

# UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

COORDINACION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA  
MAESTRIA EN PROTECCION VEGETAL

**MANEJO DEL HONGO ENTOMOPATOGENO *Beauveria bassiana*  
(BALS.) VUILL. Y SU EFECTO SOBRE LA BROCA DEL CAFE  
*Hypothenemus hampei* (FERR.) Y SU PARASITOIDE  
*Cephalonomia stephanoderis* BETREM**

T E S I S

QUE PRESENTA:

WILLIAM DE LA ROSA REYES

COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN PROTECCION VEGETAL



CHAPINGO, MEXICO.

JULIO 1993

Este trabajo de investigación fue realizado en los laboratorios de Patología de Insectos del Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo y del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste en Tapachula, Chiapas, bajo la dirección de la Dra. Raquel Alatorre Rosas.

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCION DEL COMITE  
ASESOR INDICADO. HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN:**

**PROTECCION VEGETAL**

**COMITE ASESOR**



---

**M. en C. VICTOR MANUEL PINTO.**



---

**DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS.**



---

**DR. JAVIER TRUJILLO ARRIAGA.**

**CHAPINGO, MEXICO, JULIO DE 1993**

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCION DEL COMITE  
ASESOR INDICADO. HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:



MAESTRO EN CIENCIAS

EN:

PROTECCION VEGETAL

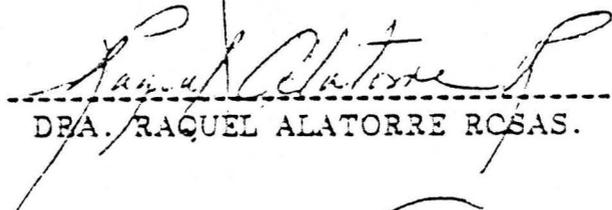
DIRECCION ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

COMITE ASESOR

PRESIDENTE:

  
M. en C. VICTOR MANUEL PINTO.

ASESOR:

  
DRA. RAQUEL ALATORRE RCSAS.

ASESOR:

  
DR. JAVIER TRUJILLO ARRIAGA.

REPRESENTANTE  
COORD. GRAL.  
EST. POSTG.

  
M.C.S. GERARDO LEYVA MIR

REPRESENTANTE  
COORD. DEPTAL.  
EST. POSTG.

  
M.C. BENITO RESENDIZ GARCIA

CHAPINGO, MEXICO, JULIO DE 1993

## **A G R A D E C I M I E N T O**

- A la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme terminar mis estudios de Postgrado.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca que hizo posible el apoyo económico para la culminación de mi formación académica.
- Al Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (CIES) por todo el apoyo brindado durante mi estancia en la Universidad Autónoma Chapingo.
- Orgullosamente dirigido y con profunda gratitud a la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por su asesoría desinteresada en la culminación del presente trabajo.
- Al Dr. Javier Trujillo Arriaga y el M. en C. Víctor Manuel Pinto por sus valiosas sugerencias en la revisión del escrito.
- Al M. en C. Juan Fco. Barrera Gaytán y al Dr. José Pablo Liedo Fernández del CIES por todo el apoyo moral y la confianza que depositaron en mi persona.
- A mis Profesores de la Universidad Autónoma Chapingo (U.A. CH.) por el encause de los conocimientos de que me hicieron partícipe.

- A los compañeros del laboratorio de Patología de Insecto del Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, especialmente a los biólogos Beatriz Andrade, Joel Lara Reyna y José Luis Rosas Acevedo, por la armonía que existió en las horas de trabajo.
  
- A mis compañeros de Postgrado: Gudelia Elizalde, Yesenia Alvarez, Wilson Avilés, Francisco Perdomo, José Isidro Rincón, Agustín Cruz, Francisco Ascencio e Isidro Rubén León, por los momentos más difíciles que pasamos juntos.
  
- A todo el personal del Proyecto Control Biológico de la Broca del café del CIES-Unidad Tapachula, que en alguna forma contribuyeron en la elaboración de esta tesis.
  
- A mis amigos de siempre, Rosalino Méndez, Ever Villalobos, Luis E. López y Miguel Monzón por la amistad sincera que nos une.
  
- A la Sra. Rosalba Morales por el excelente trabajo de mecanografía de los cuadros.
  
- A la Sra. Margarita Reyes, las Familias Urbán Meraz y Moran Gutiérrez, por sus gran calidad humana, amistad y confianza.

## **DEDICATORIAS**

**A mis Padres:**

**Ma. del Carmen Reyes Cruz**

**José D. de la Rosa López**

**Por el apoyo Moral que me brindaron  
durante mis estudios de Postgrado.**

**A mis hermanos:**

**Olga Margoth**

**Julvia**

**Francisco Javier**

**Wulfrano**

**Por el lazo de hermandad  
que nos une. Para siempre.**

**A mis sobrino:**

**José Isaac**

**Joanne**

**Lorena**

**Rigoberto**

**Javier**

**Wilmar**

**Leyver**

**Felipe**

**Diego Alexander**

**Con mucho cariño para ellos.**

# C O N T E N I D O

	Pág.
INDICE DE CUADROS . . . . .	ix
INDICE DE FIGURAS . . . . .	xi
RESUMEN . . . . .	xiv
1. INTRODUCCION. . . . .	1
2. OBJETIVO Y JUSTIFICACION. . . . .	3
3. REVISION DE LITERATURA. . . . .	4
3.1. La broca del Café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferrari). . . . .	4
3.1.1. Taxonomía y sinonimia de <u>H. hampei</u> . . . . .	4
3.1.2. Origen y distribución geográfica. . . . .	5
3.1.3. Importancia económica . . . . .	5
3.1.4. Biología. . . . .	7
3.1.5. Medidas de control. . . . .	9
3.1.6. Control biológico de la broca del café <u>H. hampei</u> . . . . .	9
3.2. Agentes de Control Biológico de la broca del café . . . . .	9
3.2.1. Entomófagos . . . . .	10
3.2.2. Características generales de la familia Bethyridae. . . . .	11
3.2.3. Clasificación taxonómica de <u>Cephalonomia stephanoderis</u> . . . . .	12
3.2.4. Origen y distribución geográfica de <u>C.</u> <u>stephanoderis</u> . . . . .	12
3.2.5. Biología . . . . .	13
3.2.5.1. Oviposición. . . . .	13
3.2.5.2. Larva. . . . .	15
3.2.5.3. Pupa . . . . .	15
3.2.5.4. Adulto . . . . .	16
3.2.6. Promedio de desarrollo de hembras y machos, y relación de sexos . . . . .	16
3.2.7. Sobrevivencia y longevidad de adultos . . . . .	17
3.2.8. Ecología y parasitismo. . . . .	17
3.3. Entomopatógenos. . . . .	18
3.3.1. Taxonomía y sinonimia de <u>Beauveria</u> <u>bassiana</u> . . . . .	19
3.3.2. Características generales <u>B. bassiana</u> . . . . .	20



3.3.3. Mecanismo de acción . . . . . 20

3.3.4. Incidencia de B. bassiana sobre la  
broca del café H. hampei. . . . . 22

3.4. Viabilidad de conidios de hongos entomopató-  
genos. . . . . 23

3.4.1. Efecto de la temperatura en la  
viabilidad de los conidios. . . . . 24

4. MATERIALES Y METODOS. . . . . 27

4.1. Lugar de la investigación. . . . . 27

4.2. Origen de las cepas del hongo. . . . . 27

4.3. Patogenicidad de B. bassiana sobre  
H. hampei . . . . . 27

4.4. Purificación de las cepas de B. bassiana . . . 29

4.5. Obtención de esporas . . . . . 29

4.6. Preparación de matrices de B. bassiana . . . . 30

4.7. Propagación masiva del hongo . . . . . 30

4.8. Cosecha de conidios. . . . . 31

4.9. Bioensayos semifinos (respuesta biológica) . . 31

4.9.1. Cría de la broca del café . . . . . 31

4.9.2. Bioensayos. . . . . 31

4.9.3. Bioensayos finos. . . . . 32

4.9.4. Conteos de conidios . . . . . 33

4.10. Evaluación del hongo por medio de bioen-  
sayos sobre C. stephanoderis. . . . . 33

4.10.1. Obtención del parasitoide . . . . . 33

4.10.2. Bioensayos. . . . . 34

4.11. Preservación de los conidios de B.  
bassiana en cristales de sílica gel . . . . . 34

4.11.1. Porcentaje de germinación . . . . . 35

4.11.2. Crecimiento radial de las colonias. . 35

4.12. Análisis estadístico. . . . . 36

5. RESULTADOS Y DISCUSION. . . . . 37

5.1. Patogenicidad de Beauveria bassiana sobre  
Hypothenemus hampei. . . . . 37

5.2. Bioensayos finos . . . . . 37

5.2.1. Broca del café H. hampei . . . . . 37

5.2.2. Parasitoide Cephalonomia  
stephanoderis . . . . . 42

5.3. Desarrollo de B. bassiana sobre H. hampei. . . 45

5.4. Desarrollo de B. bassiana sobre C.  
stephanoderis. . . . . 48

5.5. Esporulación de B. bassiana sobre H. hampei. . 48



5.6. Esporulaci3n de B. bassiana sobre C. stephanoderis. . . . . 53

5.7. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana preservados en cristales de s3lica gel . . . . 53

5.7.1. Porcentaje de germinaci3n de conidios . 53

5.7.1.1. Germinaci3n de conidios a  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . . . . . 55

5.7.1.2. Germinaci3n de conidios a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  . . . . . 56

5.7.1.3. Germinaci3n de conidios a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  . . . . . 56

5.7.2. Di3metro de colonias de B. bassiana . . 57

6. CONCLUSIONES. . . . . 77

7. BIBLIOGRAFIA. . . . . 79

8. APENDICE. . . . . 94

## INDICE DE CUADROS

CUADRO	Pág.
1	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> a diferentes temperatura, mencionadas por varios investigadores . . . . . .24
2	Cepas del entomopatógeno <u>Beauveria bassiana</u> , hospedero original y lugar de origen. 1992. . . .28
3	Valores de CL <sub>50</sub> , concentración de conidios, límites fiduciales, CL <sub>95</sub> y ecuación de la línea de regresión de nueve cepas de <u>Beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill. evaluadas sobre adultos hembras (60 días de edad) de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> . C.I.E.S. 1992. . . . . .38
4	Valores de CL <sub>50</sub> , concentración de conidios, límites fiduciales, CL <sub>95</sub> y ecuación de la línea de regresión de nueve cepas de <u>Beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill evaluadas sobre adultos hembras del parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> . C .I .E .S. 1992. . . . . .43
5	Porcentaje de adultos hembras de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferr.) esporuladas después de inoculadas con nueve cepas del hongo <u>beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill. a diferentes concentraciones de conidios/ml en condiciones de laboratorio. C.I.E.S. 1992. . . . .52
6	Porcentaje de adultos hembras del parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> Betrem, esporuladas después de inoculadas con nueve cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill. a diferentes concentraciones de conidios/ml en condiciones de laboratorio. C.I.E.S. 1992 . . . .54
7	Porcentaje de germinación de los conidios de -- <u>Beauveria bassiana</u> preservados en sílica gel a tres diferentes temperaturas. 1992 . . . . .75
8	Promedio de desarrollo colonial de 13 cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> preservados durante siete meses en sílica gel a diferentes temperaturas . 1992. . . . . .76

CUADRO

Pág.

9	<p>Porcentaje de mortalidad de <u>Hypothenemus hampei</u> inoculado con 18 cepas del hongo entomopatógeno <u>Beauveria bassiana</u> al 1% de concentración. . . . .</p>	.94
10	<p>Concentración de conidios/ml en las diferentes diluciones de cinco cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill. evaluadas sobre la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferr.) y el parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> Betrem. 1992. . . . .</p>	.95
11	<p>Concentración de conidios/ml en las diferentes diluciones de cuatro cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill. evaluadas sobre la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferr.) y el parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> Betrem. 1992. . . . .</p>	.96
12	<p>Desarrollo en diámetro (cm) de 13 cepas del hongo entomopatógeno <u>Beauveria bassiana</u> preservados en sílica gel bajo temperatura constante. 1992 . . . . .</p>	.97
13	<p>Ingredientes que forman parte en la dieta meridica para la cría de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u>. C.I.E.S. 19 . . . . .</p>	.99

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1	Distribución mundial de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferr.), tomada de Alonzo (1985) y C.A.B. International Institute of Entomology (1989) . . . . . 6
2	Adulto hembra de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferrari) . . . . . 8
3	Ciclo biológico del parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> Betrem (Tomado de Barrera et al 1990) . . . . . 14
4	Morfología del hongo <u>Beauveria bassiana</u> . (1) conidios, (2) esterigma, (3) conidioforos, - (4) grupo de conidios . . . . . 21
5	Líneas de respuesta dosis-mortalidad de cinco cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill., sobre hembras adultas de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferr.). C.I.E.S. 1992. . . . . 40
6	Líneas de respuesta dosis-mortalidad de cuatro cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> (Bals) Vuill., sobre hembras adultas de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> (Ferr.). C.I.E.S. 1992. . . . . 41
7	Líneas de respuesta dosis-mortalidad de cinco cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> (Bals.) Vuill., sobre hembras adultas del parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> Betrem. C.I.E.S. 1992. . . . . 46
8	Líneas de respuesta dosis-mortalidad de cuatro cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> (Bals) Vuill., sobre hembras adultas del parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> Betrem. C.I.E.S. 1992. . . . . 47
9	Desarrollo micelial de <u>Beauveria bassiana</u> sobre el adulto hembra de la broca del café <u>Hypothenemus hampei</u> . . . . . 49
10	Desarrollo micelial de <u>Beauveria bassiana</u> sobre el adulto hembra del parasitoide <u>Cephalonomia stephanoderis</u> . . . . . 50

**FIGURA**

**Pág.**

11	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb2), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992 . . . . .	.59
12	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb4), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.60
13	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb6), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.61
14	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb7), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.62
15	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb8), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.63
16	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb9), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.64
17	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb11), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.65
18	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb13), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.66
19	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb15), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.67
20	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb16), preservados <u>en sílica gel</u> a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.68

**FIGURA****Pág.**

21	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb17), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.69
22	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb18), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.70
23	Viabilidad de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> cepa (Bb19), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas, en función del tiempo. C.I.E.S. 1992. . . . .	.71
24	Interacción de la temperatura ( $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo colonial de 13 cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> a partir de un cristal de sílica gel 1992 . . . . .	.72
25	Interacción de la temperatura ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo colonial de 13 cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> a partir de un cristal de sílica gel 1992 . . . . .	.73
26	Interacción de la temperatura ( $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo colonial de 13 cepas del hongo <u>Beauveria bassiana</u> a partir de un cristal de sílica gel 1992 . . . . .	.74
27	Germinación de conidios de <u>Beauveria bassiana</u> almacenados a diferentes temperaturas. 1992 .	.100

## R E S U M E N

Mediante bioensayos por inmersión, se establecieron valores para las líneas base de nueve cepas del hongo Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. probadas sobre la broca del café Hypothenemus hampei (Ferr.) y su parasitoide Cephalonomia stephanoderis Betrem. Para esto se utilizaron insectos obtenidos del pie de cría del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (CIES) Unidad Tapachula en el Estado de Chiapas.

Los resultados demostraron que la broca del café fue más susceptible al hongo, ya que sus concentraciones letales (CL<sub>50</sub>) fueron menores para las cepas Bb4 (Ecuador), Bb25 (México) y Bb26 (México), registrando CL<sub>50</sub> de 0.003, 0.004 y 0.006 respectivamente, mismas que equivalen a 2.2, 4.1 y 5.9 millones de conidios/ml de solución.

Con respecto al parasitoide, presentó una ligera tolerancia al entomopatógeno, debido que sus CL<sub>50</sub> fueron mayores, para las cepas Bb4 (Ecuador) y Bb26 (México) con CL<sub>50</sub> de 0.007 y 0.022 respectivamente, mismas que equivalen a 5.25 y 21.93 millones de conidios/ml de solución.

Los conidios de B. bassiana preservados en cristales de sílica gel, presentaron una declinación progresiva en relación a la temperatura y el tiempo, obteniendo mayor porcentaje de viabilidad a temperatura baja ( $4 \pm 1$  °C) que a temperaturas más altas ( $25 \pm 1$  °C y  $35 \pm 1$  °C).

## 1. INTRODUCCION

El cafeto se cultiva a lo largo y ancho de la franja tropical del mundo, es un cultivo propio de países en vías de desarrollo donde genera importantes fuentes de trabajo, pero sobre todo, a través de su comercialización en el mercado internacional se obtienen considerables divisas, que en muchos países llegan a constituir parte fundamental en su economía (De Greaff, 1986).

Las áreas más cultivadas de café a nivel mundial son: Brasil, América Central, Este de Africa y Angola (Regouín, 1988), y los principales productores: Brasil, Colombia, Costa de Marfil y México (Cernas, 1983). En nuestro país la Cafeticultura se ha desarrollado en 12 Estados de la República (INMECAFE, 1987), siendo el primer producto agrícola de exportación a nivel Nacional (Anónimo, 1987).

Según LePelley (1973), la principal plaga del cultivo lo constituye la broca del café Hypothenemus hampei, (Coleoptera: Scolytidae), insecto originario del Africa Ecuatorial que se encuentra en un acelerado proceso de expansión en todas las regiones cafetaleras más importantes del mundo. Este insecto puede mermar la producción hasta un 85%, reflejándose en el rendimiento y calidad del grano.

En México esta plaga se detectó por primera vez en 1978 (INMECAFE, 1987), a partir de este año se ha dispersado en más de 115, 400 has distribuidas en los Estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Puebla y Guerrero (S.A.R.H., 1992).

El método de control más utilizado contra H. hampei, ha sido el uso del insecticida endosulfán, sin embargo en los últimos años se ha puesto mayor atención a los agentes biológicos (parasitoides, patógenos) quienes abren nuevas perspectivas para el manejo de este insecto plaga. Estos constituyen una alternativa que puede proveer resultados permanentes de control y que tiene especial aplicación en los países en vías de desarrollo, donde el control químico de las plagas es anti-económico para la agricultura de subsistencia y los niveles de resistencia de las plagas a los insecticidas son altos como consecuencia

de su uso inapropiado y excesivo (Sther, 1975; Wilson y Huffaker, 1976). Entre las nuevas alternativas que se proponen para el combate de la broca del café, se encuentra la utilización de enemigos naturales como parasitoides y microorganismos entomopatógenos.

La utilización del parasitoide Cephalonomia stephanoderis y el hongo Beauveria bassiana sobre H. hampei, pueden complementarse, ya que el parasitoide actúa sobre los estados inmaduros (huevos, larvas y pupas) y el hongo comunmente actúa sobre el estado adulto de la broca, de manera que ambos agentes de control contribuirán a bajar la densidad poblacional de la plaga.

## 2. OBJETIVO Y JUSTIFICACION

### OBJETIVO GENERAL:

Determinar en condiciones de laboratorio la patogenicidad de varias cepas del hongo Beauveria bassiana sobre Hypothenemus hampei y su parasitoide Cephalonomia stephanoderis, con la finalidad de incorporarlos en un programa de manejo integrado de la broca del café.

### OBJETIVO PARTICULAR:

1. Aislamiento y propagación masiva de B. bassiana para la obtención de inóculo.
2. Realizar prueba de patogenicidad de las cepas de B. bassiana mediante bioensayos sobre hembras adultas tanto de la broca del café como de su parasitoide.
3. Determinar la relación dosis mortalidad (CL<sub>50</sub>) para la broca del café y su parasitoide Cephalonomia stephanoderis.
4. Determinar el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los conidios de B. bassiana preservados en sílica gel.

### JUSTIFICACION:

El control biológico de la broca del café mediante organismos benéficos (Patógeno: Parasitoide), es una alternativa para los cafeticultores en el manejo integrado de dicha plaga, es un método económico de fácil aplicación, seguro, ya que no contamina al medio ambiente, no perjudica a la salud humana y permite conservar la diversidad biológica.

### 3. REVISION DE LITERATURA

#### 3.1. La broca del café Hypothenemus hampei (Ferrari).

##### 3.1.1. Taxonomía y sinonimia de H. hampei.

De acuerdo con Wood (1982), la posición taxonómica de la broca del café, es la siguiente:

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Uniramia

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

División: Endopterygota

Orden: Coleoptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Curculionoidea

Familia: Scolytidae

Subfamilia: Ipinae

Tribu: Cryphalini

Género: Hypothenemus

Especie H. hampei (Ferr.,  
1967).

Dentro del género Hypothenemus se han encontrado 27 especies en México, H. hampei es la única especie considerada que ataca a los frutos del género Coffea spp. (Wood, 1982). En relación a la sinonimia empleada en la literatura, se citan las siguientes en orden cronológico.

Cryphalus hampei Ferrari, 1887

Stephanoderes coffeae Hargerdon, 1910

Xyleborus coffeivorus Van der Weele, 1910

Stephanoderes cooki Hopkins, 1915

Xyleborus coffeicola Campos Novaes, 1922

Stephanoderes punctatus Eggers, 1924

### 3.1.2. Origen y distribución geográfica.

La bibliografía señala que la broca del café H. hampei, es originaria del Africa Ecuatorial, descrita por Ferrari en 1867 y reportada como plaga en el Continente Africano en 1901 en Gabón, 1902-1904 en el Congo, 1908 en Uganda y 1909 en Java (Koch, 1986).

Actualmente, casi todos los países productores de café padecen de esta plaga (Figura 1). En América fue introducida accidentalmente en 1913 en el Brasil, de donde se distribuyó a Perú (1962), Guatemala (1971), Honduras (1977), Bolivia (1978), Jamaica (1978), México (1978), Ecuador (1981), El Salvador (1981), Nicaragua (1988) y Colombia (1988) (Hernández y Sánchez, 1972; Perdomo y Miranda, 1983; Reid, 1983; Barrera y Baker, 1984; Anónimo, 1987).

En México, su presencia fue reportada por primera vez en el Sureste del Estado de Chiapas en los municipios de Cacahoatán y Unión Juárez en la región del Soconusco, cerca de la frontera con Guatemala y a pocos kilómetros de la Ciudad de Tapachula (Baker, 1985 y Baker et al, 1989). Según el INMECAFE, para 1989, aproximadamente 80 mil has de las 89 mil existentes en la región del Soconusco, se encontraban infestadas por esta plaga. Otra región del Estado de Chiapas infestada por la broca es el Centro-Norte, sin embargo se desconoce la superficie afectada; además de Chiapas, la broca se ha detectado en otros Estados de la República como son Oaxaca, Veracruz, Puebla y Guerrero (S.A.R.H., 1992).

### 3.1.3. Importancia económica.

Según Koch (1986), la broca del café es una de las plagas más dañina que existe en diversos países de Africa, Indonesia y América. Existen antecedentes de daños que alcanzan más de un 90% de las cerezas; en Brasil se han registrados pérdidas que van desde un 60 a un 80% en plantaciones donde no se han tomado medidas de control constituyendo una plaga primaria para este cultivo.

Las pérdidas ocasionadas por la broca del café estimadas en función al porcentaje de frutos infestados al momento de la cosecha pueden ser de un 25% o más (Monterroso, 1981) y el deterioro en la calidad comercial alcanza algunas veces hasta el 50% (ANACAFE, 1981). Trabajos realizados en cafetales a diferentes altitudes sobre el nivel del

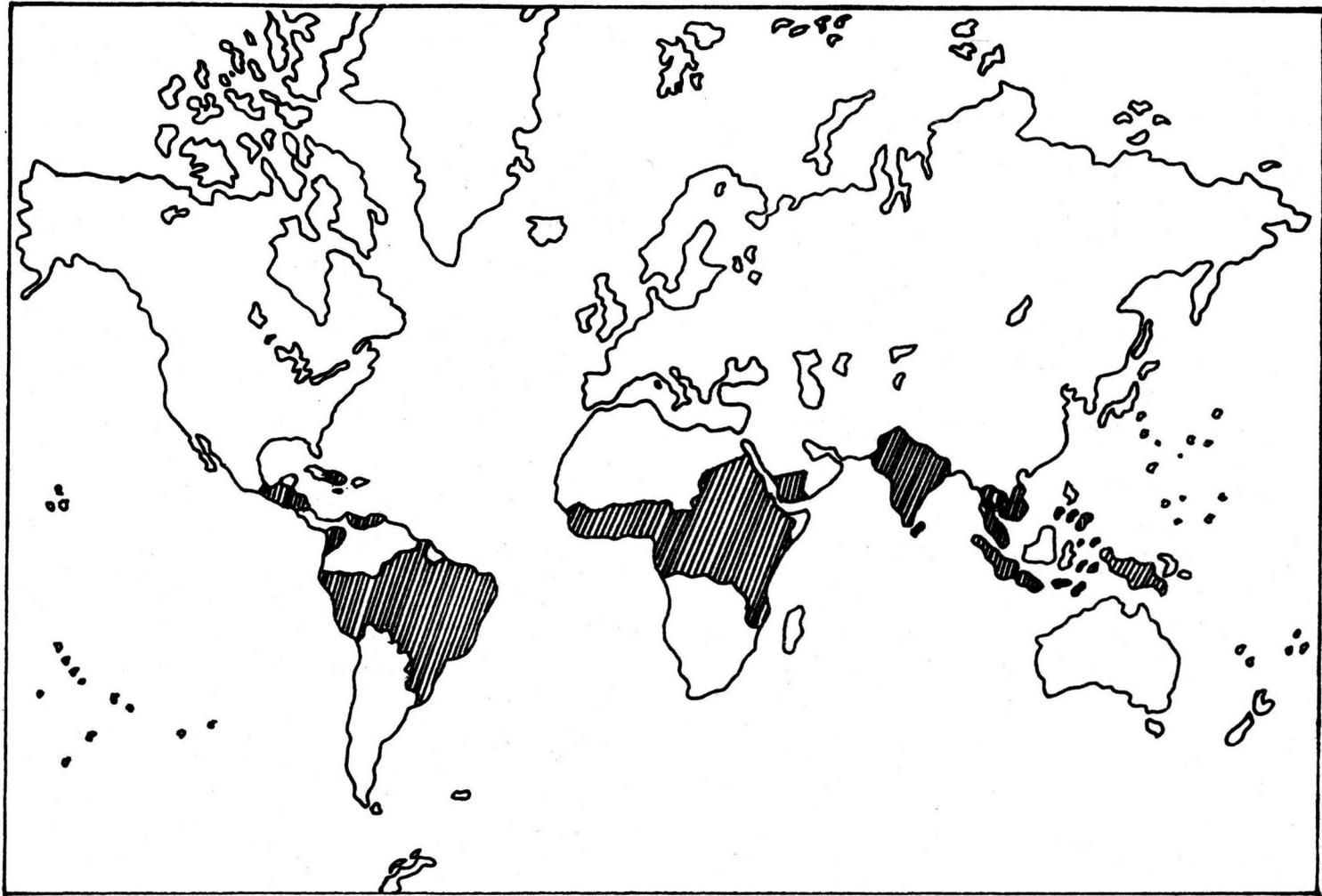


Figura 1. Distribución mundial de la broca del café Hypothenemus hampei (Ferrari), tomada de Alonzo (1985) y C.A.B. International Institute of Entomology (1989).

mar, reportan que la infestación de la broca en la zona baja (menos de 600 m) fue de 33.7%; zona media (600 a 1000 m) fue de 31.6% y la parte alta (más de 1000 m) fue de 23.2%, por lo que consideran que el porcentaje de infestación e importancia económica disminuye a medida que aumenta la altura sobre el nivel del mar (Ochoa et al , 1986).

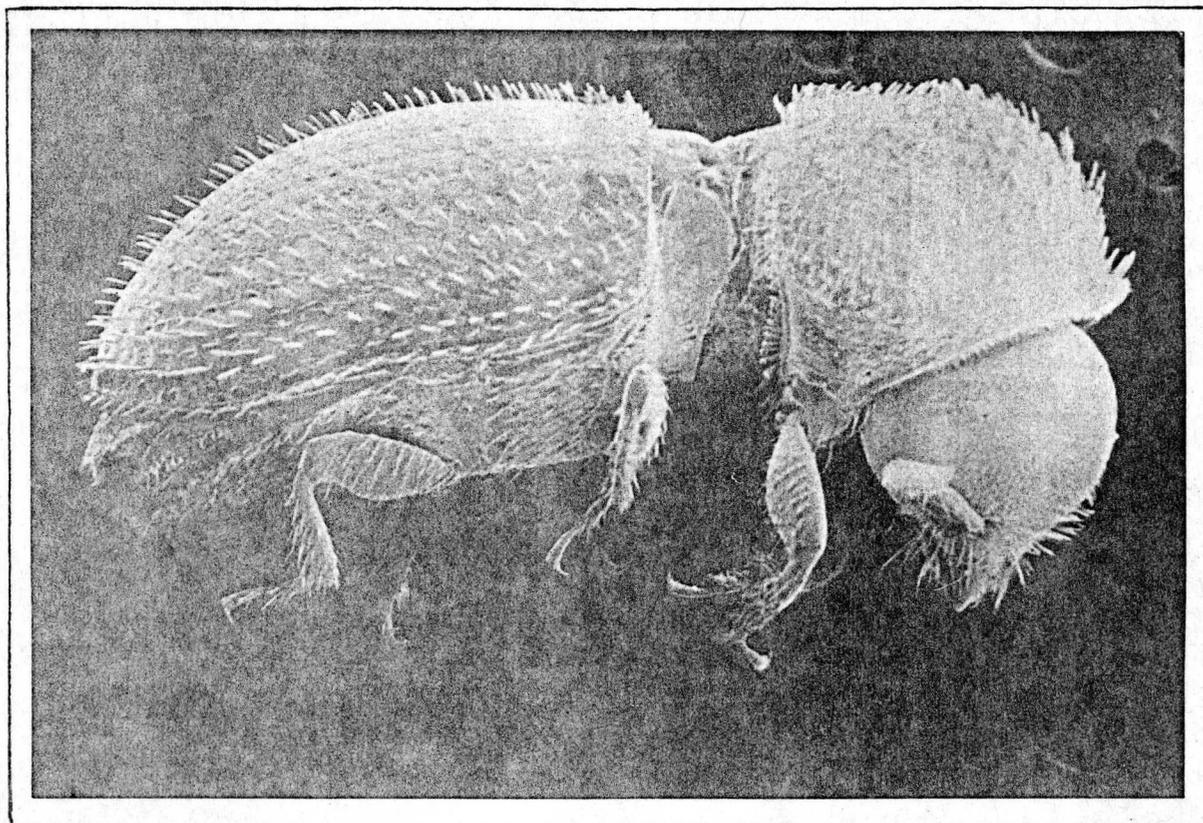
#### 3.1.4. Biología.

H. hampei, tiene metamorfosis completa (Holometábola), pasando por los estados de huevo, larva, pupa y adulto (Coronado y Marquez, 1985). La biología de este insecto ha sido estudiada intensamente en Java (Leefmans, 1923), Uganda (Hargreaves, 1926; 1935), Malaya (Corbett, 1933), Sri Lanka (Jepson, 1936), El Congo (Leroy, 1936), Brasil (Bergamin, 1943), México (Barrera y Baker, 1984) y Honduras (Muñoz, 1988).

