

Compatibilidad *in vitro* y efecto de mezclas de tres insecticidas en la viabilidad de *Beauveria bassiana*

Compatibility *in vitro* and effect of mixtures of three insecticides in the viability of *Beauveria bassiana*

PATRICIA MARÍN M.¹, ALEX E. BUSTILLO P.², ARMANDO RIVERA M.²

Revista Colombiana de Entomología 26(3-4): 125-130 (2000)

Resumen. Se llevó a cabo un experimento para evaluar la compatibilidad *in vitro* de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, utilizado en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, con insecticidas químicos incorporados a un medio de crecimiento del hongo y en una mezcla en suspensión acuosa simulando un tanque de equipo de aspersión. Se hizo una combinación de factores usando tres fuentes diferentes de *B. bassiana*: aislamientos Bb9002 y Bb9205 producidos en sustrato arroz y un producto comercial Brocaril®, y tres insecticidas (diazinon en tres formulaciones: Polvo Mojable (PM), Emulsión Mojable (EM) y Suspensión Encapsulada (SE); isazofos y metacrifos). Los insecticidas se probaron en mezcla usando la dosis comercial (DC), la mitad de la dosis comercial (½ DC) y un cuarto de la dosis comercial (¼ DC). Las evaluaciones se hicieron midiendo la tasa de crecimiento radial de la colonia y el efecto de los insecticidas sobre la germinación del hongo 24 y 48 h después de estar en mezcla, simulando tanques de aspersión (1, 3 y 6 h). Se encontró que diazinon PM y metacrifos causaron una alta inhibición en el crecimiento de la colonia para el aislamiento Bb9205 y Brocaril®. Isazofos causó la inhibición más baja sobre Bb9205, siendo de 19,1% en la DC hasta 11,7 cuando se usó ¼ DC. Diazinon SE en mezcla con Brocaril® causó una reducción en el crecimiento de la colonia del 17% en la DC hasta 6,8% en ¼ DC. Cuando se evaluó la germinación de *B. bassiana* Bb9002 y Bb9205 en mezcla en suspensión acuosa por un período de seis horas con diazinon EM a la DC se encontró total inhibición de la germinación; sin embargo, diazinon SE no causó inhibición, lo que se puede atribuir al solvente utilizado en esta formulación. Diazinon PM y metacrifos causaron el mismo efecto inhibitorio en la germinación presentado cuando se evaluó el crecimiento radial del hongo. El aislamiento Bb9002 fue más sensible a los insecticidas, este hallazgo demuestra que hay diferencias entre aislamientos de un mismo hongo, lo cual indica la necesidad de seleccionar aislamientos más resistentes a plaguicidas en programas de MIP. Basados en resultados de los ensayos anteriores se realizó un experimento de germinación de conidias de Bb9205 reactivado en *H. hampei* usando tiempos de mezcla de 1, 3, 6, 12 y 24 horas. No se encontraron diferencias significativas en relación con el testigo con los insecticidas diazinon EM e isazofos. La inhibición fue menor con el aislamiento Bb9205 reactivado en *H. hampei* que con el no reactivado.

Palabras clave: *Hypothenemus hampei*. Broca del café. *Beauveria bassiana*. Café. Isazofos. Metacrifos. Diazinon. Brocaril®.

Summary. An experiment was conducted to evaluate the compatibility *in vitro* of a mixture of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin used in the control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, and three insecticides incorporated in a fungus growth media and mixed in an aqueous suspension simulating a spray tank. A combination of factors were created using three different sources of *B. bassiana*: isolates Bb9205 and Bb9002 produced on rice substrate, and a commercial product Brocaril®, and three insecticides (diazinon in three formulations: Wettable Powder (WP), Wettable Emulsion (WE) and Encapsulated Suspension (ES); isazofos and metacrifos). All the insecticides were tested in the mixture using the commercial dosage (CD), half of the commercial dosage (½ CD) and one fourth of the commercial dosage (¼CD). Evaluations were made measuring the rate of fungus radial growth of the colony and the effect of the insecticides on fungus germination. It was found that diazinon WP and metacrifos had a heavy colony growth inhibition for isolate Bb9205 and Brocaril®. Isazofos caused the lowest inhibition on Bb9205 accounting for a reduction of fungal growth in the media from 19.1% at the commercial rate to 11.7% when ¼ CD was used. Diazinon ES in mixture with Brocaril® caused a reduction on growth from 17% at CD to 6.8% at ¼ CD. Total inhibition of germination of *B. bassiana* Bb9205 and Bb9002 was achieved when using diazinon WE at CD when mixed in an aqueous suspension for a period of up to 6 h; however, diazinon ES did not cause inhibition which may be attributed to the solvents used in the formulations. Diazinon WP and metacrifos had the same inhibitory effect on germination as showed when the radial growth was measured. Isolate Bb9002 was more sensible to the insecticides, this finding demonstrates that there are differences among isolates of a same fungus, which poses the necessity of selecting isolates more resistance to pesticides in IPM programs. In the experiment on conidia germination of Bb9205 reactivated in *H. hampei* using mixtures times for 1, 3, 6, 12 and 24 h with diazinon WE and isazofos, no significant differences were found compared to the control. Inhibition was lower with the isolate Bb9205 reactivated in *H. hampei* than with the one not reactivated.

