

***Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo**

Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* mix to control the coffee berry borer in soil fruits

JORGE L. JARAMILLO¹, ESTHER C. MONTOYA^{2,3}, PABLO BENAVIDES^{2,4} y CARMENZA E. GÓNGORA B.^{2,5}

Resumen: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son usados para controlar la broca del café. Estudios previos demostraron que una mezcla de cepas diferentes genéticamente de *B. bassiana* era más virulenta que las cepas individuales. Para validar el efecto de esta mezcla y su combinación con *M. anisopliae*, se evaluó primero la virulencia en laboratorio y el efecto sobre la oviposición del insecto; los tratamientos fueron: –mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119), –*M. anisopliae* Ma9236, –mezcla Cenicafé más Ma9236 y –agua (testigo). Posteriormente, se establecieron tres parcelas en un cultivo comercial de café y en cada parcela se asignaron los cuatro tratamientos en grupos de 50 árboles. Cada 20 días, durante cuatro meses, se colocaron cuatro frutos brocados sobre el suelo de los árboles y luego fueron asperjados con los tratamientos. Dieciocho días después de cada aplicación, se evaluó la infestación y la población de brocas en los frutos infestados de los árboles. En laboratorio, las cepas y mezclas causaron mortalidades sobre la broca entre el 91% y el 94% y la mezcla Cenicafé afectó la capacidad de oviposición del insecto hasta en un 87%. En campo, todos los tratamientos redujeron la infestación en los árboles entre el 18% y 47% respecto al testigo; se obtuvo máximo control con la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae*; con porcentajes de broca inferiores al 6,6%, disminuyendo la población en los frutos infestados en un 40%. Las aplicaciones periódicas de las cepas sobre frutos del suelo controlan la broca y disminuyen la progenie en los granos infestados.

Palabras clave: Control biológico. Hongos entomopatógenos. *Hypothenemus hampei*. Colombia.

Abstract: *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are used to control the coffee berry borer (CBB). Previous work revealed that a mixture of genetically different *B. bassiana* strains was more virulent than the single strains. To evaluate the effect of the mix of *B. bassiana* and its combination with *M. anisopliae* for controlling the CBB, we evaluated the virulence in lab and the effect on insect oviposition. The treatments applied were: –Cenicafé mix (Bb9001, Bb9024, Bb9119), –*M. anisopliae* Ma9236, –Cenicafé mix with Ma9236 and –water (control). Then, three plots were established in a commercial coffee plantation, the four treatments were randomly assigned into groups with 50 trees in each plot. Every 20 days for four months, four infested berries per tree were left onto the ground and later sprayed with the treatments. Eighteen days after applications, the infestation per tree and the population inside the infested berries were evaluated. Under lab conditions, the strains and mixtures revealed mortality rates against the coffee berry borer ranged between 91% and 94% and, Cenicafé mixture affected the insect oviposition ability up to 87%. In the field, treatment applications reduced infestation in trees ranged between 18% and 47% compared with the control; getting maximum control with the combination of Cenicafé mixture and *M. anisopliae*; this mixture, kept the insect levels in the crop under 6.6% and decreased the insect population in infested berries by 40%. Periodic applications of the fungi strains over infested berries on the ground, control the borer and decrease the progeny inside new infested fruits.

Key words: Biological control. Entomopathogenic fungi. *Hypothenemus hampei*. Colombia.

Introducción

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytinae), es el principal problema entomológico que afecta la caficultura en muchos países del mundo, debido a que ataca los frutos directamente reduciendo su valor comercial y en muchos casos, ocasiona la caída prematura de los mismos (Bustillo 2008a; Benavides *et al.* 2012).

Estudios sobre la dispersión de la broca han demostrado que los frutos infestados que se encuentran en el suelo y que caen como consecuencia del ataque del insecto o de las actividades agronómicas del cultivo, se convierten en reservorio de poblaciones y son el principal foco de dispersión del insecto. Moreno *et al.* (2001) demostraron que durante la cosecha se retiran del lote y se lleva al beneficio entre el 66% y el 74% de los estados de broca viva que hay en el lote y que entre el 4,6% y el 12,4% de esta población se queda en el suelo de los árboles al finalizar la cosecha. Además de esto,

Castaño *et al.* (2005) estudiaron la dispersión de la broca en cafetales zoqueados y encontraron que después de la eliminación del cafetal, se dejaron en el lote de 7 a 10 millones de brocas por hectárea; estas brocas infestaron ramas de árboles distanciados hasta 30 metros del lote zoqueado y se estimó que después de realizada esta actividad, volaron entre 2 a 3,5 millones de adultos de broca por hectárea, indicando que esta práctica favorece la dispersión del insecto. Por otra parte, en Cenicafé (2010), se evaluó el impacto de las brocas que emergen de los frutos brocados caídos al suelo en las futuras infestaciones de los frutos de la parte aérea de los árboles considerando la temperatura, la altitud y el evento climático que se presente en campo (Constantino 2010; Benavides 2012). Los resultados mostraron que un solo fruto brocado caído en el suelo de un cafetal ubicado a 1.218 metros de altitud puede infestar en un árbol en producción hasta 150 frutos en una época de La Niña, 590 en un periodo normal y hasta 959 en El Niño.

¹ Estudiante de Maestría en Ciencias - Entomología. Universidad Nacional de Colombia - Medellín. jorlu7@gmail.com. ² Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Plan Alto Km 4 antigua vía a Manizales, Chinchiná, Caldas, Colombia. ³ M. Sc., Biometría. estherc.montoya@cafedecolombia.com. ⁴ Ph. D., Disciplina de Entomología. pablo.benavides@cafedecolombia.com. ⁵ Ph. D. Disciplina de Entomología. carmenza.gongora@cafedecolombia.com. Autor para correspondencia.

El control de la broca del café no ha sido una tarea fácil debido a que gran parte de su ciclo de vida transcurre en el interior de los granos, donde los productos químicos no pueden actuar; por esta razón, Cenicafé ha planteado diferentes estrategias de manejo integrado para disminuir las poblaciones del insecto que emergen de los frutos infestados del suelo y mantener los niveles de plaga por debajo del umbral de daño económico (Bustillo 2008b; Benavides *et al.* 2012). Dentro de estas estrategias, el control biológico con hongos entomopatógenos ha sido una herramienta apropiada, debido a que las conidias pueden permanecer viables sobre la superficie de los granos o del suelo e infectar a los insectos una vez emergen. Las especies *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales), son hongos patógenos naturales de la broca presentes en casi todas las regiones de Colombia donde se ha dispersado y su uso es recomendado por Cenicafé (Bustillo *et al.* 1998; Bustillo 2004; Góngora *et al.* 2009; Góngora 2011).

