

**ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD DE *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson
Y REPELENCIA DE *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, *Beauveria
bassiana* y *Metarhizium anisopliae* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ,
Hypothenemus hampei (Ferrari)**

ALEXANDER PEREA MORALES

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
SAN JUAN DE PASTO COLOMBIA
2004**

**ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD DE *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson
Y REPELENCIA DE *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, *Beauveria
bassiana* y *Metarhizium anisopliae* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ,
Hypothenemus hampei (Ferrari)**

ALEXANDER PEREA MORALES

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agrónomo**

Presidente

**ALEX ENRIQUE BUSTILLO PARDEY,
I. A., Ph. D. Investigador Principal I. Disciplina de Entomología
Centro Nacional de Investigaciones de Café**

Copresidente:

**ROLANDO TITO BACCA
I. A., M. Sc. Profesor asociado
Universidad de Nariño**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
SAN JUAN DE PASTO - COLOMBIA
2004**

ASESORES

JUAN CARLOS LÓPEZ NÚÑEZ
Microbiólogo, Asistente de investigación.
Disciplina de Entomología
Centro Nacional de Investigaciones del Café

CARLOS BETANCOURTH GARCÍA
Ingeniero Agrónomo, M. Sc., Director Dpto. Producción y Sanidad Vegetal,
Universidad de Nariño.

CARLOS MOSQUERA
Ingeniero Agrónomo, Jefe Dpto. Recursos Naturales y Sistemas
Agroforestales.
Universidad de Nariño.

BENJAMIN SAÑUDO SOTELO
Ingeniero Agrónomo.
Universidad de Nariño.

PATRICIA MARÍN
Bacterióloga, Disciplina de Entomología
Centro Nacional de Investigaciones del Café

ESTHER CECILIA MONTOYA
Estadístico, M. Sc. Investigador Científico I.
Disciplina de Biometría
Centro Nacional de Investigaciones del Café

“Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado son responsabilidad exclusiva de su autor”.

Artículo 1º del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2004

Dedico a:

Mi madre Mercedes y a mi Padre Hermes, por su gran amor y ayuda incondicional, a mi novia Carolina por su amor, apoyo y paciencia. A todos mis familiares y amigos quienes me alientan a seguir siempre adelante.

Alexander Perea Morales

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

La Facultad de Ciencias Agrícolas de La Universidad de Nariño por su labor formadora.

La Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y a su Centro Nacional de Investigaciones de Café “Pedro Uribe Mejía”.

Alex Enrique Bustillo Pardey, Ingeniero Agrónomo, Ph. D. Investigador Principal I. Líder de la disciplina de Entomología, CENICAFÉ, por sus valiosos aportes y asesoría permanente.

Juan Carlos López N., Microbiólogo M. Sc. Asistente de Investigación, Disciplina de Entomología, CENICAFÉ, por su amistad y su constante ayuda y aportes a esta investigación.

Patricia Marín, Bacterióloga, Disciplina de Entomología CENICAFÉ por su gran amistad, ayuda y colaboración a esta investigación.

Esther Cecilia Montoya, Estadístico, M. Sc., Investigador Científico I, Disciplina de Biometría, CENICAFÉ, por su permanente asesoría.

Arturo Gómez, Mirian Giraldo, Carlos Quintero, Mauricio Jiménez, Auxiliares Disciplina de Entomología de Cenicafé, por su trabajo.

Gonzalo Hoyos Salazar, Disciplina de Divulgación, Cenicafé, por su colaboración con el material fotográfico.

Carlos Betancourth, Ingeniero Agrónomo, M. Sc., Profesor de La Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño.

Rolando Tito Bacca Ingeniero Agrónomo, M. Sc., Profesor de La Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño.

Benjamín Sañudo Sotelo Ingeniero Agrónomo, Profesor de La Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño.

Carlos Mosquera Ingeniero Agrónomo, Profesor de La Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño

Y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo, muchas gracias

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	23
1. MARCO TEÓRICO	25
1.1 DAÑOS CAUSADOS POR LA BROCA DEL CAFÉ	25
1.2 MANEJO INTEGRADO DE LA BROCA DEL CAFÉ	26
1.3 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	27
1.3.1 Modo de acción de los hongos entomopatógenos	29
1.4 HONGOS NATIVOS ENEMIGOS DE LA BROCA	30
1.5 CLASIFICACIÓN DE LA ESPECIE <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom.) Samson	31
1.6 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Paecilomyces lilacinus</i>	31
1.7 <i>Paecilomyces</i> spp. COMO BIOCONTROLADOR	32
1.8 <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom.) Samson SOBRE UN BIOINDICADOR	39
2 DISEÑO METODOLÓGICO	40
2.1 FASE DE LABORATORIO	40
2.1.1 Localización	40
2.1.2 Reactivación de los aislamientos de <i>P. lilacinus</i> sobre la broca del café	40
2.1.3 Selección de los aislamientos de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	41
3.1.3.1 Prueba de germinación	42

2.1.3.2 Prueba de patogenicidad	43
2.2 FASE DE CAMPO	45
2.2.1 Localización	45
2.2.2 Etapa 1. Evaluación de la patogenicidad del aislamiento PL9301 y del Comercial en tres dosis diferentes	46
2.2.3 Etapa 2. Evaluación de cuatro tiempos de aplicación de los aislamientos PL9301 y del Comercial	50
2.3 EVALUACIÓN DE LA REPELENCIA DE <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> HACIA LA BROCA DEL CAFÉ, <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari)	53
2.3.1 Localización	53
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.1 FASE DE LABORATORIO	55
3.1.1 Prueba de germinación	55
3.1.2 Prueba de patogenicidad	55
3.2 FASE DE CAMPO	57
3.2.1 Etapa 1. Evaluación de la patogenicidad del aislamiento PL9301 y Comercial en tres dosis diferentes	58
3.2.2 Etapa 2. Evaluación de cuatro tiempos de aplicación de los aislamientos PL9301 y Comercial	59
3.3 EVALUACIÓN DE LA REPELENCIA DE <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> HACIA LA BROCA DEL CAFÉ	62
4 CONCLUSIONES	65
5 RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Cantidades utilizadas en la aspersión del aislamiento PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes	46
Tabla 2. Cantidades utilizadas en la aspersión del aislamiento PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación y a una dosis de 1×10^{10} esporas/árbol	50
Tabla 3. Germinación promedio de las esporas de diferentes aislamientos de <i>Paecilomyces lilacinus</i> y el Comercial	53
Tabla 4. Mortalidad de adultos de la broca del café y tiempo de mortalidad causada por diferentes aislamientos de <i>Paecilomyces lilacinus</i> en laboratorio. (Datos corregidos en relación con el testigo)	55
Tabla 5. Mortalidad total y mortalidad total corregida de la broca del café causada por los aislamientos de <i>Paecilomyces lilacinus</i> : PL9301 y el Comercial aplicados en tres dosis	56
Tabla 6. Mortalidad total y mortalidad total corregida de la broca del café causada por los aislamientos de <i>Paecilomyces lilacinus</i> : PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación y a una dosis de 1×10^{10} esp/árbol	58
Tabla 7. Mortalidad total de broca corregida causada por los aislamientos de <i>Paecilomyces lilacinus</i> : PL9301 y el Comercial para el factor tiempos de aplicación por separado	59
Tabla 8. Promedios y coeficiente de variación para los porcentajes infestación con broca para el factor tiempos de aplicación por separado	60
Tabla 9. Infestación promedio de la broca del café en frutos confinados en una jaula entomológica	62

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Daño en el fruto del café causado por <i>Hypothenemus hampei</i> : A) Daño externo. B) Daño interno	26
Figura 2. Ciclo de infección de los hongos entomopatógenos	30
Figura 3. Estructuras características de <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom.) Samson	32
Figura 4. Reactivación de los aislamientos de <i>P. lilacinus</i> sobre la broca del café: A) Desinfestación. B) Secado. C) Inoculación D) Individualización	36
Figura 5. Germinación de las esporas de <i>P. lilacinus</i> : A) Deposición de alícuotas en medio agar agua. B) Tinción de las alícuotas con azul de lactofenol a las 24 horas de incubación. C) Remoción de las alícuotas. D) Depósito en láminas de vidrio para observación al microscopio	38
Figura 6. Montaje en cajas de Petri de los aislamientos de <i>P. lilacinus</i> para la prueba de germinación	38
Figura 7. Procedimiento del bioensayo de patogenicidad: A) Montaje de los tratamientos para la evaluación de la patogenicidad. B) Adición de agua destilada estéril	40
Figura 8. Diseño de la parcela experimental con la demarcación de la parcela efectiva	42
Figura 9. Aspecto de las mangas entomológicas: A) Disposición de la rama dentro de la manga. B) Infestación artificial con brocas adultas. C) Manga entomológica sellada	43
Figura 10. A) Operador de aspersión. B) Aspersora de presión previa retenida C) Aspecto de la nube de aspersión	44
Figura 11. Disposición de los frutos de café cereza sobre las bandejas metálicas	49

Figura 12. A) Jaula entomológica cerrada. B) Jaula entomológica abierta

49

Figura 13. *Paecilomyces lilacinus* infectando adultos de *Hypothenemus hampei*: A) Inicio de la esporulación del hongo B) Esporulaci3n completa

51

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Ficha Técnica Micosplag®	67
Anexo B. Análisis de varianza para la germinación de los aislamientos evaluados	68
Anexo C. Prueba de Tukey (5%) para la germinación de los aislamientos evaluados	69
Anexo D. Análisis de varianza para la mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados	70
Anexo E. Prueba de Tukey (5%) para la mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados	71
Anexo F. Análisis de varianza para los tiempos promedios de mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados	72
Anexo G. Prueba de Tukey (5%) para los tiempos promedios de mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados	73
Anexo H. Análisis de varianza para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes	74
Anexo I. Prueba de Dunnett (5%) para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y Comercial en tres dosis diferentes	75
Anexo J. Análisis de varianza para la mortalidad de broca total corregida causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes	76
Anexo K. Análisis de varianza para la infestación artificial con broca para la evaluación de los aislamientos PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes	77
Anexo L. Análisis de varianza para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación	78

Anexo M. Prueba de Dunnett (5%) para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación	79
Anexo N. Análisis de varianza para la mortalidad total de broca corregidos causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación	80
Anexo Ñ. Prueba de Tukey (5%) para la mortalidad total de broca corregidos para los tiempos de aplicación causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial	81
Anexo O. Análisis de varianza para la infestación artificial con broca en los tiempos de aplicación del aislamiento PL9301 y el Comercial	82
Anexo P. Prueba de Tukey (5%) para la infestación artificial con broca en los tiempos de aplicación del aislamiento PL9301 y el Comercial	83
Anexo Q. Análisis de varianza para la infestación con broca en la jaula entomológica	84
Anexo R. Prueba de Tukey (5%) para la infestación con broca en la jaula entomológica	85

LISTA DE ABREVIATURAS

°	Grados
°C	Grados centígrados
%	Porcentaje
®	Marca registrada
()	Minutos
cm	Centímetros
cc	Centímetros cúbicos
cc/l	Centímetros cúbicos por litro
g/l	Gramos por litro
mm	Milímetros
ml	Mililitro
l	Litro
m	Metro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
PSI	Pounds per Square Inch (libras por pulgada cuadrada)
SDA	Sabouraud Dextrosa Agar
ADE	Agua Destilada Estéril
sp	Especie
esp/ml	Esporas por mililitro
esp/l	Esporas por litro
esp/árbol	Esporas por árbol

GLOSARIO

AISLAMIENTO: especie de microorganismo de características conocidas que se conserva cultivado en el laboratorio para determinados bioensayos.

APRESORIO: expansión del ápice de una hifa para adherirse en los primeros estadios de la infección.

ALÍCUOTA: volumen mínimo tomado de una suspensión de esporas de concentración conocida.

BIOENSAYO: método para determinar el efecto de una sustancia sobre un organismo bajo condiciones controladas.

CONIDIA: estructura de dispersión de algunas especies de hongos, las cuales se ubican sobre conidioforos libres.

CONIDIOFORO: hifa individual que lleva conidias apicales o laterales.

CUTÍCULA: compuesto químico que es componente del exoesqueleto de los insectos y pared celular de plantas y de microorganismos.

DEPREDADOR: organismo que se alimenta de otro, matándolo y convirtiéndolo en presa

DESINFESTACIÓN: proceso de eliminación de contaminantes.

ENTOMOPATÓGENO: organismo que causa enfermedades en artrópodos plagas (insectos, arañas y ácaros).

EPIZOOTIA: erupción de la incidencia de una enfermedad en una población de animales en la cual hay un número inusitado de casos.

ESPORA: unidad de dispersión y reproducción de los hongos y de algunas bacterias

FIALIDE: células cilíndricas en forma de botella, que llevan un poro a través del cual se forman las conidias.

GERMINACIÓN: inicio de crecimiento de estructuras reproductivas de diferentes organismos.

HALINO: que no tiene color.

HIFA: estructura tubular y unidad estructural del soma de los hongos.

HOSPEDANTE: organismo que alberga a otro en calidad de parásito.

INCUBACIÓN: fase inicial de una enfermedad desde la inoculación hasta que aparecen los síntomas externos.

INFECCIÓN: penetración y desarrollo de una enfermedad producida por gérmenes patógenos en un organismo.

INOCULAR: poner en contacto un patógeno con un hospedante

PARÁSITO: organismo que vive sobre o dentro de otro ser vivo de distinta especie y que toma nutrientes de él, causándole disturbios fisiológicos.

PATÓGENICIDAD: capacidad de producir una enfermedad; virulencia.

PATÓGENO: organismo capaz de producir o causar una enfermedad.

PEDICELO: el pie de una sola flor en una inflorescencia.

PLAGA: organismo que ocasiona un daño económico al hombre al perjudicar su alimento, vivienda y vestido.

QUITINOLÍTICO: organismo con capacidad de vencer la resistencia y penetrar la cutícula de los insectos mediante el rompimiento de las moléculas de quitina.

REPELENCIA: acción de efecto negativo en la orientación de un organismo.

