

Evaluación de una cepa nativa de *Fusarium* sp. para el manejo de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)

Evaluation of a strain of *Fusarium* sp. for the management of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)

PAULA ANDREA DÍAZ P.¹, YENNY ADRIANA GÓMEZ¹, INGEBORG ZENNER DE POLANÍA², AMPARO VARGAS³

Revista Colombiana de Entomología 29 (1): 71-76 (2003)

Resumen. La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) es objeto de amplios estudios tendientes a su manejo ambientalmente favorable. Como componente de este MIP, los entomopatógenos nativos cobran especial importancia. Recientemente se detectó en Anolaima (Cundinamarca) una cepa del hongo *Fusarium* causando la muerte de adultos de broca. El presente estudio tuvo como objetivos evaluar el control de una cepa nativa de *Fusarium* sp. sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* en un cafetal del municipio de Anolaima (Cundinamarca), realizar la caracterización preliminar de la cepa UDCA1, confirmar bajo condiciones de laboratorio su patogenicidad y estimar la DL_{50} . Las pruebas de laboratorio se efectuaron bajo condiciones controladas de humedad (60%) y temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Las aplicaciones en campo, con o sin coadyuvante, se realizaron en un lote situado a 1.550 msnm en un diseño completamente aleatorio con tres parcelas de 176 árboles cada una. Se evaluó el porcentaje de infestación y el número de frutos con presencia de *Fusarium* antes y después de cada aplicación. Los resultados indican que el micelio del hongo es de color blanco rosado, septado, vacuulado, posee abundantes microconidias de forma oval, macroconidias escasas y clamidosporas en varias presentaciones. La DL_{50} fue de 3×10^9 esporas/ml. La patogenicidad fue del $62,5\% \pm 9,57\%$ en un tiempo promedio de $5,5 \pm 3,03$ días. En campo con cinco aplicaciones se observó un incremento del porcentaje de mortalidad hasta del 33,3% por rama de cafeto. La precipitación no tuvo influencia detectable sobre el efecto del hongo en el campo. El uso del coadyuvante resulta favorable sólo en épocas de lluvias intensas.

Palabras clave: Mortalidad. Patogenicidad. Aplicación en campo. Precipitación.

Summary. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), is the object of thorough studies to find an ambientally favorable management program. As a component of this program, native entomopathogenic fungi are of special importance. Recently, in Anolaima (Cundinamarca), a strain of *Fusarium* sp. was found to cause mortality of the adults of *H. hampei*. The objective of the present research is to evaluate the effect of a native strain of *Fusarium* sp. on the coffee berry borer under field conditions in order to perform a preliminary characterization of the UDCA1 strain. Another aim is to confirm the pathogenicity and to estimate the LD_{50} under laboratory conditions. The laboratory trials were conducted under controlled conditions of humidity (60%) and temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). The field applications, with and without coadyuvant, were realized in a coffee plantation at 1.550 m of elevation in a completely randomized design with three plots of 176 coffee trees each. Infestation percentage and the amount of fruit with *Fusarium* present, before and after the sprays, were evaluated. The results show that the mycelium of the entomophatogenic fungus has a whitish-pink color. Viewed under the microscope it is also septated, vacuolated, has abundant ovoid microconidia, scarce macroconidia and clamidospores of diverse forms. The pathogenicity of the fungus was $62,5 \pm 9,57\%$ with a mean time of $5,5 \pm 3,03$ days. The LD_{50} found, presented 3×10^9 spores/ml. Under field conditions, after five applications, the percent mortality reached an increase of 33,3%. Precipitation had no detectable influence on the effect of the fungus. The use of a coadyuvant was only favorable under severe rainy conditions.

Key words: Mortality. Pathogenicity. Field applications. Precipitation.

Introducción

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) es considerada como la plaga más importante del cultivo, debido a su hábito de atacar directamente la cereza del café, lo cual hace difícil su control. En 1995 el insecto se encontraba en 600.000 hectáreas de la zona cafetera colombiana. Se considera que el con-

trol de la broca se debe realizar a través de un programa de manejo integrado, conformado por varios componentes de control como son: los entomopatógenos y los parasitoides, control cultural (como el re-re) y control químico que se debe tener como última opción debido a su costo alto y riesgos para el agroecosistema (Bustillo *et al.* 1998).

Dentro de un programa de manejo integrado de la broca de café cobra especial importancia el empleo de los hongos entomopatógenos por ser considerados ambientalmente seguros, no tóxicos para los trabajadores del campo y económicos (Bustillo y Posada 1996). Se han encontrado hongos entomopatógenos como *Beauveria*

¹ Estudiantes de Ingeniería Agronómica. Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Bogotá, E-mail: pandipa@latinmail.com - yego@latinmail.com

² Autor para correspondencia: Directora de Carrera Ingeniería Agronómica UDCA, Bogotá. A. A. 34204. E-mail: ingagro@udca.edu.co

³ Docente área de Fitopatología. Carrera de Ingeniería Agronómica UDCA. Bogotá, E-mail: ingagro@udca.edu.co

bassiana (Bals) Vuill (Vélez y Benavides 1990), *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sokorin (ICA 1993), *Hirsutella eleutherae* (Posada et al. 1993) y *Fusarium* sp. en las regiones de Caldas, Huila, Quindío y Risaralda (Pérez y Posada 1995).

