R00606

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

# "EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA REPRODUCCION MASIVA DEL ENTOMOPATOGENO Beauveria bassiana (Bals.) Vuill"

TESIS:

Presentada a la Honorable Junta Directiva de la
Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala

POR:

EDDY ADALBERTO RODAS CASTAÑEDA

En el acto de investidura de:

INGENIERO AGRONOMO

En el grado académico de:

"LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS"

Guatemala, Septiembre de 1982

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**RECTOR**

**DOCTOR Eduardo Meyer Maldonado**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA**

| | |
|---|---|
| DECANO: | Dr. Antonio Sandoval Sagastume |
| Vocal Primero: | Ing. Agr. Ms. Oscar Leiva |
| Vocal Segundo: | Ing. Agr. Gustavo Méndez |
| Vocal Tercero: | Ing. Agr. Fernando Vargas |
| Vocal Cuarto: | Profesor Leonel Enríquez |
| Vocal Quinto: | Profesor Francisco Navichoque |
| Secretario: | Ing. Agr. Carlos R. Fernández |

**TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN**

**GENERAL PRIVADO**

| | |
|---|---|
| DECANO: | Dr. Antonio Sandoval Sagastume |
| Examinador: | Dr. José de Jesús Castro |
| Examinador: | Ing. Agr. Rolando Aguilera |
| Examinador: | Ing. Agr. Rolando Arriola |
| Secretario: | Ing. Agr. Carlos R. Fernández |

Guatemala,
septiembre de 1982.

Dr. Antonio Sandoval Sagastume
Decano, Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos
Ciudad.

Dr. Sandoval:

En atención a la designación que el decanato que usted dignamente preside, me hiciera para asesorar al Perito Agrónomo EDDY ADALBERTO RODAS CASTAÑEDA en la ejecución de su trabajo de tésis titulado:

"Evaluación de Medios de Cultivo para la Reproducción Masiva del Entomopatogeno Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.

Me satisface comunicarle que dicho trabajo fue realizado con apego a las normas técnicas y científicas que la Universidad de San Carlos de Guatemala exige.

Justo es mencionar el empeño y dedicación que el Perito Agrónomo Rodas Castañeda puso en la realización de este valioso aporte a la agricultura del país, cuya aprobación y publicación considero, será de gran beneficio para la caficultura de Guatemala, asi mismo creo que puede servir de base para otras inquietudes científicas en el futuro próximo.

Sin otro particular me es grato reiterarle mis muestras de consideración y aprecio.

Atentamente,

Ing. Agr. José Luis Monterroso M.

Honorable Junta Directiva

Honorable Tribunal Examinador

De acuerdo con lo establecido por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tésis titulado " EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA REPRODUCCION MASIVA DEL ENTOMOPATOGENO Beauveria bassiana (Bals.) Vuill" presentándolo como último requisito, previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agricolas, para su aprobación.

Respetuosamente,

Eddy Adalberto Rodas Castañeda

# DEDICATORIA

A: DIOS

A: **Mis Padres**

José Arturo Rodas Echevarría
Hilda Eluvia Castañeda de Rodas

A: **Mis Hermanos**

Mario Israel
Rony Otoniel
Lisbeth Carolina
Silvia Janeth
Enma Ileana
Jorge Arturo

A: **Familia**

Dávila Rodas

A: Norma Yolanda Rojas Castro

A: Ing. Agr. José Luis Monterroso M.

A: Ing. Agr. Ronald Estrada
(pionero en control biológico)

A: Personal del Laboratorio de
Parasitología Vegetal (DIGESA)

## AGRADECIMIENTOS

Al Ingeniero Agrónomo José Luis Monterroso Mayorga, por la acertada asesoría, revisión y corrección del presente trabajo.

A la Dirección General de Servicios Agrícolas (DIGESA)

A los Ingenieros Agrónomos Jorge Anibal Escobedo, Julio Alfredo Trejo Rodríguez, Manuel Francisco Cano Alvarado, Francisco González Colíndres y Félix Alberto Díaz Méndez, por el apoyo moral e intelectual y desinteresado que me brindaron para mi formación profesional.

A Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), que permitió y colaboró en el desarrollo del presente trabajo.

# C O N T E N I D O


| | | Página |
|---|---|---|
| I | **INTRODUCCION** | 1 |
| II | **OBJETIVOS** | 3 |
| III | **FORMULACION DE HIPOTESIS** | 4 |
| IV | **JUSTIFICACION** | 5 |
| | 4.1. Importancia del Café | 5 |
| | 4.2. Dispersión de la Broca del Café en Guatemala | 5 |
| | 4.3 Control Biológico | 6 |
| V | **REVISION DE LITERATURA** | 8 |
| | 5.1 Clasificación Taxonómica | 8 |
| | 5.2 Características Generales del Entomopátogeno Beauveria sp. | 8 |
| | 5.3 Control Biológico | 8 |
| | 5.4 Medio de Cultivo | 12 |
| | 5.5 Broca del Fruto del Café | 14 |
| | 5.5.1 Taxonomía | |
| VI | **IMPORTANCIA ECONOMICA** | 17 |
| VII | **MATERIALES Y METODOS** | 19 |
| | 7.1 Materiales de Campo | 19 |
| | 7.2 Materiales y Equipo de laboratorio | 19 |
| | 7.3 Preparación del Inóculo Primario | 22 |
| | 7.4 Preparación del Inóculo primario mediante granos de café | 23 |
| | 7.4.1 Ubicación del área de recolección | 23 |
| | 7.4.2 Forma de recolección y transporte | 24 |
| | 7.4.3 Preparacion de medios de cultivo | 25 |
| | 7.4.4 Mecanismo de inoculación | 25 |
| | 7.4.5 Proceso de aislamiento | 25 |
| | 7.5 Pruebas de Patogenecidad | 27 |
| | 7.6 Composición Química de los Medios de Cultivo | 28 |

| | | Página |
|---|---|---|
| 7.7 | Medición de pH | 31 |
| 7.8 | Evaluación Estadística | 31 |
| VIII | **RESULTADOS** | 34 |
| IX | **DISCUSION** | 45 |
| X | **CONCLUSIONES** | 47 |
| XI | **RECOMENDACIONES** | 48 |
| XII | **RESUMEN** | 49 |
| XIII | **BIBLIOGRAFIA** | 52 |

# I INTRODUCCION

La caficultura nacional atraviesa por uno de sus períodos más críticos en la historia del país, crisis que se manifiesta por los bajos precios del grano en el mercado internacional y también, en el alto costo de producción. Sobre este último aspecto, las plagas de insectos y enfermedades tienen una ingerencia muy marcada; tal el caso de la Broca del café **(Hypothenemus hampei** Ferr. 1867), que causa serias pérdidas a la producción cafetalera de Guatemala, pues desde su aparición en 1971, cuando se detectaron 1,400 hectáreas infestadas, la plaga ha avanzado cubriendo en la actualidad un área mayor que 130,000 hectáreas, equivalente al 63o/o de la superficie sembrada, con pérdidas que llegan en algunos casos, hasta un 57.15o/o (15).

Es necesario pués, mantener un constante estudio del problema y buscar medios de combate de la plaga, que hagan bajar la incidencia en condiciones de rentabilidad del cultivo. El campo del control biológico ofrece buenas alternativas en este aspecto y dentro de él, el control microbiológico con el uso de entomopatógenos que caracteriza la importancia de este trabajo. A propósito de ésto, Paul de Bach (3), nos explica que "El control biológico, cuando es considerado desde un punto de vista ecológico como una fase del control natural, puede definirse como la acción de parásitos, predatores, o patógenos para mantener la densidad de población de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia".

Muchos países, al sufrir la incidencia de plagas, se ven obligados a realizar grandes esfuerzos para combatirla. "El hombre ha venido luchando desde hace muchos años contra las plagas y es así como ha ido perfeccionando diversas medidas de control de plagas y enfermedades. Algunas de tales medidas constituyen el Control Biológico, que, "Es el ejercido por un ser viviente sobre otro ser viviente, inducido por el hombre". (12).

El Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), ha hecho algunos estudios en Guatemala para determinar el potencial del entomopatógeno **Beauveria bassiana** (Bals.) Vuill, como factor del control microbiológico de **Hypothenemus hampei,** siendo que son varios los aspectos que deben estudiarse al respecto, contempla en su programación la necesidad de determinar el o los mejores medios de cultivo de **Beauveria bassiana.** De esta manera, con la colaboración del Departamento de Parasitología Vegetal de la Dirección Técnica de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura de Guatemala y la del OIRSA mismo, con la debida autorización de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se inicia este estudio y como un trabajo de tesis, aprovechando los recursos que tienen las instituciones ya mencionadas.

Básicamente, se busca determinar el desarrollo y comportamiento del **Beauveria bassiana** en diferentes medios de cultivo, tratando de usar aquellos productos no elaborados, que por sus características bioquímicas y abundancia en el medio puedan fácilmente contribuir a la reproducción del hongo en condiciones ventajosas para su uso como entomopatógeno en la lucha contra la broca del café.

Conociendo los mejores medios de cultivo en condiciones del ambiente guatemalteco,

podrá realizarse posteriormente otra serie de ensayos, tanto de campo como de laboratorio y con otros esfuerzos inducir el control integrado de la broca del café, contribuyendo así a la fitosanidad de los cultivos en el país y también a nivel de los países afectados en América.

## II OBJETIVOS

Dentro de los aspectos considerados para la reproducción artificial de hongos entomopátogenos, se caracterízan: temperaturas uniformes y sustrato nutritivo elaborado, situación que nos lleva a un nivel económico alto, siendo esto una limitante para el empleo del control microbiológico en la agricultura nacional.

El objetivo fundamental de nuestro estudio, es la determinación del mejor medio de cultivo, para la reproducción masiva del entomopatógeno **Beauveria bassiana** (Bals.) Vuill, mediante la utilización de productos no elaborados, como los granos básicos, que existen en cualquier época del año en el país.

## III FORMULACION DE HIPOTESIS

En estudios realizados los resultados positivos se han obtenido sobre sustratos que poseen gran soltura, al respecto De Bach (3), dice: "Métodos para la producción masiva de esporas de Beauveria y Metarrhizium han sido desarrollados exitosamente, el sustrato del cultivo fue usualmente producto de trigo, maíz o papa. Muller-Kogler (1967) sugiere que la soltura (afrecho o grano de maíz) más que el sustrato sólido como el agar producen esporas, ya que las esporas por unidad de peso del medio están relacionadas al área superficial del medio".

Tomando en consideración la importancia de proporcionar medio de cultivo y equipo a bajo costo, nuestra hipótesis a considerar es: "El mejor medio de cultivo es el arroz precocido, bajo condiciones ambientales de temperatura y luz".

# IV JUSTIFICACION

## 4.1 Importancia del Café

En Guatemala el cultivo del café es uno de los más importantes, debido a que genera fuentes de trabajo y divisas para el país.

Como cultivo generador de fuentes de trabajo, la siguiente tabla nos da los porcentajes de la población ocupada.

GUATEMALA Población ocupada en el cultivo del Cafe y su relación con otros indicadores demográficos, año 1979
(millones de personas)

| Concepto | Total | o/o |
|---|---|---|
| Población total | 7 | 100 |
| Población económicamente activa | 2.1 | 28.57 |
| Población ocupada en el cultivo del café | 1.7 | 24.29 |

**FUENTE. Recopilación Estadística, ANACAFE.**

Como generador de divisas ANACAFE (2), nos dice que: en el año 1979, Guatemala produjo 3.6 millones de quintales de café oro, de ello se exporta el 90o/o que representa más del 37.4o/o del total de exportaciones agrícolas del pais y generó ingreso de divisas por 495.2 millones de quetzales, que significan el 35.7o/o del total de los recursos monetarios internacionales percibidos y el gobierno percibió 115.0 millones de quetzales por concepto de impuestos de exportación de café''.

## 4.2 Dispersión de la Broca del Café en Guatemala

En plantaciones de café se le a dado gran énfasis a la fitosanidad, especialmente al control de la broca del fruto del café, desde su aparecimiento que, según Hernández y Sánchez (11), ''Fue detectado en el año de 1971, en jurisdicción de Chicacao, Suchitepéquez y al efectuar los rastreos correspondientes, se detectó la plaga en 26 fincas, en una extensión de 1,440 hectáreas''.

Los esfuerzos realizados en aquel entonces, no lograron contener el avance de la plaga, Arriaga y Penados (1), en su informe de labores de 1979, presentan el siguiente cuadro, que es muy evidente.

Avance de la plaga por años, desde su descubrimiento hasta que va de 1979*.

**CUADRO No. 1**

| Año | No. de Fincas | Area en Mz. |
|---|---|---|
| 1971 | 26 | 2,048 |
| 1972 | 79 | 20,340 |
| 1973 | 173 | 36,003 |
| 1974 | 284 | 48,218 |
| 1975 | 580 | 84,100 |
| 1976 | 688 | 96,145 |
| 1977 | 749 | 112,727 |
| 1978 | 908 | 133,648 |
| 1979 | 930 | 137,536 |

*** Se refiere a marzo de ese año.**

Lo anterior refleja un serio problema para la caficultura nacional, lo que nos induce a buscar otros factores de control de la plaga que además de eficientes sean de bajo costo; la alternativa del control biológico, parece prometer buenos resultados, sin embargo es preciso conocer otros aspectos que se relacionan al mismo, tales como la reproducción de entomopatógenos que hoy nos ocupa.