Key words: *Hypothenemus hampei*. Coffee berry borer. *Beauveria bassiana*. Coffee. Isazofos, Metacrifos. Diazinon. Brocaril®.

1 Bacterióloga, Trabajo de Grado, para optar al título de Bacterióloga y laboratorista Clínico. Universidad Católica de Manizales.

2 I. A., Ph. D. y Microbiólogo, respectivamente. Centro Nacional de Investigaciones en café. Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia. A.A. 2427 Manizales.

Introducción

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es la plaga más importante de este cultivo, su llegada a Colombia ha hecho que se desarrolle un programa de manejo integrado dentro de un marco ecológico para proteger la zona cafetera de un uso irracional de insecticidas (Bustillo *et al.* 1998). El uso del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca es un arma biológica muy importante porque se ha logrado establecer en toda la zona cafetera del país infestada con ésta y por sus efectos en las poblaciones de este insecto plaga cuando se asperja utilizando preparados artesanales en las fincas (Antia *et al.* 1992) o formulaciones industriales (Morales *et al.* 1991, Bustillo *et al.* 1998).

Los insecticidas químicos son un componente dentro del manejo integrado de la broca del café, pero pueden alterar negativamente el medio ambiente. Una alternativa la constituye las mezclas con entomopatógenos como *B. bassiana* pensando en obtener una reducción en la dosis del insecticida y un mayor efecto sobre las poblaciones de la plaga y así aminorando el impacto ambiental. El efecto de insecticidas sobre *B. bassiana* ha sido bastante estudiado en otras situaciones (Osborne y Boucias 1985). Los agroquímicos pueden reducir las epizootias de los entomopatógenos en campo al afectar la esporulación y su infectividad (Ferron *et al.* 1991). El efecto de agroquímicos sobre *B. bassiana in vitro*, se puede estudiar en varias formas, incorporándolos al medio de cultivo, o colocándolos en discos de papel impregnados del químico sobre el hongo, ó también haciendo mezclas entre el hongo y el plaguicida para evaluar la compatibilidad. Normalmente se registra la zona de inhibición ó medidas cuantificables, como el crecimiento radial de la colonia (Ramaraje *et al.* 1967; Olmert y Kenneth 1974; Clark *et al.* 1982; Anderson *et al.* 1989; Moorhouse *et al.* 1992; Rivera 1993), sin embargo, la germinación de la conidia puede ser el criterio más importante de compatibilidad (Rivera *et al.* 1994). Los solventes en las formulaciones pueden jugar un papel importante en la

viabilidad de los hongos como fue demostrado para el endosulfan, en el cual el xilol reduce la viabilidad de *B. bassiana* (Anderson y Roberts 1983; Rivera *et al.* 1994).

El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la compatibilidad del hongo *B. bassiana* producido en sustrato de arroz y formulado comercialmente (Brocaril®) con los insecticidas: diazinon en tres formulaciones (PM, EM, SE), isazofos y metacrifos de la compañía Novartis S.A.

Materiales y Métodos

Para evaluar la compatibilidad de los insecticidas con el hongo *B. bassiana* se midieron las siguientes variables:

Crecimiento radial de la colonia mezclando el insecticida con el medio de cultivo; para lo cual se utilizó el aislamiento Bb9205 originalmente obtenido de *Diatraea saccharalis* producido en sustrato de arroz en el laboratorio de Entomología de Cenicafé, y un formulado en polvo mojable, Brocaril®, producido por Laboratorios Laverlam de Cali, Colombia.

Germinación de conidias a las 24 y 48 h después de estar en mezcla con los insecticidas, simulando tanques de equipos de aspersión; se evaluaron al cabo de 1, 3 y 6 h de contacto. Se utilizaron los aislamientos del hongo *B. bassiana* Bb9205 y Bb9002 (activos contra *H. hampei*) producidos en sustrato arroz. Para las evaluaciones iniciales no se tuvo en cuenta su reactivación en broca y de acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo se hizo una evaluación adicional con el aislamiento Bb9205 reactivado en broca, utilizando los insecticidas que presentaron menor inhibición sobre el hongo.