VIRULENCIA: capacidad de producir una enfermedad; habilidad para invadir y afectar al huésped o alguno de sus órganos o tejidos; patogenicidad.

RESUMEN

Este estudio se realizó con *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para determinar su efecto sobre poblaciones de broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) ya que se ha encontrado infectando adultos que emergen de los frutos caídos. Se realizaron pruebas de patogenicidad y germinación en laboratorio con tres aislamientos (PL9601, PL9301 y PLHT) y un comercial que contiene una mezcla de *P. lilacinus*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* recomendado para el control de la broca. En campo se evaluó la patogenicidad del PL9301 y el Comercial en tres dosis y luego en cuatro tiempos de aspersión con respecto a la infestación artificial con broca. Finalmente se evaluó el efecto de repelencia de los aislamientos PL9301, Bb9205 (*Beauveria bassiana*), Ma9236 (*Metarhizium anisopliae*) y un aceite agrícola, determinando la infestación a los ocho días de inoculados los frutos de café.

El mayor porcentaje de germinación lo presentó PLHT ($98,7 \pm 0,5\%$). Las mayores mortalidades en la prueba de patogenicidad se obtuvieron con el PL9301 ($90 \pm 3,9\%$) y el Comercial ($83,31 \pm 4,1\%$). Los resultados de mortalidad al asperjar en campo los aislamientos en las tres dosis, no mostraron efecto de la interacción aislamiento*dosis, ni de los aislamientos ni de las dosis por separado, estos promedios estuvieron entre un 15,1% y un 23%. Cuando los dos aislamientos se aplicaron en cuatro tiempos, las mayores mortalidades se obtuvieron a las dos horas después (29,9%) y a las dos horas antes de la infestación artificial (28,6%).

En la evaluación del efecto de repelencia, el PL9301 y el Ma9236 presentaron los menores promedios de infestación correspondientes a 72,6% y 76,6% respectivamente.

Los resultados comprobaron que *P. lilacinus* fue patógeno a la broca del café y causó en campo controles inferiores al 30%. Adicionalmente, se comprobó el efecto de alguna repelencia de *P. lilacinus* y *M. anisopliae* hacia la broca del café.

ABSTRACT

This study was conducted with *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson to determine its effect on coffee berry borer populations, since it has been found previously infecting adult of this pest emerging from infested berries. Three isolates of *P. lilacinus* (PL9601, PL9301 and PLHT) and one commercial product, which is composed by a mixture of *P. lilacinus*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, were tested against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) under laboratory conditions. The highest percentage of germination was obtained with PLHT ($98,7 \pm 0,5\%$). The PL9301 ($90 \pm 3,9\%$) and commercial product ($83,31 \pm 4,1$) showed the highest mortalities. The commercial product and PL9301 were evaluated at three dosages under field conditions in a coffee plantation using the following dosages.

Results of mortality of coffee berry borer were found to be between 15 and 23% and showed neither an effect of interaction among isolates and dosages nor among isolates and dosages separately. Later, these isolates were evaluated applying a dosage of 1×10^{10} spore/tree at four different periods of times with respect to coffee berry borer artificial infestation. Results of mortality of coffee berry borer showed that the highest mortalities occurred when the fungus was applied two hours after (29,9 %), two hours before (28,6%).

Due to possible repellence effect, isolates PL9301, *Beauveria bassiana* Bb9205, *Metarhizium anisopliae* Ma9236 and an agricultural oil were tested under laboratory conditions. Both isolates PL9301 and Ma9236 presented the lowest infestation: 72.6 and 76.6%, respectively.

Results of this research proved that *P. lilacinus* was pathogenic to coffee berry borer under field conditions but insect control was below 30%. Also a repellent effect of *P. lilacinus* and *M. anisopliae* was detected against the coffee berry borer under laboratory conditions.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Bustillo¹, como consecuencia del uso indiscriminado de insecticidas químicos, cada vez se hace necesario adoptar nuevas tecnologías para el control de las plagas de los cultivos comerciales. El concepto de Manejo Integrado es la estrategia que más se aproxima a la solución del problema de los insectos dañinos, teniendo en cuenta la preocupación sobre la calidad del ambiente en que vivimos.

Según Bustillo et al²,

A nivel mundial, el uso de hongos entomopatógenos ha adquirido gran relevancia dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP) debido a las epizootias que estos ocasionan sobre poblaciones de insectos. En la actualidad se han identificado más de 700 especies de hongos entomopatógenos, siendo *Beauveria*, *Bassiana* y *Metarhizium. anisopliae*, sobre las cuales se han centrado las investigaciones, las que finalmente llegan a manos de los agricultores como otra opción de control y que además agregan un aspecto ecológico a su producción.

“La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), es la principal plaga limitante de este cultivo”³ por lo que La Federación de Cafeteros de Colombia a través del Centro de Investigación del Café, Cenicafé, viene implementando el Manejo Integrado de la Broca del Café (MIB), como la mejor estrategia para control de este problema⁴.

¹ BUSTILLO P., Alex Enrique. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. En : Boletín Técnico Cenicafé. Vol. 24, No 1. 2002. p 1-40

² BUSTILLO P., et al. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná : CENICAFÉ, 1998. p. 50

³ LE PELLE, R. H. Las plagas del Café. Barcelona : Labor, 1973. p. 40

⁴ BARKER, P.S. La broca del café en Colombia; informe final del proyecto MIP para el café DFID-CENICAFÉ-CABI BioScience. Chinchiná : CENICAFÉ, 1999. p. 21

Dentro de esta estrategia, el uso de los hongos entomopatógenos es importante debido a los efectos que causan sobre las poblaciones de esta plaga, alcanzando una participación entre 30 y 70% del control de la Broca; con *Beauveria bassiana*⁵

En Colombia, las especies *B. bassiana*, *B. brongniartii* (solo se ha encontrado en laboratorio), *Fusarium oxisporum*, *Hirsutella eleutheratorum* y *M. anisopliae* se han registrado atacando adultos de broca a nivel de laboratorio y de campo⁶. Por su parte, Bustillo et al.⁷, realizaron el primer registro a nivel mundial del ataque del hongo *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson sobre la broca del café en los frutos caídos en campo. A su vez, Posada, et al.⁸, establecieron la patogenicidad del hongo hacia la broca del café a nivel de laboratorio.

En la actualidad se están comercializando formulaciones de este hongo, por lo tanto este estudio permitirá conocer su efecto sobre la broca en frutos del árbol de café. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se llevó a cabo, considerando los siguientes objetivos:

Determinar el efecto del hongo *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson en el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari); seleccionar en laboratorio los aislamientos de *P. lilacinus* más patogénicos hacia la broca del café *H. hampei*; seleccionar en campo una dosis con la que se obtenga la más alta mortalidad sobre las poblaciones de broca del café; establecer el momento oportuno de la aplicación de los aislamientos de *P. lilacinus* para obtener la mayor mortalidad sobre la broca del café; evaluar el efecto de repelencia de los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* hacia la broca del café.

⁵ BUSTILLO et al., Op cit., p. 23

⁶ BUSTILLO P., Alex Enrique. Elementos biológicos para un programa de manejo integrado de la broca del café en Colombia. En: SEMINARIO DE ACTUALIZACIÓN SOBRE MANEJO INTEGRADO DE LA BROCA DEL CAFÉ. (2° : 1996 : Medellín). Memorias del II Seminario de actualización sobre manejo integrado de la broca del café. Medellín : CENICAFÉ, 1996. p. 2 - 11.

⁷ BUSTILLO et al., Op cit., p. 26.

⁸ POSADA et al. *Paecilomyces lilacinus*, enemigo natural de adultos de *Hypothenemus hampei*. En : Revista CENICAFE. Vol. 49, No.1. 1998 p.72 - 77.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 DAÑOS CAUSADOS POR LA BROCA DEL CAFÉ

Según Bustillo, et al,⁹ y Barker¹⁰

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) es la principal plaga de este cultivo y el principal factor limitante de la producción. Se estima que en la actualidad unas 800.000 hectáreas pueden encontrarse infestadas por esta plaga, afectando así el patrimonio de medio millón de familias cafeteras. Este problema cobra mayor importancia si se tiene en cuenta que en nuestras zonas cafeteras están dadas las condiciones apropiadas para su establecimiento y reproducción.

De acuerdo con Le Pelley¹¹ y García¹²

El daño que causa la broca del café afecta directamente el grano (Figura 1); este se refleja en la pérdida de peso de las almendras al ser atacadas por las larvas al alimentarse de los frutos y utilizarlos como lugar de reproducción, desarrollo y refugio; además, los frutos brocados que quedan en el árbol no solo reducen los rendimientos sino que demeritan la calidad del café a consecuencia de la depreciación del grano en la clasificación, a la caída del fruto en estado acuoso y a la alteración de la calidad de la bebida al beneficiar conjuntamente granos sanos y brocados, que además son contaminados por microorganismos.

⁹ BUSTILLO et al, Op cit., p.50

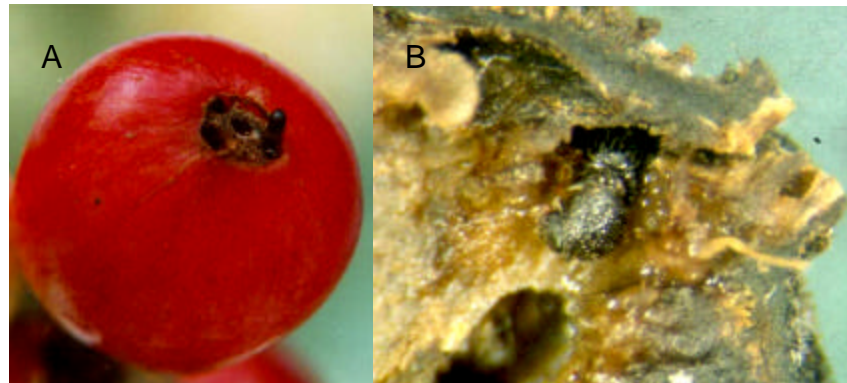
¹⁰ BARKER, Op cit., p.21

¹¹ LE PELLEY, Op cit., p. 40

¹² GARCÍA G., A. Proyecto manejo integrado de broca del café CFC-OIC-IIBC-PROMECAFE. En : SIMPOSIO Latinoamericano de Caficultura. San José, Costa Rica. MEMORIAS. ICAFE-PROMECAFE, 2000. p. 61-68

De acuerdo con Bustillo, et al.¹³, ya que es necesario aprender a convivir con esta plaga, la mejor alternativa para su control es mediante la adopción del Manejo Integrado de la Broca de café (MIB).

Figura 1. Daño en el fruto del café causado por *Hypothenemus hampei*: A) Daño externo. B) Daño interno



Fuente: Hoyos, 2003

1.2 MANEJO INTEGRADO DE LA BROCA DEL CAFÉ

Según Bustillo¹⁴, y López¹⁵

De experiencias obtenidas, la manera más racional y económica del control de la broca es a través del seguimiento de los principios del Manejo Integrado de Plagas (MIP), estrategia conformada por diferentes técnicas de manejo: Control Natural, Control Cultural, Control Químico, Control Legal y el Control Biológico; por lo cual este enfoque es la base para el Manejo Integrado de la Broca del café (MIB); esta estrategia debe tener como finalidad no solo la productividad, sino la preservación del medio ambiente, la

¹³ BUSTILLO et al. Op cit., p. 45

¹⁴ BUSTILLO P., Alex Enrique. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. Op cit., p 1-40

¹⁵ LÓPEZ, D. I. Experiencias en el manejo integrado de la broca del café en el departamento de Antioquia. En : SEMINARIO DE ACTUALIZACIÓN SOBRE MANEJO INTEGRADO DE LA BROCA DEL CAFÉ. (1° : 1996 : Medellín). Memorias del 1 Seminario de actualización sobre manejo integrado de la broca del café. Medellín : CENICAFÉ, 1996. p. 1 - 8

protección de la salud humana y la racionalidad en el uso de insecticidas químicos, ya que es claro que en las diferentes zonas cafeteras, en los predios en los cuales la broca lleva más de dos años y se ha hecho un uso racional o no se han asperjado insecticidas, se ha desarrollado una fauna benéfica, observándose presencia de varios enemigos naturales que están obrando sobre las poblaciones de la broca; por esto es necesario procurar que el control biológico sea uno de los componentes principales de esta estrategia.

De acuerdo con Valenzuela¹⁶, y Bustillo et al.¹⁷

El control biológico de la broca del café como componente del MIB se define como el estudio y la utilización de parásitos, depredadores o patógenos en la regulación de poblaciones del hospedante para mantenerla en niveles bajos de infestación donde no causen daños económicos (menor del 5%). Dentro de este componente, los hongos entomopatógenos pueden jugar un papel importante en la reducción de las poblaciones de broca del café.

1.3 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Conforme Hajek y St. Leger¹⁸, y Sañudo et al¹⁹.

Existen numerosas especies de hongos entomopatógenos distribuidas en los diferentes grupos taxonómicos principalmente en las Subdivisiones Zigomycotina, Deuteromycotina y Ascomycotina, los cuales ofrecen posibilidades de uso como factores de regulación de insectos. Las enfermedades causadas por los hongos en insectos son muy comunes y ampliamente distribuidas, a menudo ocasionando una alta reducción en la población de insectos en forma de epizootias.

¹⁶ VALENZUELA G. Control Biológico en Colombia; historia, avances y proyecciones : Aspectos históricos del control biológico. Palmira : Lito - Tamara, 1989. p. 1 - 9.

¹⁷ BUSTILLO et al. Op cit., p. 46.

¹⁸ HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. En : Annual Review of Entomology. Vol. 39. 1994. p. 293-322.

¹⁹ SAÑUDO et al. Fundamentos de micología agrícola. Pasto : Universidad de Nariño, 2001. p. 145 - 154.

Según Ferron²⁰ y Rodríguez²¹

Los hongos entomopatógenos pertenecientes a la Subdivisión Deuteromycotina son los microorganismos candidatos en primera instancia para el control biológico de insectos plaga. Sus clases (Hyphomycetes, Blastomycetes y Coelomycetes) se caracterizan por no presentar estado sexual, por lo cual se conocen con el nombre de hongos imperfectos; siendo la clase más importante la de los Hyphomycetes porque abarca la mayoría de especies conocidas como parásitos de insectos. En Colombia se han registrado 31 especies de hongos entomopatógenos, sin embargo, son escasas las especies de hongos utilizadas en programas de control biológico de plagas. *B. bassiana* y *M. anisopliae* son las especies aisladas con más frecuencia, principalmente en lepidópteros y coleópteros.