4.3 Control Biológico

Tomando en consideración el elevado precio de los pesticidas agrícolas y los desordenes ecológicos producidos, por éstos, en las aplicaciones para controlar la broca del fruto del cafeto y otras plagas, nuestra tecnología debe dirigirse a buscar cada vez más apoyo en el control biológico. Benassy (5), menciona los inconvenientes del control químico como: "Eliminación del medio ambiente, residuos tóxicos sobre o en el interior de los productos cosechados".

Ante la situación anterior, se inicia la búsqueda de un control que sea eficiente, que no produzca los efectos nefastos; por lo tanto se considera que el control microbiológico es el que más se adapta a tales exigencias.

Es así como podemos considerar pionero en control biológico en Guatemala, al Ingeniero Agrónomo Ronald Estrada (10), quien ha trabajado con los Hongos **Nomuraea rileyi** con agente de control sobre los siguientes lepidópteros:

Falso medidor **Trichoplusia ní., Pseudoplusia includens** Gusano soldado y prodenia **Spodoptera exigua, S. sunia**

Los entomopátogenos **Metarrhizium anisopliae** y **Entomophthora** sp., como agentes de control sobre la Chinche salivosa **Aenolamia sp.**

Con nuestro estudio se colabora en ampliar el campo de Control Biológico en el país, ya que se evalúan los medios de cultivo, pensando en una reproducción masiva del entomopátogeno **Beauveria bassiana,** como alternativa de control sobre la Broca del fruto del Cafeto, que sigue su disperción a pasos agigantados sobre los cafetales guatemaltecos.

# V REVISION DE LITERATURA

## 5.1 Clasificación Taxonómica

a) **Beauveria bassiana** (Bals.) Vuill

Reyno: Vegetal
División: Eumycetes
Clase: Deuteromycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: Beauveria
Especie: bassiana.

## 5.2 Características Generales del Entomopátogeno Beauveria sp.

Beauveria bassiana, fue observado por Forbes en 1980, sobre chinches apestosas. B. bassiana se manifiesta en forma normal por un crecimiento algodonoso blanco o arinoso, que a veces llega a envolver completamente al insecto. Los conidioforos forman paquetes cerrados de conidios de un color blanco cremoso. El hongo crece con rápidez en medio artificial, donde produce un tipo de crecimiento más lanoso que la mayoría de las otras variedades de B. bassiana, las cuales producen un tipo de crecimiento aplanado, arinoso y pulverulento. Se ha demostrado que la germinación óptima de las esporas de B. bassiana se presenta a humedades relativas arriba del 94o/o y a temperaturas de 28 grados centígrados.

Obteniendo bajas germinaciones a 10, 38 y 44 grados centígrados, una consideración importante en el cultivo en masas de un hongo para el control microbiano, es la selección de razas que mantengan un alto grado de viruiencia en vitro y que produzcan un buen crecimiento con abundante esporulación. La producción de esporas está determinado a menudo por el tipo de medio usado para cultivar hongos. Métodos para la producción masiva de esporas de Beauveria y Metarrhizium han sido desarrollados exitosamente el sustrato de cultivo fue usualmente producto de trigo, maíz o papa; Muller Kogler (1967), sugiere que la soltura (afrecho o grano de maíz) más que el sustrato sólido como el agar producen esporas, ya que las esporas por unidad de peso del medio están relacionadas al área superficial del medio (3).

Beauveria Vuill, el micelio es blanco o suavemente coloreado con un pequeño espolvoreo o de apariencia del polvo; los conidioforos son simples, irregularmente agrupados o en ramos verticilados; en algunas especies dilatadas en la base, con porciones portaesporas, con apariencia de zig zag después que se producen varias esporas; las conidias son hialinas, algo ovoides de una célula, nacen simples o pocos esterigmatadas, son parasíticas sobre insectos (4)

## 5.3 Control Biológico

El cultivo de hongos entomopatógenos con miras a la utilización en el control

biológico, toma cada día más importancia para el control de las plagas de insectos, debido principalmente, a el alza de los precios de los pesticidas químicos y sus consecuencias, al desarrollo genético de resistencia de los insectos a los insecticidas. El uso de control microbiológico se realizó muchos años atrás. La National Academy of Sciences (19) se refiere así: "La idea de utilizar agentes microbianos en el control de insectos se concebió en el siglo XVIII y se principió con la producción masiva de **Metarrhizium anisopliae** (Metch) Sor., en un intento de controlar el gorgojo de la remolacha azucarera **Cleonus punctiventus Germ**

El primer estudio científico de una enfermedad concreta de un insecto fue la investigación de la "Uva Blanca", enfermedad de los gusanos de seda (conocida en Italia como "Calcino"), causada por el hongo **Beauveria bassiana** (bals.) Vuillen. En Estados Unidos se empleaba el hongo **Beauveria globulifera** (Speg), para tratar de controlar a la chinche **Blissus leucopterus** (Say).

La mayoría de estos esfuerzos iniciales, concluyeron en un total o parcial fracaso, debido a la poca habilidad del investigador para controlar el medio ambiente y, a su carencia de conocimientos sobre las familias de hongos que estaban utilizando como agentes controladores.

Constantemente se aislan nuevos organismos, en la actualidad ha sido encontrados 1,165 microorganismos relacionados con los insectos; casi todos son patógenos. Este comprende 90 especies y variedades bacterianas, 260 especies de virus y ricketsias, 460 especies de hongos, 255 especies de protozoarios y 100 especies de nemátodos".

Actualmente los hombres de ciencia se preocupan y estudian el control microbiológico, como parte del control integrado, cuya definición más aceptable para nuestro caso es la expresada por Calvert (7), quien dice: "Control Integrado: es un enfoque multidiciplinario al manejo de tácticas de control compatibles en un solo sistema coordinado de manejo de plagas".

Al hablar de hongos entomopátogenos, se dice que estos se alimentan de insectos, nace la idea de como invaden al insecto para luego producir su muerte, al respecto la National Academy of Science (19), opina: "Dentro de las principales formas de invasión podemos considerar las siguientes:

a) Infección oral: en la cual el organismo se ingiere con el alimento. Los virus, ricketsias bacterias, nemátodos, protozoarios y posiblemente algunos hongos;

b) La invasión a través del integumento íntegro o traquea, es la vía más común que utilizan los hongos y algunos nemátodos;

c) Invasión parenteral cuando ocurren un trauma al integumento;

d) A través del huevo microorganismo tales como virus, ricketsias, espiroquetas y protozoarios.

Ya el hongo entomopatógeno dentro del insecto comienza el proceso de infección, el cual lleva una serie de pasos para llegar a la destrucción del insecto, al respecto Calvert (7) dice: "Hay más de 36 distintos géneros de hongos, que contienen especies que pueden causar una enfermedad en los insectos. La clasificación de muchos de estos hongos entomopatógenos cambia constantemente y la identificación de las especies es a veces muy difícil. Se transmite la mayoría de los hongos de un huésped a otro por una espora, usualmente una conidia.

El método de infección más común es por la pared del cuerpo o integumento. Las conidias germinan y forman una estructura especial que penetra al cutículo del insecto. El hongo entonces crece en el cuerpo del insecto hasta que este último está lleno de micelio. Al llegar a este punto el insecto está usualmente muerto y tiene una consistencia algo firme. Bajo condiciones favorables el hongo sigue creciendo y produciendo estructuras que penetran por el cutículo y forman esporas o conidias".

Al realizar aplicaciones con un etomopatógeno, los efectos se hacen notar por la inoculación inicial y luego las transmisiones subsiguientes para provocar las epizootías, es así como al respecto nos opina la National Academy of Science (19): "Cuando las larvas de insectos fitófagos mueren de una enfermedad infecciosa, sus cuerpos se desintegran sobre las plantas o sobre el suelo y a los organismos presentes en los cadáveres los dispersa el viento, la lluvia o el rocío, hacia otras plantas o localidades huéspedes. Los microorganismos en el intestino de los insectos infectados se distribuyen en las heces y, las aves, avispas y otros depredadores pueden comer larvas infectadas y luego desiminar los organismos por medio de sus excrementos".

Al realizar control biológico mediante aplicaciones con hongos entomopátogenos, es necesario tomar en consideraciones sobre el efecto del medio ambiente, principalmente con los parámetros de humedad, temperatura, radiación solar, para poder crear una epizootía artificial eficiente, para el control del insecto plaga. Uno de los elementos más importantes para la supervivencia y desarrollo de los entomopátogenos es el suelo y al respecto la National Academy of Science (19), nos dice: "Muchos factores influyen en la supervivencia y desarrollo de los organismos patógenos de insectos en el campo campo y afectan así su infecciosidad, en forma común el clima templado aumenta la incidencia de las enfermedades originadas por hongos. La condición y reacción del suelo puede afectar con fuerza a los patógenos, los hongos capaces de atacar a los insectos sobreviven por más tiempo en los suelos con alto contenido orgánico.

**Metarrhizium anisopliae, Beauveria bassiana** y otros hongos parásitos matan con más frecuencia y persisten por más tiempo en suelos ricos".

El medio ambiente es un factor decisivo para que el control biológico de sus mejores resultados, para conseguir esto es necesario que el medio ambiente proporcione las mejores condiciones al entomopatogeno y que se encuentre en ventaja sobre el insecto plaga, al respecto Calvert(7) dice: "El desarrollo de las infecciones por hongos es dependiente de las condiciones ambientales. Los hongos, talvez más que cualquier otro grupo de patógenos de insectos, debe tener condiciones ambientales favorables para el desarrollo de epizooticos. Se considera que una alta humedad es vital para la germinación de la espora del hongo y la transmisión del patógeno de

un huésped a otro. Cuando se aplica un patógeno, ambos factores físicos y bióticos pueden afectar su virulencia estabilidad, persistencia y susceptibilidad de la plaga y la interacción entre patógenos y plaga. Entre los factores físicos del ambiente, es bien conocido que la temperatura y humedad pueden influir la virulencia, infectividad y patogenecidad del patógeno. Los hongos son muy dependientes en alta humedad relativa y humedad del sustrato. Especialmente durante períodos de dispersión fuera de sus huéspedes, la luz del sol puede desactivar el patógeno. Los factores bióticos que pueden influir la efectividad del patógeno son: Las características morfológicas de la planta y la densidad de su follaje, que puede influir la humedad, la adhesión y cobertura de un patógeno aplicado, el crecimiento rápido de la planta puede diluir los depósitos de un patógeno, y el Ph de los depósitos en la superficie de la planta puede reactivar el patógeno''.

Así como el medio ambiente es un factor que puede poner en desventaja al entomopátogeno respecto a la plaga a controlar, los insectos también generan su resistencia y está en función de la fase vulnerable del insecto y es así como en ciertos casos la fase de larva es suceptible al entomopátogeno. También se da la forma de resistencia que el insecto produce sustancias que inhiben el desarrollo del hongo entomopatogeno, para dar una mejor explicación, la National Academy of Science (19), dice: ''La resistencia está en relación a la infección o a los subproductos tóxicos de los organismos productores de enfermedad varía con la etapa de desarrollo en que se encuentra el insecto cuando sufre el ataque. El insecto adulto rara vez lo afectan las bacterias y virus que son letales para larva, pero no se puede infectar con estos organismos y transmitirlos a la progenie. Sin embargo, los protozooarios, nemátodos, las ricketsias y los hongos pueden atacar sin discriminación a los adultos y a las larvas y ocasionar la muerte o la reducción de la fecundidad en el insecto adulto.

Debido a la composición y estructura del exoesqueleto, las pupas de algunos insectos son resistentes a algunos hongos patógenos. El exoesqueleto del insecto es una mezcla proteína-quitina (N-acetilglucosamina) que depositan las secreciones de las células hipodérmicas. La secreción se endurece debido a un proceso de esclerotización de la proteína y se recubre con una epicutícula cerosa que contiene ácidos grasos insaturados y sustancias tales como el ácido 3-4 dihidroxibenzoico, que inhibe a los hongos. Cuando muda el insecto puede arrojar de si la invasión incipiente de los hongos''.

Sussman, 1951 y Koidsumi, 1957 citados por De Bach (3), sugiere que, esa resistencia se deba a la capa cutícular en la cual se encuentran los ácidos grasosos saturados, como el ácido caprílico que actúa inhibiendo el desarrollo de los hongos entomopátogenos.

Al pensar en control biológico dentro de nuestro estudio tomamos en consideración aspectos sobre el entomopátogeno a utilizar y es así como Calvert (7), nos habla de una adecuada manipulación artificial en aspersiones o polvos, pero dándole mayor énfasis al adecuado patógeno, colectarlo en el campo y criarlo a nivel artificial en el laboratorio y luego diseminarlo cuando su huésped sea más vulnerable y también hacer mención de requisitos básicos para lograr la mayor efectividad de los agentes microbiológicos, los cuales son:

1. Un conocimiento de la biología, ecología, fenología y compartimiento del huésped, es necesario para determinar cuando se debe de aplicar un patógeno para su efectividad máxima.

2. El patogeno escogido debe ser seguro de usar, fácil de manejar, relativamente selectivo y suficientemente virulento para controlar su huésped efectivamente.

3. El método de aplicación debe resultar en un persistente depósito-letal con una distribución uniforme, el cual proveerá un control adecuado de la plaga.

