

Viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* en mezcla con agroquímicos

Viability of the fungus *Metarhizium anisopliae* in mixture with agrochemicals

Maria Elena González D.¹
Blanca Fabiola Valbuena P.¹
Armando Rivera M.²
Alex Enrique Bustillo P.²
Bernardo Chaves³

Resumen

En un intento para utilizar el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* como parte de un programa de manejo integrado contra la broca del café, *Hypothenemus hampei*, la dosis comercial (DC) y la mitad de la dosis comercial (1/2DC) de las siguientes sustancias se probaron para determinar su efecto sobre el hongo. Insecticidas: endosulfan, clorpirifos, pirimifos metil, fenitrothion y nim; fungicidas: benomyl, cyproconazol, hexaconazol, triadimefon y oxiclóruo de cobre; herbicidas: oxifluorfen, paraquat, glifosato y glifosato + terbutilazina; aditivos de aspersión: Agral, Agrotin, Mezclafix y Mixel; fertilizante foliar: Tottal. La inhibición, expresada en porcentaje, a las 24 horas después de la germinación para la DC y la 1/2DC fue, respectivamente, para los insecticidas: pirimifos metil (98,16 y 57,43%), clorpirifos (97,42 y 58,85%), fenitrothion (100 y 100%) y endosulfan (96,94 y 69,75%); para los fungicidas: cyproconazol (98,79 y 96,37%), hexaconazol (58,08 y 36,56%) y triadimefon (100 y 95,11%); para los herbicidas: oxifluorfen (100 y 100%) y paraquat (99,06 y 98,80%); para los aditivos de aspersión: Mixel (43,06 y 28,93%). Las otras sustancias probadas tienen un menor efecto (>30%). El efecto

fungistático de los plaguicidas sobre el hongo disminuye a las 48 horas después de la germinación.

Palabras claves: *Metarhizium anisopliae*, Hongos entomopatógenos, Plaguicidas, Viabilidad, Insecticidas, Fungicidas, Herbicidas.

Summary

In attempt to use the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* as part of an integrated pest management program against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, the commercial (CD) and half commercial doses (1/2CD) of the following substances were tested to determine their effect on the fungus. Insecticides: endosulfan, chlorpyrifos, pirimifos methyl, fenitrothion, isazofos and neem; fungicides: benomyl, cyproconazole, hexaconazole, triadimefon and copper oxychloride; herbicides: oxyfluorfen, paraquat, glyphosate and glyphosate + terbutylazine; spray additives: Agral, Agrotin, Mezclafix and Mixel; foliar fertilizer: Tottal. The inhibition measured in percentage at 24 h after germination for the CD and 1/2CD was respectively, for the insecticides: pirimifos methyl (98.16 and 57.43%), chlorpyrifos (97.42 and 58.95%), fenitrothion (100 and 100%) and endosulfan (96.94 and 69.75%); for fungicides: cyproconazole (98.79 and 96.37%), hexaconazole (58.08 and 36.56%) and triadimefon (100 and 95.11%); for herbicides: oxyfluorfen (100 and 100%) and paraquat (99.06 and 98.80%); for spray additives: Mixel (43.06 y 28.93%). The

other substances tested had less inhibitory effect (<30%). The fungistatic effect of the pesticides on the fungus decreased 48 h after germination.

Introducción

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), es considerada la plaga más importante del cultivo del café por atacar el fruto y causar pérdidas de peso, depreciación del grano y pérdida de la calidad de la bebida por presencia de impurezas en los granos brocados (Bustillo et al. 1993). Cenicafé, para el control de esta plaga, está utilizando el manejo integrado, donde la compatibilidad de los diferentes componentes es importante para optimizar el control de la broca.

Algunos investigadores han probado el efecto de diversos agroquímicos sobre el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hyphomycetes), por ejemplo, benomyl inhibe el crecimiento del hongo (Vaino y Hokkanen 1990; Mohamed et al. 1987; Samuels et al. 1989) en medio de cultivo sólido, en dosis de 0,1 de la dosis comercial (Moorhouse et al. 1992).

