



Selección de tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin como alternativa para el control biológico de la broca de café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: Scolytidae) a diferentes temperaturas

Selection of three strains creole *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an alternative for biological control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: Scolytidae) at different temperatures

Choquetarqui Daniel^{1*}, Almanza Lourdes¹, Loza-Murguía Manuel^{1,2}

Datos del Artículo

¹Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCB, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP, Ingeniería Agronómica, Coroico - Nor Yungas - La Paz, Bolivia. 591 (2) 8781991.

²Departamento de Enseñanza e Investigación en Bioquímica & Microbiología-DEI&BM, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP.

*Dirección de contacto: Campus Leahy...Unidad Académica Campesina Carmen Pampa, Coroico, La Paz Bolivia Casilla 4242 Tel.: 591 (2) 8781991. E-mail address: Daniel.choquetarqui@hotmail.com

Palabras clave:

Beauveria bassiana, hongos entomopatógeno, *Hypothenemus hampei*, Yungas, *Coffea arabica*.

J Selva Andina Res Soc. 2011; 1(1):17-25.

Historial del artículo.

Recibido Mayo, 2010.
Devuelto Octubre, 2010
Aceptado abril, 2011.
Disponible en línea Julio 2011.

Key words:

Beauveria bassiana, entomopathogenic fungi, *Hypothenemus hampei*, Yungas, *Coffea arabica*.

Resumen

En el mundo hay una gran demanda de café (*Coffea arabica*) por toda Europa y América, siendo así los países que producen café como el Brasil, Colombia, y productores bajos. Bolivia es un país que produce café, el 90% lo produce el lugar de los Yungas del departamento de La paz. Uno de los problema más grandes para los productores es por el ataque de la broca de café que esta va afectando a que baje el rendimiento, y los productores viendo de esa forma van aplicando químicos para eliminar a esta plaga, pero el sabor ya no es lo mismo y ahora en la actualidad hay demanda de café orgánico y los productores buscan como eliminar a la plaga de forma ecológica. Es así que encontró una de la maneras que se puede eliminar es con un hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* que este va matando por contacto en el fruto a la broca de café (*Hypothenemus hampei*), está presente en forma de un algodón amarillo cremoso que este no afecta al medio ambiente y es inocuo para animales de sangre caliente. Pero la forma de reproducir este hongo no se sabe a qué temperatura se puede reproducir solo se tiene información que germina de 23°C a 25°C pero de otra zona, es por esa razón se hace la investigación.

Es por esa razón se sometieron a diferentes temperaturas (15°C, 18°C, 21°C, 24°C, 27°C, 30°C). De tres diferentes lugares (Carmen Pampa, Irupana, Asunta) con diferentes temperaturas y altitudes.

Los resultados que se obtuvieron que a un principio todos espesaron bien pero después que pasaba el tiempo iban cambiando el comportamiento y los mejor resultado fue a los 24°C, que al principio en la germinación empezó mal pero el resultados índice de crecimiento fue de 2.21mm/día la concentración de conidios fue de 2.0 Conidios/ml, seguido por la temperatura de 18°C, 21°C, 27°C, en el índice de crecimiento que van de 1.43 a 1.85 mm/día, y la concentración que son de 1.50 a 1.70 Conidios/mL. El lugar que se comporto mejor fue el hongo de Asunta seguido por Carmen Pampa.

© 2011. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

In the world there is great demand for coffee (*Coffea arabica*) across Europe and America, and coffee producing countries like Brazil, Colombia, and low producers. Bolivia is a country that produces coffee, produces 90% instead of the Yungas of La Paz department. One of the biggest problem for producers is to attack the coffee berry borer that will affect the performance to drop, and producers are seeing thus applying chemicals to eliminate this pest, but the taste is no longer the same and now there is now demand for organic coffee as producers seek to eliminate the scourge of environmentally friendly manner. Thus he found one of the ways you can remove it with an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* that is killing the fruit contact the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), is present in the form of a creamy yellow cotton that does not affects the environment and is wicked for warm-blooded animals. But how to play this fungus is not known at what temperature can be reproduced only has information that germinate at 23 ° C to 25 ° C but in a different area, that is why research is done. That's why were submitted to different temperatures (15°C, 18°C, 21°C, 24°C, 27°C, 30°C).

