**The Hawaii protocol for scientific monitoring of coffee berry borer: a model for coffee agroecosystems worldwide**

Melissa A. Johnson1, Robert Hollingsworth2, Samuel Fortna3 Luis F. Aristizábal4 and Nicholas C. Manoukis2

1Oak Ridge Institute for Science and Education, 2United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Daniel K. Inouye US Pacific Basin Agricultural Research Center, Hilo, HI, USA, 3University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, 4Independent Consultant for CBB Management, Kona, HI, USA

Corresponding Author:

Melissa A. Johnson

Email Address: melissa.johnson@ars.usda.gov

Tel: (808)-937-0022

Email Addresses of Co-authors:

Robert Hollingsworth (robert.hollingsworth@ars.usda.gov)

Samuel Fortna (samuel.fortna@ars.usda.gov)

Luis F. Aristizábal (laristizabal721@gmail.com)

Nicholas C. Manoukis (nicholas.manoukis@ars.usda.gov)

**Resumen:**

La broca del café es el insecto plaga más devastante en plantaciones de café a nivel mundial. Hemos desarrollado un protocolo científico de monitoreo de la broca, cuyo propósito fue la cuantificación de la captura de broca, la dinámica poblacional y el impacto de esta plaga; como también el desarrollo de la fenología de la planta huésped a lo largo de un paisaje heterogéneo. La piedra angular de este sistema de monitoreo fue la registración a través del uso de un aparato móvil eléctrico digital de las aplicaciones del hongo *Beauveria bassiana* y la fenología de la planta. Este sistema de colección de datos electrónicos permite la grabación de datos de campo, los cuales son georreferenciados a través de la construcción de un sistema de posicionamiento global, el cual es soportado por una red de estaciones climatológicas y los registros de las practicad de manejo aplicado en las fincas. Un monitoreo compresivo de la broca del café y su dinámica con la planta huéspedes es una parte esencial del proyecto de toda el área de Hawái, para agregar datos a nivel de paisaje que puedan ser usado para investigación y para mejorar las prácticas de manejo. Agro-ecosistemas cafeteros de otros lugares del mundo que experimenten alta variabilidad ambiental y factores socioeconómicos podrán beneficiarse al implementar este protocolo, el cual podrá desarrollar en forma personalizada un manejo integrado de la broca del café.

**Protocolos:**

1. **Defina las zonas de muestreo en los campos de café**
	1. Defina el perímetro del lote de café que va ser monitoreado utilizando el sistema de posicionamiento global (SPG). Importe las coordinadas del campo de café dentro de un sistema de posicionamiento global (SPG) y genere un mapa del lote de café.
	2. Divida el campo en “zonas” (por ejemplo, polígonos), cada 335 m2. Esos serán usados para asegurar un diseño de muestreo aleatorio a lo largo del cultivo

1. **Crea una aplicación de datos en un sistema electrónico**
	1. Utilizando una plataforma electrónica de colección de datos, construya una colección de datos compuesta por la siguiente base de datos interconectados: Trampas, Zonas, Sitio de Servicio, Estación Climática y Manejo. Esta base de datos será utilizada en los sub siguientes pasos del protocolo para la colección y organización de los datos.
	2. Para la base de datos de Trampas, cree los campos para el Nombre del sitio, Trampa Numero, Fecha de descarga, Técnico de campo, foto de descarga y una enlace a las coordinadas del SPG para cada trampa.
	3. Para la base de datos de la Zona, cree los campos para: Nombre del sitio y Numero de la zona, con una unión al sitio georreferenciado mostrado el mapa de cada zona.
	4. Para la base de datos de Sitio de Servicio, cree los campos para: Nombre del Sitio, Fecha, Técnico de campo y notas u observaciones del sitio. En la base de tatos de Sitio de Servicio, debería anidarse las bases de datos compuesta por los siguientes espacios:
		1. Servicio de la Trampa: Trampa número, (con enlace al registro de la descarga de las Trampas de la base de datos madre), fotografía de la captura de la trampa, y conteo de la trampa.
		2. Zona de Servicio: Fotografía fenológicas, evaluación de la infestación de los frutos (número total de frutos verdes infestados, frutos verdes con *Beauveria bassiana*, y número de frutos pasillas), y una unión al registro de la base de datos Zona madre; este registro también incluye las coordenadas SPG por cada árbol muestreado.
		3. Servicio de la Estación Climática: Nombre del Sitio, fecha, descarga de datos y revisión de la batería.

