

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



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

**CEPAS NATIVAS DE *Metarhizium* sp
PROVENIENTES DE PLANTACIONES DE CAFÉ
CON POTENCIAL PARA EL CONTROL DE LA
BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei*, Ferrari)
EN RODRÍGUEZ DE MENDOZA – PERÚ**

Autor: Bach. Reyna Gisela Chuquizuta Torres

Asesor: Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

Registro (.....)

CHACHAPOYAS - PERÚ

2022

Dedicatoria

Dedico esta tesis a Dios por guiarme en cada uno de mis pasos, a mi amiga y compañera Jeisy por incitarme a no rendirme, a mis amigos del laboratorio por brindarme sus conocimientos para la realización de este trabajo y en especial a mis padres por su cariño y apoyo incondicional tanto económica como moralmente en cada una de las etapas de formación de mi carrera profesional.

Reyna Gisela Chuquizuta Torres

Agradecimiento

Al proyecto BIOBROK que me dio la oportunidad de realizar la primera fase del proyecto de investigación denominado “Desarrollo de una fórmula biológica a base de cepas nativas de microorganismos entomopatógenos para reducir la incidencia de broca en plantaciones de café especiales, Amazonas - Perú” y al equipo técnico conformado por: Mi asesor, M. Cs. Segundo Manuel Oliva Cruz y mis co asesores, Ing. Geysen Everson Angulo Cueva y Mg. Sc. Santos Triunfo Leiva Espinoza.

A mi amiga y compañera, Jeisy Mariela Servan Bardales, quien también formó parte para la realización de las actividades desarrolladas en mi tesis.

A la bióloga María Julia Silva Manco; de manera especial, por guiarme en el trabajo en laboratorio, brindarme conocimientos teóricos y prácticos y particularmente por su apoyo moral, sin el cual no hubiera sido posible la culminación de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Oswaldo Ananco Ahuananchi y Kelvin James Llanos Gomez.

Al Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV) del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (INDES-CES), por brindarme el acceso para el uso de sus equipos, reactivos y medios en general.

Reyna Gisela Chuquizuta Torres

**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

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Visto Bueno del Asesor de la Tesis



ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "Cepas nativas de Melarhizium sp. provenientes de plantaciones de café con potencial para el control de la Broca del café (Hypothenemus hampei, Ferrari) en Rodríguez de Mendoza - Perú." del egresado Reyna Gisela Chuguzuta Torres de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 15 de Septiembre del 2020

Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

Asesor y Docente de la UNTRM

Visto Bueno del Coasesor de la Tesis



ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada *“Cepas nativas de Melarhiziuma provenientes de plasmaciones de Café con potencial para el control de la Bresa del café (Hypothenemus hampei, Ferriss) en Rodríguez de Mendoza - Perú”*; del egresado *Reyna Gisela Ohugizuta Torres* de la Facultad de *Ingeniería y Ciencias Agrarias* Escuela Profesional de *Ingeniería Agrónoma* de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, *15* de *Septiembre* del 2020

Mg. Sc. Santos Triunfo Leiva Espinoza

Visto Bueno del Coasesor de la Tesis



ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (x), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "Cepas nativas de Melanizium spp. provenientes de plantaciones de Café con potencial para el control de la Broca del Café (Hypothenemus hampei, Ferrari) en Rodríguez de Mendoza (Perú)" del egresado Reyna Gisela Chuguieta Torres de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 15 de Septiembre del 2020

Ing. Geysen Everson Angulo Cueva

Co-asesor

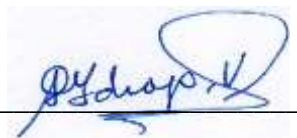
Jurado Evaluador de la Tesis



Ph.D. Ligia Magali García Rosero
Presidente



Mg. Sc. Walter Daniel Sánchez Aguilar
Secretario



Ing. Guillermo Idrogo Vásquez
Vocal

Constancia de Originalidad de la Tesis



ANEXO 3-0

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada: *Cepas nativas de Metarhizium sp* provenientes de plantaciones de café con potencial para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) en Rodríguez de Mendoza - Perú² presentada por el estudiante ()/egresado (X) Reyna Gisela Chugvizuta Torres de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma con correo electrónico institucional 7248401332@untrm.edu.pe después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 20 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 01 de Junio del 2021

OBSERVACIONES:

.....
.....

Índice de Contenido

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Autoridades de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas	iv
Visto Bueno del Asesor de la Tesis	v
Visto Bueno del Coasesor de la Tesis	vi
Visto Bueno del Coasesor de la Tesis	vii
Jurado Evaluador de la Tesis	viii
Constancia de Originalidad de la Tesis	ix
Acta de Sustentación de la Tesis	x
Índice o Contenido	xi
Índice de Tablas	xii
Índice de Figura	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. Ubicación del área de estudio	19
2.2. Métodos y procedimientos.....	23
2.3. Caracterización de cepas nativas de <i>Metarhizium</i>	25
2.4. Determinación de la capacidad entomopatógena de las cepas nativas de <i>Metarhizium</i> sp	29
2.5. Diseño experimental	32
III. RESULTADOS	36
3.1. Aislamiento.....	36
3.2. Caracterización de aislados de <i>Metarhizium</i> sp.....	39
3.3. Prueba de patogenicidad.....	48
IV. DISCUSIÓN	53
V. CONCLUSIONES	56
VI. RECOMENDACIONES	57
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Materiales y equipos utilizados en el aislamiento, evaluación de la caracterización y patogenicidad del hongo	22
Tabla 2. Características generales del experimento	33
Tabla 3. Relación de parcelas georreferenciadas. Sitio donde se realizó el aislamiento cepas de <i>Metarhizium</i> sp.....	37
Tabla 4. Desarrollo micelial de cepas nativas de <i>Metarhizium</i> sp.....	43
Tabla 5. Producción de esporas/ml de <i>Metarhizium</i> sp.	45
Tabla 6. Porcentaje de germinación de <i>Metarhizium</i> sp	47
Tabla 7. Crecimiento del micelio de <i>Metarhizium</i> sp	50
Tabla 8. Parcelas con presencia de cepas de <i>Metarhizium</i> sp y sus respectivas características microscópicas.....	52
Tabla 9. Parcelas georreferenciadas de los distritos de Rodríguez de Mendoza	62
Tabla 10. Ficha de evaluación de las características morfológicas macroscópica de <i>Metarhizium</i> sp	63
Tabla 11. Ficha de evaluación de la producción de esporas de <i>Metarhizium</i> sp	65
Tabla 12. Ficha de evaluación de porcentaje de germinación de cepas de <i>Metarhizium</i> sp	67
Tabla 13. Ficha de evaluación de Mortalidad <i>Hypothenemus hampei</i>	68
Tabla 14. Ficha de evaluación de micosis de <i>Metarhizium</i> sp sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	71
Tabla 15. Análisis de varianza de Crecimiento radial de <i>Metarhizium</i> sp.....	74
Tabla 16. Análisis de varianza de Porcentaje de germinación de <i>Metarhizium</i> sp.....	74
Tabla 17. Análisis de varianza de Crecimiento de micelio del hongo (<i>Metarhizium</i> sp) so sobre adultos de (<i>Hypothenemus hampei</i>)	74

Índice de Figuras

Figura 1. Muestras de suelo de la provincia de Rodríguez de Mendoza	23
Figura 2. "Técnica del insecto trampa “Cebo - Insecto”	24
Figura 3. Evaluación macroscópica; color de la colonia y pigmentación de <i>Metarhizium</i> sp mediante la tabla Munsell	25
Figura 4. Estructuras microscópicas; A-B <i>Metarhizium</i> sp en microscopio óptico, coloreadas con lactofenol y azul de lactofenol	26
Figura 5. Evaluación de crecimiento radial	27
Figura 6. Lectura de conidios en la cámara Neubauer.....	28
Figura 7. Evaluación de porcentaje de germinación.....	29
Figura 8. Propagación masiva: cepas nativas de <i>Metarhizium</i> sp en medio sólido arroz	30
Figura 9. Prueba de patogenicidad.....	31
Figura 10. Micosis de <i>Metarhizium</i> sp	32
Figura 11. Disposición de los tratamientos en el laboratorio	34
Figura 12. Tipo de esporulación.....	39
Figura 13. Borde de la colonia.....	40
Figura 14. Textura de la colonia.....	40
Figura 15. Valores de crecimiento radial (máximo y mínimo) para <i>Metarhizium</i> sp...	44
Figura 16. Concentración de esporas/ml, contabilizadas de las cepas de <i>Metarhizium</i> sp	46
Figura 17. Valores porcentaje de germinación (máximo, medio y mínimo) para <i>Metarhizium</i> sp.	47
Figura 18. Porcentaje de Germinación de los aislados de <i>Metarhizium</i> sp, promedios germinados y no germinados	48
Figura 19. Valores porcentaje de Mortalidad (máximo y mínimo) de <i>Metarhizium</i> sp sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	49
Figura 20. Micosis del hongo.....	49
Figura 21. Crecimiento micelial de <i>Metarhizium</i> sp sobre cuerpos de <i>H. hampei</i> (máximo y mínimo).....	51

Resumen

La presente investigación tuvo por objetivo evaluar cepas de *Metarhizium* sp para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) provenientes de plantaciones de café. Las muestras de suelo fueron recolectadas de plantaciones de café de fincas de producción orgánico, de los distritos de San Nicolás, Cochamal, Huambo, Longar, Mariscal Benavides, Milpuc, Omia, Santa Rosa y Totora de la provincia de Rodríguez de Mendoza. Se evaluaron las características morfológicas: color de las colonias de *Metarhizium* sp que variaron desde blanco, amarillo pálido, amarillo; pasando desde olivo, gris olivo, gris olivo oscuro, marrón rojizo claro; la pigmentación que se observaron de las cepas fueron desde blanco, amarillo pálido, amarillo, rojo amarillento, marrón amarillento, rojo oscuro. Las características fisiológicas evaluadas fueron la germinación, la esporulación y crecimiento radial. Los datos se procesaron en el programa InfoStat Versión 15.0 utilizando la prueba Tukey ($p < 0,05$) para la comparación de las medias. Se aislaron diecinueve cepas de *Metarhizium* sp, que presentaron patogenicidad de 100% en adultos de *Hypothenemus hampei*, germinación de conidios de 100% al término de 14 horas, crecimiento radial de 43,15mm y una esporulación de $9,8 \times 10^7$ esporas/ml.

Palabras claves: Caracterización, *Metarhizium* sp, *Hypothenemus hampei*

Abstract

The objective of this research was to evaluate native strains of *Metarhizium* sp for the control of the coffee borer (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) from coffee plantations. The soil samples were collected from coffee plantations of organic production farms, from the districts of San Nicolás, Cochamal, Huambo, Longar, Mariscal Benavides, Milpuc, Omia, Santa Rosa and Totora in the province of Rodríguez de Mendoza. The morphological characteristics were evaluated: color of the colonies of *Metarhizium* sp that varied from white, pale yellow, yellow; going from olive, olive gray, dark olive gray, light reddish brown; The pigmentation that was observed of the strains were from white, pale yellow, yellow, yellowish red, yellowish brown, dark red. The physiological characteristics evaluated were germination, sporulation and radial growth. The data were processed in the InfoStat Version 15.0 program using the Tukey test ($p < 0.05$) for the comparison of means. Nineteen strains of *Metarhizium* sp were isolated, which presented 100% pathogenicity in *Hypothenemus hampei* adults, conidia germination of 100% at the end of 14 hours, radial growth of 43.15mm and a sporulation of 9.8×10^7 spores / m

Keywords: Characterization, *Metarhizium* sp, *Hypothenemus hampei*

I. INTRODUCCIÓN

El café es la bebida estimulante y aromática más difundida en el mundo, procedente de un arbusto tropical de hojas verdes perteneciente a la familia Rubiaceas y género *Coffea* spp., que crece en zonas de moderadamente húmedas (Gotteland & Saturnino, 2007) y se estima que al menos el 30% de la población mundial consume una vez al día una taza de café (Valenzuela, 2010). Este cultivo es de gran importancia agrocomercial mundial (Fernández *et al.*, 2010; Ejea, 2009).

Este cultivo constituye la segunda mercancía más comercializada en el mundo, después del petróleo (Fernández *et al.*, 2010), sobresaliendo a nivel comercial dos variedades de café: los cafés arábicos y robustas (Alejandra & María, 2010). El café arábico (*Coffea arábica*) es nativo de las tierras de Abisinial, actual Etiopía, posiblemente de regiones de África y Arabia en Asia y el café robusto (*Coffea canephora*) proviene de África central (Coveca, 2010). La descripción entre variedades: El Arábica, genéticamente, posee 44 cromosomas contra 22 de la Robusta, cuando crece alcanza de 6 a 8 metros; mientras que la Robusta tiende a ser más alto, de 8 a 10 metros. En cuanto a enfermedades el café Arábica es particularmente sensible a la roya (*Hemileia vastatrix*), especialmente cuando se siembra en terrenos de baja altitud mientras la Robusta es más resistente a los ataques de los parásitos, a las enfermedades y al calor. Pero la gran diferencia entre las dos especies está en el grano verde. El grano Arábico es más aplanado y alargado, su color verde es más intenso, y a veces muestra matices azules con un surco central sinuoso en cambio el grano de la Robusta es más convexo y abombado, con un surco central rectilíneo, y su color es verde pálido con matices marrones o grises. Desde el punto de vista químico, el grano Arábico contiene de 1.1 a 1.7% de cafeína, mientras que la Robusta contiene de 2 a 4.5%. Y el sabor en la taza en las dos especies tampoco es igual: el Arábico es más dulce y aromático y sensiblemente menos amargo y astringente que el experimentado con la Robusta (Figuroa *et al.*, 2015).

La producción mundial para este cultivo en el periodo 2017-2018 fue de 163 51 millones de sacos (OIC, 2018). Los principales productores de café, son: Brasil con 57.4 millones, Vietnam con 29.5 millones, Colombia con 14 millones, Indonesia con 10.36 millones y Honduras 7.7 millones de sacos. En el año 2018, el Perú mostró que el café pergamino, tuvo una producción anual de 369 62 toneladas, con

un rendimiento de 826 kg/ha y una superficie de 447 426 ha. En la Región Amazonas, para el mismo año, hubo una producción anual de 43 946 toneladas, con un rendimiento de 738 kg/ha y una superficie de 59 539 ha (MINAGRI,2018).

Bajo esta perspectiva, la producción agrícola del café enfrentará el desafío del control de plagas y enfermedades (Canet & Soto, 2016). Las plagas más importantes del cultivo de café a nivel nacional son, principalmente, la broca (*Hypothenemus hampei*, Ferrari), el minador (*Leucoptera coffella*), arañita roja (*Oligonychus yothersi*), hormiga de color marrón (*Atta cephalotes*,) y Queresa *Coccus viridis* (Sanchez & Vergara, 2002).