La duración del ciclo biológico de la broca del café, varía de acuerdo a las condiciones de desarrollo; en laboratorio el ciclo varía de 27.5 a 35.8 días (Bautista, 1982 ; Muñoz, 1988). Baker (1985), menciona que en condiciones de campo en el Soconusco, Chiapas, el ciclo dura 36 días, mientras que Decazy (1988), establece que el ciclo se completa en un lapso de 30 a 80 días dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas.

Según LePelley (1973), el estado de huevo tarda de 5 a 9 días con un promedio de siete días, el estado larvario dura de 10 a 26 días con un promedio de 14 días, la pupa completa su estado en 4 a 9 días con un promedio de siete días; desde la oviposición hasta la emergencia del adulto comprende un período de 28 días.

El adulto (Figura 2) es un pequeño coleóptero de color negro, cubierto de pelos que crecen hacia atrás y con diminutas puntuaciones finamente reticulada, élitros con rayas paralelas deprimidas longitudinales; en las hembras el segundo par de alas son membranosas adaptadas para el vuelo, en los machos estas están atrofiadas, por lo que no pueden volar; la cabeza es globular, antenas en forma de mazo (Penados, 1979). La longevidad de las hembras es mayor que la de los machos, las hembras pueden vivir mínimo 135 días y los machos 46 días en promedio (Muñoz, 1989).



Tamaño natural: 2.5 mm

Figura 2. Adulto hembra de la broca del café Hypothenemus hampei (Ferrari).

### 3.1.5. Medidas de control.

Para evitar los daños que ocasiona la broca, se emplean medidas preventivas (Cuarentenas), de erradicación (campañas) y de control integrado de la plaga a base de medidas culturales (pepena, repase, podas, etc.) y el uso de insecticidas (entre las que destaca el endosulfán) (Decazy, 1985). El endosulfán ha demostrado experimentalmente ser el más tóxico para la broca del café en comparación con otros insecticidas (Ingram, 1985; Ochoa et al, 1990; Decazy y Castro, 1990; Choy, 1992). Pero existen limitaciones para el uso de este producto, como su alto costo, la contaminación ambiental, toxicidad al humano y animales, destrucción de insectos benéficos, dificultad de aplicación en topografías accidentadas, falta de equipo de aspersión de ultrabajo volumen, ineficiencia cuando la broca se encuentra en el interior del fruto, etc., una de las más serias limitaciones que se contemplan a futuro es la resistencia de la broca al endosulfán, tal como se ha reportado en Nueva Caledonia (Brum y Ruíz, 1987; Brum et al, 1989).

### 3.1.6. Control biológico de la broca del café H. hampei

El primer reporte que existe sobre el control biológico de este insecto en América, fue pocos años después de su descubrimiento en Brasil (1929), el Instituto Biológico de Sao Paulo, logró la introducción del parasitoide Prorops nasuta Waterston, bautizado como la "avisquita de Uganda". Esta fue reproducida y multiplicado en laboratorio para ser liberada masivamente en zonas cafetaleras infestadas por la broca, después de una larga fase de adaptación en 1993 se logró recuperar el parasitoide en fincas donde con anterioridad se habían realizados las liberaciones de campo (Bergamin, 1943).

### 3.2. Agentes de control biológico de la broca del café.

Siendo la broca originaria del centro Africano, es en este Continente donde se han encontrado los más importantes enemigos naturales (Barrera et al, 1988).

## 3.2.1. Entomófagos.

Según LePelley (1968) y LaSalle (1990), para la broca del café se tienen registrado los siguientes enemigos naturales.

Familia: Bethylidae

Prorops nasuta Waterston 1923

Cephalonomia stephanoderis Betrem 1961

Familia: Braconidae

Heterospilus coffeicola Schmiedeknecht 1923

Familia: Eulophidae

Phymastichus coffea LaSalle 1990

Murphy y Moore (1990) incluyen a la lista los siguientes parasitoides.

Familia: Bethylidae

Sclerodermus cadavericus

Familia: Ceraphronidae

Aphanogmus dictynna

Klein-Koch et al (1988), reportan en Brasil la incidencia del pirrocórido Dindymus rubignosus (F.) alimentándose del adulto de la broca, así también una hormiga identificada como Crematogaster curvispinosus Mayr., la cual destruye un número considerable de formas inmaduras que se encuentran en el interior del fruto infestado, enlista además al nematodo Heterorhabditis sp.

P. nasuta y H. coffeicola fueron descubiertos en Uganda en 1923 y 1924 (Hargreaves, 1935); C. stephanoderis en Costa de Marfil en 1960 (Ticheler, 1961) y P. coffea en Togo en 1987 (LaSalle, 1990). De estos enemigos naturales P. nasuta procedente de Uganda se introdujo a Java en 1923, a Brasil en 1929 y a Sri Lanka (antes Ceilán) en 1938; a Sri Lanka también se introdujo H. coffeicola y en 1962 esta especie fue enviada de Brasil a Perú. A excepción de Brasil los resultados de control con estos parasitoides han sido poco satisfactorios (Clausen, 1978). Posteriormente se realizaron importaciones de P. nasuta y C. stephanoderis en 1987 a Ecuador (Klein-Koch et al, 1988), 1988 a México (Barrera et al, en prensa), 1989 a Indonesia y solamente C. stephanoderis a Nueva Caledonia (Murphy y Moore, 1990).

La introducción de P. nasuta y C. stephanoderis a México en 1988, fue con la finalidad de ser utilizados como agentes de control biológico de H. hampei, la cual constituye un hecho revelante ya que es la primera vez que se introducen a Mesoamérica. Ambas especies fueron colectadas e introducidas por el Instituto Internacional de Control Biológico (IICB), para evitar la introducción de organismos indeseables a México, los parasitoides fueron criados bajo condiciones de cuarentena en los laboratorios del IICB ubicados en Silwood Park (Inglaterra). A H. coffeicola no se le ha podido criar en cautiverio, lo que ha imposibilitado su cuarentena y consecuente introducción (Barrera et al, 1990c).

### 3.2.2. Características generales de la familia Bethylidae.

Los betílidos es un grupo pequeño de himenópteros poco conocidos (Evans, 1964). Se trata de una familia primitiva aculeata, que en la actualidad consta de aproximadamente 2, 200 especies nominales (Hawkins y Gordn, 1986). Según Evans (1978) los betílidos son predominantes en especies en zonas tropicales. En el Norte de México la fauna consta de grandes grupos abundantes en los neotropicos representados por pocas especies; se calcula que en Norteamérica la familia Bethylidae se encuentra representada por 201 especies pertenecientes a 21 géneros de 3 subfamilias.

Klein-Koch et al (1988), mencionan que la mayoría de las especies de esta familia, son de tamaño pequeño, algunas veces las hembras son ápteras y semejan a una hormiga (0.7 a 2.5 mm). Las larvas son ectoparasitas de larvas de lepidópteros y coleópteros; generalmente la hembra del parasitoide posee un aguijón que introduce a su huésped (larva) cerca de los ganglios torácicos provocando que la larva se paralice y extrae los líquidos corporales al alimentarse de su víctima. Según la especie de parasitoide, esta oviposita uno o varios huevecillos en la parte exterior de su hospedero, la pupación se lleva a cabo dentro de un cocón tejido por la misma larva, en algunos casos ocurre endogamia debido a que los machos emergen del cocón o capullo y fecundan de inmediato a sus hermanas.

Todas las especies que pertenecen al género Cephalonomia atacan a larvas o pupas pequeñas de coleópteros. Evans (1964), agrupa convencionalmente las especies dentro de tres tipos etológicos.

- a). Especies que atacan coleópteros que afectan granos almacenados: C. tarsalis, C. warterstoni, C. gallicola y C. merridionalis.
- b). Especies que atacan escarabajos de la familia Ciidae, los cuales están asociados con hongos: C. formiciformis, C. perpusilla, C. mycetophila y C. hammi.
- c). Especies que atacan a Coleópteros descortezadores: C. gallicola, C. hilipennis, C. uthaensis y C. hypobori.

Todas las especies pertenecientes al género Cephalonomia se encuentran presentes en Africa, América, Asia, Europa y Oceanía.

### 3.2.3. Clasificación taxonómica de C. stephanoderis

Evans (1964), ubicó a esta especie en los siguientes rangos jerárquicos.

Reino: Animal  
 Phylum: Arthropoda  
 Subphylum: Uniramia  
 Clase: Insecta  
 Subclase: Pterygota  
 División: Endopterygota  
 Orden: Hymenoptera  
 Suborden: Apocrita  
 Superfamilia: Bethyloidea  
 Familia: Bethyloidea  
 Género: Cephalonomia  
 especie: C. stephanoderis  
 Betrem, 1961.

### 3.2.4. Origen y distribución geográfica de C. stephanoderis

Existen indicaciones de que en Africa, este parasitoide se encuentra en áreas cultivadas de café, sin embargo su distribución ha sido limitada a Costa de Marfil (Ticheler, 1961), Camerún y Zaire (Koch, 1973). Rangi et al (1989) establecen que esta especie se encuentra también en Togo.

De acuerdo con Klein-Koch et al (1988), C. stephanoderis parece ser similar a P. nasuta, siendo el primero el parasitoide más importante de la broca del café en Costa de Marfil y probablemente en los países vecinos. Se ha observado que esta especie se desarrolla mejor en cafetales sin sombra, aunque en Costa de Marfil se le ha encontrado en cerezas maduras bajo abundante sombra.

### 3.2.5. Biología.

La biología de este parasitoide (Figura 3) ha sido poco estudiada, Klein-Koch et al (1988), encontraron que la duración mínima del ciclo biológico fue de 16 días a temperatura de  $27.86 \pm 0.78$  °C y humedad relativa de  $75.22 \pm 9.76\%$ . Barrera et al (1989), establecen que bajo condiciones de cría in vitro, el ciclo biológico fue similar entre hembras y machos obteniéndose un rango en los machos de 18 a 24 días y en las hembras de 17 a 25 días a temperatura de  $26.18 \pm 1.14$  °C y humedad relativa de  $77.72 \pm 7.19\%$ , no habiendo diferencias significativas para ambos sexos.

#### 3.2.5.1. Oviposición.

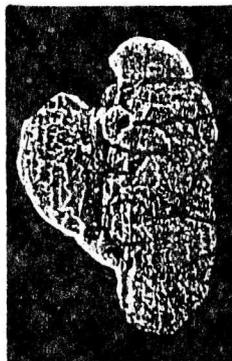
La hembra ovipone sobre larvas completamente desarrolladas, prepupas y pupas de la broca; el huevecillo es colocado sobre la parte ventral de las larvas y prepupas, y sobre la parte dorso-lateral de las pupas (Barrera et al, 1990). Según estudios realizados en el CIES, la capacidad de ovipostura de este parasitoide fue de 71 huevecillos en 30 días de vida, con un pico máximo de nueve huevecillos por día, el período del estado de huevo duró de dos a tres días (Barrera et al, 1989).

Infante et al (1989), encontraron que las hembras no fertilizadas de C. stephanoderis, son capaces de reproducirse partenogenéticamente dando lugar sólo a machos (arrenotokia); además, el promedio de oviposturas es mayor en hembras fertilizadas dando origen a ambos sexos, que en las no fertilizadas; las hembras fertilizadas naturalmente en el interior del fruto de café ovipositaron 1.3 huevecillos por día, mientras que las fertilizadas fuera del fruto este promedio fue de 1.26.



- 1.- Una hembra se introduce al fruto de café a través de la perforación hecha por la broca, y pone sus huevos sobre sus larvas y pupas.

- 2.- Del huevo del parasitoide sale una larvita que se alimenta a expensas de la larva de la broca y comienza a crecer.



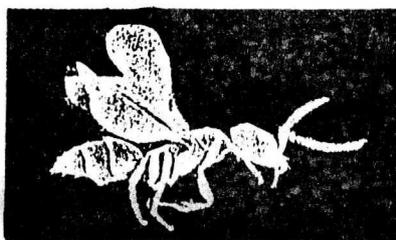
- 3.- La larva del parasitoide mata a la larva de la broca y extrae todo su contenido corporal, dejando sólo la piel vacía. Este proceso se lleva a cabo en dos o tres días.

- 4.- Terminada su alimentación la larva del parasitoide se halla completamente desarrollada.



- 5.- La larva del parasitoide construye un capullo de seda color blanco, donde se transforma en pupa. En la figura se muestra una pupa sin capullo.

- 6.- De la pupa emerge el adulto, se aparea y sale a buscar otro fruto infestado para continuar su multiplicación. Desde el huevo hasta el nacimiento del adulto transcurren 18 días a 27°C.



**Figura 3 . Ciclo biológico del parasitoide -- Cephalonomia stephanoderis (Tomado de Barrera et al, 1990).**

El huevecillo es de tipo himenopteriforme, recién ovipositado es de color blanco brillante, de 0.39 mm de largo y 0.150 mm de ancho, de forma elíptico alargado y en su extremo más agudo se localizan alrededor de 30 micrópilos, el corión es una membrana de superficie lisa (Infante et al, 1991).

#### 3.2.5.2. Larva.

La larva recién eclosionada es de forma curvada, de color blanco y cuerpo no diferenciado; existen por lo menos tres estadios larvales, en larvas bien desarrolladas se diferencian perfectamente 12 segmentos y la cabeza de forma aguda muy pequeña, con el aparato bucal invaginado en una cavidad, de forma curvada con la sección transversal redondeada, ápoda y con una longitud aproximada de 2.1 mm, presenta microespinas en el protórax y órganos sensoriales redondeados cerca de cada espiráculo (Infante et al, 1991).

Koch (1973), menciona que a una temperatura de 27 °C la duración del estado larval in vitro es de 4.9 días para la hembra y de 5.4 días para el macho. Berrera et al (1989), reportan que el estado larvario duró de uno a dos días.

#### 3.2.5.3. Pupa.

Infante et al (1991), establecen que la larva desarrollada secreta seda para construir un capullo de color blanco para pupar, la pupa al principio es de color crema que posteriormente se torna a un color más oscuro; en la pupa se diferencian perfectamente todos los apéndices al igual que los ojos compuestos.

La pupación se lleva a cabo en el interior del fruto, constituyendo la descendencia de un sólo individuo ya sea macho o hembra (Ticheler, 1961). Klein-koch et al (1988), reportan que se han encontrado hasta 35 cocones del parasitoide en una sola cereza, teniendo un promedio de 18. Algunos investigadores establecen que la duración del desarrollo pupal es de aproximadamente 15 días (Regouin, 1988). Klein-Koch et al (1988), mencionan 14.1 días para la hembra y 13.5 para el macho a una temperatura de 27 °C.

#### 3.2.5.4. Adulto.

El adulto es de color negro, con la cabeza rectangular con bordes posteriores redondeados notablemente más larga que ancha; antenas largas y brillantes, alas transparentes, venas de color amarillo a transparentes excepto por las dos callosidades las cuales son de color obscuro; el fémur es de color gris obscuro con el ápice más claro; el macho con alas normales siempre presentes, es similar a la hembra pero de tamaño más pequeño (Betrem, 1961).

Para infante et al (1991), el adulto es una avispa de color negro cuya longitud del cuerpo es aproximadamente 2 mm; la cabeza es oblonga (más larga que ancha), con gran cantidad de setas; hipognato con mandíbulas bien desarrolladas; ojos compuestos de forma hexagonal y con órganos sensoriales, antenas de 12 segmentos con órganos sensoriales mecanoreceptores y quimiorreceptores; las tres regiones del tórax están ornamentadas; las alas con venación simple con cerdas en los bordes; coxas esferoides y un sólo trocánter; tarsos de cinco segmentos con una espina apical al final de la tibia; el abdomen es sésil peciolado con seis placas tergaes y cinco esternales, los segmentos finales tienen la capacidad de imbricación retráctil.

Klein-Koch et al (1988), describen que el tamaño de C. stephanoderis es de 1.9 mm en promedio y a diferencia de P. nasuta, tiene la cabeza en forma cuadrada-oblonga y no presenta venación en el ala anterior.

#### 3.2.6. Promedio de desarrollo de hembras y machos, y relación de sexos.

El período de desarrollo en días de C. stephanoderis de huevo a adulto es similar para ambos sexos, obteniéndose un rango para los machos de 18 a 24 días y en las hembras de 17 a 25 días; la relación sexual es de un macho por cada 7.74 hembras, de acuerdo con estos resultados, este parasitoide tiene una relación de sexos similar a la que presenta su huésped la broca del café (Barrera et al , 1989; Baker et al , en prensa).

En Costa de Marfil Koch (1973), encontró que la relación sexual también favorece a las hembras; sin embargo sus datos indican que en una muestra de laboratorio la relación de hembras por macho es de 7.2 a 1 y en una muestra de campo de 3.5 a 1. Ticheler (1961), en este país africano reportó una relación de sexos de 4.8 hembras por macho.

### 3.2.7. Supervivencia y longevidad de adultos.

Hagen (1968), menciona que generalmente los parasitoides adultos del Orden Hymenoptera requieren de carbohidratos para la maduración del huevo, oviposición y longevidad, compuestos que pueden ser proporcionados por la miel. Barrera *et al* (1989), establecen que la longevidad promedio de hembras es de 41.37 días y en los machos 19.93; la supervivencia máxima registrada para las hembras y machos fue de 58 y 29.5 días respectivamente, mientras que las hembras más longevas vivieron 77 días y los machos 59. En un experimento realizado en Costa de Marfil, Koch (1973), reporta que *C. stephanoderis* alimentado con estados inmaduros de la broca, el enemigo natural tuvo una longevidad promedio de 19.9 días (el autor no indica el sexo del insecto).

### 3.2.7. Ecología y parasitismo.

Las investigaciones realizadas en Costa de Marfil por Koch (1973), indican que *C. stephanoderis* incrementa notablemente sus poblaciones durante algunos meses del año, precisamente después que ha ocurrido casi toda la cosecha del café y cuando las poblaciones de la plaga son muy bajas. Según Ticheler (1961), este parasitoide alcanzó un 27% de parasitismo en frutos de color rojo y 50% en los de color negro, incidiendo con menor frecuencia en cafetales sombreados. En Ecuador se ha obtenido parasitismos de 86.1 a 87% en frutos infestados en la planta y en el suelo respectivamente (Klein-Koch *et al*, 1988). En Colombia a pocos meses de la liberación del parasitoide se encontró un parasitismo de 8 a 14% (Bustillo, 1991). Barrera *et al* (1990b), mencionan que en zonas cafetaleras del Soconusco, Chiapas después de la liberación del parasitoide se ha encontrado parasitismos que van desde el 0.18 al 81.25%. Los adultos de *C. stephanoderis* pueden vivir dentro del fruto infestado y actúan como depredadores alimentándose de la hemolinfa de la broca adulta, rompiendo con sus mandíbulas la membrana intersegmental de los terguitos proto y mesotorácico

(Ticheler, 1963). Quezada (1985), menciona que este enemigo natural es capaz de parasitar hasta un 50% de formas jóvenes de la plaga (prepupas y pupas).

Barrera et al (1990c), reportan que C. stephanoderis en los cafetales de Chiapas se encuentra en un proceso de adaptación a las nuevas condiciones ambientales en que se ha liberado, y el impacto sobre las poblaciones de la broca actualmente se están evaluando.

El control biológico utilizando parasitoides, podría ser la alternativa que permita frenar el avance de la broca del café a lugares no infestados, basándose en el hecho de que el cafeto es un cultivo tropical perenne considerado como un buen hábitat para la proliferación de enemigos naturales, además de los grandes beneficios ecológicos derivados del control biológico (Baker, 1984; Quezada, 1985; Decazy, 1988).

### 3.3. Entomopatógenos.

Existen otros enemigos naturales que atacan a la broca del café, entre ellos se mencionan los hongos entomopatógenos Beauveria bassiana, Spicaria javanica y Metarhizium anisopliae; siendo B. bassiana la más eficaz que parasita a H. hampei en todo los estados de desarrollo, principalmente en períodos húmedo (Ticheler, 1963; Moore, 1989).

Murphy y Moore (1990), señalan que B. bassiana es un enemigo natural de la broca y que ha sido observado parasitándola en Kenia, Togo, Zaire, Camerún, Costa de Marfil, Indonesia, Brasil, Ecuador, Guatemala y México. Méndez (1990), amplía la lista anterior citando a otros países incluyendo al Congo Belga, Perú, Java, Uganda y confirma su presencia en México.

### 3.3.1. Taxonomía y sinónima de Beauveria bassiana.

División: Amastigomycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: Beauveria

Especie: B. bassiana (Balsamo)  
Vuillemin, 1911.

De acuerdo con Benham y Miranda (1953), este hongo fue descrito originalmente por Agostino Bassi quién demostró que la enfermedad llamada "muscardina blanca", "mal del signo" o "calcino" era ocasionada por este patógeno, más tarde Balsamo Crivelli en 1935, ubicó al hongo en el género Botrytis, nombrándolo Botrytis bassiana. Posteriormente algunos investigadores observaron que el hongo presentaba características diferentes a Botrytis, estableciendo nuevas especies.

Saccardo (1886) mencionado por Benham y Miranda (1953), describe a Botrytis tenella como una subespecie de B. bassiana en Sylloge Fungorum 4, sin embargo, él no hace ninguna mención de las características de las cabezas conidiales del grupo de Botrytis bassiana y parecen existir ciertas dudas con respecto si la especie está relacionada con Beauveria bassiana. Vuillemin en 1912 crea el nuevo género de Beauveria bassiana considerando la forma y tipo de conidioforo o simpodio; los esporangios filamentosos forman prolongaciones y la disposición de las esporas en zig-zag hacen que Botrytis bassiana se cambie a Beauveria bassiana (Balsamo) Vuill. Beauverie en 1914 concluye que Beauveria tiene cuatro especies, mencionándolos en forma cronológica, estas son:

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin 1911

Beauveria effusa (Beauverie) Vuillemin 1911

Beauveria densa (Link) Picard 1914

Beauveria globulifera (Spegazzini) Picard 1914

Recientemente Sanson Y Evans (1982), reportan dos nuevas especies de Beauveria en Sudamérica, B. velata y B. amorpha.

### 3.3.2. Características generales de B. bassiana.

El hongo en cultivo puro, a una edad de 21 días, presenta un micelio de aspecto algodonoso de color blanco y tiene una esporulación abundante de color crema con textura de talco. El micelio se ramifica formando conidioforos simples e irregulares que terminan en vértices en forma de racimos, el conidioforo es abultado en su base, sufriendo un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios los cuales son globosos de  $2.09 \mu$  de largo y  $1.67 \mu$  de ancho, estos se insertan sobre esterigmas dispuestos en zig-zag (Figura 4). La cantidad de conidios aumenta con el transcurso del tiempo, a los 12 a 15 días de edad la colonia presenta abundante esporulación de color crema; La temperatura óptima para su crecimiento micelial se encuentra: temperatura mínima de  $10^{\circ}\text{C}$  y máxima de  $30^{\circ}\text{C}$ , en cambio las esporas toleran variaciones a altas temperaturas ( $98^{\circ}\text{C}$  durante cinco horas continuas) en atmosfera seca, pero en atmosfera húmeda y expuesta a  $40^{\circ}\text{C}$  soportan solamente 24 horas, a bajas temperaturas no sufren reacción alguna, siendo la temperatura óptima para su crecimiento y esporulación de  $28^{\circ}\text{C}$  (Alcocer, 1979).

El patógeno según algunos investigadores, se desarrolla en humedad relativa del 92.5% o más y a temperatura de  $15$  a  $30^{\circ}\text{C}$ ; encontrándose las condiciones óptimas para su germinación, crecimiento y esporulación 100% de humedad relativa y temperatura de  $25$  a  $30^{\circ}\text{C}$  (Moore, 1973; Ramaska, 1984). B. bassiana puede perder hasta un 50% de viabilidad entre 5 a 10 días después de haberse aplicado al follaje (Gardner et al, 1977).

### 3.3.3. Mecanismo de acción.

Madelin (1963), señala cuatro rutas principales de infección : a). através del integumento, b). por el tracto digestivo, c). tráqueas y d) através de heridas. En la mayoría de los casos, la infección del insecto ocurre por la penetración directa del tubo germinativo al integumento, en condiciones microclimáticas adecuadas, esto puede suceder en dos días después del contacto de los conidios con el cuerpo del insecto y a medida que el micelio penetra, la quitina es disuelta o digerida parcialmente; después de la invasión de los tejidos, éste se desarrolla desintegrando órganos y finalmente aparece una masa compacta de aspecto algodonoso que prolifera hacia al exterior con la consecuente aparición de masas de esporas que semejan a talco fino cuyo color pasa de blanco yeso a crema. Este entomopatógeno fue

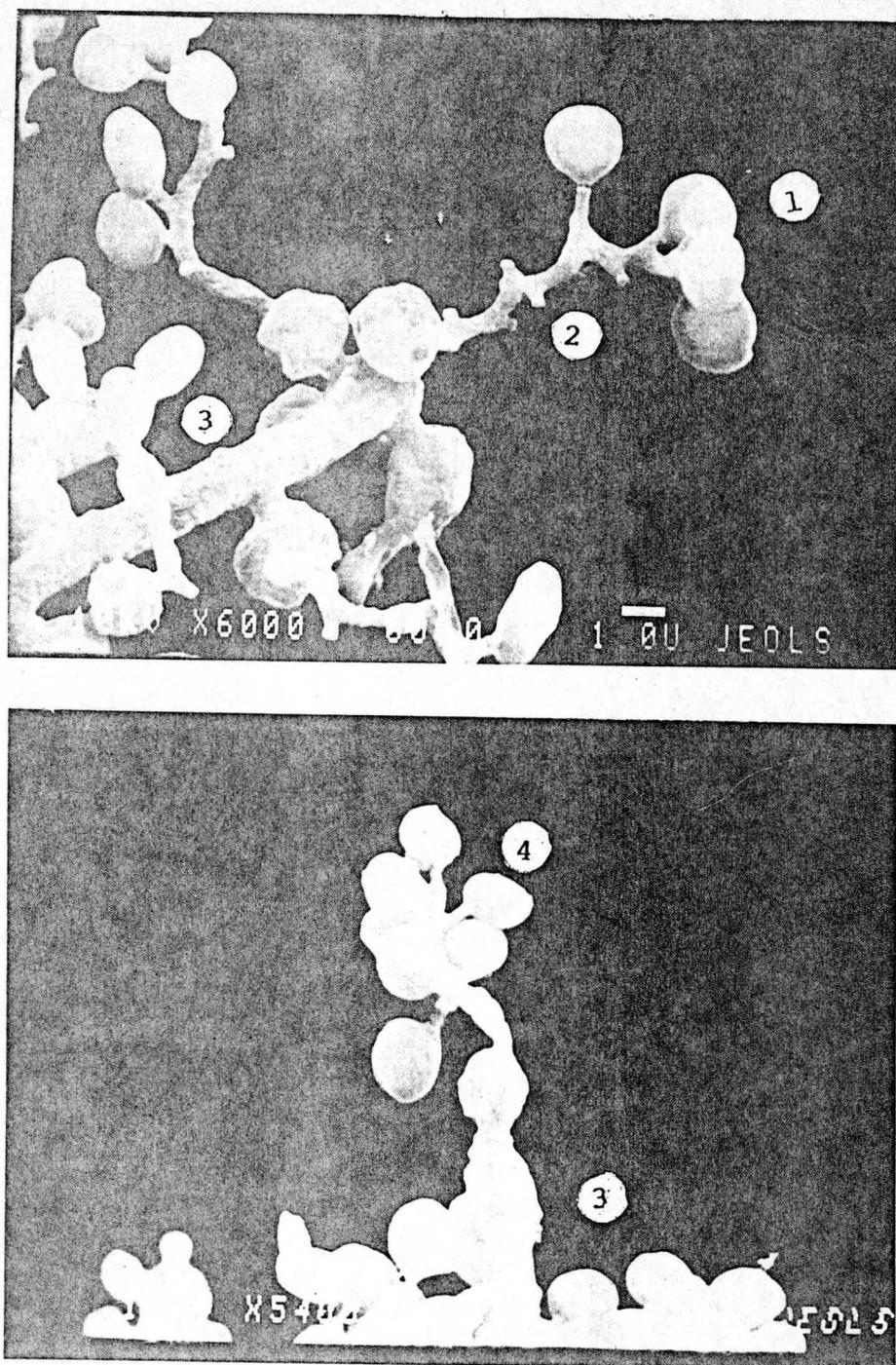


Figura 4. Morfología del hongo *Beauveria bassiana*.  
(1) Conidios, (2) Esterigma, (3) Conidio  
foro y (4) Racimo de conidios.

utilizado en 1910 por Bertlett y Lefebvre en pruebas de campo contra el barrenador del maíz en los Estados Unidos; también fue utilizados en trabajos similares llevado a cabo en Ontario Canadá en 1937, en donde se obtuvo controles de 60 a 70%. Steyaer (1935), lo ensayó contra la broca del café llamado entonces Stephanoderes hampei en el Congo Belga, indicando que el material fungoso debe aplicarse antes de que el insecto invada la cereza.

Méndez (1990), establece que el crecimiento micelial del hongo emerge de los costados de la broca y de las partes membranosas de la región bucal; los ramilletes de conidioforos alcanzan a cubrir todo el cuerpo excepto las áreas quitinizadas como son los élitros y la parte superior del pronoto; generalmente bajo condiciones de laboratorio el micelio de B. bassiana emerge y esporula de cualquier parte del insecto; cuando la infección ocurre en el interior del fruto de café, el micelio envuelve totalmente al cuerpo de la broca y la esporulación ocurre con mayor abundancia en la parte exterior del orificio de entrada de la cereza sin llegar a invadir el tejido vegetal.

#### 3.3.4. Incidencia de B. bassiana sobre la broca del café H. hampei.

B. bassiana es considerada como el mejor microorganismo entomopatígeno que puede utilizarse contra la broca del café, ya que se le ha encontrado en cualquier lugar donde se presenta la plaga, independientemente de la variedad de café de que se trate (Molinari, 1988).

Existen pocos estudios que permiten conocer la abundancia del hongo sobre la plaga, en el Ecuador, se ha registrado su presencia principalmente en cerezas verdes y rojas, y la incidencia de B. bassiana está dada de acuerdo a las condiciones favorables del medio ambiente como alta humedad relativa, alta nubosidad y temperatura óptimas, pero sobre todo abundante población de la plaga (Molinari, 1988).

Steyaert (1935), en el Congo Belga, demostró que la máxima mortalidad de la broca por efecto del hongo fue de 63% en los meses de julio y agosto, mientras la menor incidencia se presentó en marzo y abril; considerando el grado de maduración de los frutos encontró un 48.2% de mortalidad en frutos verdes y un 3.28% en los maduros,

concluyendo que la infección del insecto se efectúa en la superficie del fruto probablemente cuando los insectos están volando de un fruto a otro para ovipositar. Algunos investigadores señalan que B. bassiana forma una capa algodonosa de color blanco-rosado en la entrada del orificio perforado por la broca bajo condiciones ambientales favorables de alta humedad relativa (80%) y temperatura de 20 a 30 °C, además de altas poblaciones de la plaga (Pascalet, 1939).

Méndez (1990), indica que B. bassiana está presente en la región del Soconusco, Chiapas, México, atacando al estado adulto de la broca del café H. hampei, además observó que la incidencia no sobre pasa más del 1% y está presente tanto en frutos de Coffea canephora variedad robusta como en frutos de C. arábica.

