

EFICACIA DE MEZCLAS DE CEPAS DEL HONGO *Beauveria bassiana* EN EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ

Ángela B. Cárdenas-Ramírez*; Diógenes A. Villalba-Guott**; Álex E. Bustillo-Pardey**;
Esther C. Montoya-Restrepo***; Carmenza E. Góngora-Botero**

RESUMEN

CÁRDENAS R., A.B.; VILLALBA G., D.A.; BUSTILLO P., A.E.; MONTOYA R., E.C.; GÓNGORA B., C.E. Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Cenicafé* 58(4): 293-303.2007.

En el laboratorio y el campo se evaluó la mortalidad de la broca del café, causada por siete cepas del hongo *Beauveria bassiana*, una mezcla de cepas de alta virulencia y otra de cepas de baja virulencia. En el laboratorio se estimó el porcentaje de mortalidad del insecto, infectando brocas con suspensiones del hongo de 1×10^6 esporas/mL. En el campo se emplearon parcelas de 25 árboles con diez repeticiones, distribuidas bajo un diseño completamente aleatorio. Por parcela se seleccionó un árbol y de éste una rama con 50 frutos, sobre las cuales se realizaron infestaciones artificiales del insecto. Después de 24h, las ramas infestadas se asperjaron empleando una dosis de 2×10^7 esporas/rama de cada tratamiento. Después de 30 días, se evaluó la mortalidad de los insectos mediante la disección de los frutos. En el laboratorio la mayor mortalidad se obtuvo con la mezcla de cepas de baja virulencia (100%) y la menor, con la cepa Bb9024 (53,3%). En el cafetal se registró la mayor mortalidad con la mezcla de cepas de baja virulencia (66,6%) y la menor con la cepa Bb9020 (53,1%), entre las cuales hubo diferencias estadísticas, pero no con el resto de los tratamientos. Se concluye que con la mezcla de cepas de baja virulencia se obtienen mayores porcentajes de mortalidad. La mezcla de cepas de alta virulencia se comportó de una manera diferente en el campo, lo cual implica interacciones desconocidas con el medio ambiente.

Palabras clave: Patogenicidad, *Hypothenemus hampei*, diversidad, sinergismo, antagonismo, control biológico, entomopatógenos.

ABSTRACT

Under laboratory and field conditions coffee berry borer mortality rate caused by seven stocks of the *Beauveria bassiana* fungus, a mixture of high-virulence stocks and another one of low-virulence stocks was evaluated. In the laboratory, the insect mortality percentage was calculated by infecting coffee berry borers with 1×10^6 spores/mL. In the field, 25-tree plots with three repetitions distributed through a completely randomized design were used. One tree per plot and a branch with 50 berries were selected to make artificial infestations of the insect. After 24h, the infested branches were sprayed using a dose of 2×10^7 spores/branch for each treatment. After 30 days, the insects mortality was assessed through berries dissection. In the laboratory, the highest mortality was obtained through a mixture of low-virulence stocks (100%) and the lowest with the stock Bb9024 (53.3%). In the coffee plantation, the highest mortality was registered with the low-virulence stocks mixture (66.6%) and the lowest with the stock Bb9020 (53.1%), there were statistic differences between them, but not with the rest of the treatments. It is concluded that with the mixture of low-virulence stocks high mortality percentages are obtained. The high-virulence stocks mixture behaved in a different way in the field, which implies unknown interactions with the environment

Keywords: Pathogenicity, *Hypothenemus hampei*, diversity, synergism, antagonism, biologic control, entomopatogens.

* Estudiante Agronomía, UNISARC, Santa Rosa, Caldas.

** Investigador Asociado, Investigador Principal e Investigador Científico III. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Investigador Científico III. Biometría. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

El cultivo del café en Colombia se había mantenido libre de daños graves por el ataque de insectos hasta la aparición de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), en el año 1988 (6). Este insecto se reproduce en el interior de los frutos y ocasiona su caída prematura, así como la reducción en la calidad del café en taza (17). Para su control, la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia por medio del Centro Nacional de Investigaciones de Café-Cenicafé, implementó el manejo integrado de la broca (MIB), con prácticas de control cultural, biológico y químico (4, 6, 9). Dentro del MIB el componente de control biológico, con el hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, juega un papel muy importante en la regulación de poblaciones del insecto (20).