Clorpirifos fue el más tóxico de los productos organofosforados evaluados sobre el crecimiento y esporulación del hongo en todas las concentraciones probadas (Mohamed et al. 1987; Moorhouse et al. 1992), mientras que a concentraciones de 0,01, 0,001 y 0,0001% de ingrediente activo, *M. anisopliae* fue tolerante a éste (Li y Holdom 1994). El endosulfan causó inhibición parcial o completa del crecimiento y la esporulación del hongo en concentraciones equivalentes a las utilizadas en campo, mientras que el fenitrothion fue inocuo al hongo en experimentos y concentraciones similares (Catalá y Gabriel 1970).

Castiñeiras et al. (1991), al evaluar en el laboratorio la compatibilidad de *M. anisopliae* con los biocidas ametrina, benomyl, carbofuran, KCl, dalapon, diquat,

1 Estudiantes de Bacteriología. Universidad Católica de Manizales. Manizales, Colombia.

2 Asistente de Investigación e Investigador Principal I, respectivamente. Disciplina Entomología. Cenicafé. Chinchiná (Caldas), Colombia.

3 Investigador Científico II. Disciplina Biometría. Cenicafé. Chinchiná (Caldas), Colombia.

diuron, pirimifos metil, NPK, fensulfotion, nitrato de amonio, paraquat, propiconazol, simazina y zineb, usados en el cultivo del banano, encontraron que la germinación conidial y la virulencia del hongo no fueron afectadas por el pirimifos metil a la concentración de 32 ppm.

Samuels et al. (1989), al evaluar la compatibilidad de varios aislamientos de *M. anisopliae* con el herbicida paraquat, encontraron que todos los aislamientos fueron altamente compatibles con el herbicida, y resultados similares fueron encontrados por Vaino y Hakkanen (1990) y por Li y Holdom (1994).

Atehortúa y Londoño (1993), al evaluar el efecto del insecticida clorpirifos y del herbicida glifosato en las concentraciones de 50, 5 y 0,5 ppm sobre *M. anisopliae*, encontraron que clorpirifos presenta efecto inhibitorio en el crecimiento a los nueve días de inoculado en todas las concentraciones; sin embargo, dicho efecto desaparece a los 18 días, tiempo en el cual sólo 50 ppm mantienen su efecto. Los días de esporulación fluctuaron entre seis y 18, siendo mayor el tiempo para el clorpirifos.

Para la implementación adecuada del manejo integrado de la broca (MIB) es necesario determinar la compatibilidad que pudiera existir entre sus componentes, por tanto, se desarrolló este experimento para determinar que tan viable es el hongo *M. anisopliae* en mezcla con los diferentes agroquímicos utilizados comúnmente en la zona cafetera colombiana.

Materiales y Métodos

En este estudio se utilizaron esporas del hongo *M. anisopliae* Ma 9236, perteneciente a la micoteca del Laboratorio de Patología de Insectos de Cenicafé. Las esporas se produjeron en sustrato de arroz cocido, con un tiempo de inoculación de 25 días a una temperatura promedio de 25 ± 2°C. Para el ensayo de la mezcla entre los agroquímicos y el entomopatógeno, en cajas de petri se preparó el medio

de cultivo para hongos Agar-Sabouraud-Dextrosa (SDA) acidificado con ácido láctico al 0,37%

Se examinó la compatibilidad en mezcla de *M. anisopliae*, en una concentración de 1x10⁸ esporas/ml, con la dosis comercial (DC), con base en las dosis recomendadas por los fabricantes, y la mitad de la dosis comercial (1/2DC) de las formulaciones comerciales de los agroquímicos que aparecen en las Tablas 1 y 2.

Las esporas para el ensayo se suspendieron en una solución acuosa con aceite agrícola Carrier al 0,1%. La viabilidad de las esporas se determinó por la germinación del 100% a las 48 horas en SDA, es decir, cuando todas las esporas presentaban el tubo germinal más largo que el diámetro promedio de la espóra.

En matraces estériles de 250 ml se depositaron 100 ml de la suspensión del hongo en agua destilada estéril (ADE), a los

Tabla 1. Insecticidas y fungicidas evaluados en mezcla con el hongo *M. anisopliae*.