Con el fin de obtener una mayor eficacia de estos entomopatógenos, se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos genéticos que les dan sus características de patogenicidad y virulencia (Mantilla *et al.* 2012); esta información ha sido útil en el desarrollo de mezclas de cepas, que no solo incrementan el espectro de acción, sino que también aseguran su acción bajo diferentes condiciones ambientales (Góngora 2008). Al respecto, Cruz *et al.* (2006) caracterizaron genéticamente mediante ITS, secuencias de β -tubulina y AFLPs, varias cepas del hongo *B. bassiana*, agrupando los aislamientos en tres grupos. Las pruebas de virulencia de los aislamientos sobre la broca empleando concentraciones de 1×10^6 conidias/ml mostraron que la mortalidad sobre el insecto para cada cepa fluctuó entre 57,5% y 89,1%. Al mezclar cepas de virulencia superior al 82% y diferentes genéticamente, se obtuvieron mortalidades significativamente bajas (57%), mientras que al mezclar cepas con virulencia inferior al 80% y diferentes genéticamente (Bb9001, Bb9119, Bb9024), se obtuvieron los mayores porcentajes de mortalidad, siendo promisoría esta última combinación como alternativa para evaluar en campo. Cárdenas *et al.* (2007) corroboraron que la mezcla de cepas de baja virulencia (Bb9001, Bb9119, Bb9024) causó una alta mortalidad (100%) sobre la broca del café en pruebas de laboratorio y en pruebas de campo, luego de realizar infestaciones artificiales con el insecto a ramas de árboles, se observó una mortalidad de 66,6%, indicando que es posible incrementar la eficacia del entomopatógeno. El uso de mezclas se evidenció como una alternativa en vez de la utilización de una sola cepa para el control del insecto y se abrió el campo para el desarrollo futuro de formulaciones compuestas.

Los estudios realizados por Vera *et al.* (2011), determinaron que la mezcla promisoría de cepas de *B. bassiana* (mezcla Cenicafé) aplicada al suelo sobre granos infestados en condiciones controladas, afecta las brocas que emergen de estos frutos al ocasionar mortalidades cercanas al 40%, disminuyendo los porcentajes de infestación en los árboles entre el 30 y el 50% con respecto al testigo (sin aplicación de hongos) y afecta los individuos que alcanzan a infestar los frutos sanos del árbol, de tal forma que disminuye significativamente la progenie de estas brocas. Sin embargo, estos resultados no han sido validados en campo.

En cuanto al uso de *M. anisopliae*, Milner y Lutton (1976) reportaron que este hongo está mejor adaptado a condiciones

del suelo que *B. bassiana*, se emplea ampliamente en el control de plagas a nivel de la rizosfera, mientras que *B. bassiana* está más asociada a plagas de la parte aérea de las plantas. Por lo tanto a nivel de control de poblaciones de la broca en frutos caídos, *M. anisopliae* podría ser un buen controlador, pero aún se desconoce el efecto de una combinación entre las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* aplicada al suelo. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar y validar, en condiciones de campo, el efecto de las mezclas de cepas de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el control de las poblaciones de broca que vuelan de frutos infestados del suelo y su impacto en las futuras infestaciones de la parte aérea de los árboles. Se parte de la hipótesis que al menos una mezcla de cepas de hongos entomopatógenos redujera en al menos 45% el porcentaje de infestación de broca en el campo y redujera en más de 85% la capacidad de oviposición de la broca.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en tres fases: I. Producción de los hongos y evaluación de su virulencia (Shapiro *et al.* 2005) en condiciones de laboratorio. II. Aplicación de los hongos en mezclas en condiciones de campo III. Determinación del efecto de las mezclas de entomopatógenos sobre la oviposición de la broca del café en condiciones de laboratorio.

Descripción del área de estudio. Las aplicaciones de hongos se realizaron en la estación experimental La Catalina de Cenicafé, ubicada en el municipio de Pereira, Risaralda, Colombia a 1.321 metros de altitud, con una temperatura promedio de 21,9 °C y una humedad relativa del 82%; en una plantación comercial de café variedad castillo con árboles de tres años de edad después de zoqueo, sembrados a una distancia de 2 x 1 con dos tallos por sitio.

Ensayos de laboratorio. Los ensayos de laboratorio se mantuvieron en el cuarto de incubación de hongos de la Disciplina de Entomología de Cenicafé con condiciones controladas de temperatura a 25 °C, humedad relativa del 70% y fotoperiodo de 12 h.

Fase I. Producción de los hongos y evaluación de la virulencia de las mezclas de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la broca en condiciones de laboratorio. Para la producción de los hongos, se tomaron conidias de los aislamientos Bb9001, Bb9024, Bb9119 y Ma9236 conservados en viales criogénicos con Luria Broth (LB) y glicerol al 15% a -80 °C; se sembraron en PDA y se incubaron por 15 días a 25 °C hasta obtener conidias a partir de las cuales se multiplicaron masivamente las cepas en medio de cultivo sólido a base de arroz.

Para la multiplicación masiva se preparó un medio líquido compuesto por soya (15 gr/L), azúcar blanca (10 gr/L) (Incauca®), cloruro de sodio (sal común Refisal®) (5 gr/L), carbonato de calcio (2 gr/L) (Omya S.A.S.) y cloranfenicol (0,05 gr/L) (Sigma®), mezclados homogéneamente en agua destilada. 200 ml del medio se esterilizaron en frascos de vidrio con capacidad para 400 ml durante 15 minutos a 120 °C y 15 psi. Se hicieron suspensiones de conidias de las diferentes cepas con concentraciones de $2,6 \times 10^7$ conidias por ml, se inocularon 10 ml de la solución por cada 200 ml de medio líquido y se dejaron en agitación durante tres días a 27 °C y 110 revoluciones por minuto. Posteriormente se distribuyó de manera uniforme el medio líquido sobre 350 gramos de arroz

común (Roa®) estéril en bandejas de aluminio de 35 x 56 cm las cuales se cubrieron con película extensible (cristaflex) y se dejaron en incubación a 25 °C y fotoperiodo regulado de 10 horas luz/día durante 15 días. Finalmente se tamizó el arroz en una serie de tamices (No 20, 40,60 y 80) y se coleccionaron las conidias puras, las cuales fueron almacenadas por tiempo máximo de 15 días a una temperatura de 4 °C hasta su uso y con las cuales se realizaron las aspersiones en campo. Una vez que se obtuvieron las cepas, se determinaron los porcentajes de germinación de las conidias de todas las cepas evaluadas. Cuando los hongos presentaron un valor mínimo de germinación del 90% se procedió a realizar las pruebas de virulencia en condiciones de laboratorio. Tanto para la prueba de germinación como de virulencia, se siguieron los métodos reportados por Marín y Bustillo (2002).

Los tratamientos en condiciones de laboratorio fueron: a. la mezcla de cepas de *B. bassiana* Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119), b. la cepa de *M. anisopliae* Ma9236, c. la mezcla Cenicafé junto con Ma9236 y d. un testigo con agua.

Para las pruebas de virulencia, se prepararon 10 ml de una suspensión de conidias de cada una de las cepas de *B. bassiana*: Bb9001, Bb9024 y Bb9119 y *M. anisopliae* Ma9236 a una concentración de 1×10^6 conidias por ml. Para la preparación de la mezcla Cenicafé se tomaron 3,33 ml de cada suspensión de las tres cepas de *B. bassiana* para un total de 10 ml. Para la preparación de la mezcla de cepas Cenicafé más *M. anisopliae* 9236 se tomaron 2,5 ml de cada suspensión de las tres cepas de *B. bassiana* y de la cepa de *M. anisopliae* para un total de 10 ml.