En enero de 1998, en Anolaima (Cundinamarca) se detectó la presencia de *Fusarium* sp. y *Beauveria bassiana* (Bals) causando la mortalidad de adultos de broca. En ese momento se presentaba el fenómeno del Pacífico, el cual produjo una sequía de seis meses, a pesar de la cual se encontraron los hongos, afectando la población de broca (Zenner de Polania et al. 2001).

Teniendo en cuenta que se desconocen las características de esta cepa de *Fusarium* denominada UDCA1 y el posible efecto sobre la broca al ser aplicado en campo, se consideró oportuno realizar esta investigación durante el año 2000, la cual tuvo como objetivos la caracterización preliminar de la cepa, confirmar la patogenicidad y determinar la DL_{50} . Otro propósito fue evaluar la cepa bajo condiciones de campo.

Materiales y Métodos

Los bioensayos referentes al hongo *Fusarium* UDCA1 se realizaron en el laboratorio de entomología de la carrera de Ingeniería Agronómica de la UDCA, a 60% de humedad relativa y $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura. El aislamiento inicial del hongo se obtuvo de brocas extraídas de granos de café recolectados del municipio de Anolaima y se realizaron las pruebas correspondientes de patogenicidad en brocas sanas; para esto se utilizaron tres medios de cultivo Komada, Sabouraud- Dextrosa- Agar (SDA) y Papa-Dextrosa- Agar (PDA). El lote donde se realizó el trabajo de campo se encuentra localizado en el municipio de Anolaima, vereda Mesitas de Caballero, a una altitud de 1.500 msnm, una temperatura media de 23°C y una precipitación media de 1.410 mm anuales.

Las brocas adultas empleadas para los bioensayos fueron donadas por la unidad de cría de Cenicafé (Chinchiná, Caldas).

Para la reactivación del hongo sobre adultos de la broca se seleccionaron los especímenes más activos, negros y con una edad inferior a ocho días en promedio. Las brocas se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, se lavaron tres veces con agua destilada estéril sobre mallas de tul. Posteriormente, se realizó la infección de las brocas por aspersión con 1 ml de suspensión del hongo en cajas de petri que contenían una toalla de papel esterilizada. Después de 15 días se tomaron individualmente, se sometieron a una nueva desinfección con hipoclorito de sodio comercial al 5,25% por un minuto y se pasaron inmediatamente sobre una toalla de papel. Finalmente, las brocas infectadas se colocaron individualmente en cajas de petri con medio de cultivo Komada (Vélez et al. 1997).

La observación cualitativa preliminar de la cepa *Fusarium* UDCA1 se realizó a partir de

cultivos puros del hongo en medio Komada, se determinaron las características macroscópicas del hongo observando el crecimiento micelial y el color de la colonia. Para las características microscópicas se montaron placas con muestras obtenidas de la producción masiva de 35 días de edad. Se observaron al microscopio, con objetivo de 40X, micelio, microconidias, macroconidias y clamidosporas.

La prueba de patogenicidad se realizó con el hongo obtenido en sustrato de arroz precocido a los 35 días de desarrollo, en una concentración de 5.8×10^8 esporas/ml; los insectos utilizados previamente se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 0,5% por diez minutos; la inoculación de las brocas se efectuó por medio de aspersión de las esporas sobre éstas, se dejaron caminar las brocas en cajas de petri con papel filtro estéril.

Luego se colocaron individualmente las brocas en tubos de ensayo de 9 ml, con un disco de papel filtro humedecido con agua destilada estéril y se taparon con un algodón esterilizado. Al cabo de 24 horas se adicionó como sustrato a cada tubo un grano de café pergamino.

La mortalidad de las brocas se evaluó diariamente durante 15 días después de la inoculación, utilizando un microscopio estereoscópico para observar los signos de la enfermedad en las brocas (Vélez et al. 1997). Este bioensayo constó de dos tratamientos: testigo absoluto y brocas inoculadas, cada uno replicado cuatro veces con diez individuos por réplica.

Para el análisis Probit se realizó la selección y desinfección de las brocas, se asperjaron con un mililitro de cada una de las dosis a utilizar, se dejaron las brocas en cajas de petri y diariamente durante 15 días se evaluó la mortalidad por dosis para obtener por medio del paquete estadístico SAS 6.12 las dosis letales 50 y 80.