Nombre genérico	Nombre comercial	Concentración y formulación	i.a. en ppm DC	1/2 DC
endosulfan	Thiodan	35% CE	2.457	1.229
clorpirifos	Lorsban	48% CE	2.880	1.440
pirimifos metil	Actellic	50% CE	2.000	1.000
fenitrothion	Sumithion	54,3% CE	3.258	1.629
isazofos	Miral	50% SM	5.000	2.500
Nim	Semilla de Nim	5% EA	4.000	2.000
benomyl	Benlate	50% PM	1.500	750
cyproconazol	Alto	10% SL	80	40
hexaconazol	Anvil	5% SC	200	100
triadimefon	Bayleton	25% CE	1.000	500
Oxicloruro de cobre	Oxicloruro de cobre	50% PM	6.000	3.000

i.a. Ingrediente activo
 DC Dosis comercial
 1/2 DC mitad de la dosis comercial
 CE Concentrado emulsionable
 SC Solución concentrada
 SM Solución microencapsulada
 EA Extracto acuoso
 PM Polvo mojable
 SL Solución líquida

Tabla 2. Herbicidas, aditivos de aspersión y fertilizante foliar evaluados en mezcla con el hongo *M. anisopliae*.

Nombre genérico	Nombre comercial	Concentración y formulación	i.a. en ppm DC	1/2 DC
endosulfan	Thiodan	35% CE	2.457	1.229
oxifluorfen	Goal	2% CE	3.360,0	1.680,0
paraquat	Gramoxone	20% SL	1.200,0	600,0
glifosato	Roundup	36% SL	3.590,0	1.795,0
terbutilazina-glifosato	Folar	430% SC	3.996,0	1.998,0
			1.080,0	540,0
alcohol alkil aril poliester	Agral	90% SL	1.800,0	900,0
-----	Agrotin	7945% SL	635,6	317,8
hidrocarburos parafínicos	Mezclafix	83% SL	4.980,0	2.490,0
alcohol alkil aril poliester	Mixel	84,2% SL	1.684,0	842,0
fertilizante foliar	Tottal	SL	30%	15%

i.a. Ingrediente activo
 DC Dosis comercial
 1/2 DC mitad de la dosis comercial
 CE Concentrado emulsionable
 SL Solución líquida

cuales se les adicionó la cantidad adecuada de los agroquímicos en cada una de las concentraciones citadas anteriormente, y se mantuvieron en agitación a 70 rpm, para mantener homogénea la mezcla, y la germinación conidial se evaluó después de estar en mezcla durante una hora. Transcurrido este tiempo se inocularon 10 cajas de petri que contenían SDA, con diez alícuotas de 5 ml para cada una de las diferentes concentraciones y tratamientos evaluados, lo mismo se hizo para el testigo. Todo el experimento se realizó a una temperatura promedio de 25°C.

Para evaluar la compatibilidad de los tratamientos con el hongo, se midió la germinación de esporas a las 24 y 48 horas (Rivera et al. 1992). El experimento se organizó en un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial distribuido así: para los insecticidas de 6 x 2 + testigo, los fungicidas de 5 x 2 + testigo, los herbicidas de 4 x 2 + testigo, los aditivos de aspersión de 4 x 2 + testigo y el fertilizante foliar de 1 x 2 + testigo; con el matraz como unidad experimental, y con cuatro repeticiones por tratamiento.

Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran los resultados de germinación de la mezcla de *M. anisopliae* con insecticidas. Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas con el testigo y entre sí, según la Prueba de Tukey al 5%. Se observa que isazofos presentó un leve efecto inhibitorio sobre la germinación a las 24 horas (13,63 y 0% para la DC y la 1/2DC, respectivamente); el extracto acuoso de semilla del nim exhibió un efecto moderado (30,52 y 29,03%); mientras que los que presentaron una alta inhibición fueron clorpirifos (97,42 y 58,85%), pirimifos metil (98,16 y 57,43%) y endosulfan (96,94 y 69,75%); la inhibición total la causó fenitrotion a las 24 horas en las concentraciones evaluadas. A las 48 horas, todos los insecticidas probados, excepto fenitrotion (64,85 y 34,87% de inhibición) y endosulfan (27,52 y 12,63% de inhibición), permiten la germinación

