	5	3	4	3	2	12	60
A5B1	Envase de vidrio de 1 l. y sorgo	1.71	5	2	2	3	2	9	45
T6B3	Envase pets de 2.5 l. y arroz	1.63	5	4	2	3	3	12	60
A1B1	Envase de vidrio de 1 l. y maíz quebrantado	1.53	5	1	3	3	3	10	50
A5B1	Envase de 2.5 l. y sorgo	1.49	5	4	2	2	0	8	40
A4B1	Envase de vidrio de 1 l. y pulpa de café	1.38	5	3	2	1	1	7	35

En el cuadro once se observan los resultados obtenidos en el laboratorio implementado en finca Santa Anita luego de haber aplicado el hongo *Beauveria bassiana* sobre las brocas colectadas. Al cabo de 25 días de aplicación del hongo se procedió a extraer y observar las brocas que se encontraban tanto dentro del fruto de café como las brocas que se encontraban en las cajas de Petri, para lograr observar la epizootia que el hongo había efectuado sobre el insecto y también se observó si el hongo obtuvo mayor virulencia en algún sustrato.

Entre los resultados obtenidos se evidencia que el hongo creado sobre el medio de cultivo de arroz obtuvo mayor mortalidad sobre el insecto no importando el tipo de recipiente de envasaje siendo estos el recipiente de vidrio de un litro y el envase pet

de 2.5 litros obteniéndose un porcentaje de mortalidad de 60%. Se observa también que los mejores resultados en cuanto tipo de envase adecuado para la el almacenaje lo obtienen los envases de vidrio de un litro esto puede ser debido a que fueron lavados y luego esterilizados mediante un baño maría, sin embargo, se observa que el maíz quebrantado obtuvo un 50% de virulencia en el combate de la broca del café en cuanto a mortalidad seguido del sorgo con un 45%. Por lo que se recomienda de acuerdo a los resultados obtenidos la producción de *Beauveria bassiana* sobre arroz debido al porcentaje de mortalidad que ocasionó sobre *Hypothenemus hampei F.*

Luego de la comprobación de la virulencia de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei F.* realizada en el laboratorio se realizó un presupuesto de costos por producción por tratamientos realizados para luego poder implementar la producción de *Beauveria bassiana* y poder llevar a cabo la aplicación al campo con el mejor sustrato y recipiente obtenido, a continuación, se muestran los costos por producción en el cuadro doce en la siguiente página.

Cuadro 12. Determinación de los costos por unidad producida

Tratamiento		Media	Significancia de Tukey al 5 %	Precio del sustrato en Quetzales	Precio por Unidad/jornal en Quetzales	Precio de leña utilizada en Quetzales	Precio del algodón/unidad en Quetzales	Total de costos en Quetzales
T6B1	Envase de vidrio de 1l. y arroz	1.99	a	1.32	3.33	2.5	0.13	7.28
A5B1	Envase de vidrio de 1l. y sorgo	1.71	ab	2.64	3.33	2.5	0.13	8.6
T6B3	Envase pets de 2.5 l. y arroz	1.63	ab	1.32	3.33	0.83	0.13	5.61
A1B1	Envase de vidrio de 1l. y maíz quebrantado	1.53	abc	0.73	3.33	2.5	0.13	6.69
A5B1	Envase de 2.5 l. y sorgo	1.49	abc	2.64	3.33	0.83	0.13	6.93
A4B1	Envase de vidrio de 1l. y pulpa de café	1.38	abcd	0.24	3.33	2.5	0.13	6.2

De acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño experimental y pruebas de media se procedió a realizar los costos de producción sobre los mejores sustratos y tipos de envasajes que obtuvieron los mejores rendimientos en número de conidias

producidas, siendo los ejemplares: T6B1, A5B1, T6B3, A1B1, A5B3 Y A4B1, para ello se llevó a cabo la suma total de costos de producción que cada uno de estos ejemplares poseían siendo el más barato en cuanto a producción y mayor porcentaje en mortalidad de la broca del café el tratamiento T6B3 correspondiente a la producción de *Beauveria bassiana* sobre el sustrato de arroz y envase pet de 2.5 litros con un costo promedio de Q 5.61 para su producción.