In three different places (Carmen Pampa, Irupana, Asunta) at different temperatures and altitudes. The results were that a thickened first all well but after time passed were changing the behavior and the best result was at 24°C, initially in the germination started badly but the results of growth rate was 2.21mm/day the concentration of conidia was 2.0 conidia / ml, followed by the temperature of 18 °, 21 °, 27 °, the growth rate ranging from 1.43 to 1.85 mm/day, and the concentration is 1.50 to 1.70 conidia/mL. The place was better behaved Asunta fungus followed by Carmen Pampa.

© 2011. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivian. All rights reserved.

Introducción

Se estima que la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), provoca un daño económico del orden de 500 millones de dólares en todo el mundo y su control se basa en el uso de insecticidas, principalmente el endosulfan, utilizado en forma intensiva y repetida conlleva al desarrollo de resistencia del insecto a este producto (Brun et al 1989) además, de causar problemas ambientales, contaminación de los alimentos y de los agricultores.

El cultivo del café (*Coffea* spp) tiene importancia económica, social, cultural y ambiental en todo el mundo. La broca del café destaca entre las limitantes más importantes de este cultivo y es considerada como el insecto plaga más dañino del café (LePelley 1968). Aunque se han descubierto más de veinte enemigos naturales de la broca en diferentes partes del mundo (Murphy & Moore 1990, Benassi 1995, Bustillo et al 2002) los parasitoides de origen africano han despertado mayor interés para ser usados en programas de control biológico clásico, pues se piensa que podrían tener mayor potencial para el control de la broca (Murphy & Moore 1990).

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) es una especie monófaga del fruto del cafeto (*Coffea* spp), que se considera entre las principales plagas de este cultivo a nivel mundial (Baker 1999), siendo la principal plaga de los cafetales, tanto en el área Centroamericana como en otras partes del mundo, su importancia radica en que ataca directamente los granos de café provocando la caída de los frutos en estado acuoso, la pérdida de peso del grano y la calidad de la bebida, aumentándose los gastos por concepto de manejo,

y reduciendo el precio de venta del producto. (Benavides & Arévalo 2002)

Para el manejo de esta plaga, se ensayan y/o utilizan prácticas como el saneamiento de los cafetales en períodos posteriores a la cosecha, el uso de trampas (con sustancias atrayentes), medios biológicos y en última instancia, productos químicos. (López-Núñez 2006, Aristizábal et al 2006, Baker 1999, CNSV 2005, García & Riera 2006, Garcia et al 2007, Agramont et al 2010)

Con relación al manejo con el empleo de medios biológicos, en nuestro continente, los trabajos con el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin han mostrado avances significativos en la investigación y/o uso en condiciones de producción en países como Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana y Venezuela, entre otras naciones (Baker 1999, CNSV 2005, García & Riera 2006, Vintimilla 2004). Así por ejemplo, luego de ser encontrados aislamientos en Colombia a fines de la década de los 90's (Baker 1999), se establecieron procesos sencillos de reproducción del hongo, lo que ha propiciado su distribución en toda la zona cafetera colombiana infestada con *H. hampei*, siendo actualmente utilizado en casi toda esa zona, convirtiéndose en un factor de mortalidad natural, donde se estima que el 49% de la población total de broca en un cafetal es afectada por el hongo (Baker 1999).