La broca del café es susceptible al ataque de *B. bassiana*. Su infección inicia con la adhesión de las esporas sobre su integumento; éstas germinan y penetran mediante un proceso físico y químico que involucra la producción de enzimas, posteriormente, el hongo invade la cavidad hemocélica del insecto y ocasiona su muerte debido a deficiencias nutricionales, destrucción de los tejidos y por la liberación de toxinas (6). Una vez el hongo ha crecido dentro del insecto sale de él a través de los tejidos destruidos y lo cubre con estructuras miceliales. Finalmente, bajo condiciones ambientales adecuadas de humedad y temperatura ocurre la conidiogénesis.

En el cepario de Cenicafe existen 233 aislamientos del hongo *B. bassiana* originarios de diversos países y aislados de diferentes órdenes de insectos (25), dentro de los cuales la cepa Bb9205 es considerada como el aislamiento con las mejores características por su alta producción de esporas, virulencia y rápida mortalidad de la broca del café (15). En diferentes estudios con el empleo

de la cepa Bb9205, se han logrado obtener porcentajes de mortalidad de la broca por acción del hongo, entre el 90 y el 100% en el laboratorio, y entre el 30 y el 60% en el campo (2, 6, 8, 12, 13, 22).

Evaluaciones en el campo han demostrado que a medida que se incrementa la concentración de esporas se obtiene una mayor mortalidad en poblaciones de *H. hampei*, sin embargo, se considera que una concentración de 1×10^9 esporas/árbol es la más eficaz (5, 6, 7). Las aspersiones deben ir dirigidas a la parte productiva del árbol y se deben realizar entre las 6 y 10 de la mañana y/o entre las 4 y 6 de la tarde. Además, se debe utilizar un aceite agrícola como coadyuvante y evitar la mezcla con insecticidas o fungicidas (8, 26).

En Cenicafe se están llevando a cabo diferentes experimentos empleando el hongo *B. bassiana* con el objetivo de aumentar la virulencia del entomopatógeno sobre la broca del café, con el empleo de técnicas como la identificación de genes del hongo involucrados en el proceso de infección (14) y el uso de la diversidad genética de las cepas con el fin de producir mezclas que sean más eficaces, dentro del cual se encuentra enmarcada esta investigación (11).

Aplicar una sola cepa seleccionada por su virulencia hacia un insecto puede resultar en una supresión corta y limitada de la plaga, y dos o más cepas diferentes genéticamente pueden ser requeridas para iniciar y mantener una epizootia en una población de insectos heterogénea en el campo (3, 21). El uso de mezclas de biocontroladores ya ha sido reportado en diferentes partes del mundo, y en todos los casos los mejores resultados se han obtenido cuando se han utilizado mezclas de cepas, y no cuando se ha aplicado una sola cepa (1, 18, 24, 28, 29).

En un estudio previo se diferenciaron genéticamente 11 cepas de *Beauveria* y se evaluó en el laboratorio el efecto de las cepas individuales, diferentes genéticamente, y en mezcla sobre la mortalidad de la broca del café, se empleó una concentración de 1×10^6 esporas/mL. El análisis Cluster de las secuencias permitió agrupar las cepas en tres grupos genéticos y los resultados con respecto a la patogenicidad de las cepas y las mezclas de cepas, permitieron observar efectos sinérgicos y antagónicos, ya que al mezclar cepas similares genéticamente no se observaron diferencias significativas respecto a la virulencia. Al mezclar cepas con virulencias superiores al 85% y diferentes genéticamente, se obtuvieron mortalidades de la broca alrededor del 57%, mientras que al mezclar cepas con virulencias inferiores al 80%, también diferentes genéticamente, se obtuvieron los mayores porcentajes de mortalidad (93%), y se mostró el potencial biocontrolador de esta mezcla como promisorio (11).

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar la eficacia de seis cepas del hongo *Beauveria bassiana*, una mezcla de cepas de alta virulencia y una mezcla de cepas de baja virulencia, en el laboratorio y en el campo, para el control de la broca del café.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el laboratorio y en el campo se evaluó la mortalidad de la broca del café, causada por seis cepas del hongo *B. bassiana*, una formulación comercial, una mezcla de cepas de alta virulencia y una mezcla de cepas de baja virulencia, seleccionadas con base en un trabajo previo realizado por Cruz *et al.* (11) (Tabla 1). Las pruebas de laboratorio se realizaron en las instalaciones de la Disciplina de Entomología del Centro

Nacional de Investigaciones de Café. Las pruebas de campo se desarrollaron en la finca Tamboral, ubicada en la Vereda Alto Lisboa, del municipio de Manizales (Caldas), en un lote de café variedad Colombia, en zoca de 20 meses de edad, sembrado a una distancia de 1,30 x 1,30m en triángulo, a libre exposición solar, a una altitud de 1.070m y una pendiente menor al 20%.