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), tiene su origen en el África oriental, actual Uganda, en la región cercana al Lago Victoria. (Franqui & Medina, 2003). Apareció por primera vez en latinoamérica en 1913, en Brasil en 1924, en Guatemala en 1971 y Colombia en 1988 (Canet & Soto, 2016) y actualmente es considerada la plaga más importante del cultivo del café en el mundo, por el severo daño que causa al grano (Padilla *et al.*, 2000). lo que genera serias pérdidas en el rendimiento y en la calidad del producto. La hembra adulta de este coleóptero taladra y hace galerías en el endospermo del grano de café, produciendo tres tipos de daños: perforación y alimentación por los adultos y su progenie, reduciendo la producción y la calidad del producto final; el daño físico de la broca permite que los granos maduros atacados sean vulnerables a la infestación y a los ataques de otras plagas y el tercer daño implica que la broca ataque también a los granos verdes, causando la caída prematuras (Barrera *et al.*, 2006).

Los estudios realizados por Canet & Soto (2016), utilizando avispas *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta*, *Phymastichus coffea* y *Heterospilus coffeicola* para el control biológico, actúan como parásitos. Estos insectos tienen el propósito de reducir en lo posible el número de estados inmaduros que dan origen a las hembras fundadoras aptas para colonizar la futura cosecha. Función que también pueden cumplir ciertos hongos entomopatógenos pertenecientes al género *Metarhizium* y *Beauveria* (Monzón, 2001), que se encuentran en la naturaleza en rastrojos de cultivos, estiércol, suelo, plantas y parasitando algún insecto (Canet & Soto, 2016). Monzón (2001), encontró que el *Metarhizium* sp, ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes, en cuanto a la patogenicidad, esta especie tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina) (Leger *et al.*, 1988). Otra

forma de ataque es mediante los metabolitos tóxicos llamados depsipéptidos, especialmente la destruxina que es producida por el *Metarhizium* sp. y son sintetizados cuando el hongo ha penetrado el exoesqueleto y alcanzado el hemocele (Franco *et al.*, 2011).

En la región Amazonas, el café es cultivado a mediana escala, principalmente en la provincia de Rodríguez de Mendoza, generando un mayor ingreso económico-familiar. Donde, agricultores han reportado incidencias de daños al cultivo por encima del 50 %, atribuidos a la broca del café; convirtiendo a esta plaga en una amenaza para la producción del mismo (Leiva, 2013).

Con el fin de aprovechar la diversidad de hongos entomopatógenos en diferentes agroecosistemas productivos de café en la Provincia Rodríguez de Mendoza, el objetivo de la presente investigación fue aislar, identificar y evaluar la patogenicidad de diferentes cepas nativas de *Metarhizium* sp. contra la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en la provincia de Rodríguez de Mendoza – Perú.

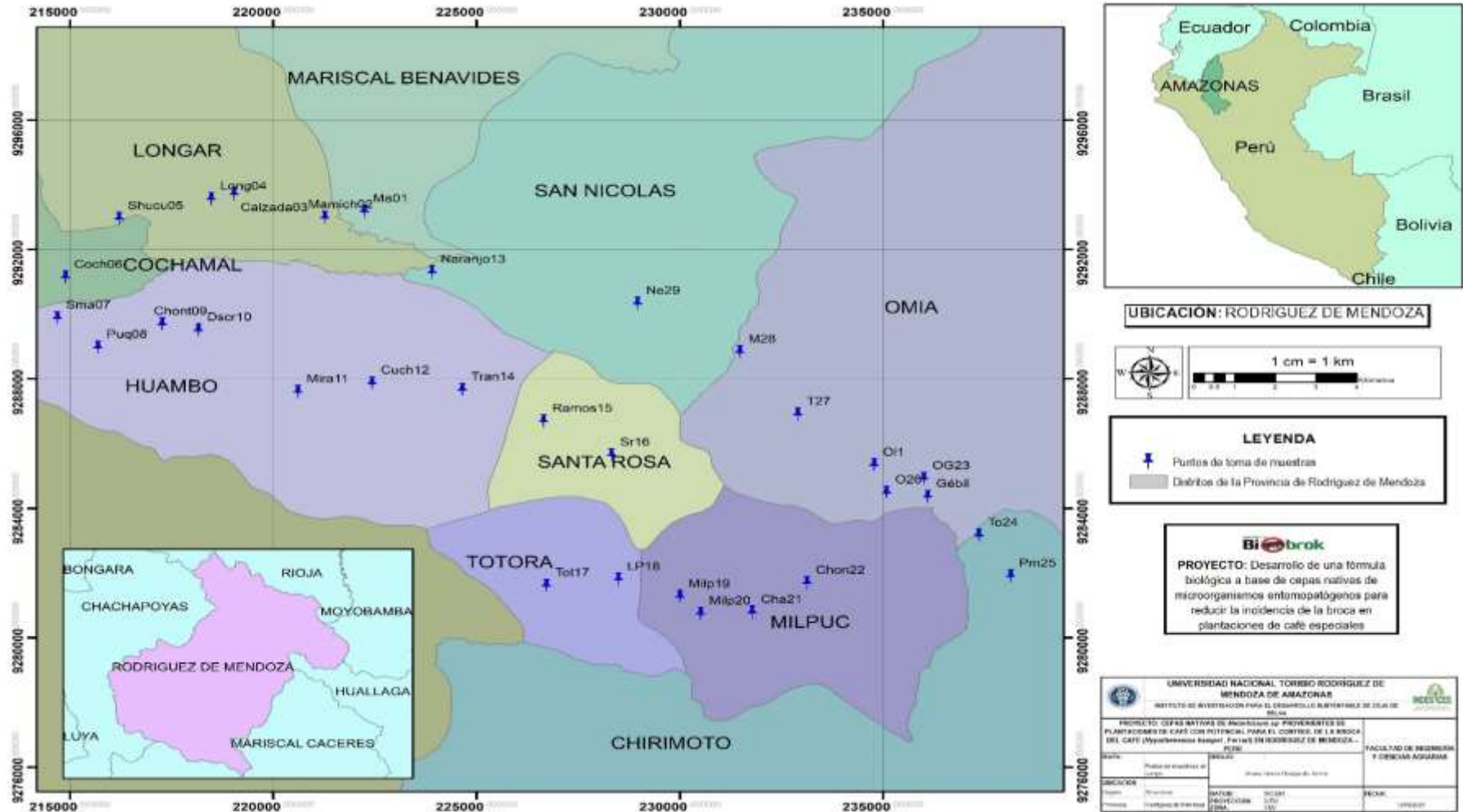
II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del área de estudio

La presente investigación se ejecutó por etapas: la primera etapa de recolección de muestras de suelo procedente de plantaciones de café orgánico de los distritos de la provincia de Rodríguez de Mendoza: San Nicolás, Cochamal, Huambo, Longar, Mariscal Benavides, Milpuc, Omia, Santa Rosa y Totorá (Mapa 1), y la segunda etapa para el aislamiento, caracterización, patogenicidad y distribución geoespacial, a ser realizada en el Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV), ubicado en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, barrio Higos Urco, Chachapoyas (Mapa 2).

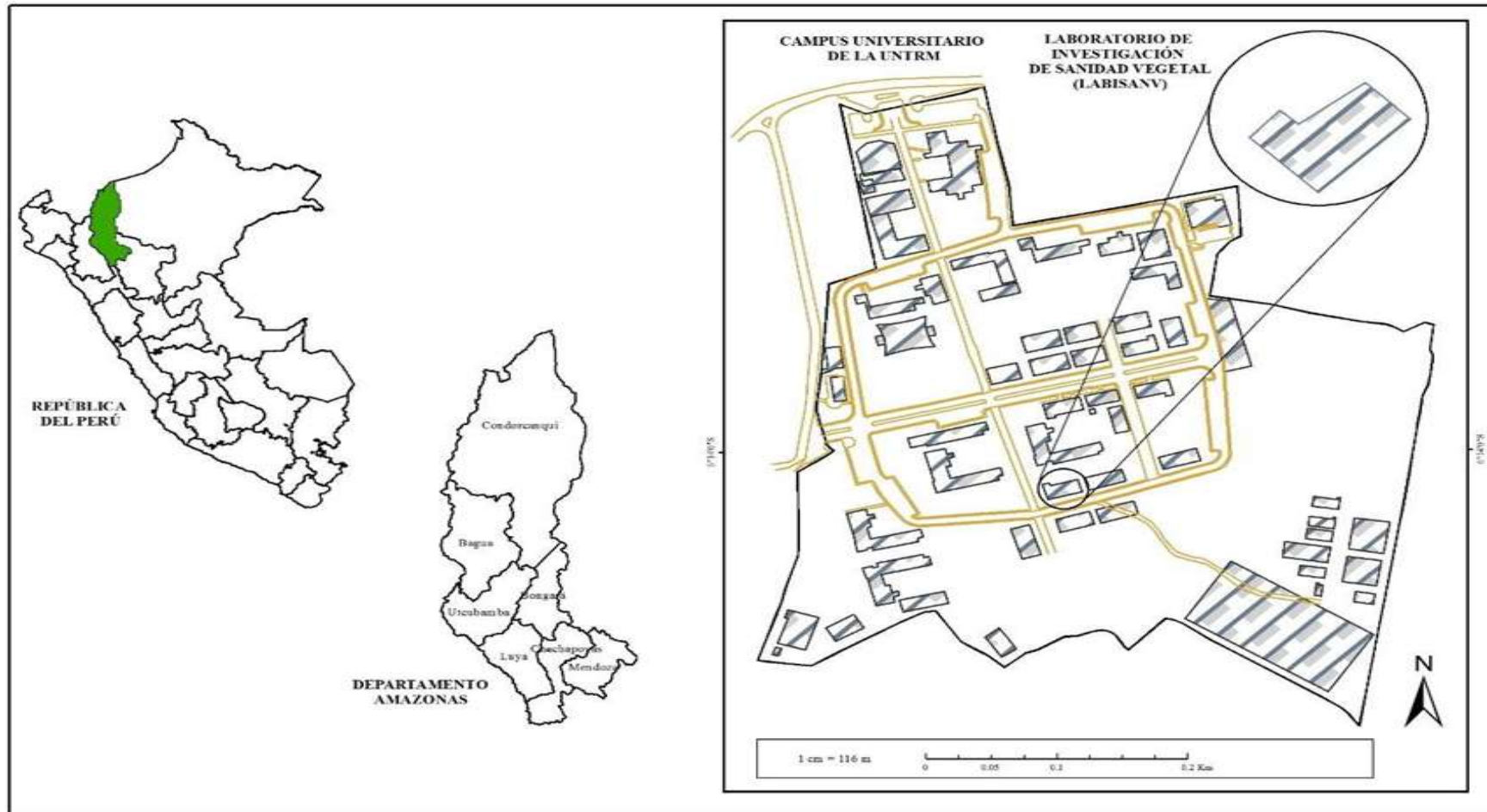
Mapa 1

Mapa del área de estudio. Los distritos involucrados en el estudio son los pertenecientes a la provincia de Rodríguez de Mendoza



Mapa 2

Mapa de la ciudad universitaria UNTRM-A y el Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal. Donde se desarrollará la segunda etapa: aislamiento, identificación, caracterización y distribución geoespacial de las muestras recolectadas



Los materiales, equipos, reactivos y medios nutritivos utilizados en campo y laboratorio para el análisis de muestras (Tabla 1).

Tabla 1

Materiales y equipos utilizados en el aislamiento, evaluación de la caracterización y patogenicidad del hongo

Equipos y materiales de campo		
- Bolsas	- Wincha	
- Costal	- Hipoclorito de sodio al 70%	
- Gps	- Plumón indelible	
- Muestreador metálico		
Equipos y materiales de laboratorio		
Materiales		
- Recipientes de plástico	- Mecheros	- Papel toalla
- Placas petri	- Bisturí	- Estilete
- Tips	- Pinzas	- Sacabocado
- Aguja de siembra	- Cubre objeto	- Tubos de ensayo
- Ansa de siembra	- Porta objeto	- Matraz Erlenmeyer
- Plumón indeleble	- Papel aluminio	- Gradilla
Medios nutritivos		
- Potato dextrose agar (PDA)		
- Arroz		
Reactivos		
- Lactofenol	- Antibiótico cloranfenicol	
- Lactofenol azul	- Alcohol de 96°	
- Tween 80	- Alcohol de 70°	
- Agua destilada		
Equipos		
- Incubadora	- Autoclave	
- Microscopio marca Leica®	- Estereoscopio	
- Vortex	- Estufa	
- Balanza analítica	- Cámara de flujo laminar	

-
- | | |
|-------------------------|----------------------|
| - Macropipetade de 5 ml | - Cámara de Neubauer |
| - Micropipeta de 1ml | - Agitador magnético |
-

2.2. Métodos y procedimientos

Selección y evaluación en fincas cafetaleras

Las muestras de suelos fueron recolectadas por el equipo técnico del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (INDES-CES) en fincas productoras de café de los distritos de San Nicolás, Cochamal, Huambo, Longar, Mariscal Benavides, Milpuc, Omia, Santa Rosa y Totora.

Distribución geoespacial de las fincas cafetaleras

Cada muestra de suelo recolectada fue georreferenciada mediante GPS (Anexo 01: Tabla 8), datos que fueron ingresados al software ArcGIS.

Fase de Campo

Recolección de muestras de suelo

En esta etapa se utilizó la metodología descrita por Ávila *et al.* (2014) con algunas modificaciones.

Se colectaron muestras de suelo, procedentes de 31 unidades agrícolas identificadas, para ello se seleccionaron 5 plantas de café al azar por finca, del cual se obtuvieron 5 sub muestra por planta a una profundidad de 0-20 cm, todas estas muestras fueron homogenizadas para sacar de ellas una sola muestra compuesta por finca, obteniendo aproximadamente 300 Kg de muestra, estas fueron colectadas en bolsas de polietileno previamente codificadas para luego ser transportados al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la UNTRM.

Figura 1

Muestras de suelo de la provincia de Rodríguez de Mendoza



Fase de laboratorio

Aislamiento de cepas nativas de *Metarhizium* sp.