En Bolivia la broca del café fue detectada por primera vez en 1978 en Riberalta (Beni), y en abril de 1985 en Caranavi, introducida del Brasil, desde esta zona se ha diseminado a todas las zonas cafetaleras del país (Belpaire & Chorquina 1998). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin se ha registrado como enemigo natural de la broca del

café, aislándose en todos los países a los cuales ha migrado este insecto. La infección de *H. hampei* es predecible, a partir de la particular susceptibilidad de este insecto al ataque del hongo (Valdés & Vélez 2000). Al igual que la mayoría de los entomopatógenos formulados para el control de insectos plagas en el campo, deben tenerse en consideración determinados aspectos que definen el éxito de su implementación en los programas manejo. Algunos de estos aspectos son: la actividad biológica de la formulación, el momento oportuno de la aspersión en relación con el desarrollo del insecto y su planta hospedante, el cubrimiento logrado en la planta con la formulación utilizada y la estabilidad de la formulación cuando se expone a condiciones ambientales limitantes como la temperatura, humedad relativa y luz solar, resultando este último, el factor que más afecta la persistencia del entomopatógeno en el campo. (Flóres et al 1997)

En la región de los Yungas, las mayor incidencia generalmente ocurre en zonas por debajo de los mil metros de altitud con infestaciones que están entre un 20 a 50% (Cuba 2003). Los daños que se observan no solamente reflejan la rápida propagación de la plaga sino, también, la intensidad de daños directos que ocasiona en los frutos (verdes, maduros).

Lo que pretende esta investigación es, encontrar la temperatura de comportamiento de las diferentes cepas criollas de *B. bassiana* en las fases de germinación, desarrollo y esporulación y recomendar diferentes cepas para cada zona de los yungas según el lugar y así aumentar la productividad y rentabilidad del caficultor de la región.

Materiales y métodos

Material biológico. Las brocas fueron obtenidas a partir de frutos recolectados en cafetales de la Asunta e Irupana de la provincia Sud Yungas y Carmen Pampa de la provincia Nor Yungas del Departamento de La Paz-Bolivia. Se usaron hembras de la broca momificadas y los granos de café infestados por el hongo.

Reproducción del hongo. Se usó tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* de las tres regiones colectadas (La Asunta, Irupana y Carmen Pampa). No hay estudio acerca de su grado de virulencia de estas cepas, la identificación de morfométrica de la *Beauveria bassiana* se la realizó según. (Benham & Miranda 1953)

Las cepas fueron aisladas de adultos de *H. hampei* infectados de forma natural y luego fueron conservadas en cristales de sílicagel a 4°C en el laboratorio de Fitopatología de la carrera de Ingeniería Agronómica, de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (LF-IA-UAC-CP). Las conidias fueron producidas en el medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), la germinación y esporulación del hongo se logró a (15°, 18°, 21°, 24°, 27°, 30°C, humedad relativa de 80%±5 y 12:12h (luz: oscuridad). (Velásquez 2000)

Propagación. El medio de cultivo (ADS) en placa de petri con un sacabocados se hizo varios círculos de 5 mm en las ufc de los hongos y estas se sacó y se colocó en un medio de cultivo fresco y se selló con parafilm, se llevó a la incubadora a las temperaturas de reproducción. El conteo de conidios se realizó en la cámara de Neubauer cada 24 horas, se midió el diámetro en milímetros de la ufc hasta el final de la investigación, para los resultados se hizo por medio de la formula del índice de crecimiento micelial (ICD).

$$ICD = (CF - CI) / N^{\circ} \text{ de días}$$

Donde:

ICD = Índice de crecimiento micelial

CF = Conteo Final

CI = Conteo Inicial

Concentración de conidios: Después de evaluar el crecimiento del hongo, se abrió la placa de Petri y en los discos pequeños o lentejitas se hizo un raspado superficial, llevándose a un vaso precipitado de 50 mL, que contiene 10 mL de agua destilada estéril, la lectura se hizo en la cámara de Neubauer utilizando un microscopio Olympus CH31, la determinación fue de No de conidios por mL.

$$X = X1 + X2 + X3 + X4 + X5$$

$$NC = X * 5 \times 10^4 * D$$

Donde:

NC = número de conidios por mL

X = Total de conteo de conidio en los subcuadrantes de la cámara de Neubauer.

