



**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO**

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS
NATIVAS DE *Beauveria* spp. CON POTENCIAL PARA
EL CONTROL DE *Hypothenemus hampei*,
COLECTADAS DE PLANTACIONES COMERCIALES
DE CAFÉ**

Autor(a): Bach. Gim Keith Vilchez García

Asesor(a): Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza

CO-ASESOR: Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova

Mg. Sc. Walter Daniel Sánchez Aguilar

Registro:

CHACHAPOYAS - PERÚ

2019



**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO**

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS
NATIVAS DE *Beauveria* spp. CON POTENCIAL PARA
EL CONTROL DE *Hypothenemus hampei*,
COLECTADAS DE PLANTACIONES COMERCIALES
DE CAFÉ**

Autor(a): Bach. Gim Keith Vilchez García

Asesor(a): Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza

CO-ASESOR: Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova

Mg. Sc. Walter Daniel Sánchez Aguilar

Registro:

CHACHAPOYAS - PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios en primer lugar por haberme traído a esta hermosa tierra amazonense y dado el privilegio de estudiar esta gloriosa casa de estudios que día a día forja su camino con excelencia; por darme paciencia y fuerzas cuando creí que dejaría todo en algún momento de mi vida, fue él quien inicio mi carrera y permitió que la terminara.

A mi padre por enseñarme todo lo que se en esta vida en cuanto a trabajo y sacrificio, por sus consejos y ejemplos vividos día a día aprendí que las cosas nunca son fáciles, pero nuestro camino es mejor con responsabilidad, respeto y honor.

A mi madre que siempre estuvo allí para alentarme, aun cuando las cosas parecían no tener sentido para mí, ella fue quien le dio el toque para que esa pequeña luz de esperanza se encendiera.

A mis hermanos, que, con su apoyo moral, económico y la unidad familiar estuvieron allí para mí, desde cada crítica constructiva, mi vida no sería igual sin ellos.

Gim Keith Vilchez García

AGRADECIMIENTO

A mi familia por su apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, motivándome cada día para ser mejor persona.

Al instituto de investigación INDES-CES a través de uno de sus proyectos en convenio con el PNIA: por considerar mi persona y poner su confianza para la realización de una de sus tesis de pre grado.

A mi asesor el Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza por haberme apoyado a lo largo de la ejecución del presente trabajo de investigación.

A mis co-asesores: Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova y Mg. Sc. Walter Daniel Sánchez Aguilar por cada consejo e instrucción en la fase de laboratorio, por compartir sus experiencias.

A la Ing. Nuri Carito Vilca Valqui por su apoyo incondicional y sustento estadístico en el presente trabajo de investigación.

A mis amigos que siempre estuvieron presente de alguna manera para ayudarme a resolver problemas que se presentaban al momento de la ejecución del presente trabajo: Leidy Gheraldinne Bobadilla Rivera, Nuri Carito Vilca Valqui, Jesi Patricia Arista Bustamante, Rosa María Purihuaman Vilcarromero. A ellos por estar con sus consejos y apoyo aun al momento de la redacción de este trabajo ayudándome con sus correcciones.

Gim Keith Vilchez García

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI
RECTOR

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN
VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN
VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Ing. *MSc.* ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA
**DECANO DE LA FACULTAD
DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

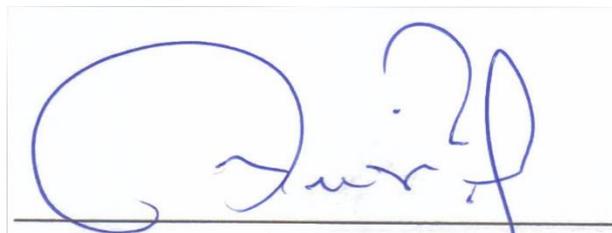
VISTO BUENO DEL ASESOR

El **Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza**, Docente de la escuela profesional de agronomía de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), deja constancia que ha asesorado el proyecto de investigación y la realización de la tesis titulada: **Evaluación y caracterización de cepas nativas de *Beauveria* spp. con potencial para el control de *Hypothenemus hampei*, colectadas de plantaciones comerciales de café**

Asimismo, avala al **Bach. Gim Keith Vilchez García**, Egresado de la escuela profesional de agronomía de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) para la presentación del informe de tesis y me comprometo a orientarlo en el levantamiento de las observaciones y la sustentación de la tesis.

Se le expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Chachapoyas, mayo del 2019



Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza

Docente FICA

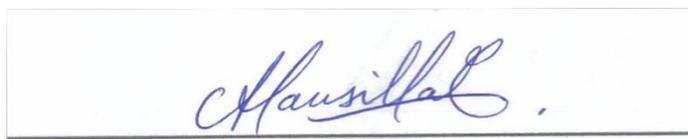
VISTO BUENO DEL Co -ASESOR

El **Doc. Pedro Javier Mansilla Córdova**, Docente de la escuela profesional de agronomía de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), deja constancia que ha asesorado el proyecto de investigación y la realización de la tesis titulada: **Evaluación y caracterización de cepas nativas de *Beauveria* spp. con potencial para el control de *Hypothenemus hampei*, colectadas de plantaciones comerciales de café**

Asimismo, avala al **Bach. Gim Keith Vilchez García**, Egresado de la escuela profesional de Ingeniería Agrónoma de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) para la presentación del informe de tesis y me comprometo a orientarlo en el levantamiento de las observaciones y la sustentación de la tesis.

Se le expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Chachapoyas, mayo del 2019



Doc. Pedro Javier Mansilla Córdova

Docente FICA

VISTO BUENO DEL Co -ASESOR

El **Mg. Sc, Walter Daniel Sánchez Aguilar**, Docente de la escuela profesional de agronomía de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), deja constancia que ha asesorado el proyecto de investigación y la realización de la tesis titulada: **Evaluación y caracterización de cepas nativas de *Beauveria spp.* con potencial para el control de *Hypothenemus hampei*, colectadas de plantaciones comerciales de café**

Asimismo, avala al **Bach. Gim Keith Vilchez García**, Egresado de la escuela profesional de Ingeniería Agrónoma de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) para la presentación del informe de tesis y me comprometo a orientarlo en el levantamiento de las observaciones y la sustentación de la tesis.

Se le expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Chachapoyas, mayo del 2019



Mg. Sc, Walter Daniel Sánchez Aguilar

Docente FICA

JURADO EVALUADOR DE TESIS



Ing. Guillermo Idrogo Vásquez
PRESIDENTE



Ing. Armstrong Barnard Fernández Jeri
SECRETARIO



Ing. Mg Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz
VOCAL

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo, **Gim Keith Vilchez García**, identificado con DNI: **60412191** estudiante de la Escuela Profesional de **Ingeniería Agrónoma** de la facultad de **Ingeniería y Ciencias Agrarias** de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

“Evaluación y caracterización de cepas nativas de *Beauveria* spp. con potencial para el control de *Hypothenemus hampei* colectadas de plantaciones comerciales de café”

La misma que presento para optar:

El título de Ingeniero Agrónomo.

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente, asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción deriven.



Bach. Gim Keith Vilchez García

DNI: 60412191

Chachapoyas, mayo del 2019



ANEXO 2-N

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 04 de Febrero del año 2019, siendo las 3:00 pm horas, el aspirante: Gim Keith Vilchez García defiende públicamente la tesis titulada: Evaluación y caracterización de cepas nativas de Beauveria spp con potencial para el control de Hypothenemus hampei, colectada de plantaciones comerciales de café para optar el Título Profesional Ingeniero Agrónomo, otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado, constituido por: Presidente: Ing. Guillermo Idrogo Vázquez Secretario: M.Sc. Armstrong Fernández Jeri Vocal: M.Sc. Segundo Manuel Olivo Cruz

Procedió el (los) aspirante (s) a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideran oportunas, las cuales fueron contestadas por el los aspirante (s). Tras la intervención de los miembros del jurado y las oportunas contestaciones del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los miembros del jurado presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes. Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

Notable o sobresaliente () Aprobado () No apto ()

Otorgada la calificación el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 5:00 pm horas del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación de la tesis.

[Signature]
SECRETARIO

[Signature]
PRESIDENTE

[Signature]
VOCAL

OBSERVACIONES:

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO . RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.....	iii
VISTO BUENO DEL ASESOR	iv
VISTO BUENO DEL Co -ASESOR.....	v
VISTO BUENO DEL Co -ASESOR.....	vi
JURADO EVALUADOR DE TESIS.....	vii
DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO	viii
ACTA DE EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	ix
INDICE GENERAL	x
INDICE DE TABLAS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
III. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1. Antecedentes de la investigación	3
3.1.1. Broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>).....	6
3.1.2. Hongos entomopatógenos	8
3.1.3. Genero <i>Beauveria</i>	10
3.1.4. Caracterización morfológica y fisiológica.....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. Materiales.....	13
4.1.1. Ubicación del área de estudio.....	13
4.2. Métodos y procedimientos	15
4.2.1. Características de la investigación.....	15

4.2.2. Evaluación y selección en fincas cafetaleras	15
4.2.3. Recolección de muestras de café cerezo atacadas por broca con presencia de <i>Beauveria</i> sp.	16
4.2.4. Etapa N°1: Aislamiento y purificación de cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp. ..	18
4.2.5. Etapa N°2: Determinación de la capacidad entomopatógena de las cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp sobre ABC.	22
4.2.6. Etapa N°3: Caracterización morfológica y fisiológica de <i>Beauveria</i> sp.	25
V. RESULTADOS	30
5.1. Selección de fincas de café con potencial de cepas nativas del hongo <i>Beauveria</i> sp e incidencia de broca del café, mayor al 15%	30
5.2. Evaluación de la patogenicidad de siete aislamientos de <i>Beauveria</i> sp.	32
5.2.1. Prueba de patogenicidad	32
5.2.2. Crecimiento micelial (micosis)	33
5.3. Caracterización morfológica y fisiológica de siete cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp... ..	35
5.3.1. Caracterización morfológica	35
5.3.2. Caracterización fisiológica	40
VI. DISCUSIÓN.....	43
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. RECOMENDACIONES.....	47
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
X. ANEXOS	53
Anexo 1: Fichas de evaluaciones	53
Anexo 2. Análisis estadístico	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje (%) de incidencia de broca del café.....	15
Tabla 2: Características generales del experimento.	24
Tabla 3: Nivel de incidencia y coordenadas de las Parcelas seleccionadas para recolección de muestras de frutos de café con presencia de ABC y <i>Beauveria</i> sp.....	30
Tabla 4. Caracterización morfológica macroscópica de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp. 35	
Tabla 5. Caracterización microscópica de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.....	36
Tabla 6. Porcentaje de germinación promedio, desviación estándar y nivel de significancia para las 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.....	40
Tabla 7. Tasa diaria de crecimiento radial, desviación estándar y nivel de significancia para las 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.....	41
Tabla 8. Nivel de esporulación para las 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.....	42
Tabla 9. Ficha de evaluación de la patogenicidad	53
Tabla 10. Ficha de datos de porcentaje de germinación de aislados de <i>Beauveria</i> sp	54
Tabla 11. Ficha de evaluación y lectura en microscopio de germinación de aislados de <i>Beauveria</i> sp	55
Tabla 12 Ficha de evaluación de la tasa de crecimiento radial de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	56
Tabla 13. Ficha de datos de promedios de tasa de crecimiento radial.....	57
Tabla 14. Ficha de datos de lectura en microscopio para evaluación de la concentración de conidios de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.....	58
Tabla 15. Datos de concentración de conidios de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	59
Tabla 16. Prueba de normalidad para aptogenicidad Shapiro-Wilks.	60
Tabla 17. Prueba de Kruskal Wallis	60
Tabla 18. Prueba de Normalidad para porcentaje de germinación Shapiro-Wilks	60
Tabla 19. Prueba de Kruskal Wallis	61
Tabla 20. Prueba de Normalidad para crecimiento radial Shapiro-Wilks	61
Tabla 21 Prueba de Kruskal Wallis	61
Tabla 22 Prueba de Normalidad para número de esporas Shapiro-Wilks	62
Tabla 23 Cuadro ANOVA para número de esporas	62
Tabla 24 Prueba Tukey para número de esporas	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Daño ocasionado en fruto	8
Figura 2. Esquema del ciclo infectivo de hongos entomopatógenos.....	8
Figura 3. Mapa de la ciudad universitaria UNTRM-A y Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal.	13
Figura 4. Mapa de ubicación geográfica (Provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas)	14
Figura 5. Protocolo de recolección de 7 muestras en campo.	16
Figura 6. Protocolo de aislamiento de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	19
Figura 7. Protocolo de cultivo monospórico de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	21
Figura 8. Protocolo de prueba de patogenicidad de 7 aislados de <i>Beauveria</i> sp hacia ABC.	23
Figura 9. Disposición de los tratamientos en el laboratorio	24
Figura 10. Protocolo de caracterización morfológica de 7 cepas de <i>Beauveria</i> sp.	26
Figura 11. Protocolo de caracterización morfológica de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	26
Figura 12. Protocolo de evaluación del porcentaje de germinación de conidios de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	27
Figura 13. Protocolo de evaluación de concentración de conidios de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	28
Figura 14. Protocolo de evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial de 7 cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	29
Figura 15. Ubicación de las 7 parcelas de muestreo en la Provincia de Rodríguez de Mendoza.	31
Figura 16. Promedios de patogenicidad de 7 tratamientos (cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.) y un testigo, sobre ABC.....	32
Figura 17. Porcentaje de mortalidad de ABC por acción de 7 tratamientos (cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.).....	33
Figura 18. Crecimiento micelial de 7 tratamientos (cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.) sobre ABC.....	33
Figura 19. Grado de micosis de <i>Beauveria</i> sp. en cuerpos de ABC según la escala convencional de la evaluación propuesta.	34
Figura 20: Características microscópicas del hongo <i>Beauveria</i> sp. (zoom 100x).	39

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de Sanidad Vegetal (LABISANV), de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, situado en la ciudad universitaria (UNTRM-A), barrio Higos Urco-Chachapoyas. El objetivo fue aislar, identificar y caracterizar cepas nativas del entomopatógeno *Beauveria* sp. con potencial para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. Se recolectaron muestras de cerezos de café de fincas productoras de café orgánico, de los distritos de Chirimoto, Omia y Huambo de la provincia de Rodríguez de Mendoza. Para lograr la identificación y caracterización se realizaron evaluaciones morfológicas y fisiológicas de diferentes aislados del hongo *Beauveria* sp. Las características fisiológicas evaluadas fueron la patogenicidad, la germinación, la esporulación y la tasa de crecimiento radial. Todas estas variables se analizaron estadísticamente con las pruebas de Normalidad de Shapiro-Wilks y prueba de Kruskal Wallis. Se aislaron siete cepas de *Beauveria* sp, que presentaron patogenicidad de 91.01% en adultos de *H. hampei*, germinación de conidios de 81.43% al término de 24 horas, tasa diaria de crecimiento radial de 1.76 mm/día y una esporulación de 21.38×10^9 conidios/ml en promedio.

Palabras claves: Caracterización, *Beauveria* sp, hongos entomopatógenos, *Hypothenemus hampei*.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the Plant Health Research Laboratory (LABISANV), of the Toribio Rodríguez de Mendoza National University of Amazonas, located in the university city (UNTRM-A), Higos Urco-Chachapoyas neighborhood. The objective was to isolate, identify and characterize native strains of the entomopathogenic *Beauveria* sp with potential for the control of the coffee borer *Hypothenemus hampei*. Samples of coffee cherry were collected from farms producing organic coffee from the districts of Chirimoto, Omia and Huambo in the province of Rodríguez de Mendoza. To obtain the identification and characterization, morphological and physiological evaluations of different isolates of the fungus *Beauveria* sp. The physiological characteristics evaluated were pathogenicity, germination, sporulation and radial growth rate. All these variables were analyzed statistically with the Normality tests of Shapiro-Wilks and Kruskal Wallis test. Seven strains of *Beauveria* sp were isolated, which showed pathogenicity of 91.01% in adults of *H. hampei*, germination of conidia of 81.43% at the end of 24 hours, daily rate of radial growth of 1.76 mm / day and sporulation of 21.38×10^9 conidia / ml on average.

Key words: Characterization, *Beauveria* sp, entomopathogenic fungi, *Hypothenemus hampei*.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente 37 millones de hectáreas son dedicados a cultivos producidos orgánicamente en el mundo, al tiempo que la comercialización global de estos alcanza un estimado de € 44.5 billones, de acuerdo al estudio “*the woel of Organic Agriculture*” de 2012. (Tudela, 2015).

A nivel mundial 1.6 millones de productores están utilizando métodos orgánicos y aproximadamente el 80% de ellos se encuentra en países en desarrollo (Tudela, 2015). En comparación a otros países en vía de desarrollo como Brasil y Colombia, el Perú no cuenta con una política económica que brinde, en su totalidad, ayuda a los productores comercializadores de café orgánico, los cuales no logran una mejora en la oferta exportable del producto. (Solís, 2017. Citado por Leiva, Roman y Rubio, 2017).

El sector cafetalero requiere una atención especial que involucre un cambio estructural dentro de las políticas públicas nacionales, requiriéndose mayor compromiso y participación que contribuya a prestar mayor atención a los pequeños agricultores, quienes están en condiciones de mayor desventaja, para mejorar su capacidad productiva y de organización (Leiva *et al.*, 2017).

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Scolytidae), es el insecto plaga más importante entre los que afectan a la caficultura en todo el mundo (Pardey, 2005).

En África, región de origen de *H. hampei*, se han estudiado diversas especies de enemigos naturales, las que se han utilizado exitosamente en programas de control biológico clásico en otras regiones del mundo, principalmente los parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* *Betrem* (Hymenoptera: Bethylidae), *Heterospilus coffeicola* *Schedeneken* (Hymenoptera: Braconidae), *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) y el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*Hyphomycetes: Moniliales*), entre otros Baker; Vega *et al.*, (Como se citó en Vázquez *et al.*, 2006).

El hongo *Beauveria bassiana* es usado para el control de un gran número de insectos plaga y es la especie de entomopatógeno comercialmente más utilizada alrededor del mundo Alves *et al.* (como se citó en Góngora, Marín y Benavides, 2009).

Rodríguez de Mendoza es una de las provincias del departamento de Amazonas, que se encuentra a 1300 m.s.n.m y se destaca por ser una de las principales zonas productoras de café en el departamento de Amazonas. La producción de la mayoría de fincas de la provincia viene siendo afectada por el insecto *Hypothenemus hampei* (Ferrari) que puede causar pérdidas de hasta 40 % de la cosecha en campo. Los caficultores se ven perjudicados y si muchas opciones, ya que no pueden hacer uso de productos sintéticos debido al sistema de producción orgánico que utilizan, el cual excluye el uso de tales sustancias.

Los agricultores orgánicos tienen como opción los controles amigables con el medio ambiente. Dichos controles se apoyan en métodos integrados para la represión de plagas y enfermedades; uno de ellos el control biológico, con el uso de microorganismos o insectos capaces de depredar o parasitar un insecto plaga que afecta el cultivo de café u otro.

La presente investigación busca una solución amigable con respecto al medio ambiente y la salud pública, optando por el trabajo con microorganismos ya conocidos por muchos estudiosos en la materia, pero desconocido aun para la gran mayoría de los pequeños agricultores; esta investigación centra su interés en el aislamiento, identificación y caracterización de nuevas cepas nativas del microorganismo entomopatógeno *Beauveria sp.* para el control de la broca del café *H hampei*.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar y caracterizar cepas nativas de *Beauveria sp* colectadas de plantaciones comerciales de café.