²⁰ FERRÓN, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. En : Annual Review of Entomology. Vol. 23 No.1. 1978. p. 409-442.

²¹ RODRÍGUEZ S., D. A. Hongos entomopatógenos. En: Control microbiano de insectos. Santafé de Bogotá : CENIPALMA, 1992. 136 p.

1.3.1 Modo de acción de los hongos entomopatógenos. De acuerdo con De Bach²², Alves²³, St. Leger *et al.*²⁴, Charnley y St. Leger²⁵.

Una de las características de los insectos es la presencia de un exoesqueleto denominado cutícula, la cual puede ser penetrada por los hongos entomopatógenos mediante un conjunto de mecanismos que tienen la capacidad de vencer la resistencia y asimilar los materiales del hospedero; proceso que requiere condiciones de temperatura y humedad adecuada. El proceso de colonización del hospedante inicia con la adherencia de una espora germinativa (conidia) que por acción física y enzimática (proteasas, lipasas, quitinasas) penetra la cutícula (Figura 2). En algunas especies de hongos la penetración es directa y en otras se produce un botón adhesivo llamado apresorio. Una vez el hongo ha penetrado se inicia la ramificación hifal, creciendo abundantemente e invadiendo la cavidad del cuerpo (hemolinfa) a la vez que se alimenta de él. Después de la muerte del insecto, el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por hifas filamentosas, más no ocurre la desintegración del insecto debido que el patógeno secreta sustancias antibacterianas, resistiendo así la descomposición por bacterias contaminantes y habitantes del tracto digestivo. Finalmente las hifas emergen primero por los espiráculos y regiones intersegmentadas para luego atravesar la cutícula, terminando con la formación de conidioforos a partir de los cuales se forman las conidias, que funcionan como unidades de dispersión e infección; la muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, desnutrición y daños mecánicos.

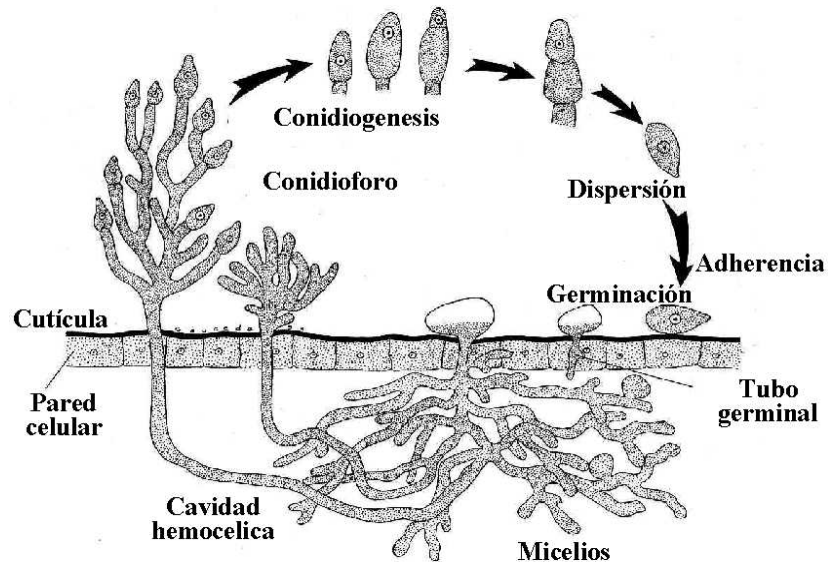
²² De BACH, P. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México : Continental, 1987. p.20-23.

²³ ALVES, S. B. Fungos entomopatógenicos. En: Control microbiano de insectos. Sao Paulo : Manole, 1986. p. 73-127.

²⁴ ST. LEGER *et al.* Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. En : Journal of Invertebrate Pathology. Michigan. Vol. 47 No. 1. 1986. p: 295 - 302.

²⁵ CHARNLEY, A. K.; ST. LEGER, R. J. The role of cuticle -degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. En : The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Nueva York : Plenum Press, 1991. p. 267 – 268.

Figura 2. Ciclo de infección de los hongos entomopatógenos



Fuente: Cave, 1995

Existe el registro de un aislamiento de beauverina de micelios de *Paecilomyces fumosoroseus*²⁶.

1.4 HONGOS NATIVOS ENEMIGOS DE LA BROCA

Particularmente los hongos que parasitan la broca del café desempeñan un papel importante en el control biológico debido a la reducción de las poblaciones de esta plaga, por tanto, estos controladores biológicos se han constituido en un arma fundamental en el programa MIB²⁷.

Bustillo²⁸ lista como enemigos nativos que atacan o compiten con la broca *H. hampei* (Ferrari) a los hongos *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Fusarium oxisporum*, *Hirsutella eleutheratorum*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces sp*; todos estos

²⁶ ROBERTS, D. W. Toxins of entomopathogenic fungi. En: Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970 – 1979. London : Academic Press, 1981. p. 421 – 464.

²⁷ BUSTILLO et al, Op cit., p.28.

²⁸ BUSTILLO P., Alex Enrique. Elementos biológicos para un programa de manejo integrado de la broca del café en Colombia. Op cit., p. 2 - 11.

pertencientes a la Subdivisión Deuteromycotina, clase Hypomycetes. Por otra parte, Bustillo *et al.*²⁹, registran a *P. lilacinus* atacando a la broca del café.

1.5 CLASIFICACIÓN DE LA ESPECIE *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson

De acuerdo con Samson³⁰, Barnett y Hunter³¹, *P. lilacinus* es un hongo perteneciente a la División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae.

1.6 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE *Paecilomyces lilacinus*

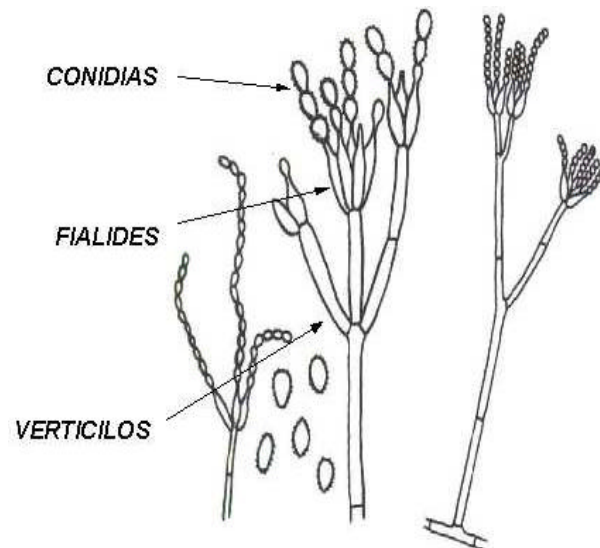
La especie *P. lilacinus* se caracteriza por presentar un conidioforo erecto, de terminación verticilada o ramificada; de donde salen bruscamente las fialides. Estas son engrosadas en la base y terminadas en un cuello largo en forma de botella. Presenta una conidia unicelular hialina o ligeramente pigmentada; las que se producen en forma concatenada (Figura 3) y pueden formar masas en condiciones húmedas. El hongo forma colonias de color carmelito amarillento a rosado parduzco (Alexopoulos y Mims, 1979; Samson, *et al.*, 1988).

²⁹ BUSTILLO *et al.*, Op cit., p. 29.

³⁰ SAMSON, R. A. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. En: Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970 – 1979. London : Academic Press, 1981. p. 93- 107.

³¹ BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. Nueva York : Macmillan Publishing Company, 1987.p. 65-70.

Figura 3. Estructuras características de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson.



Fuente: Samson y Evans, 1988

1.7 *Paecilomyces* spp. COMO BIOCONTROLADOR

Según Jatala et al.³², Samson³³, Cabanillas y Barker³⁴.

El género *Paecilomyces* Bainier ha sido observado atacando algunas especies de Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Hemiptera y Orthoptera, además, posee especies que pueden atacar nematodos de plantas. El género posee 14 especies entomopatógenas siendo las más destacadas *Paecilomyces farinosus* (Holm ex S.F Gray), *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) y *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson.

De acuerdo con Bustillo³⁵ en nuestro medio se registran como mínimo cinco especies del género *Paecilomyces*: (*Paecilomyces amoeneroseus* (P. Henn)

³² JATALA et al. Field application of *Paecilomyces lilacinus* for controlling *Meloidogyne incognita* on potatoes. En : Journal Nematology. Vol. 12 No. 4. 1980. p. 226 - 227.

³³ SAMSON, Op cit., p. 22-30

³⁴ CABANILLAS, E. y BARKER, K. R. Inoculum level and application time of *Paecilomyces lilacinus* on control of *Meloidogyne incognita* in tomato. En: Journal of Nematology. Vol. 21, No. 1: 1989. p.115-120.

Samson, *Paecilomyces farinosus* (Holmes & Gray) Brown & Smith, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson y *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson) infectando insectos.

De acuerdo con Garzón³⁶, Molina y Sañudo³⁷.

Particularmente, *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, es un hongo quitinolítico que ataca principalmente nematodos del género *Meloidogyne*; el ataque lo realiza fundamentalmente en estado de huevo, destruyendo el embrión e impidiendo la formación de larvas, aunque puede destruir estados juveniles. Esta especie se desarrolla en el suelo de regiones cálidas, colonizando raíces de muchas plantas como frijol, banana, tomate, caña de azúcar.

En Colombia, la especie *P. lilacinus* además de ser utilizada en el control de nematodos del género *Meloidogyne*³⁸, también se ha utilizado en el control de *Leptopharsa gibbicarina* (Hemiptera: Tingidae) o chinche encaje de la palma de aceite; donde se han desarrollado epizootias que han alcanzado hasta un 70% de mortalidad en laboratorio³⁹. También se ha registrado actuando sobre poblaciones del chinche de la viruela del cultivo de la yuca *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae)⁴⁰, sobre el chinche negro *Antiteuchus tripterus* (Hemiptera:

³⁵ BUSTILLO, Alex. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: SEMINARIO SOBRE USO DE ENTOMATÓGENOS EN COLOMBIA. (1° : 2001 : Bogotá). Memorias del I Seminario sobre Uso de Entomopatógenos en Colombia. Bogotá : SOCOLEN, 2001. p. 30 – 49.

³⁶ GARZÓN V., J. Estudio de biocontrol del nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp. con organismos fungosos. Palmira, 1995, 61 p. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Agrícolas. p.20.

³⁷ MOLINA, L. y SAÑUDO S., B. Manejo de *Meloidogyne incognita* Chitwood en lulo de castilla *Solanum quitoense* Lam. en el municipio de San Lorenzo, departamento de Nariño. En: Revista de Ciencias Agrícolas Pasto. Vol. 11, No. 8: 1989. p. 77 - 90.

³⁸ GIRALDO F., M. A. Evaluación de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson. en el control de *Meloidogyne* spp. Goeldi. en almácigos de café *Coffea arabica*. Manizales, 1996, 102 p. Tesis. (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. p.56

³⁹ CALVACHE G., H. El control microbiano en el manejo de las plagas de aceite en Colombia. En : Palmas, Bogotá. Vol. 14, No. 2. 1993. p. 13 -21.

⁴⁰ SÁNCHEZ, D., BELLOTTI, A. C. Patogenicidad de hongos Hyphomycetes sobre *Cyrtomenus bergi* F. (Hemiptera: Cydnidae) chinche subterráneo de la yuca. En: Revista Colombiana de Entomología. Vol. 23, No. 1, 1997. p. 31 - 37.

Pentatomidae) en el cultivo de cacao, sobre *Tibraca* sp. (Hemiptera: Pentatomidae) en el cultivo de arroz y sobre la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) donde se obtuvieron mortalidades que oscilaron entre 90% y 98% a nivel de laboratorio⁴¹.

Por otra parte, Bustillo, *et al.*⁴², durante la realización de un trabajo con los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control de la broca del café, constataron que dicha plaga es un nuevo huésped de *P. lilacinus*. Este es el primer registro de este hongo atacando adultos de *H. hampei* (Ferrari) bajo condiciones naturales, aunque Posada, *et al.*⁴³, y Bustillo *et al.*⁴⁴, afirman que este hongo no fue encontrado atacando brocas en frutos en el árbol de café.

Estudios posteriores mostraron un 50% de mortalidad de broca causada por *P. lilacinus* a nivel de laboratorio; mortalidad que empezó a presentarse a partir del segundo día de evaluación y se extendió hasta el decimosegundo⁴⁵.

1.8 *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson SOBRE UN BIOINDICADOR

Aranzazu (1998) evaluando los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. lilacinus* y *Trichoderma koningii* sobre los estados biológicos de la lombriz roja *Eisenia foetida*, concluye que dichos hongos no ocasionaron ningún efecto deletéreo en los estados de desarrollo de la lombriz.

⁴¹ GARZÓN M, I. Patogenicidad de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Verticillium lecanii*, y *Paecilomyces lilacinus* sobre la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* bajo condiciones de laboratorio. En : CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA. (30° : 2003 : Cali). Resumen del XXX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Cali : SOCOLEN, 2003. p. 71.

⁴² BUSTILLO *et al.* Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Scolitidae) populations emerging from fallen coffee berries. En : Florida Entomologist Florida. Vol. 82 No. 4. 1999. p. 491-498.

⁴³ POSADA *et al.*, *Op cit.*, p. 37.

⁴⁴ BUSTILLO *et al.*, Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Scolitidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Op cit.*, p. 491 – 498

⁴⁵ POSADA, *Op cit.*, 39.

2. DISEÑO METODOLÓGICO

La investigación comprendió una fase en laboratorio, dos en campo y una última en laboratorio en la cual se evaluó el efecto de repelencia de los aislamientos PL9301 de *Paecilomyces lilacinus*, Bb9205 de *Beauveria bassiana* y el aislamiento Ma9236 de *Metarhizium anisopliae*. La investigación tuvo una duración total de 21 meses y fue desarrollada en la zona central cafetera colombiana.