Brocas adultas, recién emergidas, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% de su formulación comercial (NaClO 5,25%) durante 10 minutos y fueron lavadas con agua destilada estéril, posteriormente se inocularon por inmersión en la suspensión de los respectivos tratamientos. Las brocas se individualizaron en viales con un rodete de papel húmedo. Cada cepa se evaluó con cuatro unidades de muestreo, donde cada una de ellas estaba conformada por 15 adultos de broca. Por cada cepa y unidad de muestreo, se registró diariamente, durante nueve días, el número de brocas vivas y muertas y el crecimiento del hongo sobre éstas (esporulación), utilizando el estereoscopio.

Con la información obtenida se determinó el porcentaje y el tiempo medio de mortalidad, para obtener los valores mínimos y máximos observados y el promedio de la prueba de laboratorio. Cuando los hongos presentaron un valor promedio de mortalidad en laboratorio sobre la broca de 88% (Góngora *et al.* 2009), se llevaron a campo para su validación.

Fase II. Aplicación de los hongos y evaluación del efecto de la mezclas de hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en las poblaciones de broca que emergen de frutos infestados del suelo. Con el fin de validar los resultados obtenidos en la fase de laboratorio, se seleccionó un lote comercial de café, este se dividió en tres parcelas y en cada parcela se seleccionaron cuatro grupos de 50 árboles cada uno (unidades de trabajo). A cada árbol se le retiraron los frutos maduros y los frutos perforados por broca, tanto en la parte aérea como en el suelo. Sobre los platos de estos árboles (suelo de cada uno) se colocaron cuatro frutos previamente infestados con brocas, aproximadamente 40 días antes, en una relación de cuatro brocas por fruto. Doce horas después de colocados los frutos, se realizó la aplicación de los tratamientos; asignados aleatoriamente en cada parcela, estas

aplicaciones se hicieron sobre los frutos dejados en el suelo y en las ramas productivas de los árboles.

Los tratamientos consistieron en la aplicación de: a. la mezcla de cepas de *B. bassiana* Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119), b. la cepa de *M. anisopliae* Ma9236, c. la mezcla Cenicafé junto con Ma9236 y d. un testigo con agua. Cada 20 días, durante cuatro meses, se repitió este procedimiento, dejando los frutos infestados en el suelo y haciendo las aplicaciones de los tratamientos empleando equipos Matabi Supragro 20® con boquilla TX3. Los equipos fueron previamente calibrados, con el fin de asegurar una dosis de 50cc de cada tratamiento en el suelo y en las ramas productivas del árbol. Cada tratamiento se asperjó a una dosis de 1×10^9 conidias, sobre los frutos brocados dejados en el suelo de cada árbol y en las ramas productivas y como testigo se aplicó únicamente agua.

La preparación de las mezclas se hizo de la siguiente manera: para la mezcla de cepas Cenicafé se pesó la cantidad de hongo que se requiere para preparar 5 litros de cada una de las cepas Bb9001, Bb9024, Bb9119 a una concentración de 2×10^{10} conidias por litro de agua y se mezclaron para obtener un volumen total de 15 litros. Para la preparación de la cepa de *M. anisopliae* Ma9236 se pesó la cantidad de hongo que se requiere para preparar 15 litros de la cepa a una concentración de 2×10^{10} conidias por litro. Para la preparación de la mezcla de cepas Cenicafé junto con *M. anisopliae* Ma9236, se pesó la cantidad de hongo que se requiere para preparar 3,75 litros de cada una de las cepas Bb9001, Bb9024, Bb9119 y Ma9236 a una concentración de 2×10^{10} conidias por litro de agua, y se combinaron para obtener un volumen total de 15 litros.

A los 18 días de aplicados los tratamientos (fechas de muestreo: 18 oct, 9 nov, 29 nov y 14 dic de 2011), se seleccionaron 40 árboles por unidad de trabajo (unidades de observación), en los cuales se registró: en la rama más productiva del estrato medio y bajo de cada árbol, el número total de frutos por rama y de estos el número de frutos brocados. La variable de interés, fue el porcentaje de infestación por broca en el árbol.

Además, cada 15 días se cosecharon en cada parcela por tratamiento, los frutos maduros, de los cuales se tomó una muestra de 1.000 g por parcela, para registrar el número total de frutos y el número de ellos perforados por broca. Al finalizar el experimento, de los frutos brocados se seleccionaron 50, para disecarlos y registrar la posición de la broca y el número de estados biológicos presentes, con el fin de determinar el número de estados por fruto (huevos, larvas, pupas y adultos). De los frutos cosechados restantes, se beneficiaron 10 kg, para determinar la relación cereza/pergamino seco y el porcentaje de infestación de broca en pergamino según el protocolo usado por la Cooperativa de Caficultores (variables complementarias).

Con la variable de interés y las variables complementarias, se estimó, por tratamiento y tiempo de muestreo, el promedio con su respectivo intervalo con un coeficiente de confianza del 95%. Para cada variable se realizó un análisis de varianza de una vía al 5% y prueba de Duncan al 5%. Para la variable estados de broca al interior de los frutos cosechados se realizó una prueba t al 5%. La hipótesis de trabajo se corroboró mediante la diferencia estadística entre tratamientos para el porcentaje de infestación en campo y la diferencia entre el promedio de al menos un tratamiento con mezcla de cepas de entomopatógenos y el testigo, que mostrará una reducción mayor del 45% a favor del último.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software SAS.

Fase III. Efecto de las mezclas de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *B. bassiana* más *M. anisopliae* sobre la oviposición de la broca del café. Con el fin de explicar el efecto de la aplicación de las mezclas de los hongos entomopatógenos en campo sobre las nuevas generaciones de la broca, se evaluaron en laboratorio, los mismos tratamientos validados en campo: a. la mezcla de cepas de *B. bassiana* Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119), b. la cepa de *M. anisopliae* Ma9236, c. la mezcla Cenicafé junto con Ma9236 y d. un testigo con agua.

Brocas adultas recién emergidas se infectaron por inmersión durante dos minutos con las suspensiones de los tratamientos en concentración de 1×10^7 conidias/ml y en el testigo con agua, siguiendo los métodos del ensayo de virulencia (Marín y Bustillo 2002). Las brocas se individualizaron en viales que contenían un grano de café pergamino con una humedad del 45%, previamente desinfectados por exposición directa a luz UV-C (< 280 nm) en cámara de flujo laminar durante 45 minutos. Por cada tratamiento se tuvieron 120 unidades de observación, que se incubaron en oscuridad a 25 °C y 70% de HR, durante 20 días.

A los 10 y 20 días de aplicados los tratamientos (tiempo de muestreo), se tomaron aleatoriamente, 60 unidades de observación por tratamiento, se disecaron y se registró el número de brocas adultas muertas y el número de estados de broca presentes (variables de interés). Se realizó una evaluación adicional en la cual se evaluaron los tratamientos sobre 30 unidades experimentales a los 45 días después de haber infectado las brocas con los hongos. Se quería observar el posible efecto de los tratamientos sobre la progenie de las brocas inicialmente infectadas, pasados 30 días, se deberían observar en los controles la progenie en estado adulto.