5×10^4 = Constante de la cámara de Neubauer

D = Dilución en agua destilada

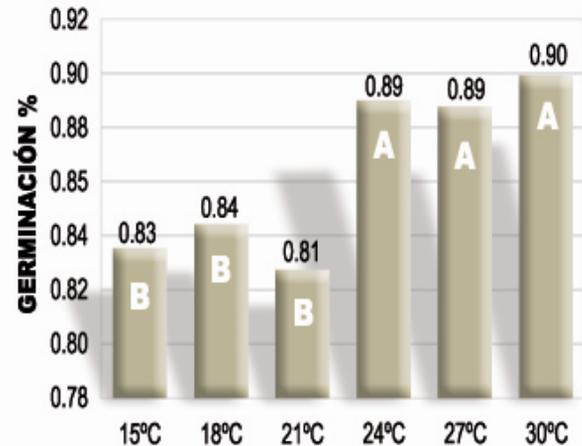
Factores de estudio

Los factores son las tres cepas criollas de *Bauveria bassiana* y las diferentes temperaturas de incubación. Las respuestas son el porcentaje de germinación, desarrollo y esporulación.

Análisis estadístico. La comparación de los resultados de realizo mediante el análisis de varianza (ANVA) que nos ayudará a determinar la variación existente. La prueba de DUNCAN nos ayuda a la comparación de medias. Los datos se analizaron con el software de estadística SAS (Minitab 2007).

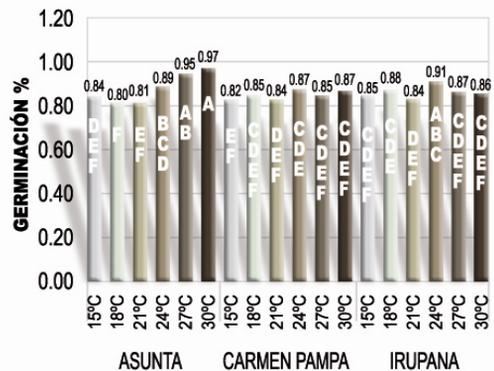
Resultados

Fig. 1 Germinación de conidios de las tres cepas criollas de *Bauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a las 8 horas, transformado con log+5



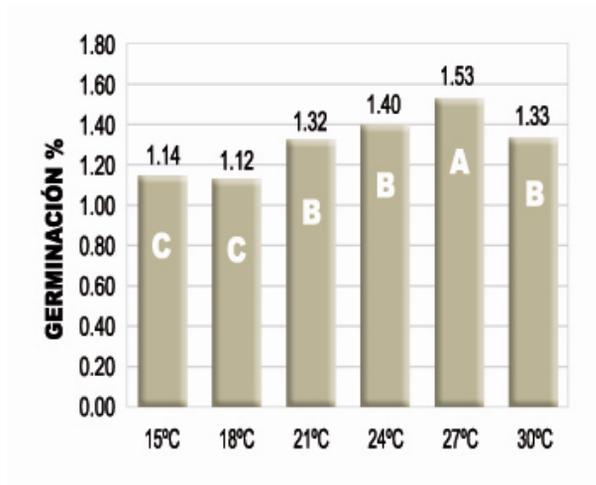
El análisis según la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) muestra que las tres cepas criollas de *Bauveria bassiana* de las zonas de recolección (Carmen Pampa, Asunta e Irupana) hubo un crecimiento a la temperatura de 24°C, 27°C y 30°C con un porcentaje de germinación de 0.89% a 0.90%, en relación a las temperaturas de 15°C, 18°C y 21°C que fue de 0.83% a 0.84%.