Este bioensayo se estableció utilizando seis dosisificaciones (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3) y un testigo, replicadas cinco veces, con diez individuos por repetición. Se determinó la concentración de esporas expresada en esporas/ml utilizando para esto un hemacitómetro y se calculó el número de esporas/g, el sustrato se lavó con 80 ml de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,1%, luego se realizaron diluciones seriadas para llevar al hemacitómetro y realizar los recuentos.

Para la producción masiva del hongo se empleó la metodología establecida por Antia et al. (1992) para la producción de *Beauveria bassiana* a nivel de finca, utilizando como sustrato arroz cocido en botellas de vidrio de 275 ml de capacidad, en proporción 80 ml de agua corriente y 50 g de arroz sin lavar. Luego se introdujo el inóculo, obtenido de un cultivo puro del hongo en medio Komada, en las botellas y se colocaron tapones de algodón, se marcaron con la fecha de siembra y se llevaron

a un cuarto de maduración a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 35 días. Posteriormente, se realizaron las aplicaciones de campo en un cafetal de la variedad Colombia no tecnificado con sombrío y una densidad de siembra aproximada de 2.700 árboles por hectárea. Para éstas se utilizó un diseño completamente al azar.

Se tenían tres parcelas de 176 árboles cada una, se escogieron al azar cinco sitios en los cuales se marcaron ramas de la parte productiva de seis cafetos, para un total de seis ramas por sitio. Sobre estas ramas se realizaron conteos semanales para evaluar el porcentaje de infestación contando el número total de granos, el número total de granos brocados y el número total de granos brocados con presencia del hongo *Fusarium* y *B. bassiana* (hongo también presente en forma natural en la región). Los tratamientos correspondieron a: T1 (testigo absoluto), T2 (aplicación del hongo con adyuvante) y T3 (aplicación del hongo sin adyuvante).

Las aspersiones se hicieron a toda la parcela tanto a las ramas fructíferas como al suelo y se repitieron con un intervalo de dos semanas. Para esto se emplearon 30 litros de "biopesticida". Se utilizó el adyuvante "carrier" recomendado por la Federación de Cafeteros en las aplicaciones de *B. bassiana*.

En los muestreos se tuvo en cuenta la apariencia y ubicación del micelio del hongo tanto en el grano como en la broca. *Fusarium* sp. se presenta con un micelio de color blanco polvoso con tintes rosado o amarillo, tanto en la broca como en el ombligo del grano del café, lo cual confirmó la eficiencia del hongo y se distinguió de *B. bassiana* el cual sólo se encuentra sobre la broca y es de color blanco.

Las aplicaciones se complementaron con un manejo de cosecha oportuna cada 20 días. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba T.

Resultados y Discusión

Después de 15 días de incubación se observó mayor crecimiento micelial en medio Komada que en medio SDA (Sabouraud - Dextrosa - Agar). En PDA (Papa - Dextrosa - Agar) no hubo crecimiento. El micelio presentó un color blanco rosado según la tabla de color Munsell; con la edad se rodea de halo color violeta. El desarrollo del micelio aéreo fue escaso. Microscópicamente se observó micelio septado, abundantes microconidias de una sola célula, y de forma oval; macroconidias en forma de hoz con tres septos, generalmente escasas en cultivos jóvenes; las clamidosporas fueron de formación rápida y abundantes, se presentaron simples, en grupos y largas cadenas observadas en cultivos de 35 días de edad, su color es claro en cultivos jóvenes y se torna marrón a través del tiempo (Fig. 1). De acuerdo con las observaciones preliminares de algunas características microscópicas se presume que se trata de una especie diferente a *Fusarium oxysporum*.