Por cada tiempo de muestreo y tratamiento, se estimó el promedio de las variables de interés con su respectivo intervalo con un coeficiente de confianza del 95%. Para cada variable se realizó un análisis de varianza de una vía al 5% y prueba de Duncan al 5%. La hipótesis de trabajo se corroboró mediante la diferencia estadística entre tratamientos para la variable número de estados de broca presentes y la diferencia entre el promedio de al menos un tratamiento con mezcla de cepas de hongos entomopatógenos y el testigo, que mostrara una reducción mayor del 85% a favor del último.

Resultados y discusión

Fase I. Producción de los hongos y evaluación de la virulencia de las mezclas de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la broca en condiciones de laboratorio. Las cepas de *B. bassiana* Bb9001, Bb9024, Bb9119 y la cepa de *M. anisopliae* Ma9236 empleadas en las cuatro aplicaciones cumplieron con los porcentajes de germinación establecidos en las pruebas de calidad microbiológicas ($\geq 90\%$); estas pruebas se realizaron de manera individual para cada aislamiento previo a la conformación de las mezclas (tratamientos).

Con respecto a la virulencia de la mezcla de cepas Cenicafé (Bb9001, Bb9024 y Bb9119), la cepa *M. anisopliae* 9236 y la combinación de cepas Cenicafé (Bb9001, Bb9024 y Bb9119) más *M. anisopliae* Ma9236 sobre brocas recién emergidas, se observó que a una concentración de 1×10^6 conidias/ml, todos los tratamientos causaron mortalidad superior al 88%, ocasionando la muerte de los insectos en un periodo estimado entre los 4,54 y los 6,36 días, tiempo a partir del cual comenzó el desarrollo micelial de los hongos sobre los individuos. Los valores de mortalidad fueron similares entre sí para los tres tratamientos en la mayoría de las evaluaciones y diferentes con respecto al testigo (Tabla 1);

Tabla 1. Mortalidad de adultos de *H. hampei* en laboratorio causado por las cepas y mezclas de entomopatógenos (1×10^6 conidias/ml) empleadas en campo.

Fecha	Tratamiento	Mortalidad hongo (%)	IC	Tiempo medio de mortalidad (días)	IC
29 Sep 2011	Testigo	0	0	0	0
	Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	95	3,26	4,54	0,31
	Cepa <i>M. anisopliae</i> 9236	88,3	13,5	5,3	0,35
	Mezcla Cenicafé más <i>M. anisopliae</i> 9236	91,6	9,8	4,74	0,33
20 Oct 2011	Testigo	0	0	0	0
	Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	93,3	5,3	6,36	0,36
	Cepa <i>M. anisopliae</i> 9236	93,3	7,54	5,34	0,42
	Mezcla Cenicafé más <i>M. anisopliae</i> 9236	93,3	5,3	5,42	0,44
15 Nov 2011	Testigo	0	0	0	0
	Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	93,3	5,3	5,8	0,4
	Cepa <i>M. anisopliae</i> 9236	91,6	6,25	5,73	0,35
	Mezcla Cenicafé más <i>M. anisopliae</i> 9236	91,6	8,2	6,1	0,41
02 Dic 2011	Testigo	0	0	0	0
	Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	95	3,3	4,67	0,28
	Cepa <i>M. anisopliae</i> 9236	91,6	3,3	4,62	0,34
	Mezcla Cenicafé más <i>M. anisopliae</i> 9236	90	6,5	5	0,45

Tabla 2. Mortalidad promedio en laboratorio sobre adultos de *H. hampei*, de las cepas y mezclas (1×10^6 conidias/ml).

Tratamiento	Mortalidad (%)	IC	Tiempo medio de mortalidad	IC
Testigo	0	0	0	0
Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	94,1	0,96	5,34	0,87
Cepa <i>M. anisopliae</i> 9236	91,3	2,2	5,25	0,45
Mezcla Cenicafé más <i>M. anisopliae</i> 9236	91,8	1,34	5,31	0,59

IC: intervalo de confianza (95%).

sin embargo, la mezcla de cepas Cenicafé causó en promedio mortalidades superiores (Tabla 2).

Los resultados obtenidos en laboratorio con la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae* Ma9236 mostraron un porcentaje de mortalidad inferior en comparación con la mezcla de cepas de *B. bassiana* Cenicafé (Tabla 2); sin embargo, este promedio ($91,8\% \pm 1,34$) fue similar al valor de mortalidad obtenido por Cruz *et al.* (2006) con la mezcla Cenicafé (93%), indicando que el efecto sinérgico inicial reportado entre las cepas de *B. bassiana* de la mezcla (Bb9001, Bb9024 y Bb9119), no se afectó cuando ésta fue combinada con la cepa Ma9236. El seguimiento del proceso de infección, permitió observar la presencia de micelio y conidiación de los hongos como evidencia de que la muerte de la broca fue causada por los entomopatógenos. Sin embargo, no se cuantificó cuales insectos presentaban micelio de *B. bassiana* y/o micelio de *M. anisopliae*.

Vera *et al.* (2011) corroboraron que la mezcla de cepas Cenicafé ocasionaba en condiciones de laboratorio las mayores mortalidades siendo estas superiores al 96%; pero hasta el momento, no se había evaluado el efecto de una cepa adicional, como *M. anisopliae* Ma9236, adaptada a condiciones del suelo. Los resultados mostraron que la mortalidad de la mezcla Cenicafé sobre la broca, se mantuvo con la adición de Ma9236 y que era necesario validar, en condiciones de campo, esta combinación asperjada sobre las poblaciones de broca que emergen de frutos infestados del suelo. Esta combinación de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* tendría la ventaja de que podría ser efectiva bajo diversas condiciones ambientales, tales como suelo o parte aérea de la planta.

Fase II. Aplicación de los hongos y evaluación del efecto de las mezclas de hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en las poblaciones de broca que emergen de frutos infestados del suelo. Las evaluaciones de infestación realizadas entre septiembre y diciembre de 2011 mostraron un incremento acumulado en el nivel de infestación de broca

Tabla 3. Porcentaje de infestación promedio por broca en el lote comercial de café en La Catalina.

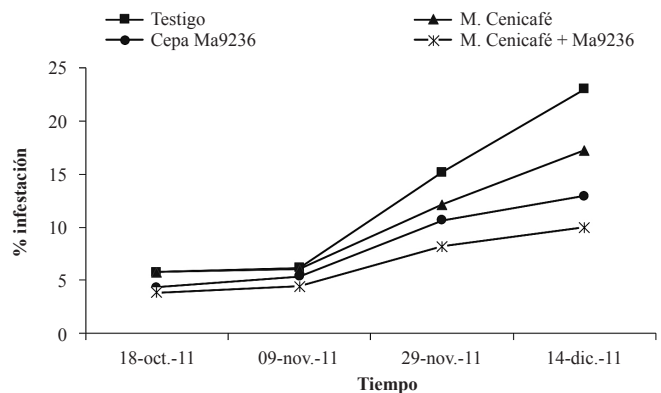
Tratamiento	Porcentaje de infestación (%)
	\bar{X}
Testigo	12,54 a*
Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	10,3 b
Cepa <i>M. anisopliae</i> 9236	8,33 c
Mezcla Cenicafé más <i>M. anisopliae</i> 9236	6,62 d

* Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P = 0,05$).

