

VIABILIDAD DEL HONGO *Metarhizium anisopliae* EN MEZCLA CON PRODUCTOS AGROQUÍMICOS

María Elena González-D*; Blanca Fabiola Valbuena-P*; Armando Rivera-M.**;
Alex Enrique Bustillo-P**; Bernardo Chaves-C.***

RESUMEN

GONZALEZ D., M.E.; VALBUENA P., B.F.; RIVERA M., ARMANDO; BUSTILLO P., A.E.; CHAVES C., B. Viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* en mezcla con agroquímicos. *Cenicafé (Colombia)* 46(4): 227-234. 1995.

En un intento por utilizar el hongo *Metarhizium anisopliae* como parte de un programa de manejo integrado de plagas contra la broca del café *Hypothenemus hampei*, la dosis comercial (DC) y la mitad de la dosis comerciales (1/2DC) de las siguientes sustancias fueron probadas para determinar su efecto sobre el hongo. Insecticidas: endosulfan, clorpirifos, pirimifos metil, fenitrothion y nim; fungicidas: benomyl, cyproconazol, hexaconazol, triadimefón y oxiclóruro 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 (98,2 y 57,4%), clorpirifos (97,4 y 58,8%), fenitrothion (100 y 100%) y endosulfan (96,9 y 69,7%); para los fungicidas cyproconazol (98,8 y 96,4%), hexaconazol (58,1 y 36,6%) y triadimefón (100 y 95,1%); para los herbicidas: ioxifluorfen (100 y 100%) y paraquat (99,1 y 98,8%); para los aditivos de aspersión: Mixel (43,1 y 28,9%). Las otras sustancias probadas tienen un menor efecto (<30%). El efecto fungistático de los plaguicidas sobre el hongo disminuye a las 48 h después de la germinación.

Palabras claves: Compatibilidad, *Hypothenemus hampei*, inhibición, tanque de aspersión.

ABSTRACT

In an 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 dose (DC) and half commercial dose (1/2DC) of the following substances were tested to determine their effect on the fungus. Insecticides: endosulfan, clorpirifos, pirimifos methyl, fenitrothion isazofos and neem; fungicides: benomyl, cyproconazole, hexaconazole, triadimefón and copper oxychloride; herbicides: oxyfluorfen, paraquat, glyphosate and glyphosate + terbutylazine; spray additives: Agral, Agrotin, Mezclafix and Mixel; foliar fertilizer: Tottal. The percentage inhibition measured at 24 hours after the germination for the DC and 1/2DC was respectively, for the insecticides: pirimifos methyl (98,2 and 57,4%), clorpirifos (97,4 and 58,8%), fenitrothion (100 and 100%) and endosulfan (96,9 and 69,7%); for fungicides cyproconazole (98,8 and 96,4%), hexaconazole (58,1 and 36,6%) and triadimefón (100 and 95,1%); for herbicides: oxyfluorfen (100 and 100%) and paraquat (99,7 and 98,8%); for spray additives: Mixel (43,1 and 28,9%). The other substances tested had less inhibitory effect (<30%). The fungistatic effect of the pesticides on the fungus decreased 48 h after germination.

Keywords: Compatibility, *Hypothenemus hampei*, inhibition, spray tank.

-
- * Estudiante de Bacteriología. Universidad Católica de Manizales.
** Asistente de Investigación e Investigador Principal I. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.
*** Investigador Científico II. Biometría. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

La broca es considerada la plaga más importante del cultivo del café, ya que ataca el fruto causando disminución del peso, depreciación del grano y pérdida de la calidad de la bebida por presencia de impurezas en los granos (2). CENICAFÉ para el control de esta plaga está recomendando el Manejo Integrado, el cual exige compatibilidad de los diferentes componentes, con el objeto de optimizar el efecto de las distintas prácticas sobre la broca.

