



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES FUNGICIDAS Y  
DOSIS EN DIETAS ARTIFICIALES PARA LA REPRODUCCIÓN DE LA  
BROCA DEL CAFÉ CON MIRAS A LA MULTIPLICACIÓN MASIVA DE SUS  
PARASITOIDES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**

**Informe de trabajo final de graduación para optar por el título de Ingeniero  
en Biotecnología con el grado académico de Bachiller**

**Andrés Valerio Oviedo**

**CARTAGO Diciembre, 2006**



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES FUNGICIDAS Y  
DOSIS EN DIETAS ARTIFICIALES PARA LA REPRODUCCIÓN DE LA  
BROCA DEL CAFÉ CON MIRAS A LA MULTIPLICACIÓN MASIVA DE SUS  
PARASITOIDES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**

**Informe de trabajo final de graduación para optar por el título de Ingeniero  
en Biotecnología con el grado académico de Bachiller**

**Andrés Valerio Oviedo**

**CARTAGO Diciembre, 2006**

# EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES FUNGICIDAS Y DOSIS EN DIETAS ARTIFICIALES PARA LA REPRODUCCIÓN DE LA BROCA DEL CAFÉ CON MIRAS A LA MULTIPLICACIÓN MASIVA DE SUS PARASITOIDES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Andrés Valerio Oviedo<sup>1</sup>

## RESUMEN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytinae), es el insecto plaga más importante entre los que afectan la caficultura en todo el mundo. Existen diversas formas de controlar esta plaga, entre estas, el control biológico con parasitoides. Entre los más importantes se pueden citar tres géneros de avispias: *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta* y *Phymastichus coffea*, que pueden ser reproducidos en grandes cantidades y utilizados como herramienta de control. En Costa Rica, en el Centro de Investigaciones en Café, CICAPE, se han realizado intentos de cría de estos parasitoides sobre café pergamino, sin embargo, esta metodología es costosa y lenta. Debido a esto, la tendencia actual va hacia el desarrollo de dietas artificiales que permitan la producción de la broca y sus parasitoides a gran escala y a bajo costo. En el CICAPE, se ha logrado desarrollar un medio de cultivo para la broca y sus parasitoides, sin embargo, este presenta altas tasas de contaminación por hongos, lo que merma la producción de las brocas y por consiguiente, de los parasitoides, haciendo al proceso poco viable. Por esta razón, el objetivo de esta investigación es evaluar la incorporación de diferentes fungicidas y dosis en dietas artificiales para el desarrollo y reproducción de la broca del café bajo condiciones controladas, para así lograr disminuir la contaminación por hongos en la dieta. Con este fin, se aislaron los hongos contaminantes de la dieta, obteniendo a *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y *Fusarium* sp. como hongos predominantes. Pruebas de sensibilidad a seis fungicidas se realizaron con estos tres hongos, determinando que el Butrol 31.5 EC era el más eficiente para inhibir el crecimiento de los mismos. Este fungicida fue probado en la dieta artificial y comparado con dos controles (Benlate 50 WP y Daconil 82.5 WG) donde demostró de nuevo su efectividad superior para evitar el crecimiento de los hongos, así como para permitir un mejor desarrollo del ciclo de vida de la broca, traducido en una mayor producción de progenie. El Butrol 31.5 EC también fue probado como desinfectante directo en el lavado de las brocas comparándolo con los controles anteriormente mencionados, así como probando la adición de un surfactante a la solución de lavado. De nuevo, el Butrol 31.5 EC produjo los mejores resultados en cuanto a contaminación y sobrevivencia de las brocas, no obstante se observó que la incorporación de un surfactante fue perjudicial para las brocas. Se concluyó que el Butrol 31,5 EC fue el fungicida más adecuado para utilizar en las dietas, aunque podría probarse a concentraciones más altas que las utilizadas en esta investigación, para mejorar los resultados.

Palabras claves: *Hypothenemus hampei*, broca, parasitoide, Butrol 31.5 EC, CICAPE.

---

<sup>1</sup> INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

# EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES FUNGICIDAS Y DOSIS EN DIETAS ARTIFICIALES PARA LA REPRODUCCIÓN DE LA BROCA DEL CAFÉ CON MIRAS A LA MULTIPLICACIÓN MASIVA DE SUS PARASITOIDES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Andrés Valerio Oviedo<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytinae), is the coffee's most important pest worldwide. There are several ways of controlling this pest, among them, the biological control with parasitoids. Among this parasitoids, three genera of wasps can be mentioned: *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta* y *Phymastichus coffea*, that can be reproduced in large quantities and used as a pest control tool. In Costa Rica, in the Center of Investigations in Coffee, CICAPE, parasitoid rearing attempts have been done in parchment coffee; nevertheless, this methodology is expensive and slow. Because of this, the current tendency leans towards the development of artificial diets that allow a large scale and low cost production of the coffee berry borer and its parasitoids. In the CICAPE, an artificial diet for the rearing of the coffee berry borer and its parasitoids has been developed, yet, this diet presents high rates of contamination by fungi, which lowers the production of borers, and therefore, the production of parasitoids, making this process nonviable. Because of this, the objective of this work is to evaluate the incorporation of different fungicides and doses in the artificial diets for the rearing of the coffee berry borer, under controlled conditions, for thus reduce the contamination caused by the fungi in the diet. With this aim, the fungi that contaminate the diet were isolated, obtaining *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., and *Fusarium* sp. as predominant genera. The sensibility of this three fungi to six fungicides was tested, determining that the Butrol 31.5 EC was the most effective to inhibit the growth of such. This fungicide was tested in the artificial diet and compared with two controls (Benlate 50 WP y Daconil 82.5 WG) where it demonstrated its effectiveness again to avoid the growth of the fungi, as well as to allow a better development of the borer's life cycle, producing a greater progeny. The Butrol 31.5 EC was also tested as a disinfectant in the washing of the borers, comparing it with the controls previously mentioned again, as well as evaluating the effect of the addition of a surfactant to the washing solution. Again, the Butrol 31.5 EC produced the best results concerning the percentages of contamination in the diet and survival of the borers, nonetheless, one observed that the incorporation of a surfactant was detrimental for the borers. One concluded that the Butrol 31,5 EC was the most adequate fungicide to be used in the diets, although higher concentrations than the ones used in this investigation could be tested in order to better the results.

Key words: *Hypothenemus hampei*, coffee berry borer, parasitoid, Butrol 31.5 EC, CICAPE.

---

<sup>2</sup> INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

**EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES FUNGICIDAS  
Y DOSIS EN DIETAS ARTIFICIALES PARA LA REPRODUCCIÓN DE LA  
BROCA DEL CAFÉ CON MIRAS A LA MULTIPLICACIÓN MASIVA DE  
SUS PARASITOIDES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**MSc. Vladimir Villalba Velásquez,  
Profesor Asesor-ITCR**

---

**Lic. Miguel Barquero Miranda,  
Asesor- Empresa**

---

**Lic. Mainor Rojas Barrantes,  
Lector**

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos  
por su apoyo durante mi vida  
y mis estudios.

Andrés

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento primeramente a Dios por todas sus bendiciones y a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Al ICAFE, por el apoyo financiero y logístico para la ejecución del proyecto.

A los funcionarios del Centro de Investigación en Café, muy especialmente a Giovanni Guerrero Lizano por su apoyo incondicional en las labores de laboratorio.

A los miembros del Tribunal evaluador: MSc. Vladimir Villalba Velásquez, Lic. Miguel Barquero Miranda y Lic. Mainor Rojas Barrantes por su valiosa guía, aportes y sugerencias.

A los profesores de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por enriquecer mi conocimiento y apoyarme durante toda mi carrera.

## **INDICE GENERAL**

---

	<b>Pag.</b>
RESUMEN.....	i
ACREDITACION.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE ANEXOS.....	xi
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	4
La broca del café: breve reseña histórica.....	4
Clasificación taxonómica.....	5
Biología de la broca del café.....	5
Ecología y condiciones favorables para su desarrollo.....	9
Importancia económica y daños que causa la broca.....	9
Medios de diseminación del insecto.....	11
Métodos de control de la broca.....	11
Parasitoides de la broca del café.....	20
Evolución histórica del control biológico de la broca del café.....	25
Cría masiva de la broca del café y sus parasitoides.....	28
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECIFICOS.....	32
MATERIALES Y METODOS.....	33
Identificación de los hongos.....	33
Pruebas de sensibilidad con diferentes fungicidas en medio Agar Papa Dextrosa (PDA).....	34
Pruebas con fungicida en la dieta artificial para la broca del café.....	35
Prueba con Tween 20.....	38
Prueba de desinfección de las brocas con diferentes fungicidas.....	39
RESULTADOS.....	40
DISCUSION DE RESULTADOS.....	56
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFIA.....	75
ANEXOS.....	80



## **INDICE DE TABLAS**

---

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
2.1	Depredadores, parasitoides y patógenos de <i>H. hampei</i>	18
4.1	Distribución de las dosis y tratamientos para las pruebas en la dieta de la broca	36
4.2	Distribución de las dosis y tratamientos para las pruebas de desinfección de la broca	39
5.1	Diámetros obtenidos de las colonias en las pruebas preliminares con diferentes fungicidas en medio PDA	41
5.2	Resultados de EC <sub>50</sub> y EC <sub>90</sub> de las pruebas con diferentes fungicidas en medio PDA	43
5.3	Porcentajes de contaminación en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con broca procedente de café pergamino	45
5.4	Porcentajes de contaminación en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con broca procedente de granos de campo	45
5.5	Porcentajes de contaminación causados por diferentes hongos en la dieta artificial de la broca con diferentes fungicidas con brocas procedentes de café pergamino	46
5.6	Porcentajes de contaminación causados por diferentes hongos en la dieta artificial de la broca con diferentes fungicidas con brocas procedentes de granos del campo	46
5.7	Porcentajes de contaminación con bacteria en la dieta artificial de la broca con diferentes fungicidas	47

5.8	Porcentajes de sobrevivencia en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con brocas procedentes de café pergamino	49
5.9	Porcentajes de sobrevivencia en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con brocas procedentes de granos de campo	50
5.10	Cantidad de individuos obtenidos con diferentes fungicidas en la dieta artificial de la broca a después con brocas procedentes de café pergamino	50
5.11	Huevos y larvas de <i>H. hampei</i> en la dieta artificial del tratamiento con Butrol 31.5 EC a una concentración de 112.5 ppm e inoculada con brocas procedentes de campo	52
5.12	Porcentajes de sobrevivencia de brocas de procedentes de granos de campo al lavado con dos soluciones diferentes de lavado	53
5.13	Porcentajes de contaminación en la dieta artificial de las pruebas con diferentes fungicidas en la desinfección de las brocas con brocas procedentes de granos de campo	54
5.14	Porcentajes de sobrevivencia de las pruebas con diferentes fungicidas en la desinfección de las brocas con brocas procedentes de granos de campo	55

## **INDICE DE FIGURAS**

---

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
2.1	Ciclo de vida de <i>H. hampei</i>	6
2.2	Hembra y macho adulto de <i>H. Hampei</i>	7
2.3	Dañados causados por la broca	11
2.4	Trampa contra la broca del ICAFE	15
2.5	<i>Cephalonomia stephanoderis</i> Betrem	21
2.6	Ciclo de vida de <i>Cephalonomia stephanoderis</i>	21
2.7	<i>Prorops nasuta</i> Waterson	23
2.8	<i>Phymastichus coffea</i> LaSalle	24
2.9	<i>Heterospilus coffeicola</i> Schmiedeknecht	25
5.1	Hongos aislados de la dieta artificial	40
5.2	Efecto de diferentes dosis de Butrol 31.5 EC en el crecimiento de tres hongos	42
5.3	Crecimiento de <i>Aspergillus</i> sp en medios con dosis de 100 ppm de diferentes fungicidas	43
5.4	Placa multipozo con dieta artificial. Testigo para el tratamiento de Butrol 31,5 EC a 75 ppm	44
5.5	Dietas artificiales de la broca del café	48
5.6	Huevos y larva de <i>H. hampei</i> sobre la dieta artificial del tratamiento con Butrol 31.5 EC a una concentración de 75 ppm e inoculada con brocas procedentes de café pergamino	51
5.7	Huevos y larvas de <i>H. hampei</i> en la dieta artificial del tratamiento con Butrol 31.5 EC a una concentración de 112.5 ppm e inoculada con brocas procedentes de campo	52

5.8	Pupas de <i>H. hampei</i> sobre la dieta artificial del tratamiento con Benlate 50 WP a una concentración de 112.5 ppm e inoculada con brocas procedentes de campo	53
6.1	Superficie de brocas sin lavar	63

## **INDICE DE ANEXOS**

---

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Diámetros obtenidos de las colonias en las pruebas preliminares con diferentes fungicidas en medio PDA.....	82
2	Curvas de sensibilidad de tres hongos a seis diferentes fungicida.....	83
3	Protocolo de formulación de la dieta artificial de la broca y desinfección de las brocas utilizando el fungicida Butrol 31.5 EC.....	89

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

---

El café (*Coffea arabica* L.) es la bebida más extensivamente consumida en el mundo. La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytinae), es el insecto plaga más importante entre los que afectan la caficultura en todo el mundo, ya que se encarga de alimentarse, reproducirse y vivir dentro de la semilla del fruto cuando este ya ha alcanzado una consistencia ideal, disminuyendo la calidad de la bebida y haciendo que este daño sea de gran importancia (Benavides *et al.*, 2003; Obando y Mora, 2003; Bustillo, 2005).

Este insecto fue introducido del África al continente americano a comienzos del siglo pasado y llegó sin los parasitoides y depredadores nativos que regulan sus poblaciones en África (Bustillo, 2005). Estos parasitoides, colocan sus huevos en las larvas y pupas de la broca y depredan a los adultos, huevos y larvas pequeñas. Entre estos enemigos naturales están *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta*. *Phymastichus coffea* es otro enemigo natural de la broca que ataca sólo los adultos en el momento que están afectando el fruto (Borbón, 2003).

El uso de enemigos naturales para el control de las plagas en los cultivos desarrollados por el hombre, como lo es el café, ha sido una de las mejores prácticas para evitar daños económicos a los productores y al medio ambiente (Obando y Mora, 2003). Como se explicó, el ciclo de vida de la broca ocurre exclusivamente dentro del fruto, por lo que su control es muy difícil en un hábitat tan protegido como ese. Debido a esta situación, organismos controladores que puedan alcanzar a la peste en su micro hábitat son muy deseados (Benavides *et al.*, 2003).

En Costa Rica, el Instituto del Café de Costa Rica, ICAFE, ha realizado grandes esfuerzos para desarrollar la multiplicación, liberación y diseminación de estos enemigos naturales tanto en el laboratorio como en el campo (Obando y Mora, 2003). Además, ha realizado inversiones considerables en la importación de parasitoides desde Colombia para acelerar el proceso de adaptación, diseminación, fuentes naturales de pies de cría y control de la broca en las diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica donde se encuentra (Borbón, 2003).

El 1 de septiembre del 2001 se estableció el Laboratorio de Control Biológico, localizado en el Centro de Investigación en Café, CICAPE en San Pedro de Barva, Heredia. En este, se inició la reproducción de parasitoides con pies de cría traídos de Guatemala y Colombia (Campos, 2001). Sin embargo, el costo de los parasitoides en crianzas sobre frutos o granos de café es elevado, y esto dificulta su integración como herramienta de control, por lo que se hace necesario pensar en la factibilidad de una producción industrial y económica de los parasitoides; por lo tanto, la tendencia va hacia el desarrollo de dietas artificiales, que permitan la producción de la broca y sus parasitoides a gran escala y a bajo costo (Schuller, 2005).

En el CICAPE, se ha logrado desarrollar un medio de cultivo para la broca y sus parasitoides, sin embargo, este presenta altas tasas de contaminación por hongos, los cuales interfieren con el desarrollo normal de las brocas y por consiguiente, de los parasitoides, lo que se traduce en pérdidas económicas para la institución. Esto hace que la producción de parasitoides utilizando medios de cultivo artificiales esté aún lejos de ser viable. Lograr idear un método para disminuir o eliminar la contaminación por hongos en este medio, sería un gran avance en el desarrollo de esta técnica de control de plagas, que además de ser efectiva, es de tipo biológico, por lo que beneficia tanto a los productores de café como al medio ambiente.

Ante lo anteriormente expuesto, este proyecto de investigación tuvo como objetivo la optimización del proceso de desinfección en dietas artificiales para la reproducción de la broca del café, con miras a lograr la producción masiva de sus parasitoides, bajo condiciones controladas que permitan su utilización en un programa de control biológico, por lo que se pretendió disminuir o eliminar la contaminación por hongos en el medio de cultivo artificial utilizado actualmente, esto sin afectar el desarrollo óptimo de las brocas. Para esto se planeó aislar e identificar los hongos que contaminan la dieta artificial, provenientes tanto de las brocas de campo, como de café pergamino. Además, se realizaron pruebas de sensibilidad en platos de Petri con medio PDA (papa dextrosa agar) con diferentes dosis de fungicidas y/o desinfectantes para determinar cual o cuales tenía un mayor efecto de disminuir el crecimiento de los hongos aislados.

Finalmente, con base en los fungicidas y/o desinfectantes que mejor resultado ofrecieron, se realizaron pruebas del efecto del fungicida sobre la sobrevivencia y reproducción de la broca, tanto de la que viene del campo como de la que viene de café pergamino, así como evaluar el porcentaje de contaminación presente en la dieta. Con esto se pretendió determinar cuales fungicidas y/o desinfectantes, aparte de ser efectivos como fungicida, no afectaban negativamente o interfirieron con el desarrollo del ciclo de vida de las brocas.

En cuanto a su vinculación con la biotecnología, este proyecto demanda poner en práctica diferentes conocimientos adquiridos durante la carrera de Ingeniería en Biotecnología, entre los que destacan la utilización de técnicas de análisis microbiológico, el uso y manejo de organismos controladores de insectos y análisis estadístico entre otros. Así mismo, se está intentando optimizar un método de para la reproducción de parasitoides como parte de un control biológico innovador; una tecnología que aprovecha a un ser vivo como herramienta para el combate de plagas de importancia agrícola para aprovechamiento del hombre y beneficio del medio ambiente.



## Capítulo 2

### REVISIÓN DE LITERATURA

---

#### 2.1 La broca del café: breve reseña histórica

El insecto *Hypothenemus hampei* es originario del África Ecuatorial (Guinea, El Congo, Uganda y Kenia), y fue Ferrari quién descubrió y clasificó en Francia al insecto en 1867 en granos importados de África, siendo esta la primera referencia que se tiene sobre el insecto; el primer registro que se conoce a nivel de campo, proviene del año de 1901 en Gabón, África (López, 1994; Borbón, 1995).

En África este insecto está presente en todos los países productores de café, teniendo un auge en los países de Uganda, Angola, Gabón y Tanganika. Para 1910 hace su presencia en Java y 12 años más tarde invade toda la isla. En 1913 apareció en Brasil y para 1924 se considera el insecto más perjudicial en café. En este país se han realizado una gran cantidad de estudios sobre los daños y biología de la broca (Borbón, 1995).

Actualmente, la broca infesta al café en más de 60 países que se distribuyen en las regiones tropicales de África, Asia, América y Oceanía (Barrera *et al*, 2000). En la región centroamericana, esta plaga apareció en Guatemala en 1971 y aparentemente su ingreso fue a través de un agricultor que introdujo semilla de forma clandestina desde Brasil; más tarde se propagó a los demás países del área: Honduras (1977), México (1978), El Salvador (1981) y Nicaragua en 1988. También se reporta en Jamaica y Puerto Rico (López, 1994). En Costa Rica, la broca se detectó el 18 de diciembre del 2000 en Barreal de Heredia (Valle Central) y desde entonces ha aumentado periódicamente su difusión.

Por esta razón, el ICAFE en conjunto con el PROMECAFE, y con la experiencia de otros institutos de los países cafetaleros, se han interesado en el estudio de formas de control de la broca del café con el fin de minimizar los efectos de esta plaga en la producción nacional (Guzmán, 2004).

## **2.2 Clasificación taxonómica**

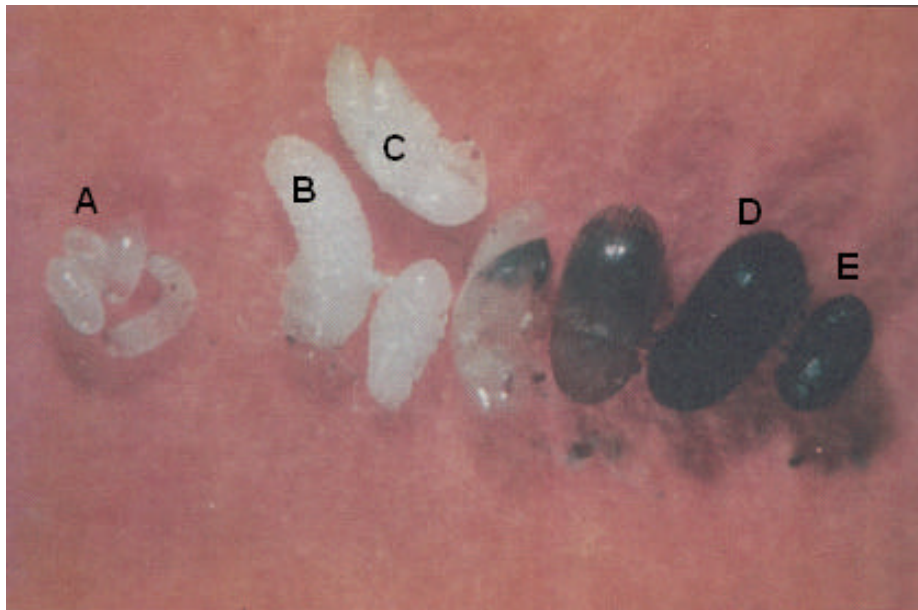
La broca del café la han descrito con los sinónimos de *Cryphalus hampei*, *Stephanoderes hampei*, antes de 1960, y actualmente es conocida como *Stephanoderes coffea*, *Xyleborus coffeicola* y *Xyloborus coffeivorus* y fue a partir de 1960 que fue clasificada como *Hypothenemus hampei* por Le Pelley (López, 1994). Este insecto pertenece a la clase Insecta, orden Coleoptera, familia Curculionidae, subfamilia Scolytinae, tribu Scolytini, género *Hypothenemus* y especie *hampei* (Bark and Wood Boring Beetles of the World, 2006).