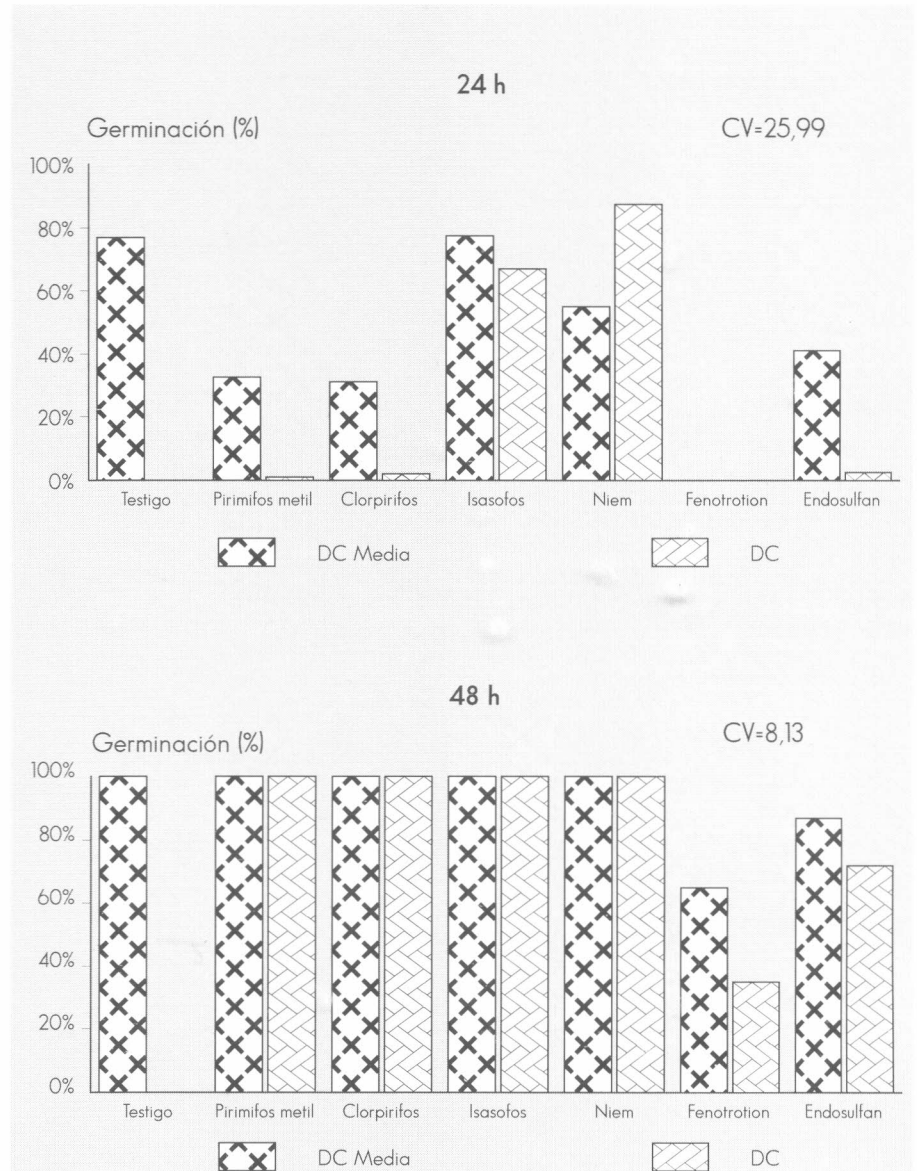


Figura 1. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con insecticidas.

en un 100% en la DC y 1/2DC, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los hallados por Samuels et al. (1989) que muestran que diferentes aislamientos de *M. anisopliae* son viables en presencia de dosis bajas de clorpirifos, y con los de Castiñeiras et al. (1991), quienes encontraron que pirimifos metil no afecta la germinación conidial en concentraciones bajas.

Los fungicidas evaluados presentaron efectos variables sobre *M. anisopliae*.

Todos presentaron diferencias significativas con el testigo y entre sí (Fig.2); triadimefon fue el más tóxico en la DC e inhibe la germinación en la 1/2DC (95,11%), seguido por cyproconazol tanto a las 24 horas (98,79 y 96,37%) como a las 48 horas (46,86 y 34,28%). Oxiclo- ruro de cobre (10,46 y 10,99% a las 24 h) y benomyl (24,46 y 5,33% a las 24 h) fueron menos inhibitorios, mientras que hexaconazol lo fue más moderadamente (58,08 y 36,56% a las 24 h). Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros investigadores (Mohamed et al.