Fig. 2 Interacción de factores de la variable germinación de conidios de las tres cepas criollas de *Bauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a las 8 horas, transformado con log+5



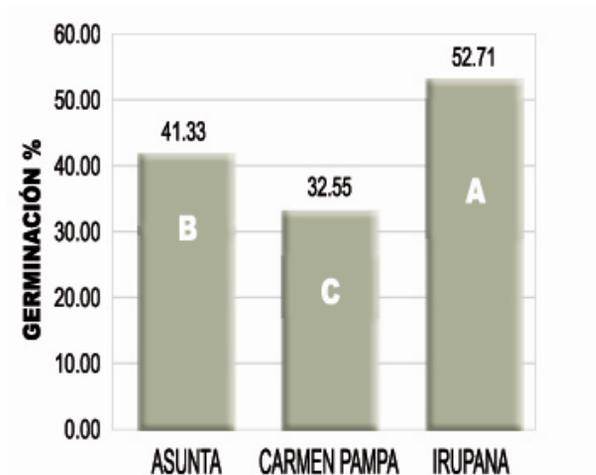
El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.05$) muestra que a 30°C de la Asunta hay mayor crecimiento frente a las cepas de Carmen Pampa e Irupana, en un 0.97% a las 8 horas, 0.89% a 24°C 0.91% de la zona Asunta e Irupana, a 15°C, 18°C, 21°C de las tres zonas y 24°C (Carmen Pampa) con una germinación que va de 0.80% a 0.87%.

Fig. 3 Germinación de conidios de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a las 16 horas, a diferentes temperaturas transformado con log+5



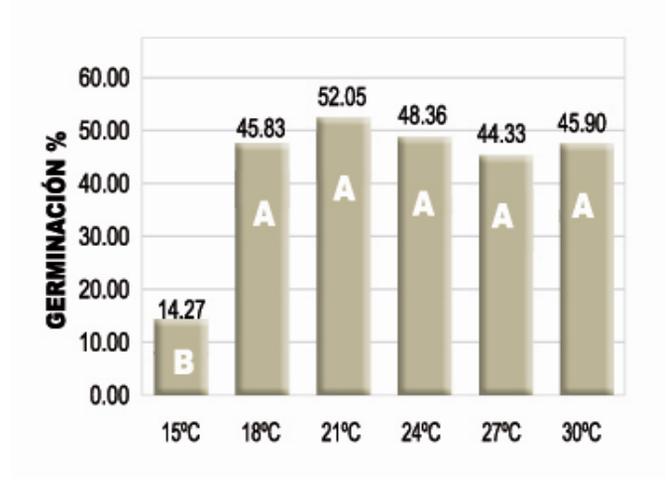
El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) a la temperatura de 27°C presenta una germinación de una 1.53% frente a las demás, seguido por los 21°C con un 1.40%, 24°C con 1.40%, 30°C con 1.33%, 15°C con 1.14% y 18°C con 1.12%.

Fig. 4 Germinación de conidios de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a las 24 horas



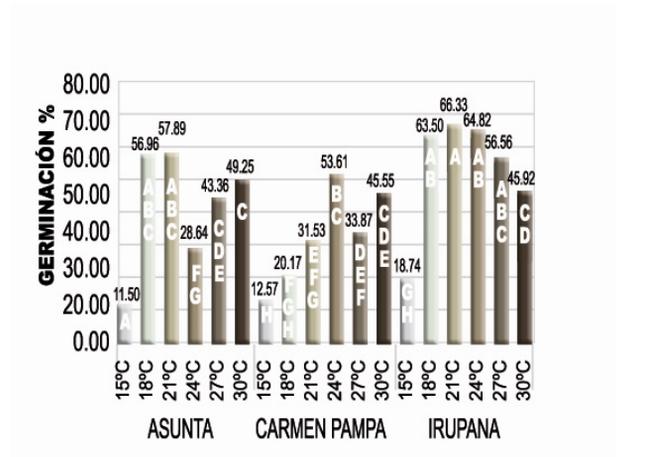
El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) muestra que la cepa de la zona de Irupana su germinación a las 24 horas presenta un 52.71%, la Asunta con 41.33% y Carmen Pampa con 32.55%.

Fig. 5 Germinación de conidios de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a las 24 horas



El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) el porcentaje de germinación de los conidios a 18°C fue de 46.88%, 21°C, 52.05%, 24°C, 48.36%, 27°C, 47.33%, 30°C, 46.90%, a 15°C con 14.27% que es el mas bajo respecto a las demás temperaturas.