En los últimos años se ha despertado el interés en utilizar este hongo, desarrollando tecnologías económicas para producirlo masivamente y realizando pruebas para demostrar su patogenicidad; la efectividad del hongo ha sido demostrada experimentalmente en Guatemala, Honduras, El Salvador y México. Excelentes medios de cultivos para su propagación han sido reportados, como el arroz cocido sin cascarilla, la pulpa de coco y el salvado de trigo (Monterroso, 1984; Ochoa, 1985 y Méndez, 1990). En un futuro deben incrementarse las pruebas de campo, definir la época de aplicación, el equipo de aspersión, realizar evaluaciones sobre la efectividad, interacciones biológicas con otros métodos de control y pruebas de laboratorio sobre la permanencia o ganancia de virulencia en las diferentes cepas (Quezada y Urbina, 1987; Bridge et al, 1990; Méndez, 1990).

#### 3.4. Viabilidad de conidios de hongos entomopatógenos.

Los diferentes factores ambientales incluyendo temperatura, humedad, luz y gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) influyen en la estabilidad de los microorganismos entomopatógenos y en la viabilidad de los conidios; las condiciones de almacenamiento deben ser específicos para conservar estas características (Steinhaus, 1960; Walstad et al, 1970; Bell, 1975).

### 3.4.1. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la viabilidad de los conidios.

La virulencia y longevidad de los conidios de B. bassiana, han sido estudiado por algunos investigadores. Lamber (1903), mencionado por Schaerffenberg (1964), establece que después de tres años de almacenamiento a baja temperatura, las esporas del hongo fueron viables produciendo un 100% de infección sobre tábanos, el escarabajo de la papa y la palomilla de la manzana. Kral y Neubauer (1956), afirman que las esporas de B. bassiana se mantuvieron viables durante 500 días en condiciones de almacenamiento a baja temperatura manteniendo su capacidad germinativa. Schaerffenberg (1964), resume los resultados de varios investigadores que trabajaron con conidios de B. bassiana, concluyendo que la viabilidad de este hongo almacenados en bajas temperaturas es retenida (Cuadro 1.).

Cuadro 1. Viabilidad de conidios de B. bassiana a diferentes temperaturas, mencionadas por varios investigadores.

Autor	Año	Tiempo en semanas	Temperatura	Poder de germinación
Lambert	1903	156	Frío	Retenido
Kral Y Neubaur	1956	70	Frío	Retenido
Steinhaus	1960	128	4 °C	Retenido
Schaerffernberg	1964	156	9-10 °C	Retenido

De acuerdo a Steinhaus (1960), el poder germinativo de las esporas de B. bassiana mantenidas a 4 °C se conservó por 120 semanas, mientras que a 23 °C se perdió después de 6 a 13 semanas y a 30 °C después de 4 a 7 semanas de almacenadas. Muller-Koller (1960), concluye que el rápido decaimiento en la germinación de las esporas puede evitarse por congelamiento y almacenado en seco.

Fargues et al (1979), encontraron que los conidios pulverizados para su secado a 50 °C y cubiertos con bentonita tiene de 50 a 70% de viabilidad, en tanto que las blastosporas que también son sensibles a esta técnica fueron liofilizadas y mezcladas con leche en polvo suplementadas con glicerina, la viabilidad de las esporas aumentó en 89%; el almacenamiento de estas preparaciones se efectuaron a una temperatura de 5 °C y la viabilidad de los conidios se conservó por un lapso mayor a los 18 meses de almacenamiento.

La germinación de los conidios es un suceso natural bajo ciertas condiciones, afectado especialmente por la variación de la temperatura, ya que reduce la viabilidad de las unidades infectivas de B. bassiana (Schaerffenberg, 1957). También se ha demostrado que a medida que la temperatura decrece de 37 a 4 °C, la viabilidad de las unidades infectivas se incrementa notablemente (Daoust y Roberts, 1983).

Walstad et al (1970), mencionan que la temperatura letal para los conidios de B. bassiana está cercana a los 50 °C, también establecen que los conidios de B. bassiana y Metarhizium anisopliae almacenados a 21 °C sobrevivieron poco tiempo de 0.5 y 2.5 meses respectivamente, mientras que los conidios almacenados a 8 °C permanecieron viables mínimo un año.

Hall (1954), Masera (1957), Steinhaus (1960), Clerk y Madelin (1965), concluyen que hay una declinación muy notable en la viabilidad de los conidios a temperaturas superiores. Los puntos críticos para la mortalidad de los conidios de B. bassiana y M. anisopliae se ubican entre los 45 y 49 °C respectivamente, temperaturas entre 35 a 49 °C retienen el proceso de germinación (Vouk y Klas, 1932).

Aregger (1992), estudió varias cepas de B. brongniartii almacenados a 2 °C durante 24 meses, demostrando que la viabilidad de los conidios decrece como consecuencia de la baja germinación. Sweeney (1981) mencionado por Goettel (1987), reporta para siete especies de entomopatógenos (Hypomicetes) que las condiciones óptimas de almacenamiento se encuentran a -18 °C, conservando la viabilidad por más de nueve años; sin embargo en Culicinomyces clavispurus, los conidios perdieron considerablemente la viabilidad después de pocos meses a -20 °C; mientras que almacenados a 70 °C el 50% de los conidios conservaron su viabilidad durante seis meses.

Goettel (1987), demostró que los conidios de Tolypocladium cylindrosporum a  $-20^{\circ}\text{C}$  a los 12.8 meses de almacenado tuvo una viabilidad de un 79%, indicando que la viabilidad de los conidios decrece lentamente en forma progresiva, presentando una relación lineal entre la viabilidad de los conidios y el tiempo de mortalidad a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Daoust y Roberts (1983), obtuvieron algo similar pero fue más rápido la declinación progresiva observada en la viabilidad de los conidios de una cepa de M. anisopliae. Varias cepas sufrieron una reducción del 93 al 56% de viabilidad en las primeras dos semanas después de congeladas (sufriendo posiblemente un choque de temperatura), posteriormente la viabilidad de los conidios se mantuvo estable (36 a 56%) por más de 24 meses. Gardner y Pillai (1987) citado por Goettel (1987), estudiaron varios métodos de almacenamiento de T. cylindrosporum, resultando el método más adecuado almacenar los conidios en agua destilada a  $4^{\circ}\text{C}$  usando esto obtuvieron una viabilidad de 86% después de dos años de almacenamiento.

Generalmente se cree que la patogenicidad es retenida después del almacenamiento de los conidios bajo ciertas condiciones que permiten la retención de la viabilidad, sin embargo se ha reportado que en B. bassiana la capacidad infectiva decrece más rápidamente que la capacidad de germinación (Daoust y Roberts, 1983).

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Lugar de la investigación.

La producción masiva del hongo para la obtención de conidios y la prueba de preservación en cristales de sílica gel, se realizaron en los laboratorios de Patología de Insectos del Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgrados (CENA-CP) y en la Universidad Autónoma Chapingo (U.A.CH.), en Chapingo Estado de México. Las pruebas de patogenicidad mediante bioensayos sobre la broca del café y el parasitoide, se llevaron a cabo en los laboratorios del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (C.I.E.S.) en la Ciudad de Tapachula, Chiapas, México.

### 4.2. Origen de las cepas del hongo.

Se utilizaron 18 cepas del hongo Beauveria bassiana, aislados de diferentes hospederos de varias partes del mundo incluyendo Brasil, Ecuador, México y Rusia (Cuadro 2). A cada una de las cepas se les asignó una clave de acuerdo con la fecha de recepción del material biológico que llega al laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados.

### 4.3. Patogenicidad de B. bassiana sobre H. hampei.

Para conocer si todas las cepas de B. bassiana eran patógenas a H. hampei, se realizó una prueba preliminar en los laboratorios del C.I.E.S. Unidad Tapachula en el Estado de Chiapas, para esto se preparó 1 gr de conidios en 100 ml de agua destilada estéril más dos gotas del dispersante adherente tritón 100 y se homogenizó en un frasco de vidrio de 200 ml. En vasos pequeños de plástico de 20 ml, se colocaron 100 brocas adultas previamente esterilizadas con formol al 2%, posteriormente, se les aplicó 1 ml de la solución de conidios procurando que los insectos se impregnaran durante 30 segundos, después de esta operación se absorbió con papel toalla la solución excedente y se cubrieron con una tapadera con maya; de la misma forma se realizó con el testigo (sin conidios) conteniendo únicamente agua destilada más tritón 100; los vasos con las brocas inoculadas con el hongo y el testigo

Cuadro 2. Cepas del entomopatógeno Beauveria bassiana, hospedero original y lugar de origen. 1992.

Clave de la cepa	Hongo	Hospedero original	Lugar de origen
Bb 2 Nativa	<u>B. bassiana</u>	<u>Hypothenemus hampei</u>	Rosario Izapa, Chis., México.
Bb 4 Ecuador	<u>B. bassiana</u>	<u>H. hampei</u>	Ecuador
Bb 6	<u>B. bassiana</u>	<u>H. hampei</u>	Ecuador
Bb 7	<u>B. bassiana</u>	<u>Atta mexicana</u>	Morelos, México
Bb 8	<u>B. bassiana</u>	<u>Leptinotarsa</u> sp.	Texcoco, México
Bb 9	<u>B. bassiana</u>	Miridae	Puebla, México
Bb 12	<u>B. bassiana</u>	Chinche café del sorgo. Pentatomidae	Irapuato, Guanajuato, México
Bb 13	<u>B. bassiana</u>	Formulación Boverin	Alyshina, Moscú
Bb14	<u>B. bassiana</u>	<u>Certoma arcuata</u> (Coleop. Chrysomelidae)	Costa do Surubin, Cristo Rei, Amazonas, Brasil
Bb 15	<u>B. bassiana</u>	<u>Chalcodermus aeneus</u> (Coleop: Curculionidae).	CNPAF, Goiañia, Goiás Brasil
Bb 16	<u>B. bassiana</u>	<u>Chalcodermus aeneus</u> (Coleop.: Curculio-	CNPAF, Goiañia, Goiás Brasil
Bb 17	<u>B. bassiana</u>	Palomilla (Lepidóptera)	Papantla, Ver., Méx.
Bb 18	<u>B. bassiana</u>	Palomilla (Lepidóptera).	Papantla, Ver., Méx.
Bb 19	<u>B. bassiana</u>	Palomilla (Lepidóptera).	Gregorio Mendez, Méx.
Bb 22	<u>B. bassiana</u>	<u>Leptophobia aripa</u>	Montecillo, Méx.
Bb 24	<u>B. bassiana</u>		
Bb 25	<u>B. bassiana</u>	<u>H. hampei</u>	Sn. Miguel, Chis. Méx.
Bb 26	<u>B. bassiana</u>	<u>H. hampei</u>	Aguacatlán, Chis., Méx.

se mantuvieron dentro de una cámara húmeda en condiciones controladas de  $27 \pm 1$  °C de temperatura y  $95 \pm 5$  % de humedad relativa y 12:12 horas luz. Se realizaron observaciones cada 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas para determinar el tiempo letal máximo (TLM) registrando la mortalidad de los individuos por fecha. Los insectos muertos se despositaron en cámaras húmedas que consistían en una caja petri y un disco de papel filtro humedecido para propiciar el desarrollo del hongo. Los individuos con el hongo esporulado se colocaron en frascos de vidrio y se conservaron a 4 °C.

#### 4.4. Purificación de las cepas de B. bassiana.

Todas y cada una de las cepas fueron sembradas sobre el medio de cultivo agar-dextrosa-sabouraud (ADS), preparada con un litro de agua destilada, 65 gr del medio ADS, 10 gr de levadura de cerveza y un cuarto de bolo del antibiótico tetraciclina, con la finalidad de uniformizar el sustrato de crecimiento y evitar variaciones de B. bassiana.

#### 4.5. Obtención de las esporas.

Del cultivo ya preparado se depositaron con una pipeta 10 ml a cada tubo de ensaye de 22 X 175 mm tapandolas con algodón lo más apretado posible y se esterilizaron a 120 °C durante 15 minutos (15 lb/pul<sup>2</sup>). Después de la esterilización de los tubos, estos se colocaron sobre una regla de madera para darles una inclinación a tal forma que el medio de cultivo se solidificara, dejandolos cinco días de reposo para eliminar la humedad que existía en su interior. De la misma forma se procedió con las cajas petri, con la variante que se esterilizaron independientemente las cajas y el medio, y luego se realizó el vaciado en un cámara de flujo laminar continuo.

La siembra de los conidios se efectuó en el interior de una campana de flujo de aire, donde se tomó con un asa bacteriológica pequeñas porciones del hongo depositandolo en varios puntos tanto en el caso de los tubos de ensaye como de las cajas petri; estos se incubaron en una cámara bajo condiciones controladas de  $27 \pm 2$  °C y húmeda relativa de 70% durante 30 días para inducir el crecimiento y esporulación del hongo.

#### 4.6. Preparación de matrices de B. bassiana.

Para este fin se utilizaron botellas Rouz donde se colocaron 100 gr de arroz entero sin cascarilla, a la cual se adicionaron 80 ml de agua destilada más un cuarto de bolo del antibiótico tetraciclina con la finalidad de inhibir el crecimiento bacteriano, la boca de los frascos se cubrió con papel aluminio sellado con maskin tape, posteriormente se esterilizaron en un autoclave a 120 °C (15 lb/pul<sup>2</sup>) durante 15 minutos, dejándolos en reposo 24 horas para que se enfriaran. De los tubos de ensaye se tomó un tercio de los conidios raspando con una asa bacteriológica, se diluyeron en 10 ml de agua destilada estéril a la cual se le agregó una gota del dispersante adherente tritón 100 para obtener una suspensión homogénea de conidios. Con una jeringa hipodérmica se inyectaron a cada frasco Rouz 10 ml de la suspensión, estas se golpearon con las palmas de las manos para distribuir uniformemente a los conidios sobre el sustrato. Las matrices se incubaron durante un mes a  $27 \pm 2$  °C de temperatura,  $75 \pm 5\%$  de humedad relativa y 12:12 horas luz.

#### 4.7. Propagación masiva del hongo.

Después de un mes de incubación de las matrices, el hongo alcanzó su máxima esporulación, se procedió a propagarlo en bolsas de polipapel, para esto se remojó el arroz durante dos horas y se escurrió para eliminar el exceso de agua utilizando un bastidor con tela mosquitera de plástico. En cada bolsa de polipapel se pesaron 200 gr de arroz, sellandolas posteriormente con grapas, estas se esterilizaron durante 15 a 20 minutos a 120 °C (15 lb/pul<sup>2</sup>), las bolsas esterilizadas se dejaron reposar 24 horas para que se enfriaran, A las matrices esporuladas se les agregó 100 ml de agua destilada estéril, más 20 gotas del dispersante adherente tritón 100 agitando vigorosamente con la finalidad de desprender los conidios del arroz, esta suspensión se filtró con tela pañalina estéril para evitar el paso de impurezas del sustrato. De la suspensión resultante, con la ayuda de una jeringa veterinaria se inyectaron 10 ml a cada bolsa tratando de cubrir el arroz y obtener una distribución homogénea del material fungoso sobre el sustrato, las bolsas fueron incubadas en una cámara con condiciones controladas.

#### 4.8. Cosecha de conidios.

A los 30 días de incubación cuando la esporulación fue evidente, se procedió a vaciar el contenido en charolas de papel aluminio dejando secar el material al medio ambiente, evitando que le llegara la luz solar ya que puede afectar la viabilidad de los conidios. La cosecha de las unidades infectivas se realizó utilizando un tamiz número 100 cubierto con dos recipientes de plástico ajustados al tamiz agitando vigorosamente para lograr el desprendimiento de los conidios del arroz, después se dejó reposar 15 minutos antes de abrir los recipientes y evitar que los conidios se dispersaran en el aire, la colecta del material se realizó con una brocha pequeña de cerdas finas; los conidios se depositaron en frascos de plásticos color ámbar para proteger el material biológico de la luz del sol, estos frascos fueron preservados a 4 °C para mantener la viabilidad de los conidios.

#### 4.9. Bioensayos semifinos (respuesta biológica).

##### 4.9.1. Cría de las brocas del café.

Las brocas adultas hembras fueron obtenidas del pie de cría de los laboratorios del C.I.E.S., apartir de una dieta merídica (Cuadro 13 del apéndice) donde H. hampei se ha desarrollado satisfactoriamente (Gómez et al, 1992; Villacorta y Barrera, En Prensa). Las brocas del café al momento de la inoculación con el hongo tenían 60 días de edad y fueron colectadas disectando el contenido de la dieta de cada tubo, los insectos se cojieron con un pincel de cerdas finas para colocarlas en tubos de vidrio, antes de la inoculación fueron tratadas con formol al 2% para eliminar contaminantes que podrían interferir en el efecto del hongo sobre H. hampei.

##### 4.9.2 Bioensayos.

Para los bioensayos semifinos u obtención de la ventana de respuesta biológica que nos permite conocer dentro de que dosis cae la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), se preparó una solución madre al 1% (1 gr de conidios del hongo en 100 ml de agua destilada estéril, más 0.01% del dispersante adherente tritón 100), a partir de ésta se prepararon las siguientes concentraciones 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, y un testigo que consistía de agua destilada más el dispersante

adherente; este procedimiento se realizó con cada una de las cepas a evaluar.

#### 4.9.3. Bioensayos finos.

Los resultados de los bioensayos semifinos permitieron seleccionar las cepas más agresivas, por lo que se decidió trabajar con nueve cepas, las cuales en los bioensayos semifinos presentaron las concentraciones letales medias preliminares más bajas.

Después de haber obtenido la respuesta biológica, únicamente se seleccionaron nueve cepas incluyendo las más agresivas a la broca, descartando aquellas cepas que resultaron ser menos virulentas al insecto. En estos bioensayos finos se utilizaron 13 tratamientos más un testigo, con cinco repeticiones cada uno. Para la inoculación se tomaron grupos de 60 brocas provenientes de dieta previamente esterilizadas que se colocaron dentro de un tubo de ensaye, en seguida se les aplicó 0.5 ml de la suspensión de conidios según dosis y cepa en evaluación, se giró el tubo de 20 a 30 segundos tratando de poner en contacto los conidios con los insectos, se drenó la solución excedente y posteriormente las brocas fueron extraídas del tubo con un pincel de cerdas finas colocándolos en el interior de la caja petri previamente preparadas con disco de papel filtro estéril para eliminar totalmente la humedad, después de esta operación las brocas se colocaron en tubos de vidrio de fondo plano de 1.7 cm de diámetro por 8 cm de alto que contenía en su interior un cotiledón de café pergamino con 45% de humedad del peso seco del fruto, los cotiledones previamente fueron tratados con propargite para evitar la reproducción de ácaros que podrían interferir en los resultados de los bioensayos, además a cada cotiledón se le hicieron de 10 a 12 agujeros para ayudar a la broca que perforara con mayor facilidad y evitar que se murieran por falta de alimento.

En cada tubo se colocaron 12 individuos, protegiendo la boca del tubo con un pedazo de tela organza sostenido con un arito de plástico, los tubos fueron colocados en el interior de una cámara húmeda construida con un recipiente de 15 cm de alto por 37 cm de ancho y 26 cm de largo para obtener condiciones ambientales controladas de  $27 \pm 2$  °C de temperatura,  $95 \pm 5\%$  de humedad relativa, para esto se preparó una solución saturada con 1000 ml de agua destilada más 100 gr de

cloruro de sodio, las cámaras húmedas se colocaron dentro de un cuarto con fotoperíodo de 12:12 horas luz. A los ocho días (Tiempo letal) después de la inoculación de los insectos se realizaron las observaciones correspondientes disectando los frutos para extraer a las brocas muertas y vivas llevando un registro por dosis y por cepa correspondiente. Las brocas muertas se colocaron en cámaras húmedas para propiciar la emergencia del hongo, y corroborar que la broca murió debido al efecto del patógeno. Los bioensayos generalmente se efectuaron por la tarde con suspensiones del hongo preparadas el mismo día.

#### 4.9.4. Conteo de conidios.

Esto se realizó con la ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer y con el auxilio de un microscopio compuesto. Para ello se seleccionó la dilución al 0.01% de todas las cepas, efectuando 10 conteos, obteniéndose un promedio, mismo que se utilizó para calcular las concentraciones de conidios por  $\text{mm}^3$  y por ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Conidios/ml} = \frac{\text{Conidios contados} \times 4 \times 10^6 \times \text{Factor de dilución}}{80}$$

Los valores obtenidos sirvieron de base para la preparación de las diferentes diluciones para cada una de las cepas a evaluar (Cuadro 10 y 11 del apéndice).

#### 4.10. Evaluación del hongo por medio de bioensayos sobre C. stephanoderis.

##### 4.10.1. Obtención del parasitoide.

Los parasitoides fueron obtenidos del pie de cría de los laboratorios del CIES donde se han reproducido sobre frutos de café infestados artificial y naturalmente por la broca, técnica establecida por

Barrera et al (1991). Los insectos utilizados fueron colectados el día anterior antes de llevar a cabo los bioensayos.

#### 4.10.2. Bioensayos.

La metodología para esta prueba fue similar a la utilizada con H. hampei, utilizando únicamente las cepas que resultaron ser más agresivas a la plaga; se tuvieron 13 tratamientos y cinco repeticiones de cada cepa del hongo a evaluar. Los parasitoides después de la inoculación con el hongo se les proporcionó diariamente miel diluída en agua (relación 2:1) como fuente de alimento para evitar su muerte y observar el efecto de B. bassiana sobre C. stephanoderis.

#### 4.11. Preservación de conidios de B. bassiana en cristales de sílica gel.

En frascos pequeños de vidrio (6 X 2 cm) con tapón de rosca, se colocaron 3 gr de cristales de sílica gel de 6 a 16 mallas de tamaño y que fueron activados en calor seco a 180 °C durante tres horas para elevar la capacidad de absorción de humedad de los cristales. A los conidios de B. bassiana se les puso una capa protectora, para lo cual se preparó una solución con 7 gr de leche en polvo semidescremada diluída en 100 ml de agua destilada más 0.01% del dispersante adherente tritón 100; se pipetearon de 3 a 5 ml por tubo de ensaye, posteriormente se pasteurizaron a 120 °C durante 15 minutos (15 lb/pul<sup>2</sup>), después de este procedimiento los tubos se almacenaron a 4 °C durante tres días.

Las 13 cepas de hongo estudiadas fueron producidas un mes antes en cajas de petri con medio agar-dextrosa-sabouraud, enriquecido con levadura de cerveza al 1%. Los conidios fueron cosechados con la ayuda de un asa bacteriológica estos se vaciaron en los tubos de ensaye que contenían la leche pasteurizada, con la ayuda de un vibrador eléctrico vortex se homogenizó durante 30 segundos hasta tener una suspensión verdadera. Con una pipeta estéril de 1 ml se tomaron 0.7 ml de la suspensión (conidios + leche) depositandolo en cada frasco que contenían los cristales de sílica gel, por medio de varios movimientos se distribuyeron uniformemente los conidios sobre las partículas. Los frascos fueron almacenados a diferentes temperatura 4, 25 y 35 ± 1 °C

y 0% de humedad relativa. Los parámetros evaluados para cada cepa fueron el porcentaje de germinación de los conidios y diámetro de las colonias.

#### 4.11.1. Porcentaje de germinación.

Para evaluar el porcentaje de germinación se tomaron de 2 a 3 cristales de sílica gel que contenían los conidios de cada una de las cepas en preservación y se colocaron en tubos de vidrio que contenían 0.3 ml de agua destilada estéril más 0.01% del dispersante adherente; se homogenizaron en el vortex durante cinco segundos y de la suspensión resultante se tomó una gota que fue colocada sobre una placa estéril que consistía en una fina capa del medio papa-dextrosa-sabouraud, tratando que la gota se expandiera sobre toda la superficie de la placa. Cada placa se hizo por triplicado con tres repeticiones cada una y un testigo, estas fueron incubadas en cámaras a  $27 \pm 2$  °C de temperatura,  $85 \pm 5\%$  de humedad relativa y fotoperíodo de 12:12 horas luz para inducir la germinación de los conidios. Después de 36 horas de incubación, las placas fueron observadas en un microscopio compuesto en 40X determinándose el porcentaje de germinación, el conteo se realizó tomando como base 100 conidios al azar dentro del campo del objetivo considerando conidios viables aquellos donde el tubo germinativo era evidente (Figura 27 del apéndice).

#### 4.11.2. Crecimiento radial de las colonias.

Para medir el desarrollo de la colonia en cajas petri con medio de cultivo papa-dextrosa-sabouraud se colocaron por cada condición de almacenamiento y cepa, dos cristales de sílica gel con conidios y se incubaron bajo condiciones controladas de  $27 \pm 2$  C de temperatura,  $85 \pm 5\%$  de humedad relativa y 12:12 horas luz. Después de ocho días de haber realizada la siembra se midió tanto el largo como el ancho de la colonia utilizando la metodología descrita por Hall y Bell (1961).

#### 4.12. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en los bioensayos fueron corregidos con la fórmula de Abbot (1925) y fueron analizados utilizando el paquete SAS-Probit Instalado en el Centro de Estadística y Cálculo (CEC) del Colegio de Postgraduados en Chapingo, México. Corroborando estos resultados con el programa estadístico S.B.I.-I.R.T. (CL<sub>50</sub>), Montpellier, Francia, y se obtuvieron las líneas de respuestas logaritmo dosis-mortalidad, los valores de la CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub>. Además se obtuvieron los valores de  $a$  y  $b$  de la ecuación de regresión  $Y = a + bx$ ; donde  $y$  corresponde al valor Probit,  $a$  es la ordenada al origen,  $b$  la pendiente de la línea de regresión, y  $x$  el logaritmo de la dosis.

A los datos obtenidos en la preservación de los conidios en sílica gel, para el porcentaje de germinación se analizó mediante una regresión lineal y para el desarrollo radial de las colonias se obtuvieron las medias con sus respectivos errores estándar ( $S\bar{x}$ ). Además se compararon las medias con la prueba de tukey tanto para el porcentaje de germinación como el diámetro de las colonias de cada cepa de B. bassiana.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1. Patogenicidad de B. bassiana sobre H. hampei.

En la prueba preliminar de patogenicidad las 18 cepas de B. bassiana resultaron ser patógenas a H. hampei (Cuadro 9 del apéndice), la mortalidad observada varió del 31 al 100%. Nueve de estas cepas resultaron ser más agresivas a este insecto causando mortalidades más altas (92 al 100%), datos que sirvieron como base para seleccionar las cepas utilizadas en los bioensayos finos, utilizando únicamente las cepas más prometedoras y descartando las menos agresivas a la plaga.

### 5.2. Bioensayos finos.

#### 5.2.1. Broca del café H. hampei.

En el Cuadro 3 se presentan los datos correspondientes a la  $CL_{50}$ , concentración de conidios, límites fiduciales al 95%,  $CL_{95}$  y ecuación de la línea de regresión de las nueve cepas de B. bassiana aplicadas sobre hembras adultas de H. hampei; el orden en que se establecen se encuentran en forma ascendente (de menor a mayor concentración). Las cepas del hongo que resultaron ser más virulentas a la broca del café, fueron la Bb4 (Ecuador), Bb25 (México) y Bb26 (México), ya que registraron las menores  $CL_{50}$  (0.003, 0.004 y 0.006), esto quiere decir que se necesita una menor cantidad de inóculo para matar al 50% de la población de la plaga. De estas tres cepas la Bb4 y Bb25 estadísticamente son iguales, ya que sus límites fiduciales a nivel de  $CL_{50}$  se traslapan, siendo diferente la Bb26 a la Bb4 ya que sus límites fiduciales a nivel de la  $CL_{50}$  no se traslapan. Le sigue en importancia la Bb17 resultando ser iguales estadísticamente a las cepas Bb25, Bb26 y Bb18, pero diferente a la Bb16, Bb24 y Bb14. La Bb8 es diferente estadísticamente a todas las cepas antes mencionada por que no existe traslape en sus límites fiduciales a nivel de  $CL_{50}$ ; sin embargo por presentar una  $CL_{50}$  (0.050) muy elevada se descarta la posibilidad de utilizarlo en estudios posteriores para el manejo integrado de la broca del café.

Cuadro 3. Valores de CL<sub>50</sub>, concentración de conidios, límites fiduciales, CL<sub>95</sub> y ecuación de la línea de regresión de nueve cepas de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill., evaluadas sobre adultos hembras (60 días de edad) de la broca del café -- Hypothenemus hampei (Ferrari). C.I.E.S. 1992.

Clave de la cepa	CL <sub>50</sub> *	Conidios X10E6/ml	Límites fiduciales (95%)		CL <sub>95</sub> *	Ecuación de la línea de regresión.
Bb4 (Ecuador)	0.003	2.2	0.002,	0.004	0.040	Y = 8.808 + 1.540X
Bb25 (México)	0.004	4.1	0.003,	0.006	0.057	Y = 8.557 + 1.533X
Bb26 (México)	0.006	5.9	0.005,	0.008	0.081	Y = 8.298 + 1.512X
Bb17 (México)	0.008	9.09	0.006,	0.010	0.083	Y = 8.418 + 1.635X
Bb18 (México)	0.009	9.21	0.008,	0.012	0.101	Y = 8.265 + 1.627X
Bb16 (Brasil)	0.015	11.74	0.011,	0.020	0.850	Y = 6.711 + 0.944X
Bb24 (México)	0.019	15.15	0.016,	0.024	0.274	Y = 7.456 + 1.443X
Bb14 (Brasil)	0.019	18.62	0.014,	0.025	0.798	Y = 6.744 + 1.015X
Bb8 (México)	0.050	45.45	0.040,	0.062	0.906	Y = 6.701 + 1.308X

\* Valores expresados en por ciento de concentración.

La Bb4 fue 1.3 veces más virulenta que la Bb25 y 2.0 veces más que la Bb26; con respecto a la cepa Bb8, la que resultó ser menos virulenta de todas las cepas, la Bb4 fue casi 17 veces más agresiva, lo que indica que se necesita más cantidad de inóculo de la cepa Bb8 para matar el 50% de la población de la broca. En esta investigación las cepas mostraron alta virulencia posiblemente por haber sido aisladas de H. hampei, su huésped natural, no así las otras cepas que fueron aisladas de otros hospederos del Orden Lepidoptera y Hemiptera.

Resultados similares fueron obtenidas por Méndez (1990), quien probó cinco cepas de B. bassiana sobre H. hampei, observando que las cepas aisladas de la broca mostraban más virulencia ( $CL_{50} = 0.005$  equivalente a 5.0 millones de conidios/ml de solución) que las cepas aisladas de otros hospederos como lepidópteros ( $CL_{50} = 27$  y  $28.9$  millones de conidios/ml). Las  $CL_{50}$  mencionadas por este autor resultaron ser más elevadas a nuestros resultados debido tal vez a que en esta investigación no se consideró la edad de la broca del café, ya que el material biológico fue colectado directamente en el campo de frutos infestados naturalmente por la plaga. No así en la presente investigación las brocas utilizadas tenían 60 días de edad y las condiciones nutricionales eran uniformes debido a que el material biológico fue obtenido a partir de una dieta merídica donde los insectos se han desarrollado satisfactoriamente (Gómez *et al*, 1992; Villacorta y Barrera, En preparación) además las condiciones ambientales fueron controladas a temperatura de  $27 \pm 2$  °C, humedad relativa del  $95 \pm 5\%$  y fotoperíodo de 12:12 horas luz.