Crecimiento radial

La compatibilidad de *B. bassiana* aislamiento Bb9205 producido en arroz y la formulación Brocaril® se evaluó en mezcla con insecticidas (Tabla 1) a través del crecimiento radial de la colonia, utilizando cajas de Petri con el medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA). Se preparó el SDA, se esterilizó, se le adicionó ácido láctico al

0,37 % y luego los insecticidas en las dosis establecidas (Tabla 1). Posteriormente, se sirvieron cajas de Petri con 15 ml de medio, una vez solidificada la mezcla se inoculó el hongo en el centro de la caja con una alícuota de 5 µl, en concentración de 1x10⁶ conidias/ml, las cajas se incubaron a 25°C. Después se midió el diámetro de la colonia, con un noniómetro de precisión (0.02 mm) marca Mitutoyo; a los 5, 7, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 días. Como testigo se utilizó el hongo solo crecido en SDA (Rivera 1993). La variable se analizó empleando análisis de varianza y se ajustó una regresión lineal simple a través del tiempo con cada producto.

Germinación de conidias

Para evaluar la germinación de los aislamientos Bb9002 y Bb9205 cultivados en sustrato de arroz, frente a cada uno de los insecticidas, simulando las mezclas en tanques de equipos de aspersión, se preparó una suspensión acuosa de conidias del hongo (1x10⁸ con/mi) con aceite Carrier® al 0.1%, de ésta se adicionaron 100 ml en erlenmeyer estériles de 250 ml y la cantidad adecuada de los insecticidas (Tabla 1). Como testigo se tuvo sólo suspensión del hongo. Las mezclas se colocaron en agitación (110 rpm). Se evaluaron los períodos de tiempo de 1, 3 y 6 h de contacto entre los dos agentes. Transcurrido cada intervalo de tiempo, se inocularon siete alícuotas de 5 µl en medio SDA más extracto de levadura al 1%, de cada uno de los tratamientos (Rivera *et al.* 1994).

El experimento se organizó bajo un diseño completamente aleatorio con el erlenmeyer como UE, con cuatro repeticiones por tratamiento a un nivel de significancia del 5%. Para evaluar el efecto de los insecticidas sobre el hongo, se midió la variable germinación de conidias, en porcentaje a las 24 y 48 h. Los resultados se analizaron empleando análisis de varianza.

Germinación del hongo después de reactivado en broca

Con base en los resultados de los dos ensayos anteriores, se evaluó la compatibilidad en mezcla del aislamiento Bb9205

Tabla 1. Insecticidas y concentraciones evaluadas en el estudio de compatibilidad con *B. bassiana*

Genérico	Comercial	Formulación y Concentración	Dosis de i. a. en g ó cc/l		
			DC*	½DC	¼DC
Diazinon	Basudin	PM** 40%	4.8	2.4	1.2
Diazinon	Basudin	EM 60%	1.2	0.6	0.3
Diazinon	Diacap	SE 30%	2.4	1.2	0.6
Isazofos	Miral	SM 50%	5.0	2.5	1.25
Metacrifos	Damfin	CE 50%	3.2	1.6	0.8

* DC dosis comercial

**PM polvo mojable

EM emulsión mojable

SE suspensión encapsulada

SM suspensión microencapsulada

CE concentrado emulsionable

reactivado en broca, en una concentración de 9.7×10^8 con/ml, utilizando las dosis y los insecticidas de la Tabla 1, excepto diazinon PM y metacrifos que presentaron una alta inhibición; se alargaron los tiempos de mezcla a 1, 3, 6, 12 y 24 h. La variable germinación de conidias se analizó empleando el mismo procedimiento del experimento anterior.

El criterio para usar las dosis y tiempos de mezcla, propuestas en cada uno de los experimentos, está basado en la idea de estimar hasta qué punto existe compatibilidad de los productos con *B. bassiana*.

Resultados y Discusión

Crecimiento radial

Los insecticidas diazinon PM y metacrifos inhibieron completamente el crecimiento micelial de *B. bassiana* en todas las dosis evaluadas tanto con Bb9205 producido en arroz, como con la formulación comercial Brocaril®. Resultados similares encontraron Cadatal y Gabriel (1970) y Alves (1986) con diazinon PM sobre este hongo. Una mayor inhibición sobre el crecimiento micelial puede deberse al contacto continuo insecticida-hongo, como es el caso de diazinon PM, al compararlo con las otras formulaciones, indicando que posiblemente los inertes tienen un efecto mayor sobre la viabilidad que el ingrediente activo.

