

## BIOLOGICAL CONTROL

Susceptibilidad del Parasitoide *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) a *Beauveria bassiana* en Condiciones de LaboratorioALFREDO CASTILLO<sup>1</sup>, JAIME GÓMEZ<sup>1</sup>, FRANCISCO INFANTE<sup>1</sup>, FERNANDO E VEGA<sup>2</sup><sup>1</sup>El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Depto. de Entomología Tropical, Carretera Antigua Aeropuerto km 2.5, Tapachula, 30700 Chiapas, México; [acastill@ecosur.mx](mailto:acastill@ecosur.mx); [jgomez@ecosur.mx](mailto:jgomez@ecosur.mx); [finfante@ecosur.mx](mailto:finfante@ecosur.mx)<sup>2</sup>Sustainable Perennial Crops Lab., United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Bldg. 001A, Beltsville, MD 20705-2350, USA; [fernando.vega@ars.usda.gov](mailto:fernando.vega@ars.usda.gov)

Edited by Fernando L Cônsoli – ESALQ/USP

Neotropical Entomology 38(5):665-670 (2009)

Susceptibility of the Parasitoid *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) to *Beauveria bassiana* Under Laboratory Conditions

**ABSTRACT** - The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), is the most important coffee pest worldwide. *Beauveria bassiana* is a generalist entomopathogenic fungus widely used by coffee farmers to control this pest and *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) is an African endoparasitoid of *H. hampei* adults, recently imported to several Latin American and Caribbean countries to aid in the coffee berry borer control. The objective of this study was to determine if *B. bassiana* is detrimental to *P. coffea*. The susceptibility of the parasitoid was evaluated in terms of adult survivorship, mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>), mean lethal time (LT<sub>50</sub>), reproduction and immature mortality. The main effect of the fungus resulted in reduction of adult longevity and mortality of 100% for immature stages of this parasitoid. The LC<sub>50</sub> for adults was 0.11% equivalent to 9.53 x 10<sup>7</sup> conidia/ml of *B. bassiana* and a LT<sub>50</sub> of 29.4h, equivalent to reduction of 22% of its normal longevity as an adult. *P. coffea* was capable of disseminating spores of *B. bassiana* to non-infected *H. hampei* adults, which could indirectly cause the death of its own progeny. These results could be valuable when considering the use of both organisms in the field, especially in an integrated pest management program.

**KEY WORDS:** Coffee, *Hypothenemus hampei*, entomopathogenic fungus

**RESUMEN** - La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), es la plaga más importante del cultivo de café en el mundo. *Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno generalista ampliamente utilizado por los productores de café para controlar a *H. hampei*. *Phymastichus coffea* LaSalle es un endoparasitoide africano de adultos de la broca, recién importado a varios países de Latinoamérica y del Caribe para el control de esta plaga. En el presente estudio se realizaron bioensayos de laboratorio con el objetivo de determinar si *B. bassiana* es detrimental para el parasitoide *P. coffea*. La susceptibilidad del parasitoide fue evaluada en términos de supervivencia de adultos, concentración letal media (CL<sub>50</sub>), tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), reproducción y mortalidad de su progenie. El principal efecto del hongo resultó en la disminución de la longevidad de los adultos y en la mortalidad del 100% de los inmaduros del parasitoide. La CL<sub>50</sub> para adultos de *P. coffea* fue de 0.11% equivalente a 9.53 x 10<sup>7</sup> conidias/ml de *B. bassiana* y una TL<sub>50</sub> de 29.4h, equivalente a la reducción del 22% de su longevidad normal como adulto. *P. coffea* fue capaz de transmitir esporas de *B. bassiana* a brocas no infectadas con el hongo y originar indirectamente la muerte de su progenie. Este trabajo servirá de referencia cuando se contemple el empleo de ambos organismos a nivel de campo, especialmente dentro de un plan de manejo integral de la plaga.