El valor de la pendiente de la línea de regresión indica el grado de uniformidad de la respuesta de la población al hongo aplicado; mientras mayor sea el valor de la pendiente, mayor será la uniformidad de la respuesta (Lagunes, 1991). Para la población de la broca. en las figuras 5 y 6 muestran las líneas de respuesta dosis-mortalidad de las nueve cepas probadas de B. bassiana, señaladas numéricamente de acuerdo a su grado de virulencia a nivel de  $CL_{50}$ . En ella se observa con el número 1 la posición de la línea de regresión de la cepa Bb4, es la más agresiva, sin embargo, la respuesta más uniforme se obtuvo con la Bb17 ya que el valor de su pendiente fue mayor (1.635) que le corresponde la posición número 4, siguiendo la Bb18 (1.627) con la posición número 5 y la más heterogénea la Bb16 por presentar un valor menor de su pendiente (0.944) representada con el número 5. La  $CL_{50}$  es el mejor indicador de la eficiencia para el control de la broca del

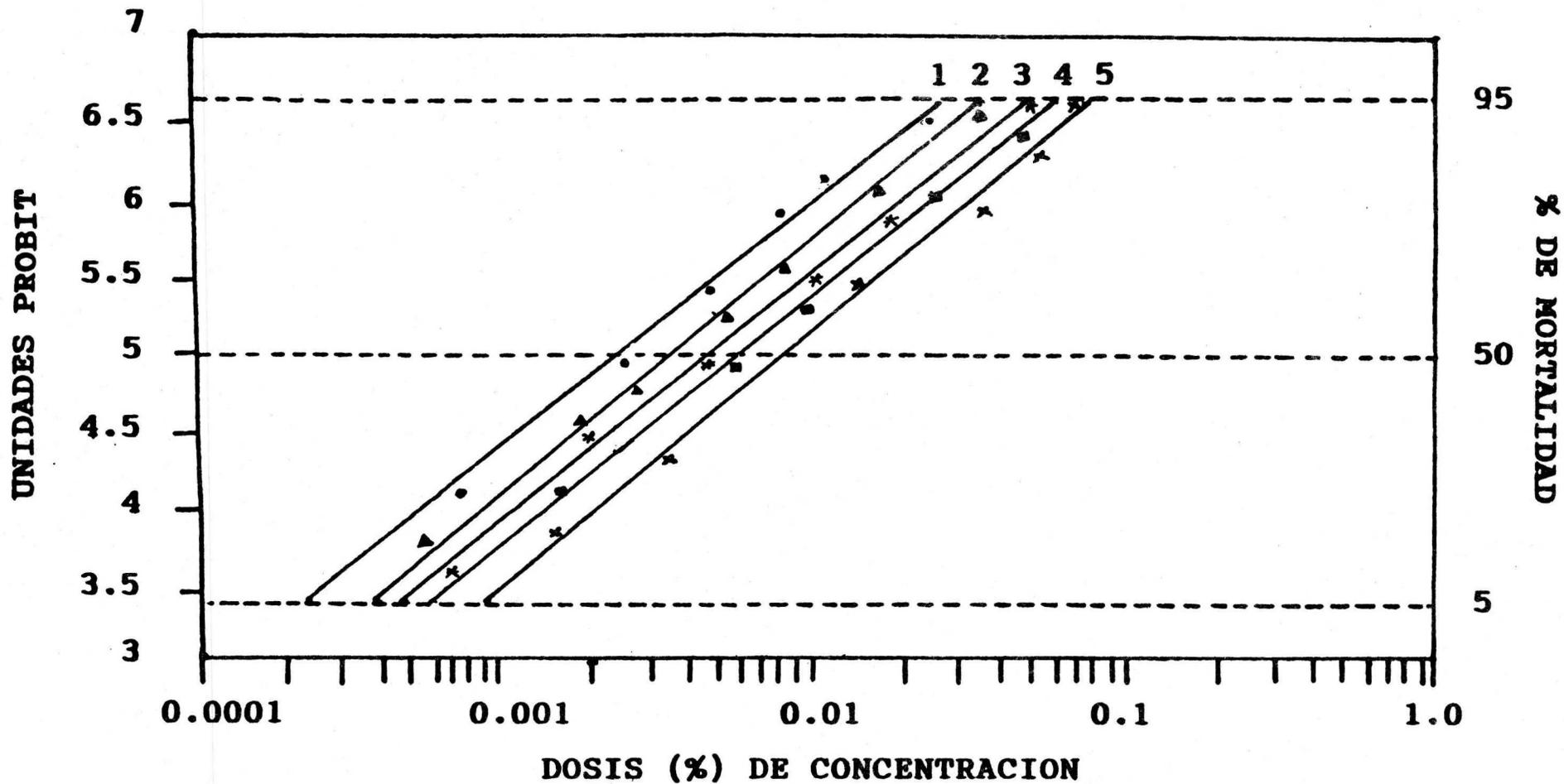


Figura 5. línea de respuesta dosis-mortalidad de cinco cepas del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., sobre hembras adultas de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferr.). (1) Bb4, (2) Bb25, (3) Bb26, (4) Bb17 y (5) Bb18. C.I.E.S. 1992.

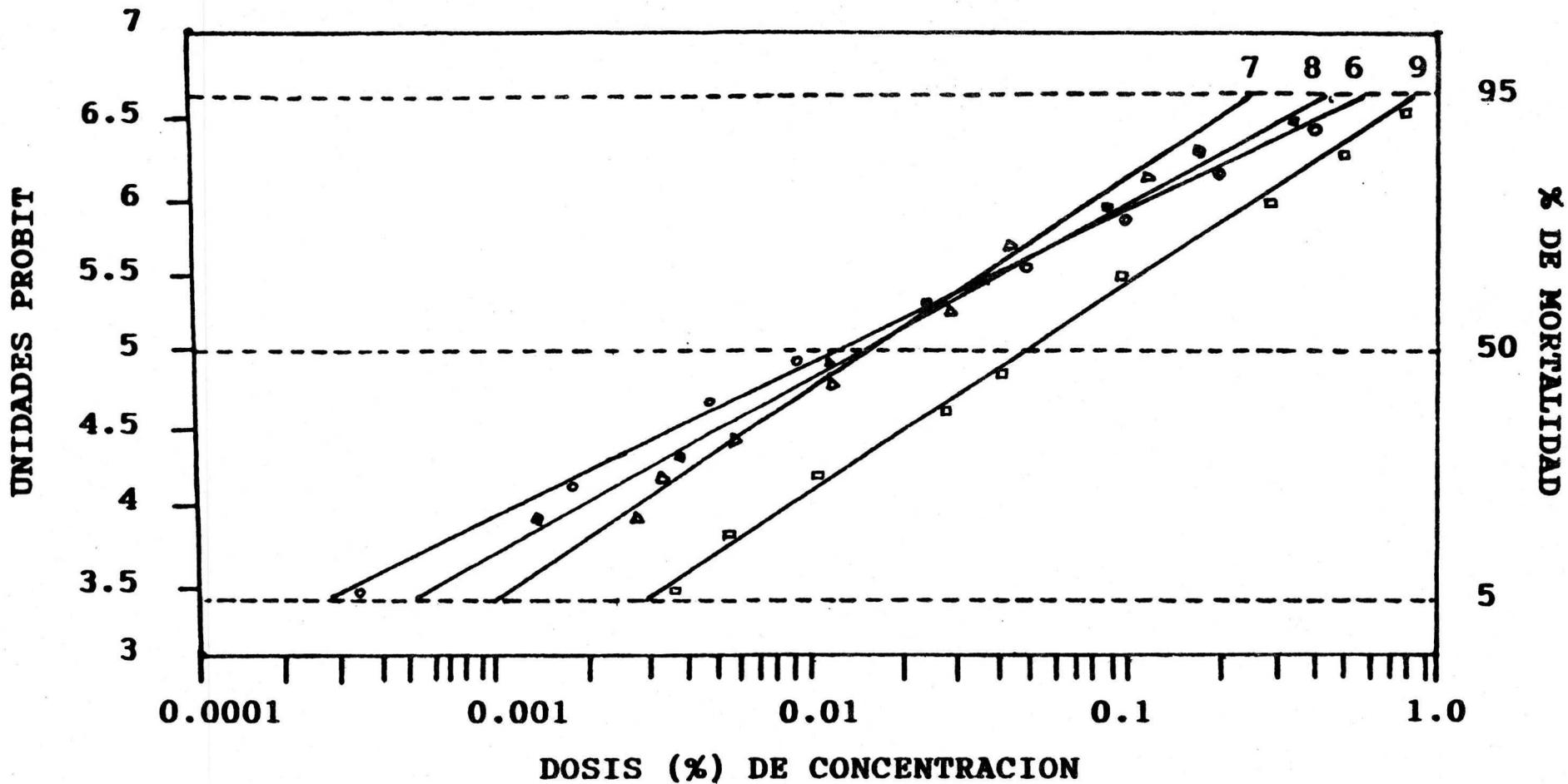


Figura 6. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de cuatro cepas del hongo *Beauveria bassiana* (Bal.) Vuill., sobre hembras adultas de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferr.). (6) Bb16, (7) Bb24, (8) Bb14 y (9) Bb8. C.I.E.S. 1992.

café y así se tienen que las CL<sub>50</sub> fueron : 0.003, 0.004, 0.006, 0.008, 0.009, 0.015, 0.019, 0.019 y 0.050% de concentración para las cepas Bb4, Bb25, Bb26, Bb17, Bb18, Bb16, Bb24, Bb14 y Bb8 respectivamente, mismas que equivalen a 2.2, 4.1, 5.9, 9.09, 9.21, 11.74, 15.15, 18.62 y 45.45 millones de conidios/ml de solución.

Finey (1978), establece que en un bioensayo los resultados pueden variar si no se toman en cuenta ciertas características importantes, como son: la edad del insecto, sexo, tamaño, condiciones físicas, biológicas y factores ambientales.

La eficiencia del hongo B. bassiana en el control de la broca del café, ha sido comparada experimentalmente en Guatemala, Honduras, El Salvador y México; por lo que se recomienda validar su efectividad en condiciones de campo utilizando diferentes concentraciones de conidios del hongo (Carneiro, 1984; Decazy, 1988 y Méndez, 1990).

#### 5.2.2. Parasitoide C. stephanoderis.

En el Cuadro 4 se establecen los datos correspondientes a la CL<sub>50</sub>, concentración de conidios, límites fiduciales al 95%, CL<sub>95</sub> y ecuación de la línea de regresión de varias cepas de B. bassiana aplicado a hembras adultas del parasitoide C. stephanoderis, los datos se encuentran en forma ordenada de menor a mayor concentración, de nueve cepas registradas, las más virulentas al enemigo natural fueron, la Bb4 (Ecuador), Bb26 (México) y Bb17 (México), cuyas CL<sub>50</sub> fueron menores (0.007, 0.022 y 0.029) en comparación con las demás cepas, esto quiere decir que se necesita una pequeña cantidad de inóculo para matar al 50% de la población del enemigo natural; las tres cepas antes mencionadas se recomiendan para continuar con las investigaciones sobre la interacción hongo-parasitoide. Le siguen en importancia decreciente las cepas Bb18(México), Bb16 (México), Bb25 (México), Bb8 (México), Bb14 (Brasil) y Bb24 (México), con CL<sub>50</sub> de: 0.030, 0.034, 0.037, 0.064, 0.072 y 0.081% respectivamente. La cepa Bb4 es estadísticamente diferente a todas las cepas probadas por que sus límites fiduciales a nivel de CL<sub>50</sub> no se traslapan, siguiendo en orden de importancia la Bb26 el cual resultó ser diferente estadísticamente a la Bb16 y Bb25, pero iguales a las cepas Bb17 y Bb18 por que existe un traslape en sus límites fiduciales a nivel de CL<sub>50</sub>. La Bb8, Bb14 y

Cuadro 4. Valores de CL<sub>50</sub>, concentración de conidios, límites fiduciales, CL<sub>95</sub> y ecuación de la línea de regresión de nueve cepas de Beauveria bassiana (Blas.) Vuill., - evaluadas sobre adultos hembras del parasitoide Cephalonomia stephanoderis Be-- trem. C.I.E.S. 1992.

Clave de la cepa	CL <sub>50</sub> *	Conidios X10E6/ml	Límites fiduciales (95%)		CL <sub>95</sub> *	Ecuación de la línea de regresión.
Bb4 (Ecuador)	0.007	5.25	0.005,	0.008	0.096	Y = 8.782 + 1.529X
Bb26 (México)	0.022	21.93	0.017,	0.028	0.287	Y = 6.973 + 1.193X
Bb17 (México)	0.029	29.3	0.023,	0.035	0.366	Y = 7.298 + 1.495X
Bb18 (México)	0.030	30.0	0.024,	0.042	0.239	Y = 7.762 + 1.797X
Bb16 (México)	0.034	36.3	0.028,	0.042	0.404	Y = 7.250 + 1.538X
Bb25 (México)	0.037	45.2	0.030,	0.045	0.287	Y = 7.122 + 1.487X
Bb8 (México)	0.064	44.5	0.052,	0.079	0.967	Y = 6.663 + 1.399X
Bb14 (Brasil)	0.072	58.1	0.058,	0.088	0.913	Y = 6.703 + 1.491X
Bb24 (México)	0.081	79.4	0.063,	0.105	2.938	Y = 6.149 + 1.058X

\* Valores expresados en porciento de concentración.

Bb24 son iguales estadísticamente, pero diferente a las cepas Bb4, Bb26, Bb17, Bb18, Bb16 y Bb25 por que no existe traslape alguno en sus límites fiduciales a nivel de  $CL_{50}$ . Puede notarse fácilmente que todas las cepas experimentadas sobre ambos insectos, la Bb4 y Bb26 resultaron ser más virulentas tanto a la broca del café como al entomófago, sin embargo se puede notar que las cepas Bb4 y Bb26 fueron más agresivas a la broca del café que al parasitoide, para H. hampei se obtuvieron  $CL_{50}$  de 0.003 (Bb4) y 0.006 (Bb26); para C. stephanoderis 0.007 (Bb4) y 0.022 (Bb26).

Aparentemente el parasitoide presenta un mayor grado de tolerancia al hongo B. bassiana, comparado con H. hampei, tal vez por que las cepas utilizadas bioquímicamente contengan una mayor concentración de quitinaza, enzima encargada de degradar la quitina, polímero que posiblemente se encuentre en mayor cantidad en Coleópteros que en Himenópteros (Prado y Valdéz, 1990). Según Roberts (1989), todos los hongos entomopatógenos presentan una diversidad bioquímica con respecto a su hospedero y distribución geográfica; la especificidad de los hongos está en función del tipo y concentración de enzimas presentes como proteasas, lipasas y quitinazas. En el caso de la broca del café, presenta una cutícula muy quitinizada y el cuerpo dorsalmente se encuentra cubierto de setas y espinas que actúa como una barrera que la protege e impide el contacto de los conidios sobre el cuerpo del insecto (Méndez, 1990); sin embargo se pudo observar que B. bassiana tiene la capacidad de vencer todos estos obstáculos y disolver la cutícula provocando la muerte; Roberts (1989), establece que el hongo produce toxinas que alteran las funciones fisiológicas del organismo y como consecuencia el insecto llega a morir.

Existen evidencias que los organismos benéficos como los parasitoides pueden desarrollar resistencia a ciertos plaguicidas como lo mencionan (Sanger, 1958; Brown et al, 1983 y Wells et al, 1988); lo mismo puede suceder con los hongos entomopatógenos aunque en la actualidad no existe reporte alguno. El grado de resistencia que presentó el parasitoide al hongo, es una característica muy importante para ser incorporado como agente potencial del control biológico dentro de un programa de manejo integrado de la broca del café. Según Baker (1984), Quezada (1985) y Decazy (1988), el parasitoide podría ser la alternativa para frenar el avance de la plaga en lugares no infestados por el escolítido, basándose en el hecho de que el cafeto es un cultivo

tropical perenne considerado como un buen hábitat para la proliferación de enemigos naturales. Tanto el hongo como el parasitoide pueden incorporarse en el combate de H. hampei, considerando que no habría interacción negativa ya que el hongo comúnmente actúa sobre el estado adulto de la plaga y la aplicación de éste patógeno sería en forma preventiva antes que el fruto de café sea perforado por la broca (Méndez, 1990). El parasitoide normalmente tiene su acción sobre los estados inmaduros de la plaga, alimentándose de huevos y larvas, ovipositando sobre las prepupas y pupas (Quezada, 1984; Barrera et al, 1990; Penagos, 1992), además actúa como depredador de adultos succionando la hemolinfa (Ticheler, 1961). Debido al comportamiento bioecológico que presenta este enemigo natural existe poca posibilidad de que el parasitoide entre en contacto con el entomopatógeno, ya que al introducirse a un fruto de café infestado por la broca C. stephanoderis comienza a alimentarse de la progenie de la plaga hasta destruirlo completamente y emerge del fruto al cumplir con su cometido y seguir buscando frutos infestados para reproducirse (Koch, 1973).

En las Figuras 7 y 8, se observan las líneas de respuestas dosis-mortalidad de nueve cepas del hongo B. bassiana probadas sobre el parasitoide adulto C. stephanoderis, señaladas numéricamente de acuerdo a su agresividad a nivel de la CL<sub>50</sub>. En ella se puede notar que el número 1 es la posición de la línea de regresión de la cepa más virulenta que le corresponde a la Bb4 (Ecuador), sin embargo de acuerdo a la pendiente de la línea de regresión la cepa Bb18 con el número 4 presentó la respuesta más uniforme como lo muestra su pendiente (1.797), siguiendo la Bb16 (México) con el número 6 con una pendiente de 1.538 y la más heterogénea resultó la Bb24 (México) con el número 9 por tener una pendiente menor (1.058). Las CL<sub>50</sub> para el parasitoide fueron: 0.007, 0.022, 0.029, 0.030, 0.034, 0.037, 0.064, 0.072 y 0.081% de concentración para las cepas Bb4, Bb26, Bb17, Bb18, Bb16, Bb25, Bb8, Bb14 y Bb24 respectivamente, mismas que equivalen a 5.25, 21.93, 29.29, 30.00, 36.26, 43.18, 44.49, 58.18 y 79.38 millones de conidios/ ml de solución.

### 5.3. Desarrollo de B. bassiana sobre H. hampei.

Madelin (1963), Perkrul y Gula (1979), Prasertphon y Tanada (1986), establecen que los conidios son la unidad infectiva de los hongos entomopatógenos; que por medio de acción mecánica y enzimática

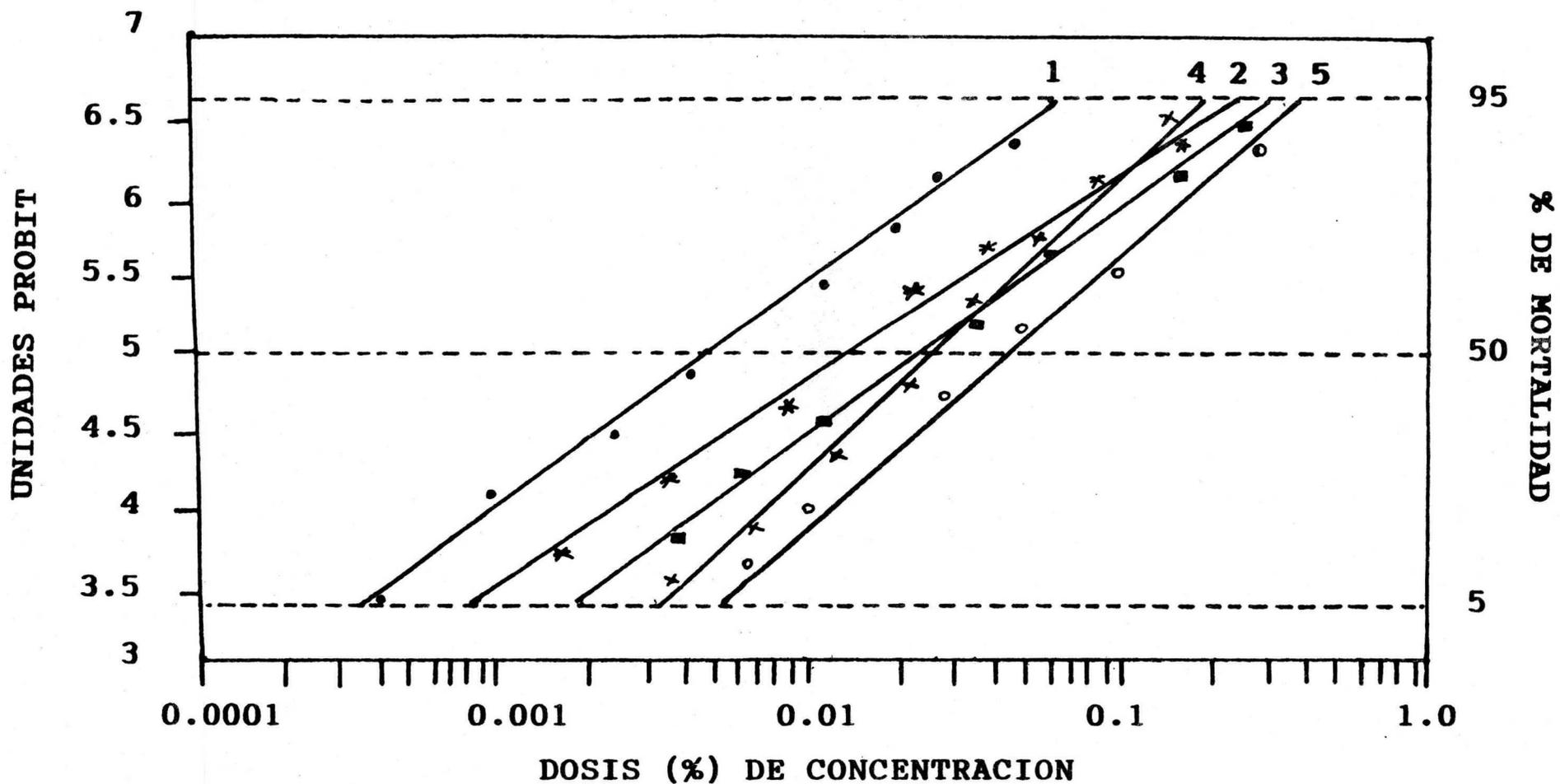


Figura 7. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de cinco cepas del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., sobre hembras adultas del parasitoide *Cephalonomyia stephanoderis* Betrem. (1) Bb4, (2) Bb26, (3) Bb17, (4) Bb18 y (5) Bb16. C.I.E.S. 1992.

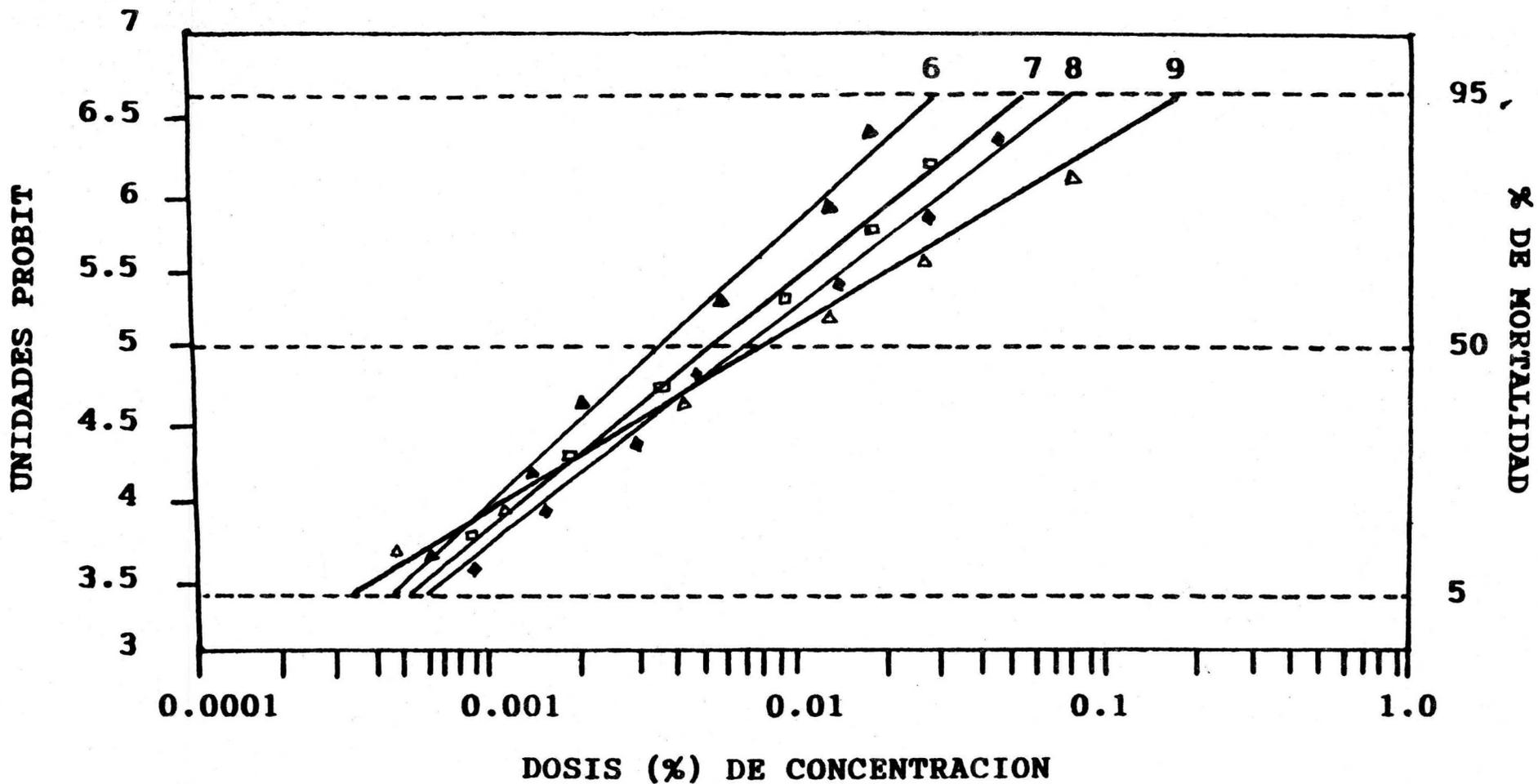


Figura 8. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de cuatro cepas del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., sobre hembras adultas del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* Betrem. (6) Bb25, (7) Bb8, (8) Bb14 y (9) Bb24. C.I.E.S. 1992.

penetran al interior del insecto a través de cuatro rutas principales, como son las áreas intersegmentales, por el tracto digestivo, las tráqueas o a través de heridas.

De acuerdo con Roberts (1989), el conidio al caer sobre la pared del cuerpo del insecto se adhiere a la cutícula por medio de un tubo germinativo que da origen a células apresorias que provocan una infección progresiva. El hongo penetra al hemocelo dando origen a cuerpos hifales o blastosporas que circulan en la hemolinfa, el patógeno produce toxinas ocasionando alteraciones en la fisiología del hospedero, invade todo los órganos internos y como consecuencia el insecto llega a morir; el hongo al recibir estímulos externos como humedad y temperatura óptima emerge a la superficie de la cutícula del insecto formando una capa micelial de apariencia algodonosa de color blanco que al completar su máximo desarrollo produce nuevos conidios, en condiciones secas el hongo puede entrar en dormancia por períodos largos de tiempo permaneciendo en el interior de su hospedero.

En la presente investigación, las brocas muertas después de 72 horas de colocadas en cámaras húmedas para estimular la emergencia del hongo de los cadáveres del insecto, se observó el desarrollo micelial y la esporulación de B. bassiana sobre H. hampei, apreciándose que el micelio emerge de los costados del cuerpo del insecto tal como lo menciona Madelin (1963) además de la región bucal. Los ramilletes de conidióforos alcanzan a cubrir todo el cuerpo excepto las áreas quitinizadas como son los élitros y parte superior del pronoto (Figura 9). En general, se puede decir que en el laboratorio bajo condiciones ambientales controladas el micelio del hongo emerge y esporula de cualquier parte del cuerpo del insecto y frecuentemente los élitros y la cabeza quedan libres del crecimiento micelial, como fue anotado anteriormente por Méndez (1990).

#### 5.4. Desarrollo de B. bassiana sobre C. stephanoderis.

En el caso del parasitoide se observó que el hongo emerge de todas las partes del cuerpo y conforme el patógeno va desarrollándose, el micelio cubre totalmente el cuerpo de C. stephanoderis dejando libre solamente la cabeza, parte superior del tórax y el abdomen (Figura 10), sin embargo cuando el hongo alcanza su máximo desarrollo este cubre totalmente al parasitoide dando un aspecto de una pelotita de apariencia

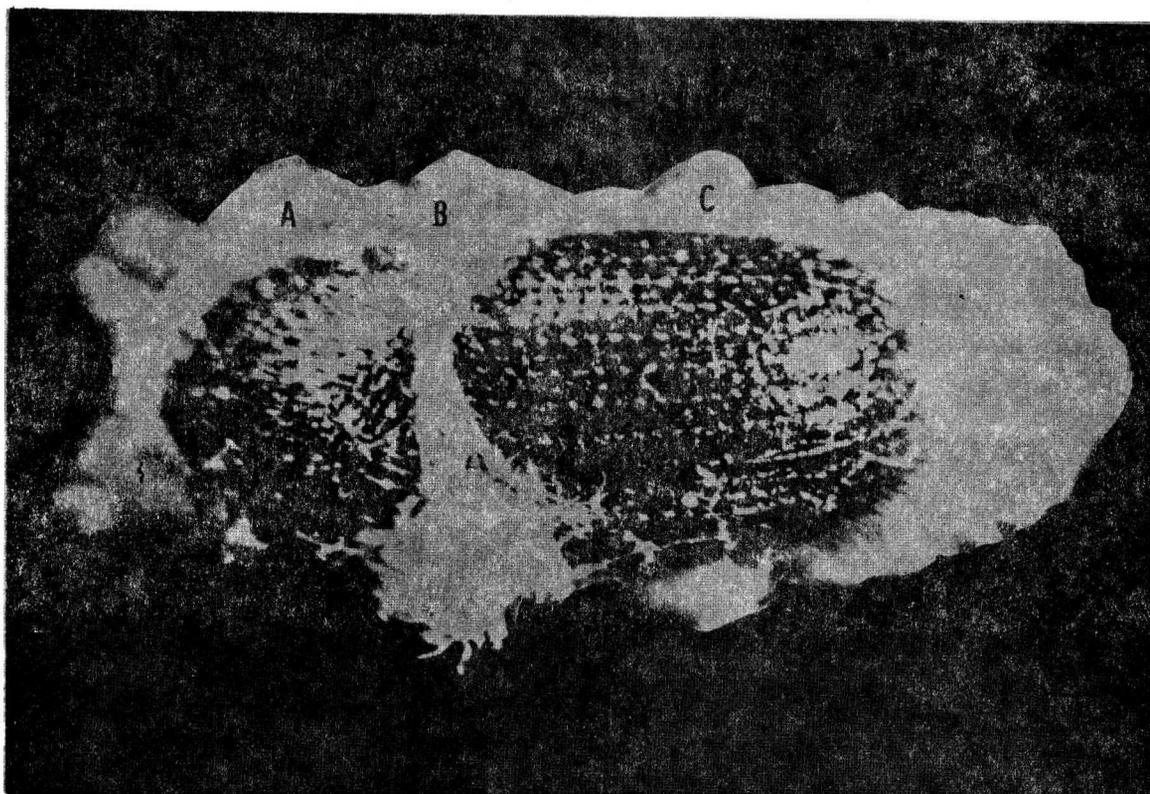


Figura 9. Desarrollo micelial de Beauveria bassiana sobre el adulto hembra de la broca del café Hypothenemus hampei. (A) Cabeza, (B) Torax y (C) Abdomen.

