

# Virulencia de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y su eficacia en campo sobre *Hypothenemus hampei*

Virulence of isolates of *Metarhizium anisopliae* and their field efficacy on *Hypothenemus hampei*

Martha Gladys Bernal U.<sup>1</sup>  
Alex Enrique Bustillo P.<sup>1</sup>  
Francisco Javier Posada F.<sup>1</sup>

## Resumen

Catorce aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* se evaluaron por su patogenicidad sobre adultos de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, bajo condiciones de laboratorio (T=25±3°C; H.R.=90%) usando una concentración de 1 x 10<sup>7</sup> conidias/ml. Todos los aislamientos fueron patogénicos a la broca; sin embargo, su virulencia fue variable. La mortalidad varió de 32,5% para el aislamiento Ma 9211, hasta el 95% para el Ma 9101. El tiempo promedio de mortalidad fue también variable, con un mínimo de 3,4 días para el Ma 9101 y un máximo de 5,7 días para el Ma 9107. Para las pruebas de campo en cafetales se utilizaron los aislamientos Ma 9108, Ma 9003 y Ma 9101 que en estudio anterior produjeron niveles de mortalidad superiores al 84%. Se evaluaron dosis de 1,5 x 10<sup>8</sup> conidias/rama de 50 frutos. La mortalidad varió de 31,1% para el Ma 9108 a 43% para el Ma 9101; sin embargo, el análisis no detectó diferencias significativas (P=0,05) entre los aislamientos. En este estudio se registra, por primera vez, el efecto de *M. anisopliae* sobre poblaciones de la broca bajo condiciones de campo y la importancia de seleccionar los aislamientos de hongos antes de considerarlos en un programa de control biológico.

**Palabras claves:** Control biológico, Hongos entomopatógenos, Broca del café, Cafeto, *Metarhizium anisopliae*, *Hypothenemus hampei*.

## Summary

Fourteen isolates of *Metarhizium anisopliae* were tested for pathogenicity on adults of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* under laboratory conditions (T=25 ± 3°C, R.H.=90%) using a concentration of 1 x 10<sup>7</sup> conidia/ml. All the tested isolates were pathogenic against the borer, however their virulence was variable. Mortality fluctuated between 32.5% for isolate Ma 9211 to Ma 9101. Average time of mortality after 8 days was also variable with a minimum of 3.4 days for Ma 9101 and a maximum of 5.7 days for Ma 9107. Field trials in coffee plantations were carried out with isolates Ma 9108, Ma 9003 and Ma 9101, which in a laboratory pathogenicity tests all reached more than 84% mortality. A dose of 1.5x10<sup>8</sup> conidia/branch of 50 berries was evaluated with every isolate. Mortality varied from 31.1% for Ma 9108 to 43.1% for Ma 9101, however no significant differences were detected (P=0.05) between isolates. This study reports for the first time the effect of *M. anisopliae* on coffee berry borer populations under field conditions and the importance of isolate selection of entomopathogens before considering them in a biological control program.

## Introducción

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), es un insecto muy difícil de controlar, y para reducir sus poblaciones a niveles que no causen daño económico se debe recurrir a diferentes formas de control. El control biológico, mediante el uso de hongos entomopatógenos, es un complemento importante en un programa integrado de esta plaga (Bustillo et al. 1991).

El hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hyphomycetes) puede ser un factor importante para el control de la broca del café. Recientemente fue aislado de adultos de la broca provenientes de frutos colectados del suelo, en un cafetal de la localidad de Amalfi (Ant.), lo que constituye el primer registro sobre la broca en cafetales donde no se han realizado aspersiones del hongo<sup>2</sup>. *M. anisopliae* se ha registrado atacando una amplia variedad de insectos considerados como plagas de importancia comercial. Se ha encontrado en más de 200 especies de insectos en siete órdenes, de los cuales los coleópteros son los más comúnmente atacados (Veen 1968). El hongo se caracteriza por presentar conidióforos que forman capas de esporas, las cuales se producen en cadenas basipétalas compactas en columnas, de forma ovoide a cilíndrica y unicelulares (Bustillo 1987). Se encuentra en forma saprofítica en el suelo y como parásito en insectos (Barret y Hunter 1972). En Colombia su presencia se ha comprobado en 22 especies de insectos, especialmente en el grupo de las chisas (Coleoptera: Scarabaeidae) (Bustillo 1987; Hernández y Rodríguez 1992). *M. anisopliae* tiene una gran afinidad por insectos del suelo (Zimmermann 1992). Este hongo se ha producido en sustrato de arroz mediante un procedimiento artesanal en Brasil (Alves 1986), Venezuela (Probioagro 1991) y Costa Rica<sup>3</sup>, para el control de cercópodos plagas de la caña de azúcar.

El efecto de *M. anisopliae* sobre *H. hampei* sólo se ha estudiado bajo condiciones de laboratorio en Brasil (D'Antonio y Paula 1979; Lecuona et al. 1986); sin embargo, estos estudios no han tenido continuidad. Esta investigación tiene como finalidad evaluar la patogenicidad de 14 aislamientos de *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio y seleccionar

<sup>1</sup> Asistente de Investigación, Investigador Principal I e Investigador Científico I, respectivamente. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Disciplina de Entomología, Chinchiná, Colombia.

<sup>2</sup> Ruiz S., L. L. Comunicación personal. Disciplina Entomología, CENICAFE, Chinchiná

<sup>3</sup> Hernández Ramírez, J. 1983. Comunicación personal. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Subdirección de Investigaciones Agrícolas, Departamento de Entomología. San José de Costa Rica. Mayo de 1993.

los mejores para evaluarlos bajo condiciones de campo.

**Materiales y Métodos**

**Evaluaciones en Laboratorio**

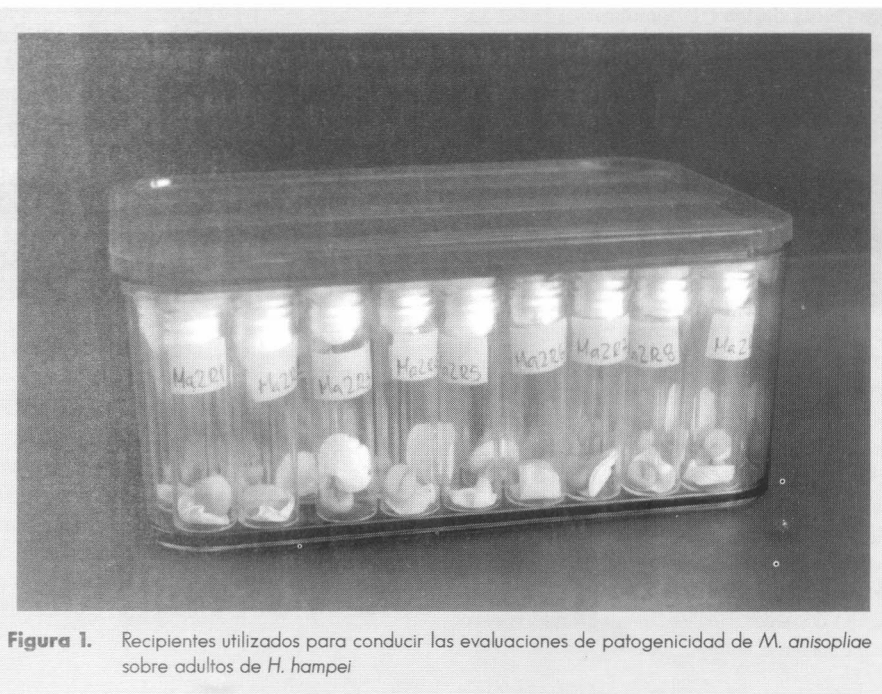
Los estudios de patogenicidad se llevaron a cabo durante 1992 en un laboratorio en Ansermanuevo (Valle) (T=25 ± 3°C; H.R.=90%). De un total de 52 aislamientos del hongo, obtenidos de diferentes partes del mundo y mantenidos bajo refrigeración en medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), 14 fueron escogidos (Tabla 1) teniendo en cuenta que fueran representativos de varios órdenes y especies de insectos, para evaluar su patogenicidad sobre adultos de la broca bajo condiciones de laboratorio. La concentración de conidias usada para las evaluaciones del hongo fue de 1 x 10<sup>7</sup> conidias/ml en suspensión acuosa + Tween-80 al 0,1%. Las brocas se obtuvieron de la Unidad de Cría de Parasitoides, procurando que fueran activas y recién emergidas.