Cuadro 13. Costos por unidad y porcentaje de Mortalidad del Insecto

Tratamiento		Media	Significancia de Tukey al 5 %	Precio del sustrato en Quetzales	Precio por Unidad/jornal en Quetzales	Precio de leña utilizada en Quetzales	Precio del algodón/unidad en Quetzales	Total de costos en Quetzales	Total de brocas muertas	% de Mortalidad de broca por tratamiento
T6B1	Envase de vidrio de 1 l. y arroz	1.99	a	1.32	3.33	2.5	0.13	7.28	12	60
A5B1	Envase de vidrio de 1 l. y sorgo	1.71	ab	2.64	3.33	2.5	0.13	8.6	9	45
T6B3	Envase pets de 2.5 l. y arroz	1.63	ab	1.32	3.33	0.83	0.13	5.61	12	60
A1B1	Envase de vidrio de 1 l. y maíz quebrantado	1.53	abc	0.73	3.33	2.5	0.13	6.69	10	50
A5B1	Envase de 2.5 l. y sorgo	1.49	abc	2.64	3.33	0.83	0.13	6.93	8	40
A4B1	Envase de vidrio de 1 l. y pulpa de café	1.38	abcd	0.24	3.33	2.5	0.13	6.2	7	35

De acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño experimental y pruebas de media se procedió a realizar los costos de producción sobre los mejores sustratos y tipos de envasajes que obtuvieron los mejores rendimientos en número de conidias producidas, siendo los ejemplares: T6B1, A5B1, T6B3, A1B1, A5B3 Y A4B1, para ello se llevó a cabo la suma total de costos de producción que cada uno de estos ejemplares poseían siendo el más barato en cuanto a producción y mayor porcentaje en mortalidad de la broca del café el tratamiento T6B3 correspondiente a la producción de *Beauveria bassiana* sobre el sustrato de arroz y envase pet de 2.5 litros con un costo promedio de Q 5.61 para su producción.

A continuación en el cuadro 12 se presentan los resultados obtenidos en cuanto el control que se logró mediante la aplicación realizada en el cultivo de café.

Cuadro 14. Porcentaje de Mortalidad de *Hypothenemus hampei* F. obtenidos luego de la aplicación de *Beauveria Bassiana* en el cultivo de café

No.	Lugar	Total, de frutos brocados colectados	% de Mortalidad de la broca
1	Nardo	100	57
2	Cañal	100	48
3	Colima Viejo	100	51
4	Nevada	100	62
5	Mosaico	100	54
6	San Antonio	100	35
7	2007	100	28
8	Barranco	100	33
9	2008	100	37
10	Miramar 1	100	46
11	Miramar 2	100	38
12	Buena Vista	100	49
		Promedio	44.83

Al realizarse las aplicaciones de *Beauveria bassiana* en el cultivo de café en Finca Santa Anita para el control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei* F. y utilizando una dosis de 500 gramos de cepa/manzana se logró controlar el 44.83% del insecto que afectaba el café dentro de la finca correspondiente a la cosecha 2017-2018. Para la obtención de estos resultados se colectaron 100 frutos de café brocado de cada sitio donde se implementó *Beauveria bassiana*.

La recolección se realizó 25 días después de la aplicación del hongo para luego ser llevados al laboratorio para observar el insecto mediante el uso de un microscopio y así verificar si el insecto se encontraba muerto y si efectivamente la causa de la muerte era el uso del hongo en estudio.