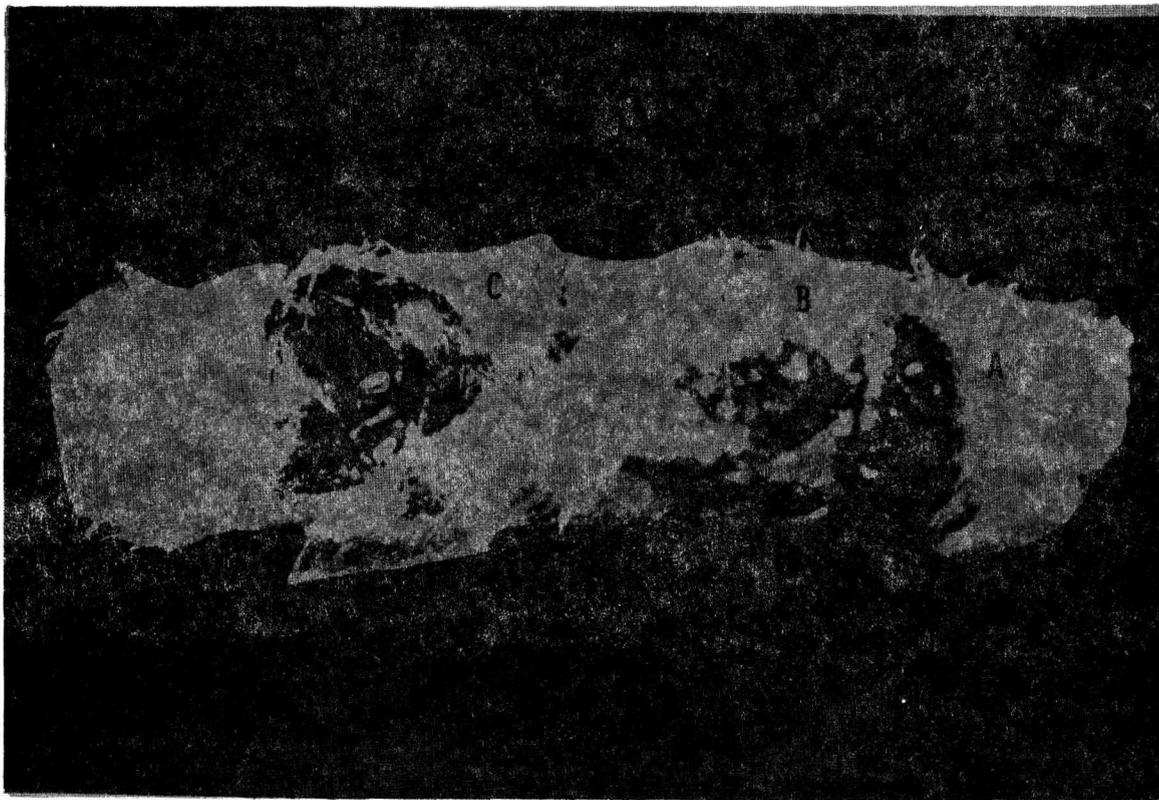


Figura 10. Desarrollo micelial de Beauveria bassiana sobre el adulto hembra del parasitoide Cephalonomia stephanoderis. (A) Cabeza, (B) Torax y (C) Abdomen.

algodonosa, característica reportada por algunos investigadores (Pascalet, 1939; Bernett y Hunter, 1972).

#### 5.5. Esporulación de B. bassiana sobre H. hampei.

Una de las funciones más importantes de los organismos entomopatógenos es la esporulación, función primordial para que el inóculo se multiplique y disemine, de tal forma que las futuras poblaciones de insectos plaga se mantengan constantemente expuestas al patógeno, permitiendo que el hongo penetre y se desarrolle en el interior del insecto huésped (Roberts, 1989; Méndez, 1990).

En esta investigación durante los bioensayos algunas de las brocas muertas no mostraron al hongo en esporulación o por lo menos ésta no fue evidente, aún cuando los insectos fueron colocados en cámaras húmedas para estimular su emergencia, hecho reportado por varios investigadores (Moore, 1973; Ramoska, 1984; Roberts, 1989; Méndez, 1990); todas las brocas fueron revisadas individualmente con la ayuda de un microscopio estereoscópico para constatar la presencia de B. bassiana y para llevar un registro por cepa y por dosis evaluada

En el Cuadro 5, se presentan los porcentajes de brocas adultas hembras con el hongo esporulado por dosis y por cepa, corregidos por el Arco seno  $\sqrt{\%}$ ; los máximos porcentajes de esporulación lo obtuvieron las cepas Bb8 (73.6%), Bb14 (62.0%) y Bb17 (81.9%) mismas que se sitúan en concentraciones del 1.0%, siguiendo en forma decreciente las cepas Bb24 (80%), Bb25 (90%), Bb26 (81.9%), Bb16 (63.4%), Bb18 (77.1%) y Bb4 (73.6%), cuyas concentraciones corresponden a 0.8, 0.8, 0.8, 0.6, 0.6 y 0.01% respectivamente. En cuanto al comportamiento por cepa, se puede apreciar que con respecto a la media general que fue el 50%, las cepas Bb25, Bb17 y Bb26 obtuvieron los promedios más altos de brocas esporuladas con 63.4, 58.9 y 57.7% respectivamente; las cepas Bb8 y Bb14 fueron las que menor porcentaje de esporulación presentaron con 38.1 y 37.2%; también se puede observar que la Bb4 fue la única cepa que obtuvo un comportamiento similar a la media general.

Aunque la humedad relativa es una limitante en la esporulación Ferron (1977) y Ramoska (1984), señalan que la mortalidad del insecto puede ocurrir en cualquier rango de humedades, pero la proliferación del hongo sobre el cadáver del insecto solamente es posible cuando los

CUADRO 5. Porcentaje de adultos hembras de la broca del café Hypothenemus hampei (Ferr.) esporuladas después de inoculadas con nueve cepas del hongo Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. a diferentes concentraciones de conidios/ml en condiciones de laboratorio. C.I.E.S. 1992.

Dosis de conidias (% de concent.)	C E P A S									TOTAL	$\bar{X}$
	Bb4	Bb8	Bb14	Bb16	Bb17	Bb18	Bb24	Bb25	Bb26		
1.0	58.8	73.6*	62.0*	51.9	81.9*	62.0	77.1	77.1	80.0	624.4	69.4
0.8	53.7	67.2	54.9	52.5	73.6	65.6	80.0*	90.0*	81.9*	619.4	68.8
0.6	69.7	65.6	51.9	63.4*	80.0	77.1*	77.1	77.1	77.1	639.0	71.0*
0.3	58.1	51.9	46.7	53.7	77.1	63.4	69.7	80.0	73.6	574.2	63.8
0.01	73.6*	54.9	51.9	46.7	80.0	68.9	65.6	71.6	68.9	582.1	64.7
0.08	58.7	54.9	43.9	56.8	71.6	63.4	58.7	77.1	65.6	550.7	61.2
0.06	54.9	46.1	36.3	52.5	69.7	65.6	53.7	73.6	60.0	512.4	56.9
0.03	40.4	42.1	36.3	46.7	58.7	62.0	46.7	64.9	53.7	451.5	50.2
0.001	55.6	21.1	33.2	40.4	51.9	50.8	43.3	62.0	53.7	412.0	45.8
0.008	43.3	10.0	31.3	43.9	43.3	40.4	28.0	54.9	52.5	347.6	38.6
0.006	43.3	8.1	26.6	24.4	41.0	31.9	18.4	49.6	39.2	282.5	31.4
0.003	34.4	0.0	8.1	20.3	24.4	20.3	10.0	31.3	28.7	177.5	19.8
0.001	10.0	0.0	0.0	8.1	12.9	10.0	10.0	15.3	12.9	79.2	8.8
TOTAL	654.5	495.5	483.1	561.3	766.1	681.4	638.3	824.5	747.8	5852.5	650.4
$\bar{X}$	50.3	38.1	37.2	43.2	58.9	52.4	49.1	63.4	57.5	450.2	50.0

\*Máximos porcentajes de brocas esporuladas.

valores de humedad están cercanos al punto de saturación; para nuestro caso, posiblemente los altos porcentajes de esporulación se dieron por que los insectos muertos se colocaron en cámaras húmedas a punto de saturación para estimular la emergencia del hongo.

#### 5.6. Esporulación de B. bassiana sobre C. stephanoderis

Todos los parasitoides muertos fueron colocados en cámaras húmedas para estimular la emergencia del patógeno de los cadáveres de C. stephanoderis y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se pudo constatar la presencia del hongo.

En el Cuadro 6, se presentan los porcentajes de adultos hembras del parasitoides con el hongo esporulado por dosis y por cepa, corregidos por el Arco seno  $\sqrt{\%}$ , se puede notar que los máximos porcentaje de parasitoides con esporulación para las cepas Bb4, Bb8, Bb14, Bb16, Bb17, Bb18, Bb24, Bb25 y Bb26 se sitúan entre el 1.0 y 0.6% de concentración, mientras que los máximos porcentajes de esporulación lo obtuvieron las cepas Bb17 (90.0%) y Bb24 (64.9%) mismas que se sitúan en concentraciones del 1.0%, siguiendo en forma decreciente el resto de las cepas (Cuadro 6). En cuanto al comportamiento por cepa se puede notar que con respecto a la media general que fue el 42.3%, las cepas Bb4, Bb26 y Bb18 obtuvieron los promedios más altos de parasitoides esporulados con 60.5, 49.7 y 45.9% respectivamente; las cepas Bb8, Bb24 y Bb14 fueron las que menor porcentaje de esporulación presentaron con un 35.6, 34.5 y 26.0%, mientras que las cepas Bb17, Bb16 y Bb25 obtuvieron un comportamiento similar a la media general, ya sus valores casi resultaron ser iguales.

#### 5.7. Viabilidad de conidios de B. bassiana preservados en cristales de sílica gel.

##### 5.7.1. Porcentaje de germinación de conidios.

La viabilidad de conidios de los hongos entomopatógenos, es una característica muy importante en el control de insectos plagas; muchos investigadores mencionan que la humedad relativa, temperatura y luz tienen efectos directos en la germinación de B. bassiana, la viabilidad

CUADRO 6 . Porcentaje de adultos hembras del parasitoide Cephalonomia stephanoderis Betrem., esporuladas después de inoculadas con nueve cepas del hongo Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. a diferentes concentraciones de conidias/ml en condiciones de laboratorio. C.I.E.S. 1992.

Dosis de conidias (% de concent.)	C E P A S									TOTAL	$\bar{X}$
	Bb4	Bb8	Bb14	Bb16	Bb17	Bb18	Bb24	Bb25	Bb26		
1.0	81.9	67.2	63.4	71.6	90.0*	77.1	64.9*	80.0	80.0	676.1	75.1
0.8	90.0*	69.7*	67.2*	77.1	77.1	81.9	60.0	80.0	90.0*	693.0	77.0*
0.6	90.0*	67.2	37.5	80.0*	67.2	90.0*	61.3	90.0*	80.0	663.2	73.7
0.3	81.9	61.3	49.0	73.6	69.7	71.6	53.7	60.0	67.2	588.0	65.3
0.01	80.0	47.9	26.6	60.0	68.9	61.3	46.7	58.1	62.0	511.5	56.8
0.08	65.6	30.0	24.4	43.3	43.9	52.5	45.0	41.0	52.5	398.2	44.2
0.06	64.9	28.7	28.0	42.1	46.7	47.9	28.7	35.1	50.8	372.9	41.4
0.03	55.6	22.8	18.4	37.5	28.7	43.3	28.0	31.9	43.9	310.1	34.5
0.001	52.5	22.8	12.9	26.6	30.0	28.0	26.6	26.6	39.2	265.2	29.5
0.008	46.1	16.4	10.0	15.3	18.4	20.3	25.1	15.3	28.7	195.6	21.7
0.006	43.3	16.4	0.0	15.3	18.4	10.0	8.1	10.0	15.3	136.8	15.2
0.003	25.1	12.9	0.0	10.0	10.0	12.9	0.0	10.0	21.1	102.0	11.3
0.001	10.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	15.3	35.3	3.9
TOTAL	786.9	463.3	337.4	552.4	579.0	596.8	448.1	538.0	646.0	4947.9	549.6
$\bar{X}$	60.5	35.6	26.0	42.5	44.5	45.9	34.5	41.4	49.7	380.6	42.3

\*Máximos porcentajes de parasitoides esporulados.

puede durar unos cuantos días hasta varios años dependiendo de las condiciones ambientales y la técnica de preservación utilizada (Steinhaus, 1960; Clerk y Madelin, 1965; Bell y Hamalle, 1974).

Los resultados obtenidos en la germinación de conidios se observan en las Figuras del 11 al 23, notándose un efecto directo de la temperatura sobre la germinación de los conidios. El mayor porcentaje de viabilidad se observó a temperaturas bajas ( $4 \pm 1$  °C) comparado con temperaturas más altas ( $35 \pm 1$  °C), existe una declinación progresiva de la viabilidad de las unidades infectivas conforme pasa el período de observación. Estos resultados son similares a los encontrados por varios investigadores (Hall, 1954; Mesera, 1957; Steinhaus, 1960; Schaerffeberg, 1964; Walstad et al, 1970; Doust y Roberts, 1983; Aregger, 1992).

#### 5.7.1.1. Germinación de conidios a $4 \pm 1$ °C.

Con respecto a la germinación de los conidios mantenidos a  $4 \pm 1$  °C, se puede notar que todas las cepas experimentadas tuvieron un comportamiento similar, ya que el porcentaje de viabilidad registrado durante el tiempo de observación sufrió una declinación progresiva. De todas las cepas, la Bb17 (Figura 21) fue la que presentó el porcentaje de viabilidad más alto, el valor de la ecuación de la línea de regresión es mayor  $Y = 108.333 - 8.041X$  ( $r^2 = 0.84$ ;  $P < 0.01$ ), siguiendo en orden decreciente las cepas Bb2 (Figura 11) con una ecuación de  $Y = 105.833 - 9.970X$  ( $r^2 = 0.91$ ;  $P > 0.01$ ) y la Bb9 (Figura 16) con la siguiente ecuación  $Y = 105.250 - 11.503X$  ( $r^2 = 0.94$ ;  $P > 0.01$ ). La cepa Bb8 manifestó menor porcentaje de viabilidad (Figura 15) como se manifiesta por la ecuación de la línea de regresión menor  $Y = 97.875 - 11.214X$  ( $r^2 = 0.91$ ;  $P > 0.01$ ). De acuerdo con la prueba de Tukey (Cuadro 7), la germinación de los conidios de las diferentes cepas B. bassiana mantenidas a  $4 \pm 1$  °C no mostraron diferencia estadística significativa.

En este estudio se pudo observar que los conidios preservados en sílica gel, se mantuvieron viables más de siete meses de almacenamiento, hasta este tiempo el porcentaje máximo de germinación fue de 61% para la cepa Bb17 (Figura 21) y el mínimo la Bb16 (Figura 20) con un 21% de germinación; posiblemente la viabilidad de los conidios conservados en sílica gel a  $4$  °C se prolongue más tiempo

según resultados reportados por otros científicos (Steinhaus, 1960; Aregger, 1962; Yendol, 1968; Fargues et al, 1979; Daust y Roberts, 1983).

#### 5.7.1.2. Germinación de conidios a $25 \pm 1$ °C.

La germinación de los conidios a temperatura de  $25 \pm 1$  °C también presentó una declinación progresiva en función del tiempo, con respecto a todas las cepas, se puede mencionar que la Bb17 (Figura 21) fue la que presentó el mayor porcentaje de viabilidad, con un valor de la ecuación de la recta de regresión mayor  $Y = 96.086 - 15.880X$  ( $r^2 = 0.84$ ;  $P < 0.01$ ), siguiendo en orden de importancia la cepa Bb2 (Figura 11) con una ecuación de  $Y = 93.208 - 14.791X$  ( $r^2 = 0.97$ ;  $P > 0.01$ ) y la Bb18 (Figura 22) con la siguiente ecuación  $Y = 91.333 - 14.490X$  ( $r^2 = 0.97$ ;  $P > 0.01$ ). La cepa que menor porcentaje de viabilidad presentó fue la Bb19 (Figura 23) con un valor menor de la ecuación de la recta de regresión  $Y = 64.407 - 10.981X$  ( $r^2 = 0.95$ ;  $P > 0.01$ ). En el Cuadro 7, se observa que de acuerdo a la prueba de Tukey la germinación de los conidios de las diferentes cepas del B. bassiana preservadas en sílica a  $25 \pm 1$  °C, no mostraron diferencia estadística.

En general todas las cepas preservadas con esta técnica, tuvieron una viabilidad máxima de cinco a seis meses, este resultado es mayor que la obtenida por Walstad et al (1960) trabajando con el mismo rango de temperatura pero no mencionan la técnica de preservación utilizada.

#### 5.7.1.3. Germinación de conidios a $35 \pm 1$ °C.

Schaerffenberg (1964), menciona que la temperatura es el factor más importante en la viabilidad de los conidios de B. bassiana, siendo la temperatura óptima para la germinación, crecimiento y esporulación del hongo entre 25 a 30 °C, abajo de los 25 °C el patógeno puede entrar en dormancia y arriba a los 30 °C los conidios pueden llegar a morir en poco tiempo. En la presente investigación se encontró que los conidios sometidos a  $35 \pm 1$  °C tuvieron viabilidad de 2 a 4 meses; la cepa Bb18 (Figura 22) fue la que obtuvo el porcentaje de germinación más alto, con un valor de la ecuación de la recta de regresión mayor  $Y = 52.916 - 994X$  ( $r^2 = 0.46$ ;  $P < 0.01$ ), siguiendo en orden

decreciente la Bb19 (Figura 23) con una ecuación de  $Y = 52.666 - 10.136X$  ( $r^2 = 0.53$ ;  $P < 0.01$ ). La cepa que menor porcentaje de viabilidad presentó fue la Bb16 (Figura 20)  $Y = 44.666 - 8.797X$  ( $r^2 = 0.43$ ;  $P < 0.01$ ); estos resultados son similares a lo reportado por Steinhaus (1960), quien menciona que la viabilidad de los conidios de B. bassiana a  $30^{\circ}\text{C}$  duró de 1 a 2 meses después de almacenamiento; no existiendo diferencia estadística según la prueba de Tukey entre las diferentes cepas preservadas a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Cuadro 7).

#### 5.7.2. Diámetro de colonias de B. bassiana.

El desarrollo radial del crecimiento micelial de las cepas estudiadas a partir de un cristal de sílica gel se muestran en las figuras 24 a 26. Los resultados demuestran que el diámetro de las colonias se reduce notablemente conforme se incrementa la temperatura (Cuadro 12 del apéndice).

En la figura 24, se presentan las medias ( $\bar{x}$ ) de las colonias con su respectivo error estándar ( $S\bar{x}$ ) de 13 cepas del hongo B. bassiana, observándose que a temperatura de  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$  las cepas que mayor crecimiento micelial obtuvieron fueron la Bb13 ( $\bar{x} = 2.24$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.21$ ) y la Bb15 ( $\bar{x} = 2.24$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.21$ ); según los resultados las dos cepas antes mencionadas tuvieron un comportamiento similar ya que sus medias y error estándar fueron iguales. Le siguen en orden de importancia la cepa Bb19 con valores de ( $\bar{x} = 1.96$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.27$ ). Con respecto a todas las cepas, la Bb8 presentó un pobre crecimiento micelial ( $\bar{x} = 1.42$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.32$ ). A esta temperatura el promedio en diámetro de las colonias se presentó en rangos que van de 2.24 a 1.96 cm teniendo una diferencia de 0.28 cm entre el valor más alto y el más bajo.

Con respecto a temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , la cepa Bb15 fue la que obtuvo el mayor promedio en el crecimiento micelial ( $\bar{x} = 1.56$  cm;  $S\bar{x} = 0.26$ ), siguiendo en orden decreciente la cepa Bb19 con valores de ( $\bar{x} = 1.24$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.35$ ). En relación con las demás cepas la Bb8 también registró el menor valor en diámetro ( $\bar{x} = 0.81$  cm;  $S\bar{x} = 0.29$ ) (Figura 25). En general se puede mencionar que a esta temperatura el promedio en el diámetro de las colonias osciló en rangos de 1.24 a 0.81 cm, con una diferencia de 0.43 cm entre el valor mayor y el menor.

En la Figura 26, se observa el resultado de las cepas del hongo B. bassiana a temperatura de  $35 \pm 1$  °C, se nota fácilmente que el crecimiento micelial se reduce drásticamente, siendo la cepa Bb19 la que registró el mayor valor de su diámetro ( $\bar{x} = 0.95$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.31$ ), le sigue en orden de importancia la Bb7 ( $\bar{x} = 0.89$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.33$ ). En comparación con las demás cepas, la Bb8 fue la que resultó tener el menor valor de su diámetro ( $\bar{x} = 0.54$  cm;  $S\bar{x} = \pm 0.33$ ). El promedio en el diámetro de las colonias fue en rangos de 0.95 a 0.89 cm con una diferencia de 0.06 cm entre ambos valores.

Los resultados de las mediciones radiales de las colonias no variaron considerablemente entre cepa y cepa, mostrando únicamente diferencia estadística (Tukey= 0.05%) a temperatura de  $4 \pm 1$  °C (Cuadro 8).

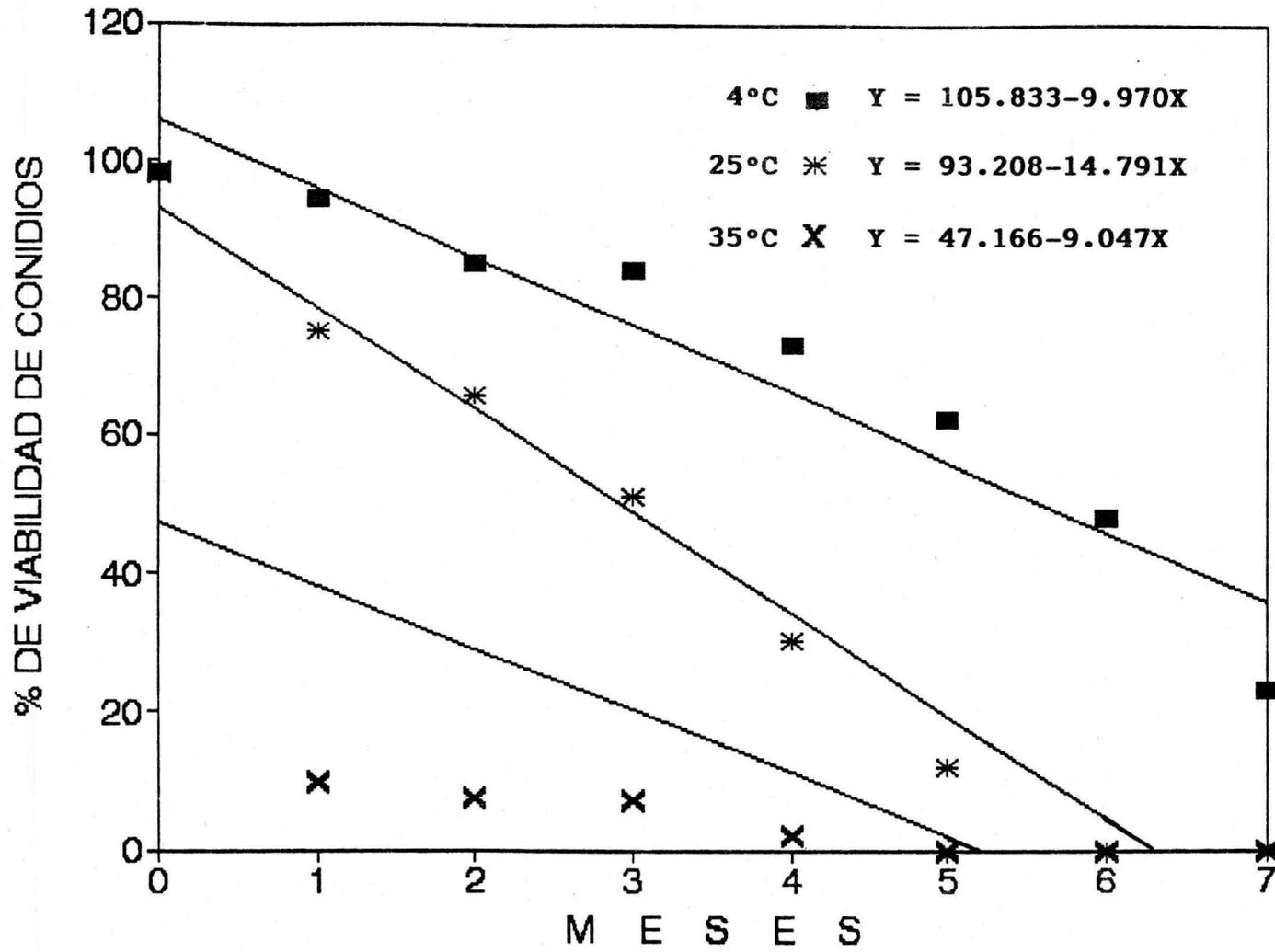


Figura 11. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb2), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

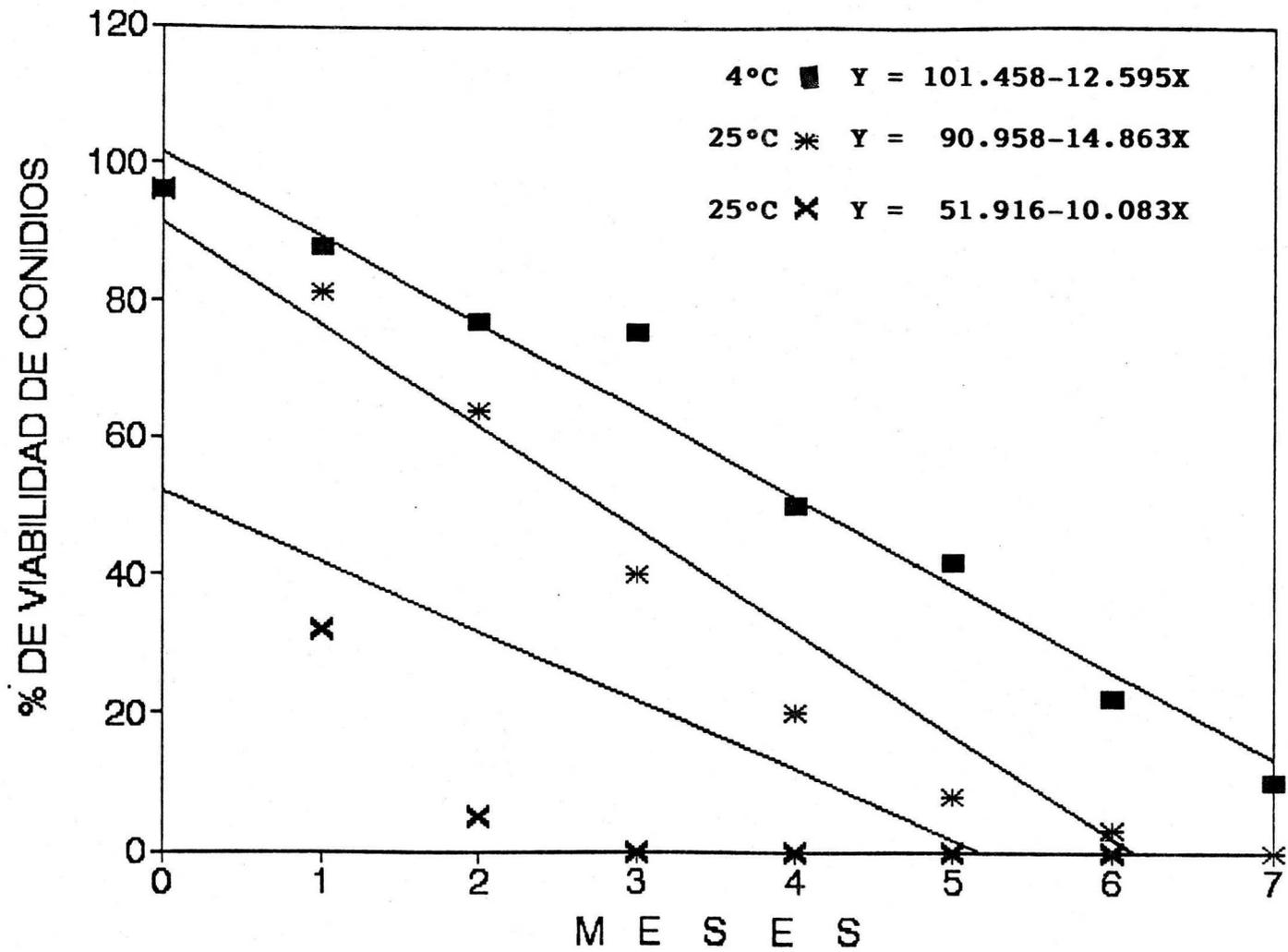


Figura 12. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb4), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

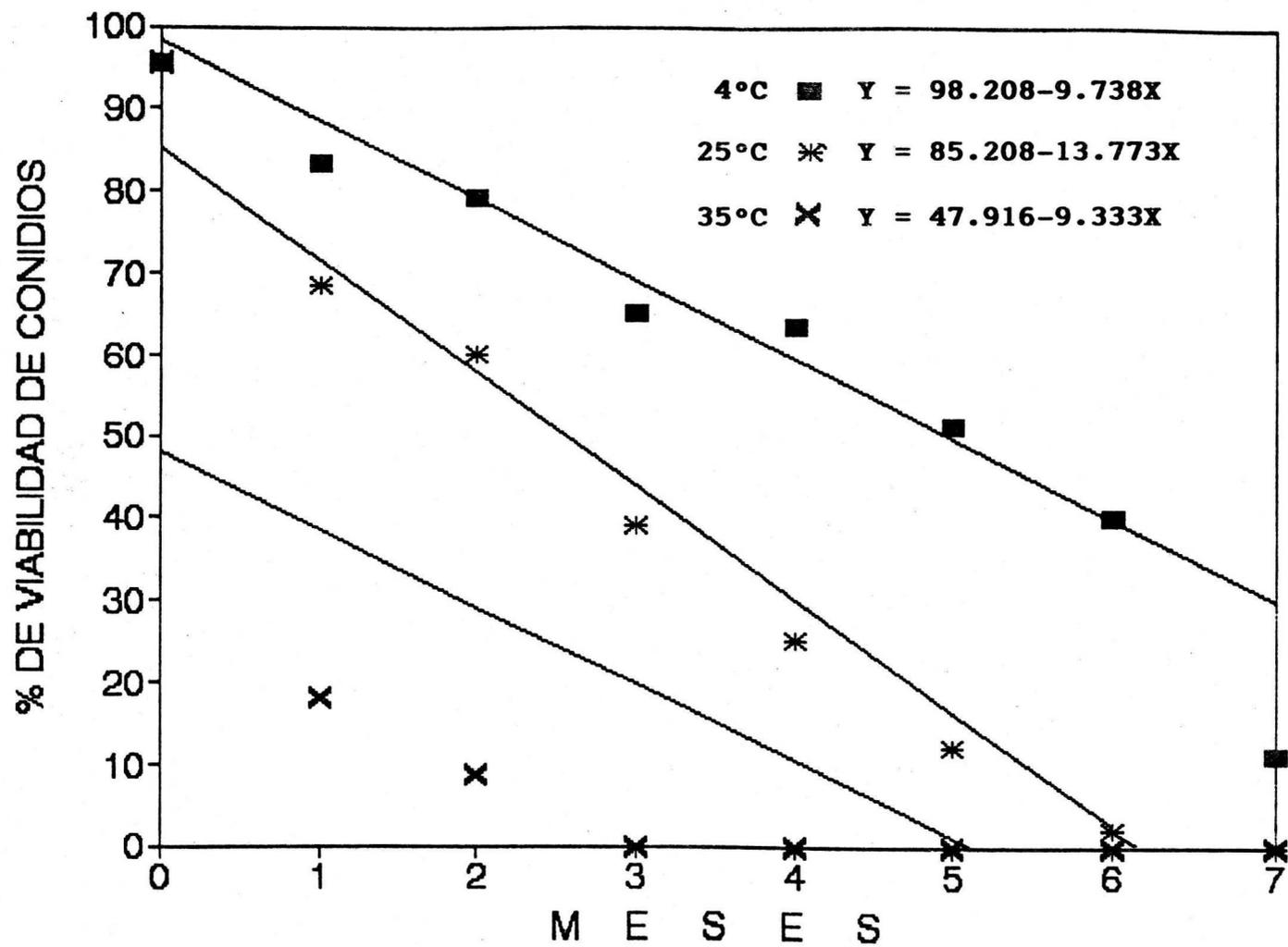


Figura 13. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb6), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