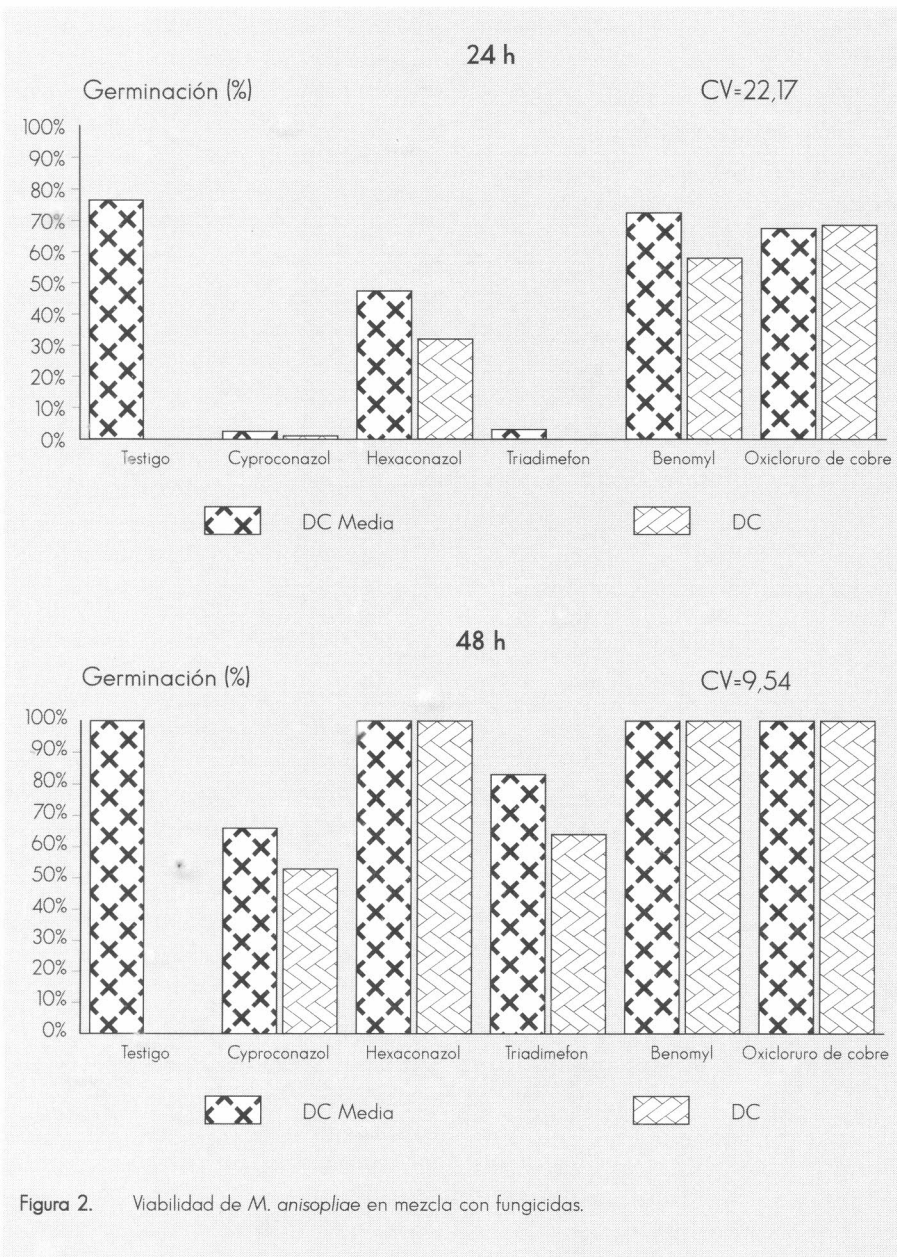


Figura 2. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con fungicidas.

1987; Samuels et al. 1989; Moorhouse et al. 1992), quienes hallaron que benomyl produce inhibición en el crecimiento micelial y en la esporulación de diferentes aislamientos de *M. anisopliae*.