2.1 FASE DE LABORATORIO

2.1.1 Localización. Esta fase se llevó a cabo en el laboratorio de Control de Calidad de Entomopatógenos de la disciplina de Entomología de Cenicafé, ubicado en Chinchiná (Caldas) a 5°01' de latitud norte, 75°36' longitud oeste; 1.425 msnm, con una temperatura promedio de 19,9 °C, humedad relativa 84,1% y precipitación anual de 2.833 mm.

Se evaluaron los aislamientos de *P. lilacinus* PL9601 aislado de *H. hampei*, PL9301 aislado de *Leptopharsa gibbicarina*, PLHT de origen desconocido y una formulación comercial Micosplag® la cual fue utilizada en su forma comercial para realizar las pruebas de laboratorio y de campo.

2.1.2 Reactivación de los aislamientos de *P. lilacinus* sobre la broca del café. Los aislamientos a utilizar durante el experimento se reactivaron y reaislaron sobre broca del café, pero no la formulación comercial. La reactivación se llevó a cabo teniendo en cuenta que estudios previos demostraron que la transferencia en serie de los aislamientos sobre medios artificiales en el laboratorio, trae como consecuencia la atenuación de la virulencia del hongo y la disminución en la producción de esporas⁴⁶.

Para este propósito se utilizaron por cada aislamiento 20 brocas procedentes de la Unidad de Cría de Parasitoides de Cenicafé, siguiendo el procedimiento descrito por Marín y Bustillo (2002) (Figura 4). Las brocas se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio 0,5% durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada estéril durante 1 minuto y luego se colocaron sobre papel toalla esterilizada para eliminar el exceso de agua. Posteriormente, las brocas se inocularon por

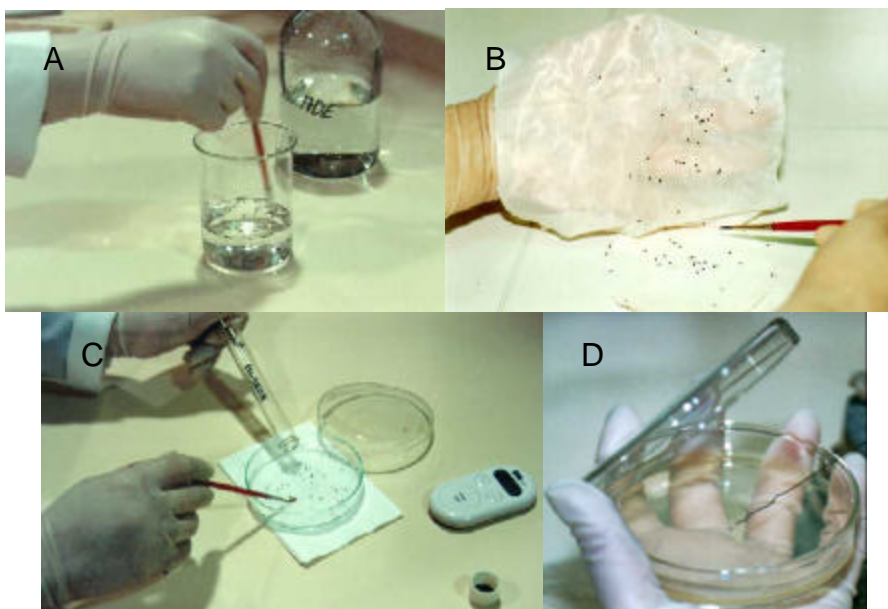
⁴⁶ PADILLA M., G. N. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* provenientes de diferentes órdenes de insectos. Manizales, 1998, 75 p. Tesis. (Bacteriólogo). Universidad Católica. Facultad de Bacteriología, p. 20

inmersión en una suspensión concentrada de esporas (1×10^8 esp/ml). Luego se colocaron en cámara húmeda y se dejaron en incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C hasta que ocurriera el desarrollo del hongo sobre el insecto.

Una vez los hongos desarrollaron su mecanismo de patogenicidad sobre el hospedero, se seleccionaron las brocas que presentaron un mayor crecimiento del hongo y se sometieron de nuevo a desinfestación con hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto; luego se colocaron sobre papel toalla esterilizado para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Con una pinza de laboratorio se transfirieron las brocas a razón de una broca depositada en el centro de cada caja Petri con medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y posteriormente, se propagaron masivamente en diez botellas con arroz previamente esterilizado.

Cuando los cultivos tuvieron 25 días de crecimiento se obtuvo el inóculo de cada aislamiento y se realizaron pruebas de germinación y patogenicidad de los aislamientos.

Figura 4. Reactivación de los aislamientos de *P. lilacinus* sobre la broca del café: A) Desinfestación. B) Secado. C) Inoculación D) Individualización.



2.1.3 Selección de los aislamientos de *Paecilomyces lilacinus*. Esta etapa de selección se realizó con los aislamientos de *P. lilacinus* y el Comercial, sometiéndolos a dos pruebas biológicas fundamentales: patogenicidad sobre la broca y germinación. Estas dos variables se tuvieron en cuenta para la selección de aislamientos, teniendo como criterio un valor mínimo observado de 80% en

germinación y patogenicidad. Con los aislamientos seleccionados en esta etapa se realizaron los estudios de campo.

2.1.3.1 Prueba de germinación. Esta prueba se realizó con el fin de establecer la viabilidad de los hongos a los 25 días de desarrollo, para lo cual se determinó el porcentaje de germinación a las 24 horas (Figura 5).

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio conformado por cuatro tratamientos (los tres aislamientos puros del hongo *P. lilacinus* y el producto comercial). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones (alícuotas) (Figura 6).

Se siguió el procedimiento descrito por Vélez, *et al.*⁴⁷

El cual consistió en preparar una caja Petri con 10-15 ml de Agar-agua al 1,5 % sin acidificar, por cada aislamiento del hongo y luego marcar 5 puntos en la superficie externa inferior de cada caja, correspondientes a los puntos en los cuales se depositaron alícuotas de 10 microlitros de suspensión del hongo (1×10^6 esp/ml). Las cajas Petri inoculadas se incubaron a 25 ± 2 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó una gota de azul de lactofenol a cada alícuota para detener la germinación y a la vez teñir las esporas del hongo, luego se cortaron las alícuotas depositándolas sobre una lámina portaobjetos y se cubrieron con una laminilla.

Se hicieron observaciones al microscopio en objetivo 40X, hasta determinar un promedio de 100 esporas por alícuota. La variable de respuesta fue el porcentaje de esporas germinadas (PG) con respecto al total de esporas [PG = (número de esporas germinadas / total esporas) *100], teniendo como criterio de germinación, aquellas esporas que presentaron una longitud del tubo germinal mayor al diámetro de la misma. Para la evaluación de germinación de las esporas del producto comercial se contabilizaron las esporas de *P. lilacinus*, *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

⁴⁷ VÉLEZ et al. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. En : Boletín Técnico Cenicafé. Chinchina. Vol. 17, No., 1. 1997. p. 1-34.

Figura 5. Germinación de las esporas de *P. lilacinus*: A) Deposición de alícuotas en medio agar agua. B) Tinción de las alícuotas con azul de lactofenol a las 24 horas de incubación. C) Remoción de las alícuotas. D) Depósito en láminas de vidrio para observación al microscopio.

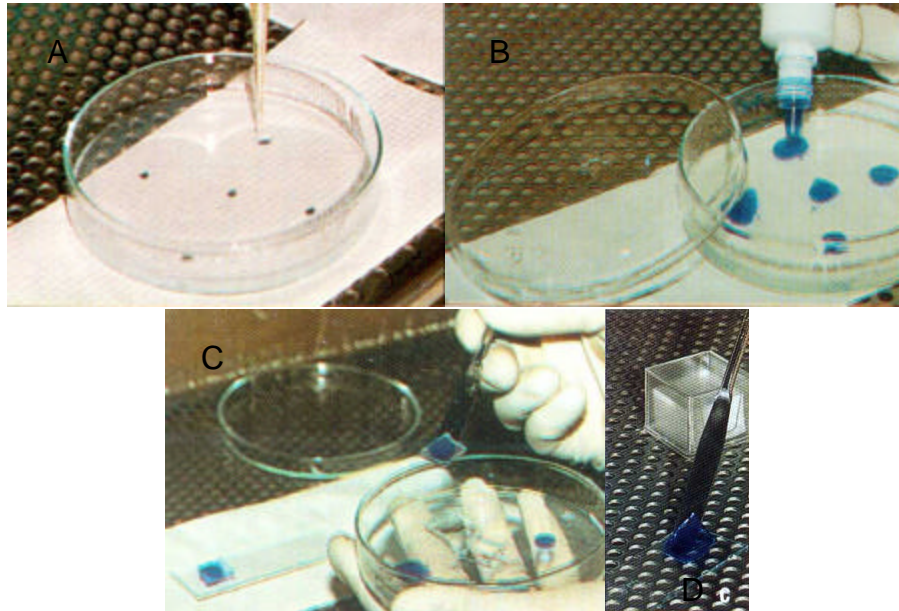
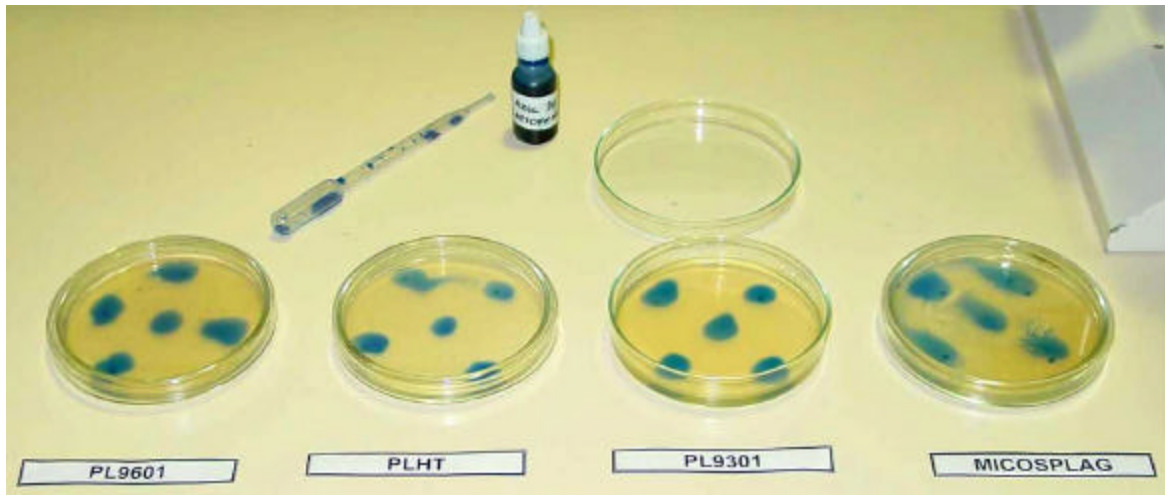


Figura 6. Montaje en cajas de Petri de los aislamientos de *P. lilacinus* para la prueba de germinación



2.1.3.2 Prueba de patogenicidad. Esta prueba se realizó con el fin de determinar el nivel de infección de todos los aislamientos evaluados, para lo cual se determinó el porcentaje de mortalidad de las brocas a los ocho días de inoculadas.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar conformado por cinco tratamientos: cuatro aislamientos del hongo *P. lilacinus*, y un testigo el cual no entró en contacto con esporas del hongo. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones y cada repetición estuvo constituida por 15 unidades de observación (viales de antibiótico) (Figura 7a).

Se siguió la metodología de bioensayo propuesta por González, *et al.*, en la cual, para cada aislamiento a evaluar se tomaron 60 adultos de broca, recién emergidas, procedentes de la Unidad de producción de parasitoides de Cenicafé, distribuidas en cuatro repeticiones, cada una con 15 individuos⁴⁸. Estas se sometieron a un proceso de desinfestación de la misma manera en que se realizó para la reactivación, con el objeto de remover otros microorganismos (hongos, bacterias y levaduras) que puedan interferir en la validez de los bioensayos; una vez sometidas a la desinfestación se seleccionaron las que presentaron mayor actividad.

Las esporas de los aislamientos reactivados con un tiempo de incubación no mayor a un mes, se suspendieron en 10 ml de Agua Destilada Estéril (ADE) con Tween 80 al 0.1%, agitando en un agitador Vortex durante un minuto. A partir de esta suspensión madre se realizaron cuatro diluciones consecutivas en base 10. La estimación de esporas presente se realizó en la cámara de Neubauer a partir de la última dilución. El promedio de seis recuentos se multiplicó por el recíproco de la dilución en la cual se hizo el recuento y por el factor de corrección de la cámara (10^4). Para llegar a la concentración deseada, (1×10^7 esp/ml) se utilizó la fórmula:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2 \text{ donde } V1 = V2 \times C2 / C1$$

V1 = Volumen de la suspensión madre necesario.

C1 = La concentración deseada.

V2 = El volumen total de la suspensión.

C2 = La concentración de esporas obtenida del recuento.

Las brocas adultas fueron inoculadas por inmersión en una suspensión de 10 ml a una concentración del hongo de 1×10^7 esp/ml, por dos minutos. Los insectos ya infectados se colocaron sobre papel toalla estéril para quitar el remanente de humedad y se transfirieron con pinceles estériles en forma individual a viales de vidrio (frasco de antibiótico) con un disco de papel previamente humedecido con ADE en la base del vial y tapando con una mota de algodón estéril.

⁴⁸ GONZÁLEZ *et al.* Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafé. Chinchina. Vol. 44, No. 3. 1993. p. 93-102.

Las evaluaciones de cada tratamiento se realizaron por 11 días. Diariamente se adicionó una gota de ADE sobre el disco de papel con el fin de favorecer la humedad del bioensayo y la acción del hongo sobre las brocas (Figura 7b). Las brocas que no mostraron signos del hongo se llevaron a una cámara húmeda por espacio de una semana. Finalmente, las que no mostraron ningún signo, fueron aplastadas, montadas en portaobjetos, teñidas con azul de lactofenol y observadas al microscopio donde se determinó la causa de su muerte. Se estableció en porcentaje de mortalidad (PM) [$PM = (\text{número de brocas muertas} / \text{total brocas}) * 100$].