**PALABRAS CLAVE:** Café, *Hypothenemus hampei*, hongo entomopatógeno

El cultivo del café (*Coffea arabica* y *C. canephora*) tiene importancia económica, social, cultural y ambiental en todo el mundo. La broca del café destaca entre las limitantes más

importantes de este cultivo y es considerada como el insecto plaga más dañino del café (LePelley 1968). Aunque se han descubierto más de veinte enemigos naturales de la broca en

diferentes partes del mundo (Murphy & Moore 1990, Benassi 1995, Bustillo *et al* 2002), los parasitoides de origen africano han despertado mayor interés para ser usados en programas de control biológico clásico, pues se piensa que podrían tener mayor potencial para el control de la broca (Murphy & Moore 1990). Hasta ahora tres especies de parasitoides de origen africano se han importado a varios países de Latinoamérica y el Caribe: *Prorops nasuta* Waterston, *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethyilidae) y *P. coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae). Los primeros dos parasitoides atacan los estados inmaduros de la broca y el tercero a los adultos. En esta región se han liberado varios millones de cada una de estas especies (Damon 2000, Jaramillo *et al* 2005). La evaluación de estos parasitoides como agentes de control biológico de la broca está en curso, especialmente para *P. coffea* que es la especie de mas reciente introducción.

*B. bassiana* es un entomopatógeno generalista y cosmopolita. Se han recolectado varias decenas de cepas en cafetales de diversos países (De la Rosa *et al* 1997a, b, Bustillo *et al* 2002, Rehner *et al* 2006). Se le considera como un agente de control biológico efectivo cuando se usa dentro de un plan de manejo integrado de la broca, y como tal, su uso ha sido ampliamente extendido (Barrera *et al* 1990, Bustillo & Posada 1996, De la Rosa *et al* 2000). La avispa *P. coffea* y el hongo *B. bassiana* coinciden espacial y temporalmente en los cafetales, ya que ambos organismos parasitan al estado adulto de la broca. Existe la necesidad de usar ambos organismos en campo debido a la severidad de los daños provocados por la broca (Infante 2002). Dado que *B. bassiana* es patogénico a una gran diversidad de insectos, incluyendo especies benéficas (Donegan & Lighthart 1989), su aplicación contra *H. hampei* representa un riesgo potencial para *P. coffea*. Para dilucidar sobre la magnitud de este problema, se realizaron bioensayos en el laboratorio con el objetivo de determinar si *B. bassiana* es detrimental para el parasitoide *P. coffea*, en términos de sobrevivencia de adultos,  $CL_{50}$ ,  $TL_{50}$ , actividad reproductiva y mortalidad de su progenie. Se considera que este trabajo servirá de referencia para futuras evaluaciones relacionadas con el empleo de ambos organismos en el campo y su posible integración dentro de un plan de manejo de la plaga.

## Material y Métodos

**Insectos.** Las brocas fueron obtenidas a partir de frutos recolectados en cafetales de la región del Soconusco, Chiapas. Se usaron hembras del parasitoide *P. coffea* recién emergidas de una cría establecida en los laboratorios de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), empleando la metodología descrita por Infante *et al* (1994). La temperatura del cuarto de cría fue de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 70-80%. Las hembras del parasitoides usadas en los experimentos se alimentaron con miel de abeja.

**Propagación y reproducción del hongo.** Se usó la cepa Bb<sub>25</sub> de *Beauveria bassiana* de la colección de hongos del Laboratorio de Patología de Insectos de ECOSUR en Tapachula, Chiapas. Estudios previos señalan que esta cepa es una de las más virulentas para la broca del café (De la Rosa *et*

*al* 1997a). Esta cepa fue originalmente aislada de adultos de *H. hampei* infectados de forma natural y conservada en cristales de sílica gel a  $4^\circ\text{C}$ . Para los bioensayos, las conidias fueron producidas en el medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). La germinación y esporulación del hongo se propició colocando el medio de cultivo a  $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa de  $80\% \pm 5$  y 12:12h (luz: oscuridad). Las conidias fueron cosechadas quince días después y almacenadas a  $4^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser utilizadas en los experimentos.