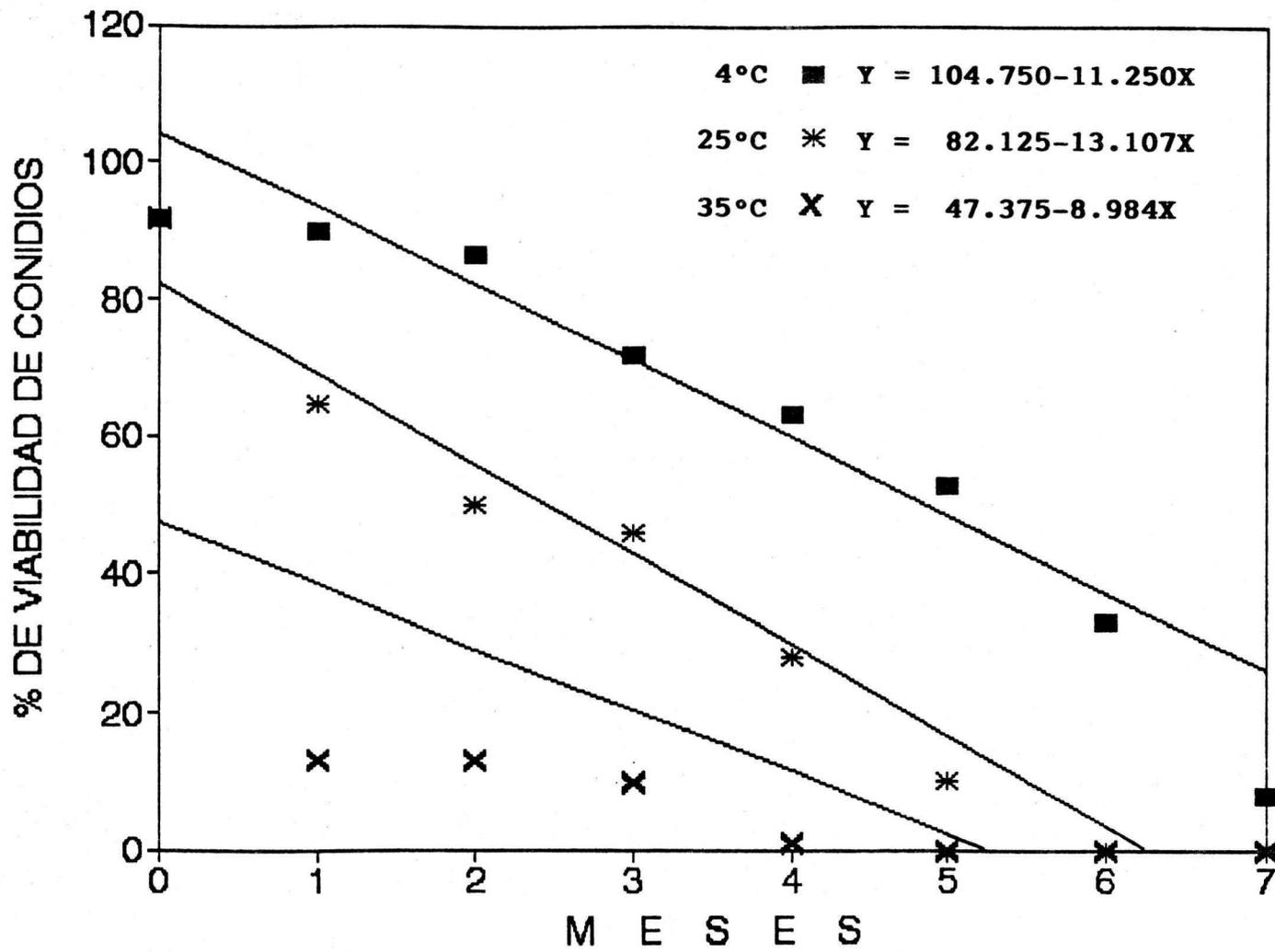


Figura 14. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb7), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

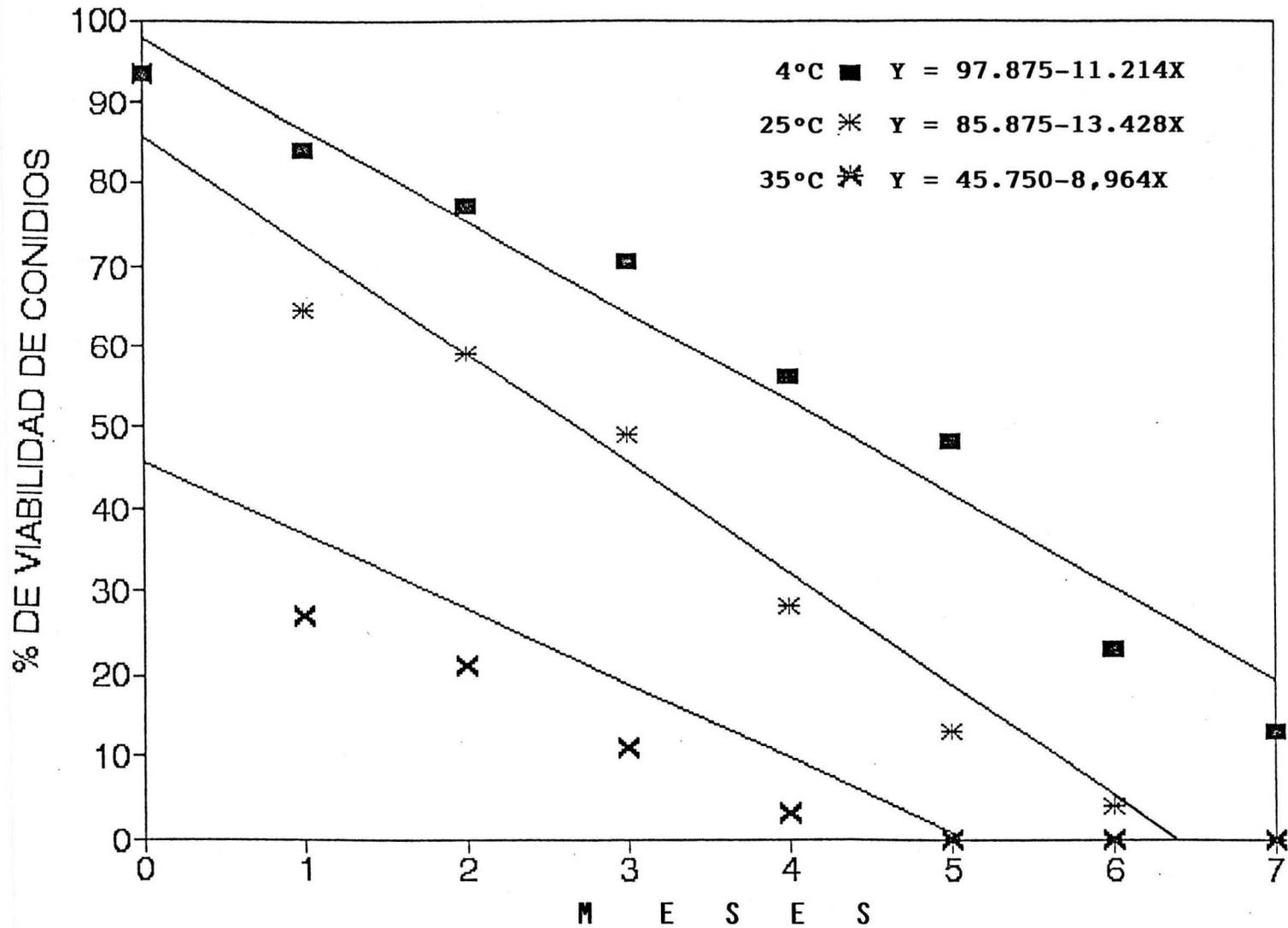


Figura 15. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb8), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

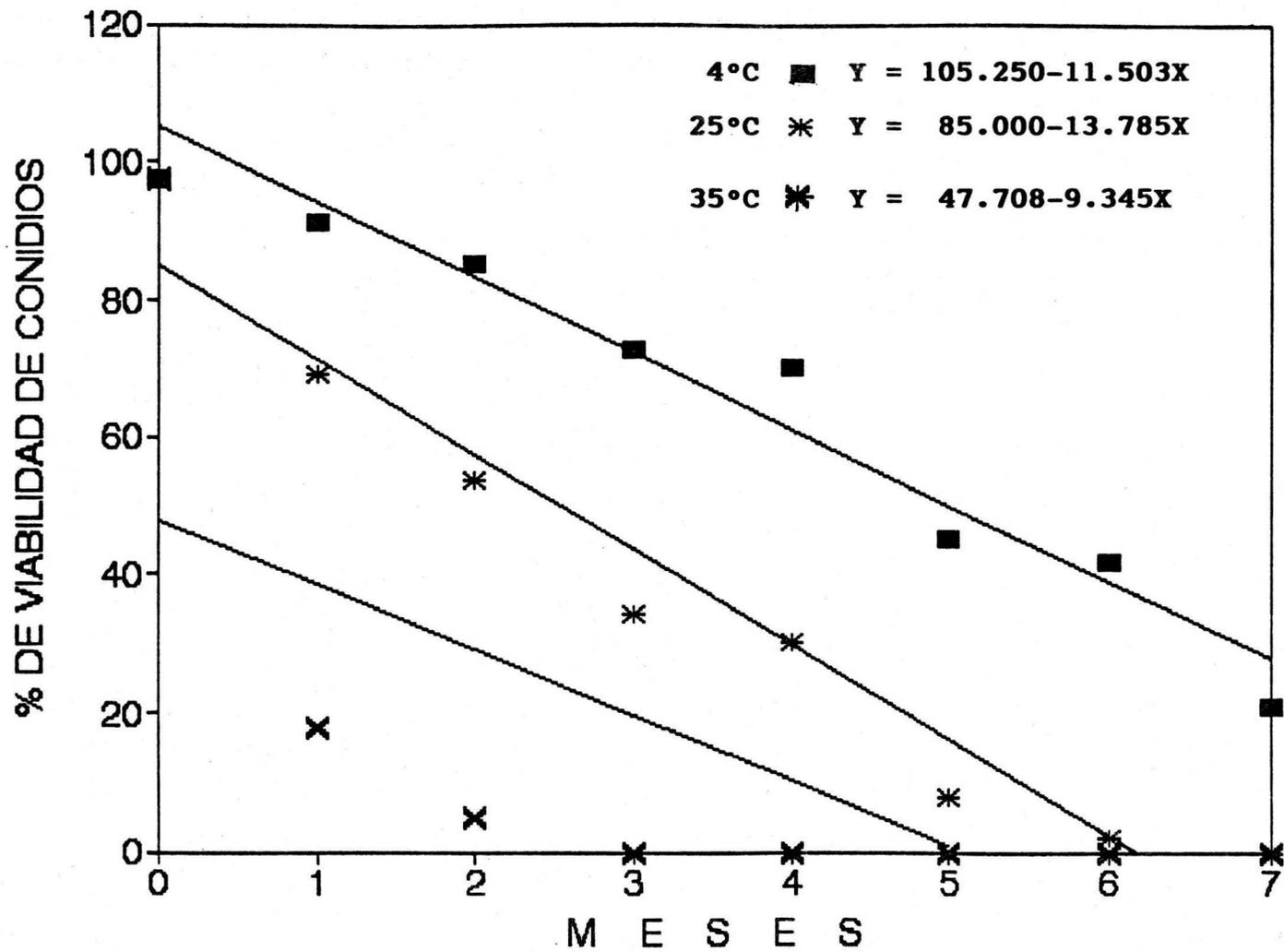


Figura 16. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb9), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

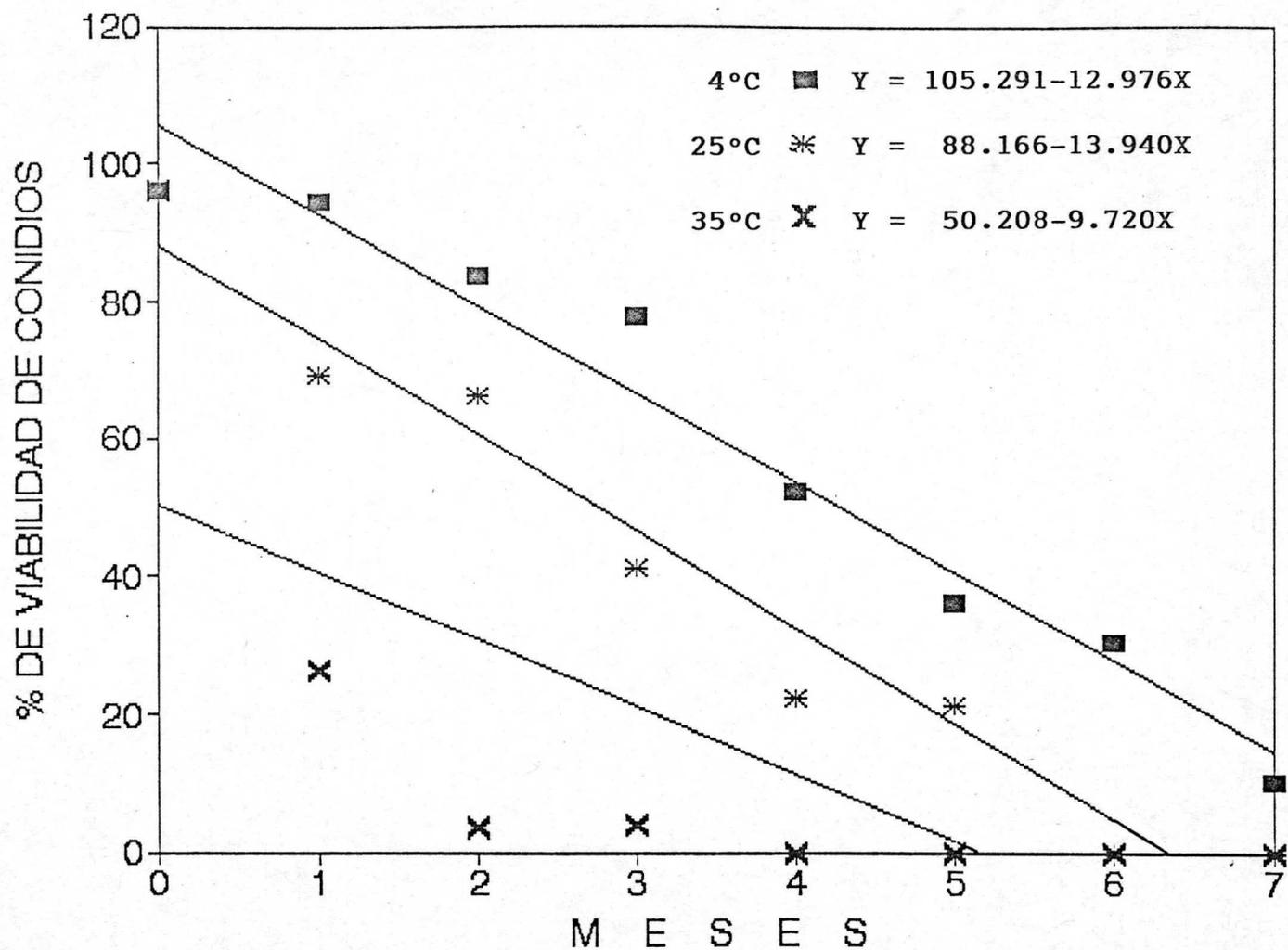


Figura 17. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb11), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

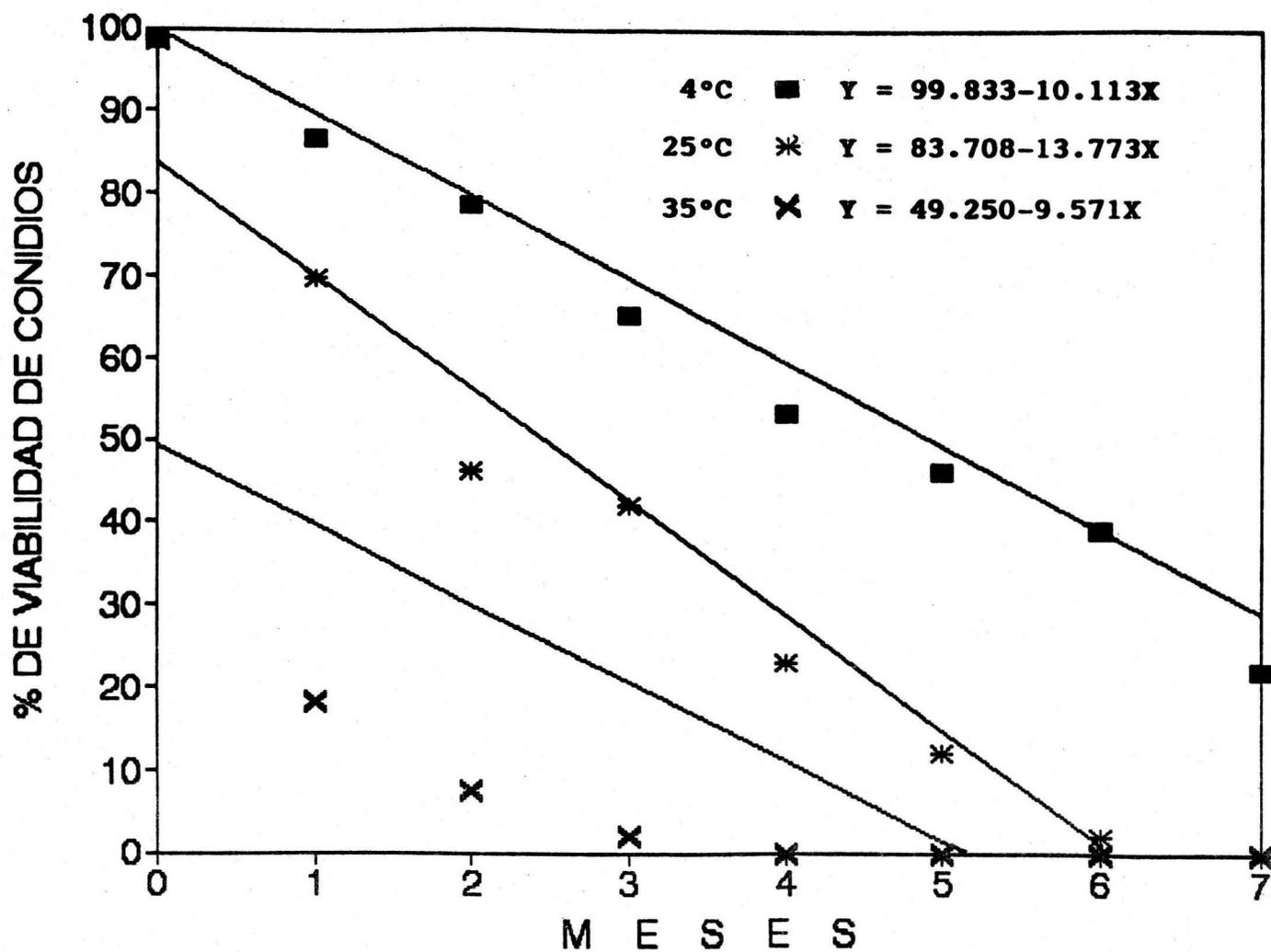


Figura 18. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb13), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

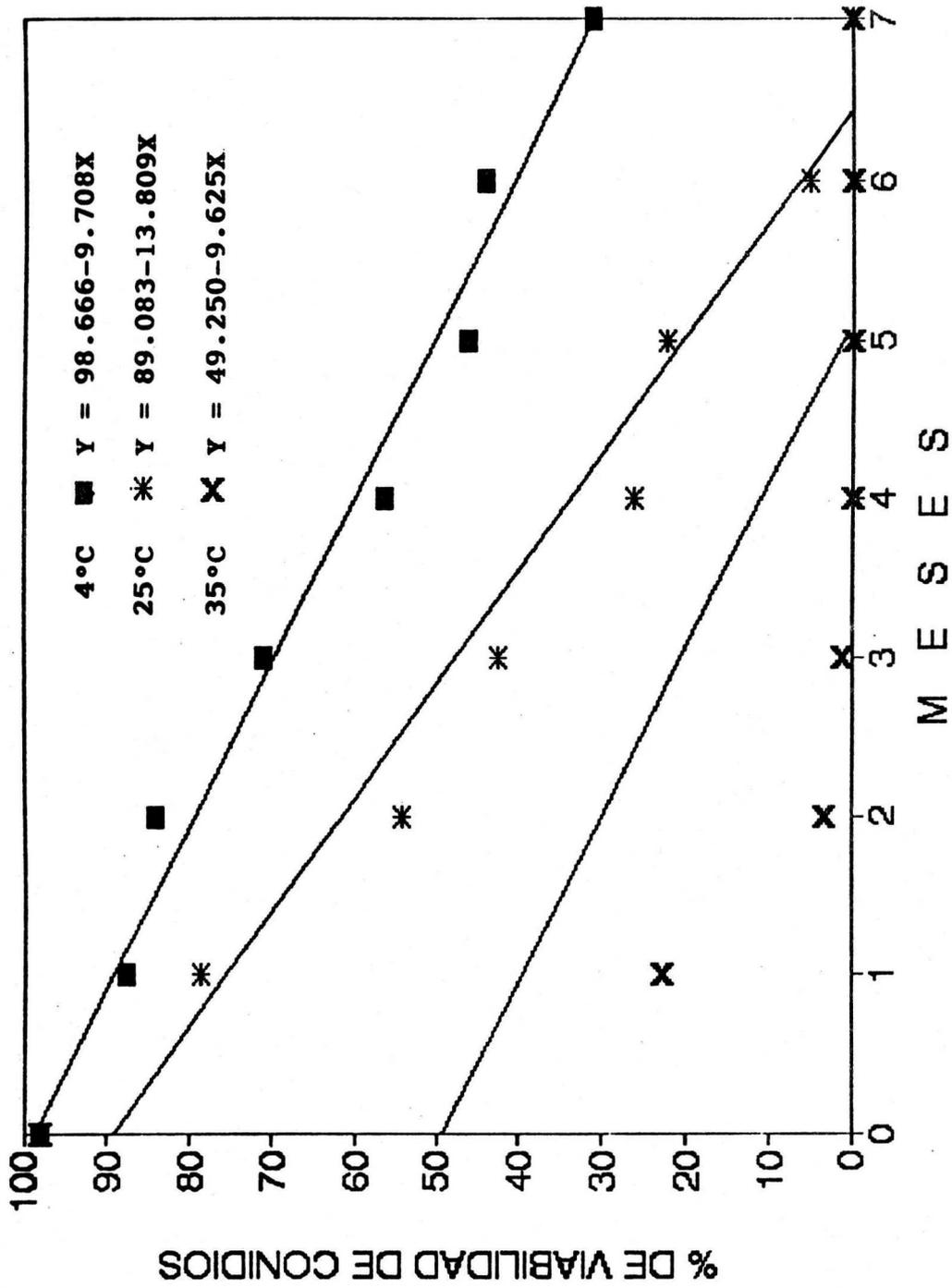


Figura 19. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb15), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

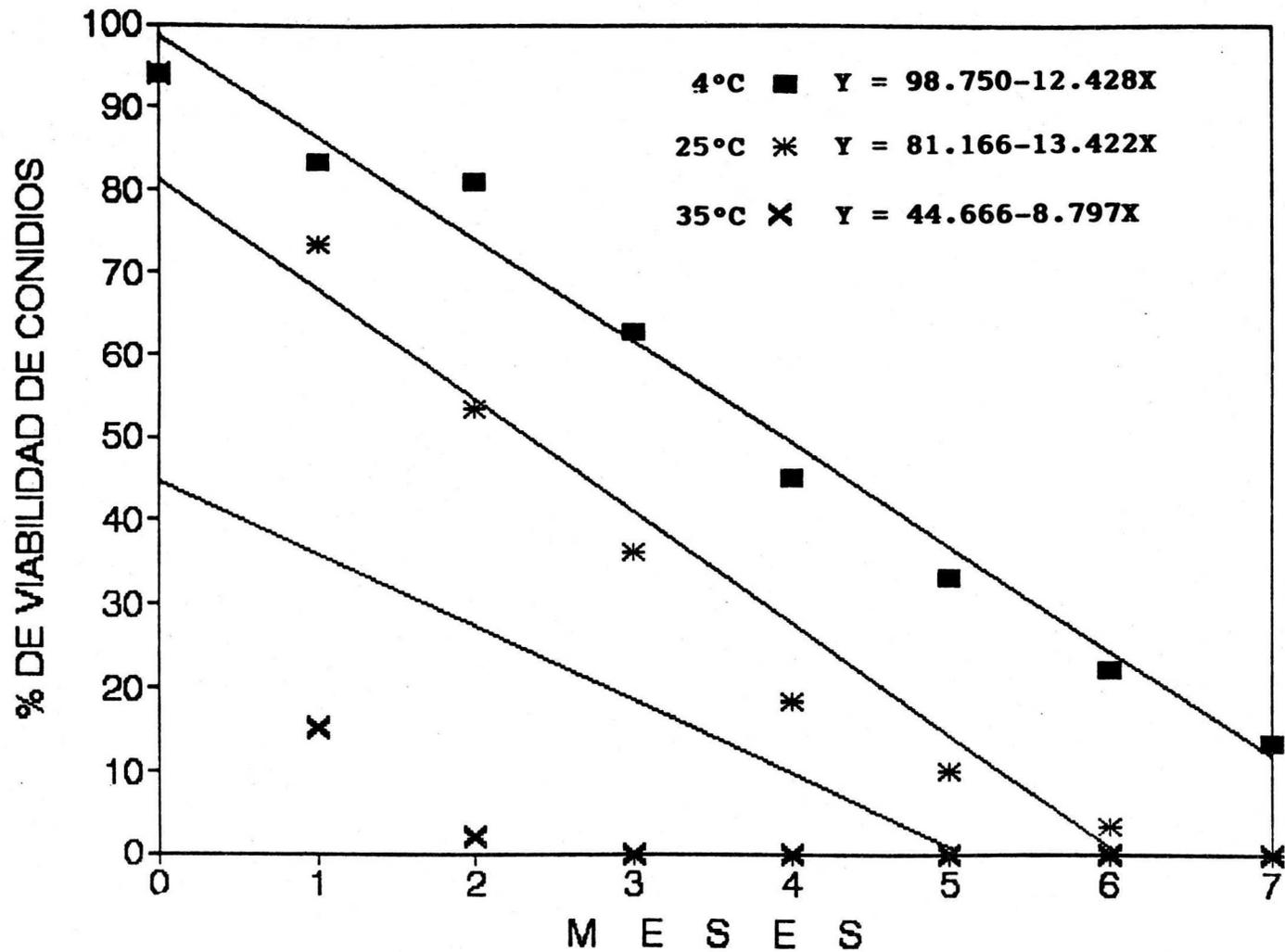


Figura 20. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb16), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

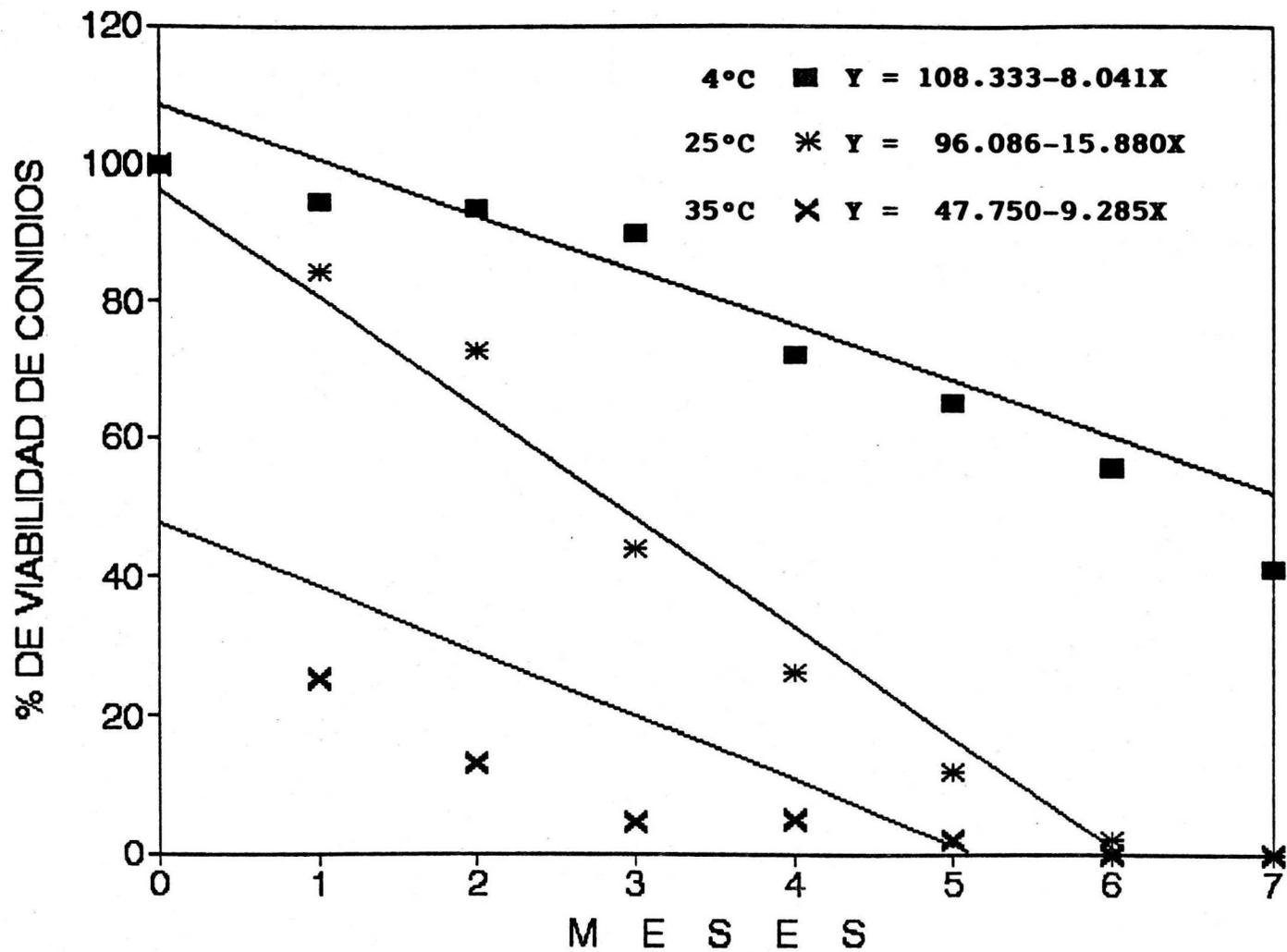


Figura 21. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb17), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