2.2. Objetivos específicos

1. Seleccionar fincas de café con potencial de cepas nativas del hongo *Beauveria sp* e incidencia de *Hypothenemus hampei* mayor al 15%.
2. Evaluar la patogenicidad de los aislamientos del hongo *Beauveria sp*.
3. Caracterizar morfológica y fisiológicamente aislamientos de *Beauveria sp*.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes de la investigación

En Venezuela, Cazorla y Morales (2016), estudiaron 13 aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con el objetivo de evaluar el efecto de formulaciones de conidias con bases acuosas y aceitosas (soya 50%) en ninfas estadio IV del triatómico *Rhodnius prolixus*. Se utilizó una concentración de 1×10^7 conidias/ml bajo condiciones de laboratorio (26°C, HR>90%). Dichas suspensiones se aplicaron por inmersión, realizándose las evaluaciones durante 24 días. Los resultados mostraron que las suspensiones de conidias aceitosas fueron significativamente más eficientes al incrementar la mortalidad y eficacia y disminuir el (TL)₅₀ de los aislamientos; de los cuales dos aislamientos (LF14 y LF13) demostraron mayor porcentaje de mortalidad acumulada, eficacia y menor (TL)₅₀ siendo buenos candidatos para pruebas a nivel de campo.

Suárez, (2016), en su trabajo de investigación: Caracterización de aislados autóctonos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin; realizado en Cuba, obtuvieron aislados de *B. bassiana* (Balsamo) que muestren variabilidad intraespecífica con potencialidad para el manejo de organismos nocivos de interés agrícola; realizaron además, una caracterización morfológica, evaluando el efecto de temperatura y el pH sobre la velocidad de crecimiento y la producción de conidios, así como su efectividad biológica; encontrándose entre los aislados diferencias significativas en cuanto a las características de sus colonias y el tamaño de los conidios; el aislamiento Bn alcanzó una mayor velocidad de crecimiento y producción de conidios a 25°C con valores de 3.29 mm/día y $9,8 \times 10^8$ conidios /ml. Las temperaturas entre 25 30°C fueron las más favorables para el desarrollo de los aislados.

Gerónimo, *et al* (2016), realizaron investigaciones en Tabasco, México, sobre aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* con potencial antagónico, con la finalidad de contar un medio de control de *Hypothenemus hampei*, 12 cepas se aislaron y caracterizaron según variables fisiológicas y patogénicas. El crecimiento micelial (CM), la velocidad de germinación y la producción de conidios (PdC) en agar-dextrosa de Sabouraud + 0,1% de extracto de levadura (ADS+EL), son las variables fisiológicas

consideradas y evaluadas a 25, 30 y 35 °C. Además, se evaluaron la PdC en arroz a 25 °C. Encontrando diferencias ($P < 0,001$) en el CM de los aislamientos. La temperatura favorable para el CM fue de 25 a 30 °C. El tiempo requerido para la germinación del 50% de los conidios (TG 50) varió de 12,6 a 15,9 h. El TG 90 varió de 16,9 a 61,5 h. Los mejores TG 50 y TG se obtuvieron a 25 y 30°C. La temperatura óptima para la germinación fue 30 °C. Hubo diferencias ($P < 0,001$) en la PdC en medio ADS+EL, y la temperatura óptima para la PdC fue 25 °C. Así también, hubo diferencias ($P < 0,001$) en la PdC en arroz. La efectividad 90 patogénica de los aislamientos de *B. bassiana* sobre *H. hampei* fue del 100% a las 144 h. El tiempo para matar el 50% de la población (TL50) varió de 71,8 a 104 h. Así también, el TL varió de 91,8 a 132,8 h. Las cepas nativas BbTcf9, BbTcf5 y BbTcf1, fueron seleccionadas para su evaluación en condiciones de campo.

Según Villamil, Martínez y Pinzón (2015), el gusano blanco (*Premnotrypes vorax* Hustache.) es una plaga clave en el cultivo de papa en Colombia, debido a las pérdidas en calidad del tubérculo las cuales pueden llegar hasta el 100% dependiendo del nivel de población y manejo del cultivo. La investigación tuvo como finalidad evaluar in vitro de aislamientos autóctonos de *Beauveria* spp. sobre *P. vorax*. Los aislamientos fueron obtenidos de larvas y adultos infectados de *Premnotrypes vorax*, *Tecia solanivora*, *Phthorimaea operculella*, *Aepytus* sp., *Hypothenemus hampei* y *Rynchophorus palmarum*, colectados en campo y aislados con técnicas In vitro.

De ocho aislamientos obtenidos de *Beauveria* sp, se seleccionaron cinco (Bv01, Bv02, Bv05, Bv07 y Bv08) por presentar un porcentaje de mortalidad superior al 60% sobre larvas de *P. vorax*. La evaluación de eficacia se realizó en diez larvas de *P. vorax*. Las larvas se desinfectaron y sumergieron en una suspensión de 1×10^8 , se realizaron observaciones por 16 días, cada 48 horas evaluando porcentaje de mortalidad. Se empleó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y cuatro repeticiones. Los resultados mostraron que 16 días después de la inoculación, se presentó el 100% de mortalidad de las larvas para los cinco aislamientos, siendo el aislamiento Bv07 el que presentó la mayor actividad patogénica sobre *P. vorax* In vitro.

Según Peteira *et al.* (2011), realizaron estudios de caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana*, para el proceso de un agente de control biológico como producto, estudiando su modo de acción, los metabolitos que en él participan y su expansión en las cepas del hongo, afín de garantizar conocimiento útil para la selección en Cuba. Concluyéndose que, es necesario el estudio de esta característica de diferentes aislamientos para seleccionar los más virulentos; no hubo diferencia significativa en la morfología de los conidios ni correlación de la virulencia con el tamaño de las mismas.

El estudio realizado por Pariona, Castellanos y León (2007), evidencia el aislamiento y caracterización de cuatro cepas de *B. bassiana* tomadas de ejemplares de langosta *Schistocerca piceifrons peruviana* procedente de la Provincia de Huamanga del Departamento de Ayacucho. La capacidad entomocida de las cuatro cepas fue evaluada en la langosta *Schistocerca piceifrons peruviana* los resultados muestran que dichas cepas en su totalidad producen un 100% de mortalidad, cuyo tiempo necesario para la mortalidad del 100% de los individuos describió un intervalo de 8,38 a 9,16 días.

Echeverría (2006), en su trabajo de investigación “Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (bálsamo Vuillemin)” data el aislamiento en diez diferentes zonas del país de Costa Rica, que fueron evaluadas biológicamente según (TDCR), producción de esporas y resistencia a la luz ultravioleta y patogenicidad ante *Hypothenemus hampei*; donde la (TDCR) evidenció una diferencia significativa en tres cepas; la producción de esporas reveló el comportamiento en dos tipos, los de alta y reducida esporulación y la evaluación de agresividad ante broca reveló una colonización del 100% antes de los 9 días de la exposición inicial en dos cepas. Todos los aislamientos son cepas, pocas muy relacionadas, dos muy distanciadas genéticamente. Ninguna relación biológica o geográfica pudo correlacionar con algún grupo clasificado.

Bases teóricas

3.1.1. Broca del café (*Hypothenemus hampei*)

3.1.1.1. Clasificación taxonómica

Clasificación taxonómica de la broca del café según (Ticheler, 1991) citado por (Goicochea, 2017).

Phyllum : Artrópoda

Clase : Hexápoda (Insecta)

Orden : Coleóptera

Familia : Scolytidae

Género : *Hypothenemus*

Especie : *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867. Citado por Goicochea, 2017).

3.1.1.2. Importancia económica

La broca es originaria de África. Descubierta como plaga del café en Gabón en 1901, su distribución actual es cosmopolita. La broca pasa casi todo su ciclo de vida dentro de la semilla o grano, lo cual trae consigo pérdidas directas a la producción y calidad del café. Los países productores de café más importantes del orbe tienen presentes la broca del café en sus cafetales (Barrera *et al.*, 2006).

3.1.1.3. Biología de la broca del café

La broca es un pequeño insecto escolítido monófago, con reproducción tipo espanandria, de unos 2.0 mm de longitud (Barrera *et al.*, 2006).

En 30 días, una broca fundadora puede dar origen a 35 individuos en una proporción de 10 hembras por un macho, si los insectos continúan reproduciéndose, se pueden encontrar más de 100 descendientes en una sola cereza, todos ellos emparentados, pues el apareamiento se realiza entre hermanos y hermanas (Barrera *et al.*, 2006).

Las hembras maduran sexualmente a los 3-4 días después de transformarse en adultos. (Barrera *et al.*, 2006).

En época lluviosa, cuando la reproducción es continua, se ha estimado un tiempo generacional aproximado de 45 días a 25°C, con una capacidad innata de crecimiento (Barrera *et al.*, 2006).

Los machos tienen alas atrofiadas, razón por la cual no vuelan ni participan en la colonización del hospedero (Barrera *et al.*, 2006).

3.1.1.4.Descripción del insecto

La broca tiene metamorfosis completa: huevo, larva, pupa y adulto (Barrera, 2002). Huevo: Es elíptico, cristalino y hacia la madurez es amarillento. Larva: No tiene patas, es blanca-amarillenta, con el cuerpo en forma de “C” y la parte torácica más ancha. La cabeza es de color café claro con las mandíbulas visibles y extendidas hacia adelante. Antes de convertirse en pupa, la larva pasa por un estado llamado prepupa, el cual es semejante a la larva, pero su color es blanco-lechoso, su cuerpo es menos curvado que la larva y no se alimenta. Pupa: Es de color blanco lechoso y amarillenta hacia la madurez. Presenta muchas de las características del adulto. Adulto: Es de cuerpo negro brillante, alargado, cilíndrico y ligeramente arqueado hacia la región ventral con una longitud de 1.50 a 1.78 mm. La cabeza se sitúa ventralmente y es protegida por el pronoto. Las antenas son acodadas y terminan con forma de un mazo. El aparato bucal es masticador y los élitros son convexos y presentan estrías longitudinales alternadas con series longitudinales de cerdas. Las hembras poseen alas bien desarrolladas que le permite volar con habilidad, mientras que las alas de los machos están atrofiadas. Las hembras se diferencian fácilmente de los machos porque son más grandes (Barrera, 2002).

3.1.1.5.Daño

El daño que le ocasiona la broca al fruto de café consiste en perforaciones a los frutos y caída de éstos cuando atacan frutos jóvenes (Bustillo, 2007).

Se encontró que cuando la broca ataca frutos de café de dos meses de edad, más del 50% de los frutos afectados caen de las ramas y muchos de ellos toman un color característico de la madurez; pero si el ataque ocurre después de los tres meses de edad, la caída de frutos es menor del 23,5% (Bustillo, 2007).

La pérdida de peso del café pergamino seco por causa de la broca fue en promedio de 18,1%, y los frutos que fueron atacados tempranamente tienen maduración prematura, lo cual repercute en un manchado del pergamino de los granos sanos (Bustillo, 2007).



Figura 1. Daño ocasionado en fruto Adaptado de, (Colonia, 2012).

3.1.2. Hongos entomopatógenos

3.1.2.1. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

A diferencia de otros patógenos de insectos, los hongos entomopatógenos no necesitan ser ingeridos para comenzar el ciclo infeccioso, ya que en general invaden al hospedador mediante la penetración de su cutícula (Pedrini *et al.*, como se citó en Huarte y Pedrini, 2017).

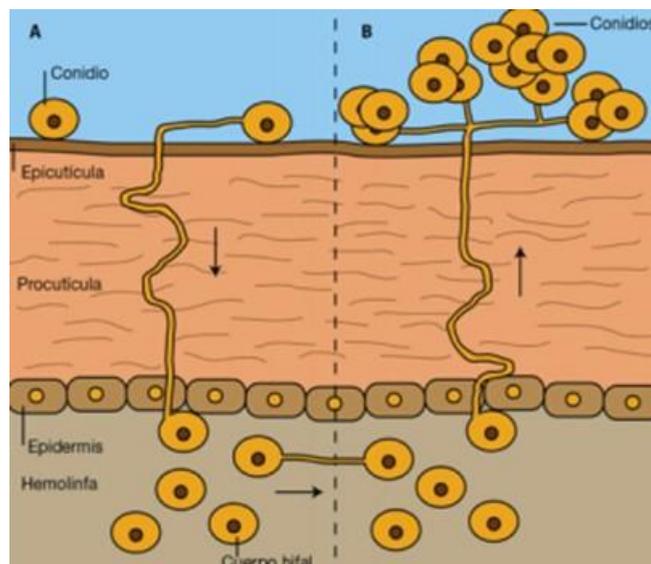


Figura 2. Esquema del ciclo infeccioso de hongos entomopatógenos.

Tomada de Huarte y Pedrini, 2017. (A) Un conidio se adhiere a la cutícula del insecto (paso 1). El conidio germina y se produce el tubo germinal (paso 2). La presión mecánica, la secreción de enzimas y la degradación de componentes cuticulares se emplean para romper la cutícula (paso 3). El hongo cambia al crecimiento de cuerpos hifales (semejantes a blastosporos) para colonizar el hemocele del hospedador (paso 4), donde secreta toxinas y se alimenta de azúcares en la hemolinfa. Los blastosporos evaden o superan las respuestas inmunes del hospedador (paso 5). (B) Después de que el huésped ha muerto (paso 6), el hongo rompe la cutícula nuevamente desde

el interior y esporula en el cadáver (paso 7). Las flechas indican la dirección del crecimiento de las células fúngicas.

a) Adhesión de la espora a la cutícula de hospedero y germinación de la espora

El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora del primero es depositada en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración Tanada *et al.*, (Como se citó en Téllez *et al.*, 2007).

b) Penetración en el hemocele

Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. (Téllez *et al.*, 2007).

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón, 2001). Estudios *in vitro* indican que en la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa Tanada y Kaya (Como se citó en Téllez *et al.*, 2007).

Se ha observado que la acción enzimática puede ser coadyuvada por la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico Bidochka y Kachatourians (Como se citó en Téllez *et al.*, 2007).

c) Replicación en el hemocele

Ya en el interior del insecto, los hongos deben enfrentarse con los mecanismos de respuesta del sistema inmune para lo cual han desarrollado estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular. Un tema muy común en la literatura de patología de insectos es la producción de toxinas por diversas especies de hongos entomopatógenos (Téllez *et al.*, 2007).

3.1.3. Genero *Beauveria*

3.1.3.1. Clasificación taxonómica

Agostino Bassi fue el primer científico en demostrar en 1835 que *Beauveria bassiana* afecta al gusano de seda "*Bombix mori*". A partir de ese momento se ha descrito varias especies de *Beauveria*, según sus características morfológicas y genéticas, tales como *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. vermiconia*, *B. velata* y *B. calendonica*. Glare e Inwood, (Como se citó en Vargas, 2003).

Clasificación taxonómica del género *Beauveria* sp. modificado de Hernández, (2016).

Reino : Fungi
Filum : Ascomycota
Subfilum : Pezizomycota
Clase : Sordariomycetes
Sub clase : Hypocreomycetidae
Orden : Hypocreales
Familia : Clavicipitacea
Género : *Beauveria*.

3.1.3.2. Morfología

Morfológicamente, *B. bassiana* forma hifas septadas de 2,5 a 25 μm de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de botella (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originales de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis. Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios

aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastosporas (Torres, 2012).

Sin embargo, independientemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas son hialinas, por lo que su apariencia es blanquizca Borrón (Como se citó en Torres, 2012).

3.1.3.3. Manejo integrado de plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) se originó como respuesta al excesivo uso de plaguicidas en la agricultura tecnificada. El MIP se define como “una estrategia de carácter preventivo y perdurable que combina varias tácticas compatibles para reducir las poblaciones de organismos a niveles que no causen pérdidas económicas importantes, con efectos negativos mínimos sobre el ambiente y la salud humana” (Briceño, 2017).

Respecto al control de *H. hampei*, Bustillo y colaboradores (1999) en Colombia, han reportado que, a nivel de campo, aspersiones líquidas de 1×10^6 esporas/ml del hongo ocasiona una mortalidad de un 30% ante *H. hampei*. En nuestro país, se obtuvo un resultado similar comparado con la cepa colombiana Bb 9205 (CENICAFE) y dos aislamientos nativos, lo cual evidencia un alto grado de virulencia de las cepas nativas. Así mismo a nivel de laboratorio, estos estudios han reportado que la mortalidad del 50% de las brocas se produce a los 6 días, incluyendo más cepas nativas, revelando, además, un alto grado de esporulación. Es mejor dispersar con esporas que con micelios, para mantener el efecto sobre el suelo y así, sobre el insecto plaga (Echeverría, 2006).

3.1.4. Caracterización morfológica y fisiológica

3.1.4.1. Caracterización morfológica

Consiste en el análisis de aspectos morfológicos a nivel microscópico, es decir, formas, colores y dimensiones de las estructuras reproductivas (cuerpos fructíferos, conidias, esporas, conidióforos, fiálides) o células vegetativas (estomas, cuerpos hifales, rizoides, cistídios). A nivel macroscópico, son

analizados caracteres, tales como: capacidad de formar sinemios, la apariencia de los cultivos en medios definidos, la forma, la coloración y el olor de las colonias (Alvarez, 2013).

3.1.4.2. Caracterización fisiológica

La caracterización fisiológica se realiza mediante la evaluación de las variables o parámetros considerados, en forma rutinaria, en el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos Vélez *et al.* (Como se citó en Vélez, Estanda, Gonzalez, Valderrama y Bustillo 2001).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Ubicación del área de estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV), situado en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, barrio Higos Urco, ciudad de Chachapoyas. Chachapoyas se encuentra ubicada a una altitud de 2.334 msnm, en el nor-oriente peruano, con una temperatura promedio 18°C y humedad relativa de 74%.

4.1.1.1. Ubicación geográfica: Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal

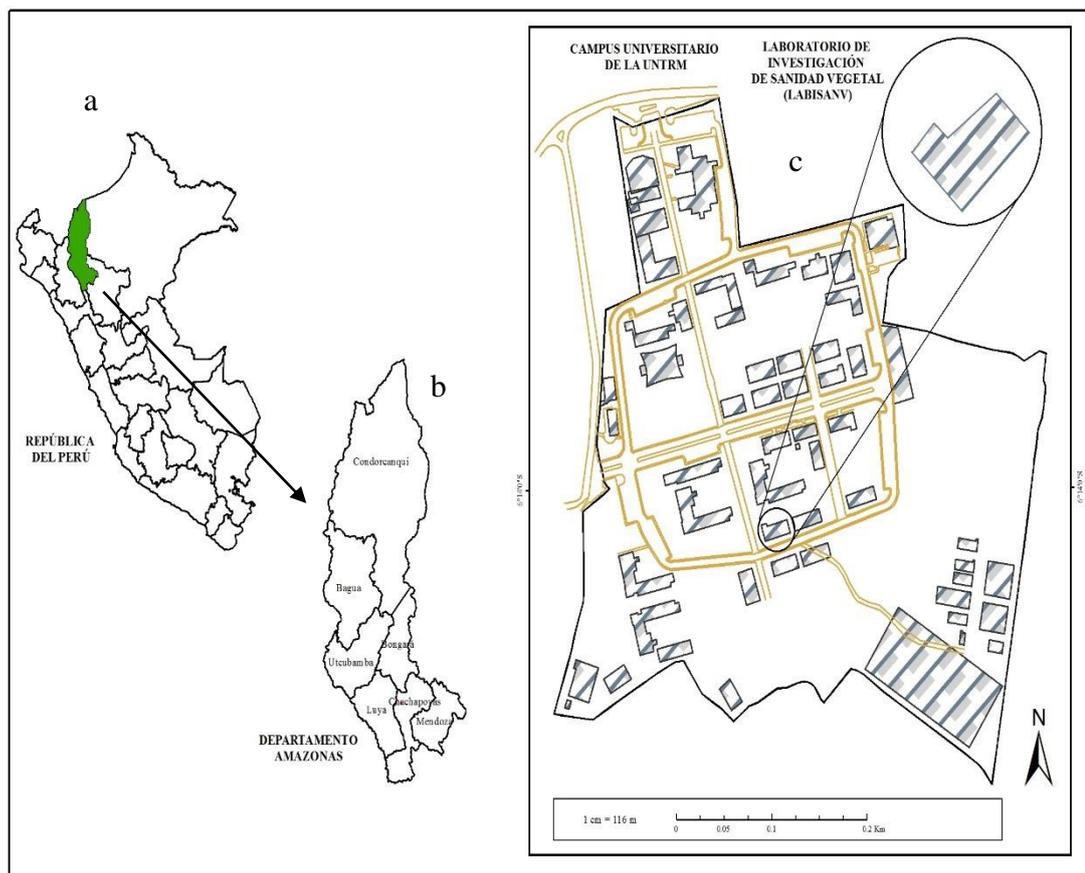


Figura 3. Mapa de la ciudad universitaria UNTRM-A y Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal. Ubicación geográfica: a) Mapa de la República del Perú, b) Mapa del Departamento de Amazonas, c) Laboratorio de sanidad vegetal ubicado dentro de la ciudad universitaria (UNTRM-A).