Algunos investigadores han probado que diversos agroquímicos actúan sobre *Metarhizium anisopliae*; por ejemplo, benomyl inhibe su crecimiento (10, 13, 15) en medio de cultivo sólido, en 0,1 de la dosis comercial (11).

Clorpirifos fue el más tóxico de los agroquímicos organofosforados evaluados sobre el crecimiento y esporulación en todas las concentraciones probadas (10, 11), mientras que con concentraciones de 0,01, 0,001 y 0,0001 de ingrediente activo, *M. anisopliae* presentó tolerancia (8). Endosulfan causó parcial o completa inhibición del crecimiento y la esporulación del hongo en concentraciones equivalentes utilizadas en campo, mientras el fenitrothion fue inocuo al hongo en experimentos y concentraciones similares (3).

Castiñeiras *et al.* (4), al evaluar en laboratorio la compatibilidad de *M. anisopliae* con los biocidas ametrina, benomyl, carbofuran, KCl, dalapon, diquat, diuron, pirimifos metil, NPK 7 5 6 18, fensulfotion, Nitrato de amonio, paraquat, propiconazol, simazina y zineb usados en el cultivo del banano, encontraron que la germinación conidial y virulencia del hongo no fue afectada por pirimifos metil en la concentración de 32 pp.

Samuels *et al.* (13), evaluaron la compatibilidad de varios aislamientos de *M. anisopliae* con el herbicida paraquat y encontraron que todos los aislamientos fueron altamente compatibles con el herbicida; resultados similares fue-

ron encontrados por Vaino *et al.* (15) y por Li y Holdom (8).

Atehortúa y Londoño (1), evaluaron el efecto del insecticida clorpirifos y del herbicida glifosato en las concentraciones 50; 5 y 0,5 ppm sobre *M. anisopliae* y encontraron que clorpirifos presenta efecto inhibitorio en el crecimiento a los 9 días de inoculado en todas las concentraciones; sin embargo, dicho efecto desaparece a los 18 días, tiempo en el cual con sólo 50 ppm se mantiene su efecto. El tiempo de esporulación fluctúa entre 6 y 18 días, y fue mayor para clorpirifos.

Para adelantar un Manejo Integrado de la Broca (MIB) de manera adecuada, es necesario establecer la compatibilidad que puede 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, para enfrentar otros problemas fitosanitarios en la zona cafetera colombiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron esporas del hongo *M. anisopliae* Ma 9236, perteneciente al cepario del laboratorio de patología de insectos de CENICAFÉ. Dichas esporas se produjeron en sustrato de arroz cocido, durante un tiempo de 25 días desde la inoculación, a una temperatura promedio de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para el ensayo de la mezcla entre los agroquímicos y el entomopatógeno se preparó el medio de cultivo para hongos Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) acidificado con ácido láctico al 0,37%, en cajas de Petri.

Se examinó la compatibilidad en mezcla de *M. anisopliae* en una concentración de 1×10^8 esporas/ml con la dosis comercial (DC) (basa-

dos en las dosis recomendadas por los fabricantes) y la mitad de la dosis comercial (1/2 DC) de las formulaciones comerciales de los agroquímicos que aparecen en las Tablas 1 y 2.

Las esporas para el ensayo fueron suspendidas en una solución acuosa con aceite agrícola Carrier (Stoller de Colombia Ltda.) al 0,1%. Se determinó su viabilidad por germinación del

100% a las 48 horas en SDA, es decir, cuando todas las esporas presentaban tubo germinal más largo que el diámetro promedio de la espora.

En matraces esterilizados de 250 ml, se depositaron 100 ml de la suspensión del hongo en agua destilada estéril (ADE) y se adicionó la cantidad adecuada de los agroquímicos en cada una de las concentraciones citadas anteriormen-

TABLA 1. Productos agroquímicos (Insecticidas y fungicidas) y dosis usadas para evaluar el efecto sobre el hongo *Metharhizium anisopliae* en mezclas.