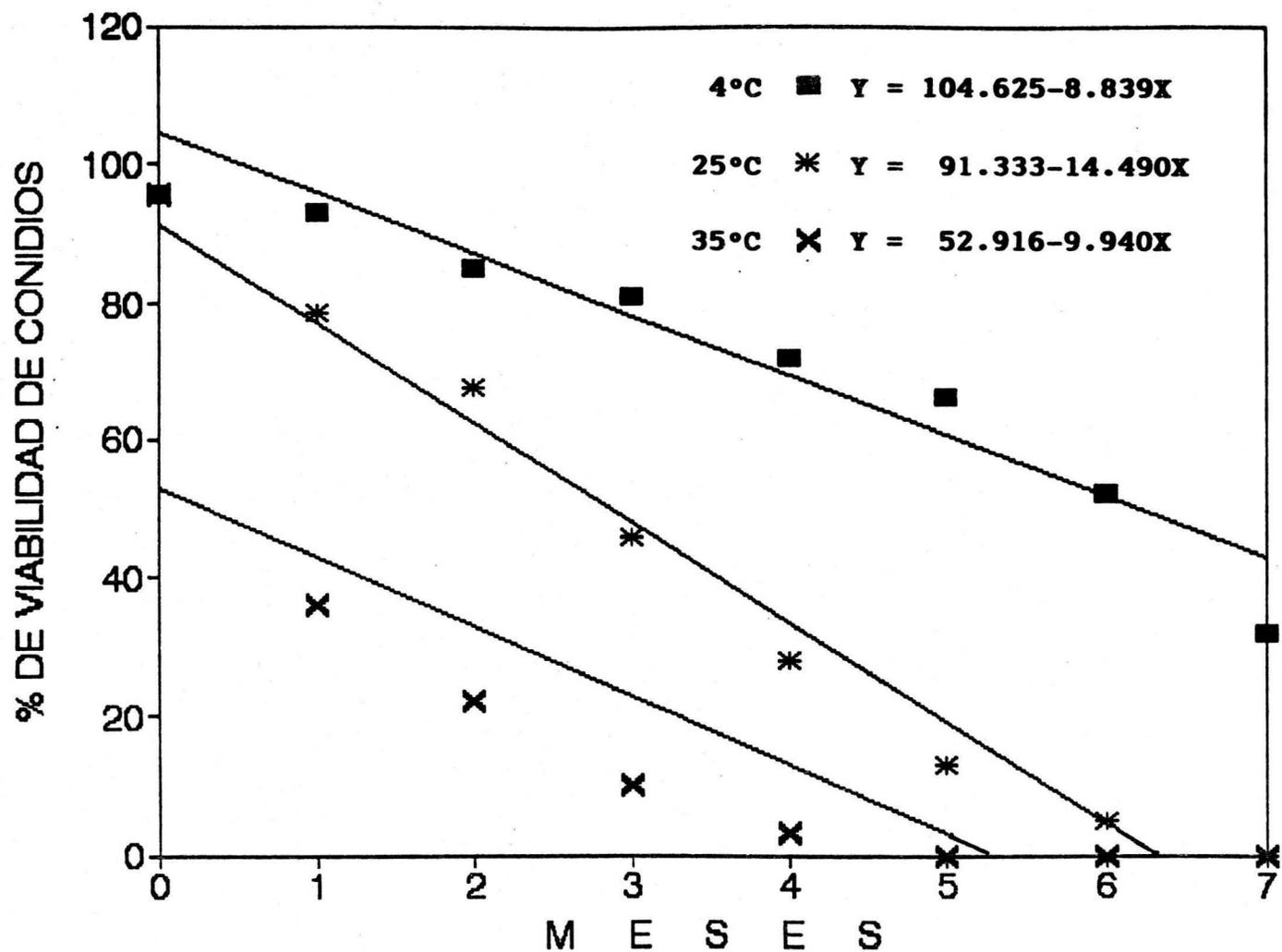


Figura 22. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb18), preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

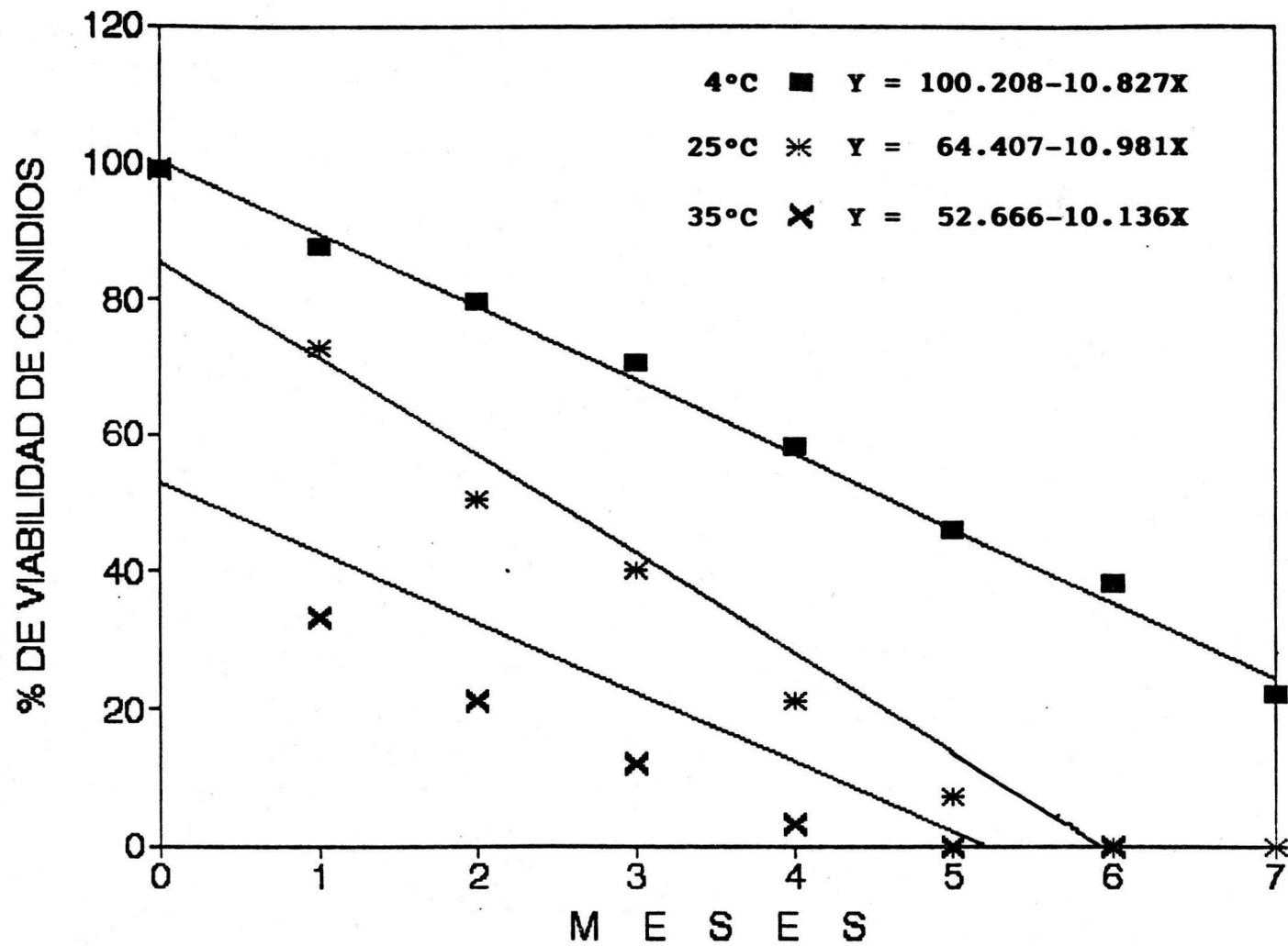


Figura 23. Viabilidad de conidios de Beauveria bassiana cepa (Bb19); preservados en sílica gel a diferentes temperaturas en función del tiempo. C.I.E.S. 1992.

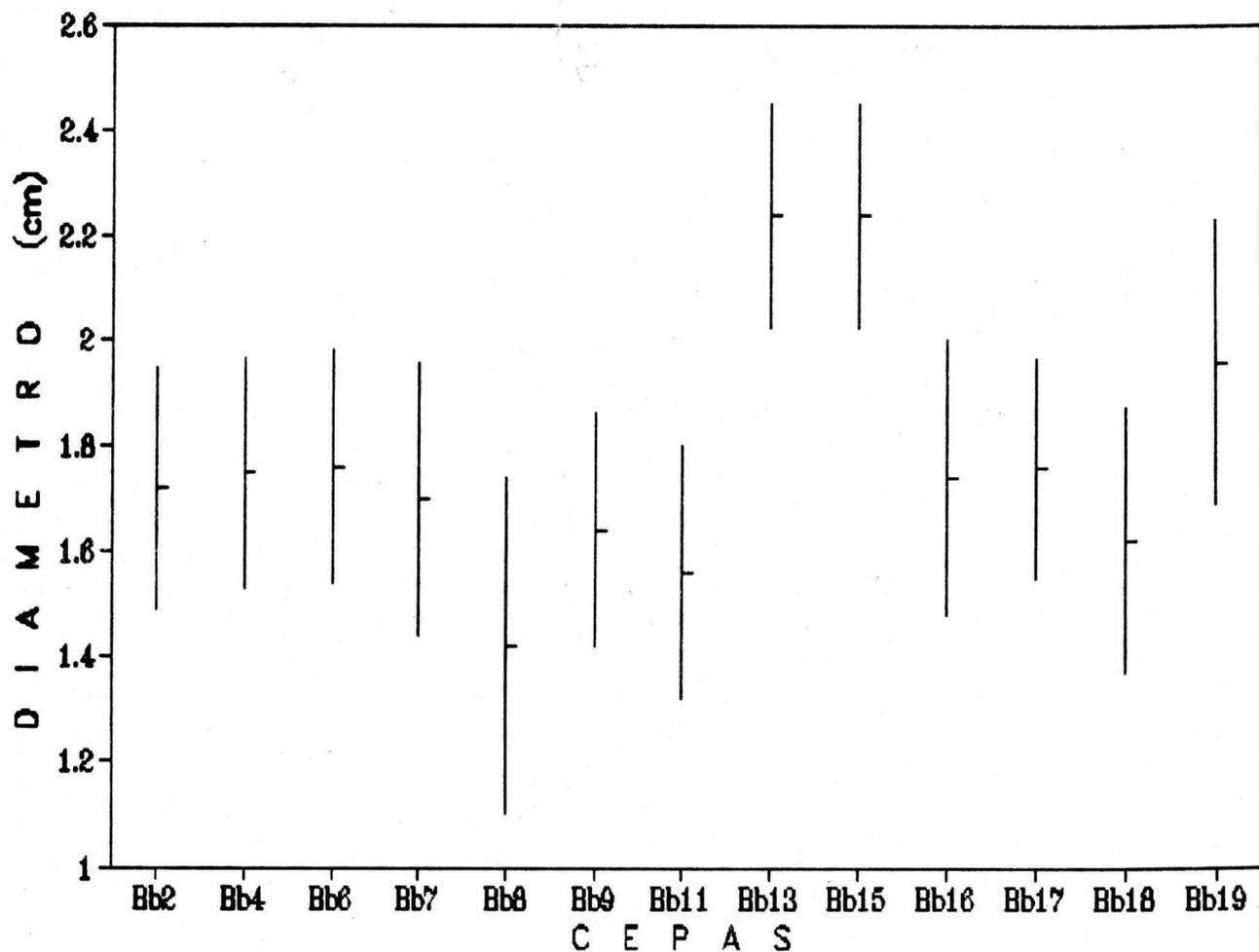


Figura 24. Interacción de la temperatura ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo colonial de 13 cepas del hongo *Beauveria bassiana* a partir de un cristal de sílica gel. 1992.

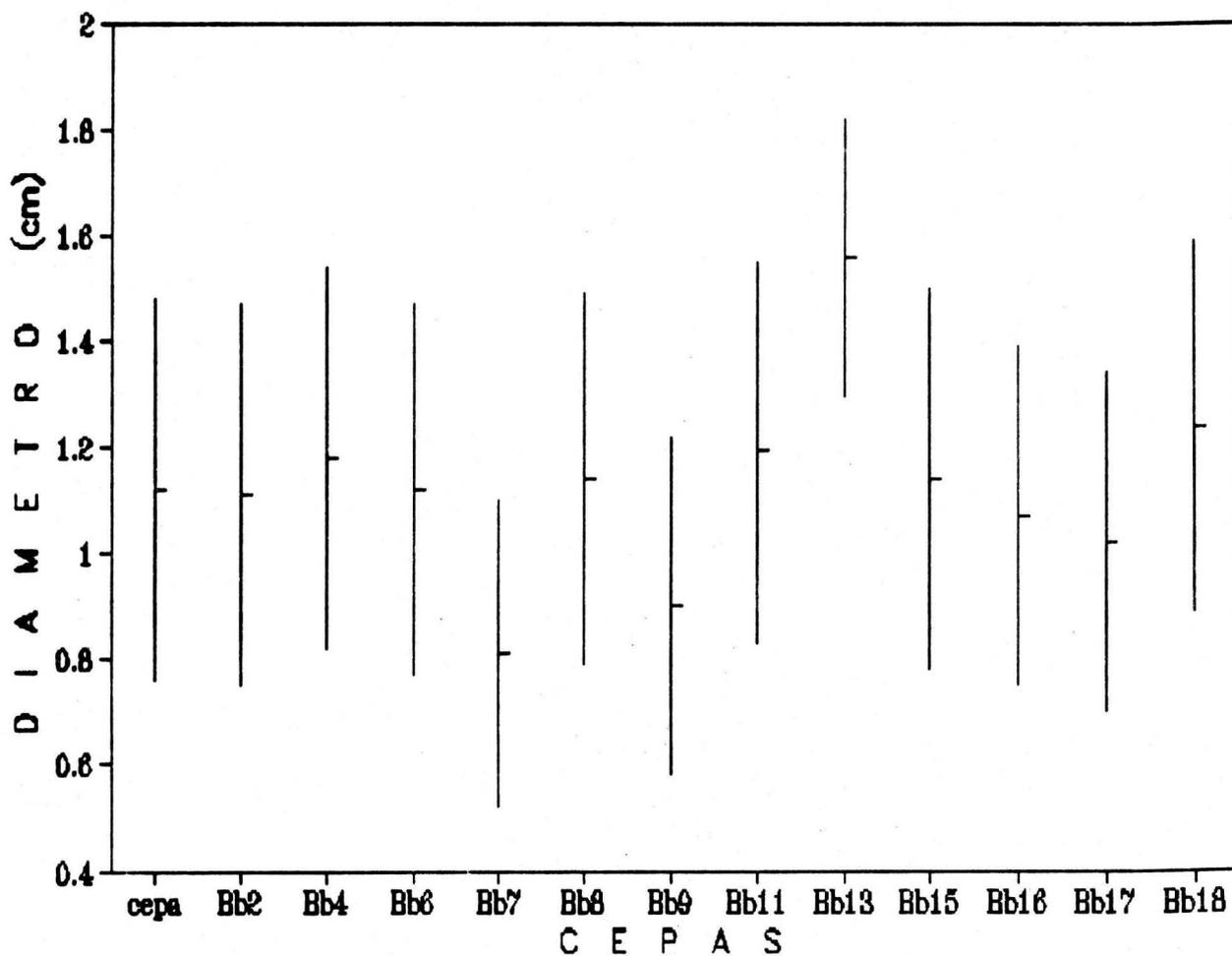


Figura 25. Interacción de la temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo colonial - de 13 cepas del hongo Beauveria bassiana partir de un cristal de sílica gel. 1992.

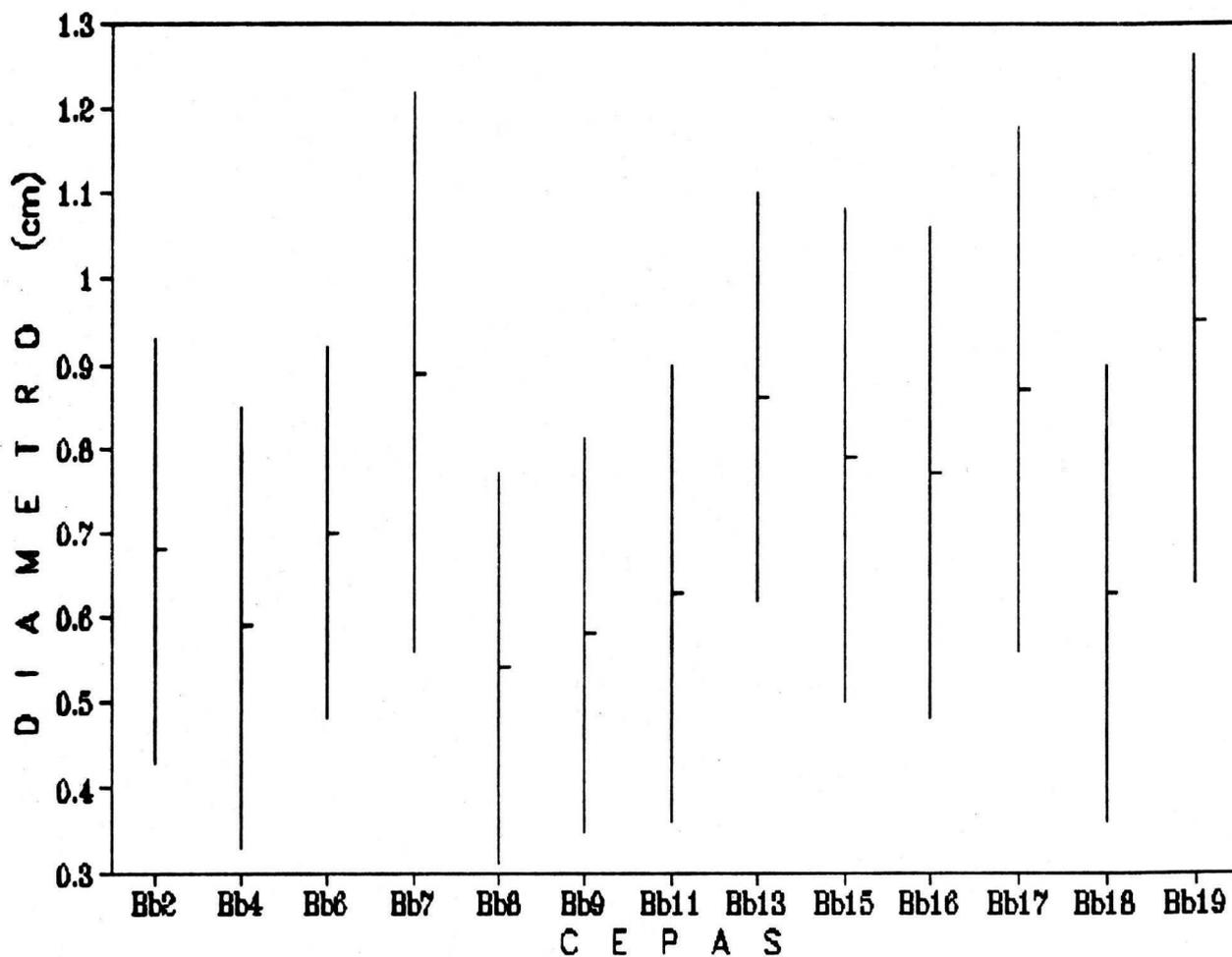


Figura 26. Interacción de la temperatura ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo colonial de 13 cepas del hongo Beauveria bassiana a partir de un cristal de sílica gel. 1992.

**Cuadro 7. Porcentaje de germinación de los conidios de 13 cepas de Beauveria bassiana, preservados durante siete meses en sílica gel a tres diferentes temperaturas.**

Cepa	T e m p e r a t u r a		
	4 $\pm$ 1°C	25 $\pm$ 1°C	35 $\pm$ 1°C
Bb2	70.93 a	41.44 a	15.50 a
Bb4	57.38 a	38,94 a	16.63 a
Bb6	64.13 a	37.00 a	15.25 a
Bb7	65.38 a	36.25 a	16.00 a
Bb8	58.63 a	38.88 a	14.38 a
Bb9	66.56 a	39.56 a	15.00 a
Bb11	59.89 a	39.38 a	16.19 a
Bb13	64.44 a	35.75 a	15.75 a
Bb15	64.69 a	40.75 a	15.56 a
Bb16	55.25 a	34.19 a	13.88 a
Bb17	80.19 a	40.50 a	15.25 a
Bb18	73.69 a	40.69 a	17.94 a
Bb19	62.31 a	35.25 a	17.19 a

Los datos con la misma letra no expresan diferencia estadística al 0.05% según la prueba de Tukey.

**Cuadro 8 . Promedio del desarrollo colonial de 13 cepas del hongo Beauveria bassiana, preservados durante siete meses en sílica gel a tres diferentes temperaturas.**

Cepa	T e m p e r a t u r a		
	4 $\pm$ 1°C	25 $\pm$ 1°C	35 $\pm$ 1°C
Bb15	2.46 a	0.99 a	0.79 a
Bb13	2.37 a	1.19 a	0.86 a
Bb19	1.96 a	1.24 a	0.95 a
Bb4	1.77 a	1.11 a	0.59 a
Bb6	1.76 a	1.18 a	0.70 a
Bb17	1.76 a	1.07 a	0.87 a
Bb16	1.74 a	1.14 a	0.77 a
Bb2	1.72 a	1.12 a	0.68 a
Bb7	1.70 a	1.20 a	0.89 a
Bb9	1.64 a b	1.14 a	0.57 a
Bb18	1.62 b	1.02 a	0.63 a
Bb11	1.58 b	0.90 a	0.63 a
Bb8	1.42 b	0.81 a	0.54 a

Promedio con la misma letra no expresan diferencia estadística al 0.05% según la prueba de Tukey.

## 6. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, donde se probaron en condiciones de laboratorio 18 cepas del hongo Beauveria bassiana sobre la broca del café Hypothenemus hampei y su parasitoide Cephalonomia stephanoderis, y la preservación de los conidios en sílica gel a diferentes temperaturas, se establecen las siguientes conclusiones.

1. De las 18 cepas del hongo B. bassiana experimentadas sobre H. hampei y C. stephanoderis, nueve de ellas resultaron ser más agresivas a ambos insectos.
2. Las cepas más agresivas a CL<sub>50</sub> en bioensayos de patogenicidad fueron Bb4 (0.003), Bb25 (0.004) y Bb26 (0.006), mismas que equivalen a 2.2X10E6, 4.1X10E6 y 5.9X10E6 conidios/ml de solución, presentando un elevado potencial para ser utilizado dentro de un programa de control integrado de H. hampei.
3. Las cepas más agresivas a CL<sub>50</sub> frente al parasitoide C. stephanoderis en bioensayos de patogenicidad fueron Bb4 (0.007), Bb26 (0.022) y Bb17 (0.021), mismas que equivalen a 5.25X10E6, 21.93X10E6 y 29.29X10E6 conidios/ml de solución.
4. El micelio del hongo emerge de los costados y partes intersegmentales del cuerpo de la broca del café, dejando libre las partes quitinizadas como es la cabeza y parte superior del pronoto.
5. En el parasitoide el micelio emerge de todas las partes del cuerpo, llegando a cubrir parcialmente la cabeza, tórax y abdomen.

6. El método de preservación en sílica gel resultó adecuado para preservar las cepas de Beauveria bassiana hasta siete meses; la mayor viabilidad ocurrió a 4 °C. Sin embargo en las tres temperaturas estudiadas, el porcentaje de germinación y el desarrollo micelial declinó a medida que pasó el tiempo, lo cual fue más marcado cuando se almacenó a 35 °C, condición en donde la viabilidad fue de dos a cuatro meses.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abbot, W. S. 1925. A methods for computing the effectiveness of insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- ANACAFE. 1981. La broca del fruto del café Hypothenemus hampei F. Subgerencia Técnica. Folleto Técnico s/n. Guatemala, C. A. 11 pp.
- Anónimo. 1987. Campo Experimental Costa de Chiapas, marco de referencia al cultivo de café. S.A.R.H. I.N.I.F.A.P.
- Alcocer, G. L. 1979. Incidencia del hongo Beauveria bassiana en México y su reproducción en laboratorio para el control microbiológico inducido. VII Reunión Nacional del Control Biológico. Veracruz, DGSV-SARH. p. 107-110.
- Alonzo, F. 1985. Avances de un programa integrado de investigación contra la broca del café (Hypothenemus hampei: Ferrari, 1836-1867). En: Memoria del III Congreso de Manejo Integrado de Plagas. PROMECAFE. Guatemala, C. A. p. 263-284.
- Aregger, E. 1992. Conidia production of the fungus Beauveria brogniartii on Barley and quality evaluation during storage at 2 °C. J. Invertebr. Pathol. 59: 2-1.
- Baker P. S. 1985. Biología e historia natural de la broca del café. En: Memorias del Curso sobre Manejo Integrado de Plagas del cafeto con énfasis en broca del fruto (hypothenemus hampei Ferr.). IICA-PROMECAFE-ANACAFE. Guatemala, C. A. p. 105-143.
- Baker, P.S.. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in

Southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). Folia Entomológica Mex. 61: 9-24.

- Baker, P. S., J. F. Barrera y J. E. Valenzuela. 1989. The distribution of the coffee berry borer (Hypothenemus hampei) in Southern Mexico: a survey for a biocontrol project. Tropical Pest Management. 35(2): 163-168.
- Baker, P.S., Barrera, J.F. y A. Rivas. Life history studies of the coffee berry borer (Hypothenemus hampei Ferr. Coleoptera: Scolytidae) on coffee tree in Southern Mexico. J. Applied Entomol. (En prensa).
- Barnett, H.L. y Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfecti fungi. Third edition. Burgess Publishing Company.
- Barrera, J.F. y Baker, P.S. 1984. Desarrollo postembrionario de la broca del grano del café Hypothenemus hampei (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) bajo condiciones de sol y sombra en el Soconusco, Chiapas, México. En: Memorias del II Congreso Nacional de Manejo Integrado de Plagas. Guatemala C.A. 314-323 p.
- Barrera, J. F., P. Baker, A. Schwarz y J. E. Valenzuela. 1988. Control biológico de la broca del café mediante parasitoides: Problemas y perspectivas. En: Memorias del X Simposio sobre Cafecultura Latinoamericana. PROMECAFAFE. Tapachula, Chiapas, México. p. 187-199.
- Barrera, J.F., Infante, F., Gómez, J., Castillo, A. y De la Rosa, W. 1989. Biologie de Cephalonomia stephanoderis Betrem (Hymenoptera: Bethyridae) en laboratoire. I. Cicle biologique, capacité d'oviposition et emergence du fruit du caféier. Café Cacao The. 33(2): 101-108.
- Barrera, J.F., Infante, F., Gómez, J. Castillo, A. y De la Rosa, W. Biología de Cephalonomia stephanoderis Betrem (Hymenoptera: Bethyridae) en laboratorio. II. Período de desarrollo de hembras y machos, relación de sexos,

sobrevivencia y longevidad de adultos. *Café Cacao The*.  
(En prensa).

Barrera, J. F., Gómez, J., Infante, F., Castillo, A. y De la Rosa, W. 1990a. Control biológico de la broca del café con parasitoides. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. Proyecto "Broca del Café". IICA-PROMECAFE. Folleto técnico No. 1. Tríptico.

Barrera, J. F., D. Moore, J. Abraham, S. T. Murphy y C. Prior. 1990b. Biological Control of the coffee berry borer Hypothenemus hampei, in Mexico and possibilities for further action. Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases. p. 391-396.

Barrera, J. F., F. Infante, J. Gómez, A. Castillo y W. de la Rosa. 1990c. Proyecto "Control biológico de la broca del" cafeto". Informe Técnico. Primera parte del informe final. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. Programa Control Integrado de Plagas. Tapachula, Chiapas, México.

Barrera, J.F., E. Carrillo, R., Muñoz, y M., Vega. 1990. Proyecto Mesoamericano de control biológico de la broca del café con parasitoides. En: Resumen del IV Taller Regional sobre la Broca del Fruto del Cafeto. PROMECAFE-IICA-ISIC. El Salvador, Sn. Salvador.

Bautista, M. N. 1982. Biología y respuesta a dietas semiartificiales de la broca del café Hypothenemus hampei (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Universidad Autónoma Chapingo.

Benham, R. W. y Miranda, J. L. 1953. The genus Beauveria, morphological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from warf-piling borers. *Mycologia*. 45: 727-746.

Bell, J. V. y Hamalle, R. J. 1974. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged

- storage on silica gel at -20 °C. *Canad. J. Microbiol.* 20(5): 639-642.
- Bell, J. W. 1975. Viability of entomopathogenic fungi stored outside. *J. Ga. Entomol. Soc.* 10(4): 357-358.
- Betrem, J. G. 1961. Cephalonomia stephanoderis Nov. spec. (Hymenoptera: Bethyridae). *Entomologische Berichten del 21. IX.* p. 183.
- Bergamin, J. 1943. Contribuicao para o conhecimento de biología da broca do café "Hypothenemus hampei" (Ferrari, 1867) (Col.: Ipidae). *Archivos do Instituto Biologico.* 14: 31-72.
- Bridge, P. D., Y .J., Abraham, M.C., Carnish, Prior, C. y Moore, D. 1990. The chemotaxonomy of Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolaten from the coffee berry borer. Hypothenemus hampei (Coleoptera: Scolytidae). *Mycopathology.* 111: 85-90.
- Brown, K. C., J. H. Lawton y S. W. Shires. 1983. Effects of insecticides on invertebrate predators and their cereal aphid (Hemiptera: Aphididae) Prey: laboratory experiments. *Environ. Entomol.* 12(6): 1747-1750.
- Brun, L. O. y J. L. Ruíz. 1987. Detection of endosulfan resistance in coffee berry borer Hypothenemus hampei (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. *International Conference on Pesticides in Tropical Agriculture.* Kuala Lumpur, Malaysia. 3pp.
- Brun, L. O., C. Marcillaud, V. Gaudichon y M. Suckling. 1989. Ensosulfan resistance in Hypothenemus hampei (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. *J. Econ. Entomol.* 82(5): 1311-1316.
- Bustillo, A. E. 1991. Perspectivas de un manejo integrado de la broca del café Hypothenemus hampei, en Colombia "Seminario sobre la broca del café". *Miscelánea de la Sociedad Colombiana de Entomología.* 18: 106-118.