## **2.3 Biología de la broca del café**

Es un insecto holometábolo típico, por presentar un estado de huevo, varios estados larvarios, un estado pupal y luego pasa a adulto. El insecto presenta un marcado dimorfismo sexual en: (1) la longitud del cuerpo, donde los machos son más pequeños que las hembras, (2) en las antenas, (3) en las alas membranosas y (4) en el abdomen (López, 1994).

Los huevos son globosos, ligeramente elípticos, al principio de color blanco lechoso, y con el tiempo se tornan hialinos y antes de la eclosión se tornan amarillentos y rugosos, miden de 0,83mm de largo y 0,45mm de ancho, y son puestos por la hembra en grupos de 2 a 8, en el fondo de la galería formada en los frutos por las mismas hembras (Figura 2.1A). Las larvas son de color blanco lechoso y de consistencia blanda, son ápodas, con una cápsula cefálica

parda y bien esclerotizada, con mandíbulas fuertes hacia adelante y el cuerpo está cubierto por grandes setas (Figura 2.1B). Su tamaño oscila de 1,17 a 2,3 mm de largo y 0,37 a 0,58 mm de ancho. Las hembras pasan por tres estados larvarios y el macho por dos. Las pupas son parecidas a las larvas, pero se diferencian por su inmovilidad. En un inicio son de color amarillentas, cambiando a pardo pálido antes de la emergencia del adulto, y a medida que se desarrollan, aparecen sucesivamente su cabeza, los ojos, antenas, boca, y presentan indicios de sus alas y patas. La pupa de la hembra mide de 1,37 a 1,93 mm de largo y 0,51 a 0,82 mm de ancho; el macho es más pequeño y mide 1,3 mm de largo y 0,55 mm de ancho (Figura 2.1C). Son del tipo abierto y pueden medir de 0,5 a 1,9 mm. Las hembras pasan por dos procesos de muda y el macho por uno (López, 1994).



Paint

**Figura 2.1.** Ciclo de vida de *H. hampei*. A: Huevos; B: Larva; C: Pupa; D: Hembra; E: Macho  
Tomado de: López, 1994.

El adulto de este insecto es un pequeño escarabajo de color pardo claro recién emergido a pardo oscuro o negro después de 4 o 5 días de edad. Las hembras son más grandes que los machos y miden entre 1,37 a 1,82 mm de largo, y

0,62 a 0,80 mm de ancho, y el macho mide de 1,0 a 1,25 mm de largo y 0,5 a 0,6 mm de ancho, y presentan una línea dorsal más o menos recta, ligeramente inclinada en el final del abdomen (Figura 2.2).



Paint

**Figura 2.2.** Izquierda: Hembra adulta de *H. hampei*. Derecha: Macho adulto de *H. hampei*. Tomado de: González *et al*, 2004

Los élitros (alas exteriores), presentan rayas paralelas, deprimidas, longitudinales, que se encuentran cubiertas de setas o pelos cortos y planos que crecen hacia atrás, por lo menos ocho veces más largas que anchas. La proporción de hembras y de machos varía de acuerdo al estado de la infestación, sin embargo, predominan el número de hembras. La cabeza es globular, bastante escondida bajo el pronoto, con antenas arqueadas y abultadas hacia el extremo, que muestra una línea dorsal acentuada, dándole al insecto una apariencia quelónica. El protórax, en su margen delantero, está armado con 4 a 7 dientes o espinas. El segundo par de alas membranosas está presente sólo en las hembras y atrofiadas en los machos, por lo que éstos no pueden volar. El adulto muerde y arranca el tejido con las mandíbulas, y lo saca como aserrín, con sus patas (López, 1994).

El macho tiene una longevidad menor, entre 50 a 75 días y no pueden volar; no obstante, en el interior del grano de café, los primeros individuos en nacer son generalmente machos, ya que éstos completan su desarrollo antes que las hembras. La hembra vive alrededor de 100-150 días y puede llegar a colocar de 2 a 3 huevos diarios, y el ritmo de postura es variable, según la edad de la hembra. La hembra penetra por la corona del fruto, unas veces perfora exactamente, haciendo coincidir el agujero de entrada con el diámetro del disco, otras en el borde y en muy pocas ocasiones, en los lados o en la base de la cereza, y el diámetro oscila entre 0,75 y 1,05 mm. Esto lo diferencia de otros insectos llamados falsas brocas, que son nativas de América, las cuales causan perforaciones en los lados o en la base del fruto (López, 1994).

El adulto de la broca del café ataca y se reproduce en frutos que tienen un peso seco superior al 20%, lo cual ocurre aproximadamente en frutos con 120 días de edad. Investigadores han observado que en un fruto se pueden encontrar hasta 82 adultos, aunque corrientemente la hembra puede colocar de 15 a 60 huevos promedio dentro del fruto de café, y luego las hembras fecundadas, abandonan la cereza donde nacieron para ir en busca de otros frutos (López, 1994).

El ciclo de vida completo toma dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas, entre 25 y 37 días. La reproducción puede ser consanguínea (entre hermanos) dentro de la misma cereza, lo cual reduce la variabilidad genética de la población. La cópula ocurre cuando la hembra alcanza la madurez sexual (3 o 5 días pos-emergencia), y la mayoría de las hembras abandonan el fruto luego de ser fecundadas, en tanto que los machos, generalmente no abandonan el fruto en el cual han nacido, pudiendo fertilizar uno solo o más de 30 hembras, donde fecundan más de dos hembras por día (López, 1994).

## **2.4 Ecología y condiciones favorables para su desarrollo**

La broca tiene una dispersión agregada o de contagio dentro del cafetal, lo que significa que no se encuentra infestando toda la plantación, sino en focos, y dentro de cada planta se encuentran bandolas más afectadas que otras, siendo las del tercio medio las más afectadas. En lo referente a la altitud, el rango reportado óptimo para el desarrollo de la broca está entre 800 a 1000 m.s.n.m. En alturas mayores a los 1500 m.s.n.m. la broca no representa un problema económico. En cafetales con sombra muy densa, las poblaciones de la broca son mayores, en tanto que en cafetales al sol, la incidencia es casi insignificante. La baja humedad provoca el desecamiento de los frutos reduciendo a veces drásticamente la tasa de reproducción de la broca, no así cuando hay humedades excesivas. Requiere temperaturas iguales o superiores a 25 grados centígrados y alta humedad relativa (altas precipitaciones pluviales), con alturas entre los 250 y 1300 m.s.n.m., sin embargo, la temperatura es el factor que juega el papel más importante para el desarrollo del ciclo biológico de *Hypothenemus hampei* y en la cantidad de generaciones por año. Las áreas que se encuentran a baja altitud y que presentan alta pluviosidad generan floraciones continuas, garantizando la permanencia del insecto. La broca inicia su ataque en el fruto poco tiempo después de la floración principal, perforando los frutos entre los 60 y 80 días después de la floración (López, 1994).

## **2.5 Importancia económica y daños que causa la broca**

La broca ataca el fruto del café, disminuyendo su calidad y rendimiento en beneficio y por ende, la rentabilidad del productor, afectando también la calidad de la bebida (Guzmán, 2004).

Esta plaga es considerada de gran importancia económica y puede llegar a causar daños del 80% o incluso hasta el 100% de daño, si no es controlada eficientemente (López, 1994).

Borbón (1995) reporta los siguientes daños, como principales, por el ataque de broca:

- a. Los frutos jóvenes que sufren el ataque de la broca caen al suelo, lo cual puede constituir entre 5 a 23% de pérdidas.
- b. Pérdida de frutos maduros que caen al suelo ya que se ha visto que la broca provoca un aceleramiento en la maduración del fruto, constituyendo pérdidas del 4 a 9%.
- c. Baja calidad del grano: el grano se considera de inferior calidad y por lo general es rechazado en los países clientes.
- d. Pérdida de rendimiento: los frutos atacados por la broca provocan un alto porcentaje de frutos vanos, de poco peso que disminuyen el rendimiento de beneficio y calidad física del grano. Esta pérdida puede ser de 15,9 kg por fanega.
- e. A los granos perforados les penetra la humedad provocando el desarrollo de hongos y la misma oxidación que se da en momento de atacar el grano, afecta la calidad de la bebida (Figura 2.3).

Así mismo, López (1994) reporta los siguientes daños directos e indirectos:

#### **2.5.1 Daños directos:**

- a. Puede ocasionar la pérdida del peso en el café maduro al convertirse en café pergamino seco con un 12 % de humedad relativa.
- b. Puede reducir la calidad del fruto, lo que podría afectar el precio e incluso hasta los mercados internacionales.

### 2.5.2 Daños indirectos

Se pueden desencadenar problemas ecológicos como producto del uso intensivo de insecticidas que se emplean para combatir a este insecto.



Paint  
**Figura 2.3.** Dañados causados por la broca. Izquierda: Bandola con detalle de broca iniciando el ataque en un fruto. Derecha: Granos dañados. Tomado de: López, 1994.

### 2.6 Medios de diseminación del insecto

Estos insectos se propagan mediante los implementos de cultivo, café en fruta y pergamino, implementos para la cosecha y beneficio, a través de las personas, animales, agua de lavado del beneficio, utensilios domésticos de los trabajadores de campo, desechos de productos agrícolas provenientes de áreas infestadas, y por el viento, pues es un medio muy eficaz de diseminación (López, 1994).

### 2.7 Métodos de control de la broca

Si se toma en cuenta el impacto en la productividad y la calidad del grano de café producido por la broca, así como su dispersión se hace necesario la implementación de técnicas de control de esta plaga con el fin evitar o al menos disminuir los efectos negativos que implica la presencia de la broca en una plantación.



### **2.7.1 Control Cultural**

El control cultural comprende la aplicación oportuna de las tecnologías apropiadas de manejo del cultivo, especialmente: regulación de sombra, poda, deshierba, fertilización y recolección de frutos brocados. Diferentes técnicas de control cultural se enumeran a continuación:

- c. Cosecha estricta y repela, con el propósito de dejar a la broca sin alimento y refugio, reduciendo la posibilidad de invasión de la plaga a los frutos sanos, por lo que se debe: cosechar estrictamente todos los frutos, retirar los frutos que hayan quedado en las bandolas, recoger los frutos caídos en el suelo (PROCAFE, 2005).
- d. Regulación de la sombra: la broca ataca intensamente a los frutos y se reproduce rápidamente en los cafetales con excesiva sombra, poca aireación interna y deficiente cuidado del cultivo, por lo que es necesario no propiciar estas condiciones en la plantación. Para esto, una solución es podar los árboles o deshijar y deshojar las plantas de sombra, para evitar la sombra excesiva y con esto las condiciones ambientales que ayuden al desarrollo de la plaga, es decir para hacerle desfavorable el ambiente al cafetal (Proyecto SICA/MAG, 2004).
- e. Poda de los cafetos: es la eliminación de chupones, ramas improproductivas y paloteadas, así como de las hojas severamente enfermas en las plantas de café, para contribuir a la aireación y entrada de luz solar al cafetal. Esto ayuda a bajar la humedad, lo que en cierta medida desfavorece a la plaga (Proyecto SICA/MAG, 2004).

- f. Control de malezas: mediante las deshierbas oportunas se evita la competencia de las malezas con el cafeto por espacio, agua, luz y nutrientes, lo que favorece un mejor crecimiento de la planta de café y facilita la pepena y repela, mejorando la exposición solar de los frutos caídos y así estos pierdan humedad, evitando que la broca sobreviva en estos granos (PROCAFE, 2005).
- g. Cosecha de frutos prematuros, para reducir infestaciones fuertes y evitar la reproducción para la próxima cosecha (PROCAFE, 2005).
- h. Fertilización orgánica o química: favorece el desarrollo vigoroso de los cafetos y eleva la producción de los cafetales (Proyecto SICA/MAG, 2004).
- i. Registro de Floración: Las floraciones deben ser registradas para conocer la época en que aparecerán los primeros frutos en donde la broca inicia sus ataques y su reproducción. Esto dará la pauta para la planificación anticipada del corte de frutos prematuros, muestreos y otras medidas de control. Se debe determinar el inicio de la floración principal, ya que entre los 90 y 120 días después de ésta, los frutos estarán en una etapa de desarrollo óptimo para que la broca haga sus ataques principales (PROCAFE, 2005).
- j. Los frutos brocados deben ser cuidadosamente recolectados de la planta; así como caídos al suelo. Los frutos plagados, luego de ser recolectados, deben ser quemados, sumergidos en agua caliente a altas temperaturas o introducidos en una funda plástica, herméticamente cerrada, que se expone a la luz solar intensa provocando una elevación de la temperatura y consecuentemente la muerte de los insectos de la plaga (Proyecto SICA/MAG, 2004).

### 2.7.2 Control etológico con trampas de captura

Las trampas son un método importante de control, que cuenta con un alto nivel de aceptación por parte de los agricultores. Sobre todo las trampas artesanales tienen gran demanda, lo que hace que este método de control se encuentre ya muy difundido. En los últimos años se han desarrollado varios modelos de trampa: la BROCAP® de El Salvador (PROCAFE y CIRAD) es de tipo industrial, la Fiesta del ICAFE de Costa Rica, y la IAPAR del instituto del mismo nombre son del tipo artesanal, y se elaboran con materiales de deshecho (Schuller, 2005).

En el caso específico de Costa Rica, las trampas diseñadas por el ICAFE constan básicamente de tres vasos, un plato y un difusor; los dos primeros vasos no tienen fondo, el último sí para poder agregarle agua y que la broca quede atrapada (Figura 2.4). En cuanto al difusor es una pequeña botellita que contiene dos tipos de alcoholes para atraer el insecto y que se coloca en el interior de los vasos, sujetado al plato (Fallas, 2004).



Paint

**Figura 2.4.** Trampa contra la broca del ICAFE. Tomado de: Guerrero, 2004.

La colocación de la trampa para control de la Broca usualmente se realiza en el período de marzo a junio (en el Valle Central), ya que

durante esta época hay escasez de alimento para las Brocas y se refugian en los granos de café que quedaron en la planta y/o en el suelo, en espera del desarrollo del fruto de la nueva cosecha. En cuanto a la cantidad y colocación de las trampas se recomienda utilizar 20 trampas por hectárea, ubicadas en la parte media de la planta y apropiadamente distribuidas en el lote (Fallas, 2004).

En lo que respecta a este tipo de control, actualmente los trabajos de investigación se centran en buscar atrayentes de mayor eficiencia. Además, es necesario comprender mejor los factores que determinan la emergencia y migración de la Broca del Café en la época de poscosecha, y evaluar la capacidad que tienen las trampas de captura en compensar deficiencias en el control cultural, como raspa y recojo de frutos, lo que ocurre periódicamente en años de precios bajos (Schuller, 2005).

### **2.7.3 Control químico**

El control químico de la broca involucra el uso de insecticidas. Sin embargo, por los efectos perjudiciales sobre los insectos benéficos, el medioambiente y la salud humana, no se recomienda su uso en la caficultura (Proyecto SICA/MAG, 2004).

Aún así, si después de haber aplicado otras técnicas de control, el muestreo refleja la necesidad de aplicar un insecticida, el Endosulfán 35 CE es el insecticida de mayor uso en el control de la broca a nivel mundial (PROCAFE, 2005). Sin embargo, este compuesto ha sido restringido por que puede inducir resistencia con su uso, además de que es altamente tóxico para el ambiente. Según estudios de EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuaria de Minas Gerais), insecticidas del mismo nivel de eficiencia del endosulfán (>80%) son el Fipronil,

Thiacloprid y Methiocarb; insecticidas del grupo de los piretroides no tienen eficiencia para el control de la broca (Schuller, 2005).

Los insecticidas son eficaces en el control de la broca sólo si se cumplen las siguientes condiciones: 1. realizar un muestreo y así determinar el umbral económico de la plaga en el cultivo, 2. asperjar en focos o puntos calientes y no en forma generalizada en las fincas, debido al carácter gregario de la broca, 3. aplicarlos cuando la broca esté penetrando al fruto o se encuentra en el canal de penetración, 4. calibrar los equipos de aspersión y la concentración del producto en la mezcla, basado en la dosis y 5. el personal que realiza las aspersiones de insecticidas debe entrenarse previamente (López, 1994)

#### **2.7.4 Control genético**

Hay varias características genéticas de cultivares de café que pueden ser aprovechadas en el marco de una estrategia de Manejo Integrado de Plagas. Por ejemplo: plantas con mayor uniformidad de floración permitirían concentrar la cosecha e introducir un periodo más largo de descanso, lo que desfavorecería el desarrollo de la broca. Algunos cultivares de *Coffea canephora* muestran mayor susceptibilidad en pruebas de brocamiento en laboratorio, y podrían ser integradas como plantas trampa. La especie *Psylanthus bengalensis*, cercana al genero *Coffea*, mostró resistencia absoluta en pruebas de brocamiento en laboratorio, y la sustancia antagónica producida podría ser utilizada como insecticida botánico. La especie *Coffea eugenoides* podría ser utilizada para procesos de mejoramiento genético por retrocruzamiento para introducir el gen de resistencia de broca del Café en variedades comerciales. Actualmente se está investigando también la alternativa de producir plantas transgénicas de café, introduciendo genes inhibidores de

$\alpha$ -amilasas provenientes del frijol. Las  $\alpha$ -amilasas son enzimas presentes en el tracto intestinal de la Broca del Café, necesarias para el proceso de digestión del alimento (Schuller, 2005).

### **2.7.5 Control Biológico**

El ciclo de vida de la broca ocurre exclusivamente dentro del fruto, por lo que su control es muy difícil en un hábitat tan protegido como ese. Debido a esta situación, organismos controladores que puedan alcanzar a la plaga en su micro hábitat son muy deseados (Benavides et al, 2003). En la integración de estrategias para el manejo de la broca del café, las prácticas de control biológico juegan un papel importante para disminuir el daño económico que puede causar la plaga. Este tipo de estrategia se basa en el uso de enemigos naturales que son utilizados para controlar la plaga como mecanismo para disminuir el ataque y el efecto de esta plaga en los rendimientos de la cosecha de café (Campos, 2001). Diversas revisiones sobre los enemigos naturales de la broca del café han sido presentadas. El tabla 2.1 presenta aquellos parasitoides, depredadores y patógenos que han sido reportados atacando a la broca, tanto en la naturaleza como en el laboratorio.

**Tabla 2.1.** Depredadores, parasitoides y patógenos que atacan a *H. hampei*

Familia	Especie	Distribución	Observaciones
Bethylidae	<i>Cephalonomia stephanoderis</i>	Costa del Marfil, Togo, Camerún, Guatemala, México, Brasil, etc.	Ectoparasitoide de larvas de última fase, prepupas y pupas; el adulto depreda sobre todos los estadios.
	<i>Cephalonomia</i> sp.	Brasil	Especie no identificada
	<i>Prorops nasuta</i>	Camerún, Costa de Marfil, Togo, Colombia, Brasil, Ecuador, Nicaragua, etc.	Ectoparasitoide de larvas de última fase, prepupas y pupas; el adulto depreda sobre todos los estadios.
	<i>Sclerodermus cadavericus</i>	Uganda, Zaire, Kenia	Provoca dermatosis
Braconidae	<i>Heterospilus coffeicola</i>	Camerún, Zaire, Kenia, Tanzania, Uganda.	La larva es depredadora; no específico.
Eulophidae	<i>Phymastichus coffea</i>	Togo, Kenia, Colombia.	Parásito de adultos; no específico
Ceraphronidae	<i>Aphanogmus dictyna</i>	Uganda	Hiperparasitoide; parasita aparentemente a <i>P. nasuta</i> .
Proctotrupeoidea	Especie no identificada	Brasil	Parásito de adultos
Formicidae	<i>Crematogaster curvispinosus</i>	Brasil	Depredador
Pyrhocoridae	<i>Dindymus rubignosus</i>	Indonesia	Depredador no específico.
Heteroabditidae	<i>Heteroabditis</i> spp.	-	No específico; bioensayos de laboratorio, no reportado en la naturaleza.
Steinernematidae	<i>Steinernema carpocapsea</i>	-	No específico; bioensayos de laboratorio, no reportado en la naturaleza.
Hypomycetes	<i>Beauveria bassiana</i>	Cosmopolita	Muchas cepas.
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Brasil, Colombia, México.	Muchas cepas; bioensayos de laboratorio.
	<i>Nomuraea rileyi</i>		Rara sobre Coleptera.
	<i>Paecilomyces (=Spicaria)jovanicus</i>	Indonesia	
Bacillaceae	<i>Bacillus thuringiensis</i>	México	Bioensayos de laboratorio.

**Fuente:** Barrera *et al*, 2000

Entre estas especies, ocho son parasitoides, dos son depredadores, cuatro son hongos entomopatógenos, una es una bacteria y varias son especies de nemátodos. Con excepción de una especie no identificada del género *Cephalonomia* y otra de la familia Proctotrupeoidea reportadas en Brasil, todos los parasitoides reportados son originarios de África (Barrera et al, 2000).

Propiamente con lo que respecta a su empleo como técnica de control, los únicos intentos de uso de enemigos naturales en el control biológico de la broca a nivel mundial han sido con los parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* Betrem, *Prorops nasuta* Waterson, *Heterospilus coffeicola* Schmideknecht, *Phymastichus coffea* LaSalle y el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Los parasitoides *P. nasuta* y *H. coffeicola* fueron los primeros en ser utilizados en los años treinta, mientras que, el interés en *C. stephanoderis*, *P. coffea* y *B. bassiana* ha sido mucho más reciente (Barrera et al, 2000).

En América, aunque en algunas naciones latinoamericanas productoras de café se han descubierto algunos parasitoides y depredadores de la broca, no se conoce cuanto es su aporte al control de esta plaga, por lo que se ha hecho necesario importar los parasitoides de origen africano, de donde proviene la broca. Estos parasitoides son pequeñas avispas, que colocan huevos en las larvas y pupas de la broca y depredan a los adultos, huevos y larvas pequeñas, en el caso de *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta*. *Phymastichus coffea*, ataca sólo los adultos en el momento que están afectando el fruto (Borbón, 2003).



## **2.8 Parasitoides de la broca del café**

A continuación se presenta una breve descripción de los principales parasitoides de la broca del café:

### **2.8.1 *Cephalonomia stephanoderis* Betrem**

Es un ectoparasitoide primario de *H. hampei*. Las hembras recién emergidas del capullo generalmente se aparean con los machos dentro del fruto del café donde se desarrollaron. Después del apareamiento salen del fruto del café para buscar a otro infestado por la broca, penetrando a éste a través de la perforación realizada por su huésped. La hembra adulta, que es más grande que el macho, se alimenta de todos los estadios de desarrollo de la broca, pero de acuerdo a investigadores sólo la alimentación sobre prepupas y pupas promueve el desarrollo y maduración de los huevos. La hembra paraliza y después parasita a las prepupas. Generalmente, es puesto un solo huevecillo por huésped, el cual es pegado sobre éste a través de una sustancia mucilaginosa (Barrera et al, 2000).