**Patogenicidad sobre estados inmaduros de *P. coffea*.** El efecto de *B. bassiana* sobre los estados inmaduros de *P. coffea*, se observó aplicando el hongo a brocas recién parasitadas, usando un diseño completamente al azar con dos tratamientos (con hongo y sin hongo) y seis repeticiones. Cada repetición consistió de diez brocas adultas. La inoculación del hongo fue realizada en tubos de ensayo, aplicando 1 ml de una suspensión con  $1 \times 10^8$  conidias/ml sobre un grupo de diez brocas. Los insectos permanecieron en contacto con la suspensión del hongo durante treinta segundos y después fueron colocados sobre un papel filtro para eliminar el exceso de humedad. Las brocas inoculadas fueron colocadas individualmente en viales que contenían 2 ml de una dieta (Villacorta & Barrera 1996). Las brocas fueron disecadas 24 días después para determinar el porcentaje de infección. Los estados inmaduros de *P. coffea* fueron colocados dentro de una cámara húmeda para propiciar la eventual esporulación del hongo.

**Patogenicidad sobre adultos de *P. coffea*.** La patogenicidad de *B. bassiana* sobre adultos de *P. coffea* fue evaluada usando un diseño similar al experimento anterior, usando diez repeticiones por cada tratamiento. Se aplicaron 0.5 ml de una suspensión con  $1 \times 10^8$  conidias/ml del hongo más un adherente (Triton X-100 al 0.1 %) sobre diez hembras del parasitoide. Las avispas fueron sumergidas por 30 segundos en la suspensión, el exceso de humedad eliminado con papel filtro y confinadas dentro de un tubo de vidrio. Los insectos del control fueron inoculados con agua destilada estéril más el adherente. Los parasitoides fueron alimentados diariamente con miel de abeja, registrando su mortalidad. Los cadáveres fueron separados y colocados en cámaras húmedas.

**Tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) para adultos de *P. coffea*.** El tiempo necesario para que ocurra la muerte del 50% de las hembras adultas de *P. coffea* debido a *B. bassiana*, fue determinado aplicando directamente las conidias del hongo. Los bioensayos se llevaron a cabo con 25 grupos de insectos conformados por diez individuos cada uno. Cada grupo fue sumergido en 0.3 ml de una solución fungosa al 1% durante 30 segundos. Una vez eliminado el exceso de humedad, los insectos tratados se colocaron dentro de viales de vidrio y diariamente alimentados con miel de abeja. La mortalidad de las avispas se registró cada 6h a partir de la inoculación. Los parasitoides muertos fueron colocados dentro de cámaras húmedas para estimular el crecimiento del hongo.

**Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) para adultos de *P. coffea*.** La concentración necesaria para que ocurra la muerte del 50% de hembras de *P. coffea* tratadas con *B. bassiana*, fue determinada aplicando diferentes dosis del hongo. Se

usaron concentraciones de 1.0, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05, 0.03 y 0.01%, agregándose 0.025% de Tritón X-100 como adherente. Las conidias fueron contadas en una cámara de Neubauer, estimándose una concentración entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  conidias/ml. Las hembras de *P. coffea* fueron sumergidas en 0.3 ml de cada concentración en grupos de diez individuos. Se realizaron cinco repeticiones, haciendo un total de 50 hembras para cada concentración. Los insectos del control fueron sumergidos en agua destilada estéril más el adherente. Los individuos muertos fueron colocados en cámaras húmedas.