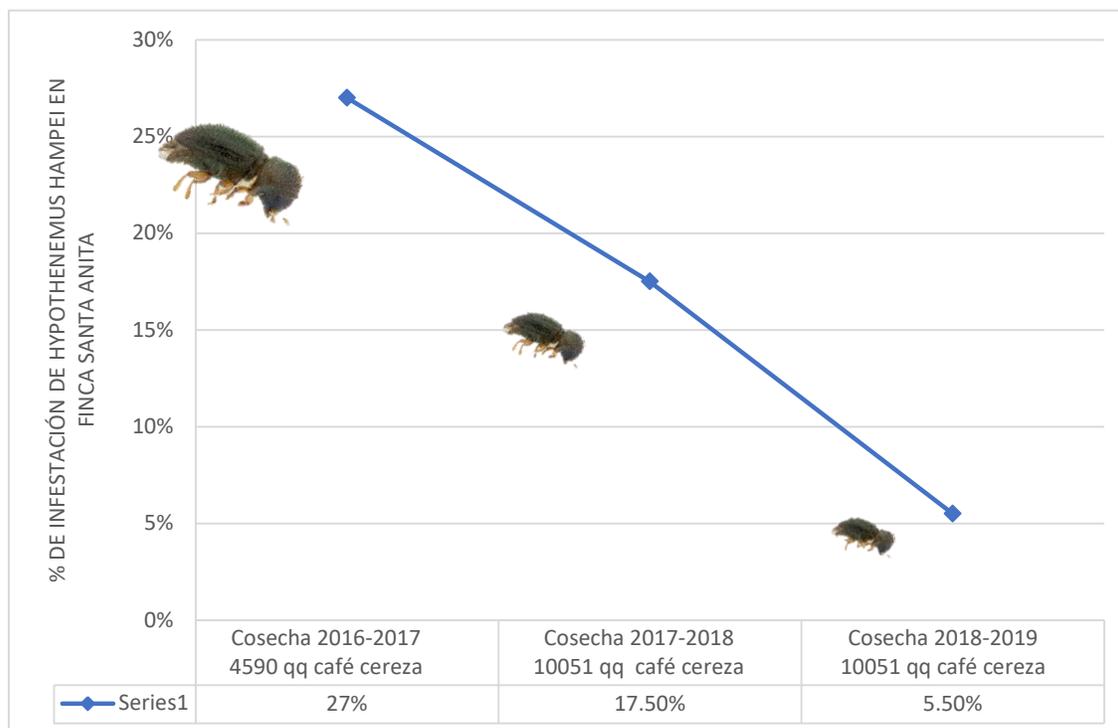


Figura 17. Porcentaje de infestación de *Hypothenemus hampei* F. cosecha 2018-2019

Según el muestreo realizado en el mes de Mayo de 2018 y mediante un manejo integrado de plagas utilizando *Beauveria bassiana* + control etológico trampas (ECO-IAPAR) + manejo cultural (pepena y repela) de los frutos dio como resultado una incidencia del 5.5% de infestación de la broca sobre los frutos de café que hay en la finca actualmente. Esto quiere decir que se logró controlar un 21.5% de la plaga conocida como broca del café en finca Santa Anita.

Esto quiere decir que *B. bassiana* controló un 9.63% a la broca del café y que las trampas etológicas junto a las prácticas culturales realizadas en la finca lograron un control sobre la broca del café en un 10.63%. Esto lleva a comparar las pérdidas que se hubieran obtenido en la cosecha 2017 – 2018 de no implementarse las prácticas necesarias para el control de la broca del café y un estimado de pérdidas para la cosecha actual 2018-2019 mediante la utilización del último muestreo de broca y datos de cosecha obtenidos en la última cosecha de la finca.

Cuadro 15. Comparación de pedidas por cosecha debido a *Hypothenemus hampei* F.