* + 1. Disección de frutos: Técnico de laboratorio, fecha, Posición de la broca del café (AB o CD), categoría de la mortalidad (viva, muerta, muerta por *B. bassiana*) por cada fruto disectado.
	1. Para la base de datos de la Estación climática, cree los campas para: Nombre del sitio, Numero de la estación, Fecha de descarga, Técnico de campo, Fotografía de descarga, y un enlace a las coordenadas SPG por cada estación climática.
	2. Para la base de datos del Manejo, cree los campos para: Nombre del sitio, fecha, y tipo de prácticas de manejo.
1. **Prepare y descargue las trapas del monitoreado de la broca del café**
	1. Determine el número de trapas que necesita para monitorear el movimiento de la broca del café de cada lote. La densidad de trapas por lote podría ser aproximadamente 5 trampas para pequeños lotes (0.5 ha) y 10 trampas para lotes grandes (> 1 ha)15.
	2. Haga una serie de agujeros de drenaje por encima de la línea de llenado de cada recipiente de la trampa, utilizando un perno o puntilla, para prevenir la dilución de la solución de jabón por la lluvia. Ensamble las trampas desacuerdo con las instrucciones del fabricante.
	3. Prepare un litro de solución para matar la broca de café, conformada por 200 mL de glicol de propileno y 800 mL de agua. El siguiente paso es preparar una mezcla del atrayente conformado por una solución 3:1 de metanol: etanol. Vierta 40 mL del atrayente dentro de una bolsa plástica semipermeable (2mm, 3x4 pulgadas) y colóquela en un recipiente para transportarla.

Nota: Las bolsas plásticas semipermeables han mostrado ser más eficientes en la atracción de brocas que viales abiertos y además requiere menor número de vistas para cambiar el atrayente debido a una baja rata de evaporación16.

PRECAUCION: Metanol y etanol son líquidos altamente ardientes (producen llamas), tóxico si son inhalados o ingeridos, además irritan la piel y los ojos. Esos químicos deberían manipularse en área bien ventiladas, utilizando guantes, protección de ojos y ropa protectora.

* 1. Distribuya las trapas aleatoriamente dentro del lote. Las trampas deben de ser instaladas a 0.5-1-5 m sobre el nivel del suelo con ascenso libre. Un palo puede ser usado para asegurar efectivamente la trapa entre los árboles. Escriba el nombre del lugar, el número de la trampa utilizando un marcado de tinta imborrable para la identificación de la trapa en el futuro.
	2. Llene el recipiente de colección de broca con 100 mL de solución de glicol para matar brocas y atornille el recipiente fuertemente en el lugar de la trampa que le corresponde. Ajuste con un cli [para cada bolsa del atrayente y úselo para enganchar la bolsa en el centro de la trapa.
	3. Utilice el aparato móvil equipado con la plataforma electrónica de colección de datos, navegue hasta la base de datos Trampa y genere un nuevo registro que incluya el lugar, la fecha, el número de la trampa y una fotografía de la trampa. La localización de la trampa en cada lote es automáticamente grabada vía SPG del aparato móvil.
1. **Mantenimiento de las trampas**
	1. A su llegada en el campo, navegue en la base de datos del Sitio de Servicio con el sistema electrónico y genere un nuevo sitio de servicio para grabar con el nombre del sitio, la fecha y el técnico de campo.

Nota: El inicio del mantenimiento de las trapas es realizado 2 semanas después de instalada las trampas, y cada dos semanas en adelante. Si se desea una alta confiabilidad en la lectura de las trapas, el mantenimiento de las trapas y su lectura se deberían realizar semanalmente. Sin embargo, nosotros hemos notado que cada dos semanas de muestreo es suficiente para obtener información general de las capturas de broca y las tendencias generales del movimiento de la broca durante la estación.