Aislamiento de cepas nativas de *Metarhizium* sp: Técnica del insecto trampa “Cebo – Insecto

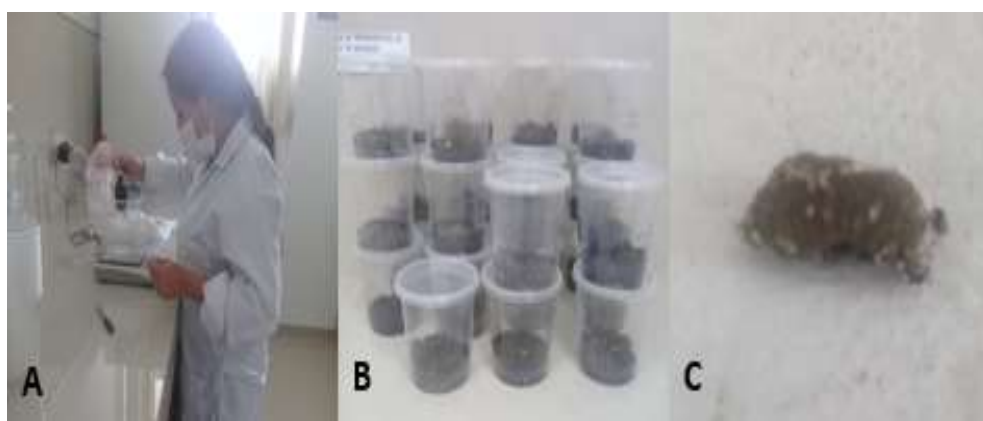
Para el desarrollo del aislamiento se utilizó la metodología descrita por Zimmermann (1986), con algunas modificaciones.

De cada muestra homogenizada, se tomó 150 g de suelo para ser colocados en un recipiente plástico, conjuntamente se colocaron 2 larvas del picudo de la caña de azúcar (*Metamasius hemipterus*). siendo incubados a 27 °C durante 7 días. Luego de este periodo, las larvas muertas fueron retiradas y colocadas en cámaras húmedas para favorecer el crecimiento del hongo entomopatógeno

Se seleccionaron aquellas larvas que presentaron crecimiento de micelio sobre la cutícula y con la ayuda de una aguja de siembra se raspó el micelio, repicando en medio de cultivo (PDA), llevando a incubar a 30°C por 7 días (Cañedo & Ames, 2004).

Figura 2

"Técnica del insecto trampa “Cebo - Insecto”; A: pesado 150g de muestra de suelo; B: muestras de suelo con larvas de Metamasius hemipterus; C: presencia de micelio del hongo en la larva.



2.3. Caracterización de cepas nativas de *Metarhizium*

a) Morfología macroscópica

Las cepas aisladas fueron sembradas en placas Petri con medio PDA y se incubaron a 30 °C por 30 días, durante los cuales se observó las características macroscópicas como el color de las colonias, textura o aspecto, el tipo de esporulación y pigmentación (Padilla *et al.*, 2000). Para describir el color se utilizó la tabla Munsell (Obando *et al.*, 2013).

Figura 3

*Evaluación macroscópica; color de la colonia y pigmentación de *Metarhizium* sp mediante la tabla Munsell*



b) Morfología microscópica

Microcultivo de cepas nativas de *Metarhizium*

Se transfirieron discos de 4 mm de diámetro del borde de una placa de PDA y se colocaron sobre un portaobjeto, seguidamente, con el asa de siembra se inocularon las esporas del hongo sobre los discos de PDA, se humedeció el papel toalla con agua destilada estéril y finalmente se incubaron a 30°C por 5 días (Torres *et al.*, 2015).

Montaje de los microcultivos

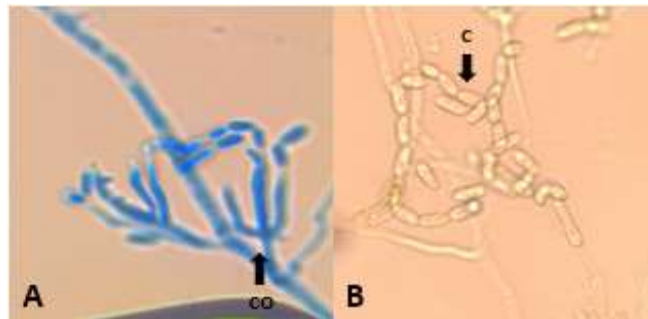
Pasados 5 días, se hizo una preparación semipermanente con lactofenol y lactofenol azul, con una pinza se levantó el cubreobjetos con esporas de los microcultivos y se colocó en porta objeto con lactofenol y lactofenol azul, lo mismo se realizó con los portaobjetos del microcultivo. El siguiente procedimiento consistió en secar los

montajes con papel, se pasó con esmalte transparente de uñas y se observaron las estructuras microscópicas en el microscopio marca Leica® para tomarles foto y luego medir las esporas y fiálides del hongo. Finalmente se compararon las estructuras microscópicas con las tablas taxonómicas de (Barnett & Hunter, 1998; Bischoff *et al.*, 2009; Nishi *et al.*, 2017).

Para la medición de las estructuras microscópicas se utilizó el Software Image Tool 3.0.

Figura 4

Estructuras microscópicas; A-B Metarhizium sp en microscopio óptico, coloreadas con lactofenol y azul de lactofenol Co: conidióforo c: conidio. (PHR-M14)

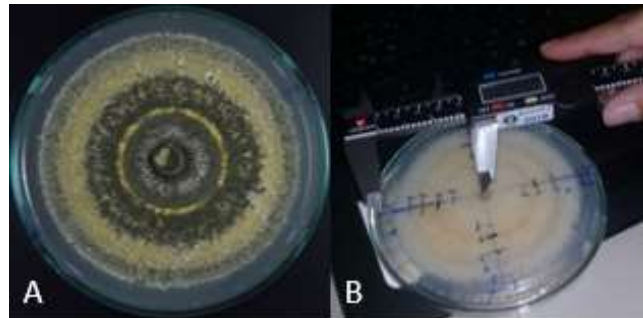


c) Crecimiento Radial

El procedimiento siguió la metodología descrita por Torres *et al.* (2013). Con el rotulador se dividieron en 4 cuadrantes las placas petri, para poder evaluar el crecimiento radial con la ayuda de una regla de 30 cm. A partir de los aislados de *Metarhizium sp* de cinco días de edad se transfirió un disco de 4 mm de diámetro del borde de la colonia en crecimiento, se colocó en el centro de una placa petri con medio de cultivo PDA y se incubó a 30° C. Para la medición se siguió la metodología descrita por Padilla *et al.*, (2000), se midió el crecimiento con Vernier cada dos días, a partir del quinto día de incubación hasta los 20 días y cada cinco repeticiones por aislado.

Figura 5

Evaluación de crecimiento radial; A: colonia de 20 días de crecimiento de *Metarhizium* sp; B: midiendo con vernier crecimiento radial. (TOR-M17)



d) Producción de conidios

El procedimiento se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Gómez *et al.* (2013), con algunas modificaciones.

Se preparó la solución madre, la cual estuvo formada por 1 g de arroz de conidios de *Metarhizium* sp más Tween 80 al 0.01 % en 100 ml de agua destilada estéril en el matraz Erlenmeyer, posteriormente se desprendió las esporas utilizando agitador magnético y con una pipeta Pasteur se pasó 1 ml de la solución madre al tubo de ensayo que pertenecía a la dilución 10^{-1} ; se repitió el procedimiento llevando 1 ml de esta dilución (10^{-2}) a tubo con 9 ml de agua destilada estéril. De las diluciones realizadas anteriormente, se determinó la concentración de esporas, tomando una alícuota de 10 μ l con una micropipeta, depositándose con cuidado en la cámara de Neubauer y dejando que las esporas se asienten por 2 min, luego se colocó la cámara Neubauer en el microscopio marca Leica® en el objetivo de 40 X y se realizó el conteo de esporas.

El conteo de conidios se realizó en la cámara Neubauer y la concentración ml^{-1} se determinó mediante la siguiente fórmula de (Lipa & Slizynski, 1973).

$$C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd / 80)$$

Dónde:

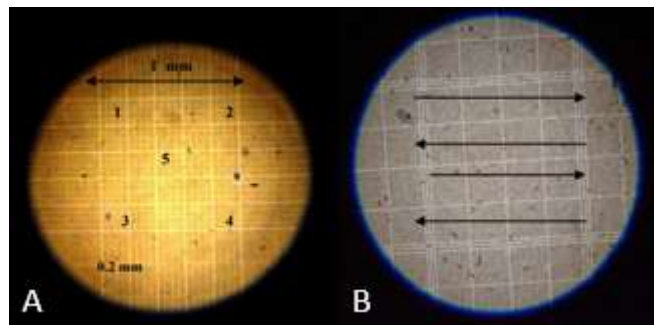
C = Número de conidios. ml⁻¹

Cc = Número promedio de conidios contados en la cámara de Neubauer

Fd = Factor de dilución

Figura 6

Lectura de conidios en la cámara Neubauer; A: cuadros principales de cámara de Neubauer: se utilizó para contar las 4 esquinas y el cuadro central; B: Conteo de conidias en uno de los cuadrantes centrales de la cámara de Neubauer. Las conidias que están sobre la línea derecha e inferior no se cuentan (Gómez & Mendoza, 2004).



e) Porcentaje de Germinación

Para el desarrollo de esta actividad se utilizó la metodología descrita por Acuña *et al.* (2015), se prepararon diluciones en serie de la suspensión de esporas (10^{-1} a 10^{-2}). Para obtener la dilución 10^{-1} se tomó 1 ml de la suspensión de esporas al que se le colocaron 9 ml de agua destilada estéril con una solución de Tween 80 al 0.01 % y colocando la dilución en un vórtex por 1 min. Este procedimiento se repitió hasta obtener las diluciones necesarias. A partir de las concentraciones de esporas, se llevó a sembrar a la cámara de flujo laminar y con una micropipeta se depositó 30 μ l de la dilución determinada de *Metarhizium* sp en dos puntos de una placa petri con PDA, se colocó encima cubreobjetos y se incubó a 30°C. Luego de esto se realizó el conteo de esporas totales, registrando las germinadas y las no germinadas, 14 horas después de la siembra.

El porcentaje de germinación se determinó mediante la siguiente fórmula:

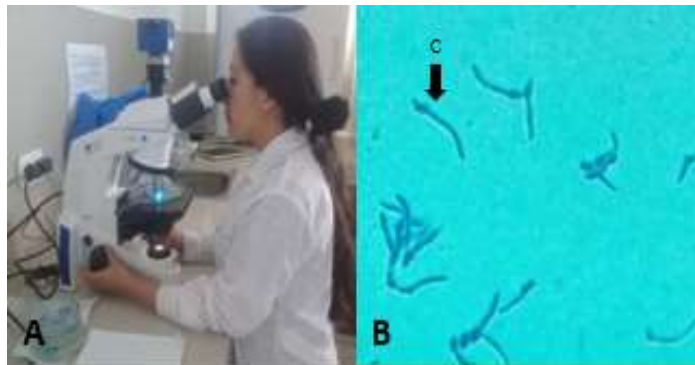
$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} * 100$$

a= número de conidias germinadas

b = número de conidias sin germinar

Figura 7

Evaluación de porcentaje de germinación; A: lectura de porcentaje de germinación; B: C= conidios germinados.



2.4. Determinación de la capacidad entomopatógena de las cepas nativas de *Metarhizium* sp

a. Producción masiva de las cepas nativas de *Metarhizium* sp

Se realizó la propagación masiva de 18 cepas nativas de *Metarhizium* sp

- Se pesó 150 g de arroz y se colocó en bandeja de plástico.
- El agua en estado de ebullición fue vertida en las bandejas de plástico y se dejó reposar por un tiempo de 2 horas.
- Luego se extrajo toda el agua de los recipientes. El arroz ya precocido fue colocado en bolsas y después autoclavado a 121°C por 15 minutos.
- En la cámara de flujo laminar se colocó las 18 bolsas y se aplicó rayos ultra violeta (uv) por 15 minutos.

- Teniendo los hongos de *Metarhizium* sp previamente repicados en placas de PDA (papa dextrosa agar), se empezó a cortar discos con sacabocados para colocar 5 de estos discos de PDA a cada bolsa.
- Finalmente, las bolsas fueron cerradas y codificadas y posteriormente colocadas en la incubadora a una temperatura de 27 °C por 15 días.

Figura 8

Propagación masiva: cepas nativas de Metarhizium sp en medio sólido arroz.



b. Recolección de adultos de Broca (*Hypothenemus hampei*).

Las muestras de cerezos de café fueron recolectadas de fincas en estudio, las cuales presentaban incidencia de *Hypothenemus hampei*. Estas muestras fueron llevadas al laboratorio donde se realizó el sacado de 570 brocas (*Hypothenemus hampei*) de café con buena manipulación para la respectiva prueba y evaluación.

Prueba de patogenicidad

Para el desarrollo de la actividad se utilizó la metodología descrita por González *et al.* (1993), con algunas modificaciones.

Para la prueba de patogenicidad en el laboratorio se usaron 18 tratamientos de *Metarhizium* sp y un testigo; el cual fue considerado como un tratamiento más (T0), tratado solo con agua destilada estéril. Para la aplicación de *Metarhizium* sp, a los 18 tratamientos se utilizó el método de inmersión, que consiste en sumergir las brocas durante 3 minutos colocadas dentro de una malla, en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 0.5 %, para su desinfección; posteriormente,

fueron sumergidas en agua destilada estéril durante 2 minutos por tres oportunidades para eliminar los residuos de cloro. Una vez desinfectados se sumergieron las brocas durante 3 minutos en concentraciones ajustadas por cada tratamiento de *Metarhizium* sp en 1×10^7 UFC/ml de agua. (UFC=Unidades formadoras de colonias). Luego de la inoculación se prepararon nuevas placas Petri, donde se introdujo un papel filtro estéril y humedecido en la base de cada placa Petri, para luego colocar con una pinza 10 brocas inoculadas con 3 granos de café en cada placa para evitar canibalismo entre ellas y muerte por hambre. Cada placa petri fue sellado con parafina y fue rotulados con códigos por tratamientos y repeticiones para los conteos posteriores. Las placas Petri fueron colocadas en la incubadora a 27°C por 12 días, mientras sea necesario se humedeció el papel filtro con agua destilada estéril sin saturarla.

En base González *et al.* (1993), se evaluó la patogenicidad y virulencia de las cepas del hongo sobre la broca del café, por 12 días, registrando los tiempos de mortandad por causas patogénicas y el ciclo del hongo, manteniendo las brocas vivas o muertas en las placas petri para no interrumpir la dinámica del insecto y el desarrollo hongo.

Figura 9

Prueba de patogenicidad; A y B: extracción de adultos de Hypothenemus hampei de granos de café; C: desinfección de Hypothenemus hampei; D: inoculación de los tratamientos a adultos de Hypothenemus hampei; E: tratamientos rotulados listas para incubación; F: Disposición de los tratamientos.