Pruebas en el laboratorio. Mediante pruebas microbiológicas y físico-químicas de control de calidad para productos biológicos (19), se evaluaron cuatro formulaciones comerciales del entomopatógeno *B. bassiana* y se seleccionó la mejor, con base en el porcentaje de germinación y de virulencia, para emplearla como testigo comercial del experimento.

Las cepas de *B. bassiana* utilizadas en el experimento se recuperaron del cepario de Cenicafé, realizando la siembra de cada una en medio nutritivo Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubándolas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, durante 20 días. Con las esporas obtenidas de cada cepa en el medio PDA, se realizó una nueva siembra utilizando el medio agar-agua con adultos de broca al 10% y se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, durante 20 días, con el propósito de aumentar la virulencia del hongo. Posteriormente, se utilizó el inóculo para producir el hongo, para lo cual se empleó como sustrato 50g de arroz y 50mL de agua destilada, en bolsas plásticas de polipropileno tapadas con motas de algodón y esterilizadas. Se sembraron cuatro bolsas con cada una de las cepas y se incubaron durante 30 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Una vez esporularon las cepas sobre el arroz, se realizaron pruebas de germinación y se determinó la concentración de esporas para cada una de ellas y a partir del porcentaje final de germinación, de cada cepa se seleccionó la bolsa que presentó mayor viabilidad. Con los datos de concentración obtenidos se realizaron los cálculos respectivos para las

pruebas de patogenicidad en el laboratorio y en el campo y se prepararon las dos mezclas correspondientes a las cepas de alta (Mezcla A) y de baja virulencia (Mezcla B) (Tabla 1). Se utilizaron suspensiones de 1×10^6 esporas/mL/cepa, se tomaron cantidades iguales de las mismas, y se obtuvo un volumen final de 10mL/mezcla.

Para la prueba de patogenicidad en el laboratorio se tomaron los insectos y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5,6%, durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril (ADE) y se inocularon con cada uno de los tratamientos (Tabla 1), para lo cual se sumergieron en una suspensión de esporas del hongo en una concentración 1×10^6 esporas/mL. Luego, las brocas se dispusieron individualmente, en viales de vidrio con rodetes de papel toalla humedecido con ADE y se taparon con algodón. Durante ocho días, se hidrató cada vial con ADE diariamente y se mantuvieron a $25^\circ\text{C} \pm 2$. Se registró la mortalidad diaria de las brocas y el crecimiento del hongo sobre éstas, mediante la observación en estereoscopio.

Para las pruebas realizadas a cada tratamiento (Tabla 1), al igual que para la selección de la formulación comercial como testigo del experimento, se utilizaron seis unidades experimentales (repeticiones) donde cada unidad experimental estuvo conformada por diez adultos de broca, asignados aleatoriamente a los tratamientos.

Al finalizar la evaluación, con los datos obtenidos de la mortalidad diaria de la broca y el crecimiento del hongo sobre los insectos, se analizaron las variables de respuesta: porcentaje de mortalidad de las brocas por el hongo y tiempo medio de mortalidad de las brocas por acción de los tratamientos, con las cuales se realizó una estimación del promedio de mortalidad y su variación por tratamiento. Un análisis de varianza de una vía al 5% y las pruebas de Duncan y Tukey al 5%, para seleccionar el tratamiento con el mayor porcentaje de mortalidad y el menor tiempo medio de mortalidad de las brocas por su acción.

Pruebas en el campo. Con el mismo inóculo utilizado en las pruebas en el laboratorio se realizó la evaluación de los tratamientos en el campo (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas y mezclas de cepas de *Beauveria bassiana* evaluadas en el experimento en el laboratorio y en el campo.