Figura 7. Procedimiento del bioensayo de patogenicidad: A) Montaje de los tratamientos para la evaluación de la patogenicidad. B) Adición de agua destilada estéril



De acuerdo con los resultados, se seleccionaron los aislamientos PL9301 y el Comercial, los cuales fueron evaluados en la fase de campo.

2.2 FASE DE CAMPO

2.2.1 Localización. Las fases de campo se llevaron a cabo en la Estación Central “Naranja” del Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé), localizada en el municipio de Chinchiná, Latitud N 4°59’, Longitud 75° 39’, Altitud 1400 msnm; la cual posee las siguientes características anuales de clima: temperatura media 20.7 °C, temperatura máxima 26.8°C, temperatura mínima 16.3° C, humedad relativa 78%, precipitación 2711 mm, brillo solar 1496.9 horas. En campo, en los lotes donde se llevaron a cabo los experimentos, no se habían realizado aplicaciones con insecticidas químicos ni biológicos con el fin de tener un ambiente lo más natural posible. Sólo se hizo como práctica de control, la cosecha oportuna. En esta fase, en primera instancia se evaluaron los aislamientos PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes (Etapa 1). Posteriormente, con estos dos aislamientos, se evaluaron cuatro tiempos de aplicación del hongo (Etapa 2).

2.2.2 Etapa 1. Evaluación de la patogenicidad del aislamiento PL9301 y del Comercial en tres dosis diferentes. En un lote sembrado con café Variedad Colombia, con una distancia de siembra de 1 m x 1.5 m se demarcaron 56 parcelas experimentales donde cada parcela experimental (o unidad experimental), estuvo constituida por 49 árboles, de los cuales 40 se dejaron como surco doble, es decir, encerrando nueve árboles que conformaron la parcela efectiva y de esta manera evitar el efecto de borde. Por lo tanto, la parcela efectiva estuvo conformada por los nueve árboles centrales, en los cuales se aplicaron los tratamientos (Figura 8). De la parcela efectiva se seleccionó el árbol central, y en este una rama productiva (unidad de medición). Las parcelas se marcaron con un letrero que llevaba el código para identificar el tratamiento y la repetición.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio en arreglo factorial $2 \times 3 + 1$; correspondiente a los dos aislamientos (PL9301 y el Comercial), tres dosis (1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 esporas/árbol) y un testigo absoluto que solo se asperjó con agua y estuvo aislado de los demás tratamientos. Cada tratamiento tuvo ocho repeticiones. Los aislamientos y las dosis evaluadas se asignaron aleatoriamente a las unidades experimentales, de acuerdo con el diseño propuesto.

Con el fin de iniciar con un porcentaje de infestación artificial conocido, de cada rama seleccionada o unidad de medición, se retiraron todos los frutos brocados y posteriormente se infestaron artificialmente con brocas, utilizando la metodología de mangas entomológicas propuesta por Villalba, *et al.*⁴⁹, (Figura 9). Esta metodología consistió en acoplar en cada rama seleccionada, un aro metálico (alambre N° 10) de 20 cm de diámetro por 70 cm de longitud el cual se cubre con una tela de muselina blanca de 40 cm de diámetro por 90 cm de longitud y de esta forma evitar el escape o entrada de las brocas.

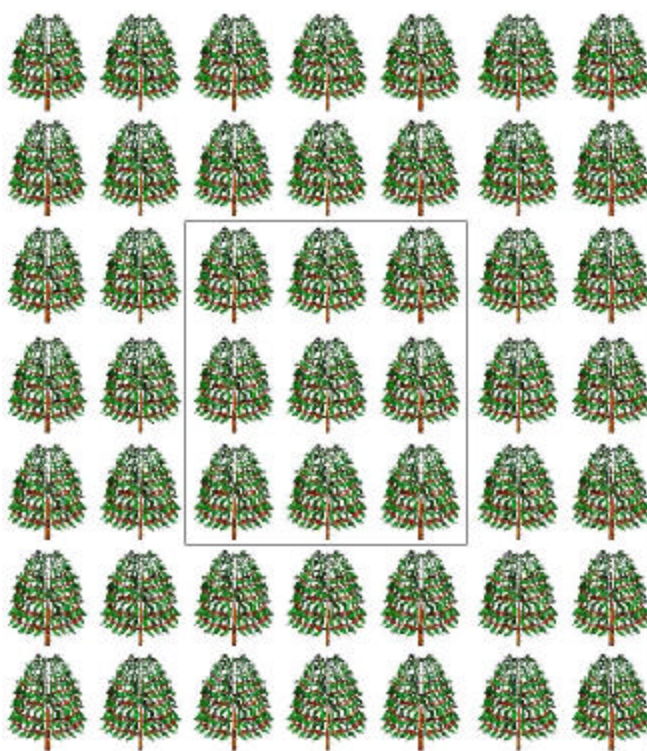
En la infestación artificial se utilizaron brocas hembras adultas procedentes de la Unidad de Cría de Parasitoides de Cenicafé, transportadas hasta el campo en tarros de rollos fotográficos tapados con muselina; a los tarros se les adicionó papel picado para evitar que las brocas se mutilen. Se utilizaron 200 brocas por cada rama para realizar la infestación. Se infestaron ramas con frutos de 150 días de madurez fisiológica.

Tres días después de cada infestación artificial, se aplicaron los tratamientos, es decir, cada uno de los aislamientos en tres dosis del hongo: 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 esp/árbol, Las aspersiones se realizaron siguiendo la metodología propuesta por

⁴⁹ VILLALBA et al. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. *En* : CENICAFE. Chinchiná. Vol. 46, No. 3. 1995. p.152-163.

Mejía, *et al.*⁵⁰, la que consistió en utilizar una aspersora de presión previa retenida Calimax “Leo Cafetera”, de 10 litros de capacidad, con boquilla TX3 de bajo flujo de descarga, a una presión de 40 PSI (Figura 10). La preparación utilizada en cada tratamiento estuvo compuesta por agua, hongo y aceite agrícola “Carrier” como agente humectante del hongo (Tabla 1). Se estableció un tiempo de 14 segundos de aplicación de los tratamientos, siete por cada cara del árbol; para un volumen de 50 cc de preparación por árbol. La aplicación estuvo dirigida a los nueve árboles de la parcela efectiva, para un total de 72 árboles asperjados por tratamiento.

Figura 8. Diseño de la parcela experimental con la demarcación de la parcela efectiva.



⁵⁰ MEJÍA et al. Técnicas de aspersión y evaluación de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. En: SEMINARIO INTERNACIONAL TEÓRICO – PRÁCTICO SOBRE ENTOMOPATÓGENOS, PARASITOIDES OTROS ENEMIGOS DE LA BROCA DEL CAFÉ. (2° : 2002 : Chinchina). Memorias del II Seminario Internacional Teórico – Práctico sobre Entomopatógenos, Parasitoides otros enemigos de la broca del café. Chinchiná : CENICAFÉ, 2002. p. 196 - 210.

Figura 9. Aspecto de las mangas entomológicas: A) Disposición de la rama dentro de la manga. B) Infestación artificial con brocas adultas. C) Manga entomológica sellada

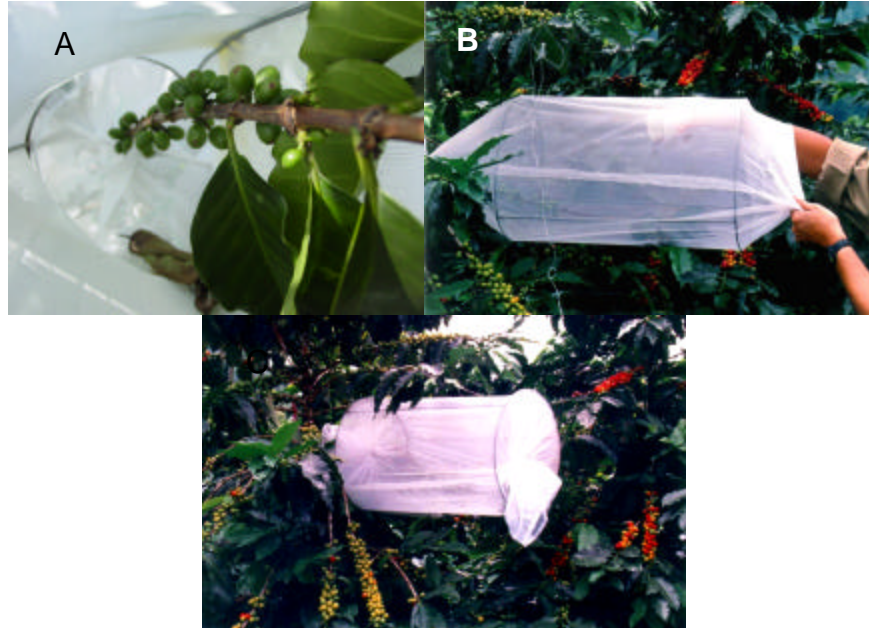


Tabla 1. Cantidades utilizadas en la aspersión del aislamiento PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes

Aislamiento	Dosis	Concentración	Cantidad	Agua	Aceite	Volumen total
	(esp/arb)	(esp/g)	(g)	(cc)	(cc)	(cc)
PL9301	1x10 ⁸	7,4x10 ⁹	1	3588	11	3600
PL9301	5x10 ⁸	7,4x10 ⁹	5,3	3584,1	11	3600
PL9301	1x10 ⁹	7,4x10 ⁹	10	3574,3	11	3600
Comercial	1x10 ⁸	6,8x10 ⁹	1	3588	11	3600
Comercial	5x10 ⁸	6,8x10 ⁹	4,9	3583,7	11	3600
Comercial	1x10 ⁹	6,8x10 ⁹	9,7	3579	11	3600

esp/árb = esporas/árbol. esp/g = esporas/gramo. g = gramo. cc = centímetro cúbico.

Al momento de la aspersión se retiró la manga de la rama y se descartaron en un balde con aceite quemado, las brocas que se encontraban aun en la manga. Una

vez realizada la aspersión en los árboles, se procedió a cubrir nuevamente la rama con la manga para ser retirada en el momento de la evaluación.

Veinte días después de las aspersiones, se cosecharon todos los frutos brocados de cada rama, colocándolos en una bolsa plástica alargada, separándolos cada uno por un nudo hecho con la misma bolsa. Especial cuidado se tuvo en identificar estas bolsas con el código de la parcela. Todas las bolsas se llevaron en cajas de icopor para facilitar su transporte.

Figura 10. A) Operador de aspersión. B) Aspersora de presión previa retenida C) Aspecto de la nube de aspersión



Los frutos cosechados se disectaron en el laboratorio, donde se contabilizó el total de brocas y el número de brocas muertas, de estas, las que no mostraron signos del hongo se llevaron a una cámara húmeda por espacio de una semana. Finalmente, las que no mostraron ningún signo, fueron aplastadas, montadas en portaobjetos, teñidas con azul de lactofenol y observadas al microscopio donde se determinó la causa de su muerte.

La variable de respuesta fue el porcentaje de mortalidad (PM) de brocas con respecto al total de brocas, en la unidad de muestreo o rama [$PM = (\text{número de brocas muertas} / \text{total brocas}) * 100$]. El valor del porcentaje de brocas muertas de cada unidad experimental, fue corregido con el promedio de mortalidad de brocas del testigo absoluto (mortalidad natural), utilizando el criterio de mortalidad corregida (MC) propuesto por Schneider-Orelli: “[$MC = (\text{mortalidad tratamiento} - \text{mortalidad testigo}) / (100 - \text{mortalidad testigo}) * 100$]”⁵¹. Al cabo de un día se evaluó el porcentaje de infestación (PI), contando el número total de frutos y el número de frutos brocados ($PI = \text{número de frutos perforados en la rama} / \text{total frutos de la rama} * 100$).

2.2.3 Etapa 2. Evaluación de cuatro tiempos de aplicación de los aislamientos PL9301 y del Comercial. Se seleccionó un lote sembrado con café variedad Colombia de 3 años de edad, a una distancia de siembra de 1 m x 1.5 m. en el cual se demarcaron 45 parcelas experimentales, donde cada parcela experimental (o unidad experimental) estuvo constituida por 49 árboles, de los cuales 40 se dejaron como surco doble, es decir, encerrando nueve árboles que conformaron la parcela efectiva y de esta manera evitar el efecto de borde. Por lo tanto, la parcela efectiva estuvo conformada por los nueve árboles centrales, en los cuales se aplicaron los tratamientos (Figura 8). De la parcela efectiva se seleccionó el árbol central, y en este una rama productiva (unidad de medición). Las parcelas se marcaron con un letrero que llevaba el código para identificar el tratamiento y la repetición.

Con los aislamientos PL9301 y el Comercial, se evaluaron cuatro momentos de aplicación del hongo, para lo cual se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio en arreglo factorial $2 \times 4 + 1$ correspondiente a los dos aislamientos, cuatro tiempos de aplicación: tres días antes de la infestación con broca (TDAI), dos horas antes de infestación (DHAI), dos horas después de la infestación (DHDI) y tres días después de la infestación con broca (TDDI) y un testigo absoluto que solo se asperjó con agua y estuvo aislado de los demás tratamientos. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Los aislamientos y los tiempos evaluados fueron asignados aleatoriamente a las unidades experimentales, de acuerdo con el diseño propuesto.

Con el fin de iniciar con un porcentaje de infestación artificial conocido, de cada rama seleccionada o unidad de medición, se retiraron todos los frutos brocados, dejando solo 50 frutos y posteriormente fue infestada artificialmente con broca,

⁵¹ CIBA-GEIGY. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. 2 ed. Suiza : El autor, 1981. p. 120.

utilizando la metodología de mangas entomológicas propuesta por Villalba, *et al.*⁵², (Figura 9). Esta metodología consistió en acoplar en cada rama seleccionada, un aro metálico (alambre N° 10) de 20 cm de diámetro por 70 cm de longitud el cual se cubre con una tela de muselina blanca de 40 cm de diámetro por 90 cm de longitud y de esta forma evitar el escape o entrada de las brocas.