El experimento se organizó en un diseño completamente aleatorio, con cuatro repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 10 adultos hembra de la broca. La unidad experimental consistió de un vial de vidrio de 1,5 cm de diámetro y 6 cm de alto, el cual contenía en su base una rodaja de papel filtro húmedo y como tapa una mota de algodón (Fig. 1). Los insectos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,5% durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó agua destilada estéril para remover el exceso del desinfectante, colocando los insectos sobre papel toalla estéril para la absorción del agua remanente. Una vez desinfectados, se sumirgieron durante dos minutos en la suspensión de conidias de *M. anisopliae*, y posteriormente fueron colocados en forma individual en cada uno de los viales. Los insectos se seleccionaron tomando los que mayor vigor presentaron después de la inmersión en las suspensiones conidiales. Al cabo de 24 horas se adicionó al recipiente un grano de café pergamino seco, con aproximadamente el 45% de humedad. Se llevaron registros diarios sobre mortalidad y desarrollo del hongo sobre los insectos durante 10 días. Las e-

**Tabla 1.** Origen de los aislamientos de *M. anisopliae* evaluados contra la broca del café. Chinchiná, 1992.

Código	Aislamiento	Insecto hospedante	Orden y Familia	País de origen
Ma 9101	298059*	<i>Scapanes australis</i>	<sup>1</sup> Col: Scarabaeidae	Papúa-Nueva Guinea
Ma 9003	-	Chisa	Col: Scarabaeidae	Colombia
Ma 9108	-	<i>Cargolia arana</i>	Lep: Geometridae	Colombia
Ma 9107	152222*	<i>Myllocerus discolor</i>	Col: Curculionidae	India
Ma 9105	98376*	<i>Heteronychus santahelenae</i>	Col: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9206	1815+	<i>Aeneolamia reducta</i>	Hom: Cercopidae	Colombia
Ma 9001	-	Chisa	Col: Scarabaeidae	Colombia
Ma 9004	-	Chisa	Col: Scarabaeidae	Colombia
Ma 9212	1813+	<i>Costelytra</i> sp.	Col: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9201	1784+	<i>Nemocestes incomptus</i>	Col: Curculionidae	Estados Unidos
Ma 9216	1770+	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Col: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9103	177416*	<i>Pemphigus trehernei</i>	Hom: Aphididae	Reino Unido
Ma 9207	1822+	<i>Mocis</i> sp.	Lep: Noctuidae	Colombia
Ma 9211	1824+	<i>Zulia colombiana</i>	Hom: Cercopidae	Colombia

<sup>1</sup> Col: Coleoptera; Hom: Homoptera; Lep: Lepidoptera.  
 - Aislamiento CENICAFE  
 \* Aislamientos provenientes del IMI (Instituto Micológico Internacional)  
 + Aislamientos provenientes del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical)



**Figura 1.** Recipientes utilizados para conducir las evaluaciones de patogenicidad de *M. anisopliae* sobre adultos de *H. hampei*

valuaciones se hicieron con la ayuda de un estereo-microscopio, para así corroborar la mortalidad causada por *M. anisopliae* al observar sus estructuras sobre el cuerpo de los insectos.