En las prepupas la ovipostura ocurre por b común en la parte ventral y en las pupas en la región dorsal abdominal. Después de la eclosión, la larva inserta su aparato bucal en el cuerpo del huésped, de tal manera que durante su desarrollo la cabeza y el protórax no son visibles. El contenido del cuerpo del huésped es enteramente consumido y hacia el fin de su desarrollo, larva teje un capullo dentro del cual se efectúa la metamorfosis (Figura 2.5 y 2.6). Las hembras apareadas presentan una reproducción sexual a partir de la cual se obtienen hembras y machos, mientras que las hembras vírgenes dan lugar sólo a machos (partenogénesis arrenotoquia) (Barrera et al, 2000).

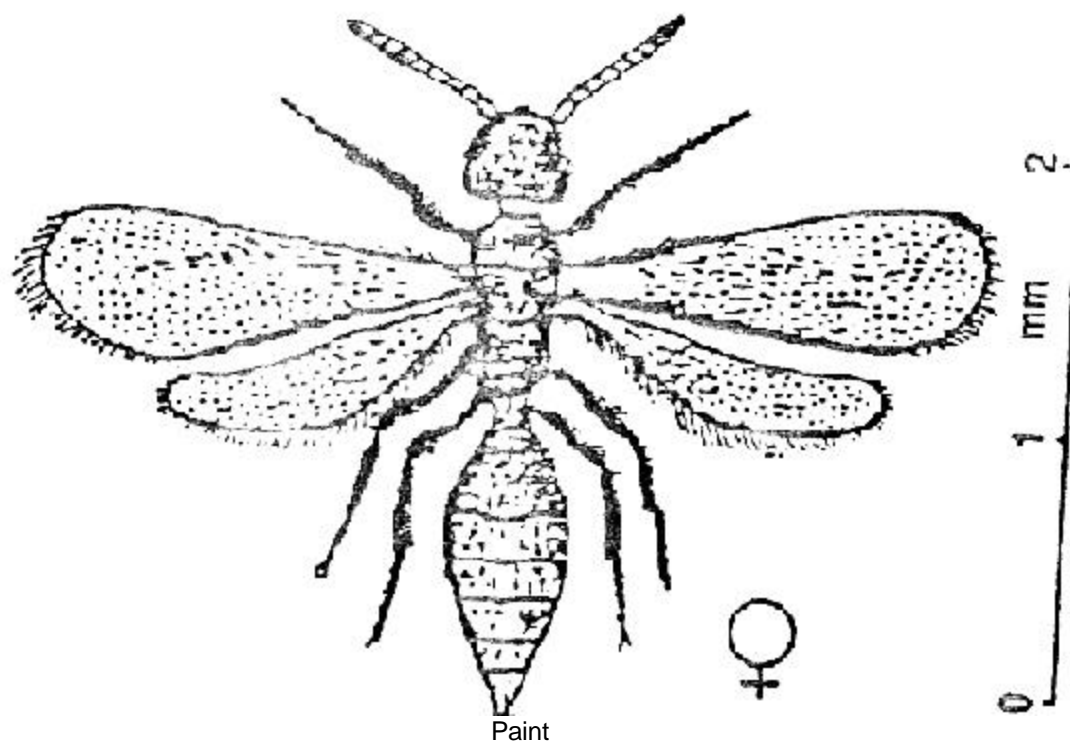


Figura 2.5. *Cephalonomia stephanoderis*. Tomado de: Borbón, 1995.

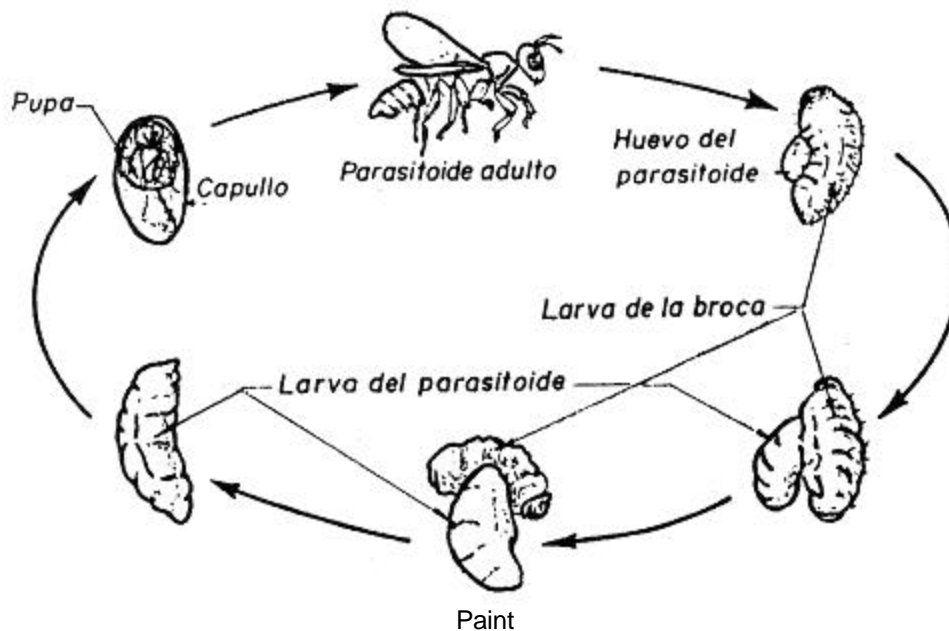
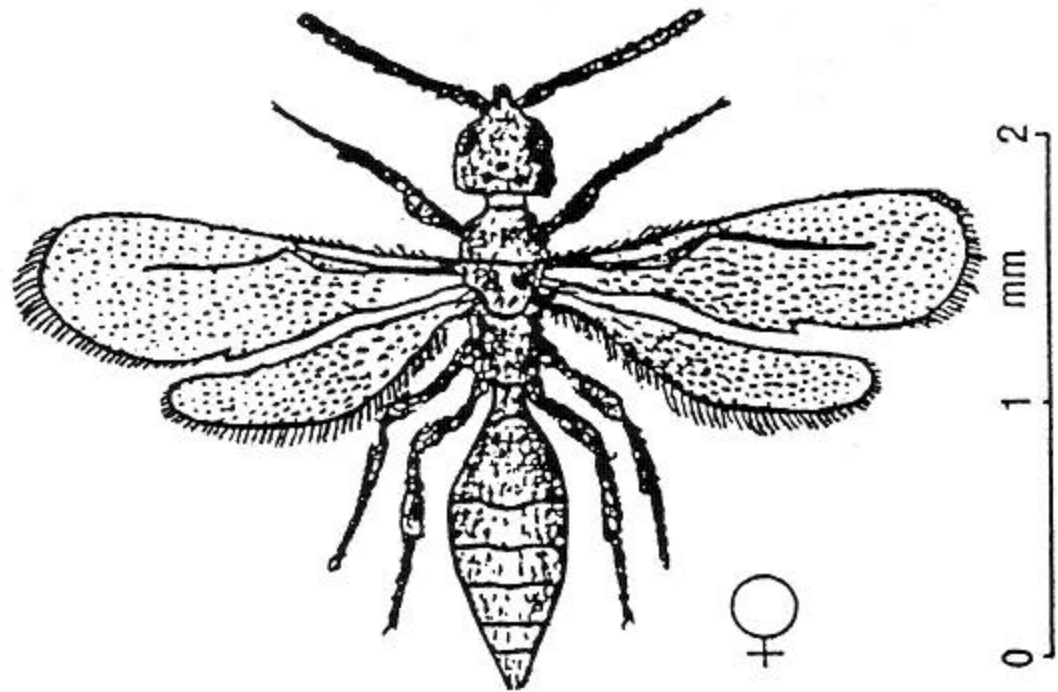


Figura 2.6. Ciclo de vida de *Cephalonomia stephanoderis*. Tomado de: López, 1994.

### **2.8.2 *Prorops nasuta* Waterson**

Es un himenóptero de la familia Bethylidae originario de Uganda, descubierto en 1923. Las hembras parasitan las larvas en su último estado o las ninfas de la broca, en las que colocan sus huevos sobre la porción ventral. La larva de *P. nasuta* vive en ectoparasitismo, alimentándose de su hospedero, donde succionan la hemolinfa, durante tres o cuatro días. Luego las larvas hacen un capullo, donde se lleva a cabo el desarrollo ninfal, que tarda 21 días, y su ciclo total se completa en 17 a 33 días a 25 grados centígrados. La hembra pone de 8 a 20 huevos por fruto (Figura 2.7). El adulto de *P. nasuta* se comporta como un predador, por alimentarse de los huevos y larvas de la broca. También puede atacar a los adultos. Su acción se lleva a cabo en los frutos maduros y secos. Este parasitoide fue introducido en Java, Ceylan, Indonesia y Brasil. En este último país, al principio su efecto fue muy bueno sobre la plaga, pero luego su acción ha venido a menos, además de verse desfavorecido por plantaciones sombreadas y con alta humedad relativa. Este parasitoide, también se encuentra en Costa de Marfil y Togo pero en pequeñas cantidades (Borbón, 1995).

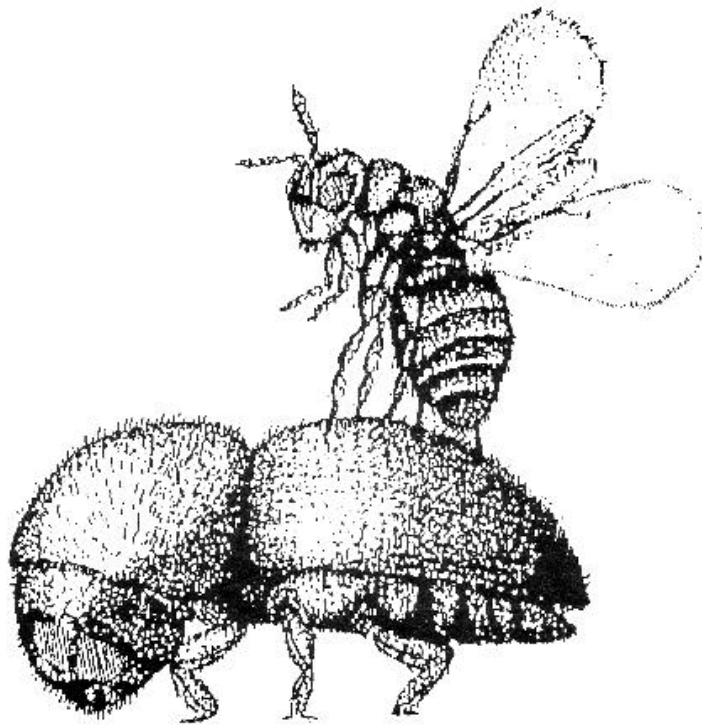


Paint

**Figura 2.7.** *Prorops nasuta* Waterson. Tomado de: López, 1994

### **2.8.3 *Phymastichus coffea* LaSalle**

Es un himenóptero de la familia Eulophidae, fue descubierto en Togo por Borbón, parasitando la broca en 1987 (Figura 2.8). Este parasitoide se desarrolla solo en las hembras de la broca como endoparasitoide, en la que pone uno o dos huevos cuando están perforando su galería en los frutos, sobre todo en los verdes. La broca muere 3 o 4 días después de ser parasitada. El ciclo biológico se completa en 20 a 25 días a unos 26 grados centígrados. Existe un dimorfismo sexual, donde la hembra mide de largo 0.80 a 1.0 mm, en tanto que el macho 0.45 a 0.55 mm. Este parasitoide puede causar el 30% o más de mortalidad de la broca, en ciertas épocas del año (López, 1994).



Paint

**Figura 2.8.** *Phymastichus coffea* LaSalle parasitando a *H. hampei*. Tomado de: Borbón, 1995

#### **2.8.4 *Heterospilus coffeicola* Schmiedeknecht**

Es un Himenóptero de la familia Braconidae, descubierto por Ghesquiére en 1924, en Zaire (Figura 2.9). La hembra va de fruto en fruto en aquellos recién atacados por la broca, donde pone un huevo, el cual a los 6 días de incubación sale la larva. Esta devorará los huevos y larvas de la broca existentes en el fruto. El estado larvario del parasitoide dura de 18 a 20 días, donde hace un capullo de seda y donde se realiza el desarrollo de la ninfa, dando luego la aparición del adulto. Los adultos de este insecto parasitoide no viven en el interior del fruto (Borbón, 1995).

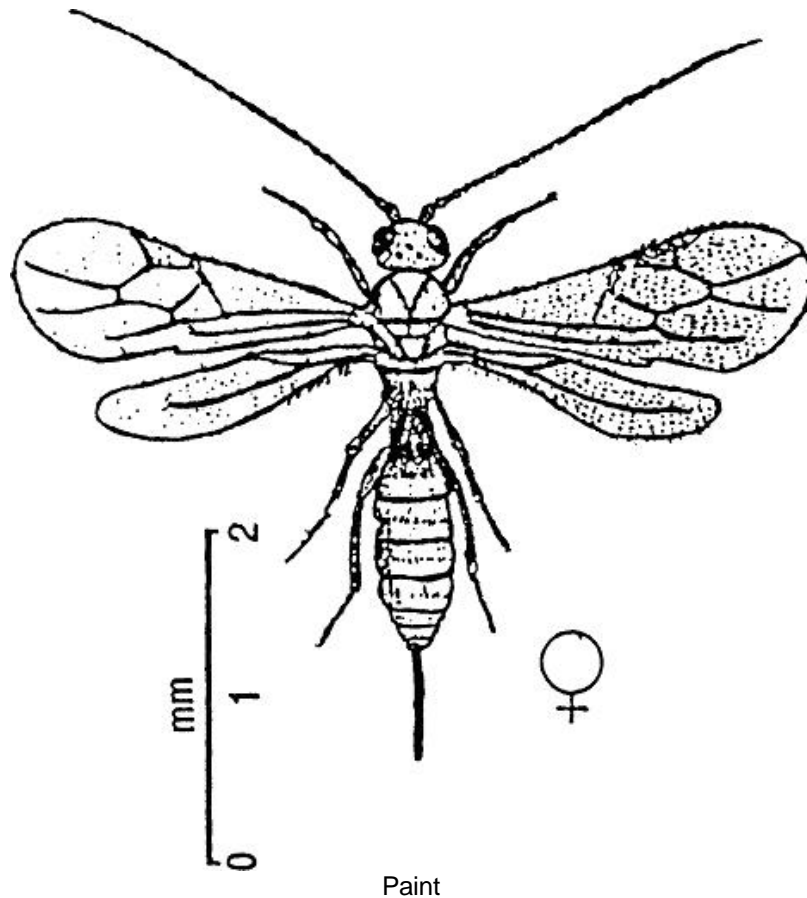


Figura 2.9. *Heterospilus coffeicola* Schmiedeknecht. Tomado de: López, 1994.

## 2.9 Evolución histórica del control biológico de la broca del café

De acuerdo con Barrera *et al*, 2000 la evolución que ha tenido este tipo de control, durante el período comprendido entre 1910 a 1990, puede ser dividida históricamente en tres períodos, los cuales han sido influenciados fuertemente por las tendencias mundiales en el combate de plagas.

### 2.9.1 Primer Período (1919-1947)

El primer período dura 28 años y comienza en 1919 con el descubrimiento en Java de un hongo (posiblemente *B. bassiana*)

parasitando adultos de la broca. Poco después, a principios de los años veintes, son descubiertos en Uganda los parasitoides *P. nasuta* y *H. coffeicola*. Importado de Uganda, *P. nasuta* es introducido a Java en 1923 y a Brasil en 1929, mientras que *H. coffeicola* es introducido a Ceilán (ahora Sri Lanka) en 1938. En 1933, *B. bassiana* es identificado formalmente atacando a la broca en Malasia y en el Congo Belga. Sin duda este período fue dominado por los esfuerzos hechos en Brasil con el uso de *P. nasuta*.

El interés en el control biológico de la broca durante este período, puede explicarse en gran parte por el descubrimiento de *P. nasuta*, los éxitos obtenidos con este tipo de control en otras plagas, y porque en aquella época aún no habían insecticidas muy efectivos.

### **2.9.2 Segundo Período (1948-1984)**

Durante este período disminuye notablemente el interés por el control biológico de *H. hampei*; por una parte debido a los resultados poco espectaculares obtenidos con *P. nasuta* y *H. coffeicola*, y por otra parte, por la llegada de los poderosos insecticidas sintéticos.

En esta época emerge el uso del endosulfan, un insecticida ciclodieno organoclorado que ha resultado muy efectivo contra *H. hampei*. Aparentemente, la primera utilización del endosulfan contra la broca data de 1960.

Entre los pocos acontecimientos aislados con relación al control biológico de esta plaga que se presentaron durante este período, se puede citar el descubrimiento de *C. stephanoderis* en 1960; la introducción a Perú en 1962 de *P. nasuta* desde Brasil; el empleo experimental de *B. bassiana* en Guatemala y estudios preliminares en Brasil sobre este hongo.

Sin duda, este período de 36 años fue dominado esencialmente por el empleo de insecticidas para combatir la broca. Esto puede explicar que *C. stephanoderis* no haya sido importado de África después de su descubrimiento.

### **2.9.3 Tercer Período (1985 a la fecha)**

El tercer período, que aún está en evolución, es caracterizado por un reflorecimiento del control biológico de la broca del café y da inicio en 1985 con la puesta en marcha de un proyecto en México y otro en Ecuador. Dichos proyectos tuvieron como objetivo la importación de *C. stephanoderis* y *P. nasuta*. Así, por primera vez *C. stephanoderis* es importado de África a otros continentes. En los siguientes años varios programas similares iniciaron actividades de importación de estos parasitoides en Indonesia (1989), Nueva Caledonia (1989), Guatemala (1990), El Salvador (1990), Honduras (1990), Colombia (1991), Nicaragua (1992) y la India (1995).

La selección de cepas y bioensayos en campo con *B. bassiana* y *M. anisopliae* también se reinician y toman fuerza en este período. Otros acontecimientos sobresalientes ocurrieron en este período son el descubrimiento de *Phymastichus coffea* LaSalle en Togo por Borbón (1989), y su reciente importación a Colombia. El primer reporte de resistencia de la broca del café al insecticida endosulfan en Nueva Caledonia; y la cría de la broca del café en una dieta artificial, lo cual ha abierto las posibilidades de la cría industrial de *C. stephanoderis*.



## **2.10 Cría masiva de la broca del café y sus parasitoides**

La utilización de insectos criados masivamente para el control de plagas data desde la década de 1920, cuando parásitos fueron cultivados a gran escala y liberados para establecer o aumentar programas de control biológico. Hoy en día, una amplia variedad de insectos son producidos en millones y usados como hospederos y agentes de control en varios programas de control de plagas. Los esfuerzos iniciales en la cría de insectos fueron desarrollados para proveer métodos de cría más eficientes, sin embargo siguen habiendo muchos problemas que resolver en esta área, por ejemplo, la producción excesiva que a veces debe ser desechada para reducir el tamaño de la colonia, otras veces la colonia es demasiado pequeña, etc. Por eso, métodos más eficientes de cría siempre son buscados (Portilla, 1999).

La producción en masa de la mayoría de especies de parasitoides requiere la cría en un hospedero. Por ejemplo, en el caso de *Cephalonomia stephanoderis*, la cría en masa se realiza utilizando su hospedero natural, *H. hampei*. La broca del café ha sido criada mediante diferentes sistemas: a) usando frutos de café infestados naturalmente, b) en frutos de café infestados artificialmente con el hospedero, c) en café pergamino infestado artificialmente con la broca, d) en granos de café verdes humedecidos e infestados artificialmente con la broca y e) en dietas artificiales infestadas con la broca del café (Portilla, 1999).

### **2.10.1 Cría en café pergamino**

Estudios con los tipos de cría citados anteriormente han evidenciado que el método de cría en café pergamino es el más exitoso para el cultivo a gran escala de la broca del café y su parasitoide, aproximadamente 1 400 millones de parasitoides entre 1994 y 1998 (Portilla, 1999).

Por ejemplo, en 1988, México estableció el programa de cría y domesticación de dos de los parasitoides de la broca, *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta*, pero solo el primero se adaptó (Campos, 2001). *C. stephanoderis* se ha criado bajo dos modalidades: 1) la “cría rural” y 2) la “cría centralizada”. La cría rural es un sistema donde los caficultores realizan una cría artesanal del parasitoide. Generalmente, esta cría no involucra la cría del huésped (la broca), sino que utiliza frutos infestados naturalmente que son colectados del cafetal; por lo tanto, en este sistema la broca es controlada tanto por la acción de los parasitoides como por la acción de retirar frutos infestados del cafetal (control cultural). Por otro lado, la cría centralizada es un sistema donde un grupo de técnicos realiza una cría más tecnificada del parasitoide. La cría centralizada, comparativamente con la cría rural, es un sistema que permite producir más parasitoides. En esta se utilizan frutos infestados del campo, pero también, llega a efectuarse la cría del huésped (el sustrato más común es el café pergamino con 35% de humedad) (Barrera *et al*, 2000).

Posteriormente, Guatemala, El Salvador y Honduras, desarrollaron el programa de control biológico, a partir de pies de cría llevados desde México y en 1999, Guatemala introdujo del África el parasitoide *Phymastichus coffea*, descubierto por el costarricense Dr. Olger Borbón, cuando realizaba sus estudios en Togo, África (Campos, 2001).

En Costa Rica, en el ICAFE, es a partir del 2001 que se establece un Laboratorio de Control Biológico, para la reproducción de parasitoides (*Cephalonomia stephanoderis*, *Phymastichus coffea* y *Prorops nasuta*) con pies de cría traídos por el Dr. Borbón de Guatemala y Colombia (Campos, 2001).

Sin embargo, el costo de los parasitoides en crianzas sobre frutos o granos de café es elevado (como 1000 avispas/1,5 U.S.\$), esto dificulta su integración como herramienta de control. Por ejemplo en Costa Rica, no se cuenta con un suministro de granos durante todo el año para la reproducción de la broca en café pergamino, por lo que se hace necesario pensar en la factibilidad de una producción industrial y económica de los parasitoides. Por lo tanto, la tendencia va hacia el desarrollo de dietas artificiales, que permitan la producción de la broca y sus parasitoides a gran escala y a bajo costo (Schuller, 2005).