* 1. Localización de la trapa en el campo. Coloque una tela fina como tamiz (tela de 0.8-1.0 mm tamaño) en el recipiente platico y vierta la solución mata broca a través del tamiz en la taza de colección de broca. Trasfiera de nuevo la solución mata broca de la taza de colección al recipiente plástico. Revuelva bien el líquido alrededor para estar seguro que toda la broca ha sido removida de la taza de colección.
	2. En la base de datos del Sitio de Servicio, navegue hasta la base de datos de Servicio de la Trapa y genere una nueva grabación para la trapa. Introduzca el número y tome una fotográfica del tamiz con el nombre del sitio y el número de la trapa en el fondo. Grave la fotografía en el registro de servicio de la trapa.
	3. Usando una cuchara o una espátula metálica, colecte todos los insectos en un vial llenado con etanol al 70%. Marque el vial con el sitio, la fecha, y el número de la trampa.
	4. Rellene la taza de colección con solución fresca mata broca y ajústela de regreso en la trampa.

Nota: Una vez por mes, lave la taza de colección de broca con agua jabonosa, enjuague y remplace con solución fresca mata broca. También remplace el atrayente y la bolsa una vez por mes o cuando sea necesario.

1. **Mantenimiento de las zonas para la fenología de las plantas**
	1. En el sitio de servicio, navegue en la base de datos de Zona de Servicio y cree un nuevo registro de la zona de servicio. Seleccione una zona de muestreo de la base de datos mapa que está unida a la base de datos de Zonas.
	2. Para prevenir sesgo en las muestras, seleccione aleatoriamente un árbol de la zona colocando hacia abajo la vista y dejando solamente visible la base de los árboles. Parándose al frente del árbol seleccionado escoja aleatoriamente una rama a la altura del pecho. Coloque una regla sobre la rama seccionada estando seguro que la regla no tape ninguna de las partes reproductivas (nudos, yemas, flores y frutos) de la visión de la cámara de campo.
	3. Tome una foto asegurando que la regla y la rama entere queden visibles. Tome una segunda foto del árbol entero y trate en lo posible, de lograr la parte media del dosel del árbol. Grave ambas fotos en la zona de servicio
2. **Mantenimiento de la zona de servicio para la evaluación del daño de frutos verdes**
	1. Si la rama utilizada para la fenología tiene más de 30 frutos verdes, cuente el número de frutos en la rama que son al menos del tamaño de una alverja (0.6 cm) y los más grandes y que van desde color verde hasta amarillo claro verdoso (en la escala BBCH 77-85 17). Grave ese número en registro de zona de servicio.

Nota: Si la rama usada en la fenología tiene menos de 30 frutos verdes, aleatoriamente seleccione una rama lateral a la altura del pecho de un árbol alrededor de la zona objetivo que tenga más de 30 frutos verdes visibles. Hágalo desde la distancia para prevenir sesgos en la selección.

* 1. Adicionalmente, en el registro de la zona de servicio, ingrese en número de frutos infestados por la broca del café de la misma rama. Los frutos infestados tendrán un pequeño orifico, el cual es típicamente localizado en el disco central del fruto; la broca del café puede o no puede estar visible en el orificio.
	2. Ingrese el número de frutos verdes infestados que tengan visible el hongo *Beauveria bassiana*. El hongo puede ser visto en la broca del café o alrededor de la entrada del orifico.

Nota: Evaluaciones adicionales pueden ser necesarias para la identificación de especies de hongos, si hay un interés especial en ellos.

* 1. Entre el número de frutos pasas (frutos secos o pasillas) de la rama. Esta información puede ser usada para entender la relación entre las prácticas de manejo (por ejemplo, recolección sanitaria) y la infestación de la broca del café.

* 1. Colecte tres frutos verdes infestados de la rama. Estos serán llevados al laboratorio para disección y evaluación de las posiciones de la broca en los frutos.

Nota:Los frutos verdes infestados pueden ser adquiridos de otras ramas de la zona si la rama seleccionada para la evaluación de daño tiene menos de 3 frutos verdes infestados.

* 1. Coloque los frutos infestados en un recipiente plástico para cada finca/ fecha de muestreo y márquelo con el sitio y la fecha. Los recipientes deberían almacenarse en un lugar frio con hielo hasta que pueden ser transportados al laboratorio. Los frutos se beberán almacenar en el laboratorio a 14 0C hasta 3 días.

Nota: Idealmente, los frutos deberían de ser disectado en 1-3 días después de ser colectados para asegurar máxima supervivencia de la broca. Los frutos pueden ser almacenados en el laboratorio a 14oC hasta 3 días con poca o ninguna mortalidad. (S. Fortna & R. Hollingsworth, comunicación personal).