El insecticida diazinon EM en la DC y la 1/2 DC produce inhibición desde los primeros momentos de contacto tanto con el hongo comercial (Brocaril®) como con Bb9205 producido en arroz (Figs. 1-2). Diazinon SE, en mezcla con Bb9205, causó una reducción en el crecimiento de la colonia en la DC de 28,1 hasta 12,2% en 1/4 DC, con el hongo producido comercialmente la inhibición fue menor (Tabla 2, Figs. 3-4). Isazofos causó la inhibición más baja sobre Bb9205, siendo de 19,1% en la DC hasta 11,7 en 1/4 DC. Con Brocaril® la inhibición fue mayor en la DC (31,6%) redu-

Tabla 2. Crecimiento radial (CR/ mm) y porcentaje de inhibición (PI/ %) de *B. bassiana* Bb9205 producido en arroz y Brocaril® comercial en presencia de insecticidas, 30 días después de la inoculación

Bb9205						
Producto	Dosis					
	DC		1/2DC		1/4DC	
	CR	PI	CR	PI	CR	PI
diazinon EM	17.93	58.92	23.63	45.86	37.65	13.74
diazinon SE	31.39	28.08	36.75	15.80	38.34	12.16
isazofos	35.33	19.06	35.55	18.55	38.64	11.47
Testigo	43.65	0.0	43.65	0.0	43.65	0.0

Brocaril®						
Producto	Dosis					
	DC		1/2DC		1/4DC	
	CR	PI	CR	PI	CR	PI
diazinon EM	11.03	74.73	25.84	40.80	42.25	3.20
diazinon SE	36.23	16.99	36.46	16.47	40.68	6.80
isazofos	29.85	31.61	34.66	20.59	42.50	2.63
Testigo	43.65	0.0	43.65	0.0	43.65	0.0

ciéndose cuando se usó 1/4 DC (2,6%) (Tabla 2, Figs. 5-6). Las dosis más bajas de los insecticidas fueron menos inhibitorias y en general tuvieron un comportamiento similar al testigo. Estos resultados están de acuerdo con los hallados por Olmert y Kenneth (1974) y Vainio y Hokkanne (1990) que observaron que diazinon CE no causa un mayor efecto sobre el hongo *Beauveria bassiana*.

Compatibilidad en mezcla

Al evaluar la compatibilidad en mezcla, simulando tanques de equipos de aspersión, se encontró a las 24 horas de evaluación que Diazinon PM y metacrifos causaron alta inhibición como sucedió sobre el crecimiento micelial en el experimento anterior.

Se observaron diferencias estadísticas significativas (Tukey 5%) con los dos aisla-

mientos del hongo evaluados y el insecticida diazinon EM; a la DC produjo una alta inhibición de la germinación conidial con ambos aislamientos desde los primeros momentos, siendo mayor al aumentar el tiempo de contacto (Figs. 7-8). Sin embargo, la formulación SE de diazinon no causó inhibición estadísticamente significativa, lo que se puede atribuir al solvente utilizado en esta formulación. Con isazofos y el aislamiento Bb9205 no se presentaron diferencias (Tukey 5%) entre el testigo y 1/4 DC, pero si con las dosis mas altas, algunas combinaciones de dosis menores a la DC no tienen mayor efecto sobre los dos aislamientos y el efecto es creciente al aumentar la dosis (Figs. 9-10). El aislamiento Bb9002 fue más sensible a los insecticidas, este resultado demuestra que hay diferencias entre aislamientos de un mismo hongo, lo cual indica la necesidad de seleccionar aislamientos más resisten-

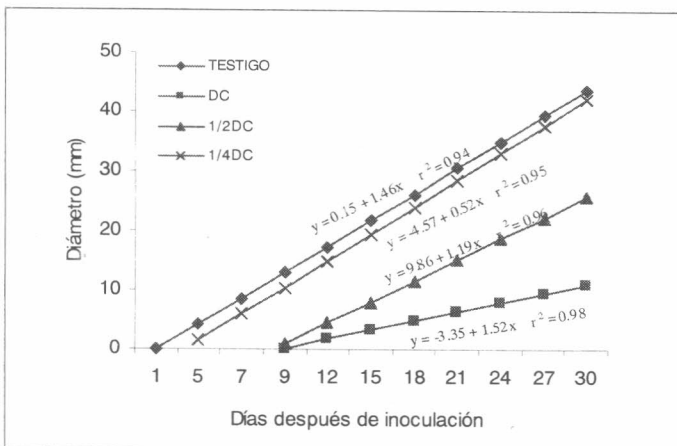


Figura 1. Crecimiento de la colonia de *Beauveria bassiana* (Brocaril®) en medio de cultivo (SDA) al cual se le adicionó diazinon EM en diferentes dosis, DC (dosis comercial); 1/2DC y 1/4DC.

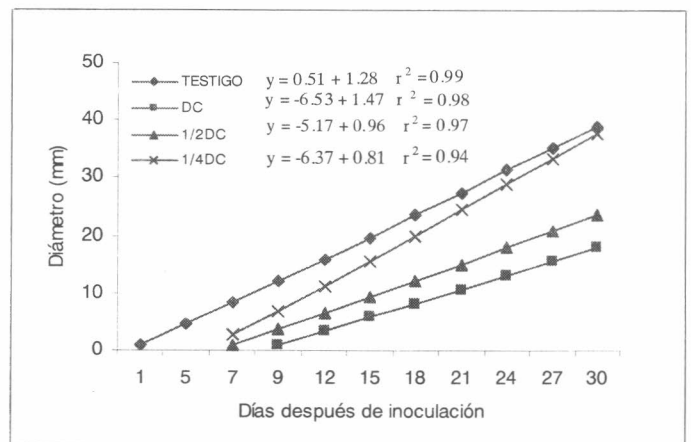


Figura 2. Crecimiento de la colonia de *Beauveria bassiana* (Bb9205-arroz) en medio de cultivo (SDA) al cual se le adicionó diazinon EM en diferentes dosis, DC (dosis comercial); 1/2DC y 1/4DC.