**Efecto de *B. bassiana* en la reproducción de *P. coffea*.** Se realizaron aplicaciones de *B. bassiana* al 1% sobre cultivos de *P. coffea* recién elaborados. El método de cría de *P. coffea* estuvo basado en la descripción hecha por Infante *et al* (1994). La inoculación con el hongo se realizó inmediatamente después de elaborar los cultivos del parasitoide, que consistieron en cien brocas adultas y diez hembras de *P. coffea*. El hongo fue aplicado directamente sobre los insectos de acuerdo con los siguientes tres tratamientos: a) parasitoides inoculados y brocas no inoculadas, b) brocas inoculadas y parasitoides no inoculados, c) parasitoides y brocas no inoculadas (control). La inoculación de los insectos fue realizada de acuerdo al protocolo antes descrito, empleando un 1 ml de la suspensión. Se realizaron diez repeticiones para cada tratamiento. Los cultivos de *P. coffea* fueron mantenidos a  $27^\circ\text{C} \pm 2$ , humedad relativa de  $80\% \pm 5$  y 12:12h (luz:oscuridad). La emergencia de parasitoides se registró diariamente a partir de los 25 días. De cada repetición se tomó una muestra de treinta brocas adultas para determinar el nivel de parasitismo, la incidencia del hongo y la mortalidad de inmaduros de *P. coffea*. Los individuos muertos fueron colocados en una cámara húmeda.

**Análisis estadístico.** La patogenicidad en los adultos de *P. coffea* fue analizada mediante una prueba de datos pareados con distribución normal. Los datos para calcular la  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$  fueron analizados empleando un análisis Probit, después de corregir la mortalidad en el testigo con la fórmula de Abbott (1925). Debido a que los datos del resto de los experimentos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, fueron transformados usando la fórmula  $\sqrt{x+1}$  antes de aplicar un análisis de varianza y la prueba de Tukey, empleando el programa estadístico Minitab 15 (Minitab Inc. 2007).

## Resultados

**Patogenicidad sobre estados inmaduros de *P. coffea*.** Se pudo determinar un claro efecto del hongo en la mortalidad de los estados inmaduros de *P. coffea*. Las disecciones de las brocas parasitadas e inoculadas con *B. bassiana*, revelaron una mortalidad del 100% de los estados inmaduros del parasitoide. Mientras que en el control (sin hongo) no hubo mortalidad.

**Patogenicidad sobre adultos de *P. coffea*.** La inoculación con *B. bassiana* incrementó significativamente la mortalidad en las hembras adultas de *P. coffea* con respecto al control ( $Z = 3.48$ ;  $gl = 1$ ;  $P < 0.01$ ). El efecto patogénico del hongo en el segundo día después de la inoculación produjo 85%

de mortalidad, contrastando con un 62% en el control. La longevidad máxima de las hembras fue de tres días, registrándose un 100% de mortalidad al cuarto día, en ambos grupos. Todos los individuos muertos en el tratamiento presentaron crecimiento del micelio de *B. bassiana* sobre sus cuerpos, pero no en el control.

**Tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) para adultos de *P. coffea*.** El análisis de los resultados mostró una  $TL_{50}$  de 29.4h (límites fiduciales: 28.5-30.3) para las hembras de *P. coffea* inoculadas con el hongo, mientras que en el grupo control (sin hongo), fue de 37.3h (límites fiduciales: 36.4-38.1). Considerando que los límites fiduciales del tratamiento y el control no se traslapan entre sí, los resultados sugieren que *B. bassiana* reduce significativamente ( $P < 0.05$ ) la sobrevivencia de las hembras de *P. coffea*. El 50% de la mortalidad fue alcanzada en ambos grupos con un tiempo diferencial de aproximadamente ocho horas (Fig 1).

**Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) para adultos de *P. coffea*.** El porcentaje de avispas esporuladas con *B. bassiana*, mostró una relación directamente proporcional con la dosis inoculada (Fig 2). La virulencia de *B. bassiana* generó una mortalidad corregida correspondiente a un valor  $CL_{50}$  de 0.11% (límites fiduciales: 0.067-0.167), equivalente a  $9.53 \times 10^7$  conidias/ml de *B. bassiana*; dosis requerida para matar al 50% de una población de hembras de *P. coffea*. No se observó esporulación del hongo en ninguno de los insectos que murieron en el grupo control (no tratados).