4.1.1.2. Ubicación geográfica de la zona de recolección de muestras biológicas.

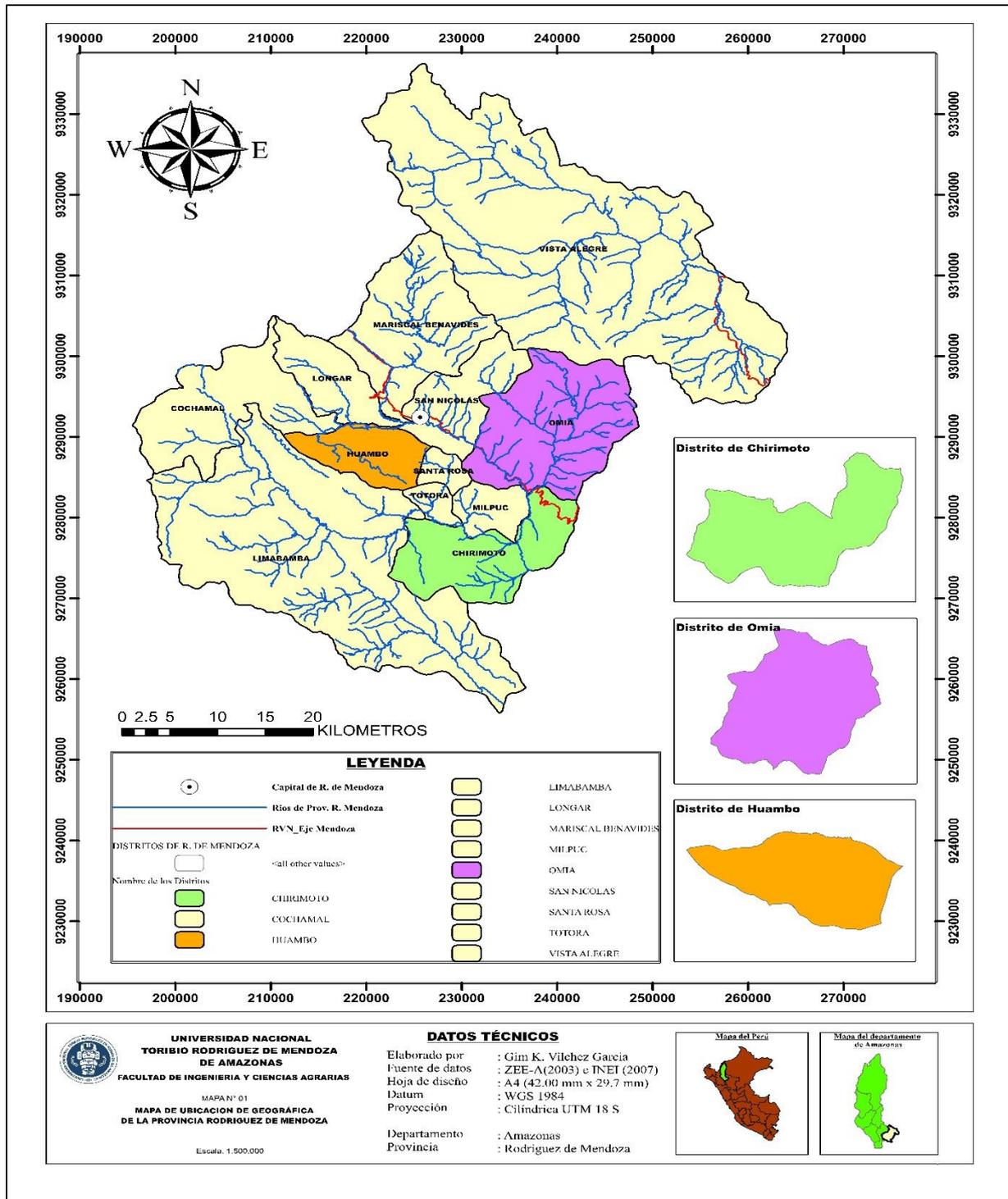


Figura 4. Mapa de ubicación geográfica (Provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas)

Área de recolección de muestras de café cerezo, caracteriza el momento y el lugar donde se recolectaron dichas muestras. Mapa geográfico de la Provincia de Rodríguez de Mendoza donde se muestra los tres distritos con diferente coloración, donde se llevó a cabo el muestreo y recolección, Mapa del distrito de Huambo, Mapa del distrito de Omia y Mapa del distrito de Chirimoto, coordenadas UTM Zona 18S.

4.2. Métodos y procedimientos

4.2.1. Características de la investigación

La investigación se efectuó en dos fases: La fase de campo (recolección de muestras) y de laboratorio; esta última se desarrolló en tres etapas complementarias unas de otras, para la selección de cepas de *Beauveria* sp con alto grado de agresividad y control de adultos de broca del café (ABC), se utilizó la prueba de patogenicidad bajo un diseño experimental en su desarrollo y evaluación.

A. Fase campo

4.2.2. Evaluación y selección en fincas cafetaleras

Para recolección de muestras de café cerezo en el presente trabajo de investigación, se realizó la selección de fincas mediante un muestreo estratificado de las parcelas. Con el desarrollo de esta prueba se obtuvo una muestra significativa del 10% de un total de 67 fincas identificadas inicialmente. Estas siete fincas fueron seleccionadas e identificadas de acuerdo al número de unidades agropecuarias que presentan cada distrito, quedando distribuidas de la siguiente manera:

Tabla 1. Porcentaje (%) de incidencia de broca del café.

Distrito	N° de fincas	% de incidencia de broca
Chirimoto	3	26%
Huambo	3	17%
Oma	1	14%

Una vez realizada la evaluación, selección, identificación y distribución de las siete parcelas, se procedió a recolectar las muestras biológicas en los tres distritos de la provincia de Rodríguez de Mendoza.

4.2.3. Recolección de muestras de café cerezo atacadas por broca con presencia de *Beauveria* sp.

En cada parcela se recolectaron 100 cerezos brocados, de los cuales fueron recuperados cuerpos vivos y muertos de ABC, en los que se observó presencia o ausencia de hongos entomopatógenos (Gerónimo *et al.*, 2016).

La recolección de las muestras se realizó de acuerdo a la técnica de muestreo estratificado que ayudó a aumentar la precisión del trabajo, dicho método permite sectorizar cada parcela en estratos, dando opción a evaluar cada estrato de forma individual; el estrato de interés a analizar estuvo conformado por las plantas de cafés bajo sombra, cuyos frutos presentaban daños por ABC y presencia de *Beauveria* sp. La muestra de frutos de café se recolectó de la parte media de la planta, como se muestra en el protocolo de recolección de muestras en campo (Figura 5).



Figura 5. Protocolo de recolección de siete muestras de café cerezo en campo.

(a) Diseño del muestreo estratificado en campo, (b) Evaluación de incidencia de ABC, (c) Geo-referenciación de la parcela, (d) Recolección de muestras de cerezo de café, destinadas al laboratorio.

Para el muestreo estratificado, los principales estimadores vienen dados por las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} \text{Total:} & \hat{x} = \sum_{h=1}^k N_h \bar{x}_h \\ \text{Media:} & \hat{x} = \sum_{h=1}^k w_h \bar{x}_h = \sum_{h=1}^k \frac{N_h}{N} \bar{x}_h \\ \text{Proporción:} & \hat{p} = \sum_{h=1}^k w_h \hat{p}_h \end{aligned}$$

Donde:

Xh: Es la media muestral de la variable X en el estrato h.

Nh: Es el tamaño del estrato h.

N: Es el poblacional.

nh: Es el tamaño muestral de la variable en el estrato h.

n: es el tamaño muestral.

Ph: Es la proporción de la variable en el estrato h y la estimación del error que cometemos al estimar los parámetros poblacionales viene dado por:

$$\begin{aligned} \text{Total:} & \hat{v}(\hat{x}) = \sum_{h=1}^k N_h^2 (1 - f_h) \frac{s_h^2}{n_h}, \\ \text{Con} & f_h = \frac{n_h}{N_h} \text{ y } s_h^2 = \frac{n_h}{n_h - 1} \left[\frac{1}{n_h} \sum_{i=1}^{n_h} X_{hi}^2 - \bar{x}_h^2 \right] \\ \text{Media:} & \hat{v}(\hat{p}) = \sum_{h=1}^k w_h^2 (1 - f_h) \frac{\hat{p}_h \hat{q}_h}{n_h - 1}, \\ \text{Proporción:} & \hat{v}(\hat{p}) = \sum_{h=1}^k w_h^2 (1 - f_h) \frac{\hat{p}_h \hat{q}_h}{n_h - 1}, \end{aligned}$$

B. Fase laboratorio

4.2.4. Etapa N°1: Aislamiento y purificación de cepas nativas de *Beauveria* sp.

a). Aislamiento de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

Los aislamientos de las siete cepas de *Beauveria* sp. fueron realizados de los cuerpos de ABC recuperados de cerezos de café, de muestras colectadas en campo de fincas cafetaleras identificadas.

En el aislamiento, se realizó la limpieza y desinfección de los cuerpos de ABC, para lo cual los insectos extraídos de los cerezos de café fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 0,5%, durante 5 minutos para su desinfección superficial, seguidamente se enjuagaron con agua destilada estéril, luego los insectos se colocaron individualmente en cámaras húmedas (90% HR y 25 °C) para ser incubadas durante 8 días y así brindarle al hongo entomopatógeno un ambiente favorable, permitiendo su desarrollo en los cuerpos de ABC (Gerónimo *et al.*, 2016).

Al segundo día de incubación, se inició la observación periódica a cada una de las cámaras húmedas; los individuos donde se detectó crecimiento de micelio del hongo *Beauveria* sp, fueron apartados y se realizó la transferencia del micelio a placas petri que contenían medio de cultivo papa agar dextrosa (PDA), la técnica empleada en esta acción fue la siembra por agotamiento; todo esto se realizó bajo condiciones asépticas. Una vez que aparecieron las colonias del hongo, se realizaron repiques (nueva siembra del micelio). Estos repique se realizaron tomando micelio del borde de la colonia anteriormente sembrada, sembrándola en una nueva placa con PDA, hasta lograr colonias puras para cada uno de los aislamientos (Villamil y Martinez, 2014).

Como se muestra en la figura 6 (Protocolo de aislamiento de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.).



Figura 6. Protocolo de aislamiento de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

(a) Muestras codificadas, (b) Extracción de insectos infectados, (c) Desinfección de muestras, (d) Incubación de la cámara húmeda.

b). Cultivo monospóric

Para el desarrollo de esta actividad se utilizó la metodología descrita por (Echeverría, 2006) con algunas modificaciones.

Se preparó medio de cultivo semi-sólido que contenía papa agar dextrosa (PDA). Cada cultivo multiespóric obtenido del aislamiento inicial, fue mantenido en crecimiento y desarrollo entre 15-21 días a 25°C y una humedad relativa del 70%; de cada cultivo se realizó la extracción de sub muestras en una cámara de flujo laminar, con un saca bocado de 5mm² se extrajo la cantidad de tres unidades (discos). Esto se realizó de la superficie de la colonia donde se visualizó el crecimiento del hongo y esporulación en forma notoria para luego ser depositado en un tubo de ensayo de 15 ml de volumen, el cual contenía 9 ml de agua destilada estéril.

Una vez añadidas las tres sub muestras a cada tubo de ensayo, éstos se agitaron fuertemente en un vórtex digital aproximadamente por 3 minutos, todo esto con la intención de desprender las esporas del medio de cultivo y homogenizar la solución. Posteriormente se realizó una dilución seriada para permitir la

cuantificación de las esporas/ml, realizándose una prueba piloto con tres aislados y sus diluciones correspondientes.

Para esto se tomó 1 mililitro del tubo de solución madre y se procedió a diluir hasta la cuarta y quinta dilución con un factor de 10^{-1} , luego de culminar con este proceso, se extrajo 200 μ l de cada tubo cuya concentración era de 10^{-4} y 10^{-5} , el volumen extraído fue depositado en un micro tubo de plástico de centrifugación de 1 ml de volumen, luego de esto se añadió 800 μ l de agua destilada estéril para completar el volumen de micro tubo; este proceso fue repetido para cada muestra; ya en esta etapa la muestra estaba lista para ser sembrada en medio de cultivo PDA.

Una vez obtenida la dilución final en el micro tubo eppendorf, se realizó la siembra, tomando con una micropipeta el volumen de 50 μ l de solución conidial y depositándola sobre la superficie del medio de cultivo PDA luego de esta acción, con una espátula de Drigalsky se diseminó por toda la superficie de la placa para asegurar un distanciamiento entre esporas al momento de la germinación; Se envolvieron las placas con papel bond estéril y se trasladó a una incubadora a 25°C y 70% HR, durante 24 horas. Se realizaron tres repeticiones para cada aislamiento. Este proceso de siembra se realizó en una cámara de flujo laminar para asegurar un nivel bajo de contaminación.

Transcurrido el tiempo promedio de incubación, se observó de forma directa el reverso de cada placa en busca de esporas en proceso de germinación, de forma individual, luego de esto se corroboró en el microscopio para precisar la ubicación de las esporas, las cuales fueron resaltadas con un marcador indeleble para su fácil localización al momento de realizar la extracción del área donde se encontraba dicha espora, para ser trasladada a una nueva placa Petri con PDA donde completaron su desarrollo fisiológico. Cabe resaltar que los resultados obtenidos en dicha prueba piloto fueron decisivos para la estandarización del proceso monospórico ya que se logró obtener un rango entre dos a siete esporas germinadas por placa petri, de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} respectivamente, optando por realizar el mismo proceso con todos los aislados en estudio, pero

con la dilución 10^{-4} ya que nos aseguraba una mayor cantidad de esporas germinadas para el trabajo, evitando así el peligro de la pérdida total del material y tiempo que se corría con la dilución 10^{-5} ya que su concentración de esporas era muy baja, entre dos a tres esporas y en ocasiones cero.

Una vez obtenida la espora individual germinada; en la cámara de flujo laminar y con ayuda de un saca bocado de acero inoxidable se cortó el área delimitada, con una punta flameada se extrajo y se colocó un disco en una nueva placa Petri con PDA recién preparada y gelificada. Se dejaron en incubación bajo las mismas condiciones anteriores, durante 15 días para su completo desarrollo fisiológico, como se observa en la figura 7 (Protocolo de cultivo monospórico de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.).



Figura 7. Protocolo de cultivo monospórico de siete cepas nativas de *Beauveria* sp. (a) Colonia multiespórica de *B* sp, (b) Materiales empleados en el proceso, (c) Preparación de los tubos para dilución seriada, (d) Proceso de dilución seriada, (e) Siembra en cámara de flujo laminar, (f) Detección de la espora germinada en microscopio, (g) Espora germinada a partir de una sola célula, (h) germinación después de 48 horas 4ta y 5ta dilución, (i) proceso final, obtención de la colonia pura a partir de una sola espora.

4.2.5. Etapa N°2: Determinación de la capacidad entomopatógena de las cepas nativas de *Beauveria sp* sobre ABC.

a). Recolección de muestras. Las muestras de cerezos de café fueron recolectadas de fincas anteriormente seleccionadas las cuales presentaban incidencia de ABC mayor al 15 %. Posteriormente las muestras fueron llevadas al laboratorio donde se realizó la recuperación de ABC de buena movilidad, para la respectiva prueba y evaluación.

b). Prueba de patogenicidad. Se evaluó la patogenicidad según el trabajo descrito por (Gerónimo *et al.*, 2016) con algunas modificaciones.

Para el ensayo en laboratorio se usaron siete tratamientos (aislados del hongo *Beauveria sp*) y un testigo el cual fue considerado como un tratamiento más (T0), tratado solo con agua destilada estéril. Para la aplicación de *Beauveria sp* a los siete tratamientos se utilizó el método de inmersión, que consiste en sumergir 10 ABC colocadas dentro de una malla de tela, en una solución de cloro al 0.01%, por un minuto, para su desinfección; luego fueron sumergidas en 100 ml de agua destilada durante otro minuto para eliminar los residuos de cloro. Una vez desinfectadas se sumergieron las brocas durante un minuto en una solución de 10 ml de agua con esporas de *Beauveria sp*. a razón de 1×10^6 UFC/ml de agua. (UFC= Unidad formadoras de colonias).

Luego de la inoculación de las esporas en ABC, se utilizaron nuevas placas Petri, donde se introdujo un papel filtro estéril y humedecido, en la base de cada placa Petri, para luego colocar los ABC inoculados utilizando un pincel, a razón de 10 ABC por plato y cinco granos de café, para evitar canibalismo entre ellas y muerte por hambre. Cada placa Petri se envolvió con papel parafina y fueron rotulados con códigos por tratamiento y repetición para los conteos posteriores. Las placas Petri fueron colocadas en un ambiente de incubación a 28 °C por siete días. Todos los días, con un atomizador se roció el papel filtro con agua destilada estéril para mantenerle la humedad relativa sin saturar de agua. Como se puede observar en la figura 8 el protocolo de prueba de patogenicidad de *Beauveria sp*. hacia ABC.



Figura 8. Protocolo de prueba de patogenicidad de siete aislados de *Beauveria sp* hacia ABC.

(a) Identificación y recolección de muestras en campo, (b) Muestras en laboratorio, (c) Extracción de ABC vivos, (d) Desinfección e inoculación a adultos de *H. hampei*, (e) Muestras rotuladas listas para el proceso de incubación, (f) Grado de micosis evaluado en cada aislado. (g) Disposición por bloques en las incubadoras.

• Diseño experimental

Se trabajó con un diseño en bloques completos al azar (DBCA), donde se distribuyó los siete tratamientos T1, T2.....T7 (aislados de *Beauveria sp.*) más un control o testigo (T0), con 3 repeticiones cada uno, haciendo un total de 24 unidades experimentales, cada unidad experimental representó una placa petri de 9 cm de diámetro. Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks y Prueba de Kruskal Wallis.

• Población

La población a estudiar fue conformada por el total de placas Petri, donde se evaluó el efecto in vitro de cepas de *Beauveria sp* con potencial de biocontrol sobre ABC.

• Muestra

Se evaluaron 24 placas Petri, (cada placa Petri de 9 cm de diámetro fue una unidad experimental.) para el presente estudio.

Tabla 2: Características generales del experimento.

Diseño en bloques completos al azar	
Bloques	3
Tratamientos	7
Nº de unidades experimentales	24
Área de la unidad experimental	64 cm ²
Placas por bloque	8 de 9 cm de diámetro
Número de placas petris a evaluar	24

Fuente: Elaboración propia.