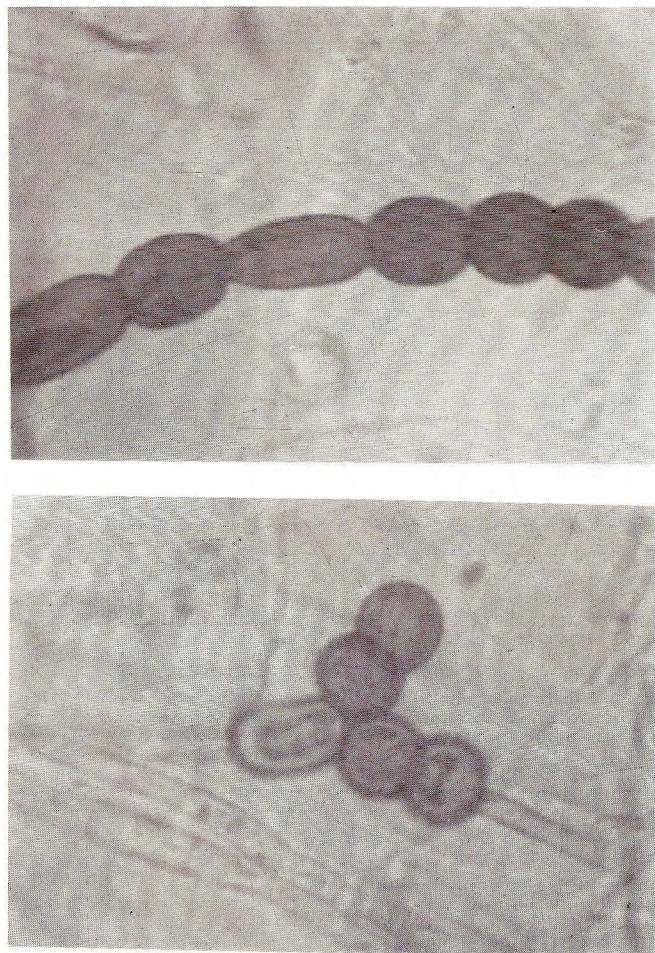


Figura 1. Clamidosporas de *Fusarium* UDCA1 en largas cadenas y en grupos al microscopio (40 X).

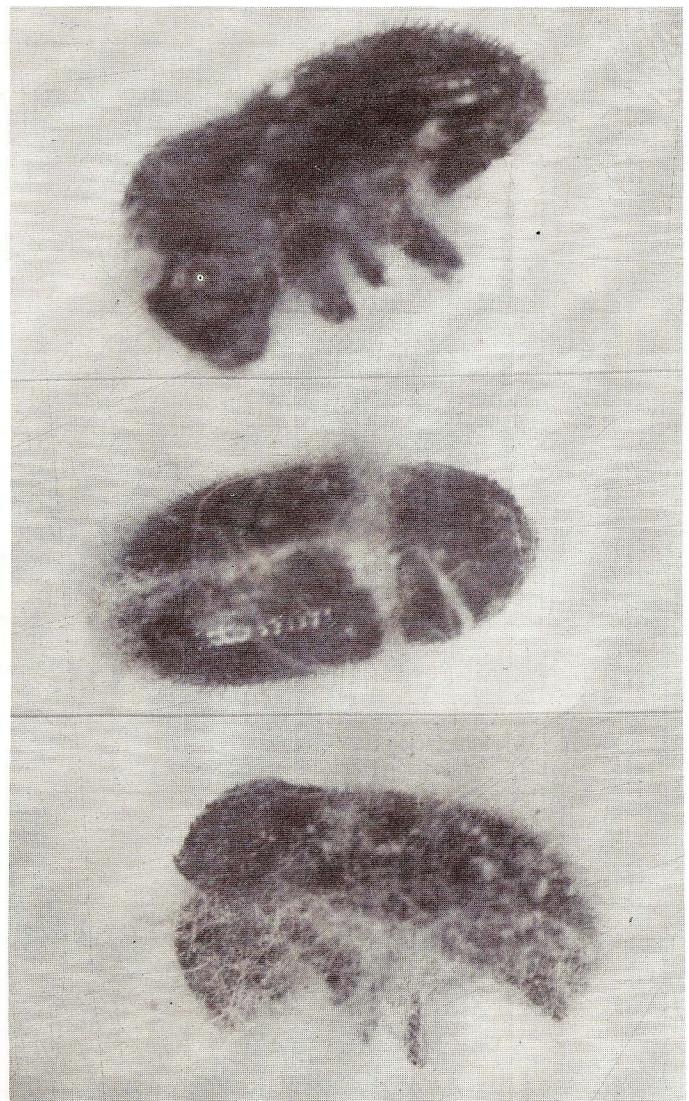


Figura 2. Broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) infectada por *Fusarium* UDCA1.

La prueba de patogenicidad de *Fusarium* UDCA1 sobre brocas reveló una mortalidad del $62,5 \pm 9,57\%$ en un tiempo promedio de $5,5 \pm 3,03$ días. Este dato difiere del aquél obtenido con otra cepa del hongo evaluada por Pérez et al. (1996) donde bajo las mismas condiciones de laboratorio se obtuvo un tiempo de mortalidad más alto ($8,63 \pm 2,58$ días) que el de la cepa evaluada; este tiempo de mortalidad menor se considera positivo ya que cuanto más rápido se cause la muerte de la broca más eficiente será su control.

A los cuatro días después de la inoculación *Fusarium* UDCA1 inicia el crecimiento micelial entre los élitros de la broca; el cubrimiento del cuerpo del insecto por el micelio y la formación de esporas sobre el mismo se observó aproximadamente a los 15 y 20 días después de la inoculación (Fig. 2).

La concentración de esporas en las submuestras de *Fusarium* UDCA1 fue de $5,8 \times 10^8 \pm 7,01 \times 10^2$ esporas/ml y $5,4 \times 10^9 \pm 6,5 \times 10^3$ esporas/g. Esta concentración se considera mayor que la obtenida por Pérez et al. (1996), la cual fue de $1,04 \times 10^8$ esporas/g.