Nombre genérico	Nombre comercial	Formulación y concentración	i.a. en ppm	
			DC	½ DC
endosulfan	Thiodan	CE 35%	2457	1229
clorpirifos	Lorsban	CE 48%	2880	1440
pirimifos metil	Actellic	CE 50%	2000	1000
fenitrothion	Sumithion	SC 54,3%	3258	1629
isazofos	Miral	SM 50%	5000	2500
Nim	Semilla de Nim	EA 5%	4000	2000
benomyl	Benlate	PM 50%	1500	750
cyproconazol	Alto	SL 10%	80	40
hexaconazol	Anvil	SC 5%	200	100
triadimefon	Bayleton	CE 25%	1000	500
Oxicloruro de cobre	Oxicloruro de cobre	PM 50%	6000	3000

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 fertilizantes foliares usados para evaluar el efecto sobre el hongo *M. anisopliae*, en mezclas.

Nombre genérico	Nombre comercial	Formulación y concentración	i.a. en ppm	
			DC	½ DC
oxifluorfen	Goal	CE 2%	3360	1680
Paraquat	Gramoxone	SL 20%	1200	600
glifosato	RoundUp	SL 36%	3590	1795
terbutilazina-glifosato	Folar	SC 430%	3996 - 1080	1998-540
alcohol alquil aril polieter	Agral	SL 90%	1800	900
-----	Agrotin	SL 7,945%	635,6	317.8
hidrocarburos parafínicos	Mezcla fix	SL 83%	4980	2490
alcohol alquil aril polieter	Mixel	SL 84,2%	1684	842
fertilizante foliar	Tottal	SL	30%	15%

- i.a. ingrediente activo
 ½ DC mitad de la dosis comercial
 SL solución líquida
 DC dosis comercial
 CE concentrado emulsionable
 SC solución concentrada

te; se mantuvieron en agitación a 70 rpm, para mantener homogénea la mezcla y se evaluó la germinación conidial después de estar en mezcla durante una hora. Posteriormente se depositaron diez alícuotas de 5 µl por caja, en un total de 10 cajas de petri que contenían SDA, para completar cada una de las diferentes concentraciones y tratamiento evaluados, igual que para el testigo. Todo el experimento se realizó a una temperatura promedio de 25°C.

Evaluación de la compatibilidad. Con cada uno de los tratamientos se midió la germinación de esporas de *M. anisopliae* a las 24 y 48 horas (12). El experimento se organizó en un diseño

completamente al azar, con un arreglo factorial distribuido así:

Para los insecticidas: 6 x 2 + testigo.

Para los fungicidas: 5 x 2 + testigo.

Para los herbicidas: 4 x 2 + testigo.

Aditivos de aspersión: 4 x 2 + testigo

Fertilizante foliar: 1 x 2 + testigo.

Se consideró el matraz como unidad experimental y se llevaron a cabo cuatro repeticiones por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presentan los resultados de la germinación de la mezcla de *M. anisopliae* con los insecticidas evaluados; todos 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%), fenitrothion causó inhibición total a las 24 horas en las concentraciones evaluadas. A las 48 horas, todos con excepción de fenitrothion (64,85 y 34,87% de inhibición) y endosulfan (27,52 y 12,63% de inhibición) permiten la germinación en un 100% en la DC y 1/2DC, respectivamente.