### **2.10.2 Dietas artificiales**

Una dieta artificial usualmente se refiere a cualquier dieta que no es el alimento natural del insecto. Hoy en día, los conocimientos en nutrición de los insectos han mostrado que una amplia variedad de insectos pueden ser producidos en millones y ser usados en varios programas de control de plagas (Portilla, 2000). Existen varias dietas artificiales para escolítidos, pero sólo existen unas pocas para la cría de la broca del café. El primer intento para la cría de *H. hampei* fue hecho por Bautista y Martínez en 1982, pero sus resultados no fueron exitosos. En 1989 Villacorta desarrollo una dieta exitosa para la cría de este insecto y en 1993 Villacorta y Barrera modificaron esta dieta, produciendo una dieta artificial llamada Ecobrovill-160. Por otra parte, en 1993 Brun y colaboradores reportaron otra dieta artificial para *H. hampei* donde fueron criadas 15 generaciones (Portilla, 2000).

Sin embargo, problemas de contaminación por hongos en esos medios de cultivo, constituyen uno de las principales dificultades para el desarrollo y aplicación de este método de reproducción, además de ser

muy caras y con muchos ingredientes. Portilla (2000) reportó la presencia de contaminación causada por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en la dieta que evaluó.

La mayoría de las 6000 especies de Scolytidae están involucradas en una relación mutualista con hongos, los cuales cultivan y utilizan como fuente de alimento. Como regla general, los escarabajos de ambrosia, que incluyen al género *Hypothenemus*, viven en relaciones mutualistas con hongos (Pérez *et al*, 2003). Por eso, por muchos años los investigadores han sospechado que hay hongos asociados con la broca del café. Pérez y colaboradores (2003) lograron aislar cultivos de hongos a partir de la cutícula, intestinos y eses de la broca del café, en donde *Fusarium*, *Penicillium*, *Candida* y *Aspergillus* fueron los géneros dominantes.

## Capítulo 3

### **OBJETIVOS**

---

#### Objetivo General

Evaluar la incorporación de diferentes fungicidas y dosis en dietas artificiales para el desarrollo y reproducción de la broca del café bajo condiciones controladas

#### Objetivos específicos

- a. Aislar e identificar los hongos que contaminan la dieta artificial, y que provienen tanto con las brocas de granos de campo como con las procedentes de café pergamino.
- b. Realizar pruebas de sensibilidad de fungicidas y/o desinfectantes a los hongos que contaminan la dieta.
- c. Determinar la concentración efectiva (EC) de los fungicidas y/o desinfectantes para una inhibición del 50 y 90% del crecimiento de los hongos, para así definir cual fungicida y que concentración es la más adecuada.
- d. Evaluar el porcentaje de contaminación en la dieta artificial inoculada con brocas procedentes de granos de campo y de café pergamino, utilizando el fungicida con la mejor  $EC_{90}$  y dos fungicidas testigo.
- e. Evaluar el efecto de diferentes fungicidas sobre la sobrevivencia y reproducción de la broca, procedente de granos de campo y de café pergamino.
- f. Evaluar el efecto de tres fungicidas en la desinfección directa de la broca del café procedentes de grano de campo.
- g. Evaluar el efecto de un surfactante sobre la desinfección directa de brocas del café procedentes de grano de campo.

## Capítulo 4

### **MATERIALES Y METODOS**

---

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio del Centro de Investigaciones en Café (CICAFE) del Instituto del Café (ICAFE), ubicado en Barva de Heredia, Costa Rica.

#### **4.1 Identificación de los hongos**

Para la identificación de los hongos, se tomaron placas multipozo con la dieta artificial, las cuales tenían un mes de haber sido inoculadas con brocas provenientes de granos de campo y presentaban contaminación por diversos hongos. En la selección de los hongos se utilizó como criterio, la frecuencia del fenotipo (color y aspecto) en las placas multipozo, escogiendo aquellos que se presentaban en mayor proporción o frecuencia.

Para determinar sus características macroscópicas, las colonias se observaron bajo un estereoscopio y se determinó el color, aspecto, forma, superficie, elevación, borde y estructura interna de las mismas. Por otro lado, para el análisis microscópico, se procedió a tomar de los pozos con medio de cultivo contaminado con cada uno de los hongos, una pequeña muestra con un asa micológica esterilizada y limpia. Esta se colocó en un portaobjetos al que previamente se le colocó una gota de agua en el centro con un gotero, se tapó con un cubreobjeto con cuidado de no dejar burbujas y se observó al microscopio. Se fotografiaron las estructuras observadas. Se repitió el procedimiento anterior con todas las muestras pero utilizando una gota de colorante vegetal (toluidina) en lugar de agua. La identificación se realizó con la ayuda de literatura como el manual de Finch H. y Finch A (1990).

## **4.2 Pruebas de sensibilidad con diferentes fungicidas en medio Agar Papa Dextrosa (PDA)**

Se realizó un aislamiento de cada uno de los hongos identificados, los cuales bajo técnica aséptica, fueron inoculados y multiplicados en sendas cajas de Petri con medio de cultivo PDA, con el fin de obtener un cultivo puro de cada hongo; para la multiplicación del inóculo se empleó también PDA.

Los fungicidas utilizados fueron: Benlate 50 WP al 50% (Benomil) metil-1-(butil-carbomil) benzimidazol-2-Yb-carbamato; Clortosip 50 SC al 50% (Clorotalonil) tetracloroisophthalonitrilo; Fytosan 80 WP (caldo bordelés) al 80% sulfato de cobre (20% de cobre metálico); Serinale 500 50 SC al 50% (Carbendazim) metil-2-benzimidazoil carbamato; Busan 100 al 80% cuaternario de amonio y Butrol 31,5 EC (Benzotiazole) al 31,5% TCMTB (tiozianometiltio).

Se preparó 135 ml de PDA en botellas de vidrio con tapa que fueron sometidas a esterilización por 15 min a 120 °C y 1,2 kg/cm<sup>2</sup> de presión. El medio de PDA se mantuvo en baño de María, para evitar su solidificación. Luego cada fungicida fue incorporado al medio de cultivo, cuando este se encontraba aproximadamente a 50° C, para obtener una concentración final en el medio de 1, 10, 100 ppm de cada fungicida.

Las pruebas se realizaron en cajas de Petri de 90 mm, vertiendo aproximadamente 15 ml de PDA con el fungicida respectivo, y preparando tres placas por dosis por fungicida y por aislamiento. Además, se evaluó un tratamiento sin fungicida para cada hongo, el cual constó de tres repeticiones realizadas por duplicado. Toda esta operación se realizó en cámara de flujo laminar.

La inoculación de los tratamientos se realizó con los hongos identificados en cultivo puro de 2 semanas de edad. Se tomó un disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio del hongo y se colocó este en el centro de las placas Petri.

Las cajas de Petri permanecieron a una temperatura de 28°C y a un fotoperíodo de 12 horas.

La evaluación del crecimiento de los hongos en cada tratamiento, se realizó después de 8 días de la inoculación, midiendo el diámetro de las colonias. El Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC) se determinó mediante la fórmula:

$$\text{PIC} = \frac{\text{crecimiento testigo} - \text{crecimiento tratamiento}}{\text{crecimiento testigo}} \times 100$$

Los datos de PIC obtenidos fueron transformados en base logarítmica ( $\log_{10}$ ) junto con las dosis de fungicida utilizadas en ppm, con el fin de determinar la  $EC_{50}$  (concentración efectiva para inhibir el 50% del crecimiento del hongo) y la  $EC_{90}$  (concentración efectiva para inhibir el 90% del crecimiento del hongo) a través de una ecuación lineal. Los datos obtenidos de la EC, fueron transformados aplicando el inverso de logaritmo de 10 (exponencial10).

#### **4.3 Pruebas con fungicida en la dieta artificial para la broca del café**

Una vez que se logró determinar el fungicida más efectivo para la inhibición del crecimiento de los hongos presentes en la dieta artificial para la broca del café, se procedió a probar su efectividad al incorporarlo en ésta. El fungicida seleccionado para esta prueba fue el Butrol 31,5 EC (Benzotiazole) al 31,5%, a concentraciones de 37,5, 75 y 112,5 ppm, cuya efectividad fue comparada con dos fungicidas más: Benlate 50 WP al 50% (Benomil) a una concentración de 750 ppm y Daconil 82.5 WG (Clorotalonil) al 82,5% a una concentración de 412,5 ppm. Las concentraciones citadas anteriormente de cada fungicida, se probaron en dietas inoculadas tanto con broca proveniente de granos del campo como con broca proveniente de café pergamino del laboratorio,



resultando en 10 diferentes tratamientos, con un testigo y seis repeticiones para cada tratamiento, como se observa en el Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Distribución de las dosis y tratamientos para las pruebas en la dieta de la broca

Fungicida	Tratamiento		Repeticiones*
	Tipo de Broca	Dosis (ppm)	
Butrol 31,5 EC	Pergamino	37,5	6
		75	6
		112,5	6
	Campo	37,5	6
		75	6
		112,5	6
Benlate 50 WP	Pergamino	750	6
	Campo	750	6
Daconil 82,5 WG	Pergamino	412,5	6
	Campo	412,5	6

\* Cada repetición consta de una bandeja multipozo con 24 pozos cada una

Además para cada tratamiento, se mantuvo un testigo con el fungicida y concentración respectiva pero sin brocas, para evidenciar si la dieta se contaminaba aún en ausencia de las mismas.

Para la preparación de las dietas se siguió el procedimiento que se utiliza actualmente en el CICAPE. Primeramente se autoclavarón 150 g de café molido (2 mm de grosor) por 15 minutos a 1,2 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Simultáneamente, se autoclavarón 750 ml de agua destilada con agar Sigma (A9915, 15 g por litro) por 15 minutos a 1,2 kg/cm<sup>2</sup>. Una vez que se finaliza con el autoclavado, en una cámara de flujo laminar se colocó el agar en una licuadora industrial y cuando este se encontraba en movimiento se adicionó el café molido. Se licuó por 30 segundos hasta que la mezcla del café y el agar fueron homogéneas y luego se agregaron los siguientes ingredientes: 1,5 g de Benlate 50 WP al 50% (Benomil) metil 1 - (butil-carbomyl) benzimidazol-2-Yb-carbamato, 20 g de torula, 20 g de caseína, 14 g de azúcar, 2 g de benzoato de sodio (B3250), 0,5 g de vitaminas de Vanderzant (V 1007), 1 g de sales de Wesson (W1374), 10 ml de etanol al 95% y 0,5 ml de formaldehído (F 1268). Seguidamente, en forma individual se disolvió cada fungicida en los 750 ml de agar líquido en la licuadora, cuando

este se encontraba a aproximadamente 50° C, obteniéndose así la concentración correspondiente en partes por millón para cada uno de los fungicidas. Después de que estuvieron todos los ingredientes en movimiento, se dejaron mezclar por 1 minuto, sin sobrepasar los 2 minutos. Las dietas se trasladaron luego a frascos para salsa pequeños, para luego depositarlos en las placas multipozo respectivas. Las placas multipozo mencionadas son de la marca Evergreen Scientific® estériles y tienen 12,7 cm de largo, 8,5 cm de ancho y 2 cm de alto aproximadamente; además tienen 24 pozos con un diámetro de 1,7 cm y una profundidad de 1,8 cm para un volumen de 2 ml por pozo aproximadamente.

Las brocas utilizadas para inocular las dietas, tanto las provenientes de café pergamino como las provenientes de granos de campo, se lavaron siguiendo este procedimiento: las brocas primero se introducen en una bolsita de tela y se someten a un lavado en una solución con cloruro de benzalconio al 7,5% por un minuto, luego se lavaban con agua esterilizada, después se someten a otro minuto de lavado en el cloruro de benzalconio y se lavaban otra vez en el agua esterilizada. Posteriormente se someten a unos 20 segundos de lavado en una solución de Benlate 50 WP (1g/L) y después se colocan a secar en un ventilador (sin volver a lavar con agua).

Se colocaron de 4 a 5 brocas hembra lavadas (identificadas por su tamaño mayor) por pozo. Las placas se recubrieron con plástico adhesivo sobre toda la placa y se perforaron aproximadamente 3 huequitos por pozo con una aguja de disección. Las placas fueron almacenadas a 25° C y 85% HR, sin luz y fueron chequeadas cada siete días hasta cumplir 28 días. Los chequeos a los 7, 14 y 21 días se hicieron contando el número y tipo de contaminación, y la sobrevivencia presente en los pozos. Las comparaciones entre los tratamientos se hicieron por medio de una prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 5%. Sin embargo, en estas tres primeras mediciones, para el conteo de la cantidad de huevos, larvas, pupas, adultos (F1) y cantidad de brocas vivas (de

las que fueron inoculadas), se tomaron en cuenta sólo los individuos que se encontraban en la superficie de la dieta, debido a que era imposible saber con certeza la cantidad y condición de los individuos que se encontraban dentro de los agujeros barrenados. En la medición del día 28, se procedió a escoger aleatoriamente 4 pozos (sin contaminación) de cada una de las 6 placas multipozos, de cada tratamiento. A los pozos seleccionados se les extrajo la dieta, la cual fue desmenuzada y observada al estereoscopio. De esta manera, se determinó la cantidad exacta y tipo de individuos presentes en cada uno de los pozos examinados. Así, se pudo determinar un porcentaje más exacto de la cantidad y tipo de individuos presentes en cada tratamiento, mediante una extrapolación de los resultados obtenidos, tomando en cuenta sólo los pozos no contaminados de cada uno.

#### **4.4 Prueba con Tween 20<sup>®</sup>**

Se evaluó el efecto de la adición del surfactante Tween 20<sup>®</sup>, en el proceso de lavado de las brocas. Para este efecto, se preparó dos diluciones de Butrol 31,5 EC a una concentración de 100 ppm. A una solución se le agregó 2 gotas por litro de Tween 20<sup>®</sup> y la otra no. Seguidamente, se tomaron 40 brocas de granos de campo, de las cuales 20 fueron sometidas a 1 minuto de lavado en la solución de Butrol 31,5 EC con Tween 20<sup>®</sup> y las otras a 1 minuto en la que no tenía Tween 20<sup>®</sup>. El lavado se hace introduciendo a las brocas en una bolsita de tela fina, y sumergiendo esta en la dilución. Una vez lavadas, las brocas de cada tratamiento fueron secadas con ventilador y colocadas en sendas cajas de Petri con papel filtro y se dejaron a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente). Después de 24 horas, se observó y contabilizó la sobrevivencia de las mismas al proceso de desinfección.

#### 4.5 Prueba de desinfección de las brocas con diferentes fungicidas

Para evaluar el efecto de la desinfección de la broca con diferentes fungicidas, se siguió el procedimiento que se menciona en la prueba con fungicidas en la dieta artificial. Salvo que se preparó 9 placas multipozo sin incluir el fungicida en el paso final de la mezcla de los ingredientes. Posteriormente, se preparó una dilución a una concentración de 100 ppm de Daconil 82,5 WG al 82,5% (Clorotalonil); Benlate 50 WP y Butrol 31,5 EC para el lavado de las brocas, estableciendo tres tratamientos. Seguidamente, se procedió a recolectar brocas provenientes de granos de campo para formar 3 grupos de aproximadamente 400 brocas cada uno. En una cámara de flujo laminar, se procedió a someter a los grupos de brocas a un lavado de 30 segundos en cada uno de los diferentes tratamientos (un grupo por tratamiento) y se dejaron secar. Se inocularon 3 placas multipozo con 4 a 5 brocas procedentes de cada uno de los tratamientos (Tabla 4.2). Por último, se observó la sobrevivencia de las brocas y contaminación en los pozos cada 7 días hasta el día 28.

**Tabla 4.2.** Distribución de las dosis y tratamientos para las pruebas de desinfección de la broca

Grupo	Tratamiento				Repeticiones *
	Fungicida	Tipo de Broca	Dosis (ppm)	Tiempo de lavado (s)	
1	Butrol 31,5 EC	Campo	100	30	3
2	Benlate 50 WP	Campo	100	30	3
3	Daconil 82,5 WG	Campo	100	30	3

\* Cada repetición consta de una bandeja multipozo con 24 pozos cada una.

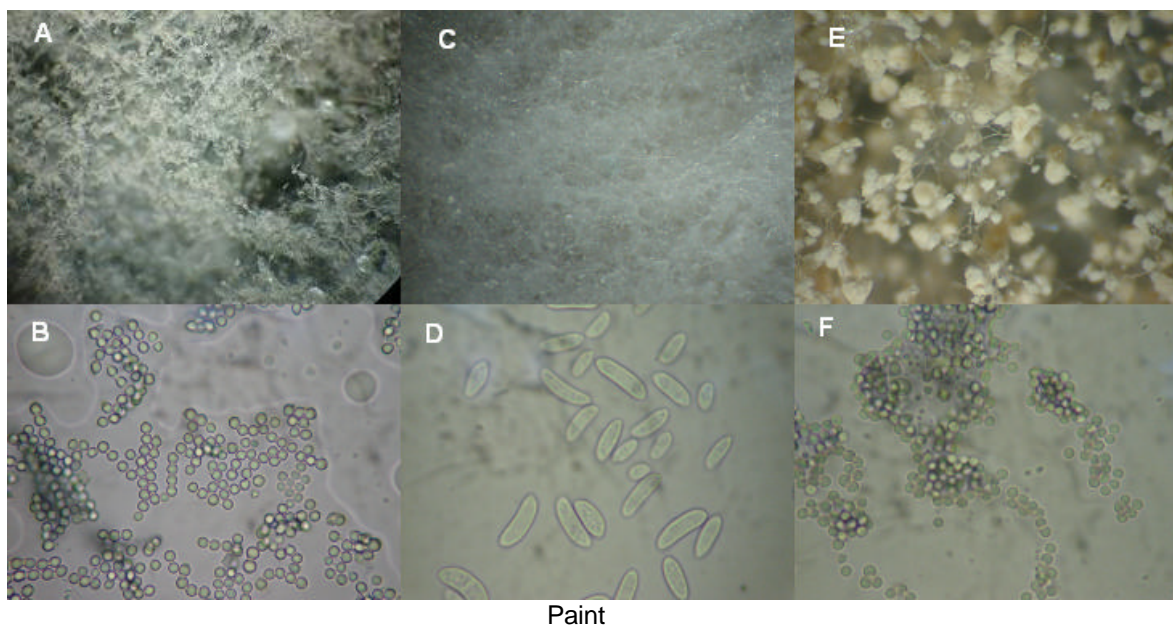
## Capítulo 5

### RESULTADOS

---

#### 5.1 Identificación de los hongos

Después realizar tanto la observación macro como microscópica de los hongos analizados, se logró determinar que los hongos contaminantes presentes las dietas artificiales eran: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y *Fusarium* sp. A nivel macro, *Penicillium* sp, presentó una colonia verde-grisácea de forma micelial, con superficie rugosa, una elevación ligeramente convexa, borde enrulado y una estructura interna filamentosa; por otro lado, *Fusarium* sp., presentó una colonia blanca-crema de forma micelial, con superficie rugosa, una elevación difusa, borde filamentoso y una estructura interna filamentosa; por último, *Aspergillus* sp., presentó una colonia amarilla con forma micelial, una superficie rugosa, con elevación difusa, un borde y estructura interna filamentosa (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Hongos aislados de la dieta artificial. A: Micelio de *Penicillium* sp. B: Esporas de *Penicillium* sp. 100x. C: Micelio de *Fusarium* sp. D: Macroconidios de *Fusarium* sp. 100x. E: Micelio de *Aspergillus* sp. F: Esporas de *Aspergillus* sp. 100x.

## 5.2 Pruebas de sensibilidad con diferentes fungicidas en medio PDA

Una vez realizadas las pruebas en medio PDA con los diferentes tratamientos, se promediaron los diámetros medidos de las tres repeticiones de cada tratamiento obteniendo los resultados que se resumen en el tabla 5.1.

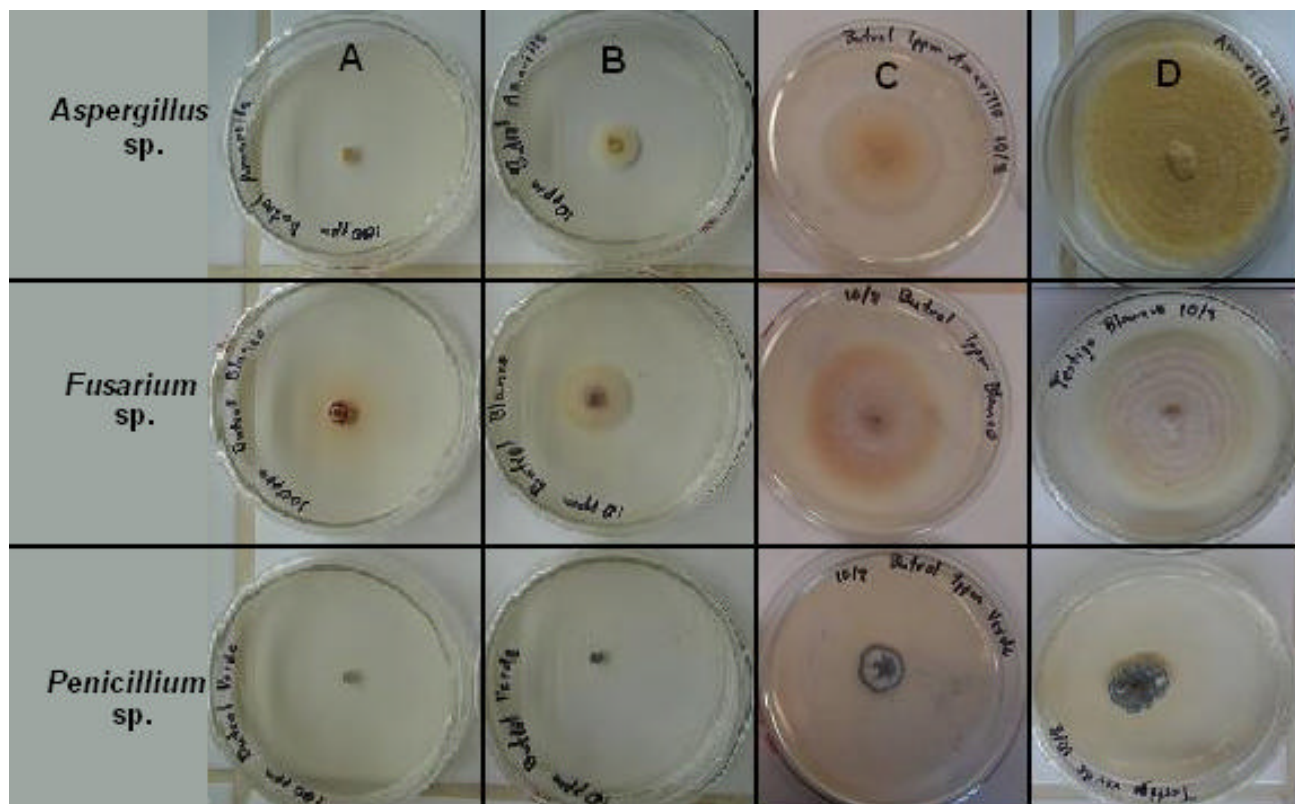
**Tabla 5.1.** Diámetros (promediados) obtenidos de las colonias en las pruebas preliminares con diferentes fungicidas en medio PDA

Tratamiento	Dosis (ppm)	Diámetro de cada hongo (mm)*		
		<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Butrol 31,5 EC	100	9,00	5,00	6,00
	10	25,67	5,00	19,00
	1	59,67	16,00	51,67
Busan 100	100	51,67	14,00	24,67
	10	59,33	15,33	45,00
	1	61,00	16,67	59,00
Fytosan 80 WP	100	38,00	14,00	49,67
	10	42,00	14,67	56,33
	1	65,33	15,33	59,67
Serinale 500 50 SC	100	48,67	12,00	21,00
	10	60,00	15,67	37,67
	1	65,00	16,00	59,00
Clortosip 50 SC	100	29,00	11,00	38,33
	10	32,33	13,00	42,33
	1	58,33	17,67	53,67
Benlate 50 WP	100	55,33	15,67	27,67
	10	55,67	16,67	44,00
	1	59,00	17,67	54,00
Testigos	0	65,67	19,00	63,67
	0	65,00	17,00	63,67

\* Los datos que se observan en esta tabla de cada tratamiento son promediados a partir de las tres repeticiones de cada uno de ellos. Los datos sin promediar se pueden observar en el anexo 1.