Tratamiento	Cepas y mezclas de cepas
1	Bb9020
2	Bb9023
3	Bb9205
4	Bb9001
5	Bb9119
6	Bb9024
7	Mezcla A (Bb9020 + Bb9023 + Bb9205)
8	Mezcla B (Bb9001 + Bb9119 + Bb9024)
9	Formulación comercial
10	Testigo dentro del diseño
11	Testigo fuera del diseño

Cada tratamiento constó de una parcela conformada por 25 árboles, de los cuales se seleccionó como parcela efectiva el árbol central del surco, y de éste, como unidad experimental, una rama de la zona productiva, a la cual se le dejaron 50 frutos entre 120 y 150 días de desarrollo, aproximadamente. Para cada tratamiento, se utilizaron diez repeticiones, determinadas estadísticamente con los siguientes criterios: varianza estimada de 121,29, asociada al promedio corregido del porcentaje de mortalidad de broca, una diferencia mínima aceptable del 10% de mortalidad, un nivel de significancia del 5% y una potencia de la prueba mayor del 90%, datos estipulados según los antecedentes de otra investigación (11).

En cada una de las ramas se instaló una manga entomológica que consta de una estructura cilíndrica, construida con alambre # 10 de 40cm de largo y 20cm de diámetro, cubierta con tela de muselina blanca. En el interior de cada manga entomológica se realizó una infestación artificial con 100 adultos de broca recién emergidos, y ésta se cerró inmediatamente con fibra de polipropileno (27). Después de 24 horas, se observó que más del 50% de los frutos estuvieran infestados, se retiraron las brocas que no penetraron y se realizó la aplicación de los tratamientos.

Se estableció la dosis de aplicación de cada tratamiento con una concentración final de 2×10^7 esporas en un volumen de 0,9cc/rama, calculada con base en el promedio del número de ramas y de la altura de las plantas del lote, a partir de la dosis recomendada de 1×10^9 esporas en 50cc de agua/árbol. Para la preparación de los tratamientos se tomó la cantidad necesaria de cada cepa, la cual dependió del porcentaje de concentración de esporas cuantificada en el laboratorio, se mezcló con 2cc de aceite agrícola "Carrier" y se desprendieron las esporas lavando el

arroz con el volumen de agua necesario. La aplicación se realizó utilizando un equipo de aspersión de presión previa retenida, Triunfo 40-100-10, con una boquilla TX-3.

Se utilizó un diseño completamente aleatorio, en el cual se ubicaron dos parcelas testigo, una dentro del diseño experimental y otra fuera, las cuales fueron infestadas con las brocas pero no se asperjaron con el hongo, con el propósito de observar el nivel de contaminación por la presencia del entomopatógeno y hacer la corrección estadística de los tratamientos.

Después de 30 días de la aplicación de los tratamientos, se cortaron las ramas seleccionadas de cada tratamiento y se dispusieron los frutos individualmente en bolsas plásticas, los cuales se llevaron al laboratorio, se disecaron y se registró el número de adultos de broca vivos, muertos sin signos y muertos con signos del hongo.

Con los registros de las brocas, obtenidas mediante la disección de los frutos, se realizó una estimación del promedio del porcentaje de brocas muertas por el hongo y su variación para cada uno de los tratamientos, un análisis de varianza bajo el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio con la variable porcentaje sin corregir de brocas muertas y las pruebas de Dunnett y Tukey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas en el laboratorio. En relación con la evaluación de los tratamientos correspondientes a las formulaciones comerciales, se pudo detectar que con la formulación número 1 se registró el mayor porcentaje de germinación (79,5%), la cual fue estadísticamente diferente a las demás, seguida por la formulación comercial número 4 (58,3%), que también

presentó diferencias estadísticas con los otros productos. Con la formulación número 3 se registró el menor porcentaje de germinación (12,8%). En términos generales, con un tiempo de evaluación de 24 horas, se observaron porcentajes de germinación muy bajos (menores al 80%), aunque se utilizaron productos frescos. En cuanto a la variable porcentaje de mortalidad de las brocas por acción de las formulaciones comerciales evaluadas, no se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, todos estuvieron entre el 95 y el 100%. Con estos resultados y el hecho de que la formulación número 4 presentó el mayor cubrimiento micelial y la mayor esporulación sobre los insectos con respecto a las demás, ésta fue seleccionada como la formulación comercial para las pruebas en el laboratorio y en el campo.