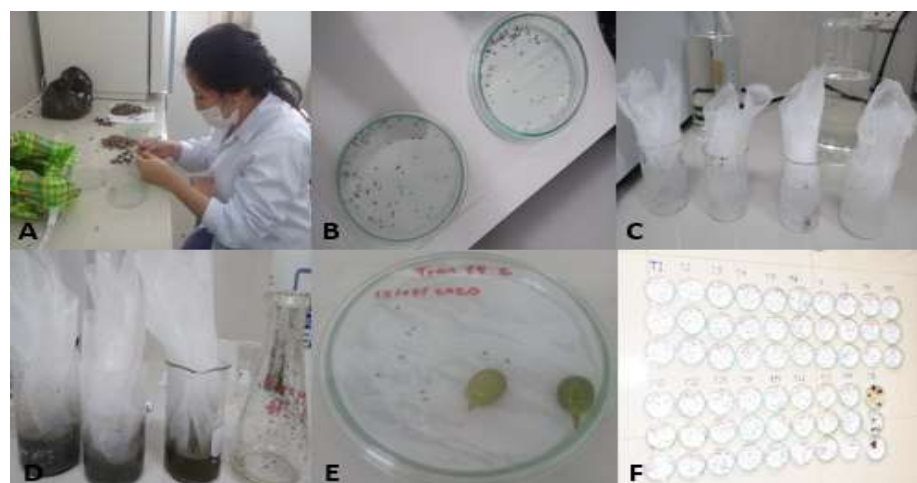
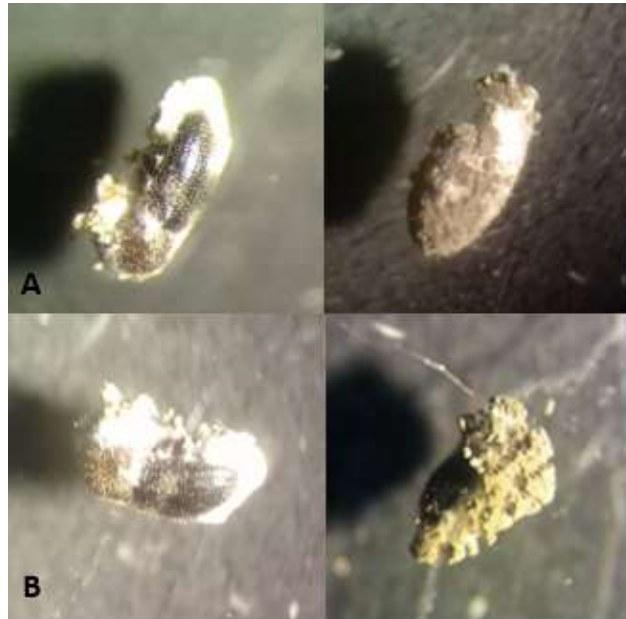


Figura 10

Micosis de Metarhizium sp; A- B: micosis del hongo sobre Hypothenemus hampei



2.5. Diseño experimental

Se trabajó con un diseño completamente al azar (DCA). Se distribuyó en 19 tratamientos (18 tratamientos “aislados” de *Metarhizium* sp, y 1 tratamiento testigo) con 3 repeticiones, cada uno haciendo un total de 57 unidades experimentales (cada unidad experimental representó una placa petri de 9 cm de diámetro).

Población:

La población a estudiar fue conformada por el total de placas petri donde se evaluó el efecto in vitro de cepas de *Metarhizium* sp con potencial de biocontrol sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*).

Muestra:

Para el presente estudio se evaluaron 57 placas petri, (cada placa petri de 9 cm de diámetro fue una unidad experimental.)

Muestreo:

El muestreo fue de tipo probabilístico.

Tabla 2*Características generales del experimento*

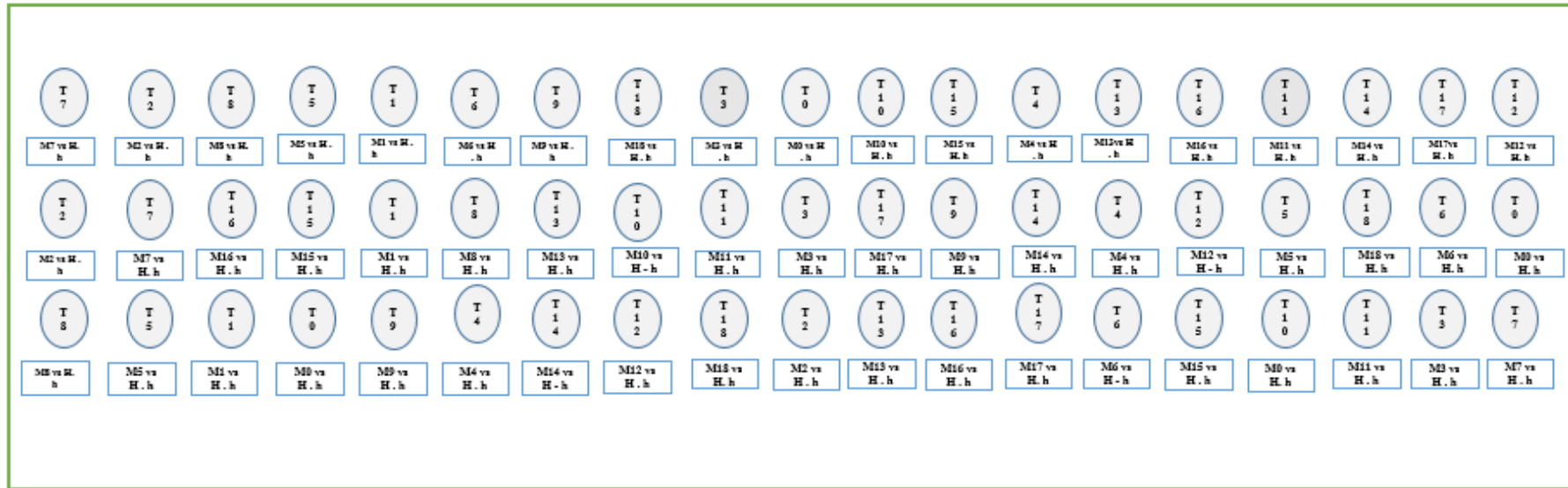
Diseño completamente al azar	
Repeticiones	3
Tratamientos	19
N° de unidades experimentales	57
N° de placas por repetición	19 placas de 9cm de diámetro
N° de placas a evaluar	57

Fuente: *Elaboración propia*

Disposición en laboratorio:

Figura 11

Disposición de los tratamientos en el laboratorio



Tratamientos

- | | | | | |
|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| T0: Testigo | T4: CMR-M8 | T8: MHR-M4 | T12: CCR-M3 12 | T16: MNR-M18 |
| T1: TOR-M17 | T5: POR-M9 | T9: LLM-M2 | T13: MMR-M16 | T17: DHR-M11 |
| T2: SRR-M12 | T6: MMR-M1 | T10: PMR-M13 | T14: TOR-M10 | T18: MMR-M7 |
| T3: PHR-M14 | T7: GOR-M19 | T11: TSR-M15 | T15: PTR-M6 | |

Evaluación de las variables.

La unidad experimental fue representada con 10 brocas por placa Petri, para un total de 30 brocas por tratamiento; a las 24 horas de la inoculación se procedió a evaluar los tratamientos.

Mortalidad de adultos de la broca del café *Hypothenemus hampei*: Esta variable fue evaluada monitoreando la mortalidad de los adultos de *Hypothenemus hampei* en cada tratamiento y comparando con el tratamiento testigo.

Crecimiento de micelio del hongo (*Metarhizium* sp.) en adultos de (*Hypothenemus hampei*): En esta variable se midió el crecimiento de micelio del hongo en el cuerpo del insecto, en cada tratamiento, determinando el porcentaje de individuos infectados con evidencia de micosis.

El tratamiento testigo, los insectos tratados con agua destilada estéril, no deberían presentar una mortalidad mayor al 10 % ni signos de micosis.

Análisis de datos

Para el análisis de los resultados de las evaluaciones se elaboró una matriz de datos usando Microsoft Excel 2016®, luego fueron sometidos a un análisis de varianza para comprobar la existencia de diferencias significativas entre variables, posterior a ello se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey al 5% de significación a fin de conocer las diferencias entre los tratamientos evaluados; los análisis fueron realizados en el paquete estadístico InfoStat versión 15.

III. RESULTADOS

3.1. Aislamiento

Se recolectó muestras de suelo de los distritos de San Nicolás, Cochamal, Huambo, Longar, Mariscal Benavides, Milpuc, Omia, Santa Rosa, Totorá, colectando 31 muestras de suelo de fincas productoras de café de las cuales se realizó el aislamiento de cepas con la técnica de insecto trampa logrando aislar 19 cepas de *Metarhizium* sp (tabla 6).

Tabla 3

Relación de parcelas georreferenciadas. Sitio donde se realizó el aislamiento cepas de Metarhizium sp

Nº	Código de campo	Código Laboratorio	Provincia	Distrito	Caserio	Ubicación		Altitud (msnm)	Variedad café
						Este	Norte		
1	Mamich02	MMR-M1	R. de Mendoza	Mariscal Benavides	Michina	221265	9292992	1565	Catimor
2	Long04	LLM-M2	R. de Mendoza	Longar	Longar	218471	9293560	1586	Catimor
3	COCH06	CCR-M3	R. de Mendoza	Cochamal	Cochamal	214885	9291139	1598	Catimor
4	Mira11	MHR-M4	R. de Mendoza	Huambo	Miraflores	220603	9287599	1661	Catimor
5	Naranjo13	NRR-M5	R. de Mendoza	R. Mendoza	Naranjo	223901	9291297	1592	Catimor
6	LP18	PTR-M6	R. de Mendoza	Totora	La Perla	228487	9281802	1757	Catimor
7	Milp20	MMR-M7	R. de Mendoza	Milpuc	Milpuc	230505	9280744	1662	Catimor
8	Chon22	CMR-M8	R. de Mendoza	Milpuc	Chontapampa	233125	9281689	1689	Catimor
9	Pm25	POR-M9	R. de Mendoza	Omia	Pumamarca	238132	9281904	1614	Catimor
10	T27	TOR-M10	R. de Mendoza	Omia	Tuemal	232896	9286902	1431	Catimor
11	Dscr10	DHR-M11	R. de Mendoza	Huambo	Dos Cruces	218155	9289509	1645	Catimor
12	OL 1	SRR-M12	R. de Mendoza	Omia	Limón	234775	9285337	1391	Catimor
13	Ma01	PMR-M13	R. de Mendoza	Mariscal Benavides	Pilancon	222237	9293179	1585	Catimor
14	Puq08	PHR-M14	R. de Mendoza	Huambo	Puquio	215684	9288975	1588	Catimor
15	Tran14	TSR-M15	R. de Mendoza	Santa Rosa	Trancaguaico	224648	9287667	1729	Catimor
16	Milp19	MMR-M16	R. de Mendoza	Milpuc	Milpuc	229996	9281264	1656	Catimor
17	Gebil	TOR-M17	R. de Mendoza	Omia	Gebil	236088	9284363	1369	Catimor
18	M28	MNR-M18	R. de Mendoza	San Nicolas	Mito	231472	9288826	1478	Catimor
19	OG23	GOR-M19	R. de Mendoza	Omia	Gebil	235997	9284919	1391	Catimor

Mapa 3

Ubicación de los aislados de *Metarhizium* sp. El mapa indica la ubicación de las zonas en las cuales se identificaron suelos con presencia de *Metarhizium* (Mariscal Benavides, Longar, Cochamal, Huambo, San Nicolás, Omia, Chirimoto, Totora y Milpu)



3.2. Caracterización de aislados de *Metarhizium* sp

a) Características macroscópicas de *Metarhizium* sp

Las cepas aisladas presentaron características diferentes entre cepas como, tipo de esporulación, borde de colonia, textura de colonia, color y pigmentación, los cuales crecieron en medio de cultivo PDA a 30°C en incubadora, en el tipo de esporulación lo que se encontró que solamente la cepa POR-M9 tiene anillo uniforme terminal (Figura 8. A), 13 cepas tienen anillo en toda la colonia (Figura 8.B), 5 cepas con anillos uniformes centrales (Figura 8. C); para el caso de borde de colonia 11 termina de forma ondulado (Figura 9. A) y 8 con terminales plumosa (Figura 9.B). La textura de las cepas 12 de 19 tuvieron textura polvosa (Figura 10.A) y 6 con textura algodonoso (Figura 10.B). Los colores de las cepas variaron desde blanco, amarillo pálido, amarillo, amarillo rojizo; pasando desde olivo, gris olivo, gris olivo oscuro, marrón rojizo claro y gris. La pigmentación que se observó de las cepas fueron desde blanco, amarillo pálido, amarillo, rojo amarillento, marrón amarillento, amarillo rojizo, rojo oscuro y rojo.

Figura 12

Tipo de esporulación. A: Anillo uniforme terminal POR-M9; B: Anillo en toda la colonia DHR-M11; C: Anillos uniformes centrales PHR-M14

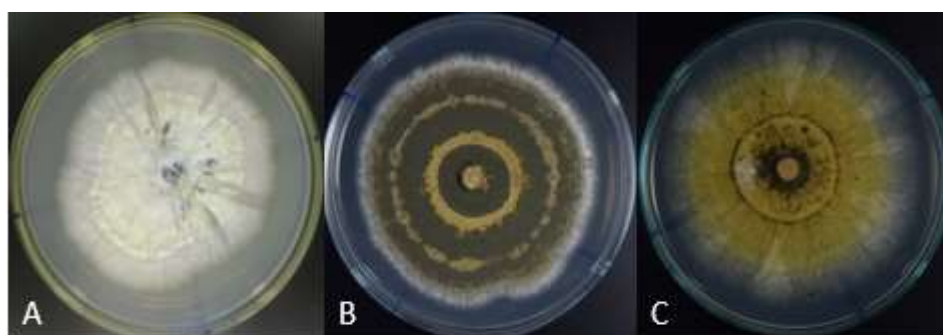


Figura 13

Borde de la colonia. A: Ondulado TOR-M17; B: Plumoso SRR-M12

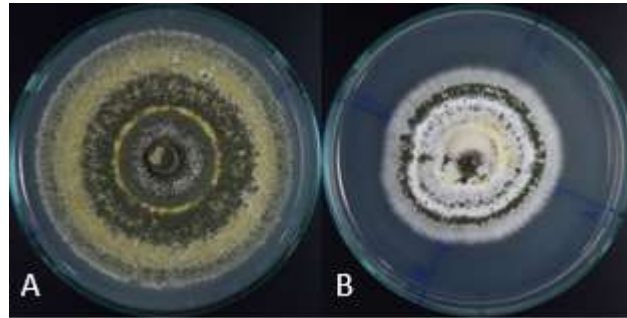
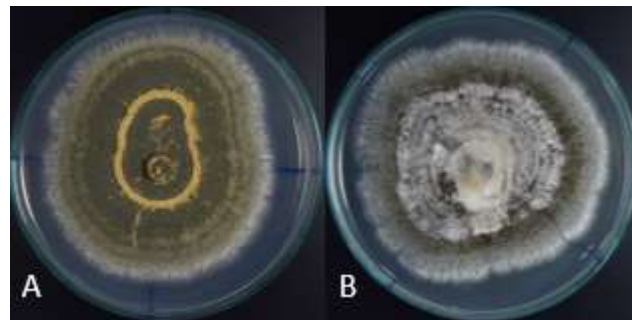




Figura 14

Textura de la colonia. A: Polvosa MNR-M18; B: Algodonosa PMR- M13



Cuadro 1

Características macroscópicas. Color de colonia de Metarhizium sp

Código de cepa	Imagen de la colonia	Color de la colonia
TOR-M10		Gris olivo oscuro, Amarillo pálido, gris, blanco.
NRR-M5		Marrón rojizo claro
MMR-M1		Olivo, gris olivo oscuro, gris, blanco.

b) Características microscópicas de *Metarhizium* sp

Cuadro 2

Medición de cepas de Metarhizium sp. Largo y ancho de las esporas; largo de las fiálides.