4. Los beneficios obtenidos con el patógeno deben de justificar su uso.

Teniendo seleccionado el patógeno de acuerdo a las condiciones básicas mencionadas anteriormente, se buscan los medios de cultivo más apropiados para el desarrollo y multiplicación del patogeno, que es el objetivo de nuestro estudio; como paso siguiente será la aplicación del entomopátogeno que como nos explica Calvert (7), que los procedimientos y el equipo empleado en la deseminación afectará la cobertura, adhesión y acarreamiento y por lo tanto, los métodos para las aspersiones en control microbiológico se pueden hacer en cuatro formas:

1. Aplicados sólo como aspersión, polvo o cebo
2. Introducción y colonización en una población de insectos
3. Aplicación en combinación con insecticidas
4. Aplicación combinada o coordinada con parásitos predatores y otros microorganismos

Estudios realizados con Beauveria bassiana en los Estados Unidos, nos hace mención De Bach (3), para el control de chinche de los cereales en el estado de Kansas, pero los trabajos fueron detenidos porque se consideraba que el hongo estaba distribuído en forma eficiente que las aplicaciones artificiales llegaban a ser no significativas en el control y esto lo concluyeron Packard y Benton (1937), citados por De Bach (3), aduciendo que el **Beauveria bassiana** es el enemigo natural más destructivo que tiene la chinche de los cereales, que generalmente se encuentra en los campos pero, su efectividad depende del clima.

5.4 Medio de Cultivo

Los hongos entomopatogenos han sido cultivados desde años atrás tal como lo mencionaremos posteriormente, es así como tenemos datos muy importantes como resultado de los trabajos realizados.

Teniendo relevancia los trabajos de Bartlett y Lefevre (1939), Dresner (1949) y Sawyer (1929), citados por De Bach (3), los cuales concluyeron que la humedad juega un papel preferencial en la esporulación de los hongos entomopátogenos.

De Bach (3), hace mención que la utilización de medios de cultivo para la producción industrial dió su gran paso con el descubrimiento y producción de la penicilina.

Como se mencionó anteriormente, son varios los trabajos realizados con medios de cultivo para la producción de hongo entomófagos, es así como Forbes (1895) citado por De Bach (3), utilizó como medio de cultivo harina de maíz mezclada con caldo de carne, para la propagación de entomopatogeno **Beauveria bassiana.**

Bartlett y Lefevre (1934), citados por De Bach (3) hicieron uso de harina de maíz como sustrato para la producción de **Beauveria bassiana.**

Shanor (1936) citado por De Bach (3), evalúa diferentes medios de cultivo y establece comparaciones utilizando el parámetro de producción de esporas de **Beauveria bassiana.** Y establece que se produjo mayor cantidad de esporas en el medio Sabourand-maltosa-agar seguida del medio Molish luego el medio de sangre con una base de agar, e inmediatamente el medio Raulinthom y Czapek-Dox, sigue en producción de esporas papa dextrosa y de último harina de maíz y agar.

Como resultado de los trabajos anteriores, tenemos la producción de esporas de**Beauveria bassiana** en diferentes medios de cultivo.

Producción de esporas en cultivos superficiales calculados de datos disponibles en Literatura.

| Especies | Medio de cultivo | Producción de esporas (g/pie$^2$ medio | Esporas usadas en las espolvo-reacciones y aspersiones | Literatura |
|---|---|---|---|---|
| Metarrhiziun anisopliae (Meth Sorokin | Amasijo de cerveza en cultivo | 16.7 - 20.4 | 3237.5 g/acre | Krassi Istschik 1888 |
| | Arroz bandejas en gabinetes especiales | 1043.3 (esporas y almidon) | 907.2-1360.8 g/acre (espo - ras y almidón | Rorer 1913 a |
| | Arroz, frascos Earlenmayes | 30.2 | 400 g/acre (14500 plantas de maíz) | Vouk y Klas, 1931 |
| Beauveria bassiana (Bals.) Vuill | Salvado 20 cm en cajas de petri | 8.9 | 20 g/acre | McCoy y Carver 1941 |
| | Frijoles 9 cm en cajas de petri | 21.8 | 20 g/acre | Dresner 1949 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Avena aplastada 20 cm en platos de petri | 1.5-2 | 26.6-484 g/acre | Hall, 1954 |

**FUENTE: Libro : "Control Biológico de las Plagas e Insectos y Malas Hierbas" (3)**

Uno de los últimos investigadores sobre medios de cultivo para **Beauveria bassiana,** es Schaerffenberg (1957) citado por De Bach (3), el cual recomienda la adición del 3o/o de peptona a un medio de extracto de malta para la producción en gran escala de esporas de **Beauveria bassiana.**

En Guatemala se ha realizado estudios para la reproducción del entomopatógeno dichos trabajos los realizó Monterroso (16) y quien al respecto nos opina: "Se han utilizado diferentes formas de reproducción del hongo en el laboratorio, una de ellas fue con la inoculación de Brocas sanas con brocas infectas y muertas por el hongo, en esta forma se logró incrementar el número de brocas muertas de dos a más de 200.

Otros medios artificiales probados fueron: maíz cocido, arroz cocido, leche en polvo disuelta en agua cocida, micosel más agar, arroz con leche cocidos, copra de coco y agua de coco. De estos medios se tuvieron resultados positivos, en cuanto a multiplicación y reproducción de esporas en todos, menos en agar más micosel. En donde hubo mejor cultivo de **Beauveria bassiana** en forma pura, fue con los medios de arroz cocido y copra de coco

5.5 Broca del Fruto del Café

5.5.1 Taxonomía

Según Balachowsky (1949, citado por Ticheler (18), la posición sistemática del Stephanoderes hampei Ferr. es la siguiente:

Orden: Coleóptera
División: Polyphaga
Suborden: Rhynchophora
Super Familia: Scolytoidea
Familia: Scolytoidea
Sub familia: Ipinae
Super tribu: Ipini
Tribu: Cryphalina
Género: Stephanoderes

Gran parte de los autores actuales lo colocan en el género Stephanoderes, pero los autores brasileros lo clasifican de acuerdo con Da Costa Lima (1928), en el género Hypothenemus.

La broca del fruto de café, es un insecto de metamorfosis completa, es decir que pasa por las fases –huevo-larva-pupa-adulto. Castillo (8) nos explica al respecto el ciclo de vida de la Broca del fruto del café.

"Huevo": es de forma globosa y de un color que va del blanco lechoso al amarillento, en este estado permanece de 5 a 9 días dentro del grano.

"Larva": A simple vista tiene apariencia de un arroz pequeño, son de color blanco lechoso y de una consistencia suave. No tiene patas. En este estado pasa de 10 a 26 días dentro del grano.

"Pupa": se puede confundir fácilmente con las larvas, pero su característica principal que las hace diferentes, es que no tiene ningun tipo de movimiento, presenta un color que va del blanco lechoso a ligeramente amarillento.

"Adulto": Tarda de 4 a 9 días para que salga el adulto. El tamaño varía según el sexo; la hembra es mas grande que los machos. Las alas de las hembras están desarrolladas para el vuelo, mientras que el macho las tiene atrofiadas".

Al respecto del adulto, Monterroso (17), nos reforza la información diciendo que, "la máxima longevidad de la hembra y de machos es de 187 y 90 días, respectivamente, la pulpa de café y la semilla de gandul, representan buenos medios alimenticios según la máxima longevidad, que en ambos casos fue de 70 días. Sin embargo en pulpa de café el promedio fue reducido.

La duración promedio de la broca del fruto del café **(Hypothenemus hampei)** sin alimento es de quince días.

Bajo las condiciones de laboratorio, se encontró en los ensayos realizados en junio y agosto 1979, un total de 558 huevos procedentes de 82 hembras, lo que nos dá un promedio de 7 huevos por hembra".

La broca del café, como todos insectos tiene hábitos de alimentación y estos son los que nos producen daño económico,. Castillo (8), dice que la perforación del fruto lo realiza la hembra adulto en la corona del fruto o disco, casi siempre en el centro del disco, las perforaciones las puede realizar en café pergamino y oro en almacenamiento.

La perforación la inicia el adulto mordiendo y arrancando tejido y los expulsa con las patas como aserrín, al llegar a la semilla hace una caverna en donde deposita sus huevos.

Al continuar con los hábitos de alimentación, la broca del fruto del café tiene predileccio-

nes para la fase del grano del café para iniciar sus perforaciones es así co como Castillo (8), nos presenta el siguiente cuadro:

| Grados de consistencia | Hábitos de perforación |
|---|---|
| 1. Acuoso: semilechoso | La broca perfora y abandona el fruto |
| 2. Lechoso: | La broca perfora y permanece en el canal de perforación |
| 3. Semiconsistente: | La broca permanece en el canal de perforación y luego continua su actividad, dañando los granos para preparar sus galerías de ovipo - posición |
| 4. Duro sacan<br>5. Duro maduro | Se observan todos los estadiosy los endospermas (granos) destruídos. |

## VI IMPORTANCIA ECONOMICA

Como de todos es sabido, el cultivo del café tiene un objetivo, el cual es la obtención del fruto y con este obtener el beneficio económico deseado.

Al considerar a la broca del café como plaga, esta produce daño el cual se manifiesta en baja de peso por lo consiguiente alterando el factor de conversión de café maduro a café oro, dandonos consecuencias de orden económico que van en detrimento de la producción cafetalera del país.

Es necesario conocer los porcentajes de infestación para saber cual es el nivel económico y, de éste partir para su control. Es así como Monterroso (15), mediante experimentación realizada nos presenta la siguiente tabla.

Peso del café maduro, pergamino y oro seco al 12o/o de humedad y Factor de conversión para diferentes grados de infestación de Broca del Café, OIRSA, Sanidad Vegetal, DIGESA, marzo 1981.

**CUADRO No. 2**

| o/o de Infestación | Peso del café maduro | Peso del café pergamino - seco 12o/o relativa (gr) | Peso de café oro al 12o/o humedad relativa (gr) | Conversión — maduro pergamino | Conversión — maduro oro | Porcentaje — o/o pérdida |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1786.0 | 392.0 | 314.40 | 4.54/1 | 5 68/1 | 0 00 |
| 20 | 1643.1 | 332.8 | 266.24 | 4.94/1 | 6.17/1 | 8.12 |
| 40 | 1682.1 | 313.8 | 251.00 | 5.36/1 | 6.70/1 | 15.29 |
| 60 | 1697.1 | 268.4 | 214.70 | 6.32/1 | 7 90/1 | 28.18 |
| 80 | 1672.5 | 212.5 | 170.00 | 7.87/1 | 9.83/1 | 42.30 |
| 100 | 1695.2 | 160.0 | 128.00 | 10.59/1 | 13 24/1 | 57.15 |

**FUENTE: Trabajo impreso del Ing. Agr. José Luis Monterroso.**

Como puede observarse en el cuadro No. 2, cuando la infestación de frutos es de 100o/o el máximo daño encontrado, por pérdida de peso del cafe, fue de 57.15o/o, lo cual es considerable, tomando en cuenta los costos de producción.

La Pelley (14), informa que: "Los daños se localizan en los frutos jovenes y en las semillas

más viejas en las que se reproduce el insecto carcome los frutos jovenes en tanto son tiernos, y aunque no se reproduce en ellos puede causar su caída''. Se refiere también a los informes de Schmitz y Crisinel quienes en el Congo, encontraron que la broca es causante de la caída de un 7o/o de los frutos de un total del 11o/o de caídos.

Hernández y Sánchez (11), expresan que ''una de las fincas más severamente atacadas, la infestación subió del 22 al 83o/o en un período de 17 días. Estos cafetales tenían sombra muy densa de leguminosas, sombra de banano explotada también para fruta y cacao. El café beneficiado de esta finca, 103 quintales oro, tuvo alrededor de un 8o/o no aceptable para exportación, debido al daño provocado por la broca''.

## VII MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se desarrollo en más de un 95o/o en el Departamento de Parasitología y Diagnóstico de Laboratorio de la Dirección Técnica de Sanidad Vegetal de DIGESA.

En consecuencia los materiales y equipo usados para realizar la experimentación de este trabajo, están de acuerdo a la disponibilidad del mencionado laboratorio, el cual se encuentra ubicado en la ciudad Guatemala, la experimentación se realizó durante los meses de mayo y junio de 1982.

Datos climatológicos de la estación 6.1.0 ubicada en la ciudad de Guatemala; año 1982, Longitud $90^{o}35'58''$, Latitud $14^{o}35'11''$; Elevación 1502.32 metros sobre el nivel del mar. Ver cuadros No. 3 y 4.

### 7.1 Materiales de Campo

- Frascos de vidrio con capacidad de 120 $cm^3$
- Bolsas nylón de 5 libras
- Navaja
- Lupa

### 7.2 Materiales y Equipo de Laboratorio

—Aherente-dispersante "Mezclafix" a base de 94o/o hidrocarburos parafinicos, 4o/o agente adherente y 2o/o emulsificante.