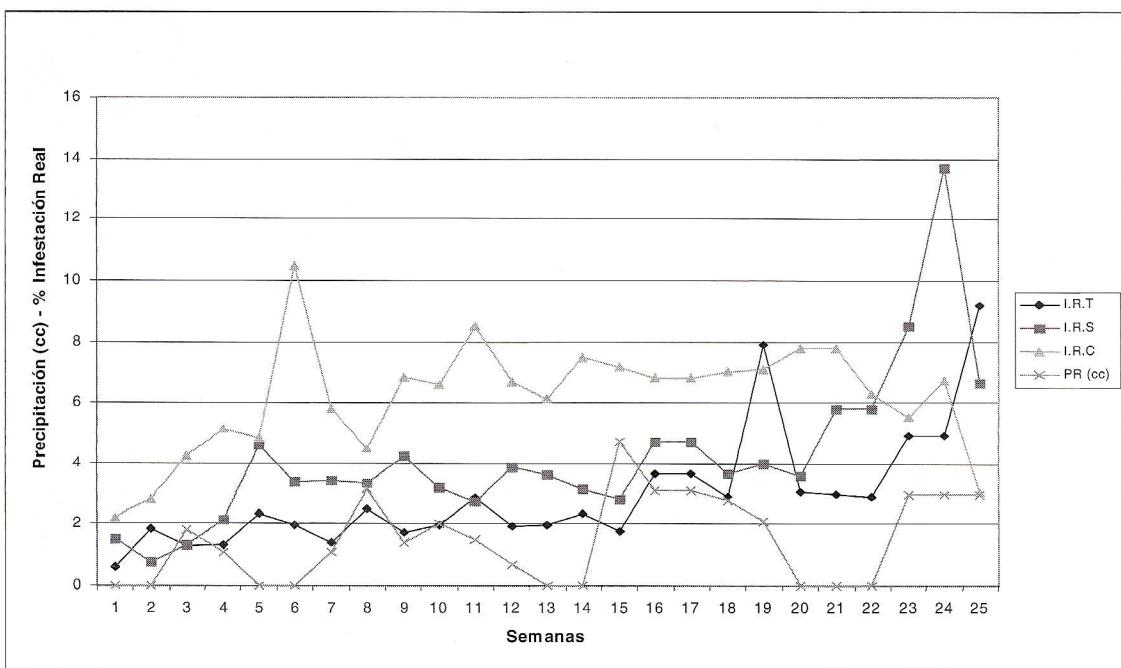
El análisis Probit arrojó una dosis letal media de 3×10^9 esporas/ml y una DL_{50} de $3,2 \times 10^9$, información necesaria para determinar la cantidad de inóculo que se requiere en el campo. Para la aplicación se tomaron dos botellas con inóculo por bomba de 20 litros debido a que la producción de esporas en una botella es menor a la DL_{50} , donde cada botella contenía $5,8 \times 10^8$ esporas/ml. Comparando con la metodología propuesta para las aplicaciones de *B. bassiana* (Antia et al. 1992) donde se utiliza una botella de $3,87 \times 10^{11}$ conidias/ml para la aspersión de 400 árboles, es respectivamente proporcional a la evaluada, debido a que la producción de conidias de *Fusarium* y el número de árboles es menor.

El análisis de las aplicaciones en campo muestra en la figura 3 que la precipitación influye en la emergencia de los adultos de la broca, la población se incrementa después de una o más semanas con ausencia de lluvias. Igualmente se observa el beneficio que causa el re-re realizado entre las semanas 1 y 18 al igual que en las últimas semanas del experimento.

En las parcelas sin adyuvante y en el testigo la realización del re-re ocasionó la ausencia de frutos en las ramas marcadas, por lo cual no se detectó infección del hongo en este periodo (Fig. 4). La influencia de la aplicación del hongo se observa dos semanas después, lo cual favorece el control de la broca especialmente cuando se utilizó adyuvante (Fig. 5).

El porcentaje de infestación inicial fue del 5%, el cual es un parámetro a tener en cuenta según la Federación de Cafeteros para iniciar el control de la broca. Despues de las aplicaciones el porcentaje de infestación sólo superó este parámetro en 1,64%. En la parcela testigo los datos son variables y aumentan lentamente hasta llegar en la semana 25 a un 9,2% de infestación, mientras que en la misma fecha en la parcela sin adyuvante fue de 6,64% y en la parcela con adyuvante 3,3% de infestación (Fig. 6); esto indica que las parcelas tratadas respondieron a las aplicaciones del hongo disminuyendo el porcentaje de infestación comparado con el testigo.