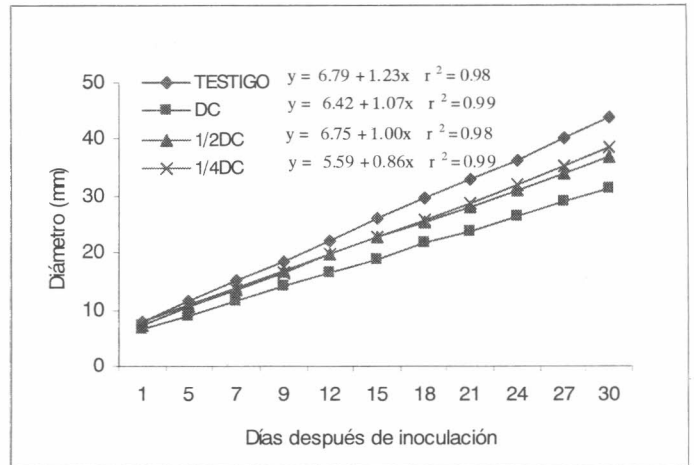
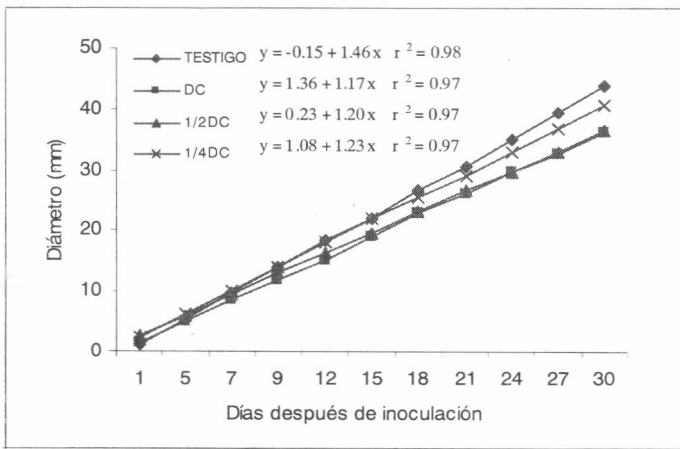


Figura 3. Crecimiento de la colonia de *Beauveria bassiana* (Brocaril®) en medio de cultivo (SDA) al cual se le adicionó diazinon SE en diferentes dosis, DC (dosis comercial); 1/2DC y 1/4DC.

Figura 4. Crecimiento de la colonia de *Beauveria bassiana* (Bb9205-arroz) en medio de cultivo (SDA) al cual se le adicionó diazinon SE en diferentes dosis, DC (dosis comercial); 1/2DC y 1/4DC.

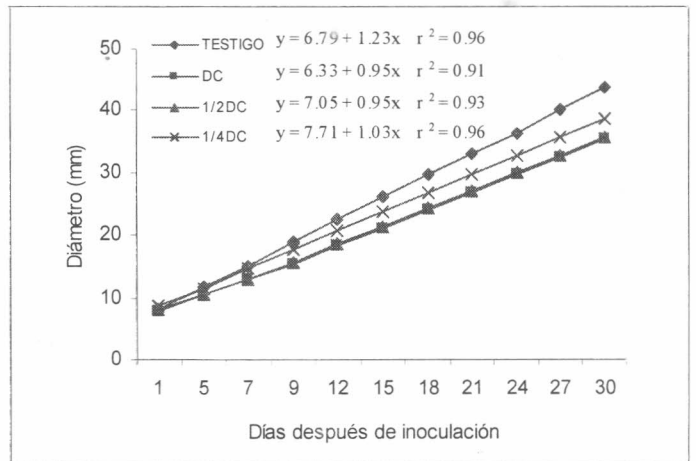
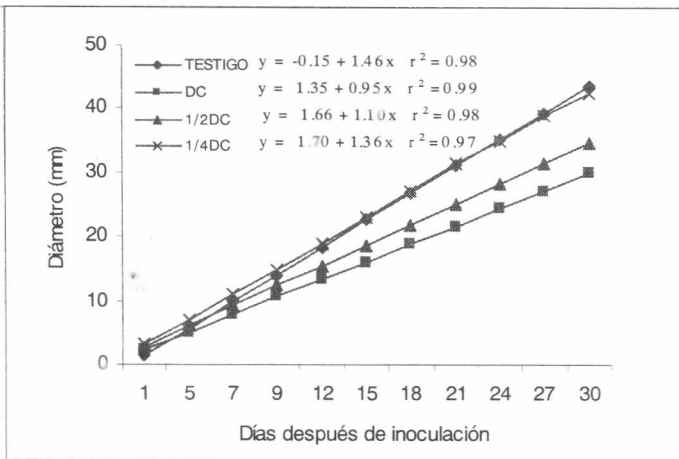