**Efecto de *B. bassiana* en la reproducción de *P. coffea*.** Las inoculaciones de *B. bassiana* tanto en parasitoides como en brocas adultas, afectaron notablemente la sobrevivencia y reproducción de *P. coffea* (Tabla 1). La incidencia del hongo sobre los hospederos (infección) no mostró diferencias entre tratamientos (parasitoides inoculados *versus* brocas inoculadas), pero sí con respecto al control ( $F = 57.25$ ;  $gl = 2$ ;  $P < 0.01$ ). El hongo fue capaz de esporular tanto en los parasitoides muertos como en las brocas, indicando un claro efecto patogénico hacia ambos organismos. No se observaron diferencias significativas ( $F = 2.84$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0.134$ ) con respecto al porcentaje de parasitismo registrado. En cuanto a la reproducción de *P. coffea*, hubo una mayor producción

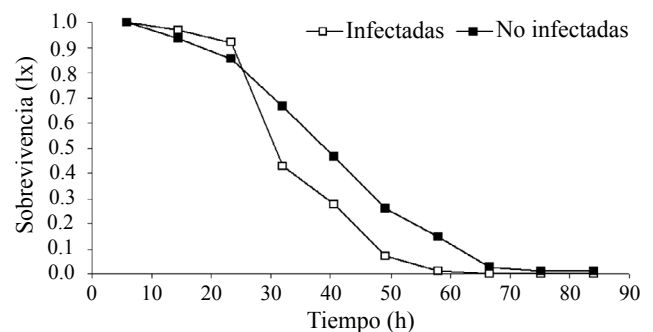


Fig 1 Sobrevivencia de hembras adultas de *Phymastichus coffea* infectadas y no infectadas con el hongo *Beauveria bassiana*.

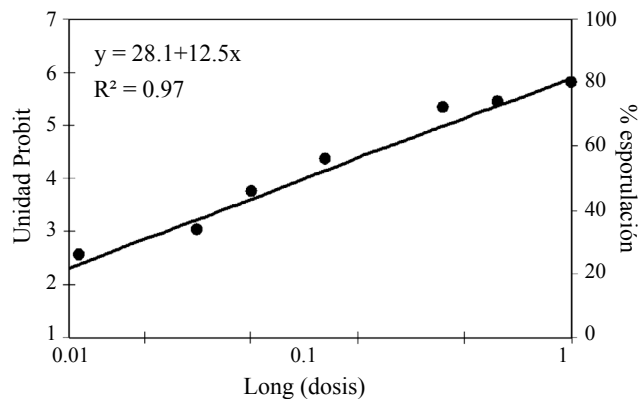


Fig 2 Relación entre la dosis de aplicación de *Beauveria bassiana* y el porcentaje de hembras adultas de *Phymastichus coffea* esporuladas con el hongo.

de progenie del parasitoide en el control con respecto a los tratamientos donde fue aplicado el hongo ( $F = 30.24$ ;  $gl = 2$ ;  $P < 0.01$ ). La población de *P. coffea* se multiplicó 3.8 veces en el control, mientras que en los tratamientos creció 1.1 y 0.4 veces, cuando la inoculación de *B. bassiana* fue sobre la broca y el parasitoide, respectivamente. Se observó la presencia de conidias de *B. bassiana* sobre el abdomen de las hembras de *P. coffea* (Fig 3) que fueron recuperadas de cultivos que recibieron inoculación del hongo. Este hecho hace suponer que la transmisión de *B. bassiana* de un fruto de café a otro, puede ser favorecida por este parasitoide.

## Discusión

El presente estudio demuestra que *Beauveria bassiana* provoca alta mortalidad sobre los estados juveniles de *P. coffea*, cuando el hongo es aplicado a sus hospederos parasitados. En este tipo de interacciones, la capacidad de penetración del hongo a través de la cutícula del insecto está

Tabla 1 Efecto del hongo *Beauveria bassiana* en la reproducción de *Phymastichus coffea* (media  $\pm$  E.E.), después de ser aplicado directamente sobre los insectos (brocas o parasitoides).