**Evaluaciones en Campo**

Los ensayos de campo desarrollados en la Subestación Experimental «Rafael Escobar», en el municipio de Supía (Cal-

das), caracterizada por tener 22°C de temperatura promedio y 78% de humedad relativa, 1.320 msnm y una precipitación anual de 1.703 mm. Se utilizó un lote comercial de café variedad «Colombia», con aproximadamente seis años de edad, sembrado a 1,50 x 1,80 m. Los aislamientos utilizados en el campo fueron los que presentaron porcentajes de mortalidad mayores al 84% en la prueba de laboratorio. El hongo *M. anisopliae* para las pruebas

de campo se obtuvo a partir de brocas infectadas en laboratorio, que se aisló en SDA, para luego cultivarlo en un medio en base de arroz. Al cabo de 15 días, se procedió a suspender las conidias en 10 ml de un aceite emulsificante (Carrier), adicionado en forma gradual 500 ml de agua destilada estéril, para posteriormente hacer un tamizado y obtener así la suspensión madre de conidias, la cual mediante diluciones sucesivas se ajustó a la concentración necesaria para realizar las aspersiones. La concentración utilizada para los tres aislamientos seleccionados fue de  $1 \times 10^7$  conidias/ml, asperjando 15 ml/rama de 50 frutos para una dosis de  $1,5 \times 10^8$  conidias/rama.

El experimento se organizó bajo un diseño completamente aleatorio conformado por cuatro tratamientos (tres aislamientos del hongo y un testigo) y 10 repeticiones. La parcela experimental fue una rama del tercio medio del árbol, a la cual se le dejaron 50 frutos de una edad aproximada de 120 días.

El hongo se asperjó con una bomba Calimax 10 experimental a 40 lb/pulg<sup>2</sup> y una descarga de 200 cm<sup>3</sup>/min. Las aspersiones se hicieron 24 horas antes de la infestación. Las ramas se infestaron con brocas adultas extraídas de frutos de «guayaba», usando una proporción de dos brocas por fruto, dentro de una «manga entomológica» para evitar el escape de los insectos. Los árboles que sirvieron para las parcelas se aislaron, usando como borde cuatro surcos en todas las direcciones.

Las evaluaciones se realizaron ocho días después de la aspersión, cortando y transportando las ramas con la manga entomológica al laboratorio para registrar la mortalidad de la broca causada por *M. anisopliae*. Se evaluaron tanto los adultos encontrados en el interior como en el exterior de los frutos. La confirmación de la mortalidad por el hongo se verificó al observar la esporulación del hongo en una cámara húmeda.

## Resultados y Discusión

Todos los aislamientos evaluados bajo condiciones de laboratorio fueron patogénicos a *H. hampei*. Los niveles de mortalidad variaron desde 3,5% hasta 95%; cua-

tro aislamientos causaron niveles de mortalidad superiores al 84%. El tiempo en el cual se produjo la muerte a los insectos fue relativamente corto, variando entre 3,4 y 5,7 días (Tabla 2). Esta mortalidad muestra la importancia de establecer una selección de aislamientos antes de iniciar un programa de control biológico con un entomopatógeno no evaluado.