En la infestación artificial se utilizaron brocas hembras adultas procedentes de la Unidad de Cría de Parasitoides de Cenicafé, transportadas hasta el campo en tarros de rollos fotográficos tapados con muselina; a los tarros se les adicionó papel picado para evitar que las brocas se mutilen. Se utilizaron 200 brocas por cada rama para realizar la infestación. Se infestaron ramas con frutos de 150 días de madurez fisiológica.

Las aspersiones de los tratamientos se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Mejía, *et al.*⁵³, la que consistió en utilizar una aspersora de presión previa retenida Calimax “Leo Cafetera”, de 10 litros de capacidad, con boquilla TX3 de bajo flujo de descarga, a una presión de 40 PSI (Figura 10). La preparación utilizada en cada tratamiento estuvo compuesta por agua, hongo y aceite agrícola “Carrier” como agente humectante del hongo (Tabla 2). Se estableció un tiempo de 14 segundos de aplicación de los tratamientos, siete por cada cara del árbol; para un volumen de 50 cc de preparación por árbol. La aplicación estuvo dirigida a los nueve árboles de la parcela efectiva, para un total de 180 árboles asperjados por aislamiento.

Al momento de la aspersión se retiró la manga de la rama y se descartaron en un balde con aceite quemado, las brocas que se encontraban aun en la manga. Una vez realizada la aspersión en los árboles, se procedió a cubrir nuevamente la rama con la manga para ser retirada en el momento de la evaluación.

⁵² VILLALBA et al, Op cit., p. 40.

⁵³ MEJIA et al, Op cit., p. 42.

Tabla 2. Cantidades utilizadas en la aspersión del aislamiento PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación y a una dosis de 1×10^{10} esporas/árbol

Aislamiento	Concentración (esp/g)	Cantidad (g)	Agua (cc)	Aceite (cc)	Volumen total (cc)
PL9301	$7,4 \times 10^9$	243,2	8730	27	9000
Comercial	$6,8 \times 10^9$	264	8709	27	9000

esp/arb = esporas/árbol. esp/g = esporas/gramo. g = gramo. cc = centímetro cúbico.

20 días después de las aspersiones, se cosecharon todos los frutos brocados de cada rama, colocándolos en una bolsa plástica alargada, separándolos cada uno por un nudo hecho con la misma bolsa. Especial cuidado se tuvo en identificar estas bolsas con el código de la parcela. Todas las bolsas se llevaron en cajas de icopor para facilitar su transporte.

Los frutos cosechados fueron disecados en el laboratorio, donde se contabilizó el total de brocas y el número de brocas muertas. De estas, las que no mostraron signos del hongo se llevaron a una cámara húmeda por espacio de una semana. Finalmente, las que no mostraron ningún signo, fueron aplastadas, montadas en portaobjetos, teñidas con azul de lactofenol y observadas al microscopio donde se determinó la causa de su muerte.

Con el registro del número de brocas y el número de brocas muertas en cada unidad experimental, se obtuvo la variable de respuesta porcentaje de mortalidad (PM) $[PM = (\text{número de brocas muertas} / \text{total brocas}) * 100]$. El valor del porcentaje de brocas muertas de cada unidad experimental, fue corregido con el promedio de mortalidad de brocas del testigo absoluto (mortalidad natural), utilizando el criterio de mortalidad corregida (MC) propuesto por Schneider-Orelli: $[MC = (\text{mortalidad tratamiento} - \text{mortalidad testigo}) / (100 - \text{mortalidad testigo}) * 100]$ (Ciba-Geigy, 1981). Al cabo de un día se evaluó el porcentaje de infestación (PI), contando el número total de frutos y el número de frutos brocados $[PI = (\text{número de frutos perforados en la rama} / \text{total frutos de la rama}) * 100]$.

2.3 EVALUACIÓN DE LA REPELENCIA DE *Paecilomyces lilacinus*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* HACIA LA BROCA DEL CAFÉ, *Hypothenemus hampei* (Ferrari)

Esta actividad se realizó con el propósito de evaluar la preferencia de la broca hacia frutos de café tratados con los aislamientos PL9301 de *Paecilomyces lilacinus*, Bb9205 de *Beauveria bassiana* y Ma9236 de *Metarhizium anisopliae*.

2.3.1 Localización. La presente actividad se llevó a cabo en un cuarto climatizado de Cenicafé, con dimensiones de 3.5 m de ancho por 3.7 de largo, por 3.5 m de alto, temperatura entre 26 y 29°C, humedad relativa entre 70% y 80%, sin corrientes de aire, y períodos de luz artificial de 12 horas (lámparas de tubo de 48 vatios, luz día).

En esta actividad se utilizó un diseño completamente aleatorio conformado por los cinco tratamientos, donde cada uno estuvo constituido por 250 frutos cerezas de café variedad Colombia sanos. Cada tratamiento constó de cinco unidades experimentales y cada unidad experimental estuvo conformada por una bandeja de malla metálica con 50 frutos (Figura 11). Los primeros 250 frutos se inocularon por inmersión en una mezcla que contenía 3 cc/l de aceite agrícola Carrier en agua y se adicionó 1×10^{10} esp/l del aislamiento PL9301; posteriormente, el mismo procedimiento se realizó con los aislamientos Bb9205 de y Ma9236. Se utilizaron dos testigos, en donde los frutos del primero fueron sumergidos en un litro de agua destilada estéril y los del segundo en un litro que contenía agua destilada estéril y 3 cc de aceite agrícola Carrier; ambos testigos no entraron en contacto con esporas de ningún hongo.

Los 250 frutos correspondientes a cada tratamiento, colocados en grupos de 50 (Figura 11) sobre 25 bandejas de malla metálica de 20 cm de largo por 10 cm de ancho cada una, se suspendieron a 145 cm de altura dentro de una jaula entomológica rectangular, de base cuadrada, cubierta con muselina blanca de 1.8 m de altura por 1,7 m de base (Figura 12); dicho procedimiento se efectuó con el fin de realizar una infestación artificial con broca dentro de la jaula; para lo cual, se liberaron 1250 brocas adultas vivas, recién emergidas, procedentes de la unidad de cría de Cenicafé. Estas brocas se liberaron a nivel del suelo con el propósito de que volaran e infestaran los frutos y de esta forma determinar la preferencia del insecto hacia los frutos de café cereza suspendidos dentro de la jaula entomológica.

Figura 11. Disposición de los frutos de café cereza sobre las bandejas metálicas



La preferencia se evaluó al cabo de ocho días, donde se estableció el porcentaje de infestación (PI) en cada bandeja metálica, determinando los frutos brocados y no brocados con relación al total de frutos [PI = (número de frutos brocados / total de frutos) x 100].

Figura 12. A) Jaula entomológica cerrada. B) Jaula entomológica abierta



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 FASE DE LABORATORIO

3.1.1 Prueba de germinación. El análisis de varianza (Anexo B) para los porcentajes de germinación mostró diferencias entre los aislamientos siendo el aislamiento PLHT el que presentó el mayor porcentaje de germinación (98,7%) según la prueba de comparación de Tukey al 5% (Tabla 3 y Anexo C).

Tabla 3. Germinación promedia de las esporas de diferentes aislamientos de *Paecilomyces lilacinus* y el Comercial

Aislamiento	Germinación de esporas	
	Prom.	C.V.
	(%)	(%)
PLHT	98,7 A	0,52
Comercial	96,5 B	0,78
PL9301	96,2 B	0,94
PL9601	96,5 B	1,10

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (2). Prom. = Promedio. C.V. = Coeficiente de Variación.

Sin embargo, todos los tratamientos presentaron porcentajes de germinación superiores al 96%, manteniendo altos valores según los criterios de calidad (mayores al 80%). Por tanto, esta variable no se tuvo en cuenta para la selección de los aislamientos evaluados en campo.

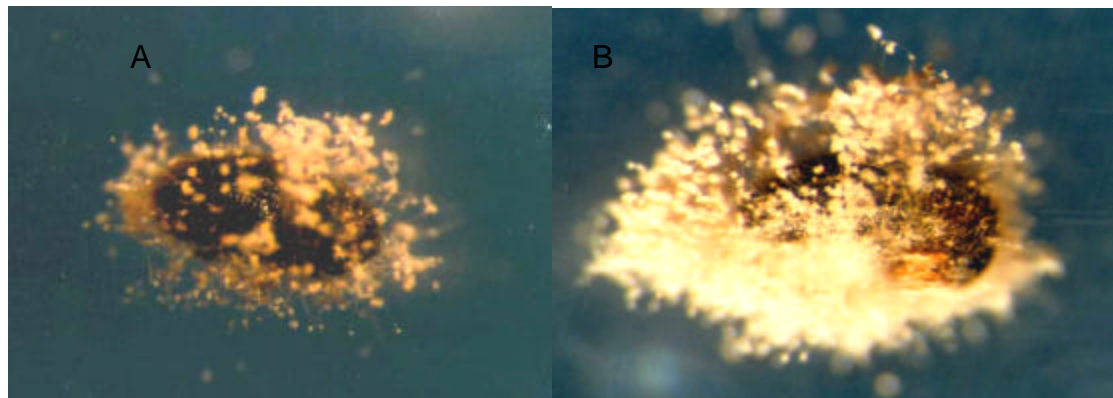
3.1.2 Prueba de patogenicidad. Debido a que algunas brocas presentaron esporulaciones de *P. lilacinus* junto con esporulaciones de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y en otros casos de los tres hongos a la vez; se determinó la mortalidad total por aislamiento. Por tanto, el análisis de varianza para los resultados de los porcentajes de mortalidad de broca corregidos, mostró diferencias entre los tratamientos (Anexo D). Las mayores mortalidades se obtuvieron con los

aislamientos PL9301 y el Comercial según prueba de Tukey al 5%. El testigo no presentó contaminación por ninguno de los hongos y fue estadísticamente diferente de los demás tratamientos (Tabla 4 y Anexo E).

Los adultos de broca atacados por *P. lilacinus* presentaron estructuras similares a escamas de lepidópteros adheridas a pedicelos delgados. El cubrimiento del hongo no fue denso y su color se tornó crema y lila a medida que avanzó la esporulación (Figura 13).

Con referencia a los hospedantes originales, estos resultados confirman lo encontrado en otros estudios en donde no se demostró ninguna relación entre la patogenicidad y el origen de los aislamientos⁵⁴, ni relación entre los porcentajes de germinación de las esporas del hongo y los de mortalidad de broca del café.

Figura 13. *Paecilomyces lilacinus* infectando adultos de *Hypothenemus hampei*. A) Inicio de la esporulación del hongo B) Esporulación completa



El tiempo en el cual ocurrió la mortalidad de broca se determinó registrando el promedio de días que tardó el hongo en matar la población de insectos. El análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos (Anexo F) y la prueba de comparación de Tukey al 5% indicó diferencias a favor de los aislamientos PL9301, PL9601 y el Comercial debido a que causaron la muerte de las brocas en un menor tiempo. El aislamiento PLHT fue el que más tardó en causar mortalidad (Tabla 4 y Anexo G). El TPMB es fundamental al momento de realizar una

⁵⁴ MOOURHOUSE et al. Laboratory selection of *Metarhizium* spp isolates for control of vine weevil larvae (*O. sulcatus*) En : Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 62 No. 1. 1993. p. 15 - 21.

selección por patogenicidad ya que si este tiempo es menor, mayor es su potencial y eficiencia como agente de control (Padilla, 1998).

Además de que la variable de selección propuesta era el porcentaje de mortalidad en broca, se puede apreciar que los aislamientos PL9301 y el Comercial presentan el menor tiempo promedio de mortalidad. De mejor forma se expresa la mortalidad causada por el patógeno principal lo que permite una mayor exactitud en la evaluación en campo.

Tabla 4. Mortalidad de adultos de la broca del café y tiempo de mortalidad causada por diferentes aislamientos de *Paecilomyces lilacinus* en laboratorio. (Datos corregidos en relación con el testigo)

Aislamiento	Mortalidad de broca		Tiempo Promedio de mortalidad de broca	
	Prom.	C. V.	Prom.	C. V.
	(%)	(%)	Días	(%)
PL9301	90,0 A	3,91	5,5 B	17.49
Comercial	83,3 A	4,12	5,0 B	25.59
PL9601	70,0 B	3,92	5,5 B	30.29
PLHT	65,0 B	4,00	7,2 A	12.15

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (10). Prom. = Promedio. C.V. = Coeficiente de Variación

Con los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio, se seleccionaron los aislamientos PL9301 y el Comercial para realizar las evaluaciones en campo.

3.2 FASE DE CAMPO

En esta etapa se utilizaron los aislamientos PL9301 y el Comercial, seleccionados en la etapa de laboratorio por el tiempo promedio y la mortalidad de broca obtenida y al igual que en la etapa de laboratorio, para las dos fases de campo, se determinó la mortalidad total por aislamiento, ya que algunas brocas presentaron

esporulaciones de *P. lilacinus* junto con esporulaciones de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y en otros casos de los tres hongos a la vez.

3.2.1 Etapa 1. Evaluación de la patogenicidad del aislamiento PL9301 y Comercial en tres dosis diferentes. Cuando se aplicaron los hongos en tres dosis diferentes, el análisis de varianza para el porcentaje de mortalidad total de broca mostró diferencias entre tratamientos (Anexo H) y la prueba de Dunnett al 5% corroboró la diferencia estadística de los promedios de todos los tratamientos frente al testigo (Tabla 5 y Anexo I).

Tabla 5. Mortalidad total y mortalidad total corregida de la broca del café causada por los aislamientos de *Paecilomyces lilacinus*: PL9301 y el Comercial aplicados en tres dosis.

Aislamiento	Dosis (esp/árb)	Mortalidad total de broca		Mortalidad total corregida de broca	
		Prom.	C.V.	Prom.	C.V.
		(%)	(%)	(%)	(%)
PL9301	1x10 ⁸	19,8 A	30,60	15,1	42,72
PL9301	5x10 ⁸	20,9 A	20,14	16,2	27,57
PL9301	1x10 ⁹	27,6 A	29,74	23,3	37,37
Comercial	1x10 ⁸	19,9 A	26,06	15,1	36,37
Comercial	5x10 ⁸	20,8 A	31,52	16,1	43,20
Comercial	1x10 ⁹	21,8 A	30,79	17,1	41,53
Testigo	SA	5,6 B	35,69	-	-

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Dunnett al 5% = (10). (esp/árb) = esporas/árbol. Prom. = Promedio SA = Sin Aplicación. C.V. = Coeficiente de Variación.