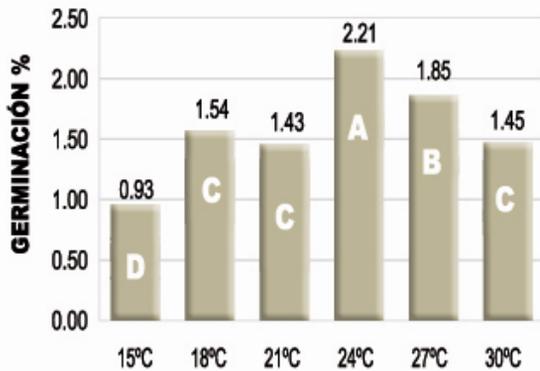
Fig. 6 Interacción de factores de la variable germinación de conidios de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a las 24 horas



El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) a las 24 horas el último conteo muestra que a 21°C un 66.73% de germinación de la cepa de la zona de Irupana, en tanto a 18°C, con 63.50%, 24°C con 64.82%, 27°C con 56.56%. La cepa de la zona La Asunta 18°C, con

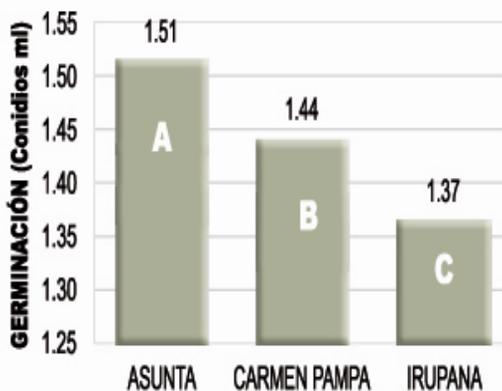
56.96%, 21°C con 57.89%. La cepa de la zona de Carmen Pampa a 24°C con un porcentaje de germinación de 53.61%.

Fig. 7 Índice de crecimiento diario de las UFC de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a diferentes temperaturas



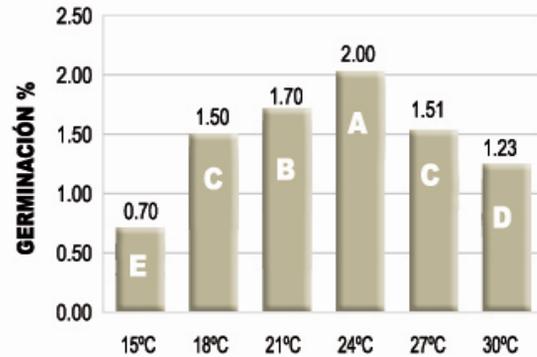
El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) a temperatura de 24°C muestra un crecimiento de la Unida formadora de colonia (UFC) de 2,21 mm seguido de 1.85mm a 27°C, observándose un rango mínimo de crecimiento de la UFC a 15°C, con 0,93 mm.

Fig. 8 Concentración de conidios de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin transformado con log+5



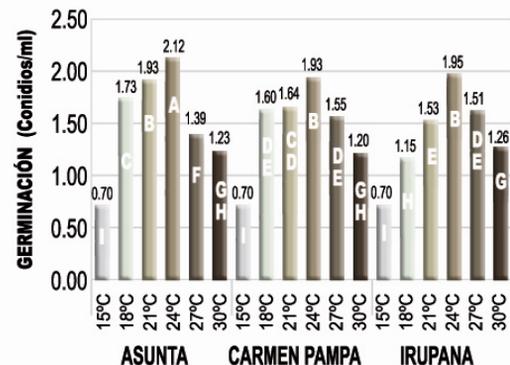
El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) la cepa criolla de la zona La Asunta presenta una concentración de 1.51 conidios/mL, la cepa de Carmen Pampa 1.44 conidios/mL, y la de la zona Irupana 1.37 conidios/mL, lo que indica que hay factores que hacen que la cepa criolla de la Asunta tenga esta mayor desarrollo en relación a las dos otras cepas.