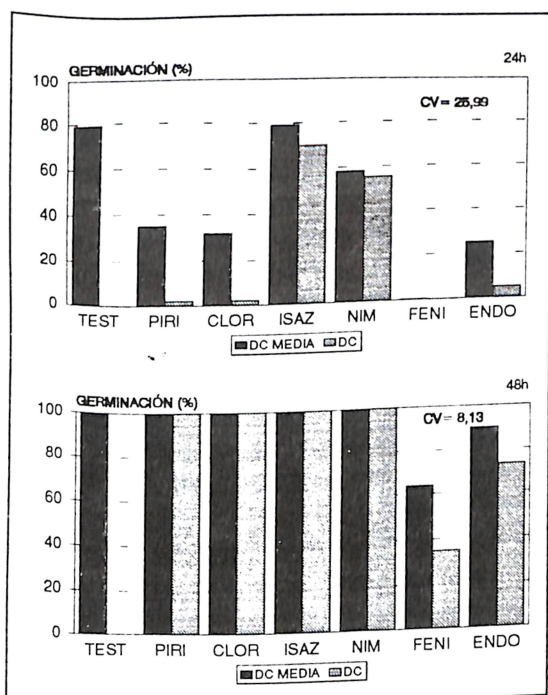


Figura 1. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con insecticidas.

Estos resultados concuerdan con los hallados por Samuels *et al.* (13) que muestran que diferentes aislamientos de *M. anisopliae* son viables en presencia de dosis bajas de clorpirifos y con los de Castiñeiras *et al.* (4) 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; 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%). oxiclورو de cobre (10,46 y 10,99% a las 24 horas) y benomyl (24,46 y 5,33% a las 24 horas) fueron menos inhibitorios, mientras hexaconazol lo fue moderadamente (58,08 y 36,56% a las 24 horas) (Figura 2). Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros in-

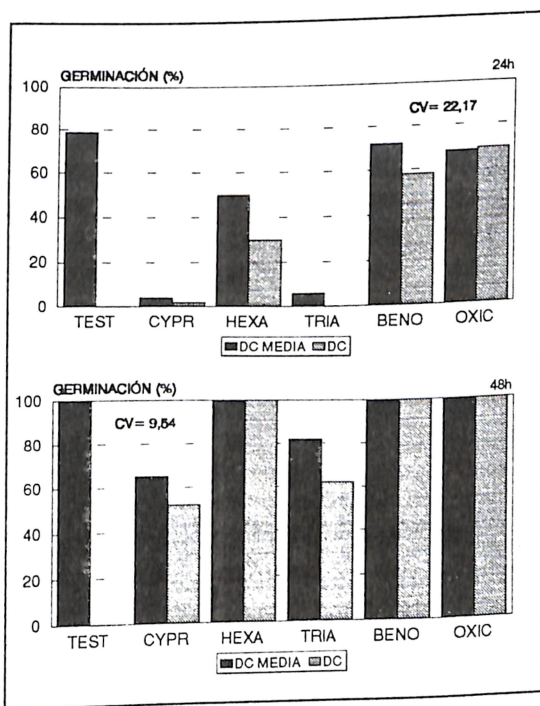


Figura 2. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con fungicidas.

vestigadores (10, 11, 13) que hallaron que benomyl produce inhibición en el crecimiento micelial y en la esporulación de diferentes aislamientos de *M. anisopliae*.

Al hacer el análisis estadístico con la mezcla de hongo y herbicidas, se encontraron diferencias significativas con el testigo y entre sí, y se observó que oxifluorfen inhibió completamente al entomopatógeno en todos los tratamientos, paraquat presentó efecto inhibitorio sobre la germinación a las 24 horas (99,06 y 98,80%) pero éste disminuyó a las 24 horas (14,57 y 17,49%) y a las 48 horas el hongo presentó 100% de germinación en presencia de este herbicida (Figura 3); glifosato + terbutilazina y glifosato sólo los que menor inhibición presentaron.