	Producción de café cereza	Estimació de perdidas sin control 27% de infestación de broca	Estimación de pérdidas con control cultural, etológico y otros 17.5% de infestación de broca	Estimació de pérdidas económicas con control cultural, etológico más <i>Beauveria bassiana</i> . 5.5 % de infestación de broca
Cosecha 2016-2017	4590	Q192,879.00		
Cosecha 2017-2018	10051	Q423,145.05	Q274,260.65	
Cosecha 2018-2019	10051	Q423,145.05		Q86,196.98

Se puede observar en el cuadro 14 los resultados de las buenas prácticas agrícolas que se han implementado en el manejo y control de la broca del café en Finca Santa Anita, comparado a la cosecha 2016-2017 la broca del café se encontraba en un 27% con pérdidas de Q192,879.00 de acuerdo a la cosecha obtenida para ese año y que mediante la implementación de manejo cultural y trampas etológicas con su debido muestreo y limpieza y mantenimiento de las trampas se redujo a 17.5% equivalente a Q274,260.65 en pérdidas. Sin embargo, se observa un incremento en la producción de café para la cosecha 2017-2018 si se compara con la cosecha anterior y de no realizarse las prácticas anteriormente mencionadas se hubiera tenido una pérdida de Q423,145.01 esto quiere decir que debido a las prácticas realizadas se recuperaron Q148,884.36. Así mismo, haciendo un estimado en la producción de café en Finca Santa Anita para la cosecha 2018-2019 y mediante la aplicación de *Beauveria bassiana*, Según el último muestreo realizado en el mes de Mayo 2018 la incidencia de broca dentro de finca Santa Anita se encuentra en un 5.5%, esto determina que de mantenerse la producción de café para este año se estaría recuperando un total de Q336,948.03 y en pérdidas únicamente serían Q86,196.98 de los Q423, 145.01 en pérdidas totales que se estarían teniendo.

Por tal motivo se recomienda que finca Santa Anita continúe con la reproducción de *Beauveria bassiana* para controlar la broca del café mediante la utilización del sustrato arroz y envases pet para la colonización del hongo debido a los bajos costos de producción que este posee, cabe mencionar que de acuerdo a investigaciones de Anacafé y por experiencias obtenidas se recomienda también el uso de los envases

pet de 2.5 litros ya que este puede reciclarse después de haber servido como medio de almacenamiento para la producción del hongo utilizándose como trampas etológicas.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1 Se determinó que de los seis medios de cultivos en estudio el más eficiente para la colonización del hongo *Beauveria bassiana* fue el arroz con un 75% colonizado y un promedio de producción de conidias de 1.99 conidias/gramo diluido en una disolución de 1×10^4 .
- 7.2 Se estableció que el mejor recipiente para la colonización y almacenaje del hongo *Beauveria bassiana* de los tres métodos utilizados es el envase de vidrio de un litro debido a que fue este recipiente donde menos contaminación se observó en la producción del hongo.
- 7.3 Se observó que la cepa de *Beauveria bassiana* producida en arroz tuvo mayor virulencia en la mortalidad del insecto *Hypothenemus hampei* F. obteniéndose como resultados un 60% de mortalidad del insecto a nivel de laboratorio.
- 7.4 Al realizarse interacciones en la producción del hongo en el sustrato y envase en el análisis de costos de producción se determinó que el medio de cultivo y tipo de envasajes más adecuado acorde a las necesidades económicas de la finca es el sustrato arroz y el envase de plástico pet de 2.5 litros el cual tiene un costo de producción de Q 5.61/unidad.
- 7.5 Los resultados en el campo luego de la producción y aplicación del hongo *Beauveria bassiana* sobre en el cultivo de café en producción se logró un control del 44.83% de la broca que estaba afectando los frutos de café cereza.
- 7.6 Al realizarse un estimado en la producción de café en Finca Santa Anita para la cosecha 2018-2019 y mediante la aplicación de *Beauveria bassiana*, Según el último muestreo realizado en el mes de Mayo 2018 la incidencia de broca dentro de finca "Santa Anita" se encuentra en un 5.5%, esto determina que de mantenerse la producción de café para este año se estaría recuperando un total