Código de cepa	Conidia (µm)	Fiálide (µm)
PMR-M13	3,7 × 0,9	7,4
MMR-M1	3,6 × 1,0	7,0
LLM-M2	3,2 × 0,8	4,2
CCR-M3	3,3 × 1,0	5,3
PHR-M14	7,8 × 2,3	13,2
DHR-M11	3,2 × 0,9	4,5
MHR-M4	7,2 × 2,8	15,3
NRR-M5	4,4 × 1,7	14,5
TSR-M15	3,5 × 1,0	6,3
PTR-M6	2,7 × 0,8	5,3

Código de cepa	Conidia (µm)	Fiálide (µm)
MMR-M16	4,0 × 1,0	6,2
MMR-M7	2,9 × 1,0	9,7
CMR-M8	3,0 × 0,9	5,7
GOR-M19	4,5 × 1,0	7,5
POR-M9	7,6 × 2,1	15,8
TOR-M10	3,5 × 1,0	5,9
SRR-M12	2,7 × 1,1	4,5
TOR-M17	3,5 × 1,0	4,5
MNR-M18	3,0 × 0,8	6,8

c) Crecimiento Radial

El crecimiento radial de los diecinueve aislados de *Metarhizium* sp con 5 repeticiones, al realizar el análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Tukey $p > 0,05$ dio como resultado que existe diferencia significativa entre grupos (Tabla 4).

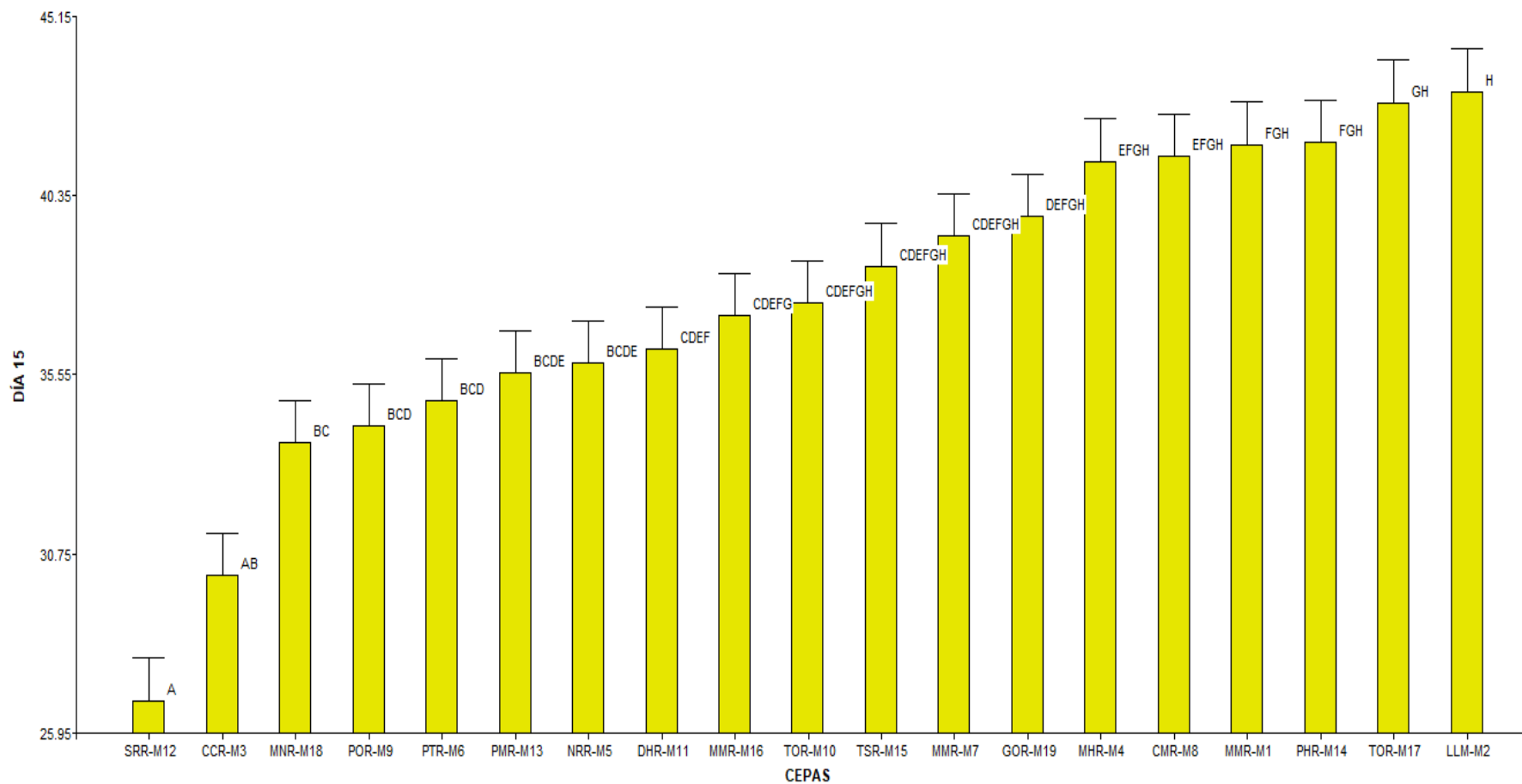
Tabla 4*Desarrollo micelial de cepas nativas de Metarhizium sp*

Cepas	Media ±	Cepas	Media ±
SRR-M12	26,82±1,13a	TOR-M10	37,46±1,13 cdefgh
CCR-M3	30,17±1,13 ab	TSR-M15	38,46±1,13 cdefgh
MNR-M18	33,72±1,13 bc	MMR-M7	39,28±1,13 cdefgh
POR-M9	34,18±1,13 bcd	GOR-M19	39,78±1,13 defgh
PTR-M6	34,84±1,13 bcd	MHR-M4	41,27±1,13 efgh
PMR-M13	35,61±1,13 bcde	CMR-M8	41,41±1,13 efgh
NRR-M5	35,87±1,13 bcde	MMR-M1	41,72±1,13 fgh
DHR-M11	36,23±1,13 cdef	PHR-M14	41,79±1,13 fgh
MMR-M16	37,13±1,13 cdefg	TOR-M17	42,85±1,13 gh
		LLM-M2	43,15 ±1,13 h

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p > 0,05$).

Figura 15

Valores de crecimiento radial (máximo y mínimo) para Metarhizium sp. El crecimiento radial de las diecinueve cepas en placa petri en medio nutritivo PDA, indicó que la cepa que tuvo crecimiento de micelio más rápido a comparación de las otras cepas fue LLM-M2 con 43.15mm y la que tuvo menor crecimiento fue la cepa SRR-M12 con 26.82mm, evaluación del día 15.



d) Producción de conidios

En la producción de esporas de los aislados de *Metarhizium* sp en la tabla 5, se observa que la cepa LLM-M2 fue quien tuvo el mayor nivel de producción de esporas con $9,8 \times 10^7$ esporas por mililitro y la cepa GOR-M19 fue quien obtuvo la menor producción de esporas por mililitro con un valor de 1×10^7 (Tabla 5).

Tabla 5

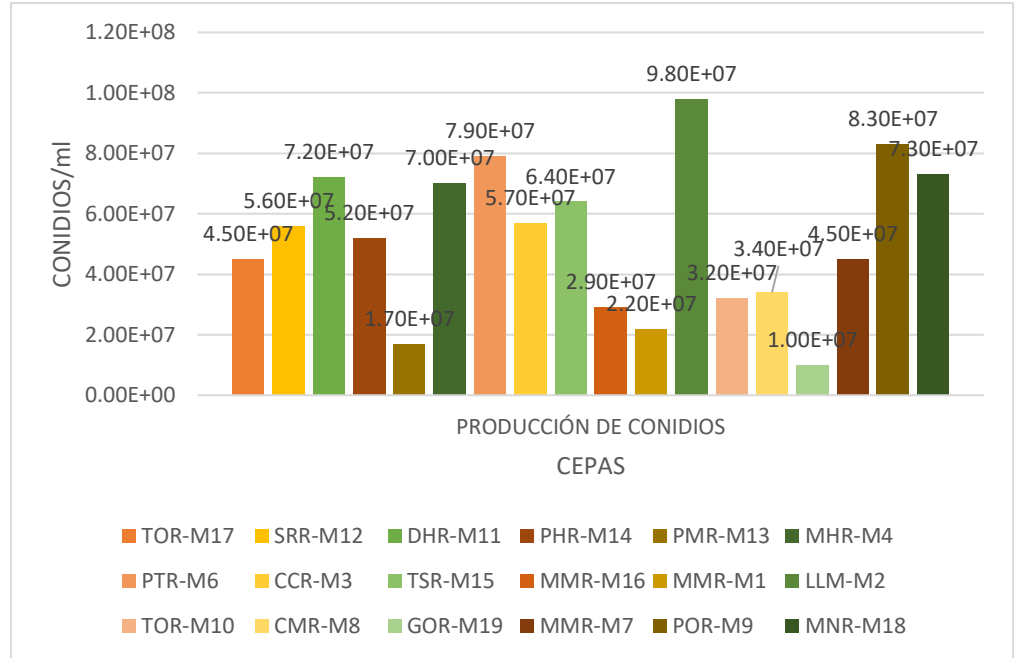
Producción de esporas/ml de Metarhizium sp

cepas	Producción de esporas/ml	cepas	Producción de esporas/ml
TOR-M17	$4,5 \times 10^7$	MMR-M16	$2,9 \times 10^7$
SRR-M12	$5,6 \times 10^7$	TOR-M10	$3,2 \times 10^7$
PHR-M14	$5,2 \times 10^7$	PTR-M6,	$7,9 \times 10^7$
CMR-M8	$3,4 \times 10^7$	MNR-M18	
	$7,3 \times 10^7$		
POR-M9	$8,3 \times 10^7$	DHR-M11	$7,2 \times 10^7$
MMR-M1	$2,2 \times 10^7$	MMR-M7	$4,5 \times 10^7$
GOR-M19	1×10^7	CCR-M3	$5,7 \times 10^7$
MHR-M4	7×10^7	TSR-M15	$6,4 \times 10^7$
LLM-M2	$9,8 \times 10^7$	PMR-M13	$1,7 \times 10^7$

Fuente: Elaboración propia

Figura 16

Concentración de esporas/ml, contabilizadas de las dieciocho cepas de Metarhizium sp, indicando que la cepa que obtuvo mayor número de esporas es LL-M2 con $9,8 \times 10^7$ esporas por mililitro y la cepa GOR-M19 obtuvo el menor con 1×10^7 esporas por mililitro.



e) Porcentaje de Germinación

En la (tabla 6), (figura 17), se observa que, los resultados obtenidos para los diferentes cepas fueron variables; los catorce cepas TOR-M17,LLM-M2,DHR-M11,MMR-M16,CMR-M8,PTR-M6,CCR-M3,GOR-M19,TSR-M15,MHR-M4,PMR-M13,PHR-M14,MNR-M18,TOR-M10 presentaron un alto porcentaje de germinación por encima del 80% con 100%, 98%, 95, 50%, 93%, 93%, 92%, 91.50%, 90%, 88%, 87%, 87%, 85,50%, 84,50% y 83%, respectivamente a las 14 horas de incubación; a diferencia de las cinco cepas restantes MMR-M1, MMR-M7,SRR-M12,POR-M9 que presentaron un porcentaje de germinación inferior al 80%, a las 14 horas de la incubación.

Tabla 6*Porcentaje de germinación de Metarhizium sp*

Cepas	Media ±	Cepas	Media ±
POR-M9	77,00±5,12 a	TSR-M15	88,00±5,12 a
SRR-M12	78,50±5,12 a	GOR-M19	90,00±5,12 a
MMR-M7	78,50±4,5,12 a	CCR-M3	91,50±5,12 a
MMR-M1	79,00±5,12 a	PTR-M6	92,00±5,12 a
TOR-M10	83,00±5,12 a	CMR-M8	93,00±5,12 a
MNR-M18	84,50±5,12 a	MMR-M16	93,00±5,12 a
PHR-M14	85,50±5,12 a	DHR-M11	95,50±5,12 a
PMR-M13	87,00 ±5,12 a	LLM-M2	98,00±5,12 a
MHR-M4	87,00±5,12 a	TOR-M17	100,00±5,12 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p > ,05$).

Figura 17

Valores porcentaje de germinación (máximo, medio y mínimo) de las dieciocho cepas *Metarhizium sp*, encontrándose que la cepa TOR-M17 germinó el 100 % de los conidios en todas las repeticiones, la segunda cepa con más germinación de conidios fue LLM-M2 con 98 % y la cepa con menos germinación fue POR-M9 con 77,00%.