- Agua destilada
- Alcohol
- Aguja de Bisección
- Beaker
- Cubre objetos y porta objetos
- Caja petri

## CUADRO No. 3

**Temperatura, Humedad relativa y Radiación, mayo 1982.**

| Día | Temperatura grados C. 7 | 13 | 18 | Media | Humedad relativa % 7 | 13 | 19 | Media | Mínima | Radiación Media | Máxima |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 17.4 | 28.8 | 20.0 | 20.0 | 86 | 46 | 88 | 81 | 33 | 0.39 | 1.24 |
| 2 | 17.6 | 26.8 | 20.5 | 20.4 | 80 | 37 | 93 | 74 | 32 | 0.38 | 1.23 |
| 3 | 17.6 | 27.0 | 22.8 | 21.0 | 85 | 36 | | | | 0.38 | 1.22 |
| 4 | 18.0 | 26.0 | 22.8 | 20.5 | 80 | 42 | 50 | 57 | 38 | 0.40 | 1.28 |
| 5 | 16.6 | 26.6 | 22.0 | 20.5 | 86 | 36 | 64 | 70 | 34 | 0.40 | 1.23 |
| 6 | 17.4 | 24.4 | 21.2 | 20.5 | 92 | 46 | 72 | 75 | 38 | 0.35 | 1.25 |
| 7 | 16.4 | 27.6 | 20.2 | 20.6 | 95 | 34 | 88 | 77 | 32 | 0.32 | 1.20 |
| 8 | 16.6 | 25.5 | 22.0 | 20.4 | 97 | 40 | 50 | 65 | 36 | 0.35 | 1.20 |
| 9 | 17.0 | 26.4 | 21.4 | 20.8 | 92 | 21 | 80 | 66 | 29 | 0.34 | 1.11 |
| 10 | 17.8 | 29.0 | 23.0 | 21.8 | 82 | 27 | 84 | 70 | 25 | 0.38 | 1.20 |
| 11 | 18.4 | 29.0 | 23.0 | 22.2 | 90 | 35 | 86 | 75 | 33 | 0.36 | 1.25 |
| 12 | 20.0 | 29.4 | 22.0 | 22.4 | 90 | 34 | 90 | 74 | 28 | 0.36 | 1.26 |
| 13 | 17.6 | 26.6 | 20.8 | 20.8 | 85 | 45 | 85 | 81 | 41 | 0.40 | 1.30 |
| 14 | 18.5 | 27.8 | 21.4 | 21.6 | 92 | 50 | 92 | 83 | 43 | 0.38 | 1.21 |
| 15 | 18.0 | 27.0 | 21.8 | 21.4 | 96 | 32 | 72 | 76 | 29 | 0.36 | 1.22 |
| 16 | 18.0 | 27.0 | 23.8 | 21.6 | 90 | 32 | 48 | 64 | 26 | 0.40 | 1.24 |
| 17 | 18.0 | 27.6 | 22.2 | 21.0 | 85 | 33 | 86 | 76 | 31 | 0.35 | 1.28 |
| 18 | 18.4 | 26.6 | 20.4 | 20.5 | 90 | 40 | 92 | 82 | 34 | 0.33 | 1.34 |
| 19 | 17.4 | 21.2 | 28.9 | 19.4 | 98 | 92 | 100 | 94 | 52 | 0.16 | 1.20 |
| 20 | 17.6 | 23.0 | 18.4 | 19.2 | 99 | 70 | 100 | 93 | 54 | 0.22 | 1.29 |
| 21 | 17.0 | 25.0 | 18.4 | 19.5 | 100 | 50 | 97 | 89 | 50 | 0.15 | 1.18 |
| 22 | 17.0 | 25.2 | 20.0 | 19.6 | 100 | 48 | 85 | 87 | 48 | 0.30 | 1.44 |
| 23 | 17.6 | 18.4 | 18.3 | 18.6 | 98 | 98 | 100 | 96 | 58 | 0.14 | 1.26 |
| 24 | 17.8 | 20.4 | 19.4 | 19.0 | 100 | 94 | 100 | 96 | 70 | 0.20 | 1.18 |
| 25 | 17.6 | 20.0 | 21.4 | 20.7 | 95 | 54 | 90 | 85 | 49 | 0.34 | 1.32 |
| 26 | 18.4 | 24.0 | 20.0 | 20.4 | 96 | 80 | 97 | 90 | 44 | 0.29 | 1.10 |
| 27 | 18.4 | 27.0 | 20.0 | 20.6 | 100 | 46 | 98 | 88 | 37 | 0.28 | 1.30 |
| 28 | 17.2 | 22.0 | 19.2 | 19.2 | 100 | 75 | 98 | 94 | 68 | 0.29 | 1.28 |
| 29 | 17.2 | 24.6 | 19.2 | 19.5 | 100 | 66 | 96 | 91 | 56 | 0.29 | 1.20 |
| 30 | 18.0 | 19.4 | 18.3 | 19.0 | 96 | 98 | 100 | 95 | 60 | 0.20 | 1.27 |
| 31 | 17.2 | 19.4 | 18.0 | 18.1 | 100 | 98 | 86 | 94 | 73 | 0.22 | 1.35 |
| Total | | | | 631.4 | | | | 243.8 | | 9.71 | |
| Media | | | | 20.4 | | | | 81.0 | | 0.31 | |

**FUENTE: Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Metereología e Hidrología, INSIVUMEH.**

## CUADRO No. 4

**Temperatura, Humedad relativa y Radiación, junio 1982.**

| Día | Temperatura grados C. | | | | Humedad relativa % | | | | | Radiación | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7 | 13 | 18 | Media | 7 | 13 | 19 | Media | Mínima | Media | Máxima |
| 1 | 16.4 | 22.8 | 20.2 | 19.2 | 97 | | 88 | | | 0.30 | 1.11 |
| 2 | 18.0 | 24.3 | 21.4 | 20.4 | 92 | | 80 | | | 0.36 | 1.08 |
| 3 | 16.8 | 26.4 | 20.8 | 20.3 | 90 | 48 | 85 | 81 | 42 | 0.40 | 1.29 |
| 4 | 19.0 | 29.0 | 20.0 | 21.5 | 85 | 32 | 97 | 77 | 29 | 0.35 | 1.18 |
| 5 | 19.0 | 26.0 | 23.2 | 21.4 | 93 | 45 | 55 | 80 | 45 | 0.30 | 1.23 |
| 6 | 19.2 | 26.4 | 22.6 | 22.0 | 92 | 36 | 0 | 73 | 36 | 0.38 | 1.23 |
| 7 | 18.2 | 27.0 | 18.4 | 20.4 | 94 | 36 | 98 | 83 | 33 | 0.38 | 1.27 |
| 8 | 17.8 | 24.8 | 22.2 | 20.4 | 94 | 44 | 62 | 76 | 38 | 0.35 | 1.27 |
| 9 | 17.6 | 24.8 | 22.0 | 20.2 | 94 | 48 | 62 | 77 | 45 | 0.29 | 1.37 |
| 10 | 17.6 | 24.4 | 22.0 | 20.2 | 94 | 36 | 55 | 76 | 44 | 0.26 | 1.27 |
| 11 | 18.2 | 23.6 | 18.8 | 19.4 | 86 | 55 | 90 | 85 | 53 | 0.20 | 1.27 |
| 12 | 18.0 | 24.2 | 20.6 | 19.5 | 80 | 54 | 92 | 85 | 48 | 0.23 | 1.32 |
| 13 | 17.0 | 21.0 | 18.3 | 18.2 | 98 | 72 | 100 | 96 | 68 | 0.17 | 1.26 |
| 14 | 17.6 | 19.2 | 17.4 | 18.2 | 100 | 97 | 100 | 97 | 76 | 0.22 | 0.97 |
| 15 | 16.8 | 20.0 | 17.6 | 17.6 | 100 | 94 | 98 | 98 | 86 | 0.18 | 0.96 |
| 16 | 16.5 | 19.8 | 17.0 | 17.3 | 100 | 90 | 100 | 99 | 85 | 0.18 | 1.10 |
| 17 | 17.0 | 21.8 | 18.6 | 18.0 | 100 | 75 | 93 | 95 | 75 | 0.19 | 1.15 |
| 18 | 17.6 | 25.4 | 20.4 | 20.0 | 96 | 57 | 90 | 86 | 55 | 0.38 | 1.17 |
| 19 | 17.4 | 25.8 | 20.5 | 20.2 | 90 | 55 | 95 | 84 | 45 | 0.35 | 1.16 |
| 20 | 18.4 | 27.2 | 17.2 | 19.8 | 80 | 44 | 97 | 82 | 37 | 0.37 | 1.19 |
| 21 | 17.6 | 25.0 | 23.4 | 20.5 | 98 | 66 | 57 | 82 | 49 | 0.33 | 1.17 |
| 22 | 17.2 | 21.8 | 22.0 | 19.8 | 96 | 75 | 80 | 85 | 46 | 0.38 | 1.32 |
| 23 | 17.6 | 25.0 | 18.0 | 19.4 | 95 | 45 | 100 | 87 | 42 | 0.30 | 1.24 |
| 24 | 17.0 | 18.6 | 17.8 | 18.0 | 100 | 97 | 100 | 97 | 64 | 0.13 | 1.38 |
| 25 | 17.2 | 24.6 | 19.0 | 19.5 | 98 | 50 | 96 | 88 | 45 | 0.26 | 1.32 |
| 26 | 17.0 | 21.5 | 18.3 | 18.4 | 86 | 82 | 95 | 92 | 59 | 0.22 | 1.26 |
| 27 | 18.4 | 22.3 | 18.4 | 18.8 | 88 | 60 | 94 | 90 | 60 | 0.23 | 1.50 |
| 28 | 17.2 | 24.8 | 22.0 | 20.0 | 97 | 49 | 75 | 79 | 46 | 0.37 | 1.22 |
| 29 | 17.8 | 25.0 | 18.5 | 19.5 | 95 | 54 | 100 | 88 | 51 | 0.28 | 1.26 |
| 30 | 16.4 | 24.5 | 21.0 | 19.6 | 95 | 35 | 66 | 70 | 29 | 0.40 | 1.22 |
| Total | | | | 587.7 | | | | 2388 | 1431 | 8.74 | |
| Media | | | | 19.6 | | | | 85.28 | 51.10 | 0.29 | |

**FUENTE: Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología, INSIVUMEH.**

- Cinta colorimétrica indicadora de pH
- Cámara de transferencia
- Embudo
- Earlen meyer
- Frasco de vidrio de 1 libra
- Contómetro
- Formalina del 2 y 10o/o
- Fósforos
- Gasa
- Horno de convección (GCA/presición Scientific Model 27)
- Hematocímetro
- Incubadora (Thelco Model G GCA )
- Licuadora
- Microscopio (compuesto binocular Kyowa)
- Mechero de alcohoi
- Cinta adhensiva
- Olla de presión con manómetro
- Papel negro
- Pipeta de globuios blancos

7.3 Preparación de Inóculo Primario

Preparación de medios de cultivo

Al iniciar la investigación se contaba con dos cajas de petri con cultivo puro de **Beauveria bassiana,** las cuales fueron preparadas en febrero de 1981 por OIRSA y se guardaron en condiciones ambientales de temperatura y luz en las Oficinas de OIRSA en Guatemala ciudad.

Se necesitaba saber si el contenido de esas cajas no había perdido su poder de reproducción y para ello se prepararon medios de cultivo de P.D.A. (papa, dextrosa, agar) y jugo de vegetales V-8. La preparación es la siguiente, según Eddie Echandi (9).

**P.D.A.** (papa, dextrosa, agar).

| | | |
|---|---|---|
| Papas peladas y partidas | 200 | grs. |
| Dextrosa (glucosa) | 20 | grs. |
| Agar | 17 | grs. |
| Agua destilada hasta completar | 1000 | c.c. |

Se cocinan las papas peladas y partidas en 500 c.c. de agua por una hora. Simultáneamente, en otro recipiente en baño maría se disuelve el agar en 500 c.c. de agua. Se cuela el extracto de papas a través de varias capas de tela gasa, se mezclan ambos líquidos, se agrega la detroxsa y se agita la mezcla. Se restaura ei volumen a 1000 ml. con agua. Se dispensa el medio en Earlen

meyer y se esteriliza a 15 libras de presión durante veinte minutos.

**Agar – Jugo V-8**

| | | |
|---|---|---|
| Jugo V-8 | 200 | c.c |
| Carbonato de calcio | 3 | grs. |
| Agar | 20 | grs. |
| Agua destilada | 800 | c.c. |

Adicionar 200 c.c. de jugo V-8 a 800 c.c. de agua tibia, se agrega el carbonato de calcio y el agar, agitando la mezcla. Se calienta en baño maría hasta disolver el agar; una vez que el agar se haya disuelto, elevar el volumen a 1000 c.c. con agua destilada. Se dispensa el medio en un earlen meyer y se esteriliza a 15 libras de presión durante veinte minutos.

Mecanismo de Inoculación

Las cajas de petri se esterilizan a 110 $^{o}$C, durante veinte minutos en el horno de convección, el llenado de las cajas se hace desinfectando y desinfestando la mesa de trabajo con formalina al 2o/o, con el auxilio de una llama de mechero de alcohol.

Se espera que se enfríe el medio conllevando a la solidificación, entonces se procede a la inoculación, siempre auxiliándonos del mechero, entonces se introduce el inóculo a las cajas de petri, por medio de una aguja de bisección y se dan punzadas en forma de cruz, esto con el fin de tener referencia en donde se hizo la inoculación. En esta primera prueba se utilizaron 20 cajas, 10 para cada medio.

Inoculadas las cajas se sellaron con cinta adhensiva de 1'', e inmediatamente se introdujeron a la incubadora a 28$^{o}$C.