Figura 5. Crecimiento de la colonia de *Beauveria bassiana* (Brocaril®) en medio de cultivo (SDA) al cual se le adicionó isazofos en diferentes dosis, DC (dosis comercial); 1/2DC y 1/4DC.

Figura 6. Crecimiento de la colonia de *Beauveria bassiana* (Bb9205-arroz) en medio de cultivo (SDA) al cual se le adicionó isazofos en diferentes dosis, DC (dosis comercial); 1/2DC y 1/4DC.

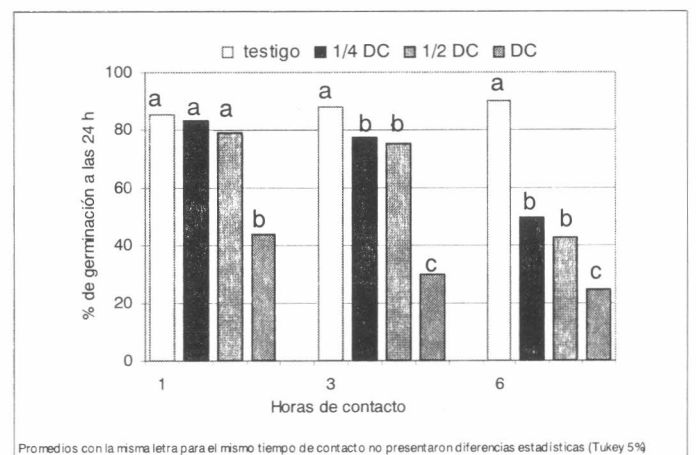
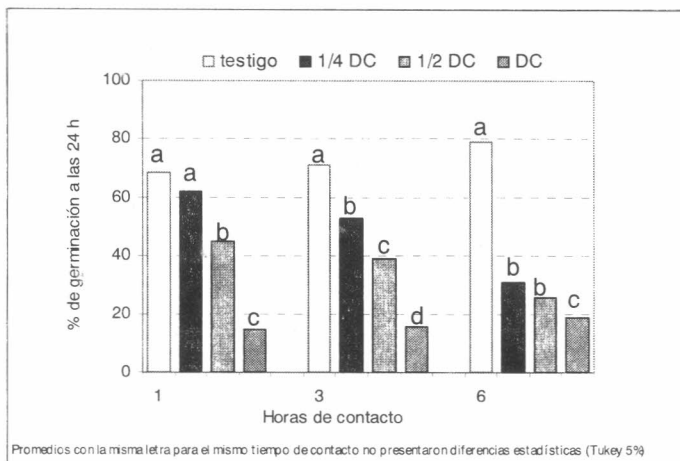


Figura 7. Germinación de *Beauveria bassiana* Bb9002, varias horas después de permanecer en contacto con una mezcla de diazinon EM en tres dosificaciones (DC: dosis comercial; 1/2DC y 1/4DC).

Figura 8. Germinación de *Beauveria bassiana* Bb9205, varias horas después de permanecer en contacto con una mezcla de diazinon EM en tres dosificaciones (DC: dosis comercial; 1/2DC y 1/4DC).

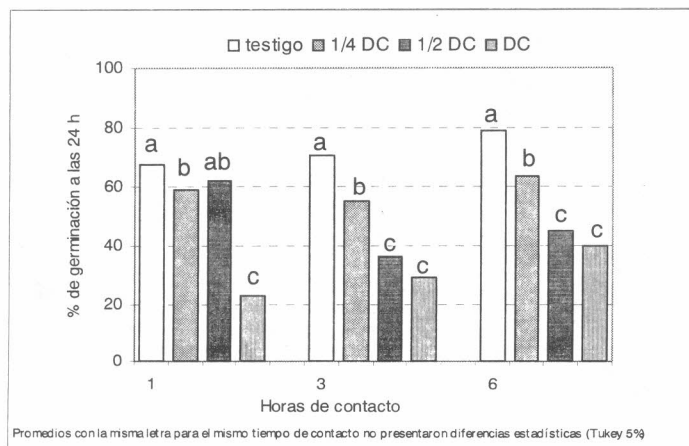


Figura 9. Germinación de *Beauveria bassiana* Bb9002, varias horas después de permanecer en contacto con una mezcla de Isazofos en tres dosificaciones (DC: dosis comercial; 1/2DC y 1/4DC).