Tratamiento	Brocas parasitadas <sup>ns</sup> (%)	Brocas infectadas (%)	Parasitoides producidos
Parasitoides inoculados + brocas	84.3 $\pm$ 5.11	97.6 $\pm$ 1.67 a	3.9 $\pm$ 1.13 b
Brocas inoculadas + parasitoides	94.3 $\pm$ 2.05	99.0 $\pm$ 1.35 a	10.9 $\pm$ 2.38 b
Brocas + parasitoides (Control)	94.3 $\pm$ 2.81	0.0 $\pm$ 0.00 b	38.2 $\pm$ 6.05 a

Valores seguidos por la misma letra dentro de cada columna no difieren significativamente entre ellos. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ); <sup>ns</sup> no significativo.

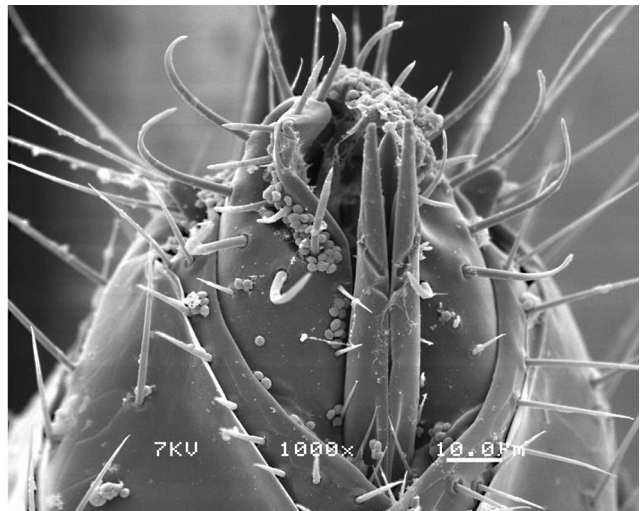


Fig 3 Vista ventral de una hembra de *Phymastichus coffea* mostrando conidias de *Beauveria bassiana* adheridas sobre su abdomen.

directamente relacionada con la producción de enzimas y toxinas de la cepa utilizada (Roberts 1989). Adicionalmente, la presencia de *B. bassiana* genera una disminución aproximada de 22% de la vida adulta de las hembras de *P. coffea*. Considerando que su longevidad como adultos es de apenas tres días (Feldhege 1992, Infante 1994), esta reducción resulta muy significativa. En otros sistemas ha sido reportado que la afectación de los parasitoides por entomopatógenos también puede darse reduciendo la disponibilidad de los recursos alimenticios o hacerlos inapropiados para el desarrollo de la progenie (Rosenheim et al 1995).

Estudios previos han demostrado que *B. bassiana* genera también altas mortalidades en otros parasitoides de la broca como son: *C. stephanoderis* y *P. nasuta* (Bustillo et al 1998, De la Rosa et al 1997b, 2000). Este hecho ha generado preocupación pues estas especies junto con *P. coffea* han sido reconocidas como las únicas que poseen potencial para ser utilizadas en programas de control biológico clásico contra la broca del café en América Latina (Murphy & Moore 1990). A la luz de las evidencias aquí presentadas sobre la susceptibilidad de *P. coffea* a este hongo, se puede concluir que el control biológico de *H. hampei* mediante parasitoides no es compatible con uso de *B. bassiana*. Este hecho había sido previamente discutido por otros autores como una hipótesis, planteándose al mismo tiempo algunas propuestas para evitar que los parasitoides fueran dañados por el hongo al ser liberados en un cafetal (Infante 2002).

Las aplicaciones de *B. bassiana* pueden afectar el 3% de los artrópodos que no son objeto del control (Bruce et al 1997) e interactúan antagónicamente con los enemigos naturales de varias plagas (Feng et al 1994, Danfa & Van der Valk 1999). El agroecosistema cafetalero alberga una gran biodiversidad de parasitoides y depredadores (Ibarra-Núñez 1990) y no se conoce el efecto que las aspersiones de *B. bassiana* pudieran tener sobre esas comunidades. Considerando que este entomopatógeno ha sido ampliamente utilizado contra la broca del café en Latinoamérica (Barrera 2005), resulta indispensable conocer en que grado esos

enemigos naturales están siendo afectados por el hongo. En este sentido, el presente trabajo se considera como una contribución útil para inferir lo que podría estar ocurriendo con este hongo en el campo.