Al hacer el análisis estadístico de la mezcla del hongo con herbicidas se encontraron diferencias significativas con el testigo y entre sí, observándose que oxifluorfen inhibió completamente el entomopatógeno en todos los tratamientos; paraquat presentó un efecto inhibitorio sobre la germinación a las 24 horas (99,06 y 98,80%), pero éste disminuyó a

las 48 horas (24,60 y 19,31%); el glifosato fue compatible a las 24 horas (14,57 y 17,49%) y a las 48 horas el hongo presentó el 100% de germinación en presencia de este herbicida (Fig. 3), siendo glifosato + terbutilazina y glifosato los productos que menor inhibición presentaron. Estos resultados son semejantes a los encontrados por Samuels et al. (1989) que muestran la compatibilidad de paraquat con diferentes aislamientos de *M. anisopliae*, y los de Atehortúa y Londoño (1992) que señalan que glifosato no presentó efecto inhibitorio sobre este hongo.

Los aditivos de aspersión y el fertilizante foliar ejercieron el menor efecto inhibitorio sobre la germinación en las concentraciones probadas. El hidrocarburo parafínico no presentó diferencias significativas frente al testigo; los productos alcohol alquil aril polieter Agral (5,58 y 13,12%) y Mixel (43,06 y 28,93%) y el producto Agrotin (18,38 y 18,31%) tienen un efecto moderado sobre el hongo a las 24 horas (Fig. 4 y 5). Los aditivos y el fertilizante foliar, al igual que el testigo a las 48 horas, permiten la germinación en un 100%.

El efecto fungistático por los agroquímicos ya había sido señalado por otros autores en laboratorio (Fargues 1972; Rivera et al. 1992), incluso con experimentos de temperatura sobre la viabilidad de *M. flavoviridae* Grams y Rozsypal, los autores explican el retardo de la germinación debido a un daño de la conidia o al desarrollo de un mecanismo protector llamado choque protéico por calor (Mc Clatchie et al. 1994), y Griffin (1994) señala que la dormancia puede ser impuesta por factores exógenos y que como los clorados inhiben bastante el transporte del nitrato a través de la pared micelial, se piensa que actúan como análogos del nitrato, pero no inhiben la nitratorreductasa (Griffin 1994). Parece que la mezcla, cuando se deposita en el agar, sufre difusión y cambia sus propiedades inhibitorias a través del tiempo. En consecuencia, esta fungistasis puede afectar directamente el inóculo efectivo y afectar la epizootia deseada. Es necesario adelantar un estudio en el campo utilizando dichas mezclas para el control simultáneo de la broca y de otras plagas del cultivo.

Bibliografía

ATEHORTUA C., M. M; LONDOÑO Z., M. E. 1993. Efecto de algunos agroquímicos en el crecimiento y esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae*. En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20º, Cali (Colombia) 13 - 16 de Julio de 1993. Resúmenes. Cali, Socolen. p.21.