Se puede observar en el tabla 5.1 que el tratamiento con Butrol 31,5 EC a una concentración de 100 ppm se observaron los diámetros de colonia y crecimientos diametrales más pequeños en los tres hongos evaluados, si se compara con el testigo respectivo (Figura 5.2). A esa misma concentración y para el caso de *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.* observamos que los diámetros de colonia seguían siendo pequeños cuando se utilizó el Clortosip 50 SC, mientras que para *Aspergillus sp.* resultó ser el Serinale 500 50 SC; sin embargo, a una

concentración de 1 ppm, los diámetros observados para todos los tratamientos fueron prácticamente iguales a los de los testigos respectivos.



Paint

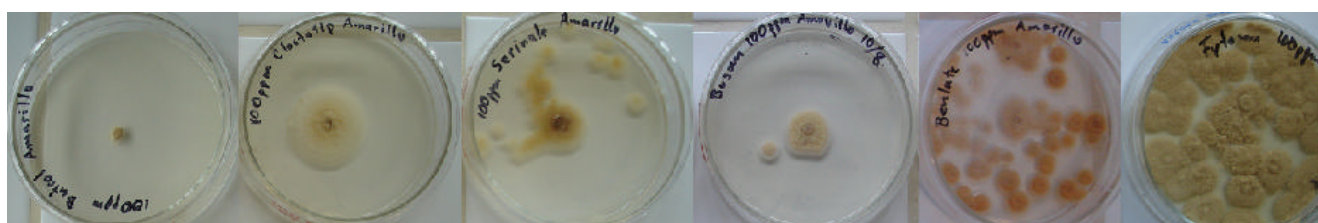
**Figura 5.2.** Efecto de diferentes dosis de Butrol 31,5 EC (A: 100 ppm., B: 10 ppm, C: 1 ppm. y D: 0 ppm) en el crecimiento de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. (de arriba hacia abajo respectivamente).

Los EC<sub>50</sub> y EC<sub>90</sub> de todos los tratamientos se resumen en el tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Resultados de EC<sub>50</sub> y EC<sub>90</sub> de las pruebas con diferentes fungicidas en medio PDA

Fungicida	Hongo	EC50 (ppm)	EC90 (ppm)	R <sup>2</sup>
Butrol 31.5 EC	<i>Fusarium</i> sp.	19,67	63,94	0,86
	<i>Penicillium</i> sp.	18,78	79,75	0,75
	<i>Aspergillus</i> sp.	10,43	58,47	0,87
Busan 100	<i>Fusarium</i> sp.	4590,59	48463,53	0,94
	<i>Penicillium</i> sp.	2445,63	28725,46	0,98
	<i>Aspergillus</i> sp.	50,92	182,23	0,97
Fytosan 80 WP	<i>Fusarium</i> sp.	61,70	127,39	0,78
	<i>Penicillium</i> sp.	931059,26	740971055,73	1,00
	<i>Aspergillus</i> sp.	2102,25	18246,76	1,00
Serinale 500 50 SC	<i>Fusarium</i> sp.	62,39	124,63	0,94
	<i>Penicillium</i> sp.	948,95	11145,99	0,85
	<i>Aspergillus</i> sp.	35,58	120,92	0,91
Clortosip 50 SC	<i>Fusarium</i> sp.	37,72	195,16	0,80
	<i>Penicillium</i> sp.	80,43	195,68	0,83
	<i>Aspergillus</i> sp.	191,34	3522,02	0,88
Benlate 50 WP	<i>Fusarium</i> sp.	7904658,43	2959338550,47	0,80
	<i>Penicillium</i> sp.	1145,70	4211,70	0,96
	<i>Aspergillus</i> sp.	61,13	479,03	1,00

Se puede observar que el fungicida que produjo los EC<sub>90</sub> más bajos fue el Butrol 31,5 EC en los tres hongos. Con el Clortosip 50 SC también se obtuvieron EC<sub>90</sub> bajos para el caso de *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., no obstante, en el caso de *Aspergillus* sp. EC<sub>90</sub> fue bastante alto. Así mismo, se pudo observar que en los tratamientos con Butrol 31,5 EC y Clortosip 50 SC, el crecimiento fue puramente miceliar, sin puntos de crecimiento alrededor de la colonia central. Por el contrario en los tratamientos con los otros fungicidas, se pudo observar en varias ocasiones, varias colonias en una misma placa (Figura 5.3).



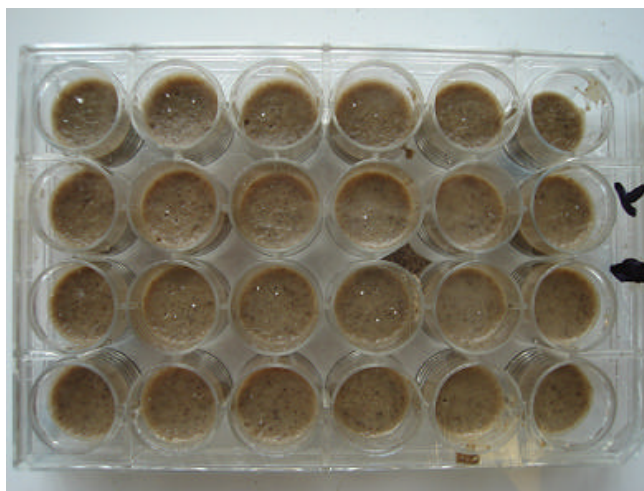
**Figura 5.3.** Crecimiento de *Aspergillus* sp en medios con dosis de 100 ppm de diferentes fungicidas. De izquierda a derecha: Butrol 31,5 EC, Clortosip 50 SC, Serinale 500 50 SC, Busan 100, Benlate 50 WP y Fytosan 80 WP.



### 5.3 Pruebas con fungicida en la dieta artificial para la broca del café

Después de 28 días, se realizaron las observaciones a las dietas a simple vista y con estereoscopio. En lo que respecta a la contaminación, los porcentajes de contaminación presentados en las tablas 5.3 y 5.4, se obtuvieron comparando el número de pozos con y sin contaminación de las seis repeticiones de cada tratamiento, para luego promediar los valores obtenidos en las repeticiones de cada tratamiento.

Primeramente, es importante recalcar que todos los testigos de los diferentes tratamientos se mantuvieron libres de contaminación (Figura 5.4).



Paint

**Figura 5.4.** Placa multipozo con dieta artificial. Testigo para el tratamiento de Butrol 31,5 EC a 75 ppm.

Se pudo observar que los tratamientos donde se obtuvo el menor porcentaje de contaminación fue con el Butrol 31,5 EC a 112,5 ppm tanto con las brocas procedentes de café pergamino como con las procedentes de campo (tablas 5.3 y 5.4).

**Tabla 5.3.** Porcentajes de contaminación en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con broca procedente de café pergamino.

Tratamiento			7 días	14 días	21 días	28 días
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	% Contaminación	% Contaminación	% Contaminación	% Contaminación
Butrol 31,5 EC	Pergamino	37,5	1,39 b	16,67b	34,03b	34,03b
		75	0,00 c	10,42c	29,86c	29,86c
		112,5	0,00 c	9,03d	22,92e	22,92e
Benlate 50 WP	Pergamino	750	41,67 a	54,17a	70,14a	70,14a
Daconil 82,5 WG	Pergamino	412,5	0 c	9,03d	27,08d	27,08d

\*Medias con letras diferentes en cada columna indican que existe diferencia significativa (DMS 5%).

**Tabla 5.4.** Porcentajes de contaminación en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con broca procedente de granos del campo.

Tratamiento			7 días	14 días	21 días	28 días
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	% Contaminación	% Contaminación	% Contaminación	% Contaminación
Butrol 31,5 EC	Campo	37,5	6,25b	43,75a	56,94b	56,94b
		75	2,08c	31,94c	46,53c	46,53c
		112,5	0,00e	25,69e	41,67e	41,67e
Benlate 50 WP	Campo	750	23,61a	40,97b	59,72a	59,72a
Daconil 82,5 WG	Campo	412,5	1,39d	31,25d	44,44d	44,44d

\*Medias con letras diferentes en cada columna indican que existe diferencia significativa (DMS 5%).

Además de determinar los porcentajes de contaminación, también se analizó el tipo de contaminación presente, a través de la de frecuencia de cada uno de los hongos presentes en las dietas.

En el caso de los tratamientos con brocas provenientes de café pergamino, con el Butrol 31,5 EC, podemos observar que el hongo presente más frecuentemente como contaminante correspondió a *Aspergillus* sp., en el caso del Benlate fue en su mayoría causada por el hongo *Penicillium* sp. y con el Daconil también la mayor parte de la contaminación fue causada por *Aspergillus* sp. (ver tabla 5.5 y figura 5.5).

**Tabla 5.5.** Porcentajes de contaminación causados por diferentes hongos en la dieta artificial de la broca con diferentes fungicidas después de 28 días con brocas procedentes de café pergamino.

Tratamiento			Tipo de Hongo (%)		
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
Butrol 31,5 EC	Pergamino	37,5	53,00	16,00	31,00
		75	51,00	19,00	30,00
		112,5	58,00	9,00	33,00
Benlate 50 WP	Pergamino	750	20,00	0,00	80,00
Daconil 82,5 WG	Pergamino	412,5	74,00	10,00	16,00

Para los tratamientos con brocas provenientes de granos de campo, con el Butrol 31,5 EC, podemos observar que el hongo presente más frecuentemente como contaminante correspondió a *Fusarium sp.*, en el caso del Benlate fue en su mayoría causada tanto por el hongo *Penicillium sp.* como por *Aspergillus sp.* y con el Daconil también la mayor parte de la contaminación fue causada por *Fusarium sp.* (ver tabla 5.6 y figura 5.5).

**Tabla 5.6.** Porcentajes de contaminación causados por diferentes hongos en la dieta artificial de la broca con diferentes fungicidas después de 28 días con brocas procedentes de granos del campo.

Tratamiento			Tipo de Hongo (%)		
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
Butrol 31,5 EC	Campo	37,5	43,00	44,00	13,00
		75	37,00	58,00	5,00
		112,5	35,00	60,00	5,00
Benlate 50 WP	Campo	750	36,00	28,00	36,00
Daconil 82,5 WG	Campo	412,5	45,00	55,00	0,00

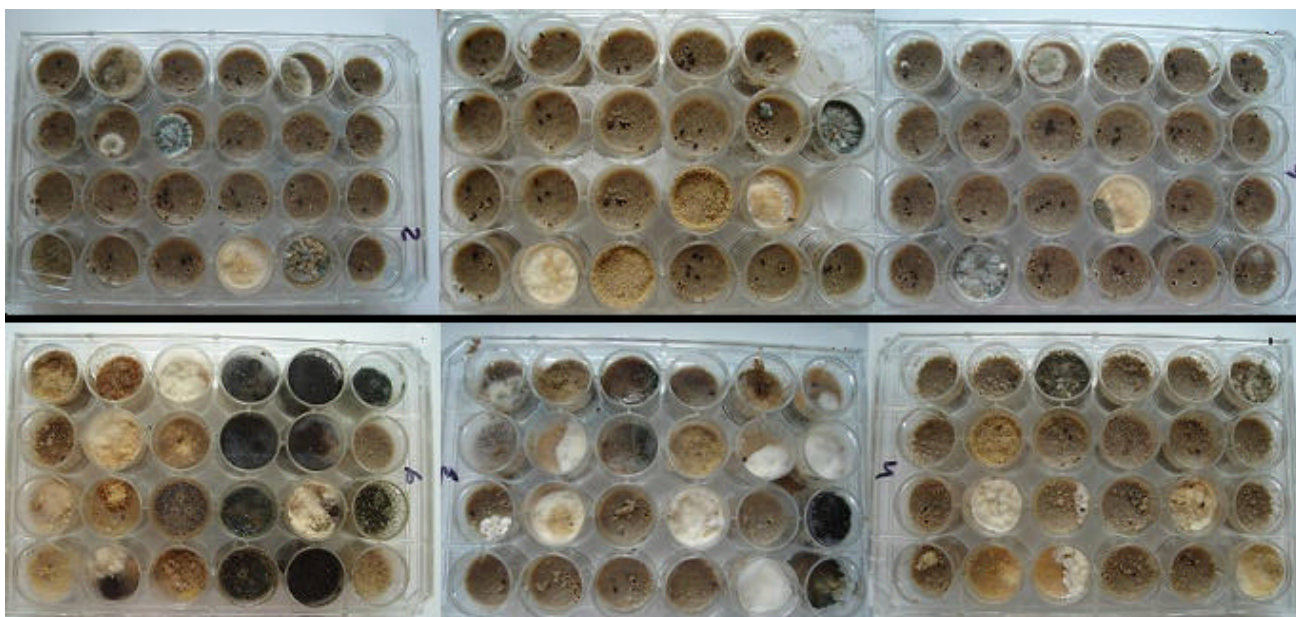
Un dato interesante fue el hecho de que, en varios pozos de las dietas inoculadas con brocas provenientes de granos de campo, se pudo observar no sólo el crecimiento de hongos, sino también de bacterias en conjunto con el hongo. Esto sucedió en menos del 4,17% de los pozos contaminados. Sin embargo, en el caso de las dietas inoculadas con brocas provenientes de café

pergamino, no se observó ningún tipo de crecimiento de bacterias (ver tabla 5.7).

**Tabla 5.7.** Porcentajes de contaminación con bacteria en la dieta artificial de la broca con diferentes fungicidas después de 28 días.

Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	% de contaminación con hongo+bacteria
Butrol 31,5 EC	Pergamino	37,5	0,00
		75	0,00
		112,5	0,00
	Campo	37,5	4,17
		75	4,17
		112,5	1,39
Benlate 50 WP	Pergamino	750	0,00
	Campo	750	1,39
Daconil 82,5 WG	Pergamino	412,5	0,00
	Campo	412,5	0,69

Además se pudo observar la tendencia de que los tratamientos con brocas provenientes de café pergamino, tienen una incidencia de contaminación por el hongo *Penicillium* sp. de más del doble, si se comparan con sus tratamientos homólogos pero con broca de campo. Por otro lado, se observó que los tratamientos con brocas provenientes del campo, tienen una incidencia de contaminación por el hongo *Fusarium* sp. de aproximadamente más del triple, si se comparan con sus tratamientos homólogos pero con broca proveniente de café pergamino. En el caso del hongo *Aspergillus* sp., su incidencia es mayor en los tratamientos con los fungicidas Butrol 31,5 EC y Daconil 82,5 WG y broca proveniente de café pergamino, si se comparan con sus tratamientos homólogos pero con broca de campo. Sin embargo en el caso del Benlate, la incidencia de *Aspergillus* sp. es mayor en el tratamiento con brocas de campo, que en su tratamiento homólogo con brocas provenientes de café pergamino (ver tablas 5.5 y 5.6 y figura 5.5).



Paint

**Figura 5.5.** Dietas artificiales de la broca del café. Arriba y de izquierda a derecha: Brocas de pergamino con Butrol a 37.5, 75 y 112.5 ppm. Abajo y de izquierda a derecha: brocas de Campo con Butrol a 37.5, 75 y 112.5 ppm.

En lo que respecta a la sobrevivencia de las brocas inoculadas procedentes de café pergamino, se observó que a los 14 días ésta fue similar para el caso de las tres dosis de Butrol 31,5 EC y la dosis de Daconil 82,5 WG. En el caso del Benlate 50 WP, la sobrevivencia fue aproximadamente cinco veces inferior. A los 21 días, el Butrol 31,5 EC demostró ser el tratamiento donde se observó mayor sobrevivencia de las brocas inoculadas, especialmente en la dosis menor (37,5 ppm) mientras que en el caso del Daconil 82,5 WG y Benlate 50 WP la sobrevivencia fue muy baja (1,56%). A los 28 días después de la inoculación de las brocas, en todos los tratamientos se observó un 100% de mortalidad (tabla 5.8).

**Tabla 5.8.** Porcentajes de sobrevivencia en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con brocas procedentes de café pergamino.

Tratamiento			Sobrevivencia (%)		
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	14 días	21 días	28 días
Butrol 31,5 EC	Pergamino	37,5	27,26c	17,71a	0
		75	27,56b	16,15b	0
		112,5	27,77e	5,56c	0
Benlate 50 WP	Pergamino	750	5,85a	1,56e	0
Daconil 82,5 WG	Pergamino	412,5	25,46d	4,86d	0

\*Medias con letras diferentes en cada columna indican que existe diferencia significativa (DMS 5%).

Por otro lado, en las brocas procedentes de granos de campo, se observó que a los 14 días la mayor sobrevivencia se obtuvo en el caso de Butrol 31,5 EC a una concentración de 112,5 ppm. En el caso del Benlate 50 WP, la sobrevivencia fue bastante inferior de nuevo, aproximadamente un 50% menos si se compara con los demás tratamientos. A los 21 días, el Butrol 31,5 EC demostró ser el tratamiento donde se observó mayor sobrevivencia de las brocas inoculadas, especialmente en las dosis de 75 y 112,5 ppm, mientras que en el caso del Daconil 82,5 WG se obtuvo una sobrevivencia ligeramente inferior (aproximadamente 1% menos). Con el Benlate la sobrevivencia fue aproximadamente un 50% menor si se compara con los otros tratamientos. A los 28 días después de la inoculación de las brocas, se pudo observar que el tratamiento de Butrol 31,5 EC a 112,5 ppm fue en el que se obtuvo el porcentaje de sobrevivencia más alto y con el Benlate 50 WP el más bajo (Tabla 5.9).

**Tabla 5.9.** Porcentajes de sobrevivencia en la dieta artificial de la broca en las pruebas con diferentes fungicidas con brocas procedentes de granos de campo.

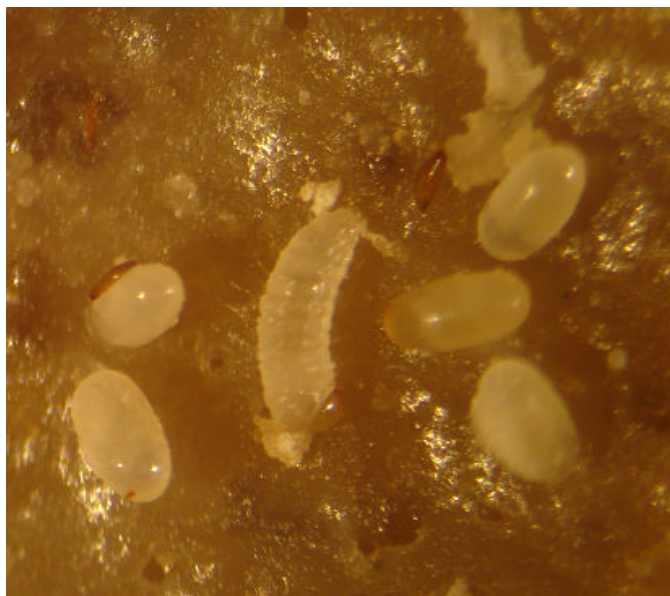
Tratamiento			Sobrevivencia (%)		
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	14 días	21 días	28 días
Butrol 31,5 EC	Campo	37,5	36,31d	5,03e	7,29e
		75	40,18c	14,93a	31,25b
		112,5	55,2a	13,02b	44,79a
Benlate 50 WP	Campo	750	17,43e	7,29d	16,67d
Daconil 82,5 WG	Campo	412,5	43,75b	11,98c	18,75c

\*Medias con letras diferentes en cada columna indican que existe diferencia significativa (DMS 5%).

En lo que concierne a la cantidad de individuos obtenidos, en el caso de las dietas inoculadas con brocas procedentes de café pergamino el tratamiento que dio mejores resultados fue el Butrol 31,5 EC, ya que en el caso del Benlate 50 WP y Daconil 82,5 WG no se observó la presencia de ninguna descendencia, ya fueran huevos, larvas pupas o adultos. Sin embargo, aún en el caso del Butrol 31,5 EC, la cantidad de individuos fue muy baja (Tabla 5.10 y figura 5.6).

**Tabla 5.10.** Cantidad de individuos obtenidos con diferentes fungicidas en la dieta artificial de la broca a después de 28 días con brocas procedentes de café pergamino.

Tratamiento			Celdas sin hongo	Individuos en 24 pozos sin contaminación				Extrapolación según # de pozos sin contaminación			
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)		Huevos	Larvas	Pupas	Adultos	Huevos	Larvas	Pupas	Adultos (F1)
Butrol 31,5 EC	Pergamino	37,5	95	1	2	0	0	4	8	0	0
		75	101	6	1	0	0	25	4	0	0
		112,5	111	0	10	0	0	0	46	0	0
Benlate 50 WP	Pergamino	750	43	0	0	0	0	0	0	0	
Daconil 82,5 WG	Pergamino	412,5	105	0	0	0	0	0	0	0	



Paint

**Figura 5.6.** Huevos y larva de *H. hampei* sobre la dieta artificial del tratamiento con Butrol 31,5 EC a una concentración de 75 ppm e inoculada con brocas procedentes de café pergamino.