• **Disposición en laboratorio**

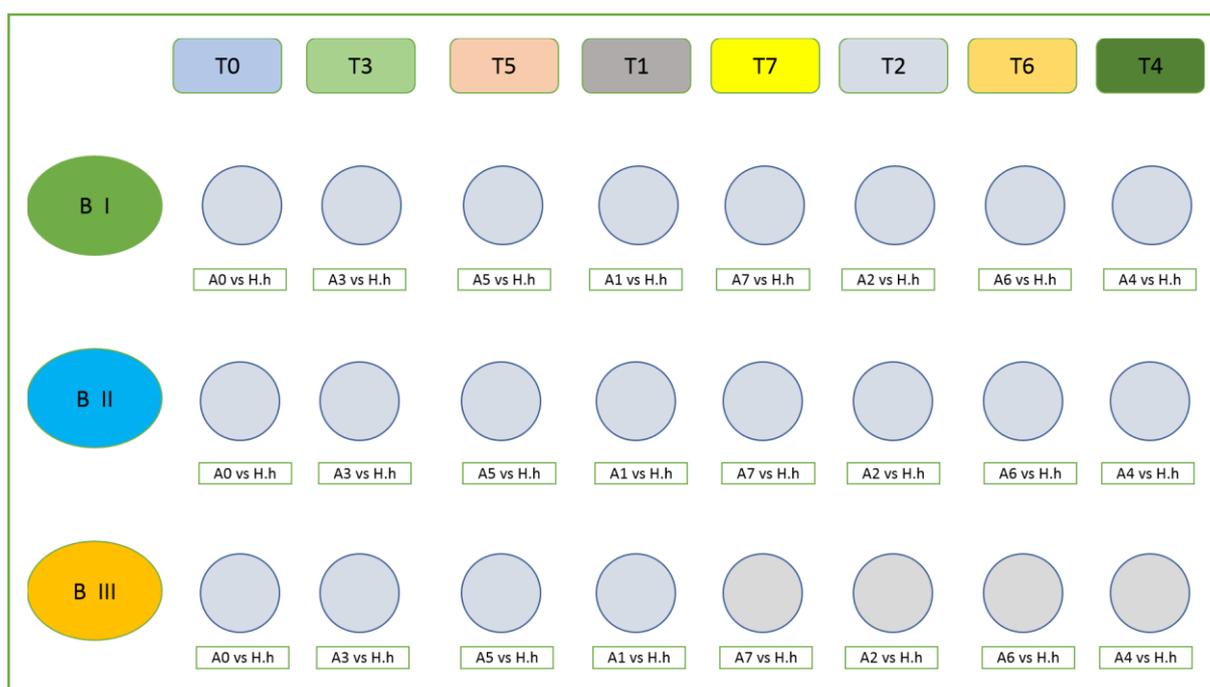


Figura 9. Disposición de los tratamientos en el laboratorio

DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA 9			
T1	Aislado <i>Beauveria</i> sp P6	T6	Aislado <i>Beauveria</i> sp F59
T2	Aislado <i>Beauveria</i> sp P15	T7	Aislado <i>Beauveria</i> sp P20
T3	Aislado <i>Beauveria</i> sp F38		Unidad experimental (placa Petri)
T4	Aislado <i>Beauveria</i> sp F42		Codificación de unidad experimental
T5	Aislado <i>Beauveria</i> sp F58		Codificación de bloque (BI, BII, BIII)

- **Evaluación de las variables.** La unidad experimental fue representada con 10 ABC por placa Petri, para un total de 30 ABC por tratamiento, al séptimo día de la inoculación se procedió a evaluar los tratamientos.
- **Porcentaje de mortalidad ABC.** Esta variable fue evaluada monitoreando la mortalidad de los adultos de *H. hampei* en cada tratamiento y comparando con el tratamiento testigo. El porcentaje de mortalidad corregida, mediante la fórmula de Abbott corregida:

$$\%MC = (\% \text{ de mortalidad obtenida} - \% \text{ de mortalidad testigo} / 100 - \% \text{ de mortalidad testigo}) \times 100$$

$$\%MC = \text{Porcentaje de mortalidad corregida. (Echeverría, 2006).}$$
- **Crecimiento de micelio del hongo *Beauveria* sp. en ABC inoculados.** En esta variable se midió el crecimiento de micelio del hongo en el cuerpo del insecto, en cada tratamiento y testigo, determinando el porcentaje de individuos infectados con evidencia de micosis. El tratamiento testigo, es decir los insectos tratados con agua destilada estéril, no deberían presentar una mortalidad mayor al 10 % tampoco signos de micosis.

Una vez realizada la prueba de patogenicidad para observar la actividad entomocida y control de ABC, los aislados de *Beauveria* sp. quienes en su totalidad superaron el 80% de mortalidad, fueron sometidos a las pruebas que se describen a en la “Etapa N°3”.

4.2.6. Etapa N°3: Caracterización morfológica y fisiológica de *Beauveria* sp.

A. Caracterización morfológica

- a) **Morfología macroscópica.** Para la caracterización macroscópica se utilizó la metodología descrita en el trabajo de Castillo *et al.*, (2012). Se realizó una siembra en una nueva placa Petri con PDA, depositando micelio del hongo en el centro de la placa por el método de punción, utilizando una aguja de siembra flameada, luego se incubó la nueva siembra a 25°C durante 15 días. Se registro color de las colonias, aspectos, superficie y pigmentación del medio de cultivo como se observa en la figura 10. (Protocolo de caracterización morfológica de *Beauveria* sp.).

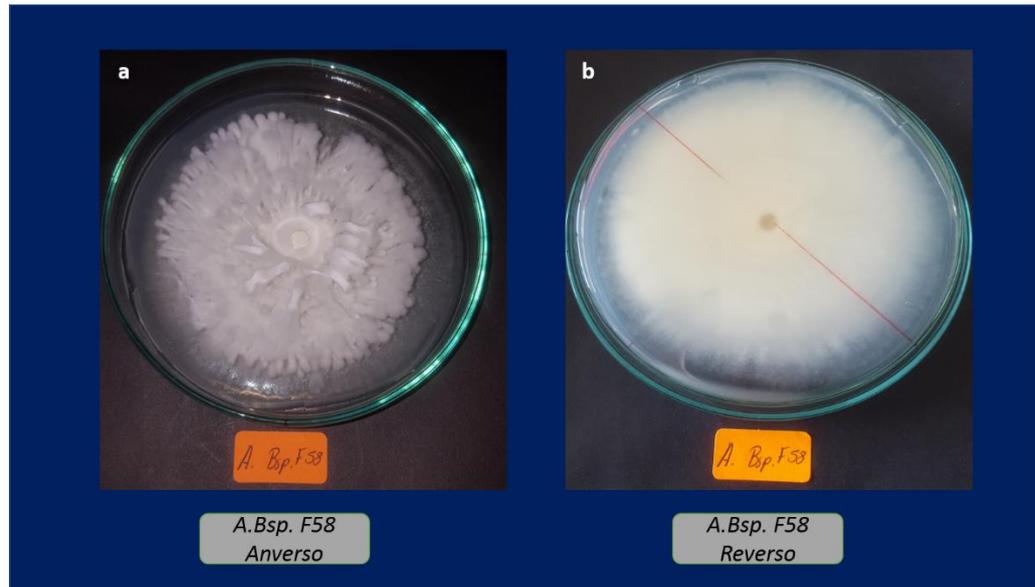


Figura 10. Protocolo de caracterización morfológica de siete cepas de *Beauveria* sp. (a) forma y diseño de la superficie de la colonia, (b) Pigmentación del medio de cultivo PDA en el reverso de la placa Petri.

b) Morfología microscópica. La micro estructura del hongo entomopatógeno se determinó con la ayuda de un microscopio-estereoscopio invertido, como se muestra en la figura 11 (Protocolo de caracterización morfológica de *Beauveria* sp.) para lograr un posible descarte de microorganismos cuyas estructuras no son características del género *Beauveria*.

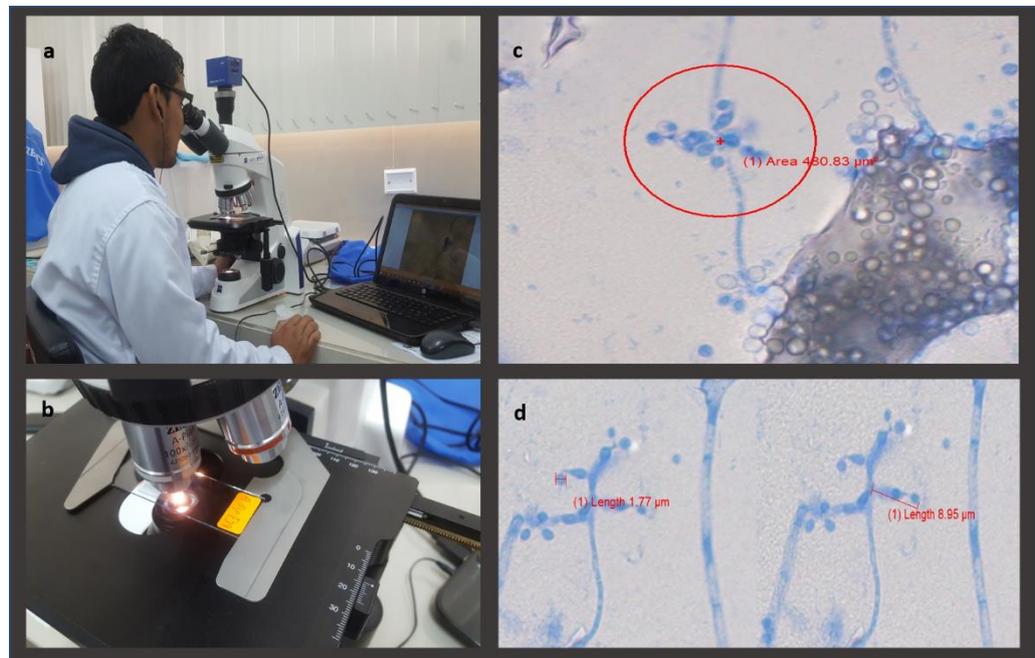


Figura 11. Protocolo de caracterización morfológica de siete cepas nativas de *Beauveria* sp. (a) Observación directa en el microscopio, (b) Procesamiento y rotulación de muestra, (c) Micro estructuras del entomopatógeno *Beauveria* sp., (e) Medición de las estructuras.

B. Caracterización fisiológica

a) **Porcentaje de germinación.** Siguiendo la metodología descrita por Estrada, Vélez, Restrepo y Pardey (1999) con algunas modificaciones. Se tomó una muestra del micelio de cada aislado fisiológicamente maduro en su desarrollo, para ser sometido a un proceso de dilución, seguidamente de la dilución 10^{-2} esporas/ml se tomaron cinco alícuotas de 5 μ l cada una y se depositaron sobre la superficie de una placa Petri con PDA y se incubaron. Cada alícuota simbolizó una repetición para cada aislado, una vez concluido el tiempo de 48 horas de incubación se procedió a realizar el conteo de esporas germinadas y no germinadas, cada alícuota fue teñida con azul de lactofenol para detener la germinación y dar mayor contraste y visualización de la muestra en el microscopio. Se cortó con un bisturí estéril y se depositó en una lámina porta objeto, el conteo en microscopio se realizó en cinco campos de lectura para cada alícuota; cada espora se consideró germinada cuando su tubo germinativo superó el diámetro de la espora, dicha observación se realizó con un aumento 60X. Como se observa en la figura 12 (Protocolo de evaluación del porcentaje de germinación de conidios de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.).

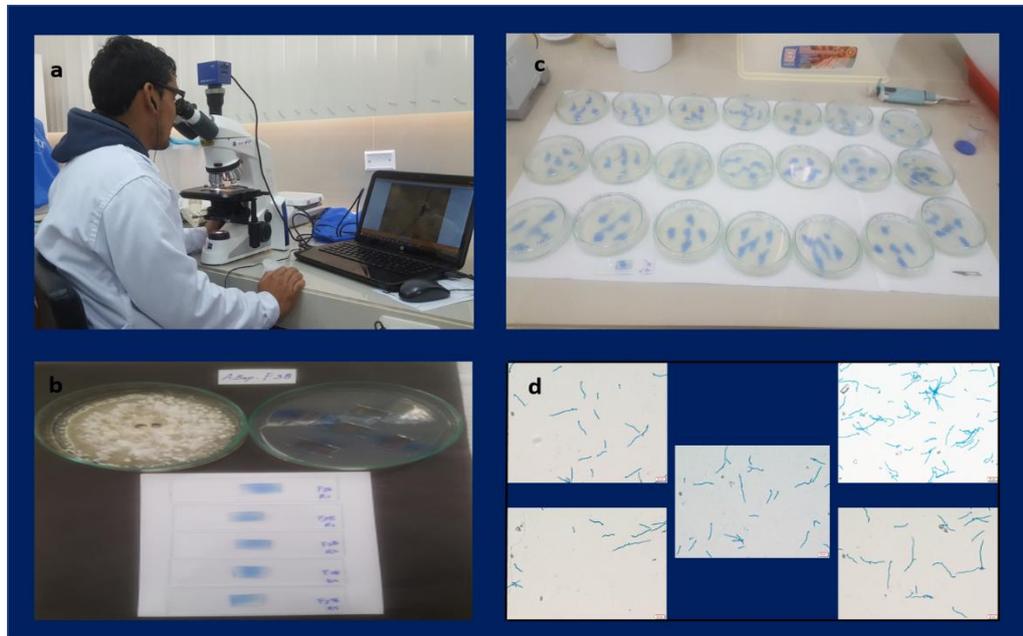


Figura 12. Protocolo de evaluación del porcentaje de germinación de conidios de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

(a) visualización en el microscopio, (b) Muestras rotuladas por repetición (c) Muestras con sus respectivas repeticiones en proceso de tinción, (e) cinco campos de lectura en el microscopio para obtener el porcentaje de germinación.

Posteriormente el porcentaje de germinación se determinó mediante la fórmula
Porcentaje de germinación: (N° de conidias germinadas/ N° total de conidias)
x 100

b) Producción de conidios (esporulación). Se utilizó la metodología descrita por Vélez, *et al.* (2000). Donde se tomó estructuras de *Beauveria* sp. (micelio) en desarrollo entre 20 a 25 días de incubación, para realizar la lectura de concentración conidial utilizando una cámara de Neubauer. Con sacabocado de acero inoxidable de 5mm^2 , se extrajo dos discos de PDA con micelio, luego se colocaron en un tubo de ensayo y se añadió 9ml de agua destilada estéril y Tween 80 al 1%, a continuación, se realizaron diluciones en un factor de 0.1, llegando hasta la dilución 10^{-5} donde se inició el conteo para determinar la concentración (conidios/mililitro) de la solución inicial. Todo esto se realizó para cada aislado y sus respectivas repeticiones que fueron cinco para cada uno, los campos de lectura registrados en la cámara de Neubauer fueron cuatro por repetición. Como se observa en la figura 13 (Protocolo de evaluación de concentración de conidios de *Beauveria* sp.).

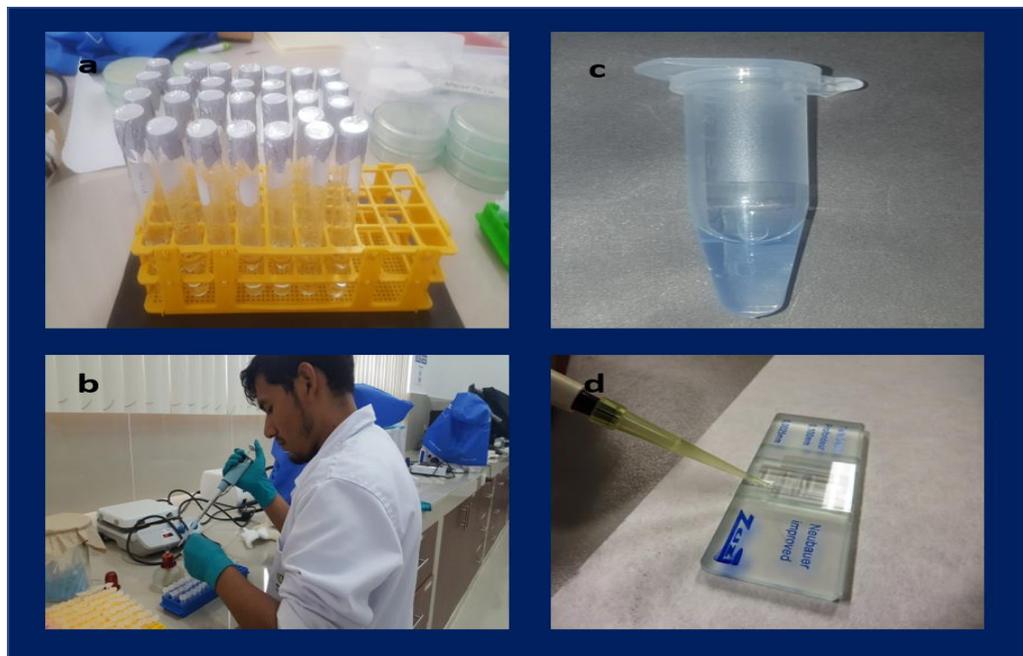


Figura 13. Protocolo de evaluación de concentración de conidios de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

(a) Muestras listas para el proceso de dilución seriada, (b) proceso de dilución seriada, (c) toma y tinción de la alícuota para ser observada en la cámara de Neubauer, (d) Portación de la muestra en la cámara de Neubauer.

Fórmula para determinar la concentración de conidios de *Beauveria* sp:

$C = N \times \text{Factor de dilución} \times \text{Factor de la cámara}$

N: Número de conidios contabilizados

- c) **Crecimiento radial (Tasa Diaria de Crecimiento Radial).** Del proceso de cultivo monospórico se tomó un conidio para depositarlo en una placa Petri con PDA, luego se llevó a incubación para registrar el crecimiento radial de la colonia. A partir del segundo día se midió el radio mayor y radio menor del crecimiento micelial de la colonia hasta el día número 15 de su desarrollo en incubación, esto se realizó para cada uno de los aislados y sus cinco repeticiones, se optó por este procedimiento para que ninguna concentración de esporas en exceso o deficiente influyera el crecimiento de alguno de los aislados o repeticiones, para poder ser más preciso en la medición de la tasa diaria de crecimiento radial, la cual fue registrada en (mm/día), como se observa en la figura 14. Protocolo de evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial.

Para el análisis de la información se consideró la tasa promedio de crecimiento diario de cada uno de los aislados evaluados según lo descrito por Vélez, *et al.* (2000).

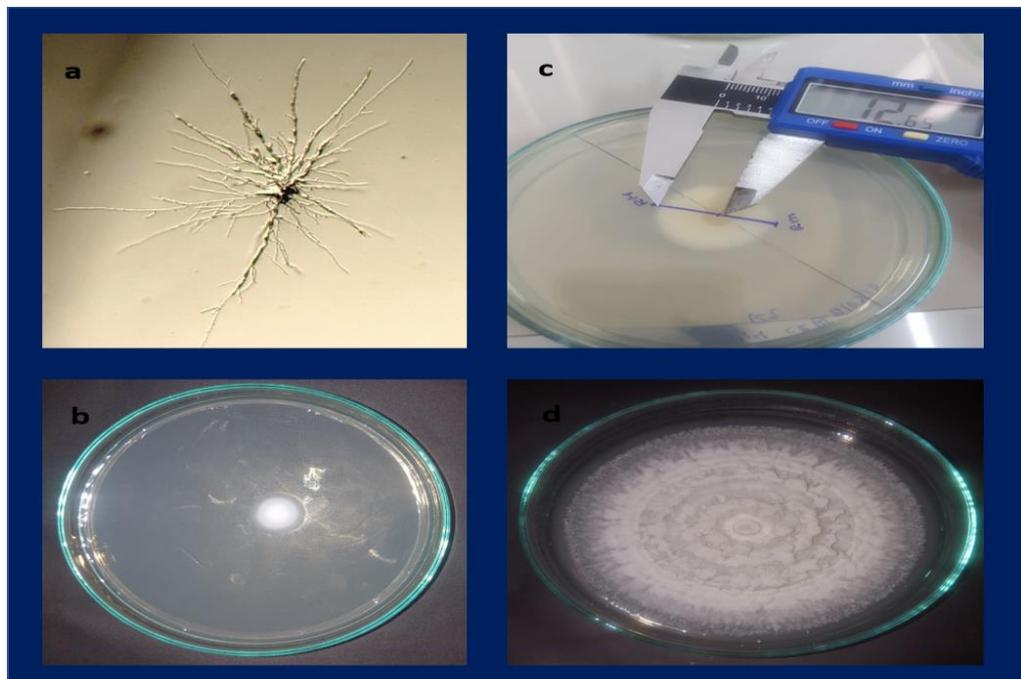


Figura 14. Protocolo de evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

(a) Identificación de la mono espora para el crecimiento radial, (b) Visualización del crecimiento micelial, (c) Medición del crecimiento radial, (d) Crecimiento en plenitud de la colonia de *Beauveria* sp.