Fig. 9 Concentración de conidios de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a diferentes temperaturas transformado con log+5



El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) a 24°C presenta 2.00 conidios/mL, a 21°C, 1.70 conidios/mL, a 18°C con 1.50 conidios/mL y 27°C con 1.51 conidios/mL, como una zona de crecimiento intermedio, a 30°C con 1.23 conidios/mL y a 15°C con una concentración de 0.70 conidios/mL, que es lo mínimo, lo que indica que hay factores intrínsecos de las cepas para que se desarrollen mejor a 24°C.

Fig. 10 Interacción de los factores de la variable concentración de conidios de las tres cepas criollas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin transformado con log+5



El análisis de la prueba de DUNCAN ($\alpha = 0.01$) se observa a 24°C la cepa criolla de la zona La Asunta presenta 2.12 conidios/mL, la cepa de Carmen Pampa 1.93 conidios/mL, e Irupana con 1.95 conidios/mL.

Discusión

Al emprender el presente trabajo, el objetivo fue determinar el damping off con el uso del hongo antagonico *Trichoderma sp*, en almácigo de café, en previos de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa. Enfocando el control biológico como “el uso de microorganismos vivos para el control de otros microorganismos”, se indica que existen avances en este campo, especialmente en lo referente a biofungicidas, cuya base es la relación antagonica que se dan entre microorganismos, especialmente entre los “hongos patógenos del suelo”, con otros microorganismos habitantes naturales del suelo, como el caso de *Trichoderma* un antagonista. También se tiene ciertas referencias de control biológico de hongos del suelo y nematodos, bajo el principio de la relación de competencia entre estos patógenos y los microorganismos del suelo, a través de la incorporación de abono orgánico (Languidez 1995)

Las principales enfermedades del café son causadas por hongos, principalmente roya (*Hemileia vastatrix*), antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*), fomosis (*Phoma* spp.), (*Phomopsis* sp.) y (*Colletotrichum* spp.), damping off (*Rhizoctonia solani*) y otros; también sufre de enfermedades bacterianas, como mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*). Entre las plagas tenemos a insectos como minador de la hoja (*Perileucoptera coffeella*) y la broca del café (*Hypothenemus hampei*), ácaros como, ácaro amarillo del café (*Oligonychus ilicis*) y nematodos (Freire et al 2002).

Conflictos de interés

Esta investigación recibió financiamiento parcial de USAID/Bolivia, la Cooperación Técnica Belga (CTB), y no presenta conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Agronómica. A la Cooperación Técnica Belga (CTB) por el financiamiento, a USAID/Bolivia por el financiamiento el los materiales de escritorio. Al Ing. José Maldonado A. e Ing. Tito Calle, por la revisión critica.

Literatura citada

- Agramont R, Cuba N, Beltrán JL, Almanza JC, Loza-Murguía MG. Crafting traps with attractant alcoholics an alternative for monitoring and control of borer coffee, *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) J Selva Andina Res Soc. 2010;1(1):2-12.
- Aristizábal LF, Jiménez QM, Bustillo AE. Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae), en fincas de caficultores experimentadores de Colombia. En Memoria del IV Congreso Internacional de Control Biológico. Mayo 31 a Junio 2. Palmira, Colombia. 2006; p.21.
- Baker P. The coffee berry borer in Colombia. Final report of the DFID-CENICAFE-CABI Bioscience IPM for coffee project (CNTR 93/1536A). 1999; 144p.