Con respecto a los tratamientos correspondientes a las cepas y las mezclas no formuladas, para la variable porcentaje de mortalidad de las brocas el análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos y la prueba de comparación de Tukey indicó

que la Mezcla B presentó los mayores porcentajes de mortalidad y el menor porcentaje lo registró la cepa Bb9024 (Tabla 2). Al excluir la cepa Bb9024 y la Mezcla A, el porcentaje de mortalidad de las brocas por acción de los tratamientos fluctuó entre el 73,3% y el 100%, en el testigo absoluto no se registró mortalidad de las brocas por efecto del hongo.

Estos resultados, concuerdan con los obtenidos en otro estudio realizado por Cruz *et al.* (11), en el laboratorio, donde se observaron valores descriptivamente similares y con los cuales se concluye que con la mezcla de cepas de alta virulencia (Mezcla A) se obtuvieron porcentajes de mortalidad por debajo del 60%, mientras que con la mezcla de cepas de baja virulencia (Mezcla B), se registraron porcentajes de mortalidad superiores al 90%, y éstos a su vez, fueron mayores a los obtenidos con la cepa Bb9205, considerada como la cepa más patogénica del cepario de Cenicafé, razón por la cual se ha utilizado en diferentes formulaciones para el control de la broca del café en el campo.

Tabla 2. Promedio y variación para la mortalidad (%) y el tiempo de mortalidad (días) de *Hypothenemus hampei* por acción de los tratamientos de *Beauveria bassiana* evaluados en el laboratorio, empleando una concentración de 1×10^6 esporas/mL.

Tratamiento	Mortalidad(%)		Tiempo (días)	
	\bar{X}	C. V. (%)	\bar{X}	C. V.(%)
Bb9020	81,7 bcd	4,9	6,5 b	8,2
Bb9023	83,3 bc	6,2	6,5 b	4,4
Bb9205	88,3 b	4,6	6,5 b	8,1
Bb9001	76,7 cd	6,7	5,5 c	7,5
Bb9119	73,3 de	7,0	5,9 bc	6,1
Bb9024	53,3 f	9,7	6,5 b	13,9
Mezcla A (Bb9020 + Bb9023 + Bb9205)	65,0 e	8,4	6,2 b	5,7
Mezcla B (Bb9001 + Bb9119 + Bb9024)	100,0 a	0,0	5,9 bc	6,0
Formulación Comercial	83,3 bc	6,2	7,1 a	3,5

Letras distintas indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 5%. C.V. Coeficiente de variación. \bar{X} : Promedio; C.V.: Coeficiente de variación.

Estos resultados confirman el potencial de esta mezcla como biocontrolador de la broca.

Para la variable tiempo medio de mortalidad de las brocas por acción del hongo en el laboratorio, la prueba de Tukey (5%) mostró diferencias estadísticas significativas a favor del tratamiento Bb9001. La Mezcla B y la cepa Bb9119 tuvieron tiempos de mortalidad menores que los demás tratamientos, pero mayores al compararlos con el tiempo obtenido con la cepa Bb9001. Los tratamientos que más tardaron en causar mortalidad de las brocas fueron la Mezcla A y las cepas Bb9020, Bb9024, Bb9023 y Bb9205, los cuales fueron más rápidos que el tratamiento correspondiente a la formulación comercial, no obstante, la diferencia del tiempo de acción registrada entre tratamientos no fue amplia (Tabla 2).

Pruebas en el campo. El análisis de varianza para el porcentaje de brocas muertas por acción del hongo en el campo mostró efecto de los tratamientos ($p < 0,05$). Con respecto a los testigos ubicados dentro y fuera del diseño experimental, se presentaron diferencias a favor de los tratamientos, pero entre los dos testigos no se presentó diferencia estadística (Tabla 3).

Los porcentajes de mortalidad de las brocas por acción del hongo, logrados en la fase de campo en este experimento, estuvieron entre el 50,3 y 66,6% (Tabla 3), resultados descriptivamente similares a los obtenidos en otras investigaciones de Cenicafé, en los cuales se usaron dosis entre 1×10^8 y 1×10^9 esporas/árbol (5, 6, 7); cabe anotar que con la mezcla de cepas de baja virulencia (Mezcla B) se obtuvo un porcentaje de mortalidad de

Tabla 3. Promedio y variación de la mortalidad de *Hypothenemus hampei* por acción de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* evaluados en el campo, empleando una dosis de 2×10^7 esporas/rama del árbol.