Se esperaron treinta días, al final de los cuales la inoculación fue negativa completamente, ya que no presentó desarrollo. Estos nos dió el conocimiento que el hongo perdió su viabilidad.

7.4 Preparación del Inóculo primario mediante el asilamiento de granos de café afectados con broca, procedentes del cafetal.

7.4.1 Ubicación del área de recolección

Por observaciones de Monterroso (16), quien registra la presencia del entomopátogeno **Bauvéria bassiana** en los cafetales de la finca Chocolá, del municipio de San Pablo Jocopilas, Suchitepéquez. Esta zona es considerada eminentemente cafetalera, con cultivo de café bajo sombra y cuenta con un buen número de variedades de café y se encuentra seriamente afectada por la broca del cafeto.

Esta zona cafetalera la podemos ubicar dentro de los siguientes parámetros climatológicos, 765 metros sobre el nivel del mar; precipitación media anual de 3,913 milímetros; tempera-

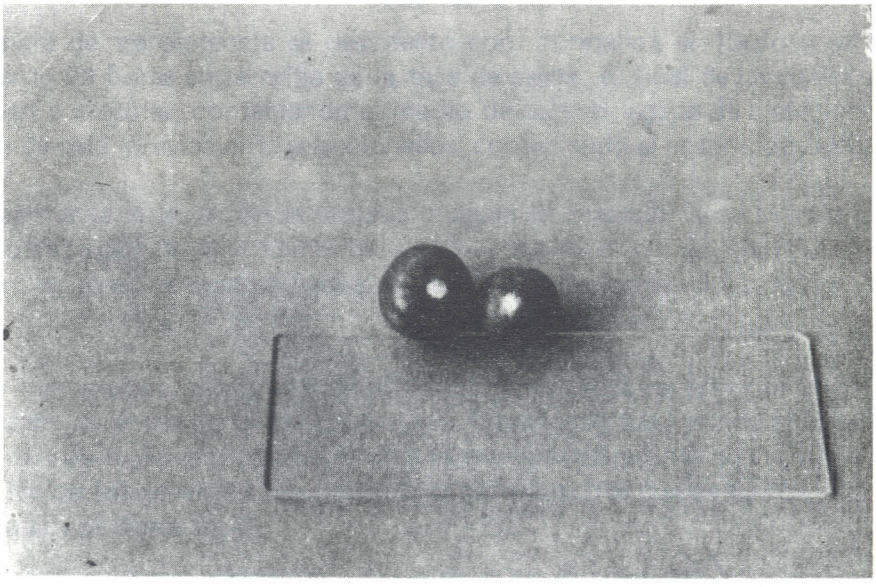
tura promedio de 21.8 y una humedad relativa de 80o/o.

7.4.2 Forma de recolección y transporte

Se seleccionaron plantas de café robusta y de ella se recolectaron frutos perforados con broca e infectadas con el entomopátogeno **Beauveria bassiana** y cuya sintomatología es que en la entrada del orificio producido por la broca, se encuentra ésta muerta y sobre ella un desarrollo de micelio blanco o suavemente coloreado con un polvo blanco (foto 1).

Estos granos se introdujeron en frascos de vidrio con tapadera y esterilizados, e inmediatamente después trasladados al laboratorio colocándolos en refrigeración a 5°C.

**Foto No. 1.**



7.4.3 Preparación de medios de cultivo (Arroz, maíz, P.D.A).

Arroz: Se colocó arroz comercial entero en remojo de agua durante diez minutos, al final de los cuales se extrajo el agua. En una caja de petri se vertieron 25 c.c. de agua destilada y se le adicionaron 40 gramos de arroz húmedo y se dispersó uniformemente en el fondo de la caja.

Se introducen las cajas destapadas al horno de convección durante veinte minutos a 110°C; luego en la segunda fase, pero con las cajas tapadas permanecieron en el mismo horno a 110°c, durante diez minutos. En la primera etapa se colocaron sin tapar para provocar pérdida de humedad.

Maíz: Se colocó a hervir agua destilada, cuando estaba hirviendo se le adicionó maíz blanco triturado y se mantuvo hirviendo durante cuarenta y cinco minutos, al final de los cuales se le extrajo el agua. De este maíz precocido se pesaron 30 gramos por caja de petri, se tapan y se introducen en el horno de convección a 110°C durante veinte minutos.

P.D.A. (papa, Dextrosa, Agar): El procedimiento para la elaboración de este medio de cultivo es el mismo, descrito anteriormente

7.4.4 Mecanismo de Inoculación

La cámara de transferencia se desinfectó con formalina al 10o/o y se sello con cinta adhensiva durante 24 horas en la orilla de la tapa de cierre, el final de las cuales se introdujeron las cajas de petri a inocular, conteniendo el medio de cultivo, agujas de bisección, cinta adhensiva y los granos de café, previamente seleccionados, conteniendo el entomopatógeno **Beauveria sp.**

Para realizar la inoculación se tomaba la aguja de bisección y se extrajo el micelio blanquecino, se habría la caja de petri lo menos posible y se punzo en cruz, sobre el medio de cultivo, esto con el fin de tener referencia para posibles contaminaciones. La cruz fue hecha de cinco puntos.

Se usó otro mecanismo en el cual se tomaba una broca muerta por el entomopatógeno, la cual se colocaba en el centro de la caja de petri. Otra forma fue haciendo contacto el medio de cultivo con el micrópilo del grano, pero en esta forma se nos presentó una asociación del entomopatógeno con los de los generos Fusarium y Monosporium, los cuales fueron clasificados con la clave fitopatológica de Barnett (4).

7.4.5 Proceso de aislamiento

Al iniciar un proceso de preparación de medios de cultivo y seguir con inoculaciones nos lleva al aislamiento del entomopatógeno y obtener el cultivo puro deseado, para ello se siguieron los siguientes pasos:

1. A partir de broca infectada se tomó micelio del hongo y se reprodujo en arroz P.D.A. y maíz: 61 cajas petri en total.
Muchos de estos cultivos se contaminaron con otros hongos.

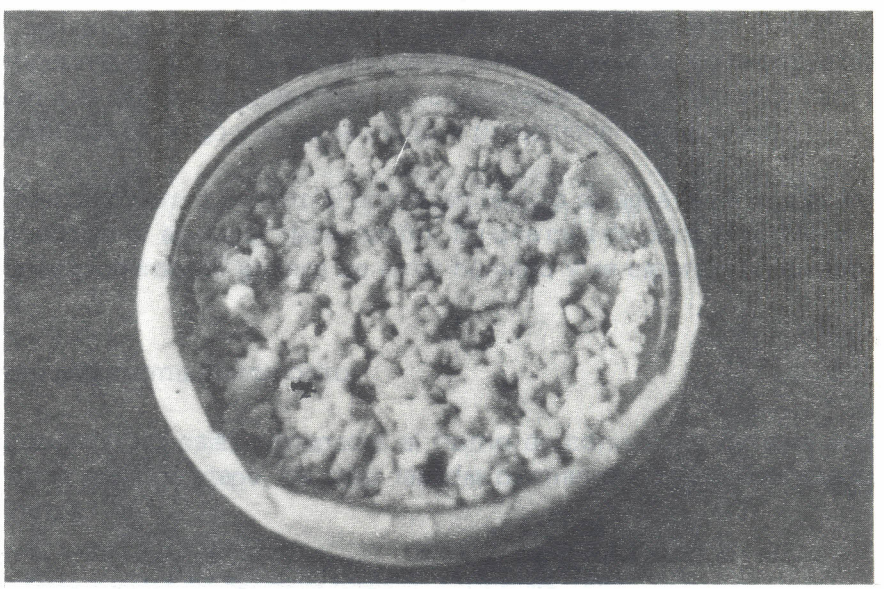
2. De las 61 petri anteriores, 6 que estaban menos contaminadas se usaron para obtener micelio y aislar el Beauveria sp; inoculándose 65 cajas petri.

3. De las 65 petri anteriores, 2 resultaron no contaminadas, se guardaron al medio ambiente para su posterior utilización.

4. De las restantes 63 petri, se separaron las menos contaminadas, donde se tomó micelio para inocular 64 petri más; de ellas resultaron con cultivo puro 16 cajas, que con las dos anteriores (párrafo 3), sumaron 18; todas con arroz como medio de cultivo; el total de cajas petri con cultivo usadas para aislar y obtener material de pie de cultivo fue de 190.

Cuando por fin aislamos al entomopatógeno en cantidades suficientes, fue identificado como Beauveria bassiana, apoyándonos en la clave fitopatológica de Bernett (4) teniendo 18 cajas de petri con cultivo puro, Foto No. 2, las cuales son consideradas como pie de cultivo para realizar la experimentación.

**Foto No. 2.**



7.5 Prueba de Patogenecidad

Para demostrar la patogenecidad del entomopatógeno **Beauveria bassiana,** se procedió a seleccionar cajas de petri con cultivo puro, las cuales provenían de inoculaciones en arroz del 6 de enero de 1982 y del 15 de diciembre de 1981. Se tomaron cuatro cajas se hizo un licuado con 300 c.c. de agua destilada, para cumplir con los postulados de Koch, ésta solución se mezcló en una asperjadora con capacidad de un galón de agua y se aplicó en 3 matas de café y, al mes se fue a observar los granos de café perforados por broca, las cuales estaban muertas por el entomopatógeno. Se tomaron granos de café conteniendo brocas afectadas por el entomopatogeno y se trasladaron al laboratorio para hacer los montajes respectivos y comprobar la presencia del entomopatógeno, la cual fue positiva.

La infección provocada por el entomopatógeno durante ese mes, comprueba una mortalidad del 34o/o de broca; Monterroso, J.L.* continuó haciendo pruebas de campo con este material, obteniendo un 92o/o de mortalidad de broca.

Medios de cultivo

Los siete medios de cultivo considerados en este estudio son: arroz **(Oriza sativa)**; maíz **(Zea Mays)**: trigo **(Triticum vulgare);** sorgo **(Sorgum helapense):** soya **(Glyssine max)**; papa **Solanum tuberosum);** pulpa de café, en dos formas de sustratos; sólido y líquido.

Preparación de Sustrato Sólido

Maíz: Se colocó a hervir agua destilada; cuando estaba hirviendo se le adicionó maíz blanco triburado y se mantuvo hirviendo durante cuarenta y cinco minutos, al final de los cuales se le extrajo el agua por decantación, de este maíz precocido se pesaron 30 gramos para cada caja petri, siendo en total ocho cajas, se taparon y se introdujeron al horno de convección a 110°C durante veinte minutos. Se desconectó el horno y cuando bajó la temperatura se sacaron y se introdujeron a la cámara de transferencia, conservando su hermetismo. Para la preparación de los sustratos sólidos de sorgo y soya, se siguió el procedimiento del maíz.

Arroz: Se colocó arroz comercial entero en remojo de agua durante diez minutos, al final de los cuales se extrajo el agua por decantación. En una caja de petri se vertieron 25 c.c. de agua destilada y se le adicionaron 30 gramos de arroz húmedo y se esparcieron uniformemente en el fondo de la caja.

Las cajas llenas en esta forma fueron ocho.

Se introdujeron las cajas destapadas al horno de convección durante veinte minutos a 110°C.; luego en la segunda etapa, las cajas tapadas permanecieron en el mismo horno a 110°C, durante diezminutos.

---

*** Monterroso, Jl.; Patogenecidad del Beauveria bassiana, Guatemala, 1982.**

En la primera etapa, se colocaron sin tapar para provocar pérdida de humedad. luego se trasladaron a la cámara de transferencia.

Para realizar el sustrato sólido de trigo se siguió el mismo procedimiento del arroz.

Papa: Lavadas y peladas las papas, se hicieron trocitos de cinco mm, se pesaron 30 gramos de papa y se colocaron en una caja de petri adicionándole 15 c.c. de agua destilada. En esta forma se llenaron ocho cajas de petri.

Las cajas destapadas se introdujeron al horno de convección a 110°C, a los quince minutos se taparon y se le dió cinco minutos más, se desconectó el horno y cuando bajó la temperatura se pasaron a la cámara de transferencia.

Para la preparación del sustrato sólido de pulpa de café verde, se siguió el mismo procedimiento de papa.

Preparación del sustrato líquido (caldo nutritivo)

El procedimiento para la elaboración del caldo nutritivo, de los siguientes medios maíz, sorgo, soya, arroz, trigo y pulpa de café verde fue: se pesaron 230 gramos de cada uno por separado, se colocaron en una olla de peltre, adicionándole 400 cc de agua destilada y se pusieron a hervir durante treinta minutos, quedando así el caldo nutritivo. Para el caso de la papa, lo que varía es el tiempo de cocción, que sólo fueron quince minutos.

Luego estos sustratos de caldo nutritivo se esterilizaron en la olla de presión a quince libras por pulgada cuadrada, durante veinte minutos, las cajas usadas para esta fase son cajas de petri desechables. El llenado de las cajas se hizo auxiliándose del mechero de alcohól, previo la desinfección de la mesa con formalina al 2o/o.