Nuestros resultados sugieren que una hembra de *P. coffea* puede transmitir la infección de *B. bassiana* a su hospedero al transportar las conidias en su cuerpo. En un cafetal, la diseminación de la enfermedad por una hembra de *P. coffea* debe ser un evento circunstancial, pues de lo contrario sus poblaciones se extinguirían debido a la susceptibilidad del parasitoide. En otras especies de insectos, la capacidad para transmitir y dispersar conidias de *B. bassiana* ha sido aprovechada para crear estrategias de control de plagas (Toledo *et al* 2007), pero los estudios que han evaluado la transmisión de hongos entomopatógenos por parasitoides son escasos (Roy & Pell 2000). Consecuentemente, se requiere de estudios específicos para valorar el papel de *P. coffea* como transmisor de *B. bassiana* en condiciones de campo, ya que su aportación al control de la broca sería mínima, considerando que menos del 4% de las brocas atacadas por *P. coffea* logran sobrevivir (Castillo *et al* 2004).

Es probable que el impacto exhibido por *B. bassiana* sobre *P. coffea*, así como su aparente transmisión por el parasitoide, hayan sido influenciadas por las condiciones de confinamiento utilizadas en el presente trabajo, al favorecer el desarrollo del hongo. Aun así, la actividad parasítica de *P. coffea* no parece no ser afectada, ya que su progenie no se extinguió con la presencia del hongo. De cualquier manera, es conveniente realizar experimentos para validar estos resultados en el campo. Las evaluaciones en laboratorio no siempre reflejan los niveles de infección que ocurren en condiciones naturales (Goettel *et al* 1990), debido a que la actividad de los enemigos naturales es afectada por la complejidad del medio (James *et al* 1995, Fuentes-Contreras *et al* 1998). Sin duda, los hallazgos reportados en el presente estudio serán importantes para futuros trabajos relacionados con la broca del café en América Latina.

### Agradecimientos

A Guadalupe Nieto por su ayuda en el procesamiento y análisis de imágenes tomadas al microscopio electrónico de barrido.

### Referencias

- Abbott W (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265-267.
- Barrera J F (2005) Investigaciones sobre la broca del café en México: logros, retos y perspectivas, p.1-13. In Barrera J F (ed) Situación actual y perspectivas de la investigación y manejo de la broca del café en Costa Rica, Cuba, Guatemala y México. México SME-ECOSUR, 66p.
- Barrera J F, Moore D, Abraham Y J, Murphy S T, Prior C (1990) Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Mexico and possibilities for further action. *Brighton Crop Prot Conf* 4: 391-396.
- Benassi V L R M (1995) Levantamento dos inimigos naturais da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) no norte do Espírito Santo. *An Soc Entomol Brasil* 24: 635-638.
- Bruce L P, Skinner M, Gouli V, Brownbridge M (1997) Impact of soil applications of *Beauveria bassiana* and *Mariannaea* sp. on nontarget forest arthropods. *Biol Control* 8: 203-206.
- Bustillo A, Cárdenas R, Posada F J (2002) Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. *Neotrop Entomol* 31: 635-639.
- Bustillo A, Cardenas R, Villalba D, Benavides P, Orozco J, Posada F J (1998) Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, Colombia CENICAFE, 134P.
- Bustillo A, Posada F J (1996) El uso de entomopatógenos en el control de la broca del café en Colombia. *Man Int Plagas* 42: 1-13.
- Castillo A, Infante F, Vera J, Trujillo J (2004) Host-discrimination by *Phymastichus coffea* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *Biocontrol* 49: 655-663.
- Damon A (2000) A review of the biology and control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Bull Entomol Res* 90: 453-465.
- De la Rosa W, Alatorre R, Trujillo J, Barrera J F (1997a) Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *J Econ Entomol* 90: 1-5.
- De la Rosa W, Godínez J A, Alatorre R, Trujillo J (1997b) Susceptibilidad del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* a diferentes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Southwest Entomol* 22: 233-242.
- De la Rosa W, Segura H R, Barrera J F, Williams T (2000) Laboratory evaluation of the impact of entomopathogenic fungi on *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyilidae), a parasitoid of the coffee berry borer. *Environ Entomol* 29: 126-131.
- Danfa A, Van der Valk H C H G (1999) Laboratory testing of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* on Sahelian non-target arthropods. *Biocontrol Sci Techn* 9: 187-198.
- Donegan K, Lighthart B (1989) Effect of several stress factors on the susceptibility of predatory insects, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr Pathol* 54:79-84.
- Feldhege M R (1992) Rearing techniques and aspects of biology of *Phymastichus coffea* (Hymenoptera: Eulophidae), a recently described endoparasitoid of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Café Cacao Thé* 31: 45-54.
- Feng M G, Poprawski T J, Khachatourians G G (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci Techn* 4: 3-34.