Los datos de porcentaje de granos brocados, porcentaje de *Fusarium* y porcentaje

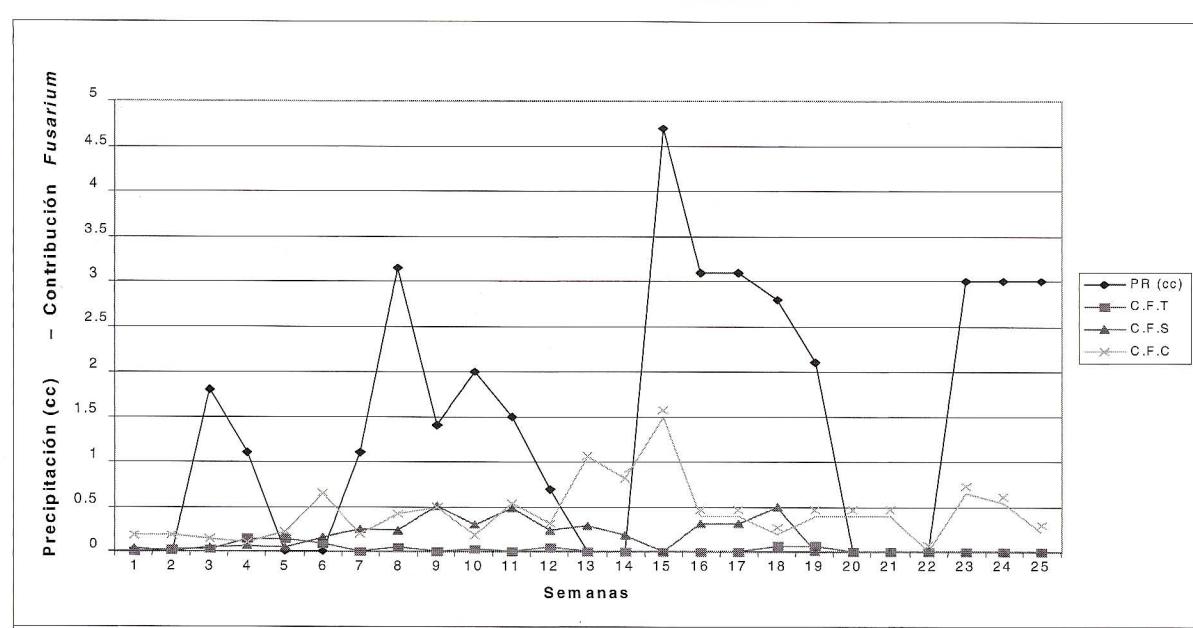


I.R.T: Infestación Real - Testigo
I.R.C: Infestación Real - Con adyuvante

I.R.S: Infestación Real - Sin adyuvante
PRcc: Precipitación en centímetros cúbicos

Aplicaciones semanas 3, 6, 9, 13 y 23
Re-Re semanas del 20 a 25

Figura 3. Porcentaje de Infestación Real Vs Precipitación en los tres tratamientos.



PR(cc): Precipitación en centímetros cúbicos
C. F. S: Contribución Fusarium – sin adyuvante

C.F.T: Contribución Fusarium – testigo
C.F.C: Contribución Fusarium – con adyuvante

Aplicaciones semanas 3, 6, 9, 13 y 23
Re-Re semanas del 20 a 25

Figura 4. Influencia de la precipitación sobre el efecto de *Fusarium* UDCA1.