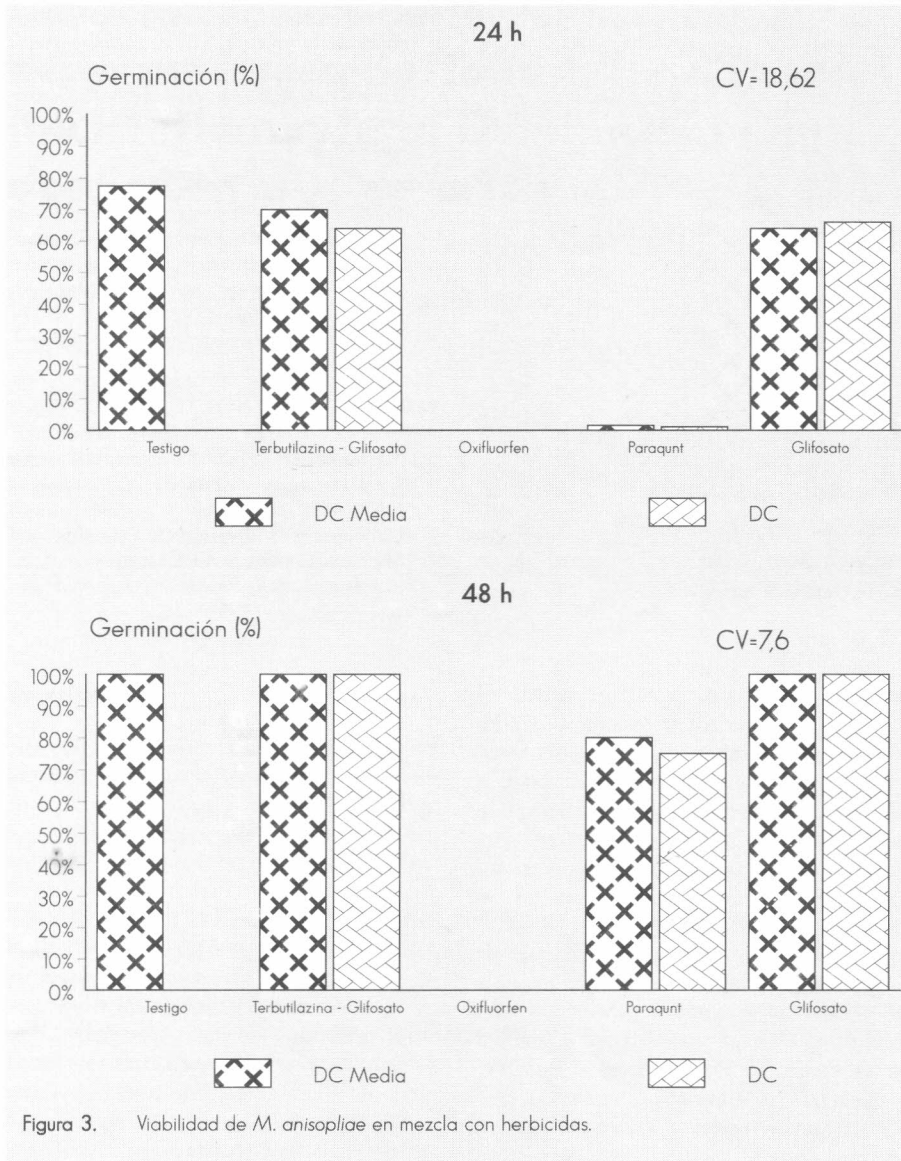


Figura 3. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con herbicidas.

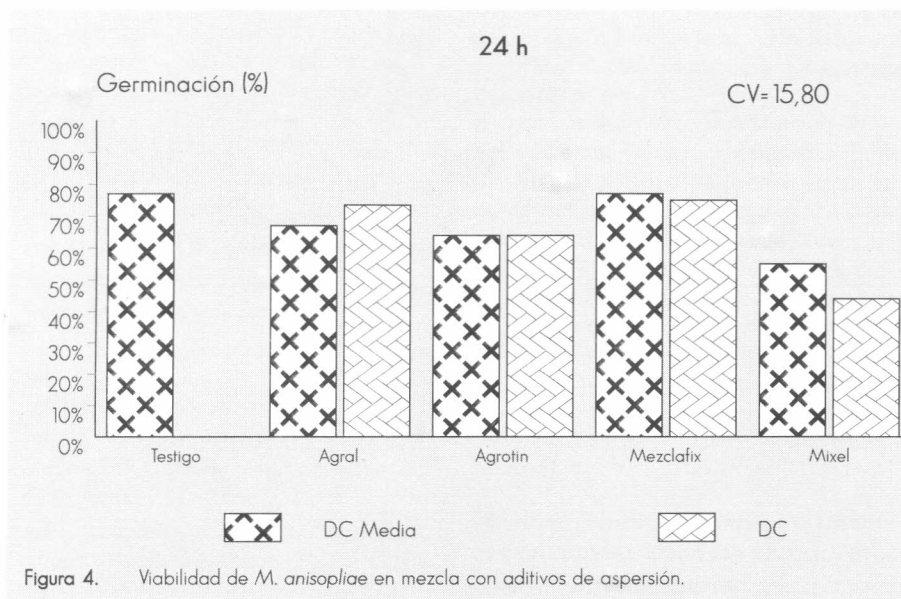


Figura 4. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con aditivos de aspersión.

BUSTILLO, A. E.; VILLALBA G., D.A.; CHAVES C., B. 1993. Consideraciones sobre el uso de insecticidas químicos en la zona cafetera en el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. 20º, Cali (Colombia), 13 - 16 de Julio de 1993. Memorias. Cali, Socolen. p.152 - 158.

CADATAL, T. D.; GABRIEL, B. P. 1970. Effect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. Philippine Entomologist (Filipinas) v.1 no.5, p.379 - 395.