en los árboles a través del tiempo, posiblemente como consecuencia de la emergencia de adultos desde el interior de los frutos dejados en el suelo previo a las aspersiones con hongos; sin embargo, al comparar el incremento de las poblaciones de broca después de aplicar los tratamientos se observó que al comienzo de las evaluaciones no hubo diferencias significativas ($F = 2,70$; $P = 0,0451$ y $F = 1,80$; $P = 0,1458$) entre ellos; durante este periodo se dio la cosecha principal de frutos, sin embargo, en los meses de noviembre y diciembre ($F = 8,55$; $P < 0,0001$ y $F = 17,13$; $P < 0,0001$) es evidente el mayor crecimiento en la población del testigo sobre el cual fue aplicado solo agua, mientras que todos los tratamientos con hongos fueron efectivos manteniendo la infestación en niveles significativamente inferiores a los del testigo (Fig. 1). Mientras que en los ensayos de laboratorio, las cepas y mezclas evaluadas mostraron porcentajes de mortalidad similares, entre el 91,3% y el 94,1%, las aplicaciones en campo causaron diferencias en los niveles de infestación. Previamente, De La Rosa *et al.* (2000) reportaron que las cepas más eficientes en laboratorio no siempre son las más eficientes en campo.

Al final del experimento, el promedio de la infestación mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3); según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P = 0,05$), se obtuvo un mayor control sobre las poblaciones de broca que emergieron de los frutos del suelo, con la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae* Ma9236 con la cual se observó un 6,6% de infestación, seguido por *M. anisopliae* Ma9236 y la mezcla Cenicafé.

Las diferencias presentadas entre los tratamientos y el testigo en cuanto al porcentaje de broca, indicaron que la aplicación frecuente de la mezcla Cenicafé y *M. anisopliae* Ma9236 reduce hasta en un 18% y un 34%, respectivamente,

**Figura 1.** Porcentaje de infestación por broca en los tratamientos del lote comercial de café en La Catalina a través del tiempo.

la cantidad de frutos perforados y que la combinación de estos dos tratamientos redujo en un 47% la infestación, por lo cual se corrobora la primera parte de la hipótesis al encontrar una reducción en infestación superior al 45% en condiciones de campo para el tratamiento mezcla Cenicafé más *M. anisopliae* Ma9236. Vera *et al.* (2011) al evaluar en condiciones experimentales la mezcla de cepas Cenicafé bajo un diseño diferente y en una evaluación puntual luego de 30 días, obtuvieron una disminución en la infestación entre 30% y 50% con respecto al testigo en dos sitios de evaluación, mostrando la variación que se puede presentar en el control debido a las condiciones climáticas en diferentes zonas.

Los hongos se manifiestan en forma diferente con respecto a la infección y acción de control en las áreas donde han sido asperjados debido a la influencia de las condiciones ambientales sobre su desarrollo. La eficacia del hongo va a depender entre otras del tipo de suelo y su compatibilidad en relación con otros microorganismos sinérgicos o antagonistas presentes en el suelo y factores abióticos. En campo, condiciones adicionales como intensidad de luz UV, humedad, temperatura, microbiota, afectan el desempeño de los entomopatógenos (Cruz *et al.* 2006); para el caso de La Catalina, el efecto de la mezcla Cenicafé sobre la broca no se había evaluado antes, no se cuenta con datos previos, sin embargo los resultados muestran que bajo estas condiciones (medio ambiente y suelo) la combinación de la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae* Ma9236, causa los mayores porcentajes de control de la broca del café. Esta combinación de cepas (Bb9001, Bb9024, Bb9119 y Ma9236) no había sido evaluada y muestra el potencial que puede tener controlando la broca en las zonas donde las cepas de *B. bassiana* ya han sido probadas con buenos resultados.

Evaluaciones de campo en condiciones controladas con la cepa de *B. bassiana* Bb9205 y *M. anisopliae* Ma9236 aplicadas a frutos del suelo en la subestación de Maracay - Montenegro - Quindío, demostraron que *B. bassiana* fue más eficiente que *M. anisopliae* infectando las brocas que lograron llegar a los frutos en la parte aérea de los árboles (Bustillo *et al.* 1999); sin embargo, la incidencia de los hongos fue obtenida mediante la cuantificación de la infección sobre adultos de broca que se encontraban presentes en los árboles, indicando que una parte de la población pudo no haber sido cuantificada, correspondiendo ésta, a la población que pudo morir antes de alcanzar nuevos frutos ya que los datos de porcentajes de infestación en los árboles se desconocen. La medida de infestación registrada en el presente experimento en La Catalina - Pereira, Risaralda, muestra el efecto que tienen los hongos evaluados sobre las brocas antes de la colonización y, en este caso, la cepa de

M. anisopliae Ma9236 logró que una menor población de broca llegara a establecerse en los árboles en comparación con el tratamiento de la mezcla de cepas de *B. bassiana* y al combinar estos tratamientos el efecto fue mayor. A pesar del control promisorio de esta combinación sobre la broca en los frutos del suelo, no se puede concluir que el efecto de *M. anisopliae* es superior al de *B. bassiana* porque no se ha evaluado el comportamiento de *M. anisopliae* en aplicaciones sobre los frutos brocados de la parte aérea de los árboles y al respecto deben realizarse más evaluaciones. La infección o micosis de los hongos sobre los adultos de broca, debe ir acompañada de otras variables tales como los porcentajes de infestación en el árbol, para demostrar la eficacia de los entomopatógenos en un programa de manejo integrado y las evaluaciones deben realizarse en diferentes sitios con condiciones contrastantes, con el fin de observar el efecto de condiciones climáticas distintas.

Los hongos entomopatógenos tienen un mecanismo de acción general en el cual las esporas en contacto con la superficie del insecto, penetran el exoesqueleto por acción física y enzimática degradando la cutícula; la caracterización molecular del tipo de enzimas que producen estos hongos, muestra que en *M. anisopliae* existe una gran cantidad de proteasas diferentes a las reportadas en *B. bassiana* (St. Leger *et al.* 1992; Gao *et al.* 2011). Una vez que los hongos entran al hemocele producen otro juego de enzimas, además de micotoxinas las cuales ocasionan la muerte del insecto. En algunos casos la importancia de las toxinas en los procesos de patogenicidad no ha sido clara (Gillespie y Claydon 1989). Sin embargo, para el caso de *M. anisopliae*, la producción y la concentración de la toxina “destruxina”, un ciclodepsipéptido, en algunas cepas está relacionada con los procesos de virulencia del hongo (Kershaw *et al.* 1999). La toxina es responsable de afectar varias organelas celulares, causando parálisis (Roberts 1969), y por ende disfunción de los órganos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular. Otra toxina reportada corresponde al ciclohexadepsipéptido beauvericina (BEA) producida por *B. bassiana*, la cual se ha encontrado relacionada con mortalidad de larvas de *H. hampei* (Arboleda *et al.* 2004), en el caso particular de las cepas que forman la mezcla, los resultados en los niveles de producción muestran que beauvericina es producida en gran cantidad por la cepa Bb9024 mientras que la cepa Bb9001 produce muy bajas cantidades (Arboleda *et al.* 2011).