7.6 Composición química de los medios de cultivo

De acuerdo a los datos proporcionados por el Instituto de Nutrición para Centro América y Panamá (INCAP), la composición química de los medios de cultivo usados es la siguiente:

**CUADRO No. 5.**

| Composición por 100 gm de porción Comestible | Arroz | maiz | Trigo | Sorgo | Soya | Papa |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Valor energético (cal). | 364 | 129 | 307 | 342 | 398 | 79 |
| Humedad % | 12.0 | 63.5 | 24.1 | 10.0 | 9.2 | 77.9 |
| Proteína (gm.) | 7.2 | 4.1 | 9.3 | 8.8 | 33.4 | 2.8 |
| Grasa (gm.). | 0.6 | 1.3 | 0.7 | 3.2 | 16.4 | 0.2 |
| Hidratos de carbono totales (gm.) | 79.7 | 30.3 | 64.4 | 76.3 | 35.5 | 18.2 |
| Fibra (gm.) | 0.6 | 1.0 | 0.5 | 2.3 | 5.7 | 0.6 |
| Ceniza (gm.) | 0.5 | 0.8 | 1.5 | 1.7 | 5.5 | 0.9 |
| Ca (mg) | 9.0 | 5.0 | 32.0 | 19.0 | 222.0 | 10.0 |
| P. (mg.) | 10.40 | 128.0 | 110.0 | 229.0 | 730.0 | 50.0 |
| Fe (mg.) | 1.3 | 1.1 | 1.7 | 3.7 | 11.5 | 1.0 |
| Vit "A" Actividad(Mcg) | 0.0 | tr | 0.0 | 10.0 | tr | tr |
| Tiamina (mg.) | 0.08 | 0.18 | 0.10 | 0.41 | 0.88 | 0.11 |
| Riboflavina (mg.) | 0.03 | 0.08 | 0.06 | 12.0 | 0.27 | 0.04 |
| Niacina (mg.) | 1.6 | 1.9 | 1.1 | 3.2 | 2.2 | 1.50 |
| Acido Ascórbico (mg.) | 0.0 | 9.0 | 0.0 | 0.0 | - | 20.0 |

**FUENTE: Instituto de Nutrición para Centro América y Panama (INCAP).**

**Composición química de la pulpa de café (6)**

**CUADRO No. 6.**

| Componente | Fresca | Deshidratada |
|---|---|---|
| Humedad | 76.7 | 12.6 |
| Materia seca | 23.3 | 87.4 |
| Extracto etéreo | 0.48 | 2.5 |
| Fibra cruda | 3.40 | 21.0 |
| Proteína cruda Nx6.25 | 2.10 | 11.2 |
| Cenizas | 1.50 | 8.30 |
| Extracto libre de nitrógeno | 15.80 | 44.40 |

**Contenido de otros compuestos en la pulpa de café (6)**

**CUADRO No. 7.**

| Compuesto | % base seca |
|---|---|
| Tanino | 1.8 - 8.56 |
| Sustancias pécticas totales | 6.5 |
| Azucares reductores | 12.4 |
| Azucares no reductores | 2.0 |
| Cafeína | 1.3 |
| Acido clorogénico | 2.6 |
| Acido cafeíco total | 1.6 |

7.7 Medición de pH

Se preparó una caja de petri para cada medio de cultivo, tanto de sustrato sólido como caldo nutritivo, de la misma forma como se hizo en la preparación de los medios de cultivo y, a estas se les medió el pH, este vendría a ser el pH original en donde el hongo inicia su desarrollo. (Ver cuadro No. 15)

Para conocer el pH final se le tomó a la solución usada en el conteo de conidias, que más adelante se detalla. (Ver cuadro No. 15).

Efecto de Luz

Cajas de petri conteniendo todos los medios ya indicados, fueron inoculadas con conidias de **Beauveria bassiana.**

Cuatro petri de cada medio de cultivo fueron inoculadas y cultivadas en constante oscuridad, cubriéndolas con papel negro a temperatura ambiental otras cuatro a temperatura constante de 28°C.

Cuatro petri de cada medio de cultivo fueron inoculadas y cultivadas bajo un régimen alterno de más o menos 12 horas de luz y más o menos 12 horas de oscuridad (regimen mixto a temperatura ambiental, otras cuatro a temperaturas constantes de 28°C. Ver cuadro No. 3 y 4.

Efecto de temperatura

Se tomaron en cuenta dos condiciones, a temperatura constante y a temperatura ambiente, que venía a ser la que imperaba dentro del laboratorio, que fue de 24.1 grados C. máxima y 16.1 grados C. la mínima, como promedio durante 30 días.

Cultivos en petri con los medios ya indicados e inoculados con conidias de B. bassiana, fueron colocándose en 4 replicas bajo cada una de las siguientes condiciones: 28°C y temperatura ambiental; con luz mixta y oscuridad constante.

7.8 Evaluación Estadística

La experimentación en este estudio, la constituyeron dos fases, la primera fase consistió en la que se conjugó sustrato sólido más temperatura constante con las variaciones de oscuridad constante y régimen mixto de más o menos 12 horas luz y más o menos 12 horas de oscuridad, todo ello dentro de la incubadora.

Al mismo tiempo se conjugó sustrato líquido más temperatura ambiente con las variaciones de oscuridad constante y regimen mixto de más o menos 12 horas luz y más o menos 12 horas oscuridad en una estantería dentro del laboratorio, esta primera fase tuvo una duración de 30 días. La segunda fase consistió en conjugar sustrato líquido a temperatura constante con

las variaciones de ausencia de luz natural o con luz natural durante más o menos 12 horas dentro de la incubadora.

Al mismo tiempo se conjugó sustrato sólido con temperatura ambiente, con las variaciones de ausencia de luz natural o con luz natural más o menos durante 12 horas en la estantería dentro del laboratorio.

Esta fase también tuvo una duración de treinta días.

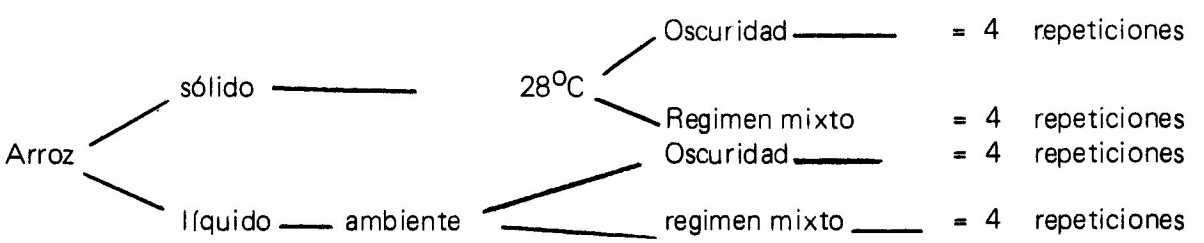
El parámetro estadístico es la producción de esporas durante cada período de prueba realizando el conteo al treintavo día de la siguiente manera: se pesaron las cajas petri, se hechó dentro del vaso de la licuadora el medio de cultivo conteniendo el hongo, se procuró dejar limpia la caja petri, luego se volvió a pesar la caja petri, siendo este peso la tara, entonces se determinopor diferencia el peso del medio de cultivo.

En base al peso se hizo la dilución de 1:10 es decir por un gramo de medio de cultivo se adicionó 10 c.c. de agua hervida, a esta dilución se le adicionó adherente en la cantidad de 0.5 c.c. teniendo la solución de Beauveria bassiana más agua destilada más el adherente, se procedió a licuarlo durante tres minutos, al final de los cuales auxiliándose de un embudo más una tela gasa se colocó la solución hacia un recipiente de vidrio de 100 c.c. de capacidad; de esos 100 c.c. de solución se extrajo la muestra para el llenado de las cámaras del hematocímetro, efectuando de inmediato el conteo respectivo, auxiliándose de un contómetro y del microscopio.

Para analizar la investigación llevada en esta experimentación, el modelo estadístico es el arreglo combinatorio completamente al azar desbalanceado 7x2x2 con cuatro repeticiones

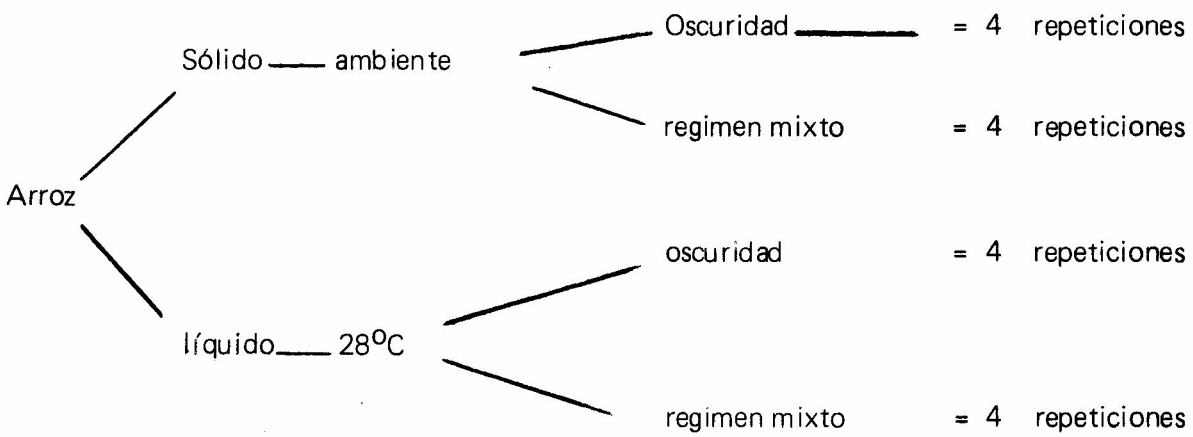
**Secuencia del experimento**

**Fase 1**



En esta forma para todos los medios de cultivo, dándonos un total de 56 cajas petri.

**Fase 2**




Para todos los medios de cultivo, con un total de 56 cajas petri.

En la experimentación se usaron un total de 112 cajas de petri.

## VIII RESULTADOS

Como datos relevantes de la experimentación podemos considerar a los factores de medio de cultivo, temperatura y luminosidad, los cuales al conjugarlos nos dan la producción de esporas por gramo de medio de cultivo que es el parámetro establecido, para hacer la evaluación estadística.

**CUADRO No. 8**

**Producción de esporas por gramo de medio de cultivo en función de los factores: temperatura y luminosidad**

| Medio de cultivo | Repetición | Temperatura | Luminosidad | Esporas/gramo medio de cultivo |
|---|---|---|---|---|
| Trigo | 1 | 28°C | Oscuridad | $2.68 \times 10^7$ |
| | 2 | " | Oscuridad | $8.012 \times 10^8$ |
| | 3 | " | Oscuridad | $5.88 \times 10^7$ |
| | 4 | " | Oscuridad | $6.16 \times 10^7$ |
| Trigo | 1 | 28°C | Regimen mixto | $4.0 \times 10^7$ |
| | 2 | " | " " | $4.457 \times 10^7$ |
| | 3 | " | " " | $7.20 \times 10^7$ |
| | 4 | " | " " | $5.22 \times 10^7$ |
| Trigo | 1 | Ambiente | Oscuridad | $2.76 \times 10^7$ |
| | 2 | " " | " " | $6.8 \times 10^6$ |
| | 3 | " " | " " | $1.58 \times 10^7$ |
| | 4 | " " | " " | $2.64 \times 10^7$ |
| Trigo | 1 | Ambiente | mixto | $8.00 \times 10^6$ |
| | 2 | " " | " | $8.20 \times 10^6$ |
| | 3 | " " | " | $7.80 \times 10^6$ |
| | 4 | " " | " | $9.60 \times 10^6$ |

| Medio de cultivo | Repetición | Temperatura | Luminosidad | Esporas/gramo medio de cultivo |
|---|---|---|---|---|
| Arroz | 1 | 28°C | Oscuridad | $7.56 \times 10^{7}$ |
| | 2 | " | idem | $1.164 \times 10^{8}$ |
| | 3 | " | idem | $1.494 \times 10^{8}$ |
| | 4 | " | idem | $1.164 \times 10^{8}$ |
| Arroz | 1 | " | Regimen mixto | $1.498 \times 10^{8}$ |
| | 2 | " | Idem | $1.472 \times 10^{8}$ |
| | 3 | " | Idem | $3.628 \times 10^{8}$ |
| | 4 | " | Idem | $1.456 \times 10^{8}$ |
| Arroz | 1 | Ambiente | Oscuridad | $1.297 \times 10^{7}$ |
| | 2 | Idem | Idem | 0.000 x 00 |
| | 3 | Idem | Idem | $1.439 \times 10^{7}$ |
| | 4 | Idem | Idem | $1.40 \times 10^{7}$ |
| Arroz | 1 | Ambiente | Regimen mixto | $6.02 \times 10^{7}$ |
| | 2 | Idem | Idem | $6.34 \times 10^{7}$ |
| | 3 | Idem | Idem | $6.56 \times 10^{7}$ |
| | 4 | Idem | Idem | $6.34 \times 10^{7}$ |
| Papa | 1 | 28° C | Oscuridad | 0.00 x 00 |
| | 2 | " | Idem | 0.00 x 00 |
| | 3 | " | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | " | Idem | 0.00 x 00 |
| Papa | 1 | 28°C | Regimen mixto | 0.00 x 00 |
| | 2 | " | Idem | 0.00 x 00 |
| | 3 | " | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | " | Idem | 0.00 x 00 |
| Papa | 1 | Ambiente | Oscuridad | $4.00 \times 10^{6}$ |
| | 2 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 3 | Idem | Idem | $5.56 \times 10^{7}$ |
| | 4 | Idem | Idem | $5.44 \times 10^{7}$ |