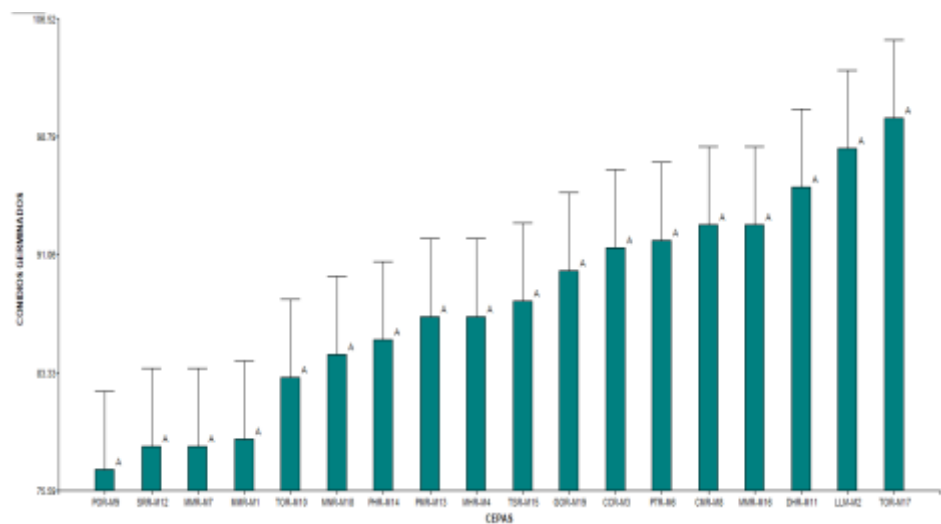
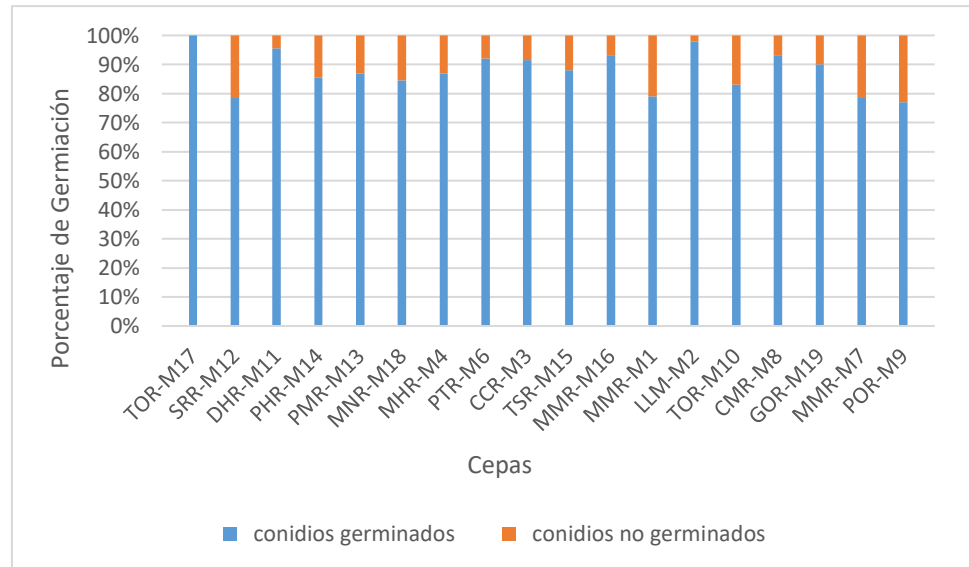


Figura 18

Porcentaje de Germinación de las dieciocho cepas de Metarhizium sp, promedios germinados y no germinados.



3.3. Prueba de patogenicidad

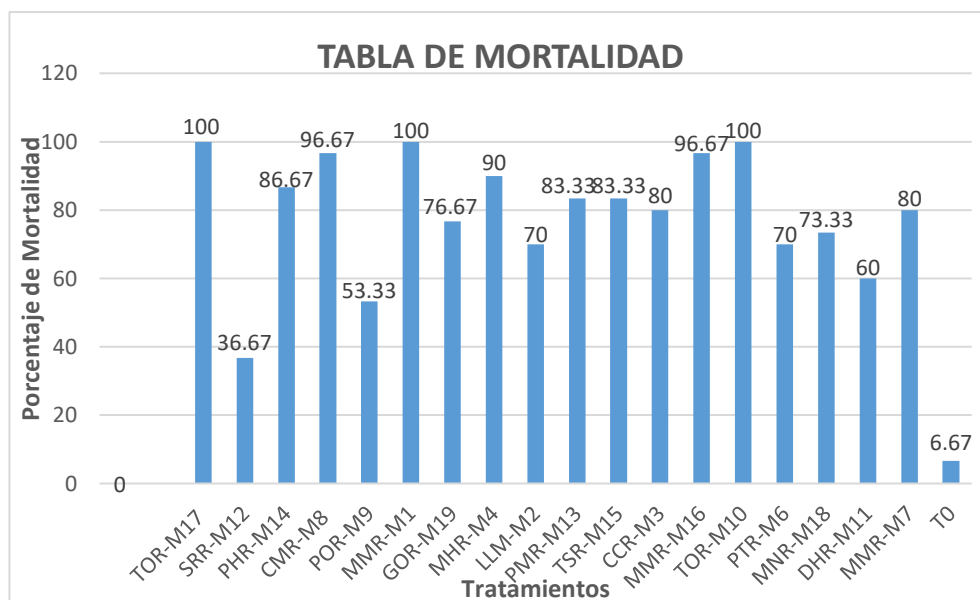
Mortalidad de adultos de la broca del café *Hypothenemus hampei*

Los tratamientos mostraron diferencias significativas de patogenicidad, así mismo respecto al testigo.

En la (figura N° 19) se muestra que el testigo obtuvo el más bajo porcentaje de mortalidad de *Hypothenemus hampei* con un promedio de 6,67%, mientras que para los tratamientos respecto a las cepas de *Metarhizium sp* el nivel de patogenicidad mínimo fue para la cepa SRR-M12 con 36,67% y el máximo para las cepas TOR-M10 y TOR-M17 con 100% de mortalidad, a las 72 horas de la inoculación.

Figura 19

Valores porcentaje de Mortalidad (máximo y mínimo) de *Metarhizium* sp sobre *Hypothenemus hampei*, encontrándose que las cepas TOR-M17 y TOR-M10 ocasionan una mortalidad del 100 % y la cepa que menos ocasionó mortalidad es SRR-M12 con 36,67 %.



Crecimiento de micelio del hongo (*Metarhizium* sp) sobre adultos de (*Hypothenemus hampei*):

En los tratamientos inoculados con el hongo se observaron insectos con síntomas de infección por hongos, como presencia de hifas o coloración blanca inicial, que posteriormente se tornó a una coloración Olivo con la esporulación (figura 20)

Figura 20

Micosis del hongo; A y B: *Hypothenemus hampei* infectado por *Metarhizium* sp (POR-M9, DHR-M11).



En la (tabla 7), (figura 21), El crecimiento micelio del hongo de las dieciocho cepas de *Metarhizium* sp con 3 repeticiones, al realizar el análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Tukey $p > 0,05$ dio como resultado que existe diferencia significativa entre tratamientos.

Tabla 7

Crecimiento del micelio de Metarhizium sp

Cepas	Media ±	Cepas	Media ±
TESTIGO	0,00±1,96 a	TOR-M17	88,33±1,96 cdef
POR-M9	75,93±1,96 b	LLM-M2	89,11±1,96 cdef
PTR-M6	80,00±1,96 bc	MMR-M7	89,33±1,96 cdef
DHR-M11	81,00±1,96 bc	SRR-M12	89,33±1,96 cdef
GOR-M19	82,91±1,96 bcd	PHR-M14	92,35±1,96 def
MNR-M18	84,33±1,96 bcde	TSR-M15	93,83±1,96 ef
CCR-M3	84,33±1,96 bcde	MMR-M1	94,00±1,96 ef
MMR-M16	85,33±1,96 bcde	MHR-M4	96,15±1,96 f
PMR-M13	87,67 ±1,96 cdef	CMR-M8	97,49±1,96 f
TOR-M10	87,67±1,96 cdef		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p > 0,05$).

Figura 21

Crecimiento micelial de Metarhizium sp sobre cuerpos de H. hampei (máximo y mínimo). La cepa que tuvo crecimiento de micelio más rápido a comparación de las otras cepas fue CMR-M8 con 97,49 y la que tuvo menor crecimiento fue la cepa POR-M9 con 75,93, respecto al testigo fue de 0; evaluación de las 288 horas.

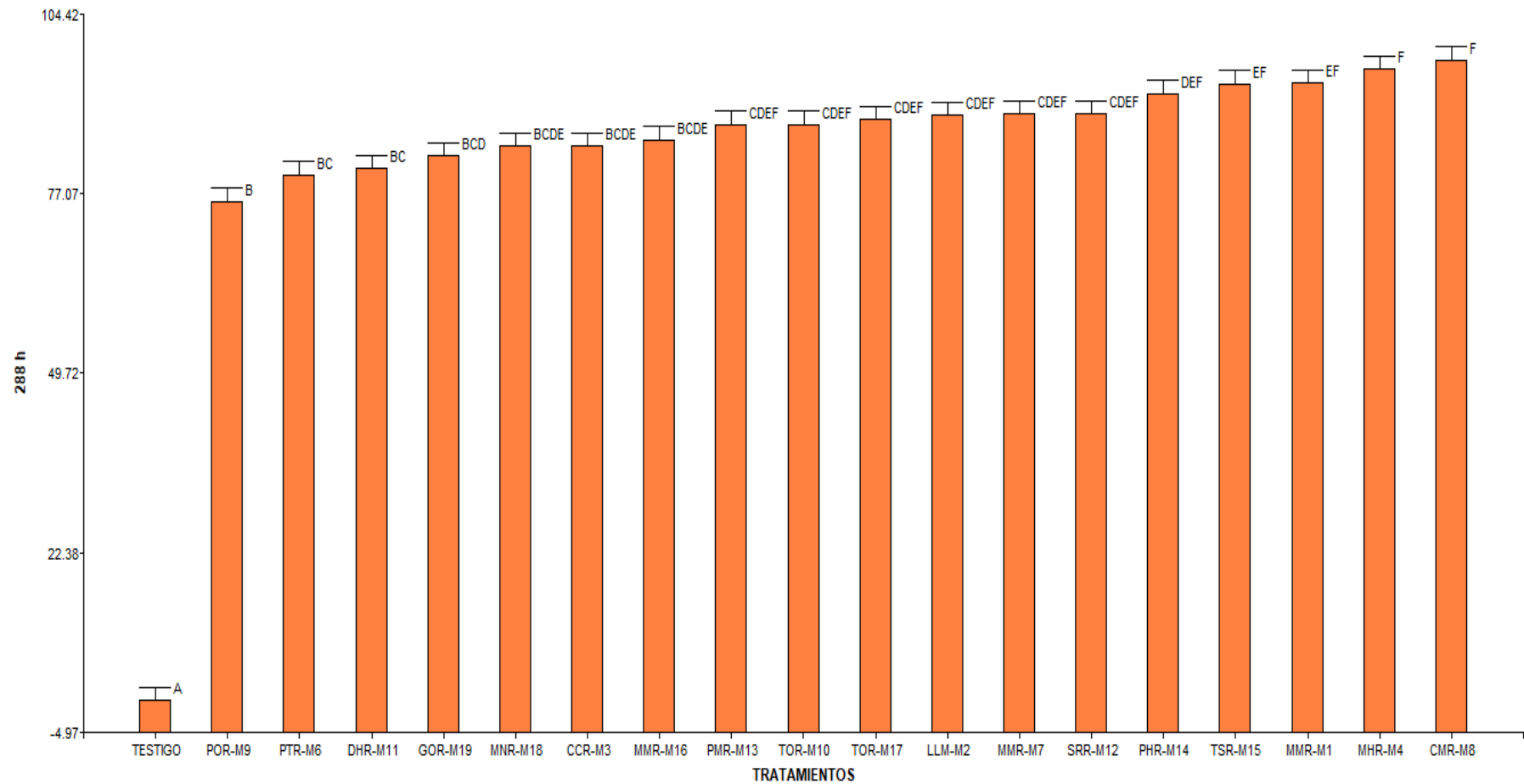


Tabla 8

Parcelas con presencia de cepas de Metarhizium sp y sus respectivas características microscópicas:

Características microscópicas de cepas de <i>Metarhizium sp</i>						
Caserío	Cepas	Conidios (largo por ancho)	Fiálides	Crecimiento radial	Esporas/ml	Porcentaje de germinación
Pilancon	PMR-M13	3.7 x 0.9	7.4	35,61±1,13 bcde	1,7×10 ⁷	87,00 ±5,12 a
Michina	MMR-M1	3.6 x 1.0	7	41,72±1,13 fgh	2,2×10 ⁷	79,00±5,12 a
Longar	LLM-M2	3.2 x 0.8	4.2	43,15 ±1,13 h	9,8×10 ⁷	98,00±5,12 a
Cochamal	CCR-M3	3.3 x 1.0	5.3	30,17±1,13 ab	5,7×10 ⁷	91,50±5,12 a
Puquio	PHR-M14	7.8 x 13.2	13.2	41,79±1,13 fgh	5,2×10 ⁷	85,50±5,12 a
Dos Cruces	DHR-M11	3.2 x 0.9	4.5	36,23±1,13 cdef	7,2×10 ⁷	95,50±5,12 a
Miraflores	MHR-M4	7.2 x 2.8	15.3	41,27±1,13 efgh	7×10 ⁷	87,00±5,12 a
Naranjo	NRR-M5	4.4 x 1.7	14.5	35,87±1,13 bcde		
Trancaguaico	TSR-M15	3.5 x 1.0	6.3	38.46±1,13 cdefgh	6,4×10 ⁷	88,00±5,12 a
La Perla	PTR-M6	2.7 x 0.8	5.3	34,84±1,13 bcd	7,9×10 ⁷	92,00±5,12 a
Milpuc	MMR-M16	4.0 x 1.0	6.2	37,13±1,13 cdefg	2,9×10 ⁷	93,00±5,12 a
Milpuc	MMR-M7	2.9 x 1.0	9.7	39,28±1,13 cdefgh	4,5×10 ⁷	78,50±4,5,12 a
Chontapampa	CMR-M8	3.0 x 0.9	5.7	41,41±1,13 efgh	3,4×10 ⁷	93,00±5,12 a
Gebil	GOR-M19	4.5 x 1.0	7.5	39,78±1,13 defgh	1×10 ⁷	90,00±5,12 a
Pumamarca	POR-M9	7.6 x 2.1	15.8	34,18±1,13 bcd	8,3×10 ⁷	77,00±5,12 a
Tuemal	TOR-M10	3.5 x 1.0	5.9	37,46±1,13 cdefgh	3,2×10 ⁷	83,00±5,12 a
Limón	SRR-M12	2.7 x 1.1	4.5	26,82±1,13a	5,6×10 ⁷	78,50±5,12 a
Gebil	TOR-M17	3.5 x 1.0	4.5	42,85±1,13 gh	4,5×10 ⁷	100,00±5,12 a
Mito	MNR-M18	3.0 x 0.8	6.8	33,72±1,13 bc	7.3×10 ⁷	84,50±5,12 a

IV. DISCUSIÓN

La metodología empleada por Zimmermann (1986) y Cañedo & Ames, (2004), en el aislamiento de cepas nativas de *Metarhizium* sp, la técnica del insecto trampa “Cebo - Insecto” fue de gran ayuda para lograr la fase de aislamiento de todo el material microbiológico; logrando pasar por las etapas de cámara húmeda y repique sin ninguna complicación, llegando al establecimiento de diecinueve colonias puras de 31 muestras de suelo.