El aislamiento denominado Ma 9216, obtenido de *O. rhinoceros*, identificado

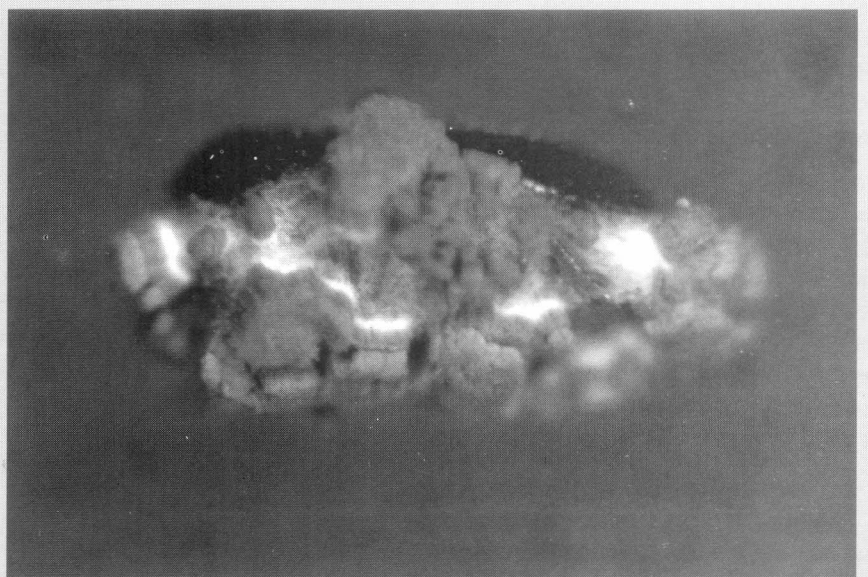
como *M. anisopliae* var. *major* y el Ma 9206 obtenido de *A. reducta* e identificado como *M. anisopliae* var. *minor* mostraron un desarrollo más lento y poca esporulación sobre las brocas muertas, a diferencia del resto de los aislamientos, cuya esporulación fue abundante (Fig. 2).

A pesar de que existen registros sobre la alta patogenicidad de aislamientos de *M. anisopliae* sobre un insecto en particular (Fargues y Robert 1976, 1978; Fargues y

**Tabla 2.** Mortalidad de *Hypothenemus hampei* y tiempo promedio de mortalidad por *Metarhizium anisopliae* en laboratorio (T=25°C; H.R.=90%). Chinchiná, 1992.

Código del aislamiento	Mortalidad			
	Porcentaje		Días	
	$\bar{X}$	$\pm$ D.E.	$\bar{X}$	$\pm$ D.E.
Ma 9101	95,0	1,29 a*	3,4	1,13
Ma 9003	90,6	1,29 a	3,5	0,82
Ma 9108	84,1	2,06 a	5,2	1,13
Ma 9107	85,0	1,20 bcd	5,7	1,30
Ma 9105	75,0	0,95 e	3,7	0,65
Ma 9206	75,0	1,25 bce	1,25	1,00
Ma 9001	57,7	2,50 b	5,2	1,62
Ma 9004	55,8	2,30 b	4,5	0,95
Ma 9212	55,0	3,00 bc	4,6	1,42
Ma 9201	52,5	1,70 bc	4,9	1,44
Ma 9216	45,0	1,20 bc	4,8	1,80
Ma 9103	42,5	0,50 bc	5,2	2,00
Ma 9207	37,5	1,50 bc	5,1	0,99
Ma 9211	32,5	1,50 bc	4,6	1,80

\* Promedios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas al nivel de P=0,05 según la prueba de Tukey.



**Figura 2.** Aspecto de un adulto de la broca del café infectado por *M. anisopliae*.



Remaudiere 1977), los resultados de este estudio indican que no son tan específicos, aunque su virulencia hacia la broca fue variable. Este efecto es de interés en el ecosistema cafetero, ya que podría también jugar un papel importante en el control de otras plagas del suelo como las chisas.

En la prueba de campo se evaluaron los aislamientos Ma 9101, Ma 9003 y Ma 9108, con los que se obtuvieron mortalidades superiores al 84% en la prueba de patogenicidad en el laboratorio. La mortalidad causada sobre la broca del café varió entre 31,8 y 43,1%, sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0,05$ ) (Tabla 3). Los aislamientos guardaron el mismo orden de eficacia que el obtenido en la prueba de laboratorio, aunque con niveles menores, lo cual se puede explicar por el efecto adverso de condiciones abióticas sobre el hongo en los cafetales. La infección de *M. anisopliae* fue evidente tanto en los adultos de broca que alcanzaron a penetrar el fruto, como en las brocas que se encontraron por fuera, indicando lo anterior que su efecto es bastante rápido, pudiéndose lograr, con aspersiones oportunas, que alguna parte de la población de la broca expuesta al hongo no cause daño al fruto.