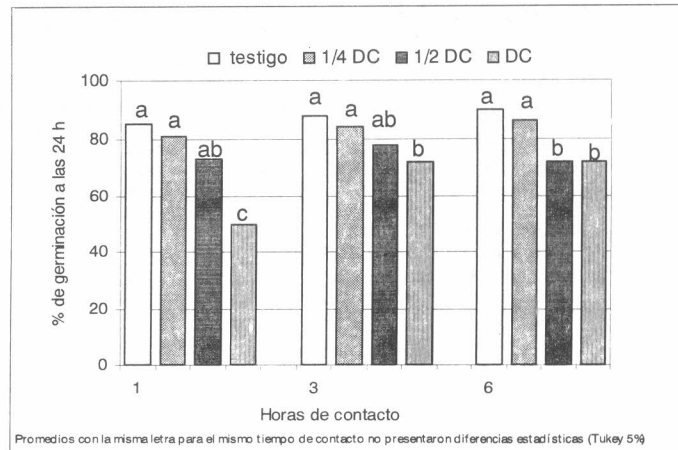


Figura 10. Germinación de *Beauveria bassiana* Bb9205, varias horas después de permanecer en contacto con una mezcla de Isazofos en tres dosificaciones (DC: dosis comercial; 1/2DC y 1/4DC).

tes a plaguicidas para ser utilizados en programas de MIP.

El efecto de los insecticidas diazinon EM, diazinon SE e isazofos a las 48h de evaluación fue inocuo, pues la germinación mostró diferencias no significativas con respecto al testigo, en las dosis evaluadas con los dos aislamientos. diazinon PM y metacrifos inhibieron totalmente al hongo durante todo el tiempo de evaluación.

No hay registros en la literatura que sugieran razones sobre la variación en la respuesta de las pruebas de los aislamientos del hongo frente a los insecticidas; por ejemplo Olmert y Kenneth (1974) no explicaron las diferencias en sensibilidad a Diazinon *in vitro*. Lyr (1977) mencionó que ciertas diferencias se han observado en cuanto a sensibilidad de fitopatógenos a ingredientes activos, lo que se podría atribuir a sensibilidad de estructuras celulares, diferencia en la potencia de los mecanismos de defensa o diferencias en la penetración o acumulación del compuesto fungicida en el sitio de acción y detoxificación dentro de la célula. Varias de las suposiciones de Lyr podrían ser aplicadas a los hongos entomopatógenos.

Compatibilidad en mezcla del aislamiento Bb9205 reactivado en broca

Para evaluar la compatibilidad en mezcla del aislamiento Bb9205 reactivado en broca se alargaron los tiempos de contacto a 1, 3, 6, 12 y 24 h. Los resultados mostraron que diazinon EM e isazofos tuvieron cierto efecto inhibitorio gradual en orden descendente de acuerdo con las dosis utilizadas pero los resultados no difieren estadísticamente del testigo, además de alcanzarse la germinación total a las 48 h. El insecticida diazinon SE no exhibió ningún efecto sobre el hongo y su comportamiento fue igual al testigo.

En este experimento, el aislamiento reactivado en broca presentó una mayor tolerancia a los insecticidas. Se ha demostrado que los insecticidas reducen la viabilidad de la conidia, pero no previenen la producción de enzimas que degradan el medio en las conidias germinantes, esto podría explicar la ventaja del aislamiento reactivado. Por ejemplo, pectinasas asociadas con la patogénesis de *Penicillium digitatum* aparentemente son secretadas por los tubos germinativos inhibidos por benomyl, aquellas degradan la pared de las células circundantes en el sitio de inoculación, liberando nutrientes que incrementan la viabilidad de las conidias resistentes en el inóculo (Wild y Eckert 1982); esto refuerza la necesidad de utilizar aislamientos previamente reactivados para darle una mayor oportunidad de control al patógeno al ser mezclado con insecticidas.

Anderson *et al.* (1989) sugieren que hay variabilidad genética entre aislamientos por la sensibilidad a los plaguicidas observada entre ellos. La sobrevivencia de biotipos persistentes parece depender de la naturaleza de la resistencia y las propiedades individuales del aislamiento, aunque este comportamiento puede no ser representativo de toda la población; además, que los biotipos tolerantes pueden proliferar fácilmente en campo (Smilanick y Eckert 1986). Investigaciones recientes también sugieren que varios niveles de resistencia a plaguicidas son la manifestación de polimorfismo en un solo gen mendeliano (Fabritius *et al.* 1997).

Otra estrategia para el biocontrol de insectos sería la selección o manipulación genética de estos hongos resistentes a plaguicidas comunes; estudios en este campo han demostrado el uso potencial de cepas transgénicas de hongos entomopatógenos con otros componentes del Manejo Integrado donde se pueda

hacer una aplicación simultánea de los dos agentes (Goettel *et al.* 1990).