V. RESULTADOS

5.1. Selección de fincas de café con potencial de cepas nativas del hongo *Beauveria* sp e incidencia de broca del café, mayor al 15%

Se identificaron siete parcelas con cultivo de café en los distritos: Omia, Chirimoto y Huambo; en las cuales se encontraron niveles de incidencia de daños causados por ABC, incidencia que superó ampliamente el nivel establecido (15%) por la investigación para la selección de la parcela.

Las parcelas seleccionadas fueron acondicionadas y deshierbadas, y para su identificación visual de estas se colocaron letreros y cintas para su fácil ubicación en futuras recolecciones de muestras de café cerezo.

Tabla 3: Nivel de incidencia y coordenadas de las Parcelas seleccionadas para recolección de muestras de frutos de café con presencia de ABC y *Beauveria* sp.

Código	Distrito	Sector	Altitud	Coordenadas		Incidencia de <i>H. hampei</i>
				Este	Norte	
P6	OMIA	Líbano	1280	253967	9265769	41%
P15	CHIRIMOTO	Chirimoto	1461	234294	9272061	47%
F38	CHIRIMOTO	Paraíso	1197	236611	9273404	46%
F42	CHIRIMOTO	Virgen del Carmen	1313	236951	9271363	80%
F58	HUAMBO	Dos Cruces	1668	218157	9289224	22%
F59	HUAMBO	Escobar	1666	218022	9289717	32%
P20	HUAMBO	Huambo	1629	217954	9289153	48%

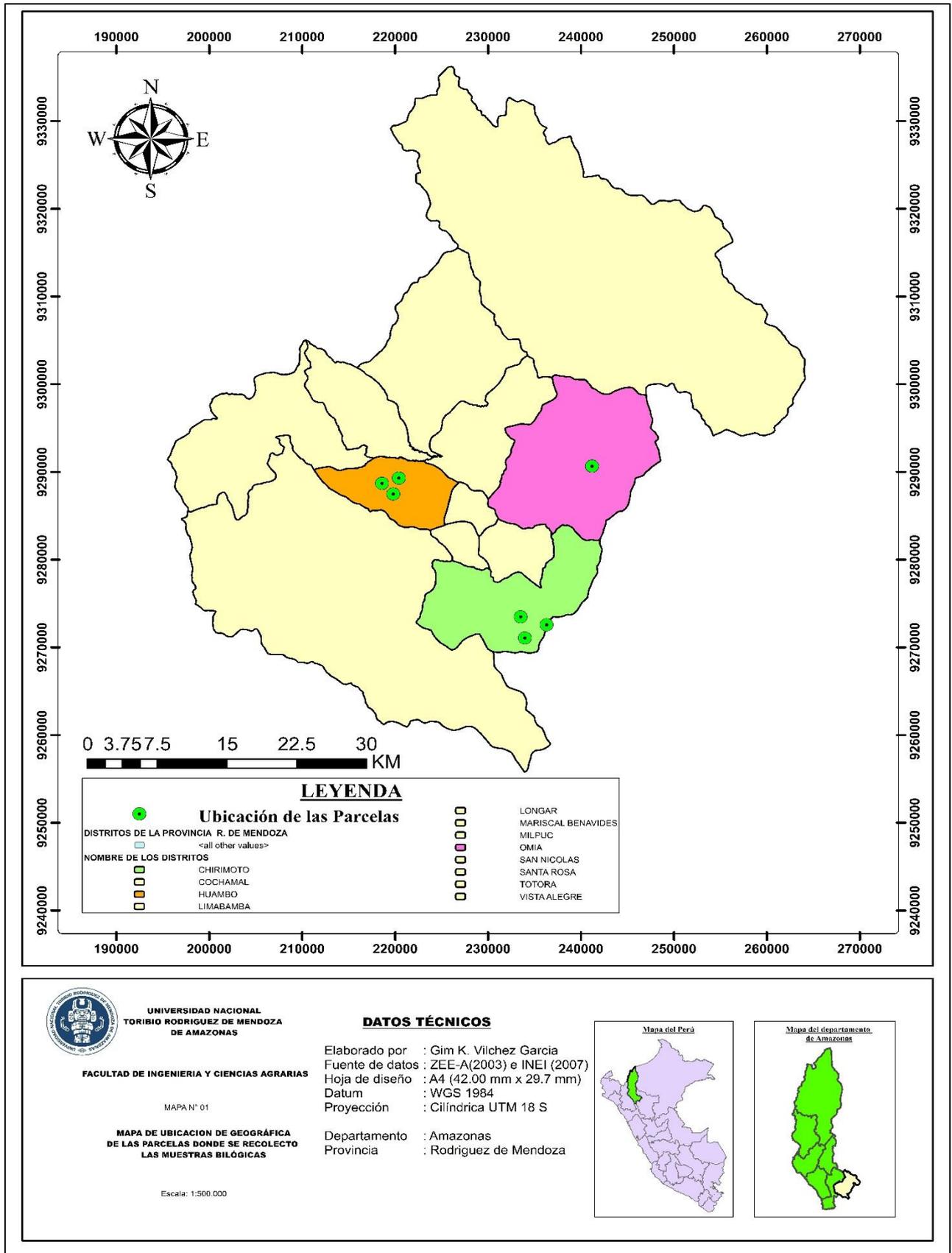


Figura 15. Ubicación de las siete parcelas de muestreo en la Provincia de Rodríguez de Mendoza.

5.2. Evaluación de la patogenicidad de siete aislamientos de *Beauveria* sp.

5.2.1. Prueba de patogenicidad

En la figura 16 se observa los promedios de patogenicidad de *Beauveria* sp. sobre ABC, todos los tratamientos alcanzaron valores por encima del 88% de mortalidad. Los tratamientos T2, T3, T5 y T7 fueron los que numéricamente superaron a los tratamientos T1, T4 y T6, los que igualaron en promedio de mortalidad con 88.85%.

Luego de someter los resultados a las pruebas estadísticas de Shapiro-Wilks y Kruskal Wallis, los datos muestran la existencia de una diferencia significativa entre los tratamientos.

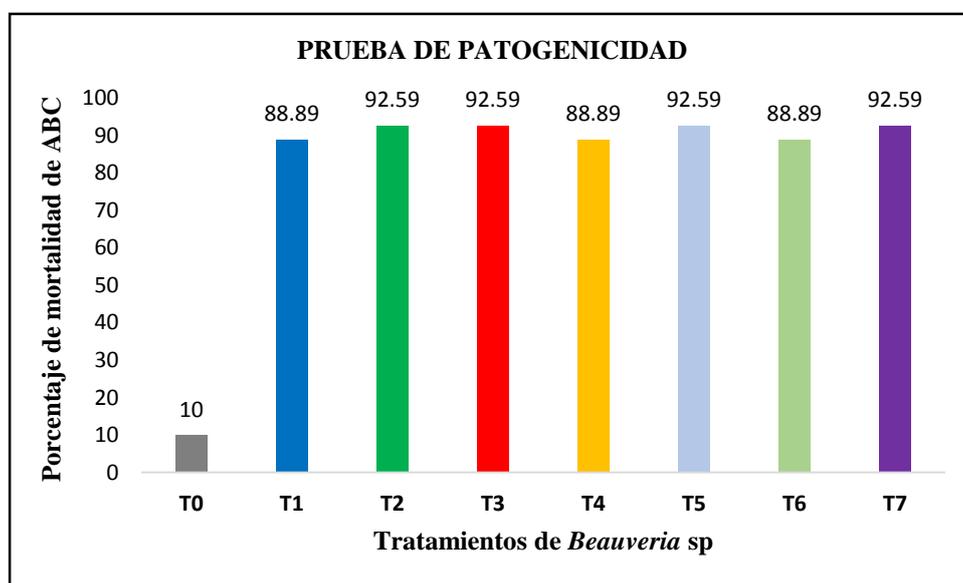


Figura 16. Patogenicidad promedio de siete cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre ABC.

Figura 17. Se observa la comparación de los porcentajes de mortalidad de ABC de los siete tratamiento excluyendo al testigo, mostrando que para el factor mortalidad de ABC se encontraron diferencias significativas en sus promedios ($P < 0.05$), el análisis estadístico con la prueba de Kruskal Wallis demuestra la existencia de dos grupos numéricamente diferentes, siendo los tratamientos T1, T4 y T6 el grupo que reporto el nivel de mortalidad de 88.89% y los tratamientos T2, T3, T5 y T7 alcanzaron el nivel de mortalidad de 92.59%.

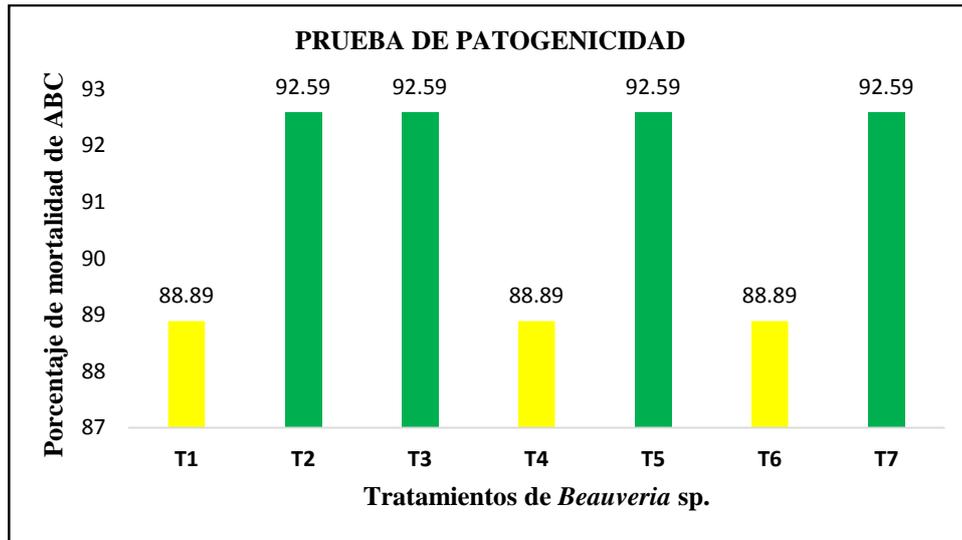


Figura 17. Porcentaje de mortalidad de ABC por acción de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

5.2.2. Crecimiento micelial (micosis)

La figura 18 muestra los valores de crecimiento micelial de *Beauveria* sp. sobre los cuerpos de ABC, estos valores fueron determinados según el grado de micosis (figura 19) obtenido en cada tratamiento.

En la figura se observa que con 3.3 grados de micosis el tratamiento T7 (cepa ABsp.P20) fue quien obtuvo el mayor valor numérico con respecto a los demás tratamientos, seguidamente un grupo integrado por los tratamientos T2 y T3 alcanzaron grado 3, el resto de tratamientos conforman un tercer grupo con valores por debajo de 2.7 grados de micosis (T1, T4, T5, T6)

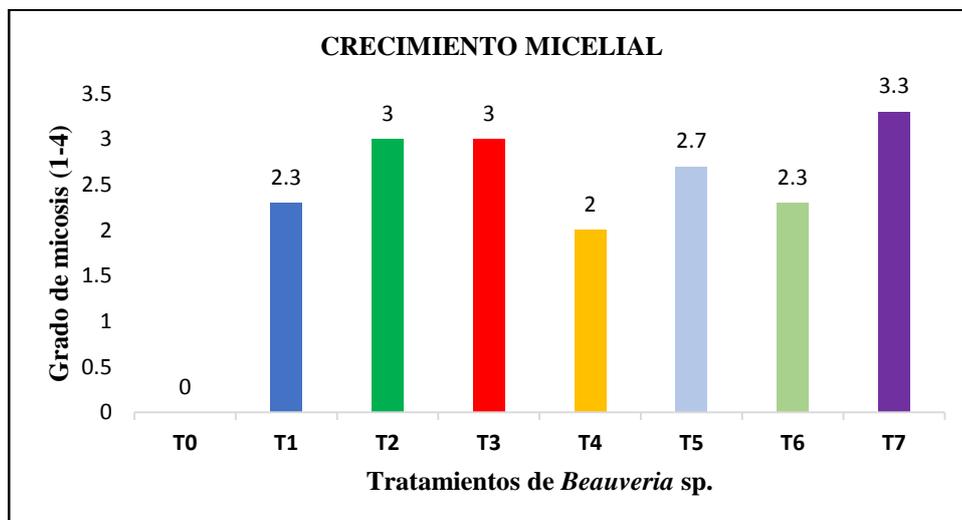


Figura 18. Crecimiento micelial de siete cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre ABC.

En la siguiente figura 19 se puede observar la escala establecida para determinar el grado de micosis obtenido por cada tratamiento en la prueba de patogenicidad.

Se estableció los valores de grado 1, 2, 3 y 4 según la esporulación o crecimiento micelial de *Beauveria* sp. sobre los cuerpos de ABC, donde el grado 1 evidencia el crecimiento micelial en el cuerpo de ABC en un (5-30) %, el grado 2 muestra un cuerpo de ABC cubierto con micelio entre (35-50) %, el grado 3 presenta un cuerpo de ABC cubierto con micelio en un (55-70) % y el grado 4 establece un cuerpo de ABC con momificación de (75-100) %.



Figura 19. Grado de micosis de *Beauveria* sp. en cuerpos de ABC según la escala convencional de la evaluación propuesta.

5.3. Caracterización morfológica y fisiológica de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

5.3.1. Caracterización morfológica

A. Morfología macroscópica. Las siete cepas de *Beauveria* sp. sometidas a prueba de patogenicidad fueron caracterizadas bajo los procedimientos expresos en metodología. Se evidenció diferencias en cuanto a superficie, aspecto y coloración de la colonia, así también pigmentación del medio de cultivo (PDA). Las cepas presentaron las características siguientes: Coloración de la colonia entre blanco y crema. Aspecto de la colonia, lanoso para las cepas *ABsp.P6* y *ABsp.F58*, polvoso para las cepas *ABsp.F38*, *ABsp.P15*, *ABsp.F42*, *ABsp.P20* y *ABsp.F59*. Superficies entre plana, semi elevada y elevada, en cuanto a la pigmentación del PDA los colores fueron crema y crema intensa.

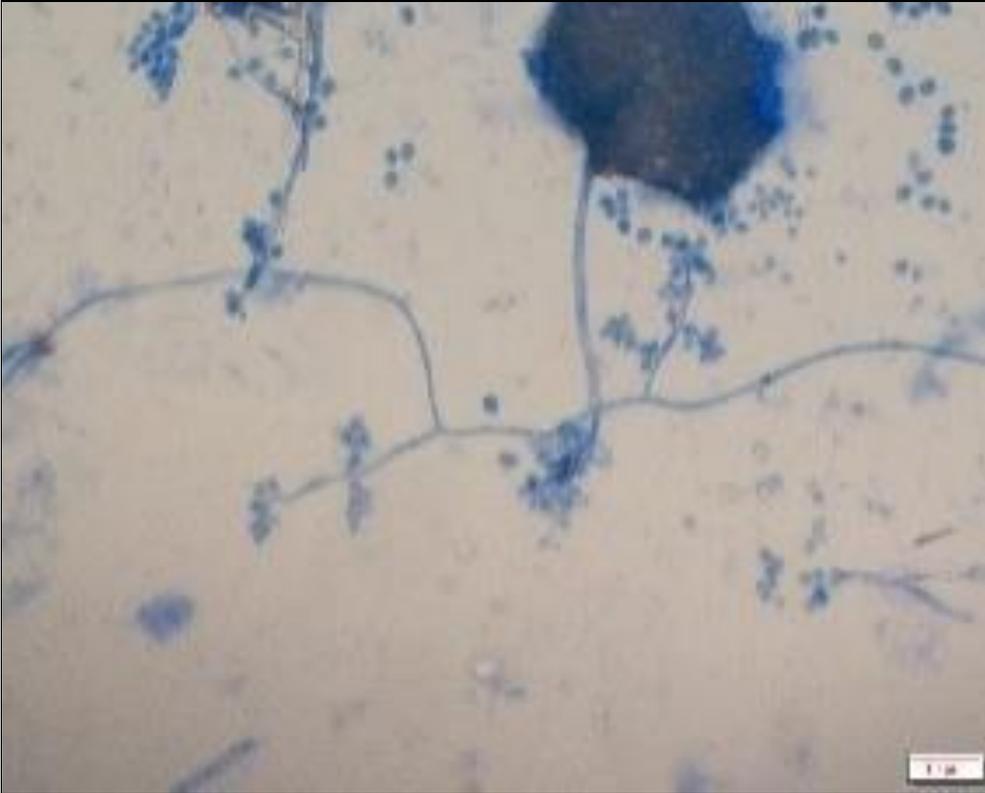
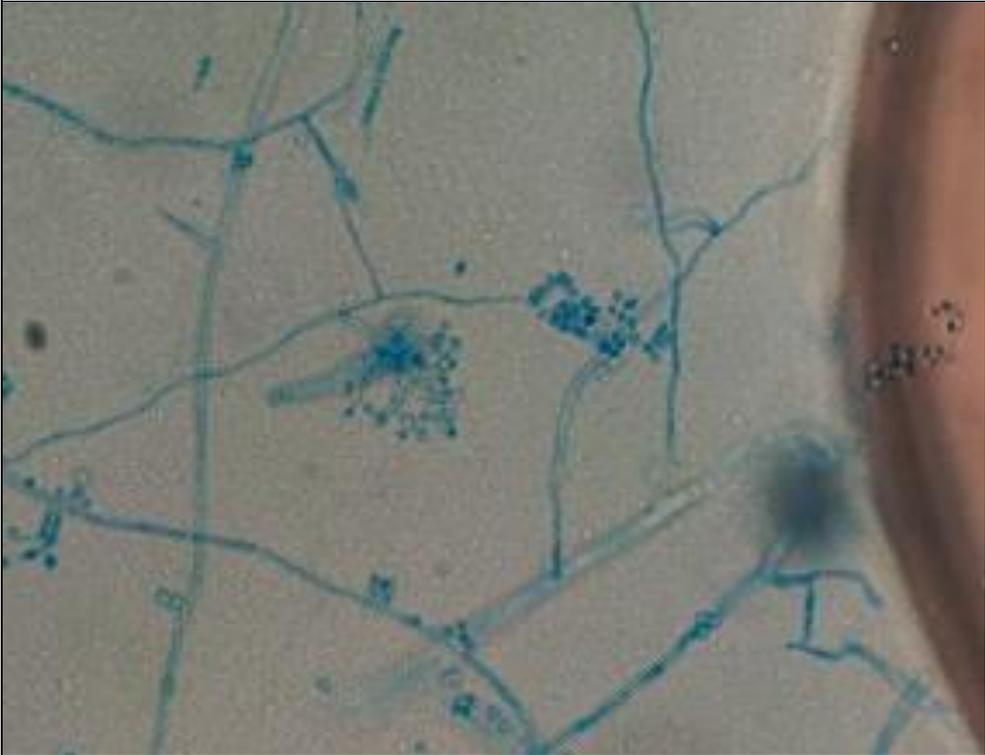
Tabla 4. Caracterización morfológica macroscópica de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

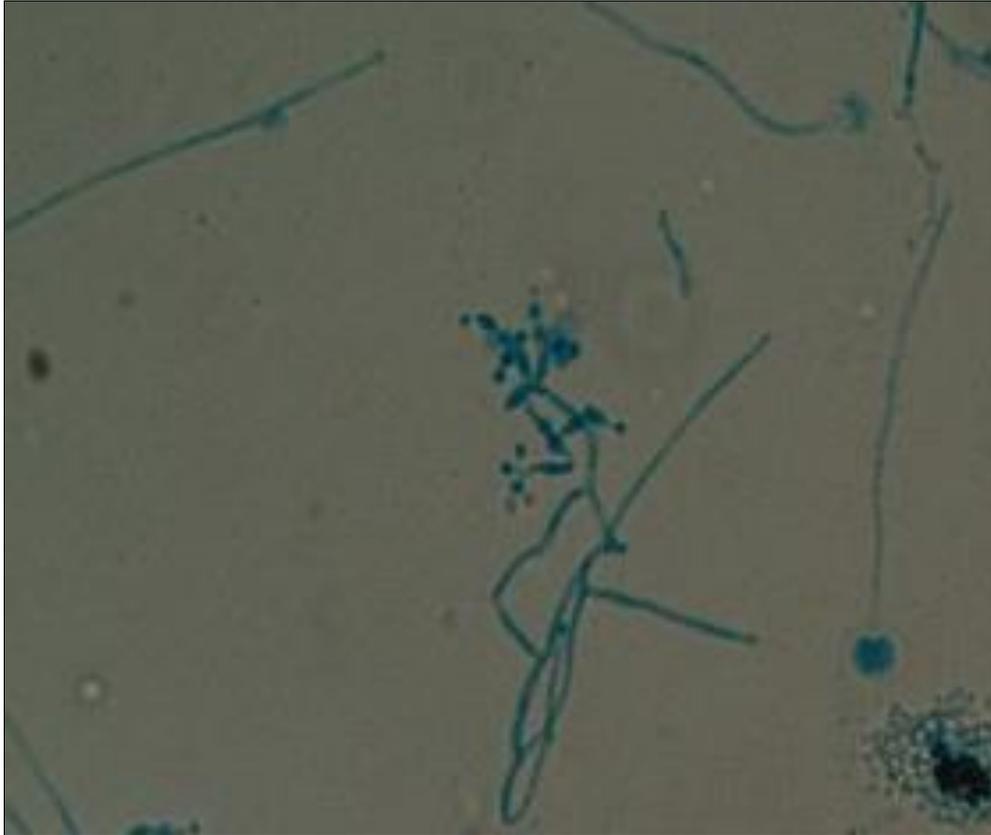
N°	CÓDIGO DE AISLADO	COLOR DE COLONIA	ASPECTO DE LA COLONIA	PIGMENTACIÓN DEL PDA	SUPERFICIE
1	<i>ABsp.P6</i>	blanco	lanoso	crema	semielevado
2	<i>ABsp.F38</i>	crema	polvoso	Crema intensa	semielevado
3	<i>ABsp.P15</i>	crema	polvoso	Crema intensa	plano
4	<i>ABsp.F42</i>	crema	polvoso	crema intensa	semielevado
5	<i>ABsp.F58</i>	blanco	lanoso	crema	elevado
6	<i>ABsp.P20</i>	blanco	polvoso	crema intensa	elevado
7	<i>ABsp.F59</i>	blanco	polvoso	crema intensa	semielevado

Clasificación según Castillo *et al.*, (2012).