de Q336,948.03 y en pérdidas únicamente serían Q86,196.98 de los Q423,145.01 en pérdidas totales que se proyectan.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1 Se recomienda continuar con la elaboración y producción de *Beauveria bassiana* utilizando como sustrato arroz y envase pet de 2.5 litros para mantener baja la incidencia de la broca del café dentro del cultivo en producción de la Finca.
- 8.2 Es necesario mantener limpia el área donde se va a realizar la inoculación del hongo y el área de almacenaje para evitar contaminación de los medios de cultivos y así evitar pérdida.
- 8.3 Aplicar el hongo *Beauveria bassiana* mediante un plan de aplicación adecuado evitando así los fungicidas químicos que puedan utilizarse en el cafetal por cuestiones de enfermedades como lo son Roya, Ojo de gallo entre otras enfermedades fungosas que necesiten ser tratadas debido a que los químicos que se aplican en los cafetales para contrarrestar estas enfermedades pueden eliminar al hongo de *Beauveria bassiana*.
- 8.4 La época de aplicación del hongo debe realizarse cuando el fruto este en formación ya que es en esta etapa del fruto cuando las brocas hembras comienzan a buscar el fruto para colocar sus huevecillos.
- 8.5 Realizar monitoreos constantes para saber en qué porcentaje de incidencia y severidad está ocasionando la broca del café para tomar decisiones de aplicación de *Beauveria bassiana* para el control del insecto.
- 8.6 Se recomienda efectuar un programa de Manejo Integrado para la Broca (MIB) para tener mejor control sobre el insecto debido a que este puede llegar a ocasionar pérdidas completas de cosecha si no se mantiene un control adecuado.
- 8.7 Se recomienda que finca Santa Anita continúe con la reproducción de *Beauveria bassiana* para controlar la broca del café mediante la utilización del sustrato arroz y envases pet para la colonización del hongo debido a los bajos

costos de producción que este posee, cabe mencionar que de acuerdo a investigaciones de Anacafé y por experiencias obtenidas se recomienda también el uso de los envases pet de 2.5 litros ya que este puede reciclarse después de haber servido como medio de almacenamiento para la producción del hongo utilizándose como trampas etológicas.

IX. Referencias Bibliográficas

1. Anacafé. (2010). *Alternativa biológica para el control de la broca del café*. Guatemala. Asociación Nacional del Café. Recuperado el 23 de marzo de 2017 en www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Beauveria_bassiana
2. Bustillo, A. y Posada, F. (1996). *El Uso de Entomopatogenos en el control de la Broca del café en Colombia*. Costa Rica. Manejo Integrado de plagas. Recuperado el 2 de septiembre de 2018 en https://www.researchgate.net/publication/274065455_El_uso_de_entomopatogenos_en_el_control_de_la_broca_del_cafe_en_Colombia
3. Camara Neubauer. (2018). Observación de la cámara Neubauer en el microscopio. Recuperado en http://wiki.org/wiki/cámara_de_Neubauer
4. Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, PE.: Centro Internacional de la Papa. Recuperado 28 de marzo de 2017 de www.cipotato.org
5. Cenicafé. (1996). *Parasitoides de Origen Africano para el control de la broca del café. Colombia. Federación Nacional de cafeteros de Colombia*. Recuperado el 2 de septiembre de 2018 en https://www.researchgate.net/publication/274510432_Parasitoides_de_origen_africano_para_el_control_de_la_broca_del_cafe
6. Constantino. L. M. (2005). Broca del café *Hypothenemus hampei* parasitada por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en un fruto de café *Coffea arabica*. Recuperado en <https://www.flickr.com/photos/140413390@N06/39246614150>
7. Góngora C., Marín P. y Benavides, P. (2009). *Claves para el éxito del hongo Beauveria Bassiana como controlador biológico de la broca del café*. Columbia. Avances Técnicos Cenicafé. Recuperado 27 de marzo 2017 en www.cenicafe.org/es/publications/avt0384.pdf

8. InfoAgro. (2004). *La broca del fruto del café. Sistema de Información del Sector Agropecuario Costarricense*. Recuperado el 28 de noviembre de 2018 en <http://www.infoagro.go.cr/Infoagro/Desplegables/La%20broca%20del%20fruto%20del%20caf%C3%A9.pdf>