- C. A. B. International Institute of Entomology. 1989. Distribution Maps of Pests. Series A (Agricultural), Map. No. 170. Hypothenemus hampei (Ferrari). London. 3 pp.
- Carneiro, F. 1984. Controle microbiológico da broca do café Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867) com fungo Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. en: Maya, M. L. A., Moncada, B. M. del P. (Comp.) 1987. La broca de la cereza del café (Hypothenemus hampei Ferrari, 1867); Resúmenes analíticos. CENICAFE, Chinchiná Caldas, Colombia. p. 167.
- Cernas, L. J. 1983. Panorama fitosanitario de la cafecultura Nacional. En: Memorias del X Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. p. 139-143.
- Choy, M. J. G. 1992. Susceptibilidad de la broca del café Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) a siete insecticidas de diferentes grupos toxicológicos. UN. A. CH. Tesis de licenciatura. 96 pp.
- Clausen, C. P. 1978. Introduced parasites and predators of arthropods pests and weeds: A world review. Agriculture Handbook, No. 480. ARS-USDA. Washington A. C. p. 292-294.
- Clerk, G. C. y M. F., Madelin. 1965. The longevity of conidia of three insect parasitizing hyphomycetes. Trans. Brit. Mycol. Soc. 48, 193-209.
- Corbett, G. H. 1933. Some preliminary observations on the coffee berry borer Hypothenemus hampei Ferr. Malay. Agric. J. Kuala Lumpur. 21: 8-22.
- Coronado, P. R. Y D. A. Marquez, 1985. Introducción a la Entomología y Taxonomía de los Insectos. Edit. Limusa, S. A., México. 282 pp.

- Daoust, R. A. y D. W., Roberts. 1983. Studies on the prolonged storage of Metarhizium anisopliae conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 143-150.
- Decazy, B. 1985. Métodos de control químico y cultural de la broca del fruto del cafeto. *En: Memorias del Curso sobre Manejo Integrado de plagas del cafeto con énfasis en broca del fruto (Hypothenemus hampei Ferr.)*. PROMECAFE-ANACAFE-IICA-ROCAP. Guatemala, C. A. p. 147-158.
- Decazy, B. 1988. Manejo Integrado de la Broca del Cafeto Hypothenemus hampei. XI Simposio de Cafecultura Latinoamericana. San Salvador C. A. ISIC-PROMECAFE (En prensa).
- Decazy, B. y M. T. Castro. 1990. El manejo integrado de la broca del fruto del cafeto Hypothenemus hampei Ferr. Manual Técnico. IICA, PROMECAFE, AID, ROCAP. 21 pp.
- De Greaff, J. 1986. The economics of coffee. *Economies of crops in developing countries*, No. 1 *Produc.* Wageningen, The Neatherlands. 294 pp.
- Evans, H. E. 1964. A synopsis of the american Bethylidae (Hymenoptera: Acuelata). *Bull. Mus. Comp. Zool.* 132(1): 222 pp.
- Evans, H. E. 1978. The Bethylidae of American North of Mexico. *Memoirs of the Amer. Entomol. Inst.* Number 27. 332 pp. EE. UU.
- Fargues, J.; P. H. Robert; y O. Reinsinger. 1979. Formulation des productions de masse de l'hyphomycete entomopathogene Beauveria en vue applications phytosanitaires. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 11(2): 247-257.

- Ferron, P. 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by Beauveria bassiana (Fungi Imperfecti, Monilales) in imagines of Acanthoscelides obtectus (Col: Bruchidae). *Entomophaga*. 22(4): 393-396.
- Finney, D. J. 1978. *Probit Analysis*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 2-4.
- Gardner, W. A., M. Sulto y R., Noblet. 1977. Persistence of Beauveria bassiana, Nomurea rileyi and Nosema nacatrix on soybean foliage. *Environ. Entomol.* 6(5): 616-618.
- Goettel, M. S. 1987. Conidial viability of the mosquito pathogenic hyphomycete Tolyocladium cylindrosporium, following prolonged storage at -20 °C. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 327-329.
- Gómez, R. J., Barrera, J. F., Infante, F., Castillo, A. y De la Rosa, W. 1992. Reproducción de Cephalonomia stephanoderis sobre broca del café Hypothenemus hampei criada en dieta artificial. XV Congreso Nacional de Control Biológico. Cuautitlán, Izcalli, México. p. 204-211.
- Hagen, K. S. 1968. Nutrición de insectos entomófagos y sus huéspedes. *En*: Paul DeBach (Editor). *Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. Cia. Editorial Continental, S. A. de C. V. (México). p. 411-436.
- Hall, I. M. 1954. Studies of microorganisms pathogenic to the sod webworm. *Hilgardia*. 22: 535-565.
- Hall, I. M. y J. V., Bell. 1961. Further studies on the effect of temperature on the growth of some entomophthoraceous fungi. *J. Insect. Pathol.* 3: 289-296.

- Hargreaves, H. 1926. Notes of the coffee berry borer Stephanoderes hampei Ferr. in Uganda. Bull. Ent. Res. 16: 347-354.
- Hargreaves, H. 1935. Stephanoderes hampei Ferr., Coffee berry borer, in Uganda. The East African Agricultural. J. 1: 218-224.
- Hawkins, B.A. y G., Gordn. 1986. Bibliography of the world literature of the Bethylidae (Hymenoptera: Bethyloidea). Insecta mundi. 1(4): 261-283.
- Hernández, P. M. y L. A., Sánchez. 1972. La broca del café. ANACAFE, subgerencia de asuntos agrícolas. Boletín No. 11. Guatemala, C. A.
- Infante, F., Barrera, J. F., Gómez, J., Castillo, A. y De la Rosa, W. 1989. Biología de Cephalonomia stephanoderis Betrem (Hymenoptera: Bethylidae) en laboratorio III. Estimación de parámetros poblacionales. Café Cacao The (En prensa).
- Infante, F. D. I. Penagos, J. Valdéz y J. F. Barrera. 1991. Morfología externa del parasitoide Cephalonomia stephanoderis (Hymenoptera: Bethylidae). En: Resumen del XXIV Congreso Nacional de Entomología. Veracruz, Ver. p. 522-523.
- INMECAFE. 1987. Broca del grano del café. Campo experimental Garnica, Veracruz, Ver., Méx.
- Ingram, W. R. 1985. An evaluation of several insecticides against berry borer and fruit fly in Uganda robusta coffee. East African Agricultural and Forestry Journal. 30(3): 259-253.
- Jepson, F. P. 1936. Report. Entomology. Division Administration. Rep. Dir. Agric. Geylon. p. 447-467.
- Klein-Koch, C. O., O., Espinoza, A., Tandazo, P., Cisneros y D. Delgado. 1988. Factores naturales de regulación y control biológico de la broca del café (Hypothenemus

hampei Ferr.). Sanidad Vegetal. (Ecuador). 3: 5-30.

Koch, V. J. M. 1973. Abundance de Hypothenemus hampei, Ferr. scolytedes grains de café, en fonction de sa plante-hôte et de son parasite Cephalonomia stephanoderis Betrem, en Cote D'Ivoire d'Ivoire. Tesis de doctorado Institute National Agronomique. Wageningen, Holand. 73-16: 1-85.

Koch, C. K. 1986. La broca del café (Hypothenemus hampei). Ministro de Agricultura y Ganadería (Dpto. de Sanidad Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Programa Nacional del Café), en Cooperación con Deutsche Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit. Tumbaco, Ecuador. p. 36-37.

Kral, J. y S. Neubauer. 1956. Ponziti entomophytlich hubrodu Beauveria protimandelince bramborové II. Zool. Listy 5: 178-186.

Lagunes, T. A. 1991. Notas del Curso de Toxicología y Manejo de Insecticidas (Documento de Trabajo). Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Montecillo-Chapingo, México. 228 pp.

LaSalle, J. 1990. A new genus and species of tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae) parasitic on the coffee berry borer Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Bulletin of Entomological Research (Londres). 80: 7-10.

Leefmans, S. 1923. De Koffiebessenboeboek. I levenswijze en oecologie. Meded. Inst. Plziekt. p. 57-94.

LePelley, R. H. 1968. Pests of coffee. Buttler & Tanner. LTD. London. 590 pp.

LePelley, R. H. 1973. Las plagas del café. Edit. Labor, S. A. Barcelona, España. p. 140-170.

- Leroy, J. V. 1936. Observations relatives a quelques insectes attaquant le cafeier. Publs. Inst. Atude Natn. Agron. Congo, Belge. Ser. Sci. 8:30.
- Madelin, M. F. 1963. Disease caused by hyphomycetous fungi. In: Insects Pathology and Advance Treatise. Volumen 2. Edited by Eduard Steinhaus. Academic Press. p. 223-264.
- Masera, E. 1957. Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) sorokin, a parasite of the silkworm. (Abstr.) Rev. Appl. Mycol. 36, 527.
- Méndez, L. I. 1990. Control Microbiológico de la broca del fruto del cafeto Hypothenemus hampei Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), con el hongo Beauveria bassiana (Blas.) Vuill. (Deuteromycetes) en el Soconusco, Chiapas, México. Tesis sin publicar. 135 pp.
- Molinari, P.A. 1988. Situación de la broca del café Hypothenemus hampei Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) en Santo Domingo de los Colorados. Rev. Sanidad Vegetal, Ecuador. 3(3): 54-57.
- Moore, G. E. 1973. Pathogenicity of three entomogenous fungi to the southern pine beetle at various temperature and humidities. Environ. Entomol. 2(1): 54-57.
- Moore, D. 1989. Integrated management of the coffee berry borer Hypothenemus hampei. In: Integrated pest management in tropical and subtropical cropping systems summaries. Babdurkheim Fed. Rep. of Germany. p. 31.
- Monterroso, J. L. 1981. Evaluación del daño causado por la broca del fruto del café Hypothenemus hampei Ferr. 1867, en función de diferentes porcentajes de infestación. Revista Cafetalera. ANACAFE. 6(206): 21-24.

- Monterroso, J. L. 1984. Incidencia de Beauveria bassiana sobre la broca del café y su reproducción en coco en Guatemala. Revista Cafetalera. ANACAFE. 6(210): 10-12.
- Muñoz, H. R. 1988. Ciclo biológico y reproducción partenogenética de la broca del fruto del cafeto (Hypothenemus hampei Ferr.). XI Simposio Latinoamericano de Cafecultura. El Salvador. (En prensa).
- Muñoz, H. R. 1989. Ciclo biológico y reproducción partenogenética de la broca del fruto del cafeto (Hypothenemus hampei Ferr.). Turrialba. 39(2): 415-421.
- Murphy, S. T. y D. Moore. 1990. Biological control of the coffee berry borer Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): Previous programmes and possibilities for the future. Biocontrol News Information. 11(2): 107-117.
- Müller-Kögler, E. 1960. Niedrige der sporen insektenpathogener pilzaeine mögliche fehlerquelle bei der Anwendung. Pflanzankrankh u pflanzenschutz. 67: 663-668.
- Ochoa, M. H. 1985. Las plagas del cafeto en Guatemala. En: Memorias del Curso sobre Manejo Integrado de Plagas con énfasis en broca del fruto (Hypothenemus hampei Ferr.). IICA-PROMECAFE. Guatemala. 274 pp.
- Ochoa, M. H., O., Campos, S. B., Vidal, y E. López. 1986. Cuantificar daños por ataque de la broca del café Hypothenemus hampei Ferr. en la conversión cereza pergamino de primera: En: Memoria del II Taller Internacional sobre la broca del grano del café (Hypothenemus hampei, Ferr.). IICA-PROMECAFE. Guatemala. p. 1-14.
- Ochoa, H. E., E. Carrillo y B. Decazy. 1990. Evaluación de cuatro insecticidas en el control de la broca del

- fruto del cafeto. En: Resúmenes del IV Taller Regional sobre la broca del fruto del cafeto. M. Castro, M. Vega y C. Galvez (Eds.). San Salvador, El Salvador, C. A. 9-12 de Octubre de 1990. PROMECAFE-IICA, ISI, AID. S/p.
- Pascalet, P. 1939. La lutte biologique contre Stephanoderis hampei ou scolyte du cafeir au Cameroun. Revne de botanique appliquee le dñAgriculture Tropicale. Bull. 219: 753-764.
- Pekrul, S. y E. A. Grula. 1979. Mode of infection of corn earworm Heliiothis zea by Beauveria bassiana as revealed by scanning electron microscopy. J. Invertebr. Pathol. 34: 238-247.
- Perdomo, A., y A. Miranda. 1983. Propuesta para la detección de la broca del café Hypothenemus hampei (Coleoptera: Scolytidae), en los países o áreas libres de la plaga. Simposio sobre Cafeticultura. Panamá. PROMECAFE-IICA- OEA.
- Penagos, T. D. I. 1992. Morfología externa del adulto y estados inmaduros del parasitoide Cephalonomia stephanoderis Betrem (Hymenoptera: Bethyilidae). Tesis Profesional Instituto de Ciencias y Artes de Chiapas. Escuela de Biología. Tuxtla, Gtz., Chiapas. p. 26-61 (No publicada).
- Penados, R. 1979. Apuntes sobre la broca del café y la lucha por combatirla. Campaña contra la broca del café. Revista Cafetalera (Guatemala). 181: 10-16.
- Prado, B. E. y C. J. Valdéz. 1990. Morfología de insectos. Colegio de Postgraduados. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. p. 21-27.
- Prasertphon, S. y T. Tanada. 1968. The formation and circulation in Galleria of hyphal bodies of entomophthoraceous fungi. J. Invertebr. Pathol. 11: 260-280.

- Quezada, J. R. 1985. Factibilidad del uso de enemigos naturales de la broca del café (Hypothenemus hampei), en el marco de manejo integrado. Actividades en Turrialba. CATIE. 13(4): 7.
- Quezada, J. R. y N. E., Urbina. 1987. La broca del fruto del cafeto Hypothenemus hampei, y su control. En: Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región Centroamericana. Ed. J. Pinochet. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 59 pp.
- Rangi, D. C., S. T., Murphy, F. L., Nangayo y D. Moore. 1989. Biological control of coffee berry borer in Mexico. Fourth and final report. CAB. International Institute of Biological Control. Kenya Station. 10 pp.
- Ramoska, W. A. 1984. The influence of relative humidity on Beauveria bassiana in infectivity and replication in the bug Blissus leucopterus. J. Invertebr. Pathol. 43: 389-394.
- Reid, J. C. 1983. Distribution of coffee berry borer (Hypothenemus hampei) with in Jamaica, following its discovery in 1978. Tropical Pest Management. 29: 224-230.
- Regouin, J. M. E. 1988. Some aspects of the biological control of the coffee berry borer Hypothenemus hampei Ferr. 1867. p. 7.
- Roberts, D. W. 1989. World picture of biological control of insects by fungi: Men. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 84(3): 89-100.
- Sanger, A. M. 1958. Efecto del andrin, el dieldrin y el endrin sobre insectos parásitos y depredadores. Resurgimientos de plagas. Shell Petroleum Company limited. Boletín Técnico s/n. Shell de México, S. A. 12 pp.

- Sanson, R. A. y H. C. Evans. 1982. Two news Beauveria spp. from South American. J. Invertebr. Pathol. 39: 93-97.
- SARH. 1992. Campaña contra la broca del cafeto. DGSV-INMECAFE. México. 49 pp.
- Schaerffenberg, B. 1957. Infections-und entwicklungsverlaufdes insektentötenden pilzen Beauveria bassiana (Vuill.) Link. Z. Angew Entomol. 41: 395-402.
- Schaerffenberg, B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by Beauveria and Metarhizium. J. Insect. Pathol. 6: 8-20.
- Steyaert, R. L. 1935. Un parasite naturel du Stephanoderes le Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.; estude des facteurs ambiants regissant sa puillation. Congo Belge. Institut National Pour L'etude Agronomique du Congo Belge. Publication serie.Scientifique. No. 2, 317-318.
- Steinhaus, E. A. 1960. The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. J. Insect. Pathol. 2, 225-229.
- Stehr, F. W. 1975. Parasitoids and predators in pest management. En: R. L. Metcalf y W. Luckmann (Eds.), Introduction to insect pest management. John Wiley & Sons. N. Y. p. 147-188.
- Ticheler, J. H. G. 1961. Estudio analítico de la epidemiología del escolítido de los granos del café Stephanoderes hampei Ferr., en Costa de Marfil. Meded. Lanbd. Hoogesch. Wageningen, Holanda. 61: 1-49.
- Ticheler, J. H. G. 1963. Estudio analítico de la epidemiología del escolítido de los granos del café Stephanoderes hampei Ferr. en Costa de Marfil. En: Maya, M. L. A., Moncada, B. M. del P. (Comp.) 1987. La

- broca de la cereza del cafeto (Hypothenemus hampei Ferrari 1867); resúmenes analíticos. CENICAFE. Chinchiná Caldas, Colombia. p. 74-75.
- Villacorta, A. y J. F., Barrera. Nova dieta merídica para criacao de Hypothenemus hampei(Ferrari, 1867) (En prensa).
- Vouk, V., y Z. Klas. 1932. On some factors affecting the culture of the insectivorous fungus Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sor. (Abstr.) Rev. Appl. Mycol. 2, 782.
- Walstad, J. D., R. F., Anderson y W. J., Stambaygh. 1970. Effect of evironmental conditions on two species of muscardine fungi (Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae). J. Invertebr. Pathol. 16(2): 221-226.
- Wells, J. D., W. W. Cone y M. M. Conant. 1988. Chemical and Biological control of Eritroneura lepthoppers on Vitis vinifera in Southcentral Washington. J. Entomol. Soc. Brit. Columbia. 85: 45-52.
- Wilson, F., y C. B., Huffaker. 1976. The philosophy scope and importance of biological control. P. 3-15. En: C. B. Huffaker y P. S. Messenger (Edis.), Theory and practice of biological control. Academic Press. N. Y.
- Wood, S. L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central American (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph Great Basin Naturalists Memoria. No 6. Brizham Young University Provo. UTAH. p. 875-911.
- Yendol, W. G. 1968. Factors affecting germination of Entomophthora conidia. J. Invertebr. Pathol. 10: 116-121.

A P E N D I C E.

Cuadro 9 . Porcentaje de mortalidad de Hypothenemus hampei inoculado con 18 cepas del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana al 1% de concentración.

Clave de la cepa	Concentración de conidios/ml. X 10E8	Brocas tratadas	Brocas muertas	Brocas vivas	Porcentaje de mortalidad.
Bb2 (México)	10.28	100	31	69	31
Bb4 (Ecuador)	7.55	100	96	4	96*
Bb6 (Ecuador)	10.86	100	61	39	61
Bb7 (México)	9.32	100	36	64	36
Bb8 (México)	9.09	100	98	2	98*
Bb9 (México)	8.21	100	88	12	88
Bb12 (México)	10.35	100	87	13	87
Bb13 (Rusia),	9.50	100	86	14	86
Bb14 (Brasil)	6.18	100	96	4	96*
Bb15 (Brasil)	7.38	100	81	19	81
Bb16 (Brasil)	12.70	100	98	2	98*
Bb17 (Brasil)	11.50	100	100	0	100*
Bb18 (México)	10.10	100	92	8	92*
Bb19 (México)	10.21	100	81	19	81
Bb22 (México)	9.42	100	90	10	90
Bb24 (México)	9.80	100	94	6	94*
Bb25 (México)	10.30	100	98	2	98*
Bb26 (México)	9.99	100	94	6	94*
TESTIGO	0.0	100	2	98	2

\* Maximos porcentajes de mortalidad.

CUADRO 10. Concentración de Conidios/ml en las diferentes diluciones de cinco cepas del hongo Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin evaluados en condiciones de laboratorio sobre la broca del café Hypothenemus hampei (Ferr.) y el parasitoide Cephalonomia stephanoderis Betrem. 1992.

CONCENTRACION DE CONIDIOS	Bb4	Bb8	Bb14	Bb16	Bb17
1.0	755 x 10 <sup>6</sup> *	909 x 10 <sup>6</sup>	618 x 10 <sup>6</sup>	127 x 10 <sup>7</sup>	115 x 10 <sup>7</sup>
0.8	604 x 10 <sup>6</sup>	727 x 10 <sup>6</sup>	494 x 10 <sup>6</sup>	102 x 10 <sup>7</sup>	92.7 x 10 <sup>7</sup>
0.6	453 x 10 <sup>6</sup>	545 x 10 <sup>6</sup>	370 x 10 <sup>6</sup>	76 x 10 <sup>7</sup>	69.5 x 10 <sup>7</sup>
0.3	226 x 10 <sup>6</sup>	272 x 10 <sup>6</sup>	185 x 10 <sup>6</sup>	38 x 10 <sup>7</sup>	34.7 x 10 <sup>7</sup>
0.1	75 x 10 <sup>6</sup>	90.9 x 10 <sup>6</sup>	61.8 x 10 <sup>6</sup>	12.7 x 10 <sup>7</sup>	11.5 x 10 <sup>7</sup>
0.08	60 x 10 <sup>6</sup>	72.7 x 10 <sup>6</sup>	49.4 x 10 <sup>6</sup>	10.2 x 10 <sup>7</sup>	9.2 x 10 <sup>7</sup>
0.06	45 x 10 <sup>6</sup>	54.5 x 10 <sup>6</sup>	37.0 x 10 <sup>6</sup>	7.6 x 10 <sup>7</sup>	6.9 x 10 <sup>7</sup>
0.03	22 x 10 <sup>6</sup>	27.2 x 10 <sup>6</sup>	18.5 x 10 <sup>6</sup>	3.8 x 10 <sup>7</sup>	3.4 x 10 <sup>7</sup>
0.01	7.5 x 10 <sup>6</sup>	9.0 x 10 <sup>6</sup>	6.1 x 10 <sup>6</sup>	12.7 x 10 <sup>6</sup>	11.5 x 10 <sup>6</sup>
0.008	6.0 x 10 <sup>6</sup>	7.2 x 10 <sup>6</sup>	4.9 x 10 <sup>6</sup>	10.2 x 10 <sup>6</sup>	9.2 x 10 <sup>6</sup>
0.006	4.5 x 10 <sup>6</sup>	5.4 x 10 <sup>6</sup>	3.7 x 10 <sup>6</sup>	7.6 x 10 <sup>6</sup>	6.9 x 10 <sup>6</sup>
0.003	2.2 x 10 <sup>6</sup>	2.7 x 10 <sup>6</sup>	1.8 x 10 <sup>6</sup>	3.8 x 10 <sup>6</sup>	3.4 x 10 <sup>6</sup>
0.001	7.5 x 10 <sup>5</sup>	9.0 x 10 <sup>5</sup>	6.1 x 10 <sup>5</sup>	12.7 x 10 <sup>5</sup>	11.5 x 10 <sup>5</sup>

\* Promedio obtenido de 10 conteos.

CUADRO 11. Concentración de Conidios/ml en las diferentes diluciones de cuatro cepas del hongo Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin evaluados en condiciones de laboratorio sobre la broca del café Hypothenemus hampei (Ferr.) y el parasitoide Cephalonomia stephanoderis Betrem. 1992.

CONCENTRACION DE CONIDIOS	Bb18	Bb24	Bb25	Bb26
1.0	101 x 10 <sup>7*</sup>	980 x 10 <sup>6</sup>	103 x 10 <sup>7</sup>	999 x 10 <sup>6</sup>
0.8	80 x 10 <sup>7</sup>	784 x 10 <sup>6</sup>	82 x 10 <sup>7</sup>	799 x 10 <sup>6</sup>
0.6	60 x 10 <sup>7</sup>	588 x 10 <sup>6</sup>	62 x 10 <sup>7</sup>	599 x 10 <sup>6</sup>
0.3	30 x 10 <sup>7</sup>	294 x 10 <sup>6</sup>	31 x 10 <sup>7</sup>	299 x 10 <sup>6</sup>
0.1	10 x 10 <sup>7</sup>	98.0 x 10 <sup>6</sup>	10.3 x 10 <sup>7</sup>	99.95 x 10 <sup>6</sup>
0.8	8.0 x 10 <sup>7</sup>	78.4 x 10 <sup>6</sup>	8.2 x 10 <sup>7</sup>	79.9 x 10 <sup>6</sup>
0.06	6.0 x 10 <sup>7</sup>	58.8 x 10 <sup>6</sup>	6.2 x 10 <sup>7</sup>	59.9 x 10 <sup>6</sup>
0.03	3.0 x 10 <sup>7</sup>	29.4 x 10 <sup>6</sup>	3.1 x 10 <sup>7</sup>	29.9 x 10 <sup>6</sup>
0.01	10 x 10 <sup>6</sup>	9.8 x 10 <sup>6</sup>	10.3 x 10 <sup>6</sup>	9.9 x 10 <sup>6</sup>
0.008	8.0 x 10 <sup>6</sup>	7.8 x 10 <sup>6</sup>	8.2 x 10 <sup>6</sup>	7.9 x 10 <sup>6</sup>
0.006	6.0 x 10 <sup>6</sup>	5.8 x 10 <sup>6</sup>	6.2 x 10 <sup>6</sup>	5.9 x 10 <sup>6</sup>
0.003	3.0 x 10 <sup>6</sup>	2.9 x 10 <sup>6</sup>	3.1 x 10 <sup>6</sup>	2.9 x 10 <sup>6</sup>
0.001	10.0 x 10 <sup>5</sup>	9.8 x 10 <sup>5</sup>	10.3 x 10 <sup>5</sup>	9.9 x 10 <sup>5</sup>

\* Promedio obtenido de 10 conteos.

Cuadro 12. Desarrollo en diámetro (cm) de 13 cepas del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana preservado en sílica gel bajo temperatura constante. 1992.

Cepa del hongo	Temp. (°C)	Diámetro de la colonia (cm)		Diferencia entre las medias.
		Media ( $\bar{x}$ )	Error standar ( $S\bar{x}$ )	
Bb2	4	1.72	0.23	
	25	1.12	0.36	0.60**
	35	0.68	0.25	0.44**
Bb4	4	1.75	0.22	
	25	1.11	0.36	0.64**
	35	0.59	0.26	0.52**
Bb6	4	1.76	0.22	
	25	1.18	0.36	0.58**
	35	0.70	0.22	0.48**
Bb7	4	1.70	0.26	
	25	1.12	0.35	0.58**
	35	0.89	0.33	0.23**
Bb8	4	1.42	0.32	
	25	0.81	0.29	0.61**
	35	0.54	0.23	0.27**
Bb9	4	1.64	0.22	
	25	1.14	0.35	0.50**
	35	0.58	0.23	0.56**
Bb11	4	1.56	0.24	
	25	0.90	0.32	0.66**
	35	0.63	0.27	0.27**

## Continuación Cuadro 12...

Cepa del hongo	Temp. (°C)	Diámetro de la colonia (cm)		Diferencia entre las medias
		Media ( $\bar{x}$ )	Error standar ( $S\bar{x}$ )	
	4	2.24	0.21	
Bb13	25	1.19	0.36	1.05**
	35	0.86	0.24	0.33**
	4	2.24	0.21	
Bb15	25	1.56	0.26	0.68**
	35	0.79	0.29	0.77**
	4	1.74	0.26	
Bb16	25	1.14	0.36	0.60**
	35	0.77	0.29	0.37**
	4	1.76	0.21	
Bb17	25	1.07	0.32	0.69**
	35	0.87	0.31	0.20**
	4	1.62	0.25	
Bb18	25	1.02	0.32	0.60**
	35	0.63	0.27	0.39**
	4	1.96	0.27	
Bb19	25	1.24	0.35	0.72**
	35	0.95	0.31	0.29**

\*\* Significancia estadística (P = 0.05).

Cuadro 13. Ingredientes que forman parte en la dieta meridica para la cría de la broca del café Hypothenemus hampei. 1992.

Ingredientes	Cantidad
Agua hervida	750 ml
Dextrosa	14 gr
Levadura de torula	20 gr
Caseina	20 gr
Semilla de café en polvo	100 gr
Sales Wesson	2 gr
Agar	27 gr
Nipagin	1 gr
Benzoato de sodio	0.6 gr
Formol al 40%	2 ml
Etanol absoluto	10 ml
Colesterol	0.6 gr

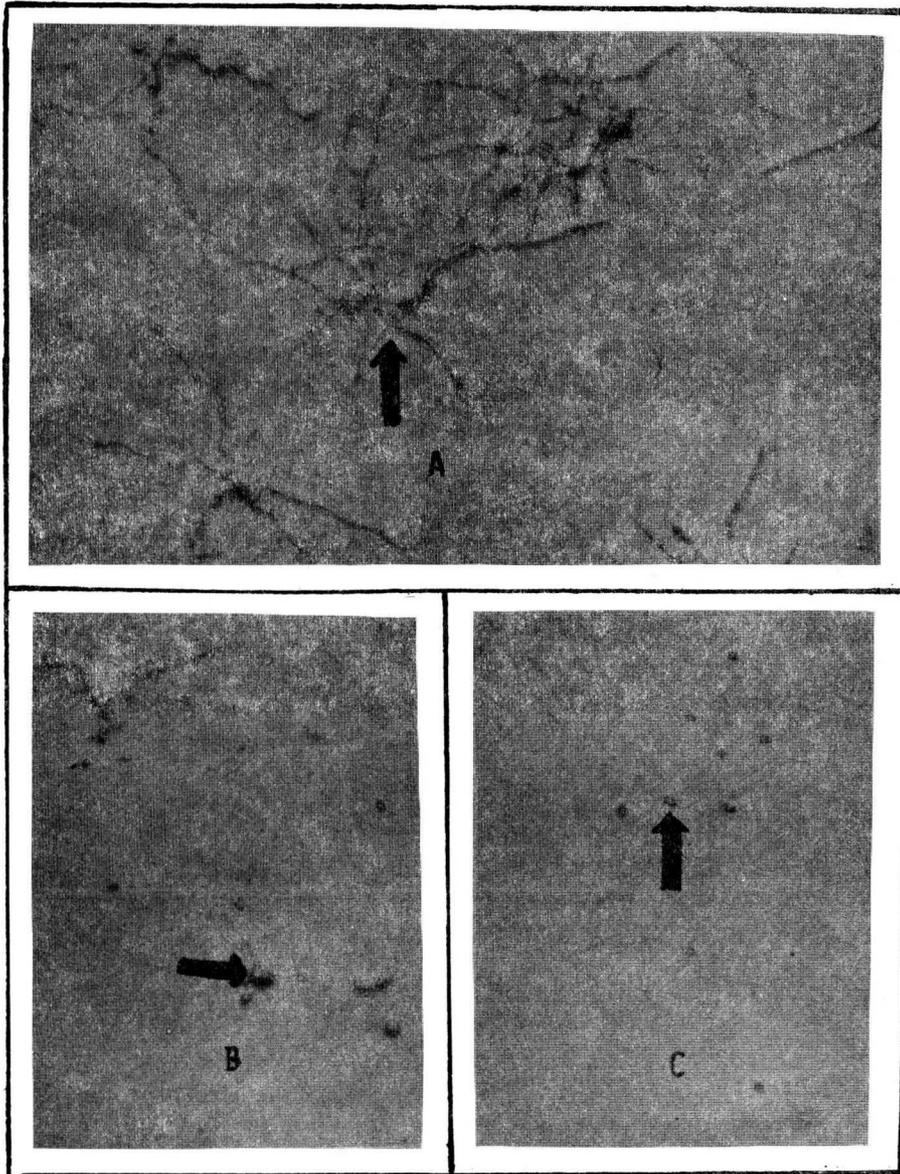


Figura 27. Germinación de conidios de Beauveria bassiana almacenados a diferentes temperaturas. A ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ), B ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y C ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ). La flecha indica el conidio del hongo.



**IMPRESA SAGITARIO**  
**PLAZA TEK "S"**  
**ALLENDE 116 LOCAL 14**  
**TEL. 4-97-79**  
**TEXCOCO MEX.**