Estudios recientes, sobre la interacción entomopatógeno-insecto utilizando microarreglos y extensos grupos de secuencias de genes, indican que *M. anisopliae* es capaz de infectar un amplio grupo de insectos (Freimoser *et al.* 2005). Los patrones de expresión de genes en respuesta al creci-

Tabla 4. Promedio de la sumatoria de estados de broca encontrados en los frutos cosechados por parcela en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Población de broca inicial	EE	Población de broca final	EE
Testigo	153 A*	55,3	446,6 B	34,2
Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	423 A	207,3	244,6 A	80,3
<i>M. anisopliae</i> Ma9236	303,6 A	129,7	449 A	110,2
Cenicafé + Ma9236	430,3 A	78,3	289,3 A	13,2

EE: Error estándar. * Promedios con letras no comunes con respecto a la población inicial y final de cada tratamiento implica diferencia, según prueba T al 5%.

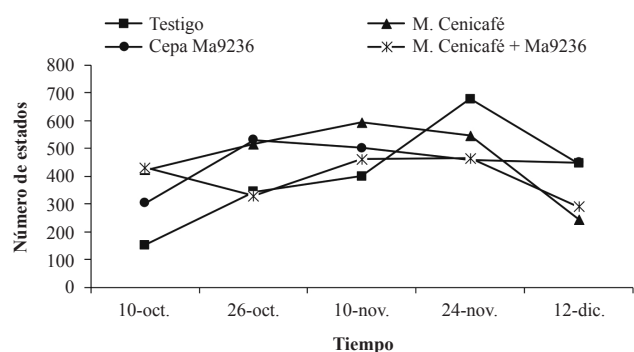


Figura 2. Promedio de la sumatoria por parcela de estados de broca encontrados en frutos de café cereza cosechados a través del tiempo en el lote comercial de La Catalina.

miento en la cutícula de otros tipos de insectos, tales como cucarachas (*Blaberus giganteus* L.) y coleópteros (*Popillia japonica* Newman), es diferente a la observada con los lepidópteros, lo que indica que el entomopatógeno responde de una forma específica y precisa ante cada insecto y condición ambiental, con un amplio grupo de genes. El efecto presentado por la mezcla de cepas Cenicafé más *M. anisopliae* Ma9236 pudo haber sido incrementado por la influencia del conjunto de proteínas y enzimas diferentes que produce el hongo *M. anisopliae*, además de las micotoxinas; a pesar de esto, el papel específico de estas enzimas y toxinas sobre algunas funciones de la broca se desconocen. Hasta ahora se está empezando a entender la interacción entre *B. bassiana* y la broca y los genes y metabolitos asociados en estos procesos (Mantilla *et al.* 2012) y el desconocimiento es aún mayor para el caso de la interacción *M. anisopliae* y la broca.

Al evaluar la broca en los diferentes tratamientos en café cereza cosechado y en café pergamino seco se observó que el promedio de infestación de estas dos variables a lo largo del experimento no mostró diferencias significativas con respecto al testigo según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P = 0,05$).

Aunque los rendimientos obtenidos en el presente experimento estuvieron dentro de los niveles comúnmente reportados para Colombia los cuales se estiman entre 4,7 y 5,3 (Álvarez 1995), los porcentajes promedio de broca presentados por los tratamientos en café cereza y en café pergamino seco superaron el umbral de daño económico debido a la presión de la broca proveniente de las liberaciones artificiales combinado con la infestación de brocas provenientes de lotes vecinos. El porcentaje de broca establecido por La Federación Nacional de Cafeteros al momento de la venta del grano, es del 2% en pergamino. Montoya (1999) encontró una relación

lineal positiva en la infestación por broca en las diferentes etapas del grano, indicando que, cuando hay mayor porcentaje de frutos perforados por broca en el árbol, mayor es el porcentaje de frutos perforados por broca en café cereza recolectado, lo cual incide en una mayor proporción de café pergamino seco y almendra perforados; además se estimó que durante la cosecha principal en zona cafetera central (octubre) el porcentaje de infestación en el café pergamino seco y en almendra corresponden al 66% y 64% de la infestación en café cereza, respectivamente.

Los resultados de estas variables complementarias no lograron explicar el efecto de las aplicaciones de los hongos sobre la calidad final del café; posiblemente, el número de árboles tomado para estimar dichas variables fue muy pequeño, además del efecto causado por las liberaciones de frutos brocados antes de las aspersiones; por lo tanto se recomienda que estas variables se estimen cuando el experimento se realice sobre poblaciones naturales de broca y en lotes donde se muestree un mayor número de árboles.

Con respecto a la variable número de estados de broca presentes en los frutos cosechados, se esperaba encontrar al comienzo de las evaluaciones una población similar entre los tratamientos debido a la extracción de frutos brocados en las ramas y en el suelo de los árboles antes de comenzar el experimento; sin embargo, se observó que el número de individuos en cada parcela fue variable encontrándose en promedio una menor cantidad de broca en el testigo (Fig. 2). La población inicial pudo haber sido afectada por la dispersión del insecto desde lotes cercanos hacia el interior de las parcelas sobre las cuales se realizaron las aplicaciones. De manera descriptiva la figura 2 muestra las fluctuaciones poblacionales a través del tiempo en los tratamientos y se observa un crecimiento de las poblaciones de broca en los frutos del testigo.

El análisis en el que se cuantificó el promedio de la sumatoria de estados de broca encontrados en los frutos cosechados por parcela en cada uno de los tratamientos, comparando la población inicial y la población final de individuos, según la prueba de T al 5%, mostró diferencias significativas para el testigo ($F = 20,33$; $P = 0,0107$) en el cual se observó un incremento tres veces mayor en las poblaciones al final del experimento, mientras que las aplicaciones con hongos sobre los frutos infestados del suelo, redujeron casi a la mitad o mantuvieron constantes el número de estados biológicos en los frutos de la parte aérea de árboles (Tabla 4). Al cuantificar el promedio de estados de broca encontrados por fruto cosechado por parcela, se encontró que en el testigo, la población de brocas por fruto permanece constante mientras que en los tratamientos se observa una disminución de las poblaciones de broca, siendo esta disminución significativa y de alrededor del 40% con la mezcla de cepas Cenicafé seguido por la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae* Ma9236 (Tabla 5).

Tabla 5. Promedio de estados de broca encontrados por fruto cosechados por parcela en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Población de broca inicial/ fruto	EE	Población de broca final/ fruto	EE
Testigo	10,5 A*	1,4	10,2 A	1
Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	15,4 A	1,7	6,5 B	1,2
<i>M. anisopliae</i> Ma9236	14,3 A	2,1	11 A	1,1
Cenicafé + Ma9236	13,4 A	0,1	7,1 B	0,3

EE: Error Estándar. * Promedios con letras no comunes con respecto a la población inicial y final de cada tratamiento implica diferencia, según prueba T al 5%.



Figura 3. Evaluación de unidades experimentales. **A)** Adulto de broca muerto al inicio de la galería. **B)** Oviposición de brocas infectadas. **C)** Oviposición de brocas sanas.

Estos resultados confirman los hallazgos de Vera *et al.* (2011) con respecto a los estados biológicos en evaluaciones realizadas en las estaciones experimentales Paraguaicito y Naranjal, puesto que las aplicaciones de hongos al suelo causaron disminución en la siguiente generación de brocas que infestaron nuevos frutos en las ramas de los árboles: esta disminución fue más efectiva para la mezcla de cepas de *B. bassiana* Cenicafé y estuvo entre el 55 y el 75% en las condiciones de campo evaluadas.