Tratamiento	Mortalidad (%)	
	\bar{X}	C. V.(%)
Bb9020	53,1 b	8,7
Bb9023	55,5 ab	16,2
Bb9205	59,6 ab	11,4
Bb9001	54,1 ab	15,5
Bb9119	58,3 ab	16,4
Bb9024	55,1 ab	21,9
Mezcla A (Bb9020 + Bb9023 + Bb9205)	60,2 ab	11,5
Mezcla B (Bb9001 + Bb9119 + Bb9024)	66,6 a	15,8
Formulación comercial	56,6 ab	17,7
Testigo dentro de la parcela	19,5	63,9
Testigo fuera de la parcela	8,4	63,7

Letras distintas indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey al 5%. C.V. : \bar{X} : Promedio; C.V.: Coeficiente de variación.

66,6%, valor superior a los obtenidos en las investigaciones antes mencionadas.

El porcentaje de mortalidad de la broca por efecto del hongo, obtenido en la parcela testigo ubicada dentro del diseño experimental, fue de 19,5%, por lo cual se hace necesario tener precaución en los estudios de este tipo para evitar que el testigo no sea influenciado por la dispersión del hongo. Por otra parte, el porcentaje de mortalidad de la broca por efecto del hongo, obtenido en la parcela testigo ubicada fuera del diseño (8,4%), sugiere una infección por el entomopatógeno en forma natural. En todo caso, esto se puede corregir estimando el porcentaje de mortalidad de los tratamientos con relación al porcentaje obtenido en el testigo.

En el laboratorio se observó una mejor discriminación de los tratamientos, con una diferenciación estadística de tres grupos de virulencia: alta (100%), media (entre 73,3 y 88,3%) y baja (53,3%). En el campo solamente se diferenciaron dos grupos de virulencia: media (máxima virulencia 66,63%) y baja (53,1%). La mezcla de cepas de baja virulencia (Mezcla B) consistentemente presentó los mejores valores de virulencia sobre la broca del café con respecto a los demás tratamientos evaluados, tanto en el laboratorio como en el campo.

Las condiciones de laboratorio son óptimas para el desarrollo del hongo y del proceso de infección, mientras que en el campo existen variaciones microclimáticas, como la humedad relativa y la temperatura, que pueden afectar la viabilidad y la persistencia del hongo y disminuir su eficacia sobre el insecto (16), lo cual explicaría la reducción observada en los porcentajes de mortalidad en el campo, inferior al 100%. En este experimento el promedio de la humedad relativa en el campo estuvo alrededor del 84% y la temperatura en 22°C, aunque no se tienen registros

de los valores máximos y mínimos. Estos valores no corresponden a los manejados en condiciones de laboratorio.

En el laboratorio, los menores porcentajes de mortalidad de la broca se registraron con la cepa Bb9024 y la Mezcla A. En el campo la cepa Bb9024 continuó mostrando este comportamiento, mientras que la Mezcla A, se ubicó dentro del grupo de tratamientos con los promedios más altos de virulencia. Al parecer, en el laboratorio las cepas de alta virulencia tienen condiciones para competir, de tal manera que se da una relación de antagonismo, contrario a la situación observada en el campo donde se registró un comportamiento más sinérgico. El antagonismo de las líneas muy agresivas, en el laboratorio, podría darse por la inhibición del desarrollo de otras, tanto afuera como adentro del hospedero (11). En el campo no se presentó este fenómeno de competencia y se favoreció la virulencia por influencia del medio ambiente en la interacción *B. bassiana* - broca.

Thomas *et al.* (23) determinaron que mezclas interespecíficas de dos patógenos, según las condiciones ambientales, pueden interactuar de manera independiente, sinérgica o antagónica. En el caso de las mezclas de *Beauveria* de baja patogenicidad contra la broca, se observó una mayor virulencia, que podría deberse a una complementación de los mecanismos de invasión e infección entre líneas genéticas. Con respecto a la mezcla de cepas de baja virulencia, la relación de sinergismo persiste tanto en el laboratorio como en el campo.

Se corrobora que el uso de mezclas que consideren la diversidad genética puede aumentar el control del insecto. Con el hongo *Trichoderma* como controlador de diferentes fitopatógenos como *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp., se ha demostrado que

el uso de mezclas de cepas del antagonista incrementa la virulencia sobre el patógeno (1). De manera similar, al evaluar la eficacia de dos especies de los hongos *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control del picudo de la vid, *Naupactus xanthographus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae), se observó que la mezcla de los entomopatógenos logró controlar definitivamente al insecto (24).