B. Morfología microscópica. Se caracterizó siete cepas nativas de *Beauveria* sp con la ayuda de un microscopio de fluorescencia invertido, donde se puede evidenciar las estructuras características del género *Beauveria*, en la siguiente caracterización se realizaron mediciones de conidias, raquis y células conidiógenas, donde fueron comparadas según la literatura citada por García (2011). Y se caracterizaron como *Beauveria* sp.

Tabla 5. Caracterización microscópica de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

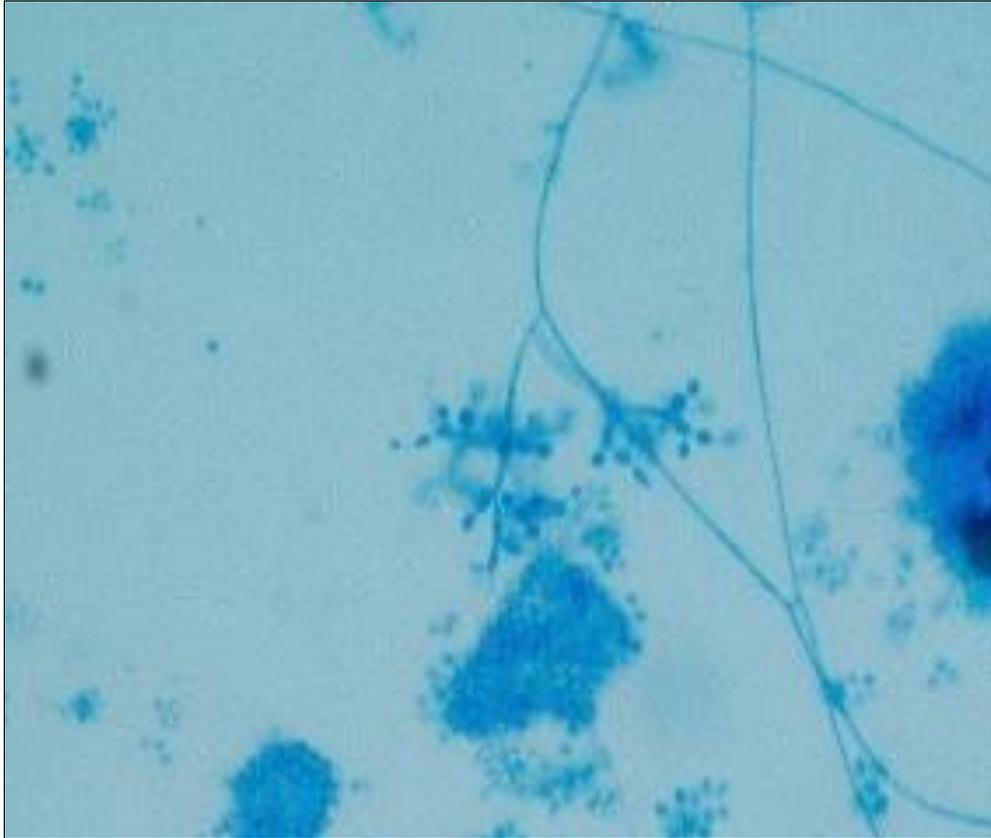
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Cepa nativa de <i>Beauveria</i> sp. ABsp.P6 (100x)

Cepa nativa de <i>Beauveria</i> sp. ABsp.P15 (100x)



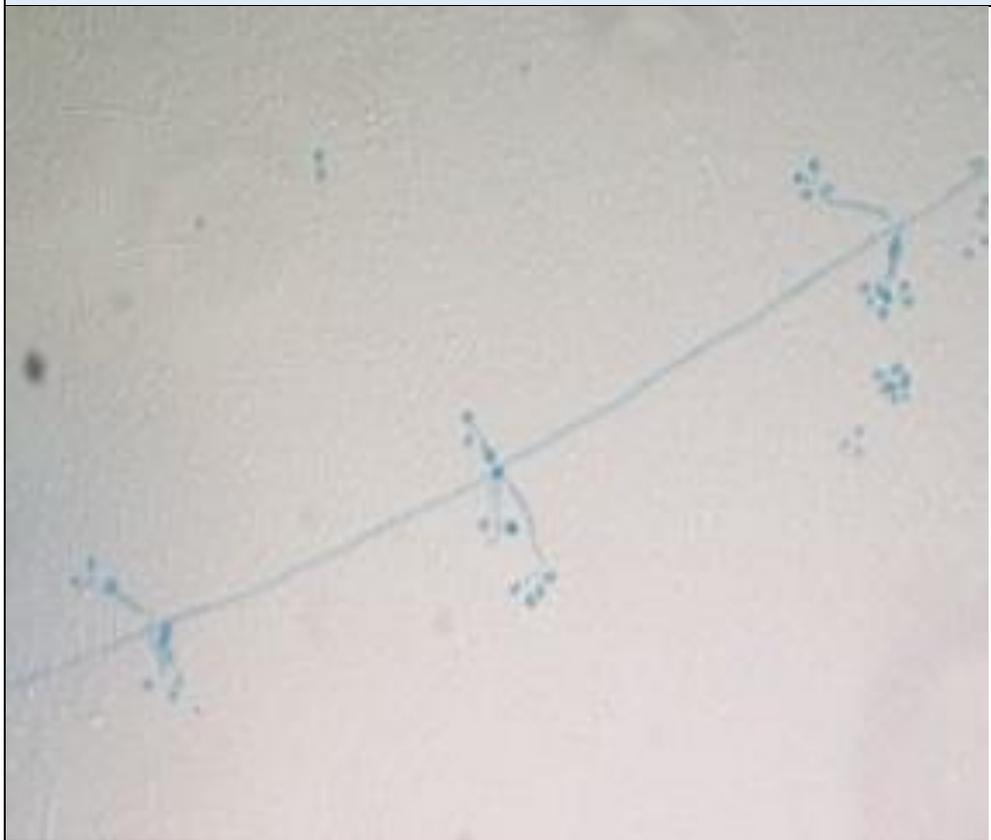
Cepa nativa de *Beauveria* sp. ABsp.P20 (100x)



Cepa nativa de *Beauveria* sp. ABsp.F38 (100x)



Cepa nativa de *Beauveria* sp. ABsp.F42 (100x)



Cepa nativa de *Beauveria* sp. ABsp.F58 (100x)

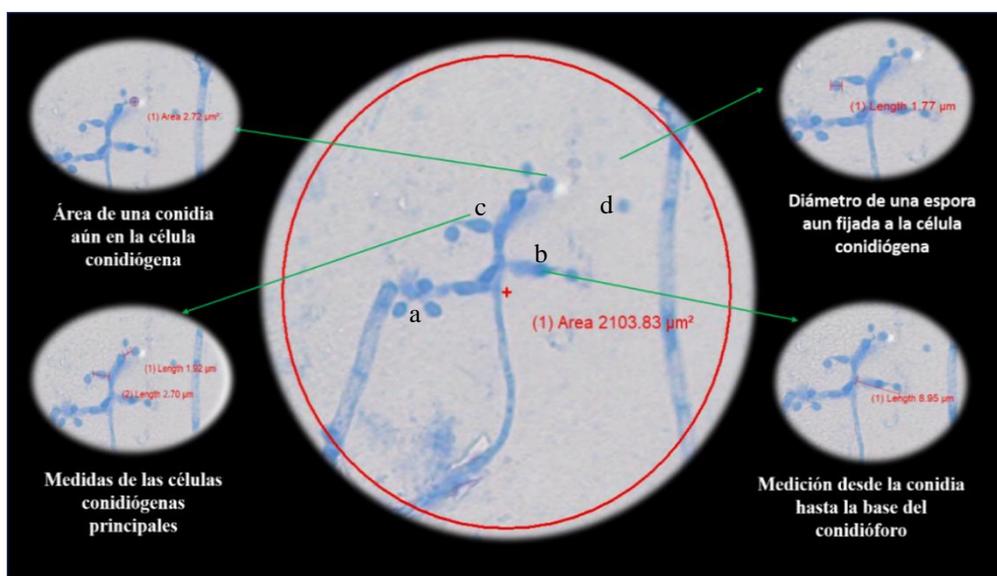
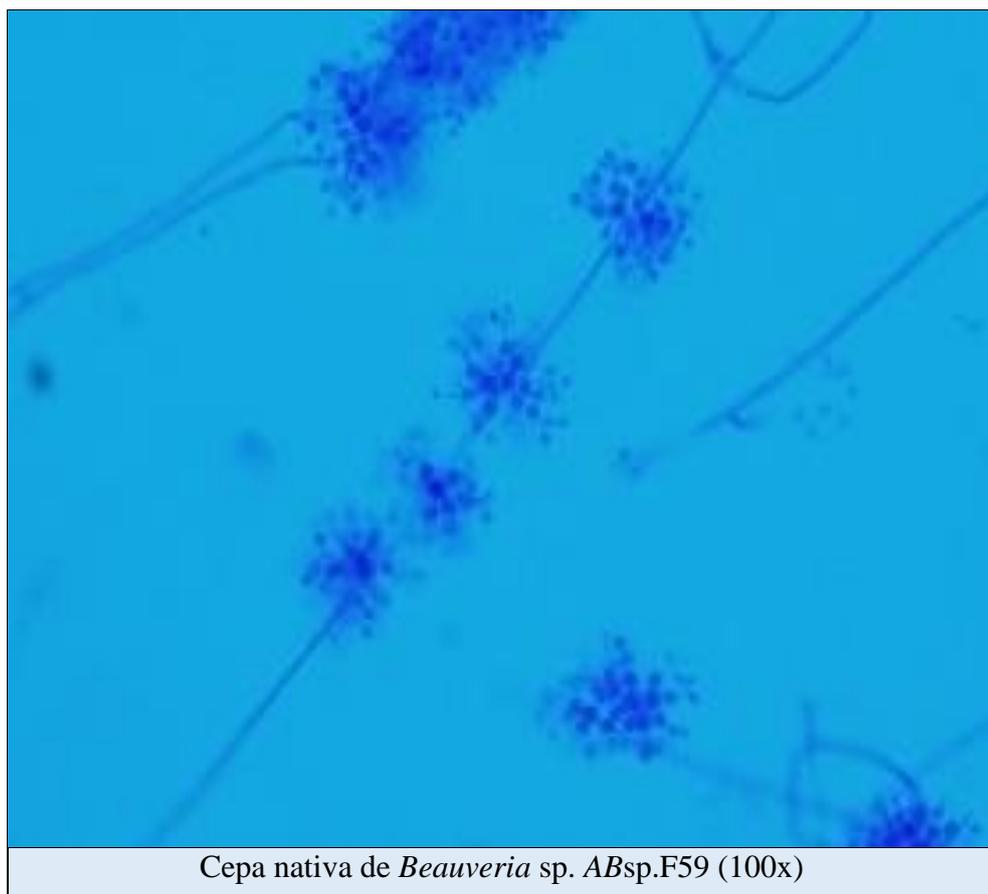


Figura 20: Características microscópicas del hongo *Beauveria* sp. (100x).

(a) conidias o esporas de *Beauveria* sp, (b) Raquis con forma de zigzag (c) célula conidiógena individual.

Para la caracterización microscópica se encontraron resultados característicos como:

- a) **Conidias** con un diámetro entre 1-2.7 μm de diámetro, un área aproximada de $2.72\mu\text{m}^2$
- b) **Raquis** de una longitud entre 2.5 - 4.5 μm aproximadamente.
- c) **Células conidiógenas** se encuentran formando grandes grupos o en ocasiones estructuras solitarias como se observa en la figura 20.

5.3.2. Caracterización fisiológica

a) Porcentaje de germinación

En la tabla 6, se observa que los resultados obtenidos para las diferentes cepas nativas de *Beauveria* sp. fueron variables. La cepa *A.BspF38* obtuvo el mayor porcentaje de germinación con el valor de 87.58%, seguidamente en escala descendente las cepas, *A.BspF58*, *A.BspF42*, *A.BspP6*, *A.BspP15*, *A.BspP20*, registraron un porcentaje de germinación con valores de 86.73%, 84.42%; 84.23%, 80.54% y 77.43% respectivamente, a las 24 horas de incubación, así mismo la cepa *A.BspF59* con el valor de 69.14% fue quien obtuvo el menor porcentaje de germinación. La comparación de las medias de germinación encontró diferencias significativas en sus promedios ($P < 0.05$).

Tabla 6. Porcentaje de germinación promedio, desviación estándar y nivel de significancia para las siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

Cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	Germinación (PG) %	D.E	Nivel de Significancia
<i>ABsp.F38</i>	87.58	5.32	b
<i>ABsp.F42</i>	84.42	4.31	b
<i>ABsp.F58</i>	86.73	2.44	b
<i>ABsp.F59</i>	69.14	14.61	a
<i>ABsp.P15</i>	80.54	2.51	ab
<i>ABsp.P20</i>	77.43	7.91	ab
<i>ABsp.P6</i>	84.23	2.21	b

PG: Porcentaje de germinación de conidios de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

D.E: Desviación estándar de la germinación de conidios.

N.S: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey.

b) Crecimiento radial

La tabla 7 muestra los valores de la tasa diaria de crecimiento radial (TDCR) obtenidos por las cepas nativas de *Beauveria* sp. estudiadas. Se registro que la cepa *ABsp.F38* tuvo la mayor TDCR con un valor de 1.90 mm/día, seguido por la cepa *ABsp.F42* y *A. Bsp P15* con valores de 1.80 y 1.77 mm/día, así como las cepas *ABsp.F58*, *ABsp.F59* y *ABsp.P6* quienes obtuvieron el mismo valor numéricos de 1.73 mm/día, y finalizando con la cepa *ABsp.P20* que obtuvo el menor valor con 1.70 mm/día, los datos de muestras a continuación en la siguiente tabla (tabla 7).

Tabla 7. Tasa diaria de crecimiento radial, desviación estándar y nivel de significancia para las siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

Cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	TDCR (mm/día)	D.E	Nivel de Significancia (N.S)
<i>ABsp.F38</i>	1.90	0.10	b
<i>ABsp.F42</i>	1.80	0.12	ab
<i>ABsp.F58</i>	1.73	0.01	a
<i>ABsp.F59</i>	1.73	0.09	a
<i>ABsp.P15</i>	1.77	0.05	ab
<i>ABsp.P20</i>	1.70	0.04	a
<i>ABsp.P6</i>	1.73	0.08	a

TDCR: Tasa diaria de crecimiento radial de siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

D.E: Desviación estándar de la tasa diaria de crecimiento radial.

N.S: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey.

c) Producción de esporas

En la tabla 8 se observa e indica que la cepa *ABsp.F38* fue la de mayor nivel en cuanto a producción de esporas obteniendo una concentración de 25.45×10^9 esporas/ml, seguido por la cepa *ABsp.F42* con una concentración de 23.75×10^9 esporas/ml, así como las cepas *ABsp.F58*, *ABsp.F59*, *ABsp.P20* y *ABsp.P15*, quienes obtuvieron los valores de concentración de 21.45×10^9 , 20.75×10^9 , 20.45×10^9 y 19.20×10^9 esporas/ml respectivamente, siendo la cepa *ABsp.P6* quien obtuvo la menor producción de esporas con una concentración de 18.65×10^9 esporas/ml, los datos se muestran a continuación en la siguiente tabla (tabla 8).

Tabla 8. Nivel de esporulación para las siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

Cepas nativas de <i>Beauveria</i> sp.	Concentración de esporas/ml (10⁹)	Nivel de Significancia (N.S)
<i>ABsp.F38</i>	25.45	a
<i>ABsp.F42</i>	23.75	ab
<i>ABsp.F58</i>	21.45	abc
<i>ABsp.F59</i>	20.75	bc
<i>ABsp.P6</i>	18.65	bc
<i>ABsp.P15</i>	19.2	c
<i>ABsp.P20</i>	20.45	c

10⁹: Concentración de esporas por mililitro en la solución.

N.S: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey.

VI. DISCUSIÓN

En cuanto al porcentaje de mortalidad, los resultados indican que todas las cepas superaron el 80% de mortalidad de ABC a las 168 horas (7 días), con límite superior 92.59% e inferior 88.89% de mortalidad, lo que podría indicar la existencia de cepas agresivas y virulentas puesto que superaron el límite de 80% de mortalidad, indicador que muestra el potencial de biocontrol entomopatógeno (Vargas, 2003). Resultados similares fueron reportados en los estudios realizados por Gerónimo *et al.*, (2016) quienes reportan una mortalidad de 100% de ABC a las 144 h; mientras que Cárdenas *et al.* (2007) obtuvieron porcentajes de 73.3% a 100% a las 192 h de evaluación. Al respecto González, Valencia y Bustillo (2001), reporta un 87.5% al 100% de mortalidad a las 96 horas, así también López (2017) muestra una mortalidad 83% y 100% a los 12 días y declara una disminución de la patogenicidad según el número de repeticiones y un porcentaje de mortalidad de 6.70% por otras causas ajenas al tratamiento. Los que coinciden con la concentración trabajada en el presente estudio. Esta diferencia porcentual encontrada en los resultados de patogenicidad puede atribuirse a las diferentes muestras procedentes de distintos lugares de recolección, los estados fisiológicos y medio ambiente donde se desarrolló el ABC.