CASTIÑEIRAS, A.; CALDERON, A.; LOPEZ, M. 1991. Efecto de los biocidas y fertilizantes empleados en el cultivo del plátano en Cuba sobre los hongos entomopatógenos. I. *Metarhizium anisopliae*. Protección de Plantas (Cuba) v.1 no.1, p.33 - 42.

FARGUES J. 1992. Traitement mixte des larves de doryphore *Leptinotarsa decemlineata* Say par des spores du champignon entomopathogene *Beauveria bassina* (Bals.) Vuill. et des des es réduites d'insecticide. Phytiatric-Phytopharmacie (Francia). v.21, p.183-193.

GRIFFIN, D. H. 1994.a Spore development. In: Fungal Physiology. Wiley-Liss, New York. p. 337-374.

_____. 1994 b. Nutrient acquisition: Digestion and transport. In: Fungal Physiology. Wiley-Liss, New York. p.158 - 194.

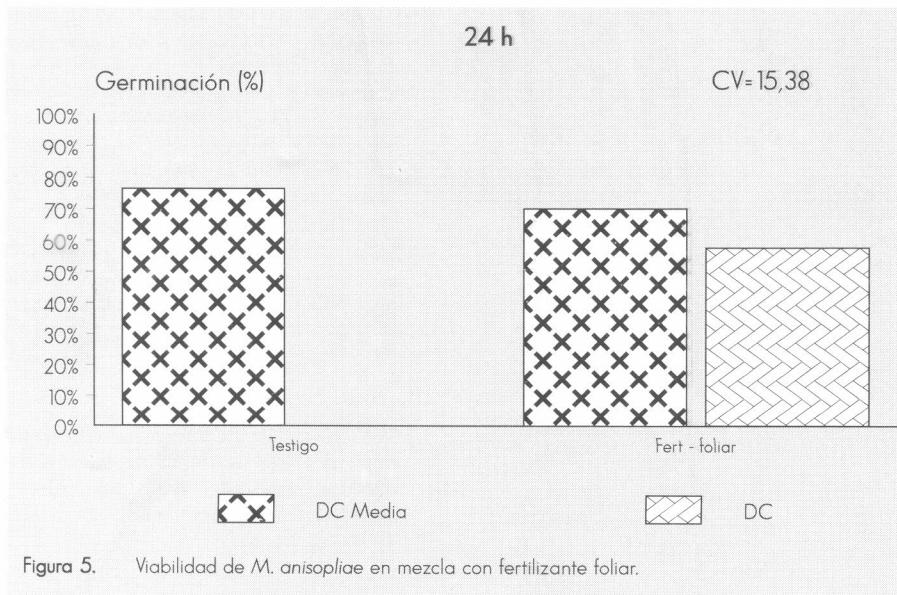
LI, D. P.; HOLDOM, D. G.; 1994. Effects of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v.63 no.2, p.209 - 211.

McCLATCHIE, G. V.; MOORE, D.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C. 1994. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. Mycopathology Research (Reino Unido) v. 99 no. 7, p. 749 - 756.

MOHAMED., A. K. A.; PRATT, J. P.; NELSON, F. R. S. 1987. Compability of *Metarhizium anisopliae* with chemical pesticides. Mycopathology (Estados Unidos) v.99 no.2, p. 99 - 105.

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 vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*. Control Science and Technology v.2 no.1, p. 49 - 58.

RIVERA M. A.; BUSTILLO P., A.E.; MARIN M., P. 1992. Compatibilidad en mezcla de dos aislamientos de *Beauveria bassina* (Balsamo)



Vuillemin con insecticidas usados en el control químico de la broca del café, *Hyphotenemus hampei* (Ferrari). En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20^o, Cali (Colombia), 13 - 16 de julio de 1993. Resúmenes. Cali, Socolen, p. 105.

SAMUELS, K. D. Z.; PINNOCK., D. E.; ALL-SOPP, P. G. 1989. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a biological control agent of *Inopus rubriceps* (Macquat) (Diptera: Stratiomyidae). Journal of the Australian Entomological Society (Australia) v. 28 no.1, p. 69 - 74.

VAINO, A.; HOKKANEN, H. 1990. Side-effects of pesticides on the entomophagous nematode *Steinernema feltiae* and the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in the laboratory. In: International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, S. Adelaide (Australia), 20 - 24 August, 1990. Proceedings and Abstracts.