Con las dietas inoculadas con brocas procedentes de granos de campo el tratamiento en el que se observó una mayor descendencia, fue con el Butrol 31,5 EC, especialmente con la concentración de 112,5 ppm (Figura 5.7). En el tratamiento con Daconil 82,5 WG, la descendencia obtenida fue muy poca; sólo se observaron larvas y en muy pequeña cantidad (Tabla 5.11), no obstante, un hecho interesante fue que solo en el tratamiento con Benlate 50 WP fue posible observar pupas (Figura 5.8). En ninguno de los tratamientos se pudieron observar adultos F1 a la fecha de la última medición.





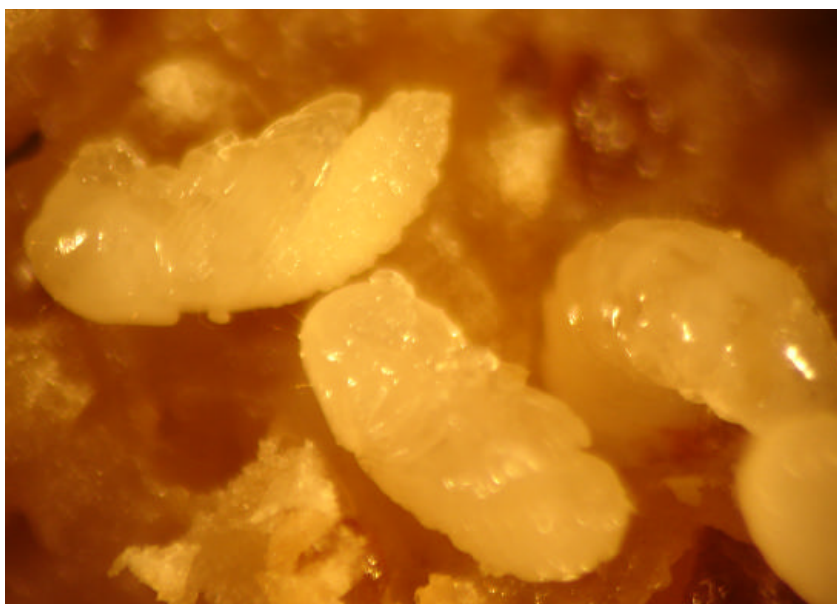
Paint

**Figura 5.7.** Huevos y larva de *H. hampei* en la dieta artificial del tratamiento con Butrol 31,5 EC a una concentración de 112,5 ppm e inoculada con brocas procedentes de campo.

**Tabla 5.11.** Cantidad de individuos obtenidos con diferentes fungicidas en la dieta artificial de la broca a después de 28 días con brocas procedentes de granos de campo.

Tratamiento			Celdas sin hongo	Individuos en 24 pozos sin contaminación				Extrapolación según # de pozos sin contaminación			
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)		Huevos	Larvas	Pupas	Adultos	Huevos	Larvas	Pupas	Adultos (F1)
Butrol 31,5 EC	Campo	37,5	69	19	137	0	0	55	394	0	0
		75	77	86	85	0	0	276	273	0	0
		112,5	84	139	168	0	0	487	588	0	0
Benlate 50 WP	Campo	750	58	53	92	22	0	128	222	53	0
Daconil 82,5 WG	Campo	412,5	80	0	2	0	0	0	7	0	0

Si se comparan los resultados obtenidos con las brocas procedentes de granos de campo con los obtenidos con las brocas procedentes de café pergamino, se observa claramente que los tratamientos con brocas procedentes de granos de campo producen una cantidad mucho mayor de individuos.



Paint

**Figura 5.8.** Pupas de *H. hampei* sobre la dieta artificial del tratamiento con Benlate 50 WP a una concentración de 750 ppm e inoculada con brocas procedentes de campo.

#### 5.4 Prueba con Tween® 20

En este ensayo, se pudo observar que la adición de Tween® 20 (2 gotas por litro) a la solución de lavado para las brocas con el fungicida Butrol 31,5 EC (100 ppm), disminuyó la sobrevivencia de las brocas al proceso de lavado (Tabla 5.12).

**Tabla 5.12.** Porcentajes de sobrevivencia de brocas de procedentes de granos de campo al lavado con dos soluciones diferentes de lavado.

Tratamiento		24 horas		
Tipo solución de lavado	Tiempo (min.)	Brocas Vivas	Brocas muertas	% Sobrevivencia
Butrol 31,5 EC+Tween®	1	10	10	50
Butrol 31,5 EC sin Tween®	1	19	1	95

## 5.5 Prueba de desinfección de las brocas con diferentes fungicidas

Después de probar diferentes fungicidas en la desinfección de las brocas provenientes de campo, se obtuvieron los siguientes porcentajes de contaminación en las dietas inoculadas con estas brocas:

**Tabla 5.13.** Porcentajes de contaminación en la dieta artificial de las pruebas con diferentes fungicidas en la desinfección de las brocas después de 28 días, con brocas procedentes de granos de campo.

Tratamiento			7 días	14 días	21 días	28 días
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	% Contaminación	% Contaminación	% Contaminación	% Contaminación
Benlate 50 WP	Campo	100	72,22	91,67	98,61	100
Daconil 82,5 WG	Campo	100	45,83	75	84,72	100
Butrol 31,5 EC	Campo	100	22,22	44,44	70,83	100

Se puede observar en el tabla 5.13 que el porcentaje de contaminación más bajo se obtuvo con las brocas que fueron lavadas con la solución de Butrol 31,5 EC, seguido por el Daconil 82,5 WG y por último el Benlate 50 WP. A pesar de que el Butrol 31,5 EC produjo un porcentaje de contaminación relativamente bajo (22.22 %) a los 7 días después de la inoculación, al final del período de 28 días se presentó un 100% de contaminación en todos los tratamientos.

En lo que concierne a los porcentajes de sobrevivencia observados, el porcentaje de sobrevivencia más alto se obtuvo con las brocas que fueron lavadas con la solución de Butrol 31,5 EC, seguido por las que se lavaron con Daconil 82,5 WG y por último las que se lavaron con Benlate 50 WP. Los porcentajes más altos de sobrevivencia se presentaron a los siete días después de la inoculación. Después de 28 días, todas las brocas de los diferentes tratamientos murieron (Tabla 5.14).

**Tabla 5.14.** Porcentajes de sobrevivencia de las pruebas con diferentes fungicidas en la desinfección de las brocas después de 28 días con brocas procedentes de granos de campo.

Tratamiento			14 días	21 días	28 días
Fungicida	Tipo Broca	Dosis (ppm)	% Sobrevivencia	% Sobrevivencia	% Sobrevivencia
Benlate 50 WP	Campo	100	1,04	0	0
Daconil 82,5 WG	Campo	100	7,29	2,43	0
Butrol 31,5 EC	Campo	100	26,74	6,94	0

## Capítulo 6

### DISCUSION DE RESULTADOS

---

#### 6.1 Identificación de los hongos

Tanto las características macroscópicas como microscópicas de las estructuras de los hongos pueden dar una idea clara para su identificación, sin embargo, son las esporas las que permiten una mejor identificación de un hongo, ya que las estructuras miceliares con frecuencia no permiten diferenciar con exactitud a un género de otro\*.

La mayoría de las 6000 especies de Scolytinae están involucradas en una relación mutualista con hongos, los cuales cultivan y utilizan como fuente de alimento. Como regla general, los escarabajos de ambrosia, que incluyen al género *Hypothenemus*, viven en relaciones mutualistas con hongos (Pérez *et al*, 2003). Por eso, por muchos años los investigadores han sospechado que hay hongos asociados con la broca del café. Pérez y colaboradores (2003) lograron aislar cultivos de hongos a partir de la cutícula, intestinos y heces de la broca del café, en donde *Fusarium*, *Penicillium*, *Candida* y *Aspergillus* fueron los géneros dominantes. Estos resultados concuerdan con los hongos identificados a partir de las dietas contaminadas del laboratorio del CICAPE, ya que los hongos que representan el mayor porcentaje de contaminación en dichas dietas son precisamente *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., y *Aspergillus* sp., no obstante, en este estudio no fue posible la identificación de *Candida* como uno de los géneros dominantes, de hecho, ni siquiera se pudo observar su presencia en los análisis realizados; aún así, queda demostrado que los hongos que han manifestado estar mayoritariamente asociados a la broca en otras investigaciones, están presentes también en el caso de las brocas utilizadas por el CICAPE.

## 6.2 Pruebas de sensibilidad con diferentes fungicidas en medio PDA

Los fungicidas utilizados en esta parte del ensayo, fueron escogidos debido a que son considerados de amplio espectro. En general, el comportamiento de los hongos hacia la exposición a los diferentes fungicidas fue de manera similar, a más alta la concentración del fungicida, menores fueron los crecimientos diametrales de los hongos, es decir, mayor fue la inhibición de su crecimiento. Por el contrario, conforme bajó la concentración del fungicida, menor fue su efecto inhibitorio sobre el hongo, por lo que éste pudo crecer en mayor proporción, produciendo colonias de mayor diámetro. Es decir, a concentraciones de 100 ppm, donde hubo una mayor presencia del ingrediente activo de los fungicidas, el hongo se vio más afectado en su desarrollo que a concentraciones de 10 ppm y en menor proporción a 1 ppm, donde el ingrediente activo del mismo no se encontró en una cantidad suficiente para interferir en el desarrollo del hongo, permitiéndole crecer.

El Butrol 31,5 EC fue el fungicida que logró inhibir de mejor manera el crecimiento de los tres hongos probados, ya que fue en el tratamiento en el que se obtuvo los crecimientos diametrales más pequeños, si se comparan con el diámetro de la colonia de su testigo respectivo. Se observó además que el efecto inhibitorio del fungicida en el crecimiento del hongo tuvo una respuesta homogénea con los tres hongos evaluados. También, al comparar los resultados obtenidos con el Butrol 31,5 EC y los demás fungicidas probados, se pudo observar que el crecimiento que lograron los hongos al ser expuestos a este fungicida fue reducido, mientras que con los otros fungicidas los hongos si lograron desarrollarse en mayor medida. Esto hace pensar que el ingrediente activo del Butrol 31,5 EC, TCMTB, es el compuesto que más fácilmente inhibe el crecimiento de los hongos probados, que constituyen los contaminantes mayoritarios de la dieta artificial.

---

\* VILLALBA, V. 2006. Identificación de hongos. TEC. (Comunicación personal)

Si comparamos los modos de acción de los fungicidas utilizados, en el caso del Butrol 31,5 EC, su ingrediente activo, el TCMTB lo que hace es inhibir la respiración mitocondrial, ya que bloquea la cadena respiratoria en un sitio similar al de la rotenona (Avivar *et al.*, 2003). El ingrediente activo del Benlate 50 WP, Benomil, lo que hace es que penetra en las células fúngicas uniéndose a la subunidad beta de los dímeros de tubulina (componente de la estructura celular), debido a esta unión se produce el cese de la división celular, la desorganización de la estructura fina de las células fúngicas y la pérdida de la integridad celular del patógeno (Viarural, 2006). Por otro lado, el cobre presente el sulfato de cobre, que es el ingrediente activo del Fytosan 80 WP, lo que hace es que interfiere en los procesos reproductivos, enzimáticos e inhibe los procesos reproductivos de los hongos y bacterias patógenas (Riveros, 2005). En el caso del Serinale 500 50 SC, su ingrediente activo, el carbendazim, lo que hace es que el producto se adhiere fuertemente a la tubulina en los hongos sensibles, afectando a los microtúbulos durante el proceso de la mitosis, lo que causa la detención del crecimiento micelial y división celular (DuPont, 2006). El clortalonil del Clortosip 50 SC es un reactivo de grupos sulfhidrilo, por lo que interacciona con numerosas enzimas y proteínas, inhibiéndolas (Avivar *et al.*, 2003). Por último, el cuaternario de amonio del Busan 100 lo que hace es que se une de una forma irreversible a los fosfolípidos y proteínas de la membrana, dañando su permeabilidad (Rueda, Amigot y Ducha, 2003).

El Butrol 31,5 EC es un fungicida de amplio espectro y con cierta acción fungistática, efectivo para prevenir y controlar los principales hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo (Edifarm, 2006). En este caso, este fungicida demostró ser también muy efectivo para inhibir el crecimiento de los tres hongos en el medio PDA, demostrando porque es considerado de amplio espectro. Al parecer el modo de acción del TCMTB, que inhibe la respiración

mitocondrial, es más eficiente para controlar el crecimiento de los hongos probados, que los modos de acción de los demás hongos.

Si se comparan los resultados obtenidos con las concentraciones más altas (100 ppm) de los diferentes fungicidas, se podría colocar en un segundo lugar de efectividad al Clortosip 50 SC, en el caso de las pruebas con los hongos *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. Este fungicida es del tipo protectante que inhibe el proceso de germinación y desarrollo de los hongos (Edifarm, 2006). Para el caso del hongo *Aspergillus* sp., en segundo lugar de efectividad se coloca el Serinale 500 50 SC, el cual es un fungicida sistémico de acción preventiva y curativa (Edifarm, 2006). Los fungicidas anteriormente mencionados, probaron ser efectivos a una concentración de 100 ppm y parcialmente efectivos a una concentración de 10 ppm. Sin embargo, a una concentración de 1 ppm, ninguno fue efectivo en inhibir el crecimiento de los hongos.

A una concentración de 100 ppm de Butrol 31,5 EC, el crecimiento de los tres hongos probados es casi completamente inhibido en el caso de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. y ligeramente en menor proporción inhibido en el caso de *Fusarium* sp. Estos resultados fueron los mejores si se comparan con los otros fungicidas, por lo que se seleccionó este fungicida para ser utilizado en la dieta artificial. A una concentración de Butrol 31,5 EC de 10 ppm, el crecimiento del hongo *Penicillium* sp. sigue siendo inhibido casi en su totalidad, mientras que en el caso de *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp. se observó una inhibición de más del 50% si se compara con el diámetro de los testigos. Por último, se observó que a una concentración de 1 ppm, el Butrol 31,5 EC no fue efectivo en inhibir el crecimiento radial de las colonias de los hongos.

Con respecto al  $EC_{90}$ , el fungicida que requiere de una menor concentración para provocar un 90% de inhibición ( $EC_{90}$ ) en el crecimiento de los hongos evaluados es el Butrol 31,5 EC, siendo este el más efectivo para el control del



crecimiento de los mismos en el medio PDA, si se compara con el crecimiento observado en los testigos respectivos.

Además, se pudo observar que tanto el Butrol 31,5 EC como el Clortosip 50 SC son efectivos en el sentido de que no permiten la germinación de esporas que pudieran haberse dispersado dentro del plato Petri, ya sea al transportar o mover las placas, ya que sólo se observó el crecimiento de la colonia central, sin puntos de crecimiento alrededor. Esto evidencia que si alguna espora logró caer en los alrededores del centro de la placa, esta no pudo germinar. Al contrario, por ejemplo, en el tratamiento con Serinale, las esporas que se movilizaron en el interior de la placa lograron germinar, creando múltiples colonias dentro de la placa Petri.

### **6.3 Pruebas con fungicida en la dieta artificial para la broca del café**

La duración de la evaluación de los resultados de esta parte del proyecto fue de 28 días debido a que en este tiempo la broca desarrolla su ciclo de vida de manera completa, sin embargo, dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas, el ciclo puede durar entre 25 y 37 días (López, 1994).

Las concentraciones de Butrol 31,5 EC utilizadas (37.5, 75 y 112.5 ppm) se definieron a partir de los  $EC_{90}$  obtenidos en las pruebas de sensibilidad con el Butrol 31,5 EC. Se determinó que 75 ppm era un valor promedio para los  $EC_{90}$  obtenidos en el tratamiento con Butrol 31,5 EC, con cada uno de los tres hongos. A partir de este hecho, se decidió probar en el ensayo la concentración promedio y la misma más y menos un medio (112,5 ppm y 37,5 ppm respectivamente), para así poder determinar o ajustar la dosis más adecuada para la inhibición del crecimiento de los hongos en la dieta, logrando determinar la concentración mínima del fungicida que puede ser utilizada para mantener el rango de sanidad deseado en las dietas artificiales.

El Benlate 50 WP y el Daconil 82,5 WG fueron utilizados como controles para comparar la efectividad del Butrol 31,5 EC. El primero se empleó a una concentración de 750 ppm, basado en ensayos realizados por investigadores como Portilla (1999), que logró evitar el crecimiento de hongos en la dieta (Portilla, 2000). No obstante, este fungicida ya había demostrado su ineffectividad en evitar la contaminación de las dietas en pruebas realizadas por el CICAPE\*. Por otro lado, el Daconil 82,5 WG fue un fungicida probado en el CICAPE a la concentración descrita anteriormente debido a la ineffectividad que mostró el Benlate 50 WP. Aunque el Daconil 82,5 WG logró disminuir la contaminación en la dieta artificial, demostró que provoca mucha inhibición en el desarrollo normal del ciclo de vida de la broca, por lo que tampoco resultó ser una opción viable.

En todos los tratamientos, los testigos se mantuvieron libres de hongo, demostrando que los fungicidas probados son efectivos en mantener la dieta libre de contaminación mientras no sea inoculada con las brocas. Esto hace pensar que la contaminación se da a raíz de la presencia y actividad de las brocas en la dieta.

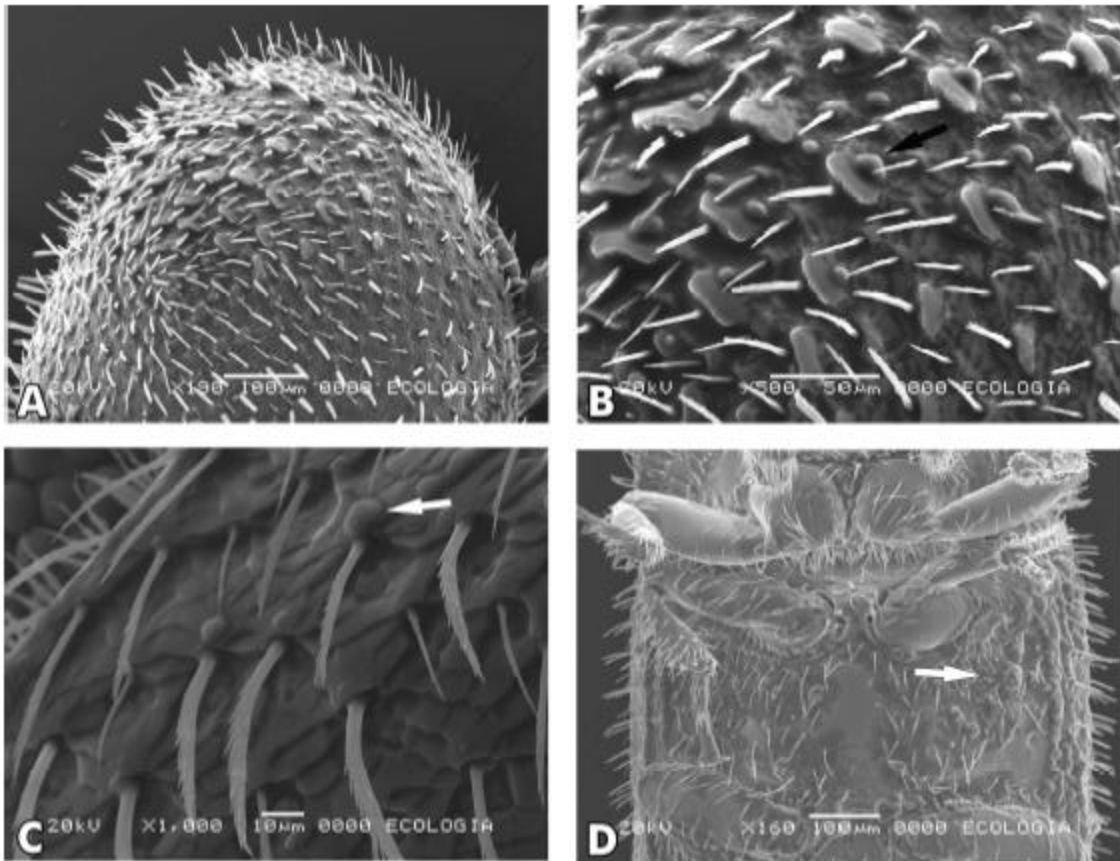
A pesar de que las brocas son lavadas, las dietas se contaminan, esto se puede deber a diferentes razones que se explican a continuación. Como se mencionó anteriormente, han surgido evidencias de que la broca cuenta con una relación de mutualismo con varios hongos, pudiéndose aislar los mismos de muestras tomadas de diferentes partes del insecto, los cuales son fuente de contaminación en la dieta, en condiciones de campo, el hongo asociado a la broca se beneficia siendo transportado a nuevos hospederos por el insecto, a cambio, los escolítidos cultivan y usan al hongo como fuente alimenticia (Pérez

---

\* GUERRERO, G. 2006. Contaminación en las dietas artificiales. CICAPE. (Comunicación personal).

*et al.*, 2005). Cuando las brocas son inoculadas en la dieta, muchas empiezan a barrenar en ella, cavando galerías. Una galería formada por *H. hampei* es un microhabitat caracterizado por condiciones ambientales que favorecen el crecimiento y sucesión de comunidades de hongos, por lo que el desarrollo de los hongos que la broca acarrea se ve favorecido en este sentido. (Carrión y Bonet, 2004).

Pérez y colaboradores (2003) lograron obtener a partir de brocas 187 aislamientos de hongos; de estos 110, 48 y 29 cultivos fueron aislados de la cutícula, intestinos y heces, respectivamente. *Fusarium*, *Penicillium*, *Candida* y *Aspergillus* fueron los géneros dominantes (Pérez *et al.*, 2003). Esto demuestra que aunque el protocolo de lavado que se esté utilizando sea efectivo, cuando la broca se alimenta y defeca, la contaminación se seguirá presentando; por esto, la incorporación de un fungicida que logre la inhibición del crecimiento de estos hongos de manera óptima es tan importante para mantener la dieta artificial libre de patógenos. Así mismo, si el protocolo de lavado no está siendo efectivo, las esporas que el insecto acarrea en su cutícula serán fuentes de contaminación en la dieta. Estos hongos asociados pueden ser transportados en estructuras especializadas de su cutícula, llamadas micangias, las cuales se encuentran en diferentes partes del insecto (Figura 6.1) (Pérez *et al.*, 2005). Es por esto que las brocas antes de ser inoculadas en la dieta, son sometidas al protocolo de lavado antes mencionado, con el fin de eliminar las esporas que puedan estar transportando en su cutícula y evitar la contaminación de la dieta.