La caracterización morfológica macroscópica demuestra que *Metarhizium* es un género de crecimiento lento, de aspecto algodonoso, compacto y polvoriento, con diferentes variaciones de color: de olivo a amarillo verdoso y de olivo a verde. Mediante este estudio se pudo corroborar los rasgos característicos de este género, en la investigación se encontró un tipo de esporulación con anillo (terminal, en toda la colonia y uniformes centrales) para el caso de borde de colonia de forma ondulado y plumosa; en cuanto a la textura polvosa y algodonosa, esta característica indica que cuando la proporción de micelio es mayor a la producción de esporas, su aspecto es algodonoso, de la misma manera, si la proporción de esporas es superior, su aspecto será compacto y se evidencia el color. Los colores de las colonias variaron desde blanco, amarillo pálido, amarillo y amarillo rojizo; pasando desde olivo, gris olivo, gris olivo oscuro, marrón rojizo claro y gris. La pigmentación que se observó de las cepas fueron desde blanco, amarillo pálido, amarillo, rojo amarillento, marrón amarillento, amarillo rojizo, rojo oscuro y rojo, existiendo concordancia con los estudios realizados por Padilla *et al.*, (2000), quienes evaluaron 50 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* en SDA, incubando por 30 días, obteniendo colonias con aspectos que variaron de algodonoso a compacto. Con respecto al color de la colonia, varió de amarillo a verde en diferentes intensidades. La pigmentación mostró color de rangos de amarillo a anaranjado o de rosado a rojo vino, esto da a demostrar que algunos pigmentos juegan un papel importante en la resistencia de las esporas en ambientes desfavorables así mismo (Obando *et al.*, 2013), ya que en este estudio obtuvieron resultados de color de las colonias que variaron desde amarillo, pasando por verde olivo y alcanzando hasta el color verde grisáceo oscuro y la pigmentación coloraciones amarillas, anaranjadas, rosadas y rojo carmesí; Sepúlveda *et al.*, (2016) evaluaron seis

aislamientos con textura algodonosa, algunos aislados mostraron anillos de conidios verdes que cubrían la colonia por completo.

El crecimiento del micelio de las diecinueve cepas de *Metarhizium* sp varió entre la cepa SRR-M12 26,82 y la cepa LLM-M2 43,15 mm después de 20 días de cultivo en potato agar dextrosa (PDA). Así mismo se observó que una de las cepas entró en dormancia, en ese sentido, Milner *et al.*, (1991) afirma que es posible que algunos aislamientos entren en un tipo de dormancia fisiológica, la cual los hace aptos para sobrevivir por períodos prolongados en el campo, fuera del insecto hospedante.

En cuanto a la caracterización morfológica microscópica, la investigación fue comparada con las claves taxonómicas de Bischoff *et al.*, 2009, existiendo concordancias entre las cepas: Tamaño de conidios PHR-M14 $7,8 \times 2,3 \mu\text{m}$ y fiálides $13,2 \mu\text{m}$ con tamaños similares de conidios de *Metarhizium guizhouense* $7,0-9,0 \mu\text{m} \times 2,0-3,0 \mu\text{m}$ y fiálides $7,5-20,0 \mu\text{m}$; así mismo la cepa POR-M9 tuvo tamaño de conidio de $7,6 \times 2,1 \mu\text{m}$ y fiálides $15,8 \mu\text{m}$ con tamaño similares de conidios de *Metarhizium pingshaense* $6,0-8,0 \mu\text{m} \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$ y fiálides $7,0-17,0 \mu\text{m}$ y *Metarhizium brunneum* tamaño de conidios $4,5-7,5 \mu\text{m} \times 2,0-3,0 \mu\text{m}$ y fiálides $9,5-18,0 \mu\text{m}$.

El nivel de esporulación a los 15 días se midió a través de la concentración de esporas/ml, la cepa LLM-M2 fue quien tuvo el mayor nivel de producción de esporas con $9,8 \times 10^7$ esporas/ml, en esa premisa, Padilla *et al.*, (2000) obtuvo resultados de concentración máximo de $8,6 \times 10^7$ esporas/ml, bajo parámetros de evaluación similares en su investigación y en un décimo de concentración menor cuya diferencia entre estudios es casi desapercibido. Padilla *et al.*, (2000) afirmó que no necesariamente la alta producción de esporas está asociada a una mayor virulencia del hongo hacia el insecto.

En cuanto a los resultados obtenidos en el porcentaje de germinación de los dieciocho aislados, se determinó la viabilidad de los conidios, con un nivel de porcentaje máximo de la cepa TOR-M17 obtuvo el 100% de germinación. Al respecto Padilla *et al.*, (2000) obtuvo resultados similares de germinación con nivel máximo de sus cepas Ma 9212 y Ma9236 con 99,1% germinación. Torres *et al.* (2013) afirmó que la velocidad de germinación es una característica importante en la selección de hongos entomopatógenos porque a mayor velocidad existe una mayor oportunidad del hongo para infectar al insecto hospedero.

Las cepas de *Metarhizium* sp, TOR-M17, TOR-M10 y MMR-M1 presentaron una mortalidad alta del 100% sobre *Hypothenemus hampei*, cuyas características propias les confiere propiedades patogénicas para combatir esta plaga, ya que esta especie tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina) (Leger *et al.*, 1988). Además, mediante los metabolitos tóxicos llamados depsipéptidos, especialmente la destruxina que es producida por *Metarhizium* sp y son sintetizados cuando el hongo ha penetrado el exoesqueleto y alcanzado el hemocele, estas toxinas tienen un amplio rango de efectos biológicos en los insectos, causando: parálisis tetánica y muerte, cambios morfológicos y del citoesqueleto de los plasmocitos del insecto que afecta parte de la respuesta inmune como la encapsulación y la fagocitosis, reduce la expresión de péptidos antimicrobianos que tienen un papel importante en la respuesta inmune humoral de los insectos y estrés oxidativo en las células, también inhiben la tasa de secreción de fluidos en los tubos de Malpighi (Franco *et al.*, 2011). Por lo tanto, la virulencia de cepas de hongos es una característica relevante en la selección de aislamientos con fines de control biológico.

En cuanto al crecimiento del micelio de *Metarhizium* sp sobre *Hypothenemus hampei*, las cepas que obtuvieron niveles superiores al 90% a los 12 días de inoculación fueron CMR-M8 con 97,49, MHR-M4 96,15 y MMR-M1 94,00, presentado hifas o coloración blanca al inicio, que posteriormente se tornó a una coloración Olivo y verde oscuro con la esporulación o liberación de conidios.

V. CONCLUSIONES

Se diseñó un mapa de la georreferenciación de diecinueve parcelas de plantaciones de cultivo de café, cuyas muestras de suelos se logró aislar cepas nativas de *Metarhizium* sp.

La cepa nativa de *Metarhizium* sp LLM-M2 fue la más predominante en la caracterización fisiológica: con porcentaje de germinación 98%, crecimiento radial 43,15mm y nivel de esporulación $9,8 \times 10^7$ esporas/ml.

Las cepas nativas aisladas mostraron las características morfológicas macroscópicas (tipo de esporulación, textura, color de la colonia y pigmentación) y estructuras microscópicas esperadas para el género *Metarhizium* sp.

Las cepas nativas de *Metarhizium* sp: TOR-M17, TOR-M10, MMR-M1, CMR-M8 y MMR-M16 resultaron ser patogénicas sobre adultos *Hypothenemus hampei*, por lo cual esta podría ser la mejor alternativa para realizar más investigaciones en control biológico de esta plaga.

Los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad muestran relación con los resultados obtenidos en las pruebas: Germinación y crecimiento radial para la cepa nativa TOR-M17.

VI. RECOMENDACIONES

Las cepas de *Metarhizium* sp, (TOR-M17, TOR-M10, MMR-M1, CMR-M8 y MMR-M16) demostraron ser altamente patogénicas a nivel de laboratorio, por lo que sería conveniente realizar aplicaciones en campo para el control de *Hypothenemus hampei* en los cultivos de café.

Realizar más investigaciones de control biológico con las cepas nativas de *Metarhizium* sp en otras especies de insectos plaga en los diferentes cultivos de importancia económica para la región Amazonas.

Se recomienda utilizar las cepas nativas de *Metarhizium* sp para el control en campo, debido a la gran capacidad adaptativa de humedad relativa y diversas temperaturas.

Se recomienda realizar el aislamiento de *Metarhizium* de muestras de suelo de plantaciones de café, así como también de diversos cultivos.

Se recomienda caracterizar las cepas de *Metarhizium* sp, probando diversos medios de cultivo nutritivos en condiciones de laboratorio.

Se recomienda caracterizar molecularmente las cepas aisladas de *Metarhizium* sp, ya que estos estudios permitirán la identificación correcta a las especies que pertenecen.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, M., García, C., Rosas, N., López, M., Sainz, J. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (metschnikoff) sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (fabricius). *Rev. Int. Contam. Ambie. México*.31 (3) 219-226.
- Ávila, C., Gorreti, M., Lizcano, R. (2014) Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial la angostura del campoalegre (Huila), *Centro de Formación Agroindustrial La Angostura*, 15-20.
- Alejandra., D. & María, N. (2010) El café y sus diversas aplicaciones en la pastelería, Instituto Superior Particular Incorporado, Técnico Superior en Gestión Gastronómica.
- Ávila, C., Gorreti, M., Lizcano, R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial la angostura del campoalegre (Huila), *Centro de Formación Agroindustrial La Angostura*, (17)15-20.
- Barnett, H. & Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th edition. APS Press. St. Minnesota, 218.
- Barrera, J., Herrera, J., Villacorta, A., García, H., Cruz, L. (2006). Trampas de metanol- etanol para la detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Sociedad Mexicana de entomología*. ISBN 970-9712-28-4. 71-83.
- Bischoff, J., Rehner, S., Humber, R. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *The Mycological Society of America, Lawrence*, 101 (4)512-530.
- Canet, G. & Soto, C. (2016) La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. *América Latina y el Caribe*.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Carbonero, C., & Córdova, M. (2014). *Aislamiento de hongos entomopatógenos de suelos agrícolas de ica y su efectividad in vitro en el control de spodoptera frugiperda (smith), enero - marzo 2013*. Ica, Perú.

- Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Gobierno del Estado de Veracruz (COVECA). 2010. *Monografía del café* <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/MONOGRAFIACAFE2010.PDF>.
- Ejea, M. (2009). *Café y cultura productiva en una región de Veracruz*. Red de Consumidores de Café.
- Fernández, F., Guglielmo, Z., Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café, *Revista de investigación*, 37(71).
- Franco, K., Rodríguez, S., Cervantes, J., Barranco, J. (2011). Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, Laboratorio de Biotecnología*, (150) 143-16
- Franqui, R. & Medina, G. (2003) *La broca del café: Biología y aspectos básicos de control y catastro de broca en Puerto Rico*. Puerto Rico.
- Figuroa, E., Pérez, F., Godínez, L. (2015). La producción y el consumo del café. México: Edit. Ecorfan- Spain.
- Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M. y Torres, E. (2013). *Manual de producción y uso de hongos antagonistas*. Perú: Laboratorio de antagonistas SCB - Senasa.
- Gómez, P. & Mendoza, J. (2004). Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. Guayas, Ecuador: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE).
- González, M., Posada, F., Bustillo, A. (1993). Bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei*(Ferrari). *Revista colombiana de entomología*, vol 19 (4) 123-130.
- Gotteland, M. & Saturnino, P. (2007) Algunas verdades sobre el café. *Revista chilena de Nutrición*, 34(2).
- Jezeer, R. & Verweij, P. (2015). *Café en sistemas agroforestales*. Holanda.
- Leiva, E. (2013). Principales Plagas y Enfermedades que afectan la Producción Cafetalera de la Provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas. Informe de línea de base. INDES-CES, Chachapoyas.55.

- Lemus, Y., Rodríguez, G., Cuervo, R., Durán, J., Zuluaga, C., Rodríguez, G. (2008). Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). *Revista Científica Guillermo de Ockham Colombia*, vol. 6 (1) 91-98.
- Leger, R., Durrands, P., Charnley, A., Cooper, R. (1988). Role of extracellular chemoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52:285-293.
- Le Lipa, J. & Slizynski, K. (1973). Wskazówki metodyczne I terminologia dowoznaczani snedniej dawki swiertelnej (LD50) W Patologii Owadow i toksykologii. *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roslin*, 15 (1); 59-83.
- Mesa, Y., Medrano, J., Martínez, M., Grave, M., Cabrera, Y. (2017) Efecto anticariogénico del café, *Revista chilena de nutrición*, 21(3).
- MILNER, R., HUPPATZ, R., SWARIS, S. (1991). A new method for assessment of germination of *Metarhizium conidial*. *Journal of Invertebrate Pathology*.57: 121-123.
- MINAGRI (2018) Producción, superficie cosechada, rendimiento y precio en chacra de café pergamino, según región.
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*.95 – 103.
- Nishi, O., Shimizu, S., Sato, H. (2017). *Metarhizium bibionidarum* and *M. purpureogenum*: new species from Japan. *German Mycological Society and Springer-Verlag GmbH Germany*.
- Obando, J., Bustillo, A., Castro, U., Mesa, N. (2013). Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39 (1): 26-33.
- Organización internacional del café (2018) *Anuario 2017-2018*, Mérida, Venezuela.
- Padilla, G., Bernal, M., Vélez, P., Montoya, E. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafé Colombia*, 51(1): 28-40.
- Sanchez, G. & Vergara, C. (2002). *Manual de prácticas de entomología agrícola* (cuarta edición). Lima, Perú.

- Söndahl, M y Lauritis, J (1992). Coffee. In: Biotechnology of perennial fruit crops, *International, England, UK*, 8, 530.
- Sepúlveda, M., Vargas, M., Gerding, M., Ceballos, R., Oyarzúa, Pía. (2016). Molecular, morphological and pathogenic characterization of six strains of *Metarhizium* spp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae). *Chilean journal of agricultural research* 76(1).
- Torres, M., Cortez, H., Ortiz, C., Cappello, S., De la Cruz, A. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 39 (1): 40-46.
- Torres, M., Ortiz, C., Bautista, C., Ramírez, J., Ávalos, N., Cappello, S., De la Cruz, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86 947–961.
- Valenzuela, A. (2010). El café y sus efectos en la salud cardiovascular y en la salud materna. *Revista chilena de nutrición*, 37(4).
- Zimmerman, G. (1986). El "método de cebo *Galleria*" para la detección de hongos entomopatógenos en el suelo. *Revista de Entomología Aplicada*, 213-215.