Con el fin de determinar el efecto real de los tratamientos evaluados, los porcentajes de mortalidad total se corrigieron por el testigo obteniendo así la variable de porcentaje de mortalidad de broca total corregida (Tabla 5). El análisis de varianza para esta variable no mostró efecto de la interacción aislamiento x dosis, ni del factor aislamiento ni de las dosis por separado (Anexo J). El análisis de varianza de los porcentajes de infestación artificial con broca tampoco mostró diferencias entre los tratamientos (Anexo K).

De acuerdo con los resultados obtenidos los aislamientos PL9301 y el Comercial causaron una mortalidad inferior al 30% bajo las condiciones ideales de aplicación.

En este caso, podría afirmarse que la mortalidad de las brocas no dependió del aumento de las dosis en los rangos evaluados, si no de la exposición de estas a las esporas del hongo, puesto que en trabajos realizados por Arrubla, *et al.*⁵⁵, se afirma que son alrededor de 40 - 70 esporas las que recibe el insecto y que una sola tiene la capacidad de penetrar y causarle la muerte.

Al no encontrarse diferencias de las mortalidades causadas por los tratamientos y no ser posible seleccionar uno para la etapa 2, se utilizaron los aislamientos PL9301 y el Comercial en una dosis mayor (1×10^{10} esp/árb), con el fin de aumentar las mortalidades de las poblaciones de broca. Estos aislamientos fueron aplicados en cuatro momentos de aspersión del hongo con respecto a la infestación artificial.

3.2.2 Etapa 2. Evaluación de cuatro tiempos de aplicación de los aislamientos PL9301 y Comercial. El análisis de varianza para los porcentajes de mortalidad de broca mostró diferencias entre los tiempos de aplicación evaluados (Anexo L) siendo el testigo el único tratamiento diferente de los demás según la prueba de Dunnett, al 5%. (Tabla 6 y Anexo M).

Por lo anterior y con el fin de determinar el efecto real de los tratamientos evaluados, los porcentajes de mortalidad total se corrigieron por el testigo obteniendo así la variable Porcentaje de mortalidad total corregida de broca (Tabla 6). El análisis de varianza para esta variable no mostró efecto de la interacción aislamiento x tiempos de aplicación del hongo ni del factor aislamiento por separado pero si del factor tiempos de aplicación del hongo (Anexo N). La mayor mortalidad de broca se presentó a las dos horas después de la infestación, según prueba de Tukey al 5%, indicando que la mortalidad de la broca en el campo a causa de los momentos de aplicación del hongo, dependió de la vulnerabilidad de las brocas al estar a una mayor exposición a las esporas del hongo (Tabla 7 y Anexo Ñ), corroborando así lo afirmado por Bustillo, *et al.*, (1998) donde muestran una mayor vulnerabilidad de las brocas cuando se encuentran a mayor exposición a las esporas del hongo, es decir, en el orificio o en el canal de penetración del fruto de café (posiciones A y B) (Figura 14).

⁵⁵ ARRUBLA et al. Adherencia sobre la broca del café de las esporas de *Beauveria bassiana* formuladas en polvo y en líquido. En: CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA. (7° : 2000 : Medellín). Resumen del VII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín : SOCOLEN, 2000. p. 9 - 10.

De igual manera, en trabajos anteriores realizados por Arrubla, *et al.*, (2000), se demuestra que se obtiene una mayor mortalidad de broca cuando esta es sometida a caminar sobre las esporas de *B. bassiana*, por tanto, es factible que se haya obtenido una mayor mortalidad de este insecto a las dos horas después y antes de la aplicación del hongo, puesto que esta tuvo un mayor y más rápido contacto con las esporas del hongo.

También es probable que se hayan obtenido menores mortalidades a los tres días antes y después de la aplicación del hongo, ya que si las esporas de estos no encuentran un medio adecuado para su establecimiento, en este caso, las brocas adultas, mueren a causa de deshidratación y por ende no afecta a la broca del café.

Tabla 6. Mortalidad total y mortalidad total corregida de la broca del café causada por los aislamientos de *Paecilomyces lilacinus*: PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación y a una dosis de 1×10^{10} esp/árbol

Aislamiento	Tiempos de aplicación	Mortalidad total		Mortalidad total corregida	
		Prom.	C.V.	Prom.	C.V.
		(%)	(%)	(%)	(%)
PL9301	TDAI	24,5 A	11,98	17,9	17,86
PL9301	DHAI	25,4 A	27,77	18,8	40,73
PL9301	DHDI	34,9 A	19,78	29,2	25,73
PL9301	TDDI	34,5 A	14,92	28,7	19,49
Comercial	TDAI	27,2 A	16,91	20,8	24,04
Comercial	DHAI	30,2 A	22,68	24,0	30,96
Comercial	DHDI	36,2 A	11,97	30,5	15,41
Comercial	TDDI	34,2 A	14,21	28,4	18,60
Testigo	SA	8,1B	12,40	-	-

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Dunnett al 5% = (10). TDAI = Tres Días Antes de Infestación. DHAI = Dos Horas Antes de Infestación. DHDI = Dos Horas Después de Infestación. TDDI = Tres Días después de Infestación. SA = Sin Aplicación. Prom. = Promedio. C.V. = Coeficiente de Variación.

Es probable que también se haya obtenido una mayor mortalidad durante estos tiempos debido al efecto potencial del inóculo del hongo presente en los insectos afectados y su distribución a otras poblaciones de broca, es decir, el insecto por si mismo constituye una fuente de inóculo del hongo para dispersión de este agente biológico.

En general, comparando los resultados de campo con los obtenidos en laboratorio, se observa que la patogenicidad en campo se ve reducida debido a que los hongos reducen su persistencia en el follaje de los árboles a consecuencia de las condiciones ambientales.

Tabla 7. Mortalidad total de broca corregida causada por los aislamientos de *Paecilomyces lilacinus*: PL9301 y el Comercial para el factor tiempos de aplicación por separado

Tiempo de aplicación del hongo	Mortalidad
	Promedio (%)
Dos Horas Después de Infestación	29,9 A
Dos Horas Antes de Infestación	28,6 A
Tres Días Después de Infestación	21,4 B
Tres Días Antes de Infestación	19,3 B

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (5). (%) = Porcentaje.

Por otra parte, los aislamientos PL9301 y el Comercial presentaron porcentajes de mortalidad similares en cada una de las etapas de campo por separado. También se observa un aumento en la mortalidad de la broca al aumentar 10 veces la dosis de los aislamientos aplicados, indicando que al aplicar 1×10^{10} esporas/árbol del hongo a los tres días después de realizada la infestación artificial, las mortalidades aumentaron en un 6% con respecto a las mortalidades obtenidas en el mismo tiempo con la dosis 1×10^9 esporas/árbol.

El Análisis de varianza de los porcentajes de infestación con broca en mangas entomológicas para los tiempos de aplicación del hongo por separado mostró diferencias entre los tratamientos (Anexo O). El menor porcentaje de infestación

se presentó en los tratamientos que incluían aplicaciones del hongo dos horas antes de la infestación con broca según la prueba de Tukey al 5% (Tabla 8 y Anexo P), lo que supone un posible efecto de alguna repelencia del hongo sobre la broca cuando es aplicado antes de la llegada de esta al fruto.

Debido a lo anterior y a que el producto comercial está compuesto por una mezcla de los hongos *P. lilacinus*, *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se planteó la evaluación de la repelencia de estos tres hongos a nivel de campo.

Tabla 8. Promedios y coeficiente de variación para los porcentajes infestación con broca para el factor tiempos de aplicación por separado

Tiempos de aplicación del hongo	Infestación	
	Prom.	C.V.
	(%)	(%)
Dos Horas Después de Infestación	99,2 A	1,04
Tres Días Después de Infestación	95,2 AB	6,20
Tres Días Antes de Infestación	91,1 BC	4,97
Dos Horas Antes de Infestación	68,2 C	13,07

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (5). Prom. = Promedio. C.V. = Coeficiente de variación.

3.3 EVALUACIÓN DE LA REPELENCIA DE *Paecilomyces lilacinus*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* HACIA LA BROCA DEL CAFÉ

El análisis de varianza mostró para el porcentaje de infestación, diferencias entre tratamientos (Anexo Q). Los menores porcentajes de infestación se obtuvieron con los aislamientos PL9301 y Ma9236 según la prueba de comparación de Tukey al 5% (Tabla 9 y Anexo R).

Los hongos *Paecilomyces lilacinus* y *Metarhizium anisopliae* redujeron bajo condiciones de laboratorio la infestación de los frutos de café en un 15% Y 19,2% respectivamente, con respecto al promedio de infestación de los tratamientos testigos (91,8%)

Estos resultados son similares a los obtenidos por Rath, A. C. y Tidbury, C. A.⁵⁶, donde encontraron efecto de repelencia de *Metarhizium anisopliae* hacia *Coptotermes acinaciformis* (Isoptera: Rhinotermitidae) y por Haimanot⁵⁷, donde demostraron el efecto de repelencia obtenido con los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* hacia *Macrotermes subhyalis* (Isoptera: Termitidae). Por otra parte, existe un registro de la repelencia de las sustancias volátiles (alcoholes): Z3-hexenol y 3-metylciclohex-2-1-ol hacia la broca del café⁵⁸. Este efecto posiblemente se debe a que las esporas de estos hongos emiten químicos que repelen a las brocas adultas provocando un efecto negativo en la orientación de un organismo, haciéndoles que prefieran buscar frutos limpios o no permitiéndoles atacar el fruto

⁵⁶ RATH, A. C. y TIDBURY, C. A. Susceptibility of *Coptotermes acinaciformis* (Isoptera: Rhinotermitidae) and *Nasutitermes exitiosus* (Isoptera: Termitidae) to two commercial isolates of *Metarhizium anisopliae*. En : Sociobiology. (On line) Australia, 1996. [Citado 3 de Noviembre de 2003]. Vol. 28 No. 1. p. 67-72. Disponible en Internet: <http://pest.cabweb.org/Archive/Spotlight/SPOTON.HTM> 1996.

⁵⁷ HAIMANOT, A. M. Potential of entomopathogenic fungi for the control of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). [On line]. Etiopia. s.f. [Citado 27 de Octubre de 2003]. Disponible en Internet: <http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01dh03/35938918X1.pdf> 2002.

⁵⁸ BORBÓN et al. Proyecto de trampas, atrayentes y repelentes para el control de la broca del fruto del cafeto, *Hypothenemus hampei*. L (Coleoptera: Scolytidae). En : SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CAFICULTURA. (1° : 2000 : San José). Memorias del I Seminario Latinoamericano de Caficultura. San José : ICAFE - PROMECAFE, 2000. p. 331 - 348.

Tabla 9. Infestación promedio de la broca del café en frutos confinados en una jaula entomológica

Tratamiento	Infestación	
	Prom.	C.V.
	(%)	(%)
Testigo	92.4 A	6.19
Carrier	91.2 A	4.74
Bb9205	90.4 A	5.56
Ma9236	76.6 B	8.88
PL9301	72.6 B	5.38

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (10). Prom. = Promedio. C.V. = Coeficiente de Variación.

4. CONCLUSIONES

Los aislamientos PL9301 y el Comercial fueron los más patogénicos a nivel de laboratorio, causando mortalidades promedio de 90 y 83,3% respectivamente.

Bajo condiciones de campo, el efecto de *Paecilomyces lilacinus* es menor en un 67% con respecto a las condiciones en laboratorio

Aunque no se presentó efecto de dosis con los aislamientos PL9301 y el Comercial, estos aislamientos fueron patogénicos a la broca del café en condiciones de campo, en los frutos del árbol causando una mortalidad promedio de 19,2%

Cuando los aislamientos PL9301 y el Comercial se aplicaron dos horas antes y dos horas después de la infestación artificial con broca, se obtuvieron las más altas mortalidades, las cuales estuvieron entre un 28,6% y 29,9% respectivamente

Los hongos *Paecilomyces lilacinus* y *Metarhizium anisopliae* redujeron bajo condiciones de laboratorio la infestación de los frutos de café en un 15,2% y 19,2% respectivamente, con respecto al promedio de infestación de los tratamientos testigos (91,8%), por tanto, estos hongos ejercen algo de repelencia cuando se asperjan previamente a la infestación de los frutos de café por la broca.

5. RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto del hongo *P. lilacinus* sobre insectos benéficos y sobre controladores biológicos utilizados en el manejo de la broca del café.

Evaluar la patogenicidad de más aislamientos de *P. lilacinus* sobre la broca del café.

Establecer estudios en parcelas comerciales que permitan establecer el efecto del hongo dentro de un programa de manejo integrado de la broca del café.

Es necesario realizar estudios donde se evalúe la sobrevivencia a través del tiempo del hongo *P. lilacinus* en cafetales.

BIBLIOGRAFÍA

ALVES, S. B. Fungos entomopatogénicos. En: Control microbiano de insectos. Sao Paulo : Manole, 1986. p. 73-127.

ARRUBLA et al. Adherencia sobre la broca del café de las esporas de *Beauveria bassiana* formuladas en polvo y en líquido. En: CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA. (7° : 2000 : Medellín). Resumen del VII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín : SOCOLEN, 2000. p. 9 - 10.

BARKER, P.S. La broca del café en Colombia; informe final del proyecto MIP para el café DFID-CENICAFÉ-CABI BioScience. Chinchiná : CENICAFÉ, 1999. p. 21

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. Nueva York : Macmillan Publishing Company, 1987.p. 65-70.

BORBÓN et al. Proyecto de trampas, atrayentes y repelentes para el control de la broca del fruto del cafeto, *Hypothenemus hampei*. L (Coleoptera: Scolytidae). En : SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CAFICULTURA. (1° : 2000 : San José). Memorias del I Seminario Latinoamericano de Caficultura. San José : ICAFE - PROMECAFE, 2000. p. 331 - 348.