Adicionalmente la prueba de crecimiento micelial de *Beauveria* sp. muestra que la cepa ABsp.P20 obtuvo el mayor porcentaje de crecimiento micelial, llegando a momificar los cuerpos de ABC con un valor de 82.5% de micosis, mientras que la cepa ABsp.F42 demostró un leve crecimiento obteniendo el mínimo valor de 50% de micosis, mientras que las demás cepas mostraron datos dentro de este rango, lo que concuerda con los datos obtenidos en la prueba de patogenicidad. Al respecto Echeverría, (2006). Reporto diferencias en cuanto al nivel y tipo de crecimiento micelial, obteniendo el mayor nivel de micosis en la muestra Sar, Co2, LH que alcanzó el 100% inclusive antes de los 12 días del tratamiento. Seguido por el aislado PZT que alcanzo el 80% de esporulación en 16 insectos y los aislados TT (67.5%), SCa (60%), AO3 (55%), SMN (52.5%), Aco (47.5%) y otros (12.5%), orden descendente.

La caracterización morfológica macroscópica demuestra que *Beauveria* es un género de crecimiento lento y de aspecto algodonoso a polvoriento, mediante este estudio se pudo corroborar los rasgos característicos de este género, encontrando colonias de crecimiento expansivo y crecimiento elongado verticalmente, superficies elevadas y semi elevadas tomando forma de pequeñas y medianas torres, en cuanto a textura se pueden encontrar

algodonosas y elásticas quienes después de los 15 días se tornaban polvorientas, en cuanto a pigmentación del medio se encontró coloraciones blancas en el desarrollo de la colonia y luego se tornaban cremosas en el anverso de la placa, rojo vino apagado y amarillento en el reverso de la placa; existiendo concordancia con los estudios realizados por Castillo *et al.*, (2012), quienes evaluaron 10 aislamientos en medios similar (PDA) a 25°C obteniendo colonias algodonosas al principio y luego se tornaron polvorientas con superficie semi elevada y crecimiento moderado, coloraciones blanco tornándose amarillento; así mismo García *et al.*, (2011) quienes obtuvieron resultados de colonias lanosas de color blanco tornándose amarillento posteriormente y en forma de polvo, mencionando que se debe a los abundantes conidios.

En cuanto a los parámetros fisiológicos evaluados, la germinación de las siete cepas nativas de *Beauveria* sp. mostraron valores porcentuales entre 69.14% y 87.58% de germinación, determinándose la viabilidad de los conidios en las cepas ABsp.F38, ABsp.F42, ABsp.F58, ABsp.P15, ABsp.P20, ABsp.P6 pues superaron el 70% de germinación lo cual evidencia una característica potencial de biocontrol en la especie *Beauveria* (Villamil *et al.*, 2015), siendo ABsp.F38 la cepa que obtuvo el mayor porcentaje de germinación con un valor de 87.58% y la cepa ABsp.F59, quien obtuvo el porcentaje mínimo de 69.14% de germinación. Al respecto Vélez *et al.* (2000), quienes trabajaron bajo los mismos parámetros, obtuvieron resultados de germinación con un nivel mínimo de 73% y un nivel máximo de 93.60% entre sus aislados. Mientras que López (2017). Manifestó en su trabajo, porcentajes de germinación promedios de 91.30%, 91.69%, 91.20% en las cepas 24, 13 y 9205 respectivamente, superando el parámetro establecido de 85% de germinación en su trabajo. Vargas, (2003). Obtuvo en su investigación un alto porcentaje de germinación a las 48 horas con valores de 99.07%, 99.74% y 95.40% para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) Yciph1(1) respectivamente, donde no encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) por lo que las tres cepas fueron consideradas de buena calidad biológica. A su vez, Arango, *et al.*; (2001) obtuvo niveles de germinación entre 70.7% y 81.2%, teniendo en sus aislados a Bb 9112 como candidato principal para una caracterización molecular.

La Tasa Diaria de Crecimiento Radial (TDCR) de las siete cepas nativas de *Beauveria* sp. reportaron como promedio mínimo de crecimiento 1.7 mm/día para la cepa ABsp.P20 y promedio máximo de crecimiento 1.9 mm/día para la cepa ABsp.F38, en cuanto a las demás cepas obtuvieron valores dentro de este rango, donde se evidencia niveles de crecimientos

radial aceptable para cada cepa (Gerónimo 2016). Lo que concuerda con Vélez, *et al.*; (2000) quienes registraron niveles de tasa diaria de crecimiento radial entre 1.8 mm/día y 3.7 mm/día. A su vez los resultados obtenidos por Vélez *et al.*, (2001), indican tasas mínimas de crecimiento de 0.21 cm/día y tasa máxima crecimiento de 0.37 cm/día, lo que nos indica niveles entre 2.1mm/día y 3.7 mm/día de crecimiento radial entre los aislados estudiados. Por su parte Vela, Pineda y Duarte (2018) quienes también realizaron estudios de crecimiento radial obtuvieron resultados promedio en la TDCR entre 5 mm/día y 5.8 mm/día. Mientras que Echeverría, (2006). Menciona en cuanto a la tasa diaria de crecimiento radial que obtuvo los siguientes resultados con diferencias significativas entre los aislados, con valores de; Aco: 0.87 mm/día, Oro: 0.90 mm/día, A03: 0.83 mm/día, LH: 0.95 mm/día, Co2: 0.87 mm/día, SMN: 1.27 mm/día, Sar: 1.23 mm/día, SCa: 2.43 mm/día, PZT: 0.83 mm/día, TT: 0.78 mm/día.

Los resultados de la concentración de esporas en las siete cepas nativas de *Beauveria* sp. muestran niveles de esporulación, cuyos valores se encontraron dentro del rango de 18.65 y 25.45 x 10⁹ esporas/ml, donde la cepa ABsp.F38 obtuvo la mayor concentración de esporas con un valor de 25.45 x 10⁹ esporas/ml y la cepa ABsp.P6 obtuvo la menor concentración de esporas con un valor de 18.65 x 10⁹ esporas/ml, sin embargo Vélez y colaboradores (2000), indican que la esporulación a nivel de laboratorio depende más de la edad del cultivo y el sustrato de crecimiento, por ende, está sujeto a variables no estimadas en este estudio (Echeverría, 2006). Al respecto Hernán, *et al.*, (2017) obtuvieron resultados de concentración 3.38 a 6.98 (x10⁸) esporas/ml, bajo parámetros de evaluación similares al presente estudio. Así como los resultados obtenidos por Villamil *et al.*, (2015). Fueron las siguientes concentraciones T1: 2.3x10⁸, T2:4.8x10⁸, T3: 5x10⁸, T4: 3.2x10⁸ y T5: 7x10⁸, siendo los valores más altos correspondientes a los aislamientos con mayor actividad patogénica. Vélez, *et al.*; (2000) obtuvo resultados de concentración de esporas de 32 x 10⁸ y 115 x 10⁸ esporas/ml entre sus diferentes grupos de estudios, encontrando diferencia significativa entre sus aislados según la prueba de Duncan al 5%. López (2017) obtuvo esporulaciones promedias entre 2.83 x 10⁸, y 5.51x 10⁸, con superioridad de la cepa 9205 y 13 respecto a las 24 cepas evaluadas indicando la variabilidad genética en conidiación.

VII. CONCLUSIONES

1. La totalidad de las fincas seleccionadas, mostraron la existencia de valores de incidencia de daños por broca del café superiores a los propuestos como nivel base para el presente estudio.
2. Las cepas nativas de *Beauveria* sp. *ABsp.F38*, *ABsp.F58*, *ABspP15*, *ABspP20* mostraron el mayor potencial entomopatígeno para el control de la broca del café, los que obtuvieron el mayor porcentaje de mortalidad con un valor de 92.59%. A sí también la cepa *ABsp.F38* demostró superioridad numérica y estadística en las pruebas de germinación con un valor de 87.58%, tasa diaria de crecimiento radial (TDCR) con un crecimiento de 1.90 mm/día y nivel de esporulación con una concentración de esporas de 25.45×10^9 esporas/ml.
3. Las siete cepas nativas evaluadas en el presente estudio mostraron características morfológicas macroscópica y microscópica que evidencian y caracterizan al género *Beauveria* sp.
4. En cuanto al aspecto de las colonias se evidenció que para las siete cepas nativas de *Beauveria* sp. el aspecto lanoso presenta una textura elástica difícil de propagar y el aspecto polvoso, una textura blanda de fácil diseminación, pero ambos aspectos se uniformizaban al completar su desarrollo fisiológico (25 días de incubación) volviéndose ambos en un aspecto polvoriento de coloración crema oscura.
5. Se encontró una relación directa entre los resultados obtenidos en las pruebas de germinación, crecimiento radial y nivel de esporulación para todas las siete cepas nativas de *Beauveria* sp.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Incorporar la prueba de resistencia a la luz ultravioleta a posteriores investigaciones.
2. Evaluar en campo las cepas más patogénicas, así también implementar evaluaciones de mezclas de cepas de alta y baja patogenicidad.
3. Realizar investigaciones futuras de control biológico con cepas nativas de *Beauveria* sp. en otras especies de insectos plaga en los diferentes cultivos de importancia económica.
4. Utilizar cepas nativas para control de broca de café en campo debido a la gran capacidad adaptativa por parte del microorganismo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, A (2013). Caracterización morfológica, biológica y molecular de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*. (Tesis de pre grado) Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.
- Barrera, J. (2002). La Broca del café: Una plaga que llegó para quedarse. *Tres Plagas del Café en Chiapas*, 17-20.
- Barrera, J. F., Herrera, J., Villacorta, A., Garcia, H., y Cruz, L. (2006). Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Simposio sobre Trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de plagas de importancia económica*, 71-83.
- Briceño, J. (2017). Eficacia del control biológico y etológico de la broca del café *Hypothenemus hampei* (ferrari) en los distritos de Huambo y San Nicolas, Provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas (Tesis de pre grado) Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Amazonas - Perú.
- Bustillo, Á. E. (2007). El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. *Cenicafé* (2) (22-25).
- Carzola, D. y Morales, P., (2016) Efectos de formulaciones acuosas y aceitosas de 13 aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* (Ascomycota) sobre *Rhodnius prolixus* (Triatomidae) bajo condiciones experimentales, *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, (27) 771-782.
- Castillo, C. E., Cañizalez, L. M., Valera, R., Godoy, J. C., Guedez, C., Olivar, R., y Morillo, S. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo, Venezuela. *Academia*, 11(23), 275-281.
- Cintrón, B y Grillo, H., Caracterización de la dinámica poblacional de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) durante el desarrollo de los frutos, *Agroecología*, 650.
- Colonia, L. (2012). Guía técnica del manejo integrado de plagas en el cultivo de café. *Agrobanco*, 26.

- Chiriboga, P., Gomez, G. y Garcés, K., (2015) Protocolo para la formulación y aplicación del bio-insumo: *Beauveria bassiana* hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (ysaú) por *Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura* (IICA), 40.
- Echeverría, B. F. (2006). Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. *Instituto Tecnológico de Costa Rica*, 105.
- Estrada, M. N., Vélez, P. E., Restrepo, E. C., y Bustillo, A. E. (1999). Esporulación, germinación y patogenicidad de aislamientos monoespóricos de *Beauveria bassiana*, *Cenicafé* 50(1), 49-65.
- García, M, A., Cappello, S., Leshner, J. M. y Molina, R, F,. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria* y *metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), 21-28.
- Gerónimo, J. D. C., Torres, M., Pérez, M., De La Cruz, A., Ortiz, C. F., y Cappello, S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México TT - Characterization of native isolates of *Beauveria bassiana* and its pathogenicity to *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, Mexico. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 28-35.
- Goicochea, J. (2017). Efecto de la altitud y edad de plantación como variables determinantes en la incidencia de broca del café *hypothenemus hampei* (ferrari), en la provincia de rodríguez de mendoza, Amazonas, 2017. (Tesis de pre grado) Universidad Nacional Toribio Rodriguez de Mendoza, Amazonas - Perú.
- Góngora, C. E., Marín, P. y Benavides, P. (2009). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Cenifacfe*, (16), 3-8.
- González, M. T., Valencia, A., y Bustillo, A. E. (2001). Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. *Manejo integrado de plagas*, (60), 31-35.
- Hernández, A. (2016). Evaluación de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el control de hormigas cortadoras de hojas (*Atta* spp) en

- eucalipto. (Tesis de pre grado) Universidad Rafael Landívar, Escuintla.
- Huarte, C., y Pedrini, N. (2017). *Caracterización molecular de genes del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana involucrados en la captación y degradación de hidrocarburos de insecto*. (Tesis doctoral) Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- Hernán, J., Poma, L., y López, C. (2017). Esporulación de conidias de *Beauveria bassiana* en sustratos de arroz. *Revista de la carrera de ingeniería agrónomica-UMSA* 3(2), 500-513.
- Leiva, S. T., Roman, A. y Rojas, K. B. (2017). Caracterización socioeconómica de la producción cafetalera en la provincia de Rodríguez de Mendoza (Amazonas, Perú) Socioeconomic characterization of coffee production in the province of Rodríguez de Mendoza (Amazonas, Perú), *Revista de investigación agrosustentable* (3), 59-67. doi.org/10.25127/aps.20173.237
- Lopez, C. (2017) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* about *Hypothenemus hampei* in reproductive generation. *Revista de la carrera de ingeniería agrónomica-UMSA*, (3), 639-651.
- Pardey, A. E. B. (2005). El papel del control biológico en el *Hypothenemus Hampei* (Ferrari), *Academia colombiana de Ciencia*, XXIX, 55-68.
- Pairona, N., Castellano, P. y León, E. Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribazaga, 1903), (2007) *Revista Peruana de Biología*, (14) 253-257.
- Peteira, B., Gonzalez, I., Arias, Y., Turro, F., Miranda, LL. y Martines, B. (2011) Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beuaveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Proteccion Vegetal*, (26) 16-22.
- Suárez, A. M. (2016). Caracterización de aislados autóctonos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Protección Vegetal* 31(2), 4697.
- Téllez, A., Guadalupe, M., Ramírez, C., y Flores, Y. M. (2007). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos (2009) *Revista Mexicana de Micología.*, 80.

- Torres, A. (2012). *Caracterización morfológica y molecular de Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin y Metarhizium anisopliae (metsch.) Sorokin de suelos cultivados y no impactados en el norte de Sinaloa*. (Tesis de maestría) Instituto Politécnico Nacional, Sinaloa.
- Tudela, J. W. (2015). Caracterización socioeconómica y ambiental de la producción de café orgánico en el Perú 1. *Revista de investigación .Altoandin.*, 17, 23-32. doi.org/http://dx.doi.org/10.18271/ria.2015.73
- Vargas , M. E. (2003). *Caracterización de tres cepas de Beauveria brongniartii (Saccardo) Petch y su virulencia en Phthorimaea operculella (Zeller) y Symmetrischema tangolias (Gyen), 100*. (Tesis de pre grado)Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Vázquez, L. L., Blanco, E., Elósegui, O., Matienzo , Y., Alfonso, J. (2006). Observaciones sobre enemigos naturales de la broca del café (*hypothemus hampei ferrari*) en cuba. *Fitosanidad*, 10(4), 307-308.
- Vela, P. R., Pineda, J. A. y Duarte, A. S (2018). Cepa nativa ecuatoriana de *Beauveria bassiana* con potencial industrial, *Biorefineria* (1) 10.
- Vélez, P. E., Estanda, M. N., Gonzalez, M. T., Valderrama, A. M., y Bustillo, A. E. (2001). Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 62(62), 38-53.
- Vélez, A. E., González, M. T., Valderrama, A. M., Estrada, M. N., Bustillo, A. E. y Montoya, E. C. (2000). Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*, *Cenicafé* 51(3), 196-206.
- Vera, L. Y., Gil, Z. N., Benavides, P (2007) Identificación de enemigos naturales de *Hypothenemus hampei* en la zona cafetalera central colombiana. *Cenicafé*, (58) 185-195.
- Villamil, J. E., y Martínez, J. W. (2014). Evaluación de aislamientos nativos de *Beauveria* app. sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera:Gelechiidae) in vitro. *Revista de Ciencias Agrícolas- Universidad de Nariño*, 31(1), 92-105.
- Villamil, J. E., Martínez, J. W., y Pinzón, E. H. (2015). Actividad entomopatogénica de

aislamientos autóctonos de *Beauveria* spp. sobre *Premnotrypes vorax* (hustache) in vitro. *Temas Agerarios*, 20(1), 14.

X. ANEXOS

Anexo 1: Fichas de evaluaciones

Tabla 9. Ficha de evaluación de la patogenicidad

PRUEBA DE PATOGENICIDAD									
AISLADO	BLOQUES	MORTALIDA D OBTENIDA	MICOSIS	MORTALIDA D TESTIGO	% de MO	% de MT	% MC	PROMEDIO % MC	PROMEDIO MICOSIS
ABsp,F38	R1	9	3	1	90	10	88.89	92.59	3.00
	R2	10	4	1	100	10	100.00		
	R3	9	2	1	90	10	88.89		
ABsp,F42	R1	9	2	1	90	10	88.89	88.89	2.00
	R2	9	1	1	90	10	88.89		
	R3	9	3	1	90	10	88.89		
ABsp,F58	R1	10	3	1	100	10	100.00	92.59	2.67
	R2	10	3	1	100	10	100.00		
	R3	8	2	1	80	10	77.78		
ABsp,F59	R1	10	4	1	100	10	100.00	88.89	2.33
	R2	8	1	1	80	10	77.78		
	R3	9	2	1	90	10	88.89		
ABsp,P6	R1	9	3	1	90	10	88.89	88.89	2.33
	R2	9	2	1	90	10	88.89		
	R3	9	2	1	90	10	88.89		
ABsp,P15	R1	9	2	1	90	10	88.89	92.59	3.00
	R2	10	4	1	100	10	100.00		
	R3	9	3	1	90	10	88.89		
ABsp,P20	R1	10	4	1	100	10	100.00	92.59	3.67
	R2	8	4	1	80	10	77.78		
	R3	10	3	1	100	10	100.00		

Tabla 10. Ficha de datos de porcentaje de germinación de aislados de *Beauveria* sp

LECTURA DE ESPORAS GERMINADAS Y NO GERMINADAS																				
REPETICIÓN	R1				R2				R3				R4				R5			
AISLADO	GERMINADAS	NO GERMINADAS	TOTAL	% DE GERMINACION	GERMINADAS	NO GERMINADAS	TOTAL	% DE GERMINACION	GERMINADAS	NO GERMINADAS	TOTAL	% DE GERMINACION	GERMINADAS	NO GERMINADAS	TOTAL	% DE GERMINACION	GERMINADAS	NO GERMINADAS	TOTAL	% DE GERMINACION
F38	48	11	59	81.3559322	58	4	62	93.5483871	38	7	45	84.4444444	67	11	78	85.8974359	38	3	41	92.6829268
F42	166	20	186	89.24731183	134	31	165	81.2121212	146	18	164	89.0243902	110	26	136	80.8823529	103	23	126	81.7460317
F58	122	19	141	86.5248227	92	12	104	88.4615385	116	16	132	87.8787879	105	14	119	88.2352941	109	23	132	82.5757576
F59	36	9	45	80	35	10	45	77.7777778	34	10	44	77.2727273	44	23	67	65.6716418	9	11	20	45
P6	72	12	84	85.71428571	60	13	73	82.1917808	57	12	69	82.6086957	55	11	66	83.3333333	69	10	79	87.3417722
P15	116	25	141	82.26950355	114	31	145	78.6206897	124	30	154	80.5194805	104	30	134	77.6119403	113	22	135	83.7037037
P20	60	24	84	71.42857143	72	10	82	87.804878	98	25	123	79.6747967	111	27	138	80.4347826	59	28	87	67.816092

Tabla 11. Ficha de evaluación y lectura en microscopio de germinación de aislados de *Beauveria* sp