- Fuentes-Contreras E, Pell J K, Niemeyer H M (1998) Influence of host plant resistance and the third trophic level: interactions between parasitoids and entomopathogenic fungi of cereal aphids. *Oecologia* 117: 426-432.
- Goettel M S, Poprawski T J, Vanderberg J D, Li Z, Roberts D W (1990) Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents, p.209-231. In Lard M, Lacey L A, Davidson E W (eds) Safety of microbial insecticides. Boca Raton, CRC Press, 259p.
- Ibarra-Núñez G (1990) Los artrópodos asociados a cafetos en un cafetal mixto del Soconusco, Chiapas, México. I. Variedad y abundancia. *Fol Entomol Mex* 79: 207-231.
- Infante F (2002) Esquema conceptual para el manejo integrado de la broca del café en Chiapas, p.193-207. In Pohlan J (ed) México y la cafecultura chiapaneca. Aachen, Alemania Shaker Verlag, 386p.
- Infante F, Murphy S T, Barrera J F, Gómez J, De la Rosa W, Damon A (1994) Cría de *Phymastichus coffea* parasitoide de la broca del café, y algunas notas sobre su historia de vida. *Southwest Entomol* 19: 313-315.
- James R R, Shafer B T, Croft B, Lighthart B (1995) Field evaluation of *Beauveria bassiana*: its persistence and effects on the pea aphid and a non-target coccinellid in alfalfa. *Biocontrol Sci Techn* 5: 1506-1513.
- Jaramillo J, Bustillo A E, Montoya E C, Borgemeister C (2005) Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Phymastichus coffea* (Hymenoptera: Eulophidae) in Colombia. *Bull Entomol Res* 95: 1-6.
- Le Pelley R H (1968) Pests of coffee. London, Longmans Green & Co, 590p.
- Minitab (2007) User's guide: statistical software. State College, PA. Minitab Inc. Version 15.
- Murphy S T, Moore D (1990) Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News Inf* 11: 107-117.
- Rehner S A, Posada F, Buckley E, Infante F, Castillo A, Vega F E (2006) Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J Inver Pathol* 93:11-21.
- Roberts D W (1989) World picture of biological control of insects by fungi. *Mem I Oswaldo Cruz* 84: 89-100.
- Rosenheim J A, Kaya H K, Ehler L E, Marois J J, Jaffee B A (1995) Intra-guild predation among biological control agents: theory and evidence. *Biol Control* 5: 303-335.
- Roy H E, Pell J K (2000) Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control. *Biocontrol Sci Techn* 10: 737-753.
- Toledo J, Campos S E, Flores S, Liedo P, Barrera J F, Villaseñor A, Montoya P (2007) Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *J Econ Entomol* 100: 291-297.
- Villacorta A, Barrera J F (1996) Techniques for mass rearing of the parasitoid *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyilidae) on *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) using an artificial diet. *Vedalia* 3: 45:48.

Received 1/IV/08. Accepted 31/I/09.