Paint

**Figura 6.1.** Superficie de brocas sin lavar. A: Vista dorsal de la cabeza con adherencia cónicas en las placas. B: Acercamiento (500X) de las adherencias cónicas. C: Esporas en la base de las setas aserradas. D: Esporas en la zona media ventral. Tomado de: Carrión y Bonet, 2004

Hubo diferencias significativas en lo que respecta al porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de contaminación entre los tratamientos con los tres fungicidas probados durante el transcurso del ensayo. Así mismo, entre las diferentes concentraciones de Butrol 31,5 EC se dieron esas diferencias.

El Butrol 31,5 EC a una concentración de 112,5 ppm probó ser el fungicida y la dosis más adecuada para inhibir el crecimiento de hongos sobre la dieta artificial de la broca. Esto reafirma los resultados obtenidos en la pruebas de sensibilidad, evidenciando que el Butrol 31,5 EC es el fungicida que mejor inhibe el crecimiento de esos hongos. Además, si se compara la dosis más alta utilizada de Butrol 31,5 EC (112.5 ppm) con las dosis de Benlate 50 WP (750

ppm) y Daconil 82,5 WG (412.5 ppm), esta es relativamente baja, lo que demuestra aún más su efectividad como fungicida. Tanto en el caso de las dietas inoculadas con brocas procedentes de campo como con las inoculadas con brocas procedentes de café pergamino, el Butrol 31,5 EC fue el que logró impedir en mayor medida el desarrollo de los hongos contaminantes sobre la dieta.

En general, los porcentajes de contaminación con los tratamientos con brocas procedentes de café pergamino fueron menores que con las brocas procedentes de granos de campo, excepto en el caso del Benlate 50 WP (la razón de porque en este caso se observó más contaminación en el tratamiento con brocas procedentes de café pergamino se discutirá más adelante), esto hace pensar que por lo general, las brocas procedentes de granos de campo, al desarrollarse, vivir y alimentarse bajo condiciones de campo, donde hay una alta diversidad de microorganismos presentes interactuando con ellas, tienen una mayor población de los mismos (incluyendo los hongos que contaminan a la dieta). Un hecho que apoya esto, fue que sólo en las dietas inoculadas con brocas procedentes de granos de campo se observó el crecimiento de bacterias, que forman parte de esta amplia gama de microorganismos presentes a este nivel, en cambio, las brocas procedentes de café pergamino, han sido criadas en laboratorio, bajo condiciones controladas tanto abióticas como bióticas. Por ejemplo, éstas brocas se desarrollan en café pergamino seleccionado y tratado con un fungicida, Derosal 50 SC (Carbendazim), y un acaricida, Omite (Propargite). Además, después de ser inoculado con las brocas, el café pergamino que se contamine es desechado, repitiendo este proceso a través de cada generación, por lo que la población y diversidad de microorganismos presentes en este tipo de broca es menor y se irá reduciendo. Probablemente esta sea una de las razones de que la contaminación con las brocas de café pergamino sea menor que en los tratamientos con brocas traídas directamente de campo.

Este fenómeno fue también observado por Pérez *et al.* (2003) que al realizar aislamientos a partir de brocas procedentes de campo se obtuvieron gran cantidad de hongos y bacterias Gram-negativas, sin embargo, no obtuvieron aislamientos de estas bacterias a partir de brocas procedentes de laboratorio.

Además, si volvemos a pensar en la gran diversidad de microorganismos a los que se encuentran expuestas las brocas provenientes de granos campo, aunado al hecho de que estos granos son traídos de diferentes zonas del país, es de esperar que los hongos que vienen con ellas sean no sólo de diferentes géneros, sino de especies variadas, mientras que en el caso de las brocas procedentes de café pergamino el número especies de hongos de un mismo género debe ser menos diverso. Esto puede ser una de las razones del porqué se obtuvo una mayor contaminación en los tratamientos con brocas de campo, ya que el fungicida debe ser efectivo contra una mayor cantidad de hongos, lo cual aumenta la posibilidad de que entre esos hongos, se encuentren variedades resistentes al fungicida.

A partir de los porcentajes de contaminación causados por los diferentes hongos en la dieta artificial con diferentes fungicidas, se puede inferir que las brocas procedentes de café pergamino, parecen acarrear consigo en mayor cantidad al hongo *Aspergillus* sp., mientras que las brocas procedentes de granos de campo acarrean mayoritariamente estructuras reproductivas del hongo *Fusarium* sp. Esto concuerda con lo observado por Pérez y colaboradores (2003) donde *Fusarium*, y particularmente *Fusarium solani* fue uno de los hongos que predominaron más en aislamientos a partir de varias partes de la broca, sin embargo, en el caso de las dietas tratadas con Benlate 50 WP, el comportamiento fue diferente, ya que en las que fueron inoculadas con brocas procedentes de café pergamino, la contaminación por hongos fue causada en su mayoría por *Penicillium* sp., esto hace plantear en tres

posibilidades. La primera es que el Benlate 50 WP es ineficiente en inhibir el crecimiento del hongo *Penicillium* sp. sobre la dieta; la segunda sería que las brocas procedentes de café pergamino tienen una alta incidencia de este hongo incluso en su interior; y por último, que la cepa de *Penicillium* sp. presente en las brocas pergamino es resistente a este fungicida. La primera posibilidad se ve reforzada en el hecho de que con las brocas procedentes tanto de granos de campo como de café pergamino, el tratamiento con Benlate 50 WP fue el que mostró la contaminación por *Penicillium* sp. más alta (más del doble si se compara con el Butrol 31,5 EC y el Daconil 82,5 WG). La segunda posibilidad se ve reforzada por el hecho de que si se comparan los tratamientos inoculados con brocas procedentes de café pergamino con sus análogos pero inoculados con brocas procedentes de granos de campo, se observa claramente que la incidencia del hongo *Penicillium* sp. es de menos de la mitad en este último caso.

Los porcentajes de contaminación y sobrevivencia entre tratamientos, fueron diferentes estadísticamente durante todo el desarrollo del ensayo, esto permite seleccionar con mayor fundamento el fungicida y la concentración óptima del mismo para minimizar la contaminación de las dietas artificiales, señalando al Butrol 31,5 EC como al más eficiente para evitar la contaminación y maximizar la sobrevivencia de las brocas inoculadas.

En general, las dietas inoculadas con brocas procedentes de café pergamino van a presentar una contaminación causada en su mayoría por *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. y en mucho menor medida por *Fusarium* sp., mientras que las dietas inoculadas con brocas procedentes de granos de campo van a presentar una contaminación causada en su mayoría por *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp. y en mucho menor medida por *Penicillium* sp. De esto se puede inferir que dependiendo del origen de las brocas, la proporción de los hongos que se

presentaran contaminando la dieta, y por ende los que están transportando en sus cuerpos, serán diferentes.

Por otro lado, el Butrol 31,5 EC probó ser el tratamiento que permite una mejor y mayor sobrevivencia de las brocas inoculadas en la dieta, tanto de las procedentes de café pergamino, como de las procedentes de granos de campo y es el que menos afecta a las brocas y mejor controla el crecimiento de los hongos contaminantes, como se mencionó anteriormente.

En cuanto a los porcentajes de sobrevivencia observados, recordemos, como se explico anteriormente, que el muestreo a los 28 días se realizó de una manera diferente a los muestreos anteriores, esto explica que se observe un crecimiento del porcentaje de sobrevivencia del día 21 al 28.

En cuanto a la producción de descendencia a partir de las brocas inoculadas, el Butrol 31,5 EC nuevamente fue el fungicida que permitió un mejor desarrollo del ciclo de vida de la broca del café, evidenciado por la producción de la mayor cantidad de descendencia. Además, si se comparan los tratamientos inoculados con brocas procedentes de café pergamino con los que se inocularon con brocas procedentes de campo, se puede observar que en estos últimos se produjo una cantidad de progenie mayor, excepto en el caso del Daconil 82,5 WG, donde en ambos casos la producción fue muy baja. De hecho, en el caso de las dietas con Benlate 50 WP y el Daconil 82,5 WG inoculadas con brocas procedentes de granos de café pergamino, no se observó ninguna descendencia.

El ciclo de vida completo de la broca toma, dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas, entre 25 y 37 días (López, 1994). Con las condiciones presentes durante el ensayo, sólo se observó la presencia de larvas y huevos, no obstante, en el caso del tratamiento con Benlate 50 WP, se observó la



presencia de pupas, debiéndose quizá a que este fungicida permite un desarrollo más rápido de la descendencia, esto es un claro ejemplo de la influencia de las condiciones abióticas sobre la duración del ciclo de vida de la broca. Con respecto a las condiciones bióticas, en las que destaca el efecto de la presencia de los hongos contaminantes en la dieta, este factor no fue muestreado, ya que solo se muestrearon pozos sin contaminación, sin embargo, Pérez y colaboradores (2005) realizaron bioensayos utilizando dietas meridicas, y no observaron que una especie particular de hongo fuera beneficiosa o perjudicial para el desarrollo de los estados inmaduros de la broca, es decir, al parecer la presencia de los hongos no afecta en gran medida el desarrollo de la descendencia. Aún así, cabe mencionar que cuando un hongo crece en uno de los pozos, este llega a ocupar el espacio y probablemente muchos de los nutrientes y humedad presentes en la dieta, lo que puede afectar el desarrollo normal de las brocas tanto adultas como en estados inmaduros.

Los estadíos de la descendencia fueron en su mayoría larvas y huevos debido a que, con las condiciones abióticas y bióticas a las que se sometió el ensayo, a los 28 días la mayoría de la descendencia se encontraba en esos instares de su ciclo de vida. Esto explica porqué no se presentaron adultos F1 a la hora del último muestreo; es probable que de haber esperado unos días más, si se hubieran observado adultos F1 en las dietas.

Al parecer, las brocas provenientes de granos de campo son más resistentes o se adaptan mejor a las condiciones presentes en la dieta artificial que las brocas procedentes de café pergamino. Por lo que en general, la sobrevivencia y la producción de descendencia es mayor cuando las dietas se inoculan con las primeras.

#### **6.4 Prueba con Tween® 20**

El Tween® 20 es un surfactante cuya estabilidad y relativa carencia de toxicidad, le permite ser utilizado como detergente o emulsificador en una variedad de aplicaciones. Este compuesto es un surfactante, es decir, es un agente humedeciente que disminuye la tensión superficial de un líquido, permitiendo que este se esparza más fácilmente (Wikipedia, 2006). Por eso, probablemente el Tween® 20 haya permitido que la solución del fungicida, en este caso el Butrol 31,5 EC que se utilizó para el lavado de las brocas, penetre en las cavidades del insecto, intoxicándolo o ahogándolo, lo que pudo causar la muerte del mismo. Es decir, el Tween® 20 tiene un efecto perjudicial sobre el proceso de lavado de las brocas, por lo que la mayoría de los insectos sometidos a este compuesto durante el lavado, murieron, mientras que en el caso de la solución sin el surfactante, sólo la mitad murió.

#### **6.5 Prueba de desinfección de las brocas con diferentes fungicidas**

Este ensayo se realizó con el fin de determinar cuál de los fungicidas utilizados en la prueba con la dieta artificial era el más efectivo para el lavado de las brocas, es decir, el que lograba limpiar mejor a las brocas de los microorganismos en su cutícula. Es por esto, que a las dietas utilizadas en esta parte del ensayo no se les incluyó la incorporación del fungicida al final de la elaboración de la dieta, para así poder aislar el efecto del lavado sobre la contaminación de la dieta y sobrevivencia de las brocas.

El Butrol 31,5 EC es el fungicida, de los tres probados, que mejor desinfectó a las brocas, por lo que fue en la dieta inoculada con brocas lavadas con este fungicida, donde se observó el menor porcentaje de contaminación. No obstante, después de 28 días, todas las dietas con los tres diferentes fungicidas se contaminaron en un 100%. Como se mencionó anteriormente, la broca

cuenta con ciertos hongos asociados. Estos hongos asociados pueden ser transportados en estructuras especializadas de su cutícula, llamadas micangias, las cuales se encuentran en diferentes partes del insecto (Pérez *et al.*, 2005). Al parecer, ninguno de los diferentes tratamientos de lavado empleados fue suficientemente efectivo para eliminar estos hongos presentes en la cutícula de las brocas, aunque el Butrol 31,5 EC sí logró un efecto más positivo que los otros dos fungicidas, reduciendo la contaminación durante los primeros días del ensayo, lo que denota que sí tuvo cierto nivel de inhibición de crecimiento de los hongos, por lo menos de los que las brocas transportan en sus cutículas. Sin embargo, la contaminación presenciada también se puede haber debido a los hongos que la broca lleva en sus intestinos y que contaminan la dieta cuando esta defeca, ya que se encuentran presentes en sus heces, entre estos se pueden encontrar los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Carrión y Bonet, 2004). Esto viene a mostrar nuevamente la importancia de incorporar un fungicida efectivo a la dieta, para evitar su contaminación.

En lo que respecta a la sobrevivencia de las brocas, el Butrol 31,5 EC probó ser el fungicida que permite una mayor sobrevivencia de las mismas, entonces, es probable que este fungicida sea el menos tóxico para ser empleado como agente de lavado. No obstante, después de 28 días todas las brocas de los tres diferentes tratamientos se encontraban muertas. Esto viene a reforzar la importancia de incorporar un fungicida efectivo a la dieta, para propiciar la sobrevivencia de las brocas que inoculen en ella.

## Capítulo 7

### **CONCLUSIONES**

---

- a. Los hongos que constituyen los contaminantes mayoritarios de la dieta artificial de la broca del café pertenecen a los géneros de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.
- b. Las dietas inoculadas con brocas que proceden de granos de campo se contaminan más que las inoculadas con brocas procedentes de café pergamino.
- c. Los hongos probados durante el ensayo: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., demostraron una mayor sensibilidad hacia el fungicida Butrol 31.5 EC que hacia cualquier otro de los fungicidas utilizados durante el ensayo.
- d. El Butrol 31.5 EC es el fungicida que a una menor concentración, puede inhibir el crecimiento de los hongos probados en un 90%.
- e. El Butrol 31.5 EC fue el fungicida más efectivo en inhibir el crecimiento de los hongos probados sobre la dieta artificial de la broca del café, tanto en la que se inoculó con brocas procedentes de granos de campo, como en la que se inoculó con brocas procedentes de café pergamino.
- f. La dieta a la que se le incorporó el fungicida Butrol 31.5 EC, fue la que permitió una mayor sobrevivencia de las brocas así como una mayor producción de descendencia, tanto en la que se inoculó con brocas procedentes de granos de campo, como en la que se inoculó con brocas procedentes de café pergamino.

- g. El fungicida Butrol 31.5 EC fue el que mejor desinfectó a las brocas directamente.
  
- h. La adición de un surfactante a la solución con fungicida para el lavado de las brocas, tiene un efecto perjudicial sobre estas.

## Capítulo 8

### RECOMENDACIONES

---

- a. Al realizar las pruebas de sensibilidad, cuando se extraen los discos de agar con micelio del hongo en cultivo puro, es mejor si el mismo se toma de las zonas más alejadas del centro de la colonia del hongo, ya que es aquí donde el hongo se encuentra en un crecimiento más activo y además se encuentra menos esporulado, lo que facilita la manipulación de los discos y una inoculación más fácil de los mismos en las cajas de Petri.
- b. Restar los 5 mm del diámetro del disco agar al medir los diámetros de las colonias, en lugar de incluir este valor como parte del crecimiento del hongo.
- c. Las brocas que se inoculen en las pruebas con la dieta artificial, deben ser sólo hembras vigorosas, activas y con apariencia saludable para garantizar resultados adecuados en la prueba. Esta selección de las brocas se puede realizar poniendo las mismas sobre un papel filtro que luego se vuelca. Las brocas que permanezcan adheridas en el papel, estarán vivas y saludables.
- d. Idear un método de muestreo para el ensayo con la dieta de la broca, que sea más exacto, de ser posible, que no involucre el uso de extrapolaciones, para así obtener una idea más exacta de los resultados obtenidos
- e. La dosis más alta de Butrol 31.5 EC utilizada en esta investigación, es muy baja si se compara con las dosis utilizadas de otros fungicidas en las pruebas con la dieta artificial de la broca, por lo que se recomienda probar

dosis más altas de este fungicida en la dieta, ya que podría arrojar resultados aún mejores que los que se observaron en el desarrollo de este ensayo.

- f. Utilizar el Butrol 31,5 EC en la dieta artificial de las brocas en lugar del fungicida que se utiliza actualmente (Anexo 3).
  
- g. Utilizar la combinación de la implementación del Butrol 31,5 EC tanto para la desinfección de las brocas como en la incorporación en la dieta artificial (Anexo 3).

## **BIBLIOGRAFIA**

---

AVIVAR, C. *et al.* 2003. Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas (en línea). Andalucía, ESP. Almería, Consejería de Salud. Consultado 7 dic. 2006. Disponible en <http://www.ugr.es/~ajerez/publicaciones/3.pdf>

BARK AND WOOD BORING BEETLES OF THE WORLD. 2006. *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (en línea). USA. Consultado 7 dic. 2006. Disponible en <http://www.barkbeetles.org/browse/subject.cfm?SUB=5004>

BARRERA, J. *et al.* 2000. Fundamentos y perspectivas de control biológico. Editado por Mohammad H. Badii, Adriana E. Flores y Luis J. Galán. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. p. 211-227

BENAVIDES, P. *et al.* 2003 Classical biological control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia with African parasitoids. En: 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods (I. 2003. Indiana, USA.) p. 430-434

BORBÓN, O. 1995. Uso del control biológico de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* Ferrari 1867. En: Seminario/Taller regional sobre control biológico de la broca del fruto del cafeto (1994. San Pedro Sula, HON.) s.p.

BORBÓN, O. 2003. El control biológico de la broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*) (en línea). Heredia, CR. Boletín Informativo del ICAFE Año 3, Número 4. Consultado 29 jun. 2006. Disponible en <http://www.icafe.go.cr/icafe/Boletines/Heredia12.pdf>



BORBÓN, O. 2003. Método de liberación inundativa para el control de la Broca del fruto del cafeto con parasitoides *Phymastichus coffea*, *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta* (en línea). Naranjo, Alajuela, CR. Boletín Informativo del ICAFE Año 3, Número 2. Consultado 29 jun. 2006. Disponible en <http://www.icafe.go.cr/icafe/Boletines/Naranjo10.pdf>

BUSTILLO, A. E. 2005. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 29 (110): 55-68.

CAMPOS, E. 2001. Programa de prevención y control de broca del café (en línea). Pérez Zeledón, CR. Boletín Informativo del ICAFE Año 1, Número 4. Consultado 29 de jun. 2006. Disponible en <http://www.icafe.go.cr/icafe/Boletines/PZ4.pdf>

CARRIÓN, G.; BONET, A. 2004. Mycobiota Associated with the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) and Its Galleries in Fruit. Ann. Entomol. Soc. Am. 97 (3):492-499.

DUPONT, 2006. Carbendazim AC: Fungicida sistémico preventivo y curativo de amplio espectro para una gran variedad de cultivos (en línea). ESP. Consultado 7 dic. 2006. Disponible en [http://www.agrosoluciones.dupont.com/esp/ficha\\_tecnica.php?producto=44](http://www.agrosoluciones.dupont.com/esp/ficha_tecnica.php?producto=44)

EDIFARM, 2006. Vadeagro 2006. 3° ed. Edifarm Internacional, GUA. 656 p.

FALLAS, C. 2004. Proyecto de elaboración de trampas contra la broca (en línea). Heredia, CR. Boletín Informativo del ICAFE Año 4, Numero 2. Consultado 13 oct. 2006. Disponible en <http://www.icafe.go.cr/icafe/Boletines/Heredia14.pdf>

FINCH, H.C.; FINCH, M.A. 1990. Los Hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. D.F., México. Editorial Trillas. 187 p.

GONZÁLES, E. *et al.* 2004. Confrontando la broca del café en Venezuela (en línea). Venezuela, LAMOFRU. Consultado 18 oct. 2006. Disponible en <http://www.plagas-agricolas.info.ve/admin/documental/archivos/20050302112949.pdf>

GUERRERO, G. 2004. La utilización de las trampas contra la broca (en línea). Heredia, CR. Boletín Informativo del ICAFE. Año 4, Numero 2. Consultado 13 oct. 2006. Disponible en <http://www.icafe.go.cr/icafe/Boletines/Heredia14.pdf>

GUZMÁN, J. 2004. Comparación financiera del uso de plaguicidas biológicos y químicos para el combate de la broca del café. San José, CR. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE), Sociedad Alemana para la Cooperación Técnica (GTZ). 30 p.

LOPEZ, L.M. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo de café. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica. 96 p.

OBANDO, J.J.; MORA, A.M. 2003. Celebración del IV Seminario: broca del café (en línea). San Marcos de Tarrazú, CR. Boletín Informativo del ICAFE Año 3, Número 4. Consultado 29 jun. 2006. Disponible en <http://www.cafedecostarica.org/icafe/Boletines/Santos12.pdf>

PÉREZ, J. *et al.* 2003. Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. Mycol. Res. The British Mycological Society. UK. 107(7): 879–887.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. 2005. Does the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) Have Mutualistic Fungi?. Ann. Entomol. Soc. Am. 98 (4):483-490.

PORTILLA, M. 1999. Mass rearing technique for *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyilidae) on *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) developed using Cenibroca artificial diet. Revista Colombiana de Entomología. CENICAFE. Disciplina de Entomología. Chinchiná, Caldas, COL. 25(1-2): 57-66.

PORTILLA, M. 2000. Desarrollo y evaluación de una nueva dieta artificial para la cría masiva de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Revista Colombiana de Entomología. CENICAFE. Disciplina de Entomología. Chinchiná, Caldas, COL. 26(1-2): 31-37.

PROCAFE, SAL. 2005. Manejo integrado de la broca del fruto (en línea). Fundación Salvadoreña para la investigación del café. Consultado 20 oct. 2006. Disponible en <http://www.procafe.com.sv/menu/Investigacion/ManejoIntegradoBroca.htm>

Proyecto SICA/MAG, ECU. 2004. La Broca del Café (en línea). Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Consultado 20 oct. 2006. Disponible en <http://www.sica.gov.ec/cadenas/cafe/docs/broca.htm>

RIVEROS, A. 2005. Uso de Phyton 27 en el control de enfermedades en diferentes especies de cultivos frutales (en línea). Santiago, CHI. Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Consultado 7 dic. 2006. Disponible en

[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_agronomicas/montealegre\\_j/6.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/6.html)

RUEDA, J.; AMIGOT, J.A.; DUCHA, J. 2003. Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal (en línea). Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Zaragoza, ESP. 22(3): 1097-1104. Consultado 7 dic. 2006. Disponible en <http://www.oie.int/eng/publicat/rt/2203/PDF22-3/29.Rueda%20esp.pdf>

SCHULLER, S. 2005. Boletín electrónico informativo: Informe sobre el Workshop Internacional “Manejo da Broca-do-Café”, en Londrina, Brasil. Editado por la Junta Nacional del Café. Red Peruana de Broca del Café. Número 1. Perú. 7 p.