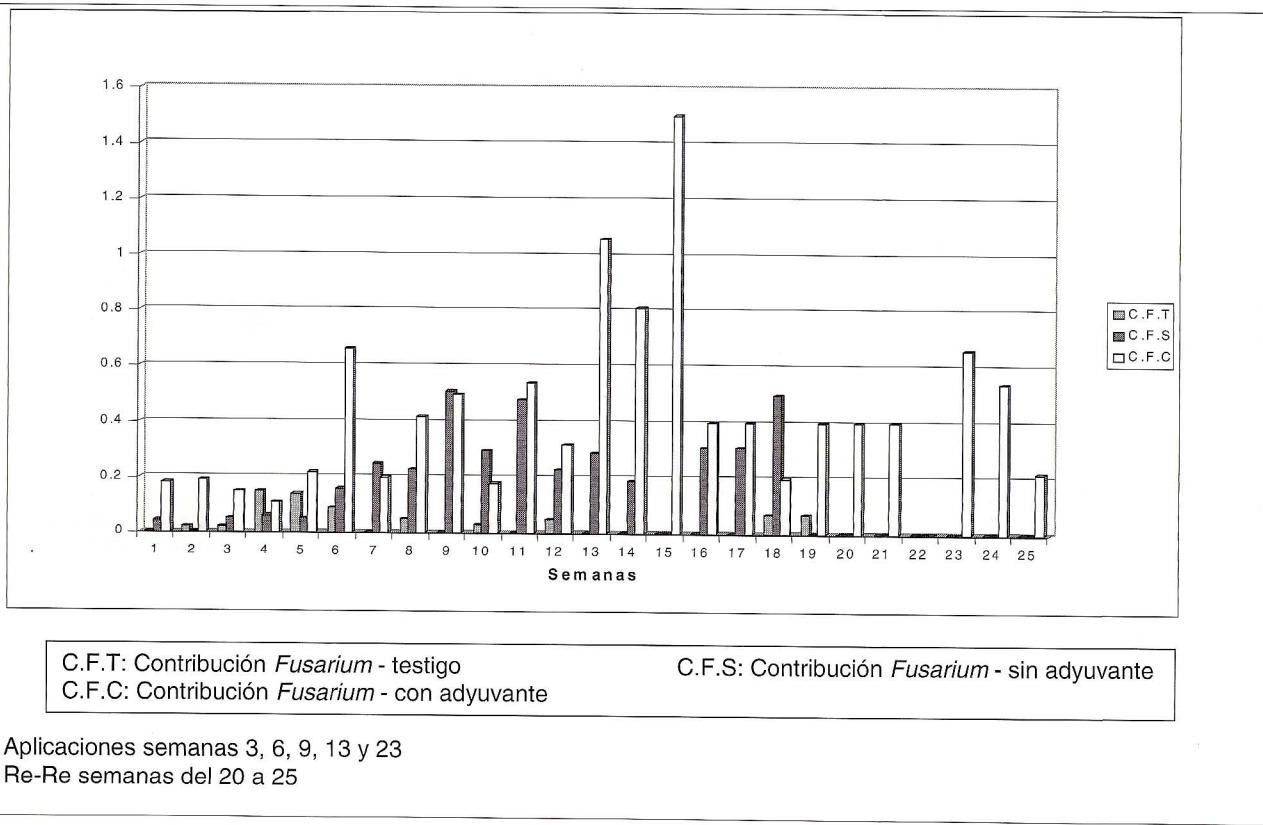
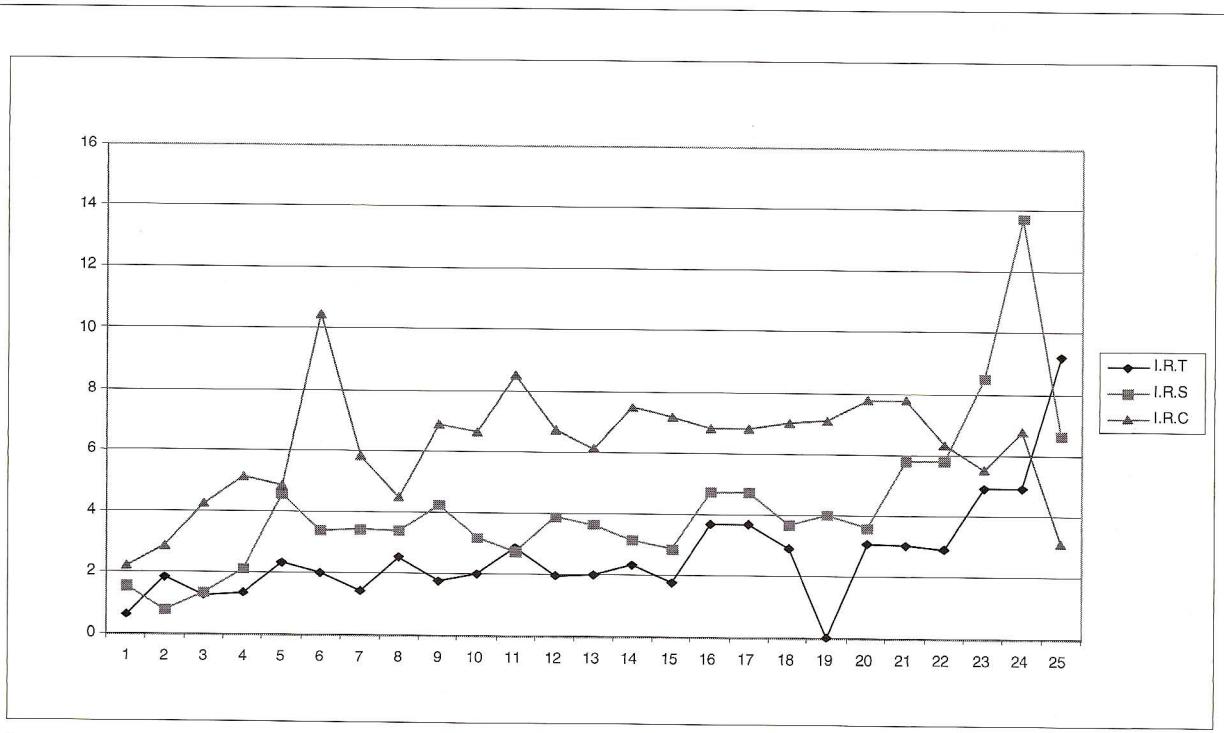


Figura 5. Contribución de *Fusarium* UDCA1 en los tres tratamientos.