| Medio de cultivo | Repetición | Temperatura | Luminosidad | Esporas/gramo medio de cultivo |
|---|---|---|---|---|
| Papa | 1 | Ambiente | Regimen mixto | $7.00 \times 10^6$ |
| | 2 | Idem | Idem | $1.46 \times 10^7$ |
| | 3 | Idem | Idem | $4.60 \times 10^6$ |
| | 4 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| Sorgo | 1 | 28°C | Oscuridad | 0.00 x 00 |
| | 2 | " | Idem | $1.94 \times 10^7$ |
| | 3 | " | Idem | $5.60 \times 10^6$ |
| | 4 | " | Idem | $8.60 \times 10^6$ |
| Sorgo | 1 | " | Regimen mixto | $3.28 \times 10^7$ |
| | 2 | " | Idem | $3.60 \times 10^7$ |
| | 3 | " | Idem | $1.28 \times 10^6$ |
| | 4 | " | Idem | $1.54 \times 10^7$ |
| Sorgo | 1 | Ambiente | Oscuridad | $1.82 \times 10^7$ |
| | 2 | Idem | Idem | $3.24 \times 10^7$ |
| | 3 | Idem | Idem | $1.88 \times 10^7$ |
| | 4 | Idem | Idem | $2.66 \times 10^7$ |
| Sorgo | 1 | Idem | Regimen mixto | $1.18 \times 10^7$ |
| | 2 | Idem | Idem | $8.40 \times 10^6$ |
| | 3 | Idem | Idem | $2.32 \times 10^7$ |
| | 4 | Idem | Idem | $1.18 \times 10^7$ |
| Maíz | 1 | 28°C | Oscuridad | $5.80 \times 10^6$ |
| | 2 | " | Idem | $1.10 \times 10^7$ |
| | 3 | " | Idem | $1.64 \times 10^7$ |
| | 4 | " | Idem | $3.80 \times 10^6$ |
| Maíz | 1 | " | Regimen mixto | $8.80 \times 10^6$ |
| | 2 | " | Idem | $1.508 \times 10^7$ |
| | 3 | " | Idem | $1.640 \times 10^7$ |
| | 4 | " | Idem | $1.100 \times 10^7$ |

| Medio de cultivo | Repetición | Temperatura | Luminosidad | Esporas/gramo medio de cultivo |
|---|---|---|---|---|
| Maíz | 1 | Ambiente | Oscuridad | $7.60 \times 10^6$ |
| | 2 | Idem | Idem | $4.40 \times 10^6$ |
| | 3 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | Idem | Idem | $9.80 \times 10^6$ |
| Maíz | 1 | Idem | Regimen mixto | $1.38 \times 10^7$ |
| | 2 | Idem | Idem | $1.16 \times 10^7$ |
| | 3 | Idem | Idem | $2.58 \times 10^7$ |
| | 4 | Idem | Idem | $1.62 \times 10^7$ |
| Soya | 1 | 28°C | Oscuridad | $4.02 \times 10^8$ |
| | 2 | " | Idem | $1.76 \times 10^8$ |
| | 3 | " | Idem | $2.62 \times 10^7$ |
| | 4 | " | Idem | $4.12 \times 10^7$ |
| Soya | 1 | " | Regimen mixto | $3.34 \times 10^7$ |
| | 2 | " | Idem | $2.26 \times 10^7$ |
| | 3 | " | Idem | $2.48 \times 10^7$ |
| | 4 | " | Idem | $2.08 \times 10^7$ |
| Soya | 1 | Ambiente | Oscuridad | 0.00 x 00 |
| | 2 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 3 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| Soya | 1 | Idem | Regimen mixto | 0.00 x 00 |
| | 2 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 3 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | Ide, | Idem | 0.00 x 00 |
| Pulpa de café | 1 | 28°C | Oscuridad | $1.54 \times 10^7$ |
| | 2 | " | Idem | $3.02 \times 10^7$ |
| | 3 | " | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | " | Idem | $2.18 \times 10^7$ |

| Medio de cultivo | Repetición | Temperatura | Luminosidad | Esporas/gramo medio de cultivo |
|---|---|---|---|---|
| Pulpa de café | 1 | 28°C | Regimen mixto | $5.44 \times 10^7$ |
| | 2 | " | Idem | $2.50 \times 10^7$ |
| | 3 | " | Idem | $3.40 \times 10^7$ |
| | 4 | " | Idem | $3.28 \times 10^7$ |
| Pulpa de café | 1 | Ambiente | Oscuridad | 0.00 x 00 |
| | 2 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 3 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| Pulpa de café | 1 | Idem | Regimen mixto | 0.00 x 00 |
| | 2 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 3 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |
| | 4 | Idem | Idem | 0.00 x 00 |

En la experimentación con los medios líquidos se observó un comportamiento negativo del hongo **Beauveria bassiana,** únicamente se notó un limitado desarrollo en donde se punzó en la inoculación, inhibiéndose el crecimiento en el resto del medio de cultivo.

Con los datos tabulados en el cuadro No. 8, que es el producto de la experimentación, se procedió al análisis de varianza que para el efecto es trifactorial 7 x 2 x 2 completamente al azar desbalanceado, utilizando el paquete estadístico de computación S.P.S.S. (paquete estadístico para las Ciencias Sociales) de la computadora instalada en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con un nivel de significación del 5o/o.

**CUADRO No. 9.**

**ANALISIS DE VARIANZA**

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados d/ libertad | Cuadrado medio | F | Significancia de F | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Efectos principales | 202144.563 | 8 | 25268.070 | 3.489 | 0.002 | |
| Medios de cultivo | 126718.500 | 6 | 21119.750 | 2.916 | 0.013 | ** |
| Luz | 6514.703 | 1 | 6514.703 | 0.899 | 0.346 | N.S. |
| Temperatura | 67939.375 | 1 | 67939.375 | 9.380 | 0.003 | ** |
| Interacciones de 2do orden | 163594.750 | 13 | 12584.211 | 1.737 | 0.069 | |
| Medio-luz | 68926.875 | 6 | 11487.813 | 1.586 | 0.162 | N.S. |
| Medio-temperatura | 90411.188 | 6 | 15068.531 | 2.081 | 0.065 | N.S. |
| Luz-temperatura | 7270.840 | 1 | 7270.840 | 1.004 | 0.319 | N.S. |
| Interacciones de 3er orden | 42608.000 | 6 | 7101.332 | 0.980 | 0.444 | |
| Medio-luz-temperatura | 42608.00 | 6 | 7101.332 | 0.980 | 0.444 | N.S. |
| Tratamiento | 408347.313 | 27 | 15123.973 | 2.088 | 0.006 | |
| Error | 564932.813 | 78 | 7242.727 | | | |
| Total | 973280.125 | 105 | 9269.332 | | | |

**** = si es significativo**
**N.S. = No significativo**

**CUADRO No. 10**

**Promedio general de esporas de los medios de cultivo (millones de esporas)**

| Medio de cultivo | Media |
|---|---|
| Trigo | 79.71 |
| Arroz | 104.31 |
| Papa | 10.51 |
| Sorgo | 18.52 |
| Maíz | 12.33 |
| Soya | 45.71 |
| Pulpa de café | 14.74 |

**CUADRO No. 11**

**Promedio general de Esporas determinado por luz**
**(millones de esporas)**

| Luminosidad | Media |
|---|---|
| Oscuridad | 33.84 |
| Regimen mixto | 49.83 |

**CUADRO No. 12**

**Promedio general de Esporas determinados por temperatura**
**(millones de esporas)**

| Temperatura $^{o}C$ | Media |
|---|---|
| $28^{o}$ C | 66.51 |
| Ambiente | 15.59 |

**CUADRO No. 13**

**Promedio de Esporas corregidos determinados por la interacción Medio – Temperatura (millones de esporas)**

| Medio | 28°C | Ambiente |
|---|---|---|
| Trigo | 145.15 | 14.27 |
| Arroz | 158.40 | 42.50 |
| Papa | 0.50 | 23.87 |
| Sorgo | 17.51 | 19.40 |
| Maíz | 11.53 | 13.24 |
| Soya | 90.93 | 0.50 |
| Pulpa de café | 31.01 | 0.50 |

**NOTA:** El término corregido es por la razón de que se le sumó 0.5 millones de esporas a los datos, ya que hay medios de cultivo que no reprodujo el hongo y esto dificulta el programa S.P.S.S. de la computadora.

**CUADRO No. 14**

**Prueba de Tukey con los promedios de los medios de cultivo**

| | 104.31 | 79.71 | 45.71 | 18.57 | 14.74 | 12.33 | 10.51 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10.51 | 93.80 | 69.2 | 35.2 | 8.01 | 4.23 | 1.80 | 0.00 |
| 12.33 | 91.98 | 67.38 | 33.38 | 6.19 | 2.41 | 0.00 | |
| 14.74 | 89.57 | 64.97 | 30.97 | 3.78 | 0.00 | | |
| 18.52 | 85.79 | 61.19 | 27.19 | 0.00 | | | |
| 45.71 | 58.60 | 34.00 | 0.00 | | | | |
| 79.71 | 24.61 | 0.00 | | | | | |
| 104.31 | 0 | | | | | | |

$$W = q\,(t, G.L.E.) \quad S\,\bar{x}$$

$$S\,\bar{x} = \sqrt{\frac{\text{cuadrado medio de error}}{\bar{r}\ \text{armónica}}}$$

**CUADRO No. 15**

**Los medios de cultivo y el pH**

| Medio de cultivo | Temperatura | Luminosidad | pH inicial | pH final |
|---|---|---|---|---|
| Trigo | 28°C | Oscuridad | 7.0 | 5.5 |
| | 28°C | Regimen mixto | 7.00 | 5.5 |
| | Amb. | oscuridad | 7.00 | 6.0 |
| | Amb. | Regimen mixto | 7.0 | 6.0 |
| Arroz | 28°C | Oscuridad | 7.0 | 5.5 |
| | 28°C | Regimen mixto | 7.0 | 5.5 |
| | Amb. | Oscuridad | 7.0 | 6.0 |
| | Amb. | Regimen mixto | 7.0 | 6.0 |
| Papa | 28°C | Oscuridad | 7.0 | 6.0 |
| | 28°C | Regimen mixto | 7.0 | 6.0 |
| | Amb. | Oscuridad | 7.0 | 6.0 |
| | Amb. | Regimen mixto | 7.0 | 6.0 |
| Sorgo | 28°C | Oscuridad | 6.0 | 4.0 |
| | 28°C | Regimen mixto | 6.0 | 4.0 |
| | Amb. | Oscuridad | 6.0 | 5.0 |
| | Amb. | Regimen mixto | 6.0 | 5.0 |
| Maíz | 28°C | Oscuridad | 7.0 | 6.5 |
| | 28°C | Regimen mixto | 7.0 | 6.5 |
| | Amb. | Oscuridad | 7.0 | 6.0 |
| | Amb. | Regimen mixto | 7.0 | 6.0 |
| Soya | 28°C | Oscuridad | 6.0 | 6.0 |
| | 28°C | Regimen mixto | 6.0 | 6.0 |
| | Amb. | Oscuridad | 6.0 | 6.0 |
| | Amb. | Regimen mixto | 6.0 | 6.0 |
| Pulpa de café | 28°C | Oscuridad | 5.5 | 4.0 |
| | 28°C | Regimen mixto | 5.5 | 4.0 |
| | Amb. | Oscuridad | 5.5 | 4.0 |
| | Amb. | Regimen mixto | 5.5 | 4.0 |

## IX DISCUSION

1. Del cuadro No. 8 podemos notar que, el mejor medio de cultivo es el arroz, seguido del trigo, ya que es el que produce la mayor cantidad de esporas por unidad de medio; esto se debe posiblemente a que tanto el arroz como el trigo, tienen un alto valor energético, o para mejor decirlo, un adecuado valor energético, ya que a la soya contiene el más alto valor energético pero el hongo desarrolló gran cantidad de micelio y no produjo esporas esto nos hace asumir que, el valor energético puede ser limitante para la producción de esporas.

2. Los medios líquidos tuvieron resultado negativo, posiblemente porque falto aireación constante, lo cual no se pudo dar por falta del equipo necesario. Es oportuno hacer notar que todos estos medios tuvieron un comportamiento común en cuanto al excesivo desarrollo de bacterias, lo cual produjo en todos estos medios un exagerado mal olor; es posible que la contaminación bacteriana se produjo por el uso de cajas de petri desechales aunque la fetidez se detectó hasta 20 días después de hacer los preparados.

Varios autores coinciden en que los medios fluídos no son adecuados para la producción de esporas, Bartlett y Lefevre (1934); Dresner (1949); y Sawyer (1929), citados por De Bach (3) han expresado que "La producción de esporas se disminuye cultivándolas sobre un medio fluído o en un sólido en presencia de una humedad relativamente alta. La condición ideal para la producción de esporas se encontró que era un medio muy mojado pero no húmedo".

3. Del análisis de varianza del cuadro No. 9, podemos decir que el medio de cultivo y la temperatura son factores que si actúan sobre la reproducción de esporas, situación contraria nos presentó el factor luz, que no influye sobre la producción de esporas. L. Kish y G. E. Allen (13), en un estudio sobre reproducción de Nomuraea rileyi concluye que, el fotoperíodo no es limitante factor en el ciclo de vida del patógeno.