VIARURAL, 2006. Benlate: fungicida sistémico de amplio espectro (en línea). Consultado 7 dic. 2006. Disponible en <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/insumosagropecuarios/agricolas/agroquimicos/dupont/fungicidas/benlate.htm>

WIKIPEDIA, 2006. Polysorbate 20 (en línea). Wikipedia Foundation. Consultado 5 dic. 2006. Disponible en [http://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate\\_20](http://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate_20)

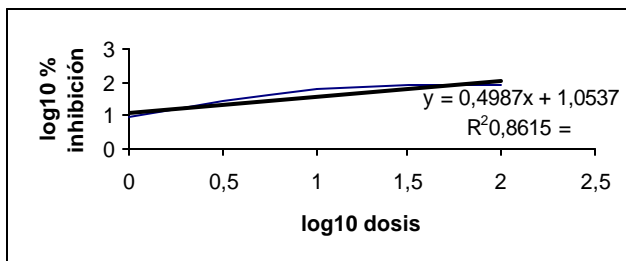
## ANEXOS

**Anexo 1.** Diámetros obtenidos de las colonias en las pruebas preliminares con diferentes fungicidas en medio PDA

Fungicida	Dosis	Hongo											
		<i>Fusarium</i> sp.				<i>Penicillium</i> sp.				<i>Aspergillus</i> sp.			
		Diámetro de la colonia (mm)			X	Diámetro de la colonia (mm)			X	Diámetro de la colonia (mm)			X
<b>Butrol 31.5EC</b>	100 ppm	10	8	9	9,00	5	5	5	5,00	6	6	6	6
	10 ppm	25	27	25	25,67	5	5	5	5,00	18	20	19	19
	1 ppm	59	60	60	59,67	16	16	16	16,00	52	52	51	51,67
<b>Busan 100</b>	100 ppm	50	54	51	51,67	14	14	14	14,00	24	27	23	24,67
	10 ppm	60	59	59	59,33	15	14	17	15,33	47	45	43	45,00
	1 ppm	61	60	62	61,00	16	16	18	16,67	58	60	59	59,00
<b>Fytosan 80WP</b>	100 ppm	36	39	39	38,00	14	14	14	14,00	49	50	50	49,67
	10 ppm	44	40	42	42,00	15	14	15	14,67	56	57	56	56,33
	1 ppm	64	68	64	65,33	17	15	14	15,33	60	59	60	59,67
<b>Serinale 500 50SC</b>	100 ppm	47	49	50	48,67	12	11	13	12,00	19	23	21	21,00
	10 ppm	58	60	62	60,00	15	16	16	15,67	40	36	37	37,67
	1 ppm	66	64	65	65,00	16	16	16	16,00	60	58	59	59,00
<b>Clortosip 50SC</b>	100 ppm	30	27	30	29,00	10	11	12	11,00	38	39	38	38,33
	10 ppm	29	33	35	32,33	13	15	11	13,00	41	43	43	42,33
	1 ppm	60	57	58	58,33	18	17	18	17,67	54	53	54	53,67
<b>Benlate 50</b>	100 ppm	56	55	55	55,33	16	15	16	15,67	27	28	28	27,67
	10 ppm	56	56	55	55,67	16	16	18	16,67	44	43	45	44,00
	1 ppm	58	59	60	59,00	17	18	18	17,67	55	55	52	54,00
<b>Testigos</b>	0 ppm	67	65	65	65,67	19	18	20	19,00	65	61	65	63,67
	0 ppm	68	64	63	65,00	17	20	14	17,00	64	62	65	63,67

## Anexo 2. Curvas de sensibilidad de tres hongos a seis diferentes fungicidas

### A. Sensibilidad de *Fusarium* sp. al Butrol 31.5 EC

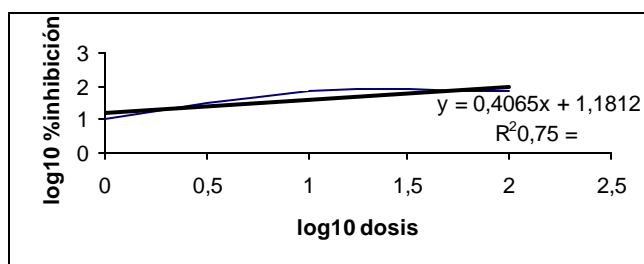


Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	8,67	0	0,94
10	60,71	1	1,78
100	86,22	2	1,94

$$EC_{50} = 19,67$$

$$EC_{90} = 63,94$$

### B. Sensibilidad de *Penicillium* sp. al Butrol 31.5 EC

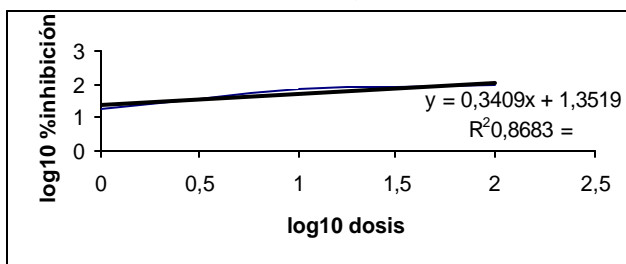


Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	11,11	0	1,045757
10	72,22	1	1,858671
100	72,22	2	1,858671

$$EC_{50} = 18,78$$

$$EC_{90} = 79,75$$

### C. Sensibilidad de *Aspergillus* sp. al Butrol 31.5 EC

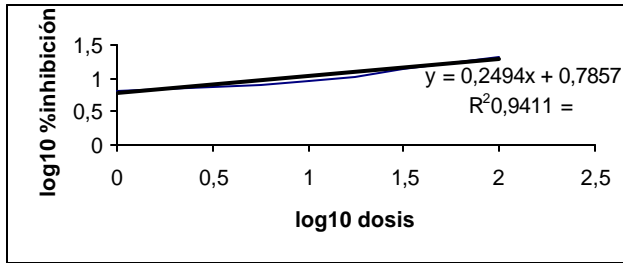


Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	18,85	0	1,28
10	70,16	1	1,85
100	90,58	2	1,96

$$EC_{50} = 10,43$$

$$EC_{90} = 58,47$$

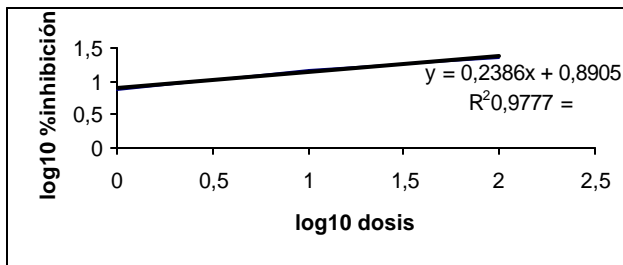
**D. Sensibilidad de *Fusarium* sp. al Busan 100**



$EC_{50} = 4590,59$   
 $EC_{90} = 48463,53$

Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	6,63	0	0,82
10	9,18	1	0,96
100	20,92	2	1,32

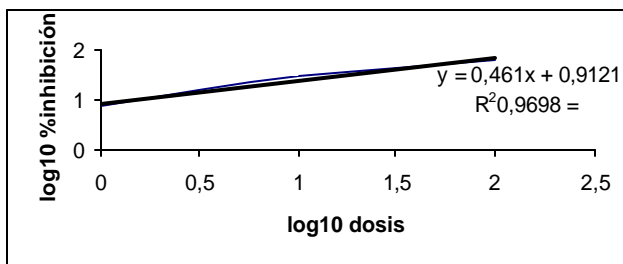
**E. Sensibilidad de *Penicillium* sp. al Busan 100**



$EC_{50} = 2445,629$   
 $EC_{90} = 28725,46$

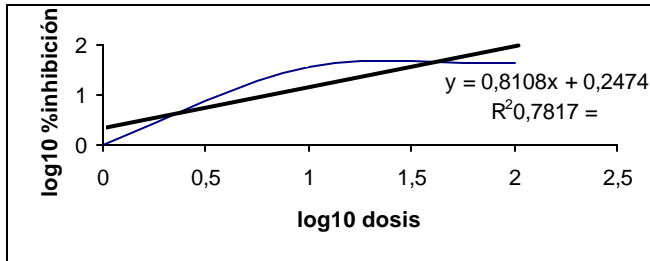
Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	7,41	0	0,87
10	14,81	1	1,17
100	22,22	2	1,35

**F. Sensibilidad de *Aspergillus* sp. al Busan 100**



Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	7,33	0	0,86
10	29,32	1	1,47
100	61,26	2	1,79

**G. Sensibilidad de *Fusarium* sp. al Fytosan 80 WP**

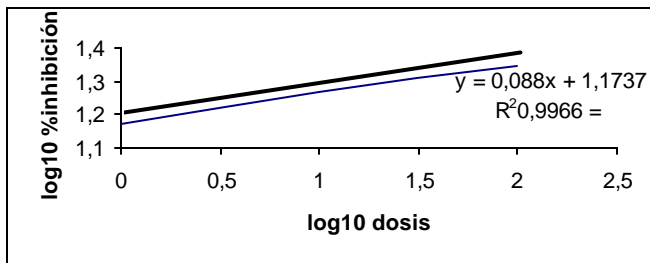


Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	0,00	0	-
10	35,71	1	1,55
100	41,84	2	1,62

$$EC_{50} = 61,70$$

$$EC_{90} = 127,39$$

**H. Sensibilidad de *Penicillium* sp. al Fytosan 80 WP**

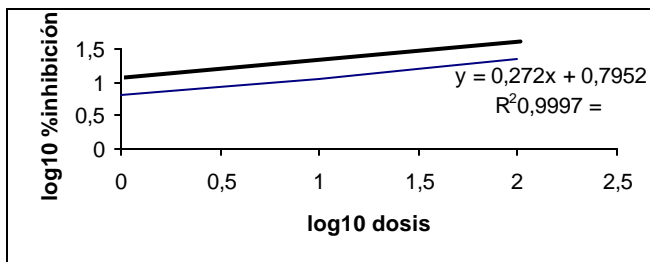


Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	14,81	0	1,17
10	18,52	1	1,27
100	22,22	2	1,35

$$EC_{50} = 931059,26$$

$$EC_{90} = 740971055,70$$

**I. Sensibilidad de *Aspergillus* sp. al Fytosan 80 WP**



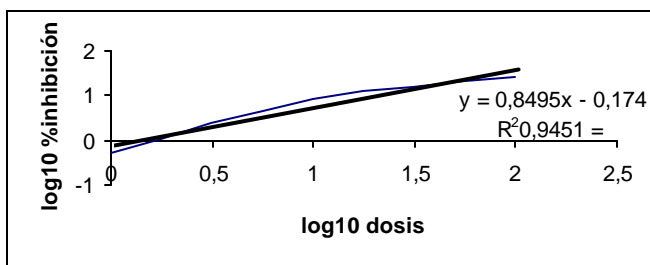
Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	6,28	0	0,80
10	11,52	1	1,06
100	21,99	2	1,34

$$EC_{50} = 2102,25$$

$$EC_{90} = 18246,76$$



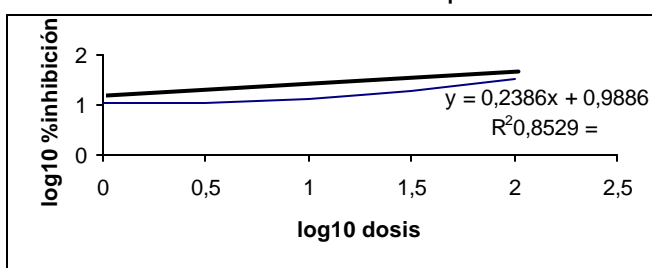
**J. Sensibilidad de *Fusarium* sp. al Serinale 500 50 SC**



$EC_{50} = 62,39$   
 $EC_{90} = 124,63$

Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	0,51	0	-0,29
10	8,16	1	0,91
100	25,51	2	1,41

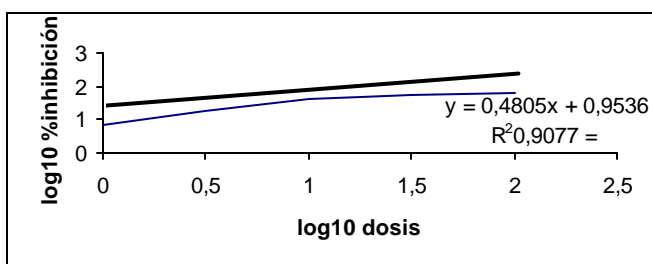
**K. Sensibilidad de *Penicillium* sp. al Serinale 500 50 SC**



$EC_{50} = 948,95$   
 $EC_{90} = 11145,99$

Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	11,11	0	1,047
10	12,96	1	1,11
100	33,33	2	1,52

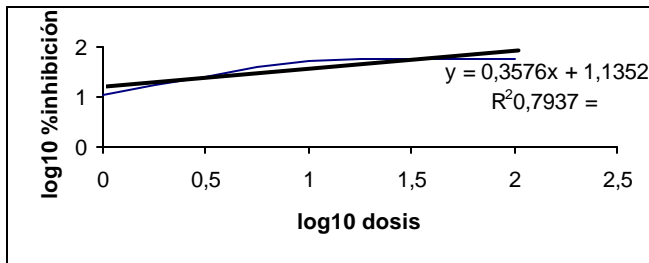
**L. Sensibilidad de *Aspergillus* sp. al Serinale 500 50 SC**



$EC_{50} = 35,58$   
 $EC_{90} = 120,92$

Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	7,33	0	0,86
10	40,84	1	1,61
100	67,02	2	1,83

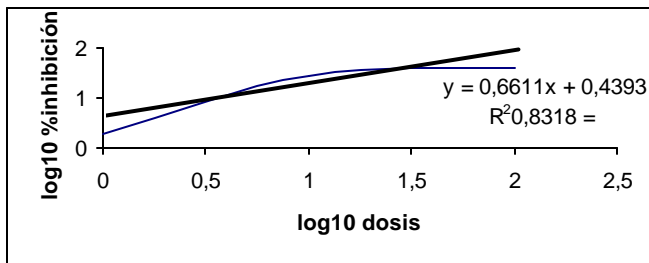
**M. Sensibilidad de *Fusarium* sp. al Clortosip 50 SC**



Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	10,71	0	1,029963
10	50,51	1	1,703379
100	55,61	2	1,74517

$EC_{50} = 37,72$   
 $EC_{90} = 195,16$

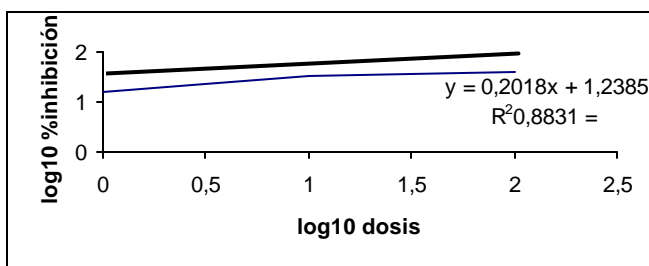
**N. Sensibilidad de *Penicillium* sp. al Clortosip 50 SC**



Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	1,85	0	0,27
10	27,78	1	1,44
100	38,89	2	1,59

$EC_{50} = 80,42947$   
 $EC_{90} = 195,6808$

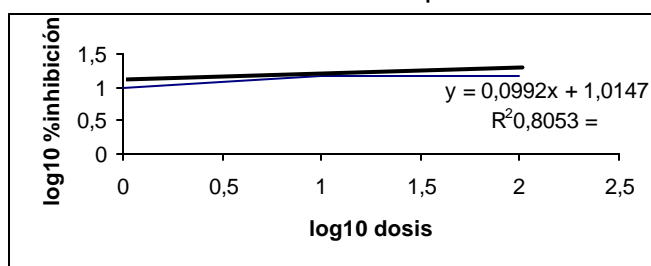
**Ñ. Sensibilidad de *Aspergillus* sp. al Clortosip 50 SC**



Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	15,71	0	1,20
10	33,51	1	1,52
100	39,79	2	1,60

$EC_{50} = 191,34$   
 $EC_{90} = 3522,02$

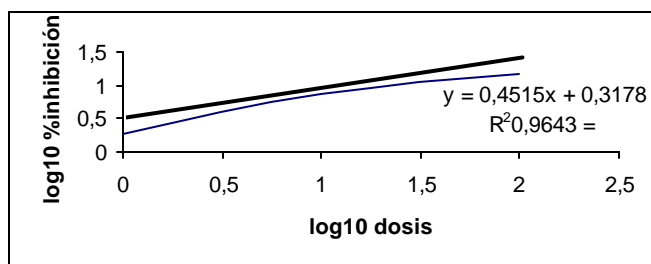
**O. Sensibilidad de *Fusarium* sp. al Benlate 50 WP**



$EC_{50} = 7904658,429$   
 $EC_{90} = 2959338550,00$

Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	9,69	0	0,99
10	14,80	1	1,17
100	15,31	2	1,18

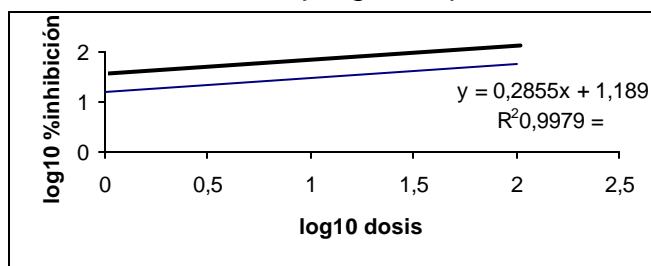
**P. Sensibilidad de *Penicillium* sp. al Benlate 50 WP**



$EC_{50} = 1145,697$   
 $EC_{90} = 4211,7$

Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	1,85	0	0,27
10	7,41	1	0,87
100	14,81	2	1,17

**Q. Sensibilidad de *Aspergillus* sp. al Benlate 50 WP**



$EC_{50} = 61,13$   
 $EC_{90} = 479,03$

Dosis	% inhibición	log10 de las dosis	log10 de % inhibición
0	0,00	-	-
1	15,18	0	1,18
10	30,89	1	1,49
100	56,54	2	1,75

**Anexo 3.** Protocolo de formulación de la dieta artificial de la broca y desinfección de las brocas utilizando el fungicida Butrol 31.5 EC.

Formulación de la dieta artificial

Primeramente se autoclavan 150 g de café molido (2 mm de grosor) por 15 minutos a 1,2 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Simultáneamente, se autoclavan 750 ml de agua destilada con agar Sigma (A9915, 15 g por litro) por 15 minutos a 1,2 kg/cm<sup>2</sup>. Una vez que se finaliza con el autoclavado, en una cámara de flujo laminar se coloca el agar en una licuadora industrial y cuando este está en movimiento se adiciona el café molido. Se licua por 30 segundos hasta que la mezcla del café y el agar sean homogéneas y luego se agregan los siguientes ingredientes: 20 g de torula, 20 g de caseína, 14 g de azúcar, 2 g de benzoato de sodio (B3250), 0,5 g de vitaminas de Vanderzant (V 1007), 1 g de sales de Wesson (W1374), 10 ml de etanol al 95% y 0,5 ml de formaldehído (F 1268). Seguidamente, se disuelven 270 µl de Butrol 31.5 EC en los 750 ml de mezcla (dieta) líquida en la licuadora, cuando esta se encuentre a una temperatura de alrededor de 50° C (para evitar la desnaturalización del fungicida y evitar la solidificación del medio), obteniéndose así una concentración de 112.5 partes por en la dieta. Después de que estén todos los ingredientes en movimiento, se dejan mezclar por 1 minuto, sin sobrepasar los 2 minutos. La dieta se traslada luego a frascos para salsa pequeños, para luego depositarlos en las placas multipozo respectivas. Las placas multipozo mencionadas son de la marca Evergreen Scientific® estériles y tienen 12,7 cm de largo, 8,5 cm de ancho y 2 cm de alto aproximadamente; además tienen 24 pozos con un diámetro de 1,7 cm y una profundidad de 1,8 cm para un volumen de 2 ml por pozo aproximadamente.

### Desinfección de las brocas

Las brocas utilizadas para inocular las dietas, tanto las provenientes de café pergamino como las provenientes de granos de campo, deben de ser sólo hembras vigorosas, activas y sanas. Éstas se deben lavar siguiendo este procedimiento: las brocas primero se introducen en una bolsita de tela y se someten a un lavado en una solución con cloruro de benzalconio al 7,5% por un minuto, luego se lavan con agua esterilizada, después se someten a otro minuto de lavado en el cloruro de benzalconio y se lavan otra vez en el agua esterilizada. Posteriormente se someten a unos 30 segundos de lavado en una solución de Butrol 31.5EC (100 ppm) y después se colocan a secar en un ventilador (sin volver a lavar con agua).

## **Anexo 4. Hoja de información**

### **Información del estudiante:**

- Nombre: Andrés Valerio Oviedo
- Cédula o No. Pasaporte: 1-1194-0177
- Carné ITCR: 200209064
- Dirección de su residencia en época lectiva: Urbanización El Cidral, casa # 22, Sabanilla, Montes de Oca
- Dirección de su residencia en época no lectiva: Urbanización El Cidral, casa # 22, Sabanilla, Montes de Oca
- Teléfono en época lectiva: 825-9051 ó 225-9533
- Teléfono época no lectiva: 825-9051 ó 225-9533
- Email: valerio.andres@gmail.com
- Fax: 225-9533

### **Información del Proyecto:**

- Nombre del Proyecto: Evaluación de la incorporación de diferentes fungicidas y dosis en dietas artificiales para la reproducción de la broca del café con miras a la multiplicación masiva de sus parasitoides bajo condiciones controladas
- Profesor Asesor: MSc. Vladimir Villalba Velásquez
- Horario de trabajo del estudiante: variable

### **Información de la Empresa:**

- Nombre: Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE)
- Zona: Barva de Heredia
- Dirección: 400 m Norte de Iglesia Católica de San Pedro de Barva, Heredia
- Teléfono: 260-1875
- Fax: 260-1937
- Apartado: 37-1000 San José
- Actividad Principal: Desarrollo y divulgación de tecnología en las diferentes áreas de la actividad cafetalera.