Estos resultados son semejantes a los encontrados por Samuels *et al.* (13) que muestran la compatibilidad de paraquat con diferentes ais-

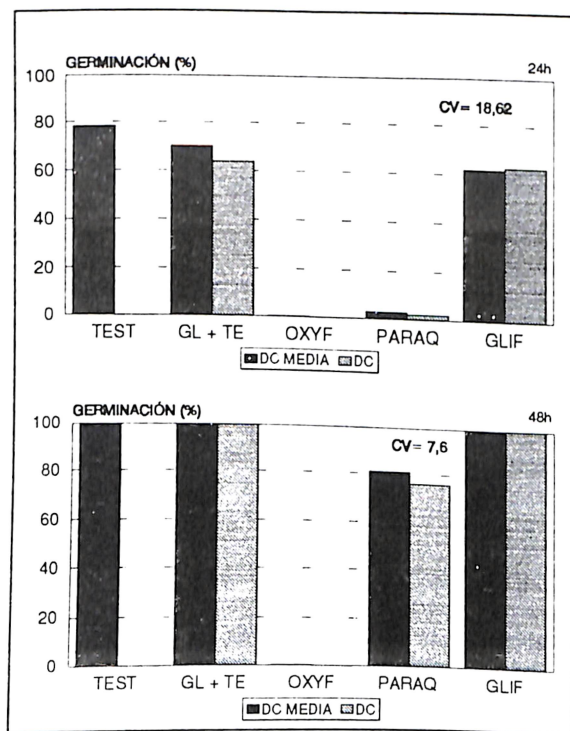


Figura 3. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con herbicidas.

lamiento de *M. anisopliae* y los de Atehortúa y Londoño (1) que señalan que glifosato no presentó efecto inhibitorio sobre éste.

Los coadyuvantes usados en la 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 (Figuras 4 y 5). Todos los aditivos, el fertilizante foliar al igual que el testigo a las 48 horas permiten la germinación en un 100%.

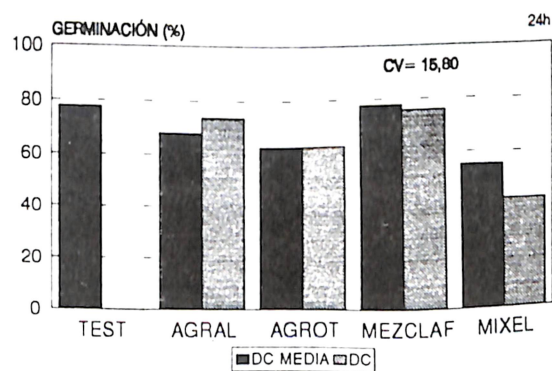


Figura 4. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con aditivos de aspersión.

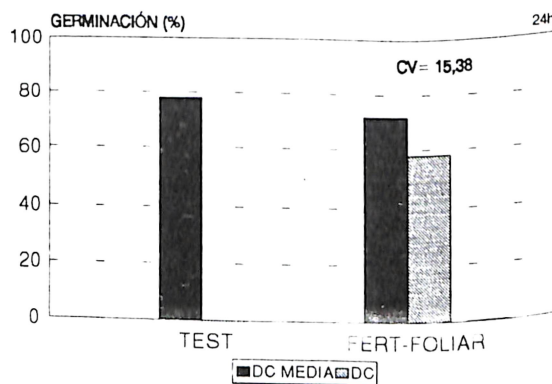


Figura 5. Viabilidad de *M. anisopliae* en mezcla con fertilizante foliar.

Algunos autores han observado que los agroquímicos pueden matar el hongo (efecto fungicida), prevenir el crecimiento (efecto fungistático) o prevenir la esporulación (efecto genestático) en laboratorio (5, 12), incluso con experimentos de temperatura sobre la viabilidad de *Metarhizium flavoviride*, los investigadores 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 (9).