9. Li, Z. Z., Li, C. R., Huang, B. and M. Z. (2001) *Discovery and demonstration of the teleomorph of Beauveria bassiana. Chinese Science Bulletin* (46), 751-753. China. Recuperado el 5 de noviembre de 2018 en http://www.naro.affrc.go.jp/org/fruit/epfdb/Deutte/Beauv/B_bassi.htm

10. Monzón, C. (2011). *Producción y uso de hongos Entomopatogenos*. Nicaragua. Fundación para el Desarrollo Agropecuario y Forestal de Nicaragua. Recuperado 24 de marzo de 2017 en funica.org.ni/index

Vo.Bo. Licda. Ana Teresa de González
Bibliotecaria CUNSUROC

X. ANEXOS

Cuadro 16. Crecimiento de *Beauveria bassiana* sobre los sustratos y tipo de envase utilizado

Porcentaje de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> sobre los sustratos orgánicos y el tipo de envase utilizado para su almacenaje				
	% de colonización en envase de vidrio de 1 litro	% de colonización en envase Pet de 2.5 litros	% de colonización en bolsa plástica de 2 libras	% de colonización total
Maíz quebrantado	68	70	60	66
Gallinaza	30	30	25	28.33
Harina de Maíz	45	30	40	38.33
Pulpa de café	60	55	55	56.66
Sorgo	70	65	70	68.33
Arroz	85	70	70	75



Figura 18. Medio de cultivo Sorgo



Figura 19. Contaminación del sustrato pulpa de café



Figura 20. Preparación de suspensión de *Beauveria bassiana* 1×10^4



Figura 21. Colocación de colonias de broca (*Hypothenemus hampei*) en cajas de Petri



Figura 22. Broca alimentándose del fruto de café

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA



Centro Universitario del Sur Occidente
CUNSUROC

Mazatenango, Agosto de 2019

Doctor
Guillermo Vinicio Tello Cano
Director Centro Universitario del Suroccidente
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director

De manera atenta me dirijo a usted para informar que el estudiante Pedro Leonardo Calel Hernández, quien se identifica con número de carné 201240686 de la Carrera de Agronomía Tropical, ha concluido su trabajo de Graduación titulado: **“Evaluación de medios de cultivo y tipos de envases para almacenaje en la producción de Beauveria bassiana en Finca Santa Anita, Zunilito Suchitepéquez”**, el cuál fue asesorado, revisado con dictamen favorable del Ingeniero Agrónomo Augusto Israel Solares.

Como coordinador de la carrera de Agronomía tropical, hago constar que el estudiante Pedro Leonardo Calel Hernández, ha cumplido con el normativo de Trabajo de Graduación, razón por la que someto a consideración el documento presentado por el estudiante, para que continúe con el trámite correspondiente.

Sin otro particular, me suscribo

Atentamente .

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

M.Sc. Erick Alexander España Miranda
Coordinador Carrera de Ingeniería en Agronomía Tropical

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA



Centro Universitario del Sur Occidente
CUNSUROC

Mazatenango, Agosto de 2019

M.Sc. Erick Alexander España Miranda
Coordinador Carrera de Agronomía Tropical
Centro Universitario del Suroccidente
Universidad de San Carlos de Guatemala

Respetable MSc. Fernández

Por este medio me dirijo a usted, deseando que se encuentre gozando de buena salud.

El motivo de la presente es para informar que luego de haber asesorado y revisado el Trabajo de Graduación titulado: **“Evaluación de medios de cultivo y tipos de envases para almacenaje en la producción de Beauveria bassiana en Finca Santa Anita, Zunilito Suchitepéquez”**, presentado por el estudiante Pedro Leonardo Calel Hernández quien se identifica con número de carné 201240686 de la carrera de Agronomía Tropical, y de conformidad establecido en el reglamento de Trabajo de Graduación, doy visto bueno y aprobación, para que el estudiante pueda continuar con el trámite correspondiente.

Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente y sin otro particular me suscribo.

Atentamente .

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Ing. Agr. Augusto Israel Solares
Asesor