En condiciones naturales, la presencia de diversidad de cepas de *Beauveria* ha sido reportada, lo cual sugiere que el desarrollo de una infección exitosa requiere de la mezcla de genotipos que difieren genéticamente (10). Nuestro siguiente paso será determinar las causas de las diferencias encontradas entre las evaluaciones de virulencia en el laboratorio y en el campo y cual es el tipo de interacciones que se presentan al interior de las mezclas bajo esas dos condiciones.

En este estudio puede concluirse que:

- La mezcla de cepas de baja virulencia (Bb9001 + Bb9119 + Bb9024) mostró los valores promedios más altos de mortalidad sobre la broca del café, tanto en el laboratorio (100%) como en el campo (67%).
- Con la mezcla de cepas de alta virulencia (Bb9020 + Bb9205 + Bb9023), en el laboratorio, se obtuvo un bajo porcentaje de mortalidad de la broca, pero en el campo el mismo tratamiento mostró un buen resultado de mortalidad (60%).
- En el campo existe una presencia natural de *B. bassiana* que causa mortalidades sobre la broca, alrededor del 8%.
- Las diferencias estadísticas de la virulencia, registradas en el campo, no resultaron tan evidentes como en el laboratorio.

- Desde el punto de vista biológico, la mortalidad del 66,63% alcanzada sobre la broca del café, es un resultado importante, que indica cómo se puede incrementar la eficacia del entomopatógeno.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia - Centro Nacional de Investigaciones de Café, a la Bacterióloga Patricia Marín Marín, a los Auxiliares de la Disciplina de Entomología: Diana María Giraldo, Jhon Fredy Cifuentes, Carlos Quintero, Mauricio Jiménez y Arturo Gómez. Al doctor Enrique Gómez Estrada y al señor Lisandro Agudelo Correa, propietario y administrador de la Finca Tamboral, en donde se realizó la prueba de campo.

LITERATURA CITADA

1. ARCIA, A. M. Uso de antagonistas en el control de fitopatógenos del suelo. In Curso sobre Control Microbial de Insectos Plagas y Enfermedades en Cultivos. Trabajo Mimografiado, presentado en seminario en la Universidad Centro Occidental (UCLA). Barquisimeto - Venezuela. 20 p. 1995.
2. ARCILA M., A.; BUSTILLO, A. E.; CHAVES C., B. Residualidad de una aspersión de *Beauveria bassiana* en cafetales a libre exposición. In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología, 24. Pereira, Julio 16-18, 1997. Resúmenes. Pereira, SOCOLEN, 1997. p. 11-12.
3. BOUCIAS, D.; STOKES, C.; SUAZO, A.; FUNDERBURK, J. AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. Mycologia 92: 638-648. 2000.
4. BUSTILLO, A. E. ¿Cómo participa el hongo *Beauveria bassiana* en el manejo integrado de la broca del café?. Brocarta N° 37:1-4. 2004.
5. BUSTILLO, A. E. Perspectivas de un manejo integrado de la broca *Hypothenemus hampei* en Colombia. In: Seminario sobre la Broca del Café. Medellín, mayo