Griffin (6, 7) señala que la dormancia puede ser inducida por factores externos, que causan la inhibición de las tres vías respiratorias que son muy sensibles a los inhibidores: la fosforilación oxidativa para producir ATP, el ciclo del ácido cítrico y el transporte de electrones; en contraste, la función de la ATPasa, durante la germinación, depende de la síntesis de *de novo* de las subunidades de la proteína y resulta notable que las mitocondrias de las esporas en dormancia son capaces de translocar y procesar nutrimentos para construir las subunidades de dicha enzima; además señala que los clorados inhiben bastante el transporte de nitrato a través de la pared micelial, los cuales se piensa que actúan como análogos del nitrato, pero no inhiben la nitratorreductasa. Parece que la mezcla al depositarse sobre 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 el experimento de mezclas en campo, ya que algunas limitaciones de los estudios de compatibilidad *in vitro* han sido demostradas por el trabajo de Wilding y Brobyn (16), quienes sugieren que dichos resultados deben ser comparados con experimentos similares *in vivo*, pues algunos compuestos pueden tener mayor actividad en el ambiente que en el agar o viceversa.

LITERATURA CITADA

1. ATEHORTUA C., M.M.; LONDOÑO Z., M.E. Efecto de algunos agroquímicos en el crecimiento y esporulación del hongo *Metarizium anisopliae*. In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20, Cali (Colombia), 13-16 de julio. 1993. Resúmenes. Cali (Colombia), SOCOLEN, 1993. p.21.
2. BUSTILLO P., A.E.; VILLALBA G., D.A.; CHAVES C., B. Consideraciones sobre el uso de insecticidas químicos en la zona cafetera en el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20, Cali (Colombia), 13-16 de julio. 1993. Resúmenes. Cali (Colombia), SOCOLEN, 1993. p. 152-158.
3. CADATAL, T.D.; GABRIEL, B.P. Effect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. Philippine Entomologist (Filipinas) 1(5):379-395. 1970.
4. CATIÑEIRAS, A.; CALDERÓN, A.; LÓPEZ, M. 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) 1(1):33-42. 1991.
5. FARGUES, J. Traitement mixte des larves de royaume Leptinotarsa decemlineata Say par des spores du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill. et des doses réduites d'insecticide. Phytatrie-Phytopharmacie (France). 21:183-193. 1972.
6. GRIFFIN D.H. Spore dormancy and germination. In: Fungal physiology. 375-398 (Estados Unidos), Ed. Wiley-Liss New York, 1994. p. 375-398.
7. GRIFFIN D. H. Nutrient acquisition: Digestion and transport. In: Fungal physiology. (Estados Unidos), Ed. Wiley - Liss New York, 1994. p. 158-194.
8. LI, D.P.; HOLDOM, D.G. Effects of pesticide on growth y sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal Invertebrate of Pathology. (Estados Unidos) 63(2):209-211. 1994.
9. McCLATCHIE G., V.; MOORE D.; BATEMAN R.P.; PRIOR C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. Mycological research (Inglaterra) 98(7):749-756. 1994.

10. MOHAMED, A.K.A.; PRATT, J.P.; NELSON, F.R.S. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with chemical pesticides. *Micopathology* (Estados Unidos) 99(2): 99-105. 1987.
11. MOORHOUSE, E.T.; GILLESPIE, A.T.; SELLERS, E.K.; CHARNLEY, A.K. Influence of fungicides and insecticides on the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*, a pathogen of the vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*. *Control Science and Technology* (Inglaterra). 2(1):49-58. 1992.
12. RIVERA M., A.; BUSTILLO P., A.E.; MARÍN, P. compatibilidad en mezcla de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin con insecticidas usados en el control químico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología*, 20, Cali (Colombia), 13-16 de julio. 1993. Resúmenes. Cali (Colombia), SOCOLEN, 1992. p. 105.
13. SAMUELS, K.D.Z.; PINNOCK, D.E.; ALLSOPP, P.G. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycete) as a biological control agent of *Inopus rubriceps* (Macquat) (Diptera: Stratiomidae). *Journal of the Australian Entomological Society* (Australia) 28(1): 69-74. 1989.
15. VAINO, A. HOKKANEN, H. 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.
16. WILDING N.; BROBYN P.J. Effects of fungicides on development of *Entomophthora aphidis*. *Transactions of the British Mycological Society* (Inglaterra) 21:137-139. 1980.