ANEXOS

Anexo 1: Fichas de evaluaciones

Tabla 9

Parcelas georreferenciadas de los distritos de Rodríguez de Mendoza

N°	Código	Distrito	Caserío	Ubicación		Altitud (msnm)	Variedad café	Área (Ha)
				Este	Norte			
1	Ma01	Mariscal Benavides	Pilancon	222237	9293179	1585	Catimor	2
2	Mamich02	Mariscal Benavides	Michina	221265	9292992	1565	Catimor	2,5
3	Calzada03	Mariscal Benavides	Calzada	219036	9293716	1585	Catimor	1
4	Long04	Longar	Longar	218471	9293560	1586	Catimor	0,5
5	Shucu05	Longar	Shucush	216204	9292955	1598	Catimor	0,5
6	Coch06	Cochamal	Cochamal	214885	9291139	1598	Catimor	1
7	Sma07	Huambo	San Martin	214687	9289883	1588	Catimor	0,5
8	Puq08	Huambo	Puquio	215684	9288975	1588	Catimor	0,5
9	Chont09	Huambo	Chontapampa	217263	9289690	1629	Catimor	0,25
10	Dscr10	Huambo	Dos Cruces	218155	9289509	1645	Catimor	1,5
11	Mira11	Huambo	Miraflores	220603	9287599	1661	Catimor	2
12	Cuch12	Huambo	Cucho	222428	9287865	1580	Catimor	1
13	Naranjo13	R. Mendoza	Naranjo	223901	9291297	1592	Catimor	0,5
14	Tran14	Santa Rosa	Trancaguaico	224648	9287667	1729	Catimor	2
15	Ramos15	Santa Rosa	Ramos	226642	9286689	1816	Catimor	0,5
16	Sr16	Santa Rosa	Santa Rosa	228314	9285644	1763	Catimor	0,75
17	Tot17	Totora	Totora	226713	9281612	1665	Catimor+ típico	0,5
18	LP18	Totora	La Perla	228487	9281802	1757	Catimor	2
19	Milp19	Milpuc	Milpuc	229996	9281264	1656	Catimor	0,5
20	Milp20	Milpuc	Milpuc	230505	9280744	1662	Catimor	2
21	Cha21	Milpuc	Chaguar	231774	9280786	1758	Catimor+ típico	0,5
22	Chon22	Milpuc	Chontapampa	233125	9281689	1689	Catimor	1,5
23	OG23	Omia	Gebil	235997	9284919	1391	Catimor	2
24	To24	Omia	Tocuya	237353	9283162	1377	Catimor	0,5
25	Pm25	Omia	Pumamarca	238132	9281904	1614	Catimor	1,5
26	O26	Omia	Omia	235075	9284486	1358	Catimor	0,5
27	T27	Omia	Tuemal	232896	9286902	1431	Catimor	0,75
28	Gébil	Omia	Gébil	236088	9284363	1369	Catimor	1
29	Ne29	Omia	Nueva Esperanza	228956	9290327	1533	Catimor	0,5
30	Ol1	Omia	Limón	234775	9285337	1391	Catimor	1
31	M28	San Nicolás	Mito	231472	9288826	1478	Catimor	0,5

Tabla 10

Ficha de evaluación de las características morfológicas macroscópica de Metarhizium sp

CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA DE AISLADOS DE METARHIZIUM SP																					
Parámetros	Categorías	valor asignado	Aislados de <i>Metarhizium sp</i>																		
			TOR -M17	SRR -M12	DHR -M11	PHR -M14	PMR -M13	MNR -M18	MHR -M4	PTR -M6	CCR -M3	TSR -M15	MMR -M16	MMR -M1	LLM -M2	TOR -M10	CMR -M8	GOR -M19	NRR -M5	MMR -M7	POR -M9
	Uniforme	0																			
	Anillos en toda la colonia	1	X		x		x		x	x	x	x	x	x	x				x	x	
Tipo de esporulación	Uniforme con anillos terminales	2																			x
	Uniforme con anillos centrales	3		x	x	x		x									x	x			
Borde de la colonia	Disperso	4																			
	Entero	0																			
	Ondulado	1	X		x			x		x	x	x		x	x		x	x		x	
	Plumoso	3		x		x	x		x				x				x		x		x
Textura de la colonia (aspecto)	Afelpada	0																			
	Polvosa	1	X		x	x		x			x	x		x	x		x				
	Estriada	2																	x		
	Algodonosa	3		x				x												x	x
Color	Aterciopelada	4																			
	Gris olivo oscuro	0	X	x		x	x		x			x	x		x	x	x			x	x
	Amarillo pálido	1			x	x		x				x			x	x				x	x

Tabla 11*Ficha de evaluación de la producción de esporas de Metarhizium sp*

PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE CEPAS DE METARHIZIUM SP									
N°	Cepas	Lectura dilución: -2	(CC)*(4*1000000)(FD/80)	Científica	N°	Cepas	Lectura dilución: -2	(CC)*(4*1000000)(FD/80)	Científica
1	TOR-M17	9	45000000	$4,5 \times 10^7$	10	MMR-M16	5,8	29000000	$2,9 \times 10^7$
2	SRR-M12	11,2	56000000	$5,6 \times 10^7$	11	MMR-M1	4,4	22000000	$2,2 \times 10^7$
3	DHR-M11	14,4	72000000	$7,2 \times 10^7$	12	LLM-M2	19,6	98000000	$9,8 \times 10^7$
4	PHR-M14	10,4	52000000	$5,2 \times 10^7$	13	TOR-M10	6,4	32000000	$3,2 \times 10^7$
5	PMR-M13	3,4	17000000	$1,7 \times 10^7$	14	CMR-M8	6,8	34000000	$3,4 \times 10^7$
6	MHR-M4	14	70000000	7×10^7	15	GOR-M19	2	10000000	1×10^7
7	PTR-M6	15,8	79000000	$7,9 \times 10^7$	16	MMR-M7	9	45000000	$4,5 \times 10^7$

8	CCR-M3	11,4	57000000	$5,7 \times 10^7$	17	POR-M9	16.6	83000000	$8,3 \times 10^7$
9	TSR-M15	12,8	64000000	$6,4 \times 10^7$	18	MNR-M18	14.6	73000000	$7,3 \times 10^7$

Tabla 12*Ficha de evaluación de porcentaje de germinación de cepas de Metarhizium sp*

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE CEPAS DE METARHIZIUM SP											
N°	cod campo	cod lab	Repetición	Lectura 1		N°	cod campo	cod lab	Repetición	Lectura 1	
				G	NG					G	NG
1	Gebil	TOR-M17	1	100	0	10	Tran14	TSR-M15	1	87	13
			2	100	0				2	89	11
2	OL1	SRR-M12	1	69	31	11	Milp19	MMR-M16	1	98	2
			2	88	12				2	88	12
3	Dscr10	DHR-M11	1	93	7	12	Mamich02	MMR-M1	1	76	24
			2	98	2				2	82	18
4	Puq08	PHR-M14	1	90	10	13	Long04	LLM-M2	1	97	3
			2	81	19				2	99	1
5	Ma01	PMR-M13	1	97	3	14	T27	TOR-M10	1	83	17
			2	77	23				2	83	17
6	M28	MNR-M18	1	95	5	15	Chon22	CMR-M8	1	97	3
			2	74	26				2	89	11
7	Mira11	MHR-M4	1	85	15	16	OG23	GOR-M19	1	94	6
			2	89	11				2	86	14
8	LP18	PTR-M6	1	86	14	17	Milp20	MMR-M7	1	78	22
			2	98	2				2	79	21
9	COCH06	CCR-M3	1	92	8	18	Pm25	POR-M9	1	83	17
			2	91	9				2	71	29

Tabla 13

Ficha de evaluación de Mortalidad Hypothenemus hampei

PATOGENICIDAD DE 18 CEPAS DE <i>Metarhizium</i> sp. SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ													
TRATAMIENTO	Descripción	REPETICIÓN	Registro de mortalidad en días de evaluación								Sumatoria	BROCAS 30	
			24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216h		a 72 h
1	Gebil TOR-M17	I	0	1	10								
		II	1	1	10								
		III	1	2	10							30	100,00
2	Ol 1 SRR-M12	I	0	1	5	10	10						
		II	1	1	2	8	10						
		III	0	1	4	10	10					11	36,67
3	Puq 08 PHR-M14	I	0	4	8	10							
		II	0	4	9	10							
		III	0	3	9	10						26	86,67
4	Chon 22 CMR-M8	I	1	3	9	10							
		II	2	4	10	10							
		III	0	3	10	10						29	96,67
5	Pm 25 POR-M9	I	0	1	7	9	10	10	10	10			
		II	2	2	3	5	7	7	9	9			
		III	1	3	6	7	10	10	10	10		16	53,33
6	Mamich 02 MMR-M1	I	2	2	10								
		II	1	4	10								
		III	3	5	10							30	100,00
7	Og 23 GOR-M19	I	2	2	8	9	10						
		II	1	2	8	10	10						
		III	3	3	7	9	10						
											23	76,67	

8	Mira 11 MHR-M4	I	1	4	9	10		
		II	1	4	9	10		
		III	2	4	9	10	27	90,00
9	Long 04 LLM-M2	I	1	3	7	10		
		II	1	3	6	10		
		III	2	4	8	10	21	70,00
10	Ma 01 PMR-M13	I	1	4	7	10		
		II	0	4	9	10		
		III	1	4	9	10	25	83,33
11	Tran 14 TSR-M15	I	1	1	9	10		
		II	0	0	7	10		
		III	1	4	9	10	25	83,33
12	Coch 06 CCR-M3	I	0	4	8	9	10	
		II	2	3	9	10	10	
		III	0	2	7	10	10	24
13	Milp 19 MMR-M16	I	2	4	10	10		
		II	2	4	10	10		
		III	1	4	9	10	29	96,67
14	T 27 TOR-M10	I	1	4	10			
		II	1	4	10			
		III	1	4	10		30	100,00
15	Lp 18 PTR-M6	I	0	1	7	10		
		II	1	2	6	10		
		III	2	2	8	10	21	70,00
16	M 28 MNR-M18	I	1	2	6	10		
		II	1	4	10	10		
		III	1	4	6	10		
17	Dscr 10 DHR-M11	I	1	3	9	9	10	10
		II	0	2	5	9	10	10
							22	73,33
							18	60,00

		III	0	2	4	9	9	10		
18	Milp 20 MMR-M7	I	1	3	10	10				
		II	0	4	9	10				
		III	0	0	5	10			24	80,00
T0	ADE Testigo	I			1					
		II			1					
		III							2	6,67

Tabla 14

Ficha de evaluación de micosis de Metarhizium sp sobre Hypothenemus hampei

PATOGENICIDAD DE 18 CEPAS DE <i>Metarhizium</i> sp SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ													
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	Registro de micosis en días de evaluación											
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216h	240 h	264 h	288 h
1 TOR-M17	I			0	3	15	32	44.5	54.5	61.5	67	78	83.5
	II			2.5	10	24	35.5	54.5	70.5	79.5	85.5	92.5	95
	III			1.5	5	24	37.5	54	60.5	69.5	75	81.333	86.5
2 SRR-M12	I			0	15	20.6	43	60	67.5	72	79	84	89.5
	II			10	22.5	27	40	56	61	67.5	73.5	82	87.5
	III			0	7.5	20.5	37.5	59.5	65.5	74.5	80	86	91
3 PHR-M14	I			0	19	21.25	45	54.5	66.11	74.44	80.56	85.56	89.44
	II			0	11.25	20	47	61.5	67	77	82.5	88.5	92
	III			0	25	26.11	51.67	63.33	75	80	85.56	90.56	95.6
4 CMR-M8	I			0	37.5	39.37	53.33	68.89	76.11	83.89	91.11	95	97.77
	II			0	32.14	41.25	51.5	66.5	73.5	82	87.5	93	97.5
	III			0	25	26.25	48.89	63.89	71.11	81.67	86.67	93.33	97.2
5 POR-M9	I			0	5	18.33	31.67	40.71	46.25	47	56.5	67.5	76
	II			0	0	0	20	30	42	48.33	59.17	65	73.3
	III			0	15	23.75	27.86	40.56	45.5	52	62.5	70.5	78.5
6 MMR-M1	I			0	20	32.222	46	76.5	85	91.5	96.5	98.5	100
	II			0	32	35.5	42.5	54.5	56.57	69	75.5	82.5	87.5
	III			0	33	35.5	52.5	71	78	85	89.5	92.5	94.5
7 GOR-M19	I			0	30	31.25	39.44	51	61.67	68.89	75.56	81.67	87.222
	II			0	30	26.43	44.44	49	58.5	66	73	78.5	83
	III			0	8	20	31.25	37.5	51.5	59	67	73	78.5
8	I			0	29	33	54.44	62.22	71.67	77.78	82.78	89.44	94.444

MHR-M4	II	0	26	35	50.5	62.5	73	80	86.5	92.5	98	
	III	0	18	36.5	51	65.5	74.5	81	86	91	96	
	I	0	28	26.25	47.5	58.75	62.22	70	75.56	81.67	87.222	
9	LLM-M2	II	0	28	29.38	43.89	60	67.22	72.78	72	79	84.5
PMR-M13		III	0	35	32.5	50.63	61.67	66.67	73.89	78.89	83.33	95.6
		I	0	25	29	38	49	60	67	72.5	77.5	85
10	TSR-M15	II	0	23	29.5	43.5	57	63	70	76	83	87
CCR-M3		III	0	26	31.11	41.5	51.5	59.5	69	74.5	80.5	91
		I	0	20	29.286	39	51.5	61	72.5	79.5	87.5	94.5
11	MMR-M16	II	0	15	16.88	38.5	54.5	64.5	74.5	81.5	88	95
TOR-M10		III	0	37.5	42.14	47	61	66.5	73	80.5	87	92
		I	0	13	28	44	52	60	69	76	83	87
12	PTR-M6	II	0	18	28	41	54	61	66	72	78	83
MNR-M18		III	0	22	31	47	52	60	65	72	78	83
		I	0	18	23	43	52	59	68	74	80	85
13	DHR-M11	II	0	23	29	43	51	57	66	74	80	87
MHR-M4		III	0	15	23	41	47	54	63	71	77	84
		I	0	25	27	43.89	57	63	68	74	79	85
14	LLM-M2	II	0	27	39	49	52	67	73	79	86	91
PMR-M13		III	0	32	38	45	34	49	62	72	81	87
		I	0	10	23	27	36	47	54	66	75	82
15	TSR-M15	II	0	15	25	28	41	47	56	68	78	83
CCR-M3		III	0	40	43	35	38	50	52	61	69	75
		I	0	15	25	33	43	53	64	73	81	87
16	MMR-M16	II	0	20	26	38	41	50	64	72	80	85
TOR-M10		III	0	19	30	41	51	57	64	70	75	81
		I	0	10	20	40	49	56	63	69	74	80
17	PTR-M6	II	0	23	20	40	53	62	66	74	80	84

	III	0	15	30	30	36	45	57	66	73	79
18 MMR-M7	I	0	25	28	38	51	61	72	78	84	90
	II	0	30	40	52	63	70	77	83	89	91
	III	0	10	24	42	52	62	70	76	81	87
Testigo	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 2

Análisis estadístico

Tabla 15

Análisis de varianza de Crecimiento radial de Metarhizium sp

FV	GI	SC	CM	F	p-valor
Cepas	18	1717,47	95,42	14,90	<0,0001
Error	76	486,66	95,42		
Total	94	2204,13	6,40		

CV:6,76%

Tabla 16

Análisis de varianza de Porcentaje de germinación de Metarhizium sp

FV	GI	SC	CM	F	p-valor
Cepas	17	1620,00	95,29	1,82	<0,1089
Error	18	943,00	52,39		
Total	35	2563,00			

CV: 8,24%

Tabla 17

Análisis de varianza de Crecimiento de micelio del hongo (Metarhizium sp) so sobre adultos de (Hypothenemus hampei)

FV	GI	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	18	23576,36	1309,80	113,85	<0,0001
Error	38	437,18	11,50		
Total	56	24013,55			

CV: 4,08%