Los insectos infectados por *M. anisopliae* presentaron un crecimiento blanco compacto, el cual se puede confundir con el presentado por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes); sin embargo, éste se torna de color verdoso al momento de la esporulación.

Los anteriores resultados indican que *M. anisopliae* es un agente de control biológico de *H. hampei*, que se puede introducir en condiciones de campo para que contribuya a reducir sus poblaciones en un programa de manejo integrado. Es posible que dadas las características de sobrevivencia de este hongo en el suelo, se pueda también utilizar para controlar

**Tabla 3.** Mortalidad promedio de adultos de la broca del café, *H. hampei*, causada por *M. anisopliae* bajo condiciones de campo, ocho días después de la aspersión. Subestación Experimental «Rafael Escobar». Supía (Caldas), 1992.

Aislamientos	No. total de brocas	Mortalidad promedio (%)
Ma 9101	459	43,1 a*
Ma 9003	620	38,2 a
Ma 9108	460	31,1 a
Testigo	701	0,0 b

\* Promedios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas al nivel de  $P=0,05$ , según la prueba de Tukey.

la broca que emerge de los frutos caídos que se encuentran en el suelo.

### Agradecimientos

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y al Instituto Micológico Británico (IMI), por el suministro de algunos aislamientos de *M. anisopliae*.

### Bibliografía

ALVES, S. B. 1986. Fungos entomopatogenos. In: S. B. Alves. (ed.). Controle microbiano de insetos. Editora Manole, Sao Paulo. 407p.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th ed. Bruges Publishing. Co., Minneapolis. 241p.

BUSTILLO, A. E. 1987. Enfermedades en insectos y posibilidades de uso en programas de manejo integrado de plagas en Colombia. ICA, Medellín. 75p.

D'ANTONIO, A. M.; PAULA, V De. 1979. Estudos preliminares de eficiencia de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle á broca do café (*Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867) em condicoes de laboratorio. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Caffeeiras, 7°, Araxa, M. G. (Brasil), 1979. Resumos. Instituto Brasileiro de Café. Grupo Executivo de Racionalizacao de Cafeicultura, Rio de Janeiro. p. 301.

FARGUES, J.; ROBERT, H. 1976. Spécificité des champignons pathogénes imparfaits (Hyphomycétes) pour les larves de coléoptéres (Scarabaeidae et Crysomelidae). Entomophaga (Francia) v. 21 no. 3, p. 313-323.

FARGUES, J.; ROBERT, H. 1978. Adaptabilité deux pathotypes de *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sor. (fungi imperfecti Hyphomycetes) par culture sur milieu artificiel et par passage sur insecte-hotedorigine. Academie dei Sciences. Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances. Series D: Sciences Naturelles (Francia) v. 287, p. 165-167.

—————; REMAUDIERE, J. 1977. Consideration on the specificity of entomopathogenic fungi. Mycopathologia (Holanda) v. 62 no. 1, p. 31-37.

LECUONA, R. E.; FERNANDEZ, P. M.; ALVES, S. B.; BLEICHER, E. 1986. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., á broca do- café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil (Brasil) v. 15, p. 21-27.

HERNANDEZ, J. A.; RODRIGUEZ, R. L. 1992. Evaluación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en el control de chisas (Coleoptera: Sacarabaeidae). Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. p. 4-7. (Tesis de Ing. Agrónomo)

PROBIAGRO. 1991, COBICAN-1. Insecticida biológico a base del hongo *Metarhizium anisopliae*, para el control de la candelilla (*Aeneola varia*). Boletín Informativo no. 1, p. 6.

VEEN, K. H. 1968. Recherches sur la maladie, due á *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pélerin. Med. Landbouwhogeschool, Wageningen. 68-5, 77S.

ZIMMERMANN, G. 1992. *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus. In: Biological Crop Protection Symposium, 24°. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer (Alemania) v. 45 no. 63, p. 113-128.