Los resultados de esta fase sugieren que la mezcla de tres cepas de *B. bassiana* y una de *M. anisopliae* puede ser efectiva para el control de la broca del café. Es necesario continuar con las evaluaciones de estas mezclas con el fin de explorar su potencial en diferentes zonas productivas donde las condiciones ambientales pueden favorecer mayores niveles de expresión de los hongos.

Fase III. Efecto de las mezclas de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *B. bassiana* más *M. anisopliae* sobre la oviposición de la broca del café. Al evaluar el efecto de los tratamientos sobre la oviposición de la broca cuando ésta es infectada por los hongos, se observó que todos los tratamientos ejercieron control sobre los insectos durante el proceso de penetración en los granos (Fig. 3A) causando entre 75% y 91,67% de mortalidad, 10 días después de la inoculación de los insectos con los hongos y entre 86,67% y 93,3% de mortalidad en la evaluación realizada 20 días después. Se presentaron para cada tiempo de muestreo, diferencias signifi-

ficativas ($F = 70,11$; $P < 0,0001$ y $F = 67,99$; $P < 0,0001$) con respecto al testigo, donde la mortalidad por factores externos al hongo fue la menor observada (Tabla 6); sin embargo, también se observó que algunos insectos infectados con el hongo alcanzaron a ingresar al fruto y ovipositaron antes de morir (Fig. 3B), presentándose un efecto significativo no solo en la mortalidad de los adultos, sino también sobre la progenie de brocas que infestaron los granos ($F = 17,89$; $P < 0,0001$ y $F = 35,35$; $P < 0,0001$), este efecto fue mayor en el tratamiento con la mezcla de cepas Cenicafé donde se observaron los valores más altos de mortalidad (Tabla 6).

Con respecto al número de estados encontrados en los frutos (Tabla 6), para el testigo infestado con brocas sanas, el número promedio de estados al interior de los frutos al cabo de 10 días es de 9,7 estados biológicos (huevos y larvas). Sin embargo, cuando una broca es infectada por acción de la mezcla de cepas Cenicafé al cabo del mismo tiempo, esta deposita en promedio únicamente 1,4 estados biológicos por grano, mientras que las brocas tratadas con la cepa de *M. anisopliae* Ma9236 y la combinación de la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae* Ma9236 dejaron en los granos entre 3,6 y 4,0 individuos respectivamente. Al cabo de 20 días la población en el testigo continuó su desarrollo alcanzando en promedio 16 estados, mientras que con el tratamiento de la mezcla Cenicafé y *M. anisopliae* alcanzaron entre 2 y 4 nuevos estados cuando se inocularon las brocas adultas y con la combinación de la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae* la población fue la misma que a los 10 días. Según la prueba de rangos múltiples

Tabla 6. Mortalidad (%) de las cepas y mezclas, sobre adultos de broca en laboratorio y su efecto en el número de nuevos estados biológicos.

Día evaluación	Tratamiento	Mortalidad (%)	Total de estados	Promedio de estados/grano
10	Testigo	11,67 c*	585	9,75 + 2,16
	Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	91,67 a	84	1,4 + 0,88
	Cepa Ma9236	88,3 a	221	3,68 + 1,6
	Cenicafé + Ma9236	75 b	245	4,08 + 1,78
20	Testigo	20 b	928	15,47 + 2,92
	Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	93,3 a	121	2,01 + 1,2
	Cepa Ma9236	86,67 a	255	4,25 + 2,1
	Cenicafé + Ma9236	90 a	242	4,03 + 1,46

* Valores con las mismas letras no son estadísticamente diferentes según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P = 0,05$).

Tabla 7. Mortalidad de las cepas y mezclas sobre adultos de broca y su efecto en el número de nuevos estados biológicos, 45 días después de la inoculación.

Tratamiento	Mortalidad (%)	Total de estados	Promedio de estados /grano
Testigo	37,7 b	818	15,6 + 5,6
Mezcla Cenicafe (Bb9001, Bb9024, Bb9119)	92,99 a	83	2,2 + 2,6
Cepa Ma9236	90 a	119	3,37 + 4,3
Cenicafe + Ma9236	79,2 a	312	8,3 + 6,8

* Valores con las mismas letras no son estadísticamente diferentes según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P = 0,05$).

de Duncan ($P = 0,05$) las diferencias significativas entre las cepas y mezclas evaluadas con respecto al testigo mostraron que todos los tratamientos fueron efectivos controlando las poblaciones de brocas adultas y disminuyeron entre el 73 y el 87% los nuevos estados biológicos en los granos al final del experimento (Fig. 4). Las brocas infectadas muestran una disminución de su tasa de oviposición, de tal forma que se observa un efecto sobre la F1 y en general en la tasa intrínseca de crecimiento de la población. Se corrobora la hipótesis de trabajo dado que la reducción en estados de broca presentes en los tratamientos superó el 85% con respecto al testigo. La observación adicional a los 45 días después de la inoculación, mostró diferencias en la mortalidad de los tratamientos con respecto al testigo (ANOVA $F = 16,01$; $P < 0,0001$). Al igual que en las fechas anteriores, se encontró que un menor número de adultos, pudieron ovipositar en los tratamientos con hongos y que la cantidad de nuevos estados en el testigo fue significativamente mayor (ANOVA $F = 5,73$; $P = 0,0011$). El porcentaje de reducción en el número de estados biológicos para los tratamientos, fluctuó entre el 47% y el 86%, siendo la mezcla Cenicafe el tratamiento más efectivo para reducir las nuevas progenies de broca en condiciones de laboratorio (Tabla 7).

Los estudios de laboratorio corroboraron las observaciones de campo con respecto a la población de broca encontrada al interior de los frutos de cada tratamiento, lo que sugiere que las aplicaciones de hongos sobre frutos infestados del suelo además de causar mortalidad sobre las brocas que volaron en busca de nuevos granos para infestar, causan disminución de la progenie de las brocas infectadas que logran colonizar un fruto sano. Estos resultados muestran la importancia de las aplicaciones periódicas de hongos entomopatógenos

dirigidas a frutos de café infestados del suelo como parte de un programa de manejo integrado que busque mantener o reducir los niveles de la plaga en el cultivo.