Los resultados de este experimento no se pueden extrapolar con lo que sucede en el campo, se deben realizar evaluaciones posteriores bajo condiciones reales, verificando la reducción en la capacidad patogénica del hongo, pues los productos tóxicos *in vitro* no necesariamente causan daño a los entomopatógenos en campo.

Agradecimientos

La autora principal agradece a Cenicafé y a las personas que de una u otra forma colaboraron para la realización de este trabajo y a la compañía Novartis S.A. por el apoyo logístico.

Bibliografía

- ALVES, S.B. 1986. Fungos entomopatógenos. En: Controle Microbiano de Insetos, ed. S. B. Alves, capítulo II, Agentes entomopatógenos no controle microbiano, p. 73-126. Editora Manole Ltda, Sao Paulo, Brasil, 407 p.
- ANDERSON, T.E.; ROBERTS, D.W. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. Journal of Economic Entomology 76: 1437-1441.
- ANDERSON, T.E.; HAJEK, A.E.; ROBERTS, D.W.; PREISLER, H.K.; ROBERTSON, J.L. 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. Journal of Economic Entomology 82: 83-89.
- ANTIA, O. P.; POSADA, F. J.; BUSTILLO, A. E.; GONZALEZ, M. T. 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Cenicafé. Avances Técnicos. No. 182. 12 p.
- BUSTILLO, A. E.; CARDENAS, R.; VILLALBA, D. A.; BENAVIDES, P.; OROZCO, J.; POSADA,

- F. J. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná (Colombia), Cenicafe. 134p.
- CADATAL, T. D.; GABRIEL, B. P. 1970. Effect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. *Philippine Entomologist* 1 (5): 379-395.
- CLARK, R.A.; CASAGRANDE, R.A.; WALLACE, D.B. 1982. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11: 67-70.
- FABRITIUS, A. L.; SHATTOCK, R. C.; JUDELSON, H. S. 1997. Genetic analysis of metalaxyl insensitivity loci in *Phytophthora infestans* using linked DNA markers. *Phytopathology* 87: 1034-1040.
- FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. En: *Handbook of Applied Mycology. Volume 2: Humans, Animals, and insects.* (Eds.: Arora, D. K.; Ajello, L.; Mukerji, K. G. Marcel Dekker. New York. 665-706 p.
- GOETTEL, M. S.; St. LEGER, R. J.; SRIRAMA, B.; JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R. C. 1990. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. *Current Genetics* 17: 129-132.
- LYR, H. 1977. Mechanism of action of fungicides. En: *Plant Disease: an advanced Treatise, Vol 1: How disease is managed* (Horsfall, J. G. y Cowling, E. B. Eds.). Academic Press, New York, p. 239-261.
- MOORHOUSE, E.R.; GILLESPIE, A.T.; SELLERS, E.K.; CHARNLEY, A.K. 1992. Influence of Fungicides and insecticides on the entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae*, a pathogen of the rine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*. *Biocontrol Science and Technology* 2: 49-58.
- MORALES G., E.; CRUZ, F.; OCAMPO V., C. A.; RIVERA P., G.; MORALES G., B. P. 1991. Una aplicación de la biotecnología para el control de la broca del café. En: *COLLOQUE Scientifique International sur le café*, 14. San Francisco (Estados Unidos), July 14-19. Ed. Paris (Francia), ASIC, p. 521-526.
- OLMERT, I.; KENNETH, R.G. 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* and *Verticillium* spp. to fungicides and insecticides. *Environmental Entomology* 3: 33-38.
- OSBORNE L.S.; BOUCIAS D.G. 1985. A review of chemical antagonist to mycopathogens of vitrus root weevils. *Florida Entomologist* 68: 409-416.
- RAMARAJE U., N.V.; GOVINDU, H.C.; SHIVASHARIKARA, K.S. 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9: 398-403.
- RIVERA, A. 1993. Estudio de compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19: 151-158.
- RIVERA, A.; MARIN P.; BUSTILLO, A. E., 1994. Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en mezcla con insecticidas utilizados en el control de la broca del café (Coleoptera: Scolytidae). *Revista Colombiana de Entomología* 20 (4): 209-214.
- SMILANICK, J. L.; ECKERT, J. W. 1986. Growth, sporulation, and virulence of isolates of *Penicillium digitatum* resistant to the fungicide sec-butylamine. *Phytopathology* 76: 805-808.
- VAINIO, A.; HOKKANNE, H. 1990. Side effects of pesticides on the entomophagous nematode *Steinernema feltiae* and the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in the laboratory. En: *International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*, 5. Adelaide (Australia). 20-24 August. Proceedings and abstracts. (Resumen consultado en: *Review of Agricultural Entomology* 79: 699. Ref. 6075 1991).
- WILD, B. L.; ECKERT, J. W. 1982. Synergy between a benzimidazole-sensitive isolate and benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 72: 1329-1332.