4. Cuando hablamos de los efectos producidos por los factores de temperatura y medios de cultivo, los cuadros Nos. 12 y 14 resaltan la influencia de la temperatura, la cual es obvio cuando se conoce que todas las reacciones bioquímicas son aceleradas con temperaturas elevadas pero no excesivas. Como ya se indicó, los mismos cuadros reportan un mejor desarrollo de esporas en los medios de cultivo de arroz y trigo, debido posiblemente al adecuado valor energético de los mismos. Es interesante notar que durante los meses de ensayo (mayo y junio) no hubo alteraciones bruscas de temperatura, sin embargo, a temperaturas menores de 20°C se disminuye el desarrollo micelial y la esporulación, esto se puede comprobar al revisar el cuadro No. 4, pués la media mesual fue de 19.6°C, mientras que con mayor temperatura (28°C), el resultado fue sensiblemente superior.

Resulta una interesante coincidencia con De Bach (3), en cuanto al factor temperatura, pués en su obra "Control Biológico de las Plagas de Insectos y Malas Hierbas", expresa que: "Se ha demostrado que la germinación óptima de las esporas de Beauveria bassiana se presenta a humedades relativas arriba del 94o/o y a temperaturas de 28°C". Aunque en este experimento no se midió la Humedad relativa, puede asumirse con absoluta seguridad que era arriba del 90o/o, pués siempre se observó una condensación del vapor de agua en la parte superior de las cajas de petri, o sea en las tapas.

En relación a la temperatura L.P. Kisch y G. Allen (13), también coinciden en que una normal esporulación ocurre entre 15° y 30°C, en sus trabajos de producción de Nomuraea rileyi.

5. Uno de los factores muy importantes que se consideró, fue el pH, aunque en la mayor parte de la literatura revisada no aparece; en este ensayo se constató que a valores bajos de pH, no existe adecuada reproducción ni de conidias ni de esporas. Véase cuadro No. 15. En el caso del sorgo y pulpa de café, con muy baja producción de esporas a un pH de 4.0. Es posible entonces que en estos medios se incremente la producción de esporas adicionando correctores de pH.

## X CONCLUSIONES

1. El mejor medio de cultivo, según la prueba de Tukey (cuadro No. 14) fue el arroz (Oriza sativa).

2. No hay efecto de luz sobre el desarrollo y esporulación del hongo.

3. Los medios líquidos resultaron negativos por falta de aireación constante y antisepcia.

4. La temperatura ideal de reproducción del hongo Beauveria bassiana, es de 28°C, confirmándose la experiencia de Paul De Bach (3).

5. Los factores de temperatura, luz y medio de cultivo, actúan independientemente, es decir no hay interacciones entre ellas (análisis biométrico con la colaboración del Ing. Luis Manfredo Reyes Chávez).

6. Desde el punto de vista del pH, el Beauveria bassiana, se desarrolla favorablemente entre 5.5 y 7.0.

7. En condiciones de temperatura ambiental en el medio arroz no se observó tan buen desarrollo (ANDEVA) como en condiciones de 28°C.

8. La condición adecuada para la producción de esporas es un medio húmedo, pero no con anegamiento del mismo.

9. Los medios no elaborados en condiciones de Guatemala, representan una mejor alternativa de reproducción del hongo, comparativamente con los medios elaborados (ver descripción del aislamiento).

## XI RECOMENDACIONES

1. Usar el arroz comercial como medio de reproducción de Beauveria bassiana.

2. Al trabajar con medios de cultivo, tomar todas las precauciones para evitar contaminación bacteriana.

3. Los medios de reproducción deben mantenerse a una temperatura constante de 28°C.

4. No es indispensable la reproducción en condiciones de oscuridad total o parcial.

5. El pH debe regularse entre 5.5 y 7.

6. La humedad interna del medio debe ser del orden del 90o/o.

7. Se recomienda determinar la polulación natural del entomopatógeno en todo el medio cafetalero, para ubicar y establecer un sistema de control biológico de H. hampei.

8. Es conveniente continuar las investigaciones intrínsicas del entomopatógeno; buscar otros enemigos naturales de H. hampei y determinar la sensibilidad del B. bassiana a los fungicidas que se usan en el área cafetalera, para control de enfermedades criptogámicas.

9. Investigar la influencia entomopatógena del B. bassiana, en otros insectos dañinos a la agricultura.

## XII RESUMEN

El cultivo del café en Guatemala se encuentra en una etapa difícil por las fluctuaciones del mercado internacional y la situación fitosanitaria del cultivo, en esta última la broca del fruto del café es la que más daño económico causa.

Al sufrir bajas la producción del café, el productor se ve en la necesidad de usar técnicas adecuadas para contrarrestar esa merma en la producción, haciendo uso de pesticidas agrícolas, los cuales incrementan los costos de producción y afectan el ecosistema.

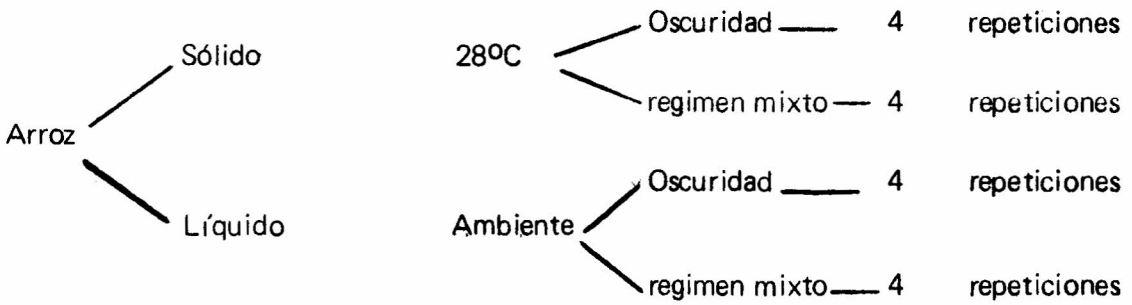
En el presente estudio, lo que básicamente se busca es determinar el desarrollo y comportamiento de Beauveria bassiana (bals) Vuill en diferentes medios de cultivo, tratando de usar aquellos productos no elaborados trigo, arroz, papa, sorgo, suya, maíz, pulpa de café) que por sus características bioquímicas y abundancia en el medio, puedan fácilmente contribuir a la reproducción del hongo en condiciones ventajosas para la utilización del entomopátogeno Beauveria bassiana como alternativa de control biológico para la broca del fruto del café.

Los materiales usados en esta investigación son: medios de cultivo, brocas infectadas, caja petri, agua destilada, etc. Dentro del equipo más importante podemos mencionar; horno de convección, incubadora, microscopio compuesto, estereoscopio, cámara de transferencia, hematocímetro, contómetro y otros.

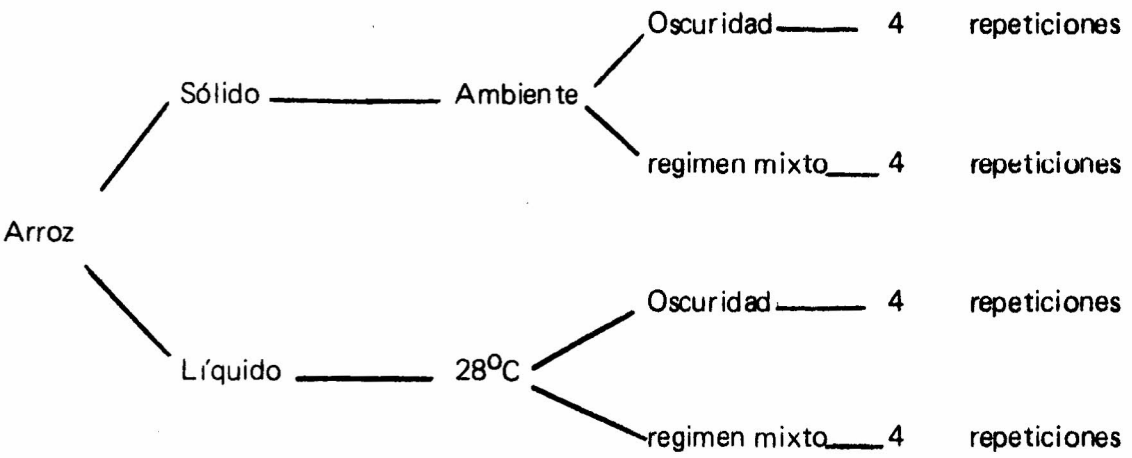
Para analizar la información obtenida en la experimentación, el modelo estadístico fue el arreglo combinatorio completamente al azar desbalanceado 7 x 2 x 2 con cuatro repeticiones conjugando los factores medios de cultivo, temperatura y luz.

## SECUENCIA DE LA EXPERIMENTACION

### FASE I




Los pasos anteriores se realizaron para todos los medios de cultivo, llegando a ser un total de 56 unidades experimentales.




Los pasos anteriores se realizaron para todos los medios de cultivo llegando a ser un total de 56 unidades experimentales. La investigación se realizó con un total de 112 unidades experimentales.

Del análisis de varianza realizado a los datos tomados en la experimentación, se concluyó:

a) El medio de cultivo influye sobre el desarrollo y esporulación del entomopatógeno;

b) La temperatura influye sobre el desarrollo y esporulación del entomopatógeno;

c) Los factores de temperatura, luz y medio de cultivo actúan independiente.

De la prueba de Tukey preacticada a los promedios de los medios de cultivo, se concluyó que el mejor medio de cultivo es el Arroz.

De la comparación realizada a los promedios de los efectos producidos por la temperatura, se concluyó que, la ideal es de 28°C, para el normal desarrollo y esporulación del entomopatógeno.

De la medición del pH en cada uno de los medios de cultivo, se observó que el mejor rango para el desarrollo y esporulación del entomopatógeno es de 5.5 a 7.0.

## XII BIBLIOGRAFIA


1. ARRIAGA, M.V. y PENADOS, R.R. Campaña contra la broca del fruto del café. Informe de labores Oct. 1978 Mar 1979. San Antonio Suchitepéquez, Guatemala, Asociación Nacional del Café, 1979. 27 p.

2. ASOCIACION NACIONAL DEL CAFE. GUATEMALA. La Asociación Nacional del Café y la caficultura en el desarrollo económico de Guatemala. Guatemala, 1981. 16. p.

3. BACH, P. De control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Trad. por Carlos Manuel Castaños. México, Compañía Editorial Continental, 1979. pp. 690-734

4. BARNETT, H.L. y HUNTER, B. Illustrated general of imperfect fungi 3rd ed Minneapolis, Minnesota, Burges Publishing Company, 1972. pp. 96.

5. BENASSY. C. Lucha biológica e integrada en la protección de plantas. España, Servicio De defensa contra plagas e inspección Fitopatológica, 1977. pp. 75-83.

6. BRAHAM, J.E. y BRESANI, R. Pulpa de café: composición tecnología y utilización. Bogota, Colombia, CIID, 1978 pp. 21.

7. CALVERT, D.J. Historia del control integrado de plagas. In control integrado de plagas en sistemas de producción de cultivos para pequeños agricultores. Turrialba, Costa Rica, CATIE–UC–USAID–OIRSA, 1979. pp. 141–150A.

8. CASTILLO S., J.L. La broca del fruto del café, Hipothenemus hampei F. y su control. Revista Cafetalera No. 217: 5–8, 1982.

9. ECHANDY, E. Manual de laboratorio para fitopatología general. México, Herrera Hermanos, 1971. pp. 21.

10. ESTRADA H., R.E. Experiencias de control biológico en Guatemala. Guatemala, s.e. 1981. 12 p.

11. HERNANDEZ P., M. y SANCHEZ A. La broca del fruto del café. Guatemala. Asociación Nacional del Café. 1971. 70 p.

12. INGUNZA, S., M.A. De Control biológico, posibilidades de su empleo contra el gorgojo de la cereza del café, Hipothenemus Ferr. (Colept: ipidae). Perú, Café Peruano, 1962. pp. 12–13.

13. KISH, L.P. y ALLEN, G.E. The biology and ecology of nomurea rilery and program for predicting its incidence on anticarse gemmatalis in soybean. s.d.e. pp. 2–5.

14. LE PELLEY, R.H. Plagas del café. Barcelona, España. Labor, s.f. pp. 121–122.

15. MONTERROSO, J.L. Evaluación del daño causado por la broca del fruto del cafeto (Hipothenemus hampei Ferr, 1867). Guatemala, DIGESA, 1981. 6 p.

16. _____ Incidencia del Beauveria bassiana sobre la broca del fruto del café (Hipothenemus hampei Ferr 1967) y su reproducción en coco (Cocos nucifera L.) en Guatemala. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. Boletín No. 6, 1981. 6 p.

17. _____ Longevidad de la broca del fruto del café (hipothenemus hampei Ferrari, 1967), bajo condiciones de laboratorio en Guatemala. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. Boletín No. 3, 1981. 9 p.

18. TICHELER, J.H.G. Estudio analítico de la epidemiología del escolitido de los granos de café, Stephanoderes hampei Ferr. en Costa de Marfil. Trad. por G. Quiceno H. Bogota, Colombia, CENICAFE, 1963. pp. 229.

19. U.S. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES Manejo y control de plagas e insectos. Trad. por Modesto Rodríguez de la Torre. México, Limusa, 1980. pp. 190–216.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA
Ciudad Universitaria, Zona 12.
Apartado Postal No. 1545
GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia .....
Asunto .....
.....

"IMPRIMASE"

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
DECANO

DR. ANTONIO A. SANDOVAL S.
D E C A N O