- 21, 1990. Medellín, Socolen, 1990. p. 106 -118. (Miscelánea No. 18).
6. BUSTILLO, A. E. Los hongos entomopatógenos en el control de insectos plagas. In: Curso Internacional Teórico – Práctico sobre Entomopatógenos, Parasitoides y otros Enemigos de la Broca del Café. Sección I. Marzo 11-15 de 2002. Chinchiná, Cenicafé, 2002. p. 15 – 23.
 7. BUSTILLO, A. E. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. Boletín Técnico Cenicafé N° 24:1-40. 2002.
 8. BUSTILLO, A. E.; CASTILLO, H.; VILLALBA, D.A.; MORALES, E.; VÉLEZ, P. Evaluaciones en el campo con el hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* en Colombia. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 14. San Francisco, Juillet 14-19, 1991. París, ASIC, 1991. p. 679-686.
 9. BUSTILLO P., A.E.; CÁRDENAS M., R.; VILLALBA G., D.A.; BENAVIDES M., P.; OROZCO H., J.; POSADA F., F.J. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, Cenicafé, 1998. 134 p.
 10. CASTRILLO, L. A.; WIEGMANN, B.M.; BROOKS, W.M. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. Journal of Invertebrate Pathology 73: 269-275. 1998.
 11. CRUZ, L.P.; GAITÁN, A.L.; GÓNGORA, C. 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): 918–26. 2006.
 12. FLÓREZ M., E.; BUSTILLO P., A.E. MONTOYA R., E.C. Evaluación de equipos de aspersión para el control de *Hypothenemus hampei* con el hongo *Beauveria bassiana*. Cenicafé 48 (2): 92 – 98. 1997.
 13. FLÓREZ M., E.; POSADA F., F.J.; BUSTILLO P., A.E. Evaluación de concentraciones de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, asperjado sobre frutos de café para el control de *Hypothenemus hampei* (Ferrari). In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20. Cali, Julio 13 – 16, 1993. Resúmenes. Cali, SOCOLEN, 1993. p. 103.
 14. GAITÁN, A.; VALDERRAMA, A.; SILDARRIAGA, G.; VÉLEZ, P.; BUSTILLO, A. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. Mycological Research 106 (11): 1307 – 1314. 2002.
 15. GONZÁLEZ G., M. T.; POSADA F., F. J.; BUSTILLO P., A. E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafé 44 (3): 93 – 102. 1993.
 16. HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual review of entomology. (Estados Unidos). 39: 293 – 322. 1994.
 17. LE PELLEY, H. Pest of coffee. London, Longmans, Green and Co., 1968. 590 p.
 18. LEAL B., S.C. M.; BUTT, T.M.; PEBERDY, J.F.; BERTIOLLI, D.J. Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains co-infecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers. Mycological Research 104: 409 – 414. 2000.
 19. MARÍN, P.; BUSTILLO, A. E. Pruebas microbiológicas y físico-químicas para el control de calidad de hongos entomopatógenos. In: Curso Internacional Teórico – Práctico sobre Entomopatógenos, Parasitoides y otros Enemigos de la Broca del Café. Sección I. Marzo 11 – 15, 2002. Chinchina, Cenicafé, 2002.
 20. MOORE, D.; PRIOR, C. Present status of biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. In: Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases 1988. Brighton (Inglaterra) 21-24 Nov. 1988. Proceedings. Surrey (Inglaterra), British Crop Protection Council, 1988. v. 3. p. 1119-1124.
 21. TIGANO M., M.S.; HONEYCUTT, R.J.; LACEY, L.A.; ASSIS, R.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. Journal of Invertebrate Pathology 65: 274-282. 1995.
 22. TOBAR H., S.P. Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin por resistencia a la luz ultravioleta. Manizales, Universidad Católica de Manizales. Facultad de de Estudios Avanzados en Ciencias de la Salud, 1997. 82 p. (Tesis: Especialista en Microbiología).

23. THOMAS, M. B.; WATSON E. L.; VALVERDE, G. P. Mixed infections and insect-pathogen interaction. *Ecology Letters* 6:183-188. 2003.
24. PINO, T. C.; FRANCE, I. A.; NORAMBUENA, A. R.; MEJÍAS, B. P. Universidad Católica del Maule – INIA. 2004. UC del Maule estudia: El control biológico del Burruto de la Vid. On line Internet. Disponible en: <http://www.vendimia.cl/veredicionanterior.php?edicion=36&id=106>. (Consultado en Octubre 2007).
25. VÉLEZ, P.E.; GONZÁLEZ, M.T.; VALDERRAMA, A.M.; ESTRADA, M.N.; BUSTILLO, A.E.; MONTOYA, E.C. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* 51 (3): 196 – 206. 2000.
26. VILLALBA G., D. Calibración de aspersoras manuales de espalda. Bogotá, FNC – Cenicafé, 1993. 16 p. (Boletín de Extensión N° 75).
27. VILLALBAG., D.A.; BUSTILLOP., A.E.; CHAVESC., B. Evaluación de insecticidas para la broca del café en Colombia. *Cenicafé* 46 (3): 152 - 153. 1995.
28. WANG, C. S.; LI, Z.; BUTT, T. M. Molecular studies of coformulated strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 29 – 34. 2002.
29. WANG, C. S.; FAN, M. ; LI, Z.; BUTT, T. M. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Southeast China. *Journal of Applied Microbiology* 96: 861 – 870. 2004.