I.R.T: Infestación Real - Testigo
I.R.C: Infestación Real - Con adyuvante

I.R.S: Infestación Real - Sin adyuvante

Aplicaciones semanas 3, 6, 9, 13 y 23
Re-Re semanas del 20 a 25

Figura 6. Porcentaje de Infestación Real en los tres tratamientos.

de *B. bassiana* obtenidos en campo, se transformaron mediante Ig₁₀ para no tener valores de cero ocasionado por la ausencia de granos y/o de *Fusarium* en las parcelas. Para hallar la diferencia en el porcentaje de infestación se realizó un análisis de varianza para las semanas 6, 15 y 23 por presentar variaciones en la gráfica. A un nivel de significancia del cinco % (p 0,05) se obtuvo para la semana seis baja influencia de los tratamientos sobre el porcentaje de infestación; esto se atribuye a que en esta época el grano es menos susceptible al ataque de la broca debido a su bajo contenido de materia seca. En la semana 15 hay influencia en las aplicaciones del hongo en el porcentaje de infestación. En la semana 23 no hay influencia de los tratamientos sobre el porcentaje de infestación, pues en las últimas cinco semanas del experimento se realizó el re-re lo cual ocasionó la presencia baja de granos, época en la cual no se justifica la aplicación del hongo.

Conclusiones

- Los resultados de laboratorio confirmaron la patogenicidad de la cepa *Fusarium UDCA1* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* y puede ser utilizada como otro componente del manejo integrado de esta plaga.
- La producción masiva del hongo a nivel de finca es factible, utilizando la metodología de multiplicación en arroz precocido indicada para *Beauveria bassiana*.
- Las aplicaciones del hongo deben iniciarse antes de que la infestación por broca lleve al 5%.

• Bajo condiciones de campo la influencia positiva de la aplicación del hongo se detecta dos semanas después de su realización. La precipitación no tiene influencia detectable sobre el efecto del hongo evaluado y el empleo de un adyuvante se recomienda sólo en épocas de lluvia.

Literatura citada

- ANTIA, O.; POSADA, F.; BUSTILLO, A.; GONZÁLEZ, M. 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avance técnico No. 182. p. 1-12. Cenicafé. Chinchiná. Colombia.
- BUSTILLO, A. 1996. Elementos biológicos para un programa de Manejo Integrado de la broca del café. Memorias. Segundo curso de actualización sobre el Manejo Integrado de la broca del café. p. 1-11. Medellín.
- BUSTILLO, P., A. E.; POSADA, F., F. J. 1996. El desarrollo y uso de entomopatógenos en el control de la broca del café. Memorias. XXIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 232-253. Cartagena de Indias.
- BUSTILLO, A.; CÁRDENAS, R.; VILLALBA, D.; BENAVIDES, P.; OROZCO, J.; POSADA, F. 1998. Manejo Integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Cenicafé. p. 19-21; 70-73; 81-84. Chinchiná. Colombia.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO; SECCIÓN INVESTIGACIÓN BÁSICA AGRÍCOLA. 1993. Primer registro de campo. Notas y noticias entomológicas. Colombia. p. 79.
- PÉREZ, L., E. J.; POSADA, F., F. J. 1995. El hongo *Fusarium* sp. como patógeno de la broca del café *Hypothenemus hampei*. Cenicafé. p. 1-7. Chinchiná. Colombia.
- PÉREZ, E.; POSADA, F.; GONZÁLEZ, M. 1996. Patogenicidad de un aislamiento de *Fusarium* sp. encontrado infectando la broca del café *Hypothenemus hampei*. Revista Colombiana de Entomología 22 (3): 105-111.
- POSADA, F.; BUSTILLO, A.; SALDARRIAGA, G. 1993. Primer registro del ataque de *Hirsutella eleutherorum* sobre la broca del café en Colombia. Cenicafé 44 (4): 153 -158.
- VÉLEZ, P.; BENAVIDES, M. 1990. Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei*, en Añcuá, departamento de Nariño, Colombia. Cenicafé, Chinchiná. 41 (2): 50-57.
- VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, M.; OROZCO, E.; BUSTILLO, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín técnico No. 17. Cenicafé. p. 4-12; 17-22. Chinchiná. Colombia.
- ZENNER DE POLANÍA, I.; QUINTERO, J.; QUINTERO, F. 2001. Evaluación de la mezcla de creolina, melaza y ceniza sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) y algunos de sus enemigos naturales. Revista Colombiana de Entomología 27 (1-2): 55-60.

Recibido: May. 15 / 2002

Aceptado: Ago. 30 / 2002