- Baker P. The coffee berry borer in Colombia. Final report of the DFID-CENICAFE-CABI Bioscience IPM for coffee project (CNTR 93/1536A). 1999; 144p.
- Baker PS. La broca del café en Colombia, informe final del proyecto MIP para el café DFID-CENICAFE-CABI. Bioscience (CNTR 93/ 1536a), Chinchiná, Colombia, 1999.
- Belpaire C, Chorquina V. Experiencias de Control Biológico de Plagas Agrícolas, vol. I. La Paz, Bolivia; Editorial Instituto de Ecología; 1998.
- Benassi VLRM. Levantamento dos inimigos naturais da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) no norte do Espírito Santo. An Soc Entomol Brasil. 1995;24:635-638.
- Benavides MP, Arévalo H. Manejo integrado: una estrategia para el control de la broca del café en Colombia. Cenicafé. 2002;53(1):39-48.
- Benham RW, Miranda JL. The genus *Beauveria*, morphological and taxonomical studies of several species and two strains isolated from whart.piling borers. Mycologia. 1953;45:727-746.
- Brun LO, Marcillaud C, Gaudichon V, Scukling D. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. J. Econ. Entomol. 1989;82:1311-1316.
- Bustillo A, Cárdenas R, Posada FJ. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. Neotrop Entomol. 2002; 31:635-639.
- Bustillo A, Gil ZN. Control Biológico de la Broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. En Memoria del IV Congreso Internacional de Control Biológico. Mayo 31 a Junio 2. Palmira, Colombia. 2006; p.36.
- Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV). Programa de Defensa contra la Broca del café. Ministerio de la Agricultura, Cuba. 2005; 21 p.
- Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV). Programa de Defensa contra la Broca del café. Ministerio de la Agricultura, Cuba. 2005; 21 p.
- Cuba N. Manual para el cultivo de café en los Yungas. Carmen Pampa-La Paz, Bolivia: Universidad católica Boliviana, Unidad Académica Campesina Carne Pampa, 2003: p. 7.
- Flórez ME, Bustillo PAE, Montoya REC. Evaluación de equipos de aspersión para el control de *Hypothenemus hampei* con el hongo *Beauveria bassiana*. Cenicafé. 1997;48(2):92-98.
- García M, Rodríguez Y, Cabrera D, Gómez L, Rodríguez MG. Producción de nematodos entomopatógenos en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la Montaña en Cuba. Rev Protección Veg. 2007;22(2):131-133.
- García R, Riera R. Desarrollo de epizootias de *Beauveria bassiana* sobre Broca del Café (*Hypothenemus hampei*) en Mérida, Venezuela. En Memoria del IV Congreso Internacional de Control Biológico. Mayo

- 31 a Junio2. Palmira, Colombia; 2006; p.20-21.
- García M. Comportamiento de la broca del café desde su detección en el país. I Taller Nacional sobre Broca del Café, Buey Arriba, Granma, Cuba, 21-22 de junio de 1999a.
- Le Pelley RH. Pests of coffee. London, Longmans Green & Co. 1968; 590p.
- López-Núñez JC. Avances en el uso de nematodos entomopatógenos para control de la Boca del café. En Memoria del IV Congreso Internacional de Control Biológico. Mayo 31 a Junio 2. Palmira, Colombia; 2006; p.20 .
- Minag. Retrospectiva y situación actual de la broca del café en Cuba», Dirección de Café y Cacao / Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Minag, La Habana, septiembre del 2003.
- Minitab. User's guide: statistical software. State College, PA. Minitab Inc. 2007; Version 15.
- Murphy ST, Moore D. Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News Inf.* 1990;11:107-117.
- Pérez I. Informe de la presencia de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en Cuba, I Taller Nacional sobre Broca del Café, Buey Arriba, Granma, Cuba, 21-22 de junio de 1999.
- Valdés DBE, Vélez APE. Procedimiento para la evaluación enzimática cualitativa de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Cenicafé.* 2000;51(2):151-168.
- Velásquez F. Selección de sepas nativas de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en 5 comunidades de Coroico (Nor Yungas), tesis licenciatura. Unidad Académica Campesina de Carmen Pampa, Universidad Católica Boliviana "San Pablo", La Paz, Bolivia. 2000.
- Vintimilla P. Mortalidad de broca de café [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] por la aplicación en el campo de cepas nativas de *Beauveria bassiana*. (Bals.) Vuill. en dos fincas cafetaleras de Costa Rica. Universidad Nacional de Costa Rica. tesis maestría. 2004;112p.
-