LECTURA EN MICROSCOPIO DE ESPORAS GERMINADAS Y NO GERMINADAS											
AISLADO	REPETICIÓN	R1		R2		R3		R4		R5	
		GERMINADAS	NO GERMINADAS								
F38	Lectura 1	12	3	8	0	7	3	19	4	8	2
	Lectura 2	9	4	11	0	6	1	11	1	11	0
	Lectura 3	8	1	10	0	7	1	10	4	6	1
	Lectura 4	9	2	17	2	10	2	7	2	7	0
	Lectura 5	10	1	12	2	8	0	20	0	6	0
	SUMATORIA	48	11	58	4	38	7	67	11	38	3
F42	Lectura 1	20	4	27	9	20	5	14	5	19	6
	Lectura 2	40	6	34	7	33	5	23	4	25	7
	Lectura 3	47	8	20	3	29	4	21	8	20	4
	Lectura 4	22	1	29	7	30	1	25	4	20	5
	Lectura 5	37	1	24	5	34	3	27	5	19	1
	SUMATORIA	166	20	134	31	146	18	110	26	103	23
F58	Lectura 1	31	4	19	1	28	4	11	2	22	4
	Lectura 2	13	1	25	4	27	7	21	1	20	3
	Lectura 3	37	10	19	2	26	1	27	6	26	9
	Lectura 4	15	1	15	3	12	0	18	1	27	5
	Lectura 5	26	3	14	2	23	4	28	4	14	2
	SUMATORIA	122	19	92	12	116	16	105	14	109	23
F59	Lectura 1	8	2	10	2	9	2	12	10	4	0
	Lectura 2	7	2	4	2	6	2	11	5	2	0
	Lectura 3	9	0	9	4	4	1	7	2	1	3
	Lectura 4	8	3	8	1	4	2	5	2	1	7
	Lectura 5	4	2	4	1	11	3	9	4	1	1
	SUMATORIA	36	9	35	10	34	10	44	23	9	11
P6	Lectura 1	6	0	10	2	14	3	10	4	14	3
	Lectura 2	19	4	22	6	9	1	7	0	14	0
	Lectura 3	16	2	11	1	7	1	20	5	10	1
	Lectura 4	13	1	10	1	12	3	8	1	15	4
	Lectura 5	18	5	7	3	15	4	10	1	16	2
	SUMATORIA	72	12	60	13	57	12	55	11	69	10
P15	Lectura 1	30	5	22	8	33	9	21	5	20	1
	Lectura 2	28	5	16	4	19	5	27	11	22	3
	Lectura 3	35	11	27	6	18	7	16	3	21	6
	Lectura 4	13	2	23	6	33	4	21	7	30	8
	Lectura 5	10	2	26	7	21	5	19	4	20	4
	SUMATORIA	116	25	114	31	124	30	104	30	113	22
P20	Lectura 1	14	8	12	2	17	7	22	5	7	1
	Lectura 2	13	5	10	1	20	5	35	4	12	6
	Lectura 3	15	4	11	2	10	3	16	7	8	3
	Lectura 4	8	4	14	2	19	1	21	2	21	11
	Lectura 5	10	3	25	3	32	9	17	9	11	7
	SUMATORIA	60	24	72	10	98	25	111	27	59	28

Tabla 12 Ficha de evaluación de la tasa de crecimiento radial de 7 cepas nativas de *Beauveria* sp.

 AISLAMIENTOS DE <i>Beauveria bassiana</i>																
 EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL EN (cm/3días)																
FECHA		07/03/2018			10/03/2018			13/03/2018			16/03/2018			19/03/2018		
EVALUACIÓN		Evaluación 1 (día 3)			Evaluación 2 (día 6)			Evaluación 3 (día 9)			Evaluación 4 (día 12)			Evaluación 5 (día 15)		
AISLADO	REPETICIÓN	RM	Rm	Prom	RM	Rm	Prom	RM	Rm	Prom	RM	Rm	Prom	RM	Rm	Prom
ABsp,F38	R1	5.1	3.9	4.5	10.44	9.85	10.145	16.81	15.87	16.34	23.3	22.54	22.92	27.9	27.12	27.51
	R2	5.32	3.56	4.44	11.05	9.81	10.43	19.44	16.11	17.775	27.04	22.36	24.7	33.6	27.59	30.595
	R3	4.51	3.11	3.81	9.96	9.59	9.775	15.07	14.76	14.915	21.53	21.27	21.4	27.28	26.59	26.935
	R4	4.89	3.34	4.115	10.31	9.41	9.86	15.4	14.7	15.05	23.55	22.16	22.855	28.9	27.97	28.435
	R5	5.56	5.33	5.445	10.17	9.63	9.9	17.22	16.48	16.85	25.33	23.77	24.55	30.64	29	29.82
ABsp,F42	R1	4.75	3.61	4.18	9.28	7.97	8.625	15.61	15.17	15.39	22.71	21.64	22.175	27.84	26.3	27.07
	R2	4.62	3.54	4.08	9.26	8.13	8.695	15.28	15.12	15.2	22.59	21.48	22.035	27.84	26.19	27.015
	R3	4.86	4.34	4.6	9.35	8.16	8.755	15.72	13.73	14.725	22.27	19.51	20.89	27.6	22.79	25.195
	R4	5.32	3.84	4.58	10.8	9.63	10.215	17.14	16.96	17.05	24.68	24.6	24.64	31	29.28	30.14
	R5	4.72	3.93	4.325	8.94	8.46	8.7	15.55	15.04	15.295	21.44	20.53	20.985	27.15	25.36	26.255
ABsp,F58	R1	4.36	3.25	3.805	10.33	9.75	10.04	15.64	14.32	14.98	21.03	21	21.015	26.17	26.06	26.115
	R2	3.78	2.39	3.085	10.12	8.31	9.215	14.7	13.17	13.935	21.03	19.74	20.385	27.4	23.95	25.675
	R3	4.75	3.4	4.075	10.34	8.7	9.52	15.15	14.51	14.83	22.46	21.35	21.905	26.25	25.48	25.865
	R4	4.6	2.72	3.66	10.79	9.5	10.145	15.8	14.65	15.225	23.23	23.08	23.155	26.58	25.81	26.195
	R5	4.43	3.67	4.05	9.74	8.91	9.325	14.43	14.32	14.375	22.06	21.25	21.655	26.6	25.13	25.865
ABsp,F59	R1	3.8	2.68	3.24	8.69	7.03	7.86	12.7	12.55	12.625	20.19	18.67	19.43	24.86	24.47	24.665
	R2	4.37	3.33	3.85	9.86	9.64	9.75	15.44	15.23	15.335	22.77	22.56	22.665	27.35	27.05	27.2
	R3	4.76	3.67	4.215	8.93	8.69	8.81	14.12	14.05	14.085	21.63	21.55	21.59	26.92	26.26	26.59
	R4	4.87	3.57	4.22	9.34	8.03	8.685	14	13.97	13.985	21.01	20.98	20.995	26.95	26.84	26.895
	R5	3.92	3.02	3.47	8.75	8.07	8.41	13.21	13.05	13.13	21.77	21.12	21.445	24.57	24.32	24.445
ABsp,P6	R1	4.53	2.96	3.745	9.92	8.2	9.06	13.9	13.31	13.605	20.59	19.47	20.03	24.92	24.58	24.75
	R2	5.28	3.35	4.315	10.27	8.75	9.51	15.26	14.75	15.005	23.5	21.19	22.345	28.83	27.1	27.965
	R3	5.81	2.94	4.375	11.91	8.93	10.42	16.33	14.02	15.175	22.12	20.3	21.21	26.36	25.29	25.825
	R4	4.64	4.44	4.54	10.6	9.25	9.925	16.09	15.22	15.655	21.93	21.76	21.845	26.34	26.2	26.27
	R5	5.15	4.36	4.755	9.89	8.25	9.07	13.88	13.55	13.715	21	20.95	20.975	25.49	25.03	25.26
ABsp,P15	R1	5.58	5.05	5.315	10.46	10.04	10.25	15.7	15.43	15.565	21.86	21.57	21.715	26.39	25.97	26.18
	R2	5.9	5.14	5.52	10.16	9.19	9.675	16.14	16.05	16.095	22.06	20.45	21.255	26.74	26.03	26.385
	R3	5.32	4.25	4.785	11.14	8.9	10.02	15.56	15.21	15.385	21.61	21.12	21.365	27.13	25.92	26.525
	R4	4.84	4.27	4.555	11.37	10.44	10.905	15.68	14.76	15.22	22.1	21.56	21.83	27.15	25.81	26.48
	R5	6.81	3.96	5.385	12.6	10.27	11.435	18.01	15.9	16.955	24.32	21.15	22.735	29.5	26.53	28.015
ABsp,P20	R1	4.85	3.64	4.245	10.12	9.65	9.885	16.17	16.1	16.135	21.97	20.74	21.355	24.98	24.53	24.755
	R2	4.43	3.48	3.955	9.82	9.11	9.465	14.97	14.56	14.765	21.32	21.16	21.24	25.59	25.08	25.335
	R3	5.23	3.58	4.405	9.53	9.21	9.37	14.65	13.54	14.095	22.05	21.47	21.76	26.86	25.56	26.21
	R4	5.23	3.8	4.515	9.94	9.47	9.705	15.04	14.32	14.68	21.19	21.08	21.135	26.48	25.33	25.905
	R5	5.28	3.06	4.17	10.23	88.66	49.445	15.74	14.23	14.985	22.26	22.12	22.19	25.97	25.68	25.825

Tabla 13. Ficha de datos de promedios de tasa de crecimiento radial

PROMEDIO POR REPETICION								
FECHA		07/03/2018	10/03/2018	13/03/2018	16/03/2018	19/03/2018	PROMEDIO	mm/día
EVALUACIÓN		Evaluación 1 (día 3)	Evaluación 2 (día 6)	Evaluación 3 (día 9)	Evaluación 4 (día 12)	Evaluación 5 (día 15)		
AISLADO	REPETICIÓN	mm/3 días	mm/3 días	mm/3 días	mm/3 días	mm/3 días		
ABsp,F38	R1	4.5	5.645	6.195	6.58	4.59	5.502	1.83
	R2	4.44	5.99	7.345	6.925	5.895	6.119	2.04
	R3	3.81	5.965	5.14	6.485	5.535	5.387	1.80
	R4	4.115	5.745	5.19	7.805	5.58	5.687	1.90
	R5	5.445	4.455	6.95	7.7	5.27	5.964	1.99
ABsp,F42	R1	4.18	4.445	6.765	6.785	4.895	5.414	1.80
	R2	4.08	4.615	6.505	6.835	4.98	5.403	1.80
	R3	4.6	4.155	5.97	6.165	4.305	5.039	1.68
	R4	4.58	5.635	6.835	7.59	5.5	6.028	2.01
	R5	4.325	4.375	6.595	5.69	5.27	5.251	1.75
ABsp,F58	R1	3.805	6.235	4.94	6.035	5.1	5.223	1.74
	R2	3.085	6.13	4.72	6.45	5.29	5.135	1.71
	R3	4.075	5.445	5.31	7.075	3.96	5.173	1.72
	R4	3.66	6.485	5.08	7.93	3.04	5.239	1.75
	R5	4.05	5.275	5.05	7.28	4.21	5.173	1.72
ABsp,F59	R1	3.24	4.62	4.765	6.805	5.235	4.933	1.64
	R2	3.85	5.9	5.535	7.33	4.535	5.43	1.81
	R3	4.215	4.595	5.275	7.505	5	5.318	1.77
	R4	4.22	4.465	5.3	7.01	5.9	5.379	1.79
	R5	3.47	4.94	4.72	8.315	3	4.889	1.63
ABsp,P6	R1	3.745	5.315	4.545	6.425	4.72	4.95	1.65
	R2	4.315	5.195	5.495	7.34	5.62	5.593	1.86
	R3	4.375	6.045	4.755	6.035	4.615	5.165	1.72
	R4	4.54	5.385	5.73	6.19	4.425	5.254	1.75
	R5	4.755	4.315	4.645	7.26	4.285	5.052	1.68
ABsp,P15	R1	5.315	4.885	5.315	6.15	4.465	5.226	1.74
	R2	5.52	4.155	6.42	5.16	5.13	5.277	1.76
	R3	4.785	5.235	5.365	5.98	5.16	5.305	1.77
	R4	4.555	6.35	4.315	6.61	4.65	5.296	1.77
	R5	5.385	6.05	5.52	5.78	5.28	5.603	1.87
ABsp,P20	R1	4.245	5.64	6.25	5.22	3.4	4.951	1.65
	R2	3.955	5.51	5.3	6.475	4.095	5.067	1.69
	R3	4.405	4.965	4.725	7.665	4.45	5.242	1.75
	R4	4.515	5.19	4.975	6.455	4.77	5.181	1.73
	R5	4.17	5.275	5.54	7.205	3.635	5.165	1.72

Tabla 14. Ficha de datos de lectura en microscopio para evaluación de la concentración de conidios de *7*cepas nativas de *Beauveria* sp

LECTURA DE ESPORAS EN LA CAMARA DE NEUBAUER CON MICROSCOPIO INVERTIDO																			
R 1				R 2				R 3				R 4				R 5			
AISLADO	CUADRANTE	N° DE ESPORAS	PROMEDIO	AISLADO	CUADRANTE	N° DE ESPORAS	PROMEDIO	AISLADO	CUADRANTE	N° DE ESPORAS	PROMEDIO	AISLADO	CUADRANTE	N° DE ESPORAS	PROMEDIO	AISLADO	CUADRANTE	N° DE ESPORAS	PROMEDIO
F38	C1	20	25.25	F38	C1	23	28.5	F38	C1	27	24.75	F38	C1	33	23.25	F38	C1	20	25.5
	C2	19			C2	40			C2	25			C2	24			C2	41	
	C3	43			C3	25			C3	30			C3	21			C3	19	
	C4	19			C4	26			C4	17			C4	15			C4	22	
F42	C1	18	24	F42	C1	16	22.25	F42	C1	31	23	F42	C1	35	26	F42	C1	21	23.5
	C2	25			C2	31			C2	19			C2	23			C2	26	
	C3	32			C3	15			C3	22			C3	25			C3	30	
	C4	21			C4	27			C4	20			C4	21			C4	17	
F58	C1	17	21.75	F58	C1	19	20	F58	C1	17	22.25	F58	C1	23	20.25	F58	C1	31	23
	C2	24			C2	24			C2	21			C2	16			C2	23	
	C3	19			C3	21			C3	34			C3	24			C3	20	
	C4	27			C4	16			C4	17			C4	18			C4	18	
F59	C1	13	19.25	F59	C1	23	18.75	F59	C1	24	22.75	F59	C1	19	23.5	F59	C1	21	19.5
	C2	18			C2	20			C2	33			C2	32			C2	22	
	C3	19			C3	25			C3	15			C3	12			C3	11	
	C4	27			C4	7			C4	19			C4	31			C4	24	
P6	C1	17	17	P6	C1	14	19.5	P6	C1	13	18.75	P6	C1	14	17.25	P6	C1	16	20.75
	C2	15			C2	19			C2	27			C2	23			C2	22	
	C3	21			C3	29			C3	21			C3	19			C3	18	
	C4	15			C4	16			C4	14			C4	13			C4	27	
P15	C1	36	20.5	P15	C1	16	19.25	P15	C1	10	15.5	P15	C1	17	18.25	P15	C1	18	22.5
	C2	18			C2	19			C2	18			C2	21			C2	33	
	C3	19			C3	22			C3	21			C3	19			C3	22	
	C4	9			C4	20			C4	13			C4	16			C4	17	
P20	C1	15	17.25	P20	C1	17	20.25	P20	C1	23	20.5	P20	C1	21	19.5	P20	C1	29	24.75
	C2	17			C2	30			C2	14			C2	13			C2	27	
	C3	22			C3	15			C3	18			C3	28			C3	17	
	C4	15			C4	19			C4	27			C4	16			C4	26	

Tabla 15. Datos de concentración de conidios de 7 cepas nativas de *Beauveria* sp.

PRODUCCIÓN DE ESPORAS			
AISLADO	REPETICION	N° DE ESPORAS	PROMEDIO
F38	R1	25.25	25.45
	R2	28.5	
	R3	24.75	
	R4	23.25	
	R5	25.5	
F42	R1	24	23.75
	R2	22.25	
	R3	23	
	R4	26	
	R5	23.5	
F58	R1	21.75	21.45
	R2	20	
	R3	22.25	
	R4	20.25	
	R5	23	
F59	R1	19.25	20.75
	R2	18.75	
	R3	22.75	
	R4	23.5	
	R5	19.5	
P6	R1	17	18.65
	R2	19.5	
	R3	18.75	
	R4	17.25	
	R5	20.75	
P15	R1	20.5	19.2
	R2	19.25	
	R3	15.5	
	R4	18.25	
	R5	22.5	
P20	R1	17.25	20.45
	R2	20.25	
	R3	20.5	
	R4	19.5	
	R5	24.75	

Anexo 2. Análisis estadístico

Tabla 16. Prueba de normalidad para aptogenicidad Shapiro-Wilks.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Prueba de patogenicidad	21	71.98	18.24	0.91	0.001

Tabla 17. Prueba de Kruskal Wallis

Variable	PARCELA	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Prueba de patogenicidad	F38	3	92.59	6.41	88.89	7	8.6	0.200
Prueba de patogenicidad	F42	3	88.89	0.00	88.89			
Prueba de patogenicidad	F58	3	92.59	12.83	100			
Prueba de patogenicidad	F59	3	88.89	11.11	88.89			
Prueba de patogenicidad	P15	3	92.59	6.41	88.89			
Prueba de patogenicidad	P20	3	92.59	12.83	100			
Prueba de patogenicidad	P6	3	88.89	0.00	88.89			

Tabla 18. Prueba de Normalidad para porcentaje de germinación Shapiro-Wilks

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Porcentaje de Germinación	35	81.44	8.77	0.83	0.001

Tabla 19. Prueba de Kruskal Wallis

Variable	PARCELA	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Porcentaje de Germinación	F38	5	87.58	5.32	85.89	6	20	0.003
Porcentaje de Germinación	F42	5	84.42	4.31	81.74			
Porcentaje de Germinación	F58	5	86.73	2.44	87.87			
Porcentaje de Germinación	F59	5	69.14	14.61	77.27			
Porcentaje de Germinación	P15	5	80.54	2.51	80.51			
Porcentaje de Germinación	P20	5	77.43	7.91	79.67			
Porcentaje de Germinación	P6	5	84.23	2.21	83.33			

Tabla 20. Prueba de Normalidad para crecimiento radial Shapiro-Wilks

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Crecimiento radial	35	1.70	0.10	0.90	0.0082

Tabla 21 Prueba de Kruskal Wallis

Variable	PARCELA	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Crecimiento Radial	F38	5	1.90	0.10	1.89	6	15.156	0.018
Crecimiento Radial	F42	5	1.80	0.12	1.8			
Crecimiento Radial	F58	5	1.73	0.01	1.72			
Crecimiento Radial	F59	5	1.73	0.09	1.77			
Crecimiento Radial	P15	5	1.77	0.05	1.76			
Crecimiento Radial	P20	5	1.70	0.04	1.72			
Crecimiento Radial	P6	5	1.73	0.08	1.72			

Tabla 22 Prueba de Normalidad para número de esporas Shapiro-Wilks

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Número de esporas	35	21.39	2.94	0.97	0.8468

Prueba de Kruskal Wallis.

Tabla 23 Cuadro ANOVA para número de esporas

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	178.27	6	29.71	7.209	0.000
Parcelas	178.27	6	29.71	7.209	0.000
Error	115.40	28	4.12		
Total	293.67	34			

Tabla 24 Prueba Tukey para número de esporas

TRAT	Medias	n	E.E.	Prueba Tukey
F38	25.45	5	0.908	A
F42	23.75	5	0.908	AB
F58	21.45	5	0.908	ABC
F59	20.75	5	0.908	BC
P20	20.45	5	0.908	BC
P15	19.2	5	0.908	C
P6	18.65	5	0.908	C