Literatura citada

- ÁLVAREZ G., J. 1995. El rendimiento total del café cereza. Cenicafe, Chinchiná, Colombia. 14 p.
- ARBOLEDA V., J. W.; DELGADO B., F.; VALENCIA J., A. 2004. Detección de beauvericina en el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante el uso de anticuerpos policlonales. Revista Colombiana de Entomología 30 (2): 125-130.
- ARBOLEDA V., J. W.; VALENCIA J., A.; GAITÁN, A.; GROSSI DE SÁ, M. F. 2011. Cytotoxic activity of *Beauveria* and fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: an intra-specific variation evaluation. Current Microbiology 63 (3): 306-312.
- BENAVIDES M., P. 2012. El repase: Actividad para el manejo de la broca del café en Colombia. Brocarta N° 46. Cenicafe, Chinchiná, Colombia. 1 p.
- BENAVIDES M., P.; GÓNGORA, C. E.; BUSTILLO P., A. E. 2012. IPM Program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia, Insecticides - Advances in Integrated Pest Management, Dr. Farzana Perveen (Ed.). ISBN: 978-953-307-780-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-advances-in-integrated-pest-management/ipm-program-to-control-coffee-berry-borer-hypothenemus-hampei-with-emphasis-on-highly-pathogenic-mix> [Fecha revisión: 10 marzo 2015].
- BUSTILLO P., A. E.; CÁRDENAS, M. R.; VILLALBA, D. A.; BENAVIDES M., P.; OROZCO H., J.; POSADA, F. F. 1998. Desarrollo de un programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Cenicafe, Chinchiná, Colombia. 93 p.
- BUSTILLO P., A. E.; BERNAL, M. G.; CHAVES, B.; BENAVIDES M., P. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Florida Entomologist 82 (4): 491-498.
- BUSTILLO P., A. E. 2004. Como participa el hongo *Beauveria bassiana* en el manejo integrado de la broca del café? Brocarta N° 37. Cenicafe, Chinchiná, Colombia. 4 p.
- BUSTILLO P., A. E. 2008a. Aspectos sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia. En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchiná (Colombia), Cenicafe, 466 p.
- BUSTILLO P., A. E. 2008b. Como implementar un programa de manejo integrado de plagas. pp. 94-109. En: BUSTILLO P., A. E. (Ed.). Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Cenicafe, Chinchiná, Colombia. 466 p.
- CÁRDENAS R., A. B.; VILLALBA G., D. A.; BUSTILLO P., A. E.; MONTOYA R., E. C.; GÓNGORA B., C. E. 2007. Eficacia

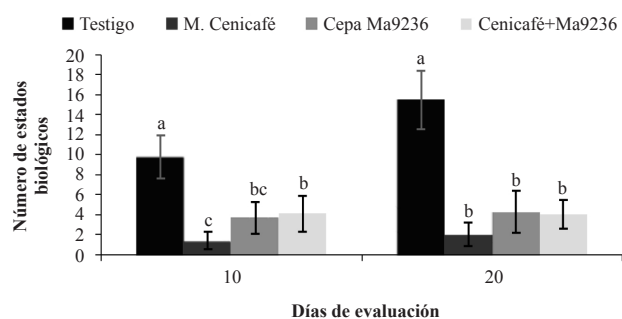


Figura 4. Número promedio de estados de broca por fruto y por tratamiento en condiciones de laboratorio. Promedios con las mismas letras no son estadísticamente diferentes según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P = 0,05$).

- de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Revista Cenicafé (Colombia)* 58 (4): 293-303.
- CASTAÑO S., A.; BENAVIDES M., P.; BAKER, P. S. 2005. Dispersión de *Hypothenemus hampei* en cafetales zoqueados. *Revista Cenicafé (Colombia)* 56 (2): 142-150.
- CONSTANTINO, L. M. 2010. La broca del café... un insecto que se desarrolla de acuerdo con la temperatura y la altitud. *Brocarta* N° 39. Cenicafé, Chinchiná, Colombia, 2 p.
- CRUZ, L. P.; GAITÁN, A. L.; GÓNGORA, C. E. 2006. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (6): 918-926.
- DE LA ROSA, W.; ALATORRE, R.; BARRERA, J. F.; TORIELLO, C. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolityidae) under field conditions. *Journal of Economy Entomology* 93 (5): 1409-1414.
- FREIMOSER, F. M.; HU, G.; ST LEGER, R. J. 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticle or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology* 151 (2): 361-371.
- GAO, Q.; JIN, K.; YING, S.-H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; DUAN, Z.; HU, X.; XIE, X.-Q.; ZHOU, G.; PENG, G.; LUO, Z.; HUANG, W.; WANG, B.; FANG, W.; WANG, S.; ZHONG, Y.; MA, L.-J.; RAYMOND, J.; ST. LEGER, R.J.; ZHAO, G.-P.; PEI, Y.; FENG, M.-G.; XIA, Y.; WANG, C. 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7 (1): e1001264. doi:10.1371/journal.pgen.1001264.
- GILLESPIE, A. T.; CLAYDON, N. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science* 27 (2): 203-215.
- GÓNGORA B., C. E. 2008. Los hongos entomopatógenos en el control de insectos. p. 133-149. En: BUSTILLO P., A. E. (Ed.). *Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana*. Cenicafé, Chinchiná, Colombia. 466 p.
- GÓNGORA B., C. E.; MARÍN M., P.; BENAVIDES M., P. 2009. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Avance técnico* 348. Cenicafé, Chinchiná, Colombia, 8 p.
- GÓNGORA B., C. E. 2011. Como usar el hongo *Beauveria bassiana* para proteger su cosecha de café. *Brocarta* N° 42. Cenicafé, Chinchiná, Colombia, 2 p.
- KERSHAW, J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. 1999. The role of destruxin in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 74 (3): 213-223.
- MANTILLA, J. G.; GALEANO, N. F.; GAITÁN, A. L.; CRISTANCHO, M. A.; KEYHANI, N. O.; GONGORA, C. E. 2012. Transcriptome analysis of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* grown on the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Microbiology* 158 (7): 1826-1842.
- MARIN, P.; BUSTILLO P., A. E. 2002. Pruebas microbiológicas y fisicoquímicas para el control de calidad de los hongos entomopatógenos. Curso internacional teórico-práctico sobre entomopatógenos y parasitoides que atacan la broca del café. Cenicafé, Chinchiná, Caldas (Colombia). Marzo 11 al 15, 72-116 p.
- MILNER, R. J.; LUTTON, G. G. 1976. *Metarhizium anisopliae*: survival of conidia of the soil, in *Proceedings of the 6th International Colloquium of Invertebrate Pathology* 428-429 p.
- MONTOYA R., E. C. 1999. Caracterización de la infestación del café por broca y efecto del daño en la calidad de la bebida. *Revista Cenicafé (Colombia)* 50 (4): 245-258.
- MORENO V., D.; BUSTILLO P., A. E.; BENAVIDES M., P.; MONTOYA, E. C. 2001. Escape y mortalidad de *Hypothenemus hampei* en los procesos de recolección y beneficio del café en Colombia. *Revista Cenicafé (Colombia)* 52 (2): 111-116.
- ROBERTS, D. W. 1969. Toxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: isolation of destruxins from submerged cultures. *Journal of Invertebrate Pathology* 14 (8): 82-88.
- SHAPIRO I., D. I.; FUXA, J.R.; LACEY, L.A.; ONSTAD., D. W.; KAYA., H. K. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88 (1): 1-7.
- ST. LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry* 204 (3): 991-1001.
- VERA, J. T.; MONTOYA, E. C.; BENAVIDES M., P.; GÓNGORA, C. E. 2011. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) emerging from fallen, infested coffee berries on the ground, *Biocontrol Science and Technology* 21 (1): 1-14.

Recibido: 9-jun-2014 • Aceptado: 24-mar-2015

Citación sugerida:

JARAMILLO, J. L.; MONTOYA, E. C.; BENAVIDES, P.; GÓNGORA B., C. E. 2015. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. *Revista Colombiana de Entomología* 41 (1): 95-104. Enero-Junio 2015. ISSN 0120-0488.