BUSTILLO et al. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Scolitidae) populations emerging from fallen coffee berries. En : Florida Entomologist Florida. Vol. 82 No. 4. 1999. p. 491-498.

BUSTILLO P., et al. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná : CENICAFÉ, 1998. p. 50

BUSTILLO P., Alex Enrique. Elementos biológicos para un programa de manejo integrado de la broca del café en Colombia. En: SEMINARIO DE ACTUALIZACIÓN SOBRE MANEJO INTEGRADO DE LA BROCA DEL CAFÉ. (2° : 1996 : Medellín). Memorias del II Seminario de actualización sobre manejo integrado de la broca del café. Medellín : CENICAFÉ, 1996. p. 2 - 11.

_____. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. En : Boletín Técnico Cenicafé. Vol. 24, No 1. 2002. p 1-40

_____. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: SEMINARIO SOBRE USO DE ENTOMATÓGENOS EN

COLOMBIA. (1° : 2001 : Bogotá). Memorias del I Seminario sobre Uso de Entomopatógenos en Colombia. Bogotá : SOCOLEN, 2001. p. 30 – 49.

CABANILLAS, E. y BARKER, K. R. Inoculum level and application time of *Paecilomyces lilacinus* on control of *Meloidogyne incognita* in tomato. En: Journal of Nematology. Vol. 21, No. 1: 1989. p.115-120.

CALVACHE G., H. El control microbiano en el manejo de las plagas de aceite en Colombia. En : Palmas, Bogotá. Vol. 14, No. 2. 1993. p. 13 -21.

CIBA-GEIGY. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. 2 ed. Suiza : El autor, 1981. p. 120.

CHARNLEY, A. K.; ST. LEGER, R. J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. En : The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Nueva York : Plenum Press, 1991. p. 267 – 268.

De BACH, P. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México : Continental, 1987. p.20-23.

FERRÓN, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. En : Annual Review of Entomology. Vol. 23 No.1. 1978. p. 409-442.

GARCÍA G., A. Proyecto manejo integrado de broca del café CFC-OIC-IIBC-PROMECAFE. En : SIMPOSIO Latinoamericano de Caficultura. San José, Costa Rica. MEMORIAS. ICAFE-PROMECAFE, 2000. p. 61-68

GARZÓN M, I. Patogenicidad de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Verticillium lecanii*, y *Paecilomyces lilacinus* sobre la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* bajo condiciones de laboratorio. En : CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA. (30° : 2003 : Cali). Resumen del XXX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Cali : SOCOLEN, 2003. p. 71.

GARZÓN V., J. Estudio de biocontrol del nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp. con organismos fungosos. Palmira, 1995, 61 p. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Agrícolas. p.20.

GIRALDO F., M. A. Evaluación de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson. en el control de *Meloidogyne* spp. Goeldi. en almácigos de café *Coffea arabica*. Manizales, 1996, 102 p. Tesis. (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. p.56

GONZÁLEZ et al. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafé. Chinchina. Vol. 44, No. 3. 1993. p. 93-102.

HAIMANOT, A. M. Potential of entomopathogenic fungi for the control of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). [On line]. Etiopia. s.f. [Citado 27 de Octubre de 2003]. Disponible en Internet: <http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01dh03/35938918XI.pdf> 2002.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. En : Annual Review of Entomology. Vol. 39. 1994. p. 293-322.

JATALA et al. Field application of *Paecilomyces lilacinus* for controlling *Meloidogyne incognita* on potatoes. En : Journal Nematology. Vol. 12 No. 4. 1980. p. 226 - 227.

LE PELLEY, R. H. Las plagas del Café. Barcelona : Labor, 1973. p. 40

LÓPEZ, D. I. Experiencias en el manejo integrado de la broca del café en el departamento de Antioquia. En : SEMINARIO DE ACTUALIZACIÓN SOBRE MANEJO INTEGRADO DE LA BROCA DEL CAFÉ. (1° : 1996 : Medellín). Memorias del 1 Seminario de actualización sobre manejo integrado de la broca del café. Medellín : CENICAFÉ, 1996. p. 1 – 8

MEJÍA et al. Técnicas de aspersión y evaluación de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. En: SEMINARIO INTERNACIONAL TEÓRICO – PRÁCTICO SOBRE ENTOMOPATÓGENOS, PARASITOIDES OTROS ENEMIGOS DE LA BROCA DEL CAFÉ. (2° : 2002 : Chinchina). Memorias del II Seminario Internacional Teórico – Práctico sobre Entomopatógenos, Parasitoides otros enemigos de la broca del café. Chinchiná : CENICAFÉ, 2002. p. 196 - 210.

MOLINA, L .y SAÑUDO S., B. Manejo de *Meloidogyne incognita* Chitwood en lulo de castilla *Solanum quitoense* Lam. en el municipio de San Lorenzo, departamento de Nariño. En: Revista de Ciencias Agrícolas Pasto. Vol. 11, No. 8: 1989. p. 77 - 90.

MOORHOUSE et al. Laboratory selection of *Metarhizium* spp isolates for control of vine weevil larvae (*O. sulcatus*) En : Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 62 No. 1. 1993. p. 15- 21.

PADILLA M., G. N. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* provenientes de diferentes órdenes de insectos. Manizales, 1998, 75 p. Tesis. (Bacteriólogo). Universidad Católica. Facultad de Bacteriología, p. 20

POSADA et al. *Paecilomyces lilacinus*, enemigo natural de adultos de *Hypothenemus hampei*. En : Revista CENICAFE. Vol. 49, No.1. 1998 p.72 - 77.

RATH, A. C. y TIDBURY, C. A. Susceptibility of *Coptotermes acinaciformis* (Isoptera: Rhinotermitidae) and *Nasutitermes exitiosus* (Isoptera: Termitidae) to two commercial isolates of *Metarhizium anisopliae*. En : Sociobiology. (On line) Australia, 1996. [Citado 3 de Noviembre de 2003]. Vol. 28 No. 1. p. 67-72. Disponible en Internet: <http://pest.cabweb.org/Archive/Spotlight/SPOTON.HTM> 1996.

ROBERTS, D. W. Toxins of entomopathogenic fungi. En: Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970 – 1979. London : Academic Press, 1981. p. 421 – 464.

RODRÍGUEZ S., D. A. Hongos entomopatógenos. En: Control microbiano de insectos. Santafé de Bogotá : CENIPALMA, 1992. 136 p.

SAMSON, R. A. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. En: Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970 – 1979. London : Academic Press, 1981. p. 93- 107.

SÁNCHEZ, D., BELLOTTI, A. C. Patogenicidad de hongos Hyphomycetes sobre *Cyrtomenus bergi* F. (Hemiptera: Cydnidae) chinche subterráneo de la yuca. En: Revista Colombiana de Entomología. Vol. 23, No. 1, 1997. p. 31 - 37.

SAÑUDO et al. Fundamentos de micología agrícola. Pasto : Universidad de Nariño, 2001. p. 145 - 154.

ST. LEGER et al. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. En : Journal of Invertebrate Pathology. Michigan. Vol. 47 No. 1. 1986. p: 295 - 302.

VALENZUELA G. Control Biológico en Colombia; historia, avances y proyecciones : Aspectos históricos del control biológico. Palmira : Lito - Tamara, 1989. p. 1 - 9.

VÉLEZ et al. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. En : Boletín Técnico Cenicafé. Chinchina. Vol. 17, No.,1. 1997. p. 1-34.

VILLALBA et al. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. En : CENICAFE. Chinchiná. Vol. 46, No. 3. 1995. p.152-163.

ANEXOS

Anexo A. Ficha Técnica Micosplagã

NOMBRE COMERCIAL: MICOSPLAG®

CASA COMERCIAL: Orius Biotecnología

COMPOSICIÓN EN UNIDAD FORMADORA DE COLONIA POR GRAMO DE PRODUCTO COMERCIAL:

<i>Paecilomyces lilacinus:</i>	10%
Metarhizium anisopliae:	5%
Beauveria bassiana:	5%
Talco estéril:	80%

CONTENIDO: 100 gramos equivalentes a 4×10^{10} esporas de hongos entomopatógenos.

DOSIS RECOMENDADA: 100 a 300 gramos por hectárea.

Anexo B. Análisis de varianza para la germinación de los aislamientos evaluados

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Modelo	3	20.00	6.66	9.51 **	0.0008
Error	16	11.21	0.70		
Total	19	31.22			

C. V. = 0,86%

Anexo C. Prueba de Tukey (5%) para la germinación de los aislamientos evaluados

Tratamiento	Promedio (%)	Grupo
PLHT	98.68	A
Comercial	96.53	B
PL9601	96.50	B
PL9301	96.16	B

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (2).

Anexo D. Análisis de varianza para la mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Modelo	3	1608.33	536.11	18.68 **	0.0001
Error	12	344.44	28.70		
Total	15	1952.77			

C. V. = 6,95%

Anexo E. Prueba de Tukey (5%) para la mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados

Tratamiento	Promedio (%)	Grupo
PL9301	90,00	A
Comercial	83,30	A
PL9601	70.00	B
PLHT	65.00	B

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (10).

Anexo F. Análisis de varianza para los tiempos promedios de mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Modelo	4	1774.64	443.66	364.82 **	0.0001
Error	295	358.75	1.21		
Total	299	2133.39			

C. V. = 23,78%

Anexo G. Prueba de Tukey (5%) para los tiempos promedios de mortalidad de broca causados por los aislamientos evaluados

Tratamiento	Promedio (Días)	Grupo
PLHT	7.18	A
Comercial	5.51	B
PL9601	5.45	B
PL9301	5.03	B
Testigo	0.00	C

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (2).

Anexo H. Análisis de varianza para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr>F
Modelo	6	2139.64	356.60	10.34 **	0.0001
Error	49	1689.44	34.47		
Total	55	3829.08			

C. V. = 30,10%

Anexo I. Prueba de Dunnett (5%) para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y Comercial en tres dosis diferentes

Tratamientos	Mortalidad (%)	Límites de confianza		
T3	21.97	14.17	29.78	***
T6	16.16	8.36	23.97	***
T2	15.28	7.47	23.08	***
T5	15.21	7.40	23.01	***
T4	14.24	6.43	22.05	***
T1	14.23	6.42	22.03	***

Promedios seguidos con *** presentan diferencias significativas con el testigo según comparador de Dunnett al 5% = (10)

Anexo J. Análisis de varianza para la mortalidad de broca total corregida causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Aislamiento	1	51.52	51.52	1.16 NS	0.2876
Dosis	2	233.79	116.89	2.63 **	0.0838
Aislamiento * Dosis	2	100.16	50.08	1.13 NS	0.3334
Error	42	1865.38	44.41		
Total	47	2250.87			

C. V. = 24,3%

Anexo K. Análisis de varianza para la infestación artificial con broca para la evaluación de los aislamientos PL9301 y el Comercial en tres dosis diferentes

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr>F
Modelo	6	6.43	1.07	0.70 NS	0.6485
Error	49	74.68	1.52		
Total	55	81.12			

C. V. = 1,24%

Anexo L. Análisis de varianza para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Modelo	8	3078.81	384.85	14.19 **	0.0001
Error	36	976.47	27.12		
Total	44	4055.28			

C. V. = 18,36%

Anexo M. Prueba de Dunnett (5%) para la mortalidad total de broca causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación

Tratamientos	Mortalidad (%)	Límites de confianza		
T7	28.10	18.91	37.28	***
T3	26.88	17.70	36.06	***
T4	26.38	17.20	35.56	***
T8	26.13	16.94	35.31	***
T6	22.11	12.92	31.29	***
T5	19.14	9.95	28.32	***
T2	17.30	8.11	26.4	***
T1	16.45	7.26	25.63	***

Promedios seguidos con *** presentan diferencias estadísticas con el testigo según comparador de Dunnett al 5% = (10)

Anexo N. Análisis de varianza para la mortalidad total de broca corregidos causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial en cuatro tiempos de aplicación

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Aislamiento	1	52.97	52.97	1.47 NS	0.2338
Tiempo	3	811.76	270.58	7.52 **	0.0006
Aislamiento * Tiempo	3	41.43	13.81	0.38 NS	0.7652
Error	32	1150.82	35.96		
Total	39	2057.00			

C. V. = 19,7%

Anexo Ñ. Prueba de Tukey (5%) para la mortalidad total de broca corregidos para los tiempos de aplicación causados por los aislamientos PL9301 y el Comercial

Tratamiento	Promedio (%)	Grupo
Dos Horas Después de Infestación	29.90	A
Dos Horas Antes de Infestación	28.56	A
Tres días Después de Infestación	21.43	B
Tres Días Antes de la Infestación	19.35	B

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (5).

Anexo O. Análisis de varianza para la infestación artificial con broca en los tiempos de aplicación del aislamiento PL9301 y el Comercial

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Aislamiento	1	7.225	7.225	0.23 NS	0.6375
Tiempo	3	5782.075	1927.3583	60.37 **	0.0001
Aislamiento*Tiempo	3	194.875	64.9583	2.03 NS	0.1287
Error	32	1021.6	31.925		
Total	39	7005.775			

C. V. = 25,2%

Anexo P. Prueba de Tukey (5%) para la infestación artificial con broca en los tiempos de aplicación del aislamiento PL9301 y el Comercial

Tratamiento	Promedio (%)	Grupo
Dos Horas Después de Infestación	99,20	A
Tres Días Después de Infestación	95,20	AB
Tres Días Antes de Infestación	91,10	BC
Dos Horas Antes de Infestación	68,20	C

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (5).

Anexo Q. Análisis de varianza para la infestación con broca en la jaula entomológica

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F
Modelo	4	1730.16	432.54	15.63 **	0.0001
Error	20	553.60	27.68		
Total	24	2283.76			

C. V. = 6,21%

Anexo R. Prueba de Tukey (5%) para la infestación con broca en la jaula entomológica

Tratamiento	Promedio (%)	Grupo
Testigo	92.40	A
Carrier	91.20	A
Bb9205	90.40	A
Ma9236	76.60	B
PL9301	72.60	B

Promedios con letras no comunes implican diferencias estadísticas según comparador de Tukey al 5% = (10).