* 1. Repita los pasos de la fenología y evaluación del daño de los frutos en cada zona muestreada. Aproximadamente 25 rama debería de ser evaluadas para fincas grandes (~1ha.) y 15 ramas debería de ser muestreadas para fincas pequeñas (~0.5 ha). Para las disecciones, 75 frutos verdes infestados deberían de ser colectados para fincas grandes y 45 para fincas pequeñas en cada día de muestreo.

Nota: Durante algunos periodos del año no es fácil encontrar este número de frutos. En este caso, trate de colectar un mínimo de 50 frutos verdes para fincas grandes (> 1 ha) y 25 frutos verdes para finca pequeñas (< 0.5 ha).

1. **Conteo de la broca del café en cada trampa**
	1. Colocar un tamiz de tela (tamaño ~1.5 mm) en la parte de encima del recipiente plástico y vacié los insectos del vial de colección hacia el tamiz. Utilice una botella de lavado llena con agua para lograr vaciar todo el contenido fuera de vial.
	2. Use la botella de lavado para lavar el contenido del tamiz, remueva los insectos del tamiz tantos como sea posible. Esto permite separar los insectos grandes y los residuos de insectos pequeños como sea posible, y previene errores en la estimación volumétrica de la broca del café. Deseche los insectos grandes y los residuos juagando el tamiz.

* 1. Colocar una tela fina de tamiz (tamaño ~1.0 mm) sobre el segundo recipiente plástico y vacié el contenido del primer recipiente sobre la tela de tamiz.

* 1. Si hay cientos de broca o más, salte al paso 7.6. Si hay menos de cientos de broca coloque un trapo fino de tamiz sobre un papel toalla para remover el exceso de agua. Voltee el tamiz hacia abajo golpea para vaciar sobre una tapa plástica limpia. Disperse los insectos alrededor médiate un pincel si ellos están agrupados y permita que se puedan secar.
	2. Si hay pocos cientos de broca o menos, utilice un pincel fino o un implemento similar para remover las brocas hacia fuera y empiece a contar bajo la luz de un estereoscopio. Cuente el número total de cucarrones y sepárelos de la broca del café y otras categorías.

* 1. Si hay cientos de broca y más, transfiera la broca de la tela del tamiz dentro de una jeringa de 10 mL utilizando una espátula metálica. Coloque el eyector dentro de la columna de la jeringa y presione suavemente hacia delante hasta sentir algo de resistencia, tenga cuidado de no aplastar las brocas. Grave el valor volumétrico de la jeringa.
	2. Cuente 200 brocas de la muestra volumétrica utilizando el protocolo descripto anteriormente. Utilice las siguientes ecuaciones para determinar el número de brocas vs otros cucarrones de la muestra.
		1. Conteo para estimar la broca: (# de broca $÷$ 200) $× ∂ ×$ (mL medidos en la jeringa) = Total de broca estimada para la muestra, en donde $∂$ = número de insectos/mL. Se recomienda que el estimado sea hecho para cada región; en la Isla de Hawái el valor estimado fue 1033.
		2. Estimación de otros insectos: (# de otros $÷$ 200) $× ∂ ×$ (mL medidos en la jeringa) = Total “Otros” cucarrones estimados en la muestra.
	3. Cuando el conteo de las trampas ha sido completado, navegue en el registro de servicio de trapas y entre el número de brocas y el número de otros cucarrones.
1. **Calificación de las fotografías fenológicas**
	1. Exporte la fotografía fenológica de café de la colección de datos. Abra la fotografía y localice la rama y la regla pegada a la rama. Para esta rama califique lo siguiente:

8.8.1 Numero de nudos (puntos pegados a las hojas de la rama).

8.8.2 Presencia o ausencia de botones inmaduros, botones maduros, velas, flores abiertas, y frutos cabeza de alfiler.

8.8.3 Numero de frutos tamaño de alverja, frutos verdes inmaduros, frutos verdes maduros mostrando una descoloración, frutos maduros y frutos pasas.

1. **Disección los frutos y determinación la posición de la broca**
	1. Tome los frutos verdes infestados del almacenamiento frio y permita que se aclimaten a temperatura ambiente durante 10 – 15 minutos antes de proceder con la disección de los frutos**.**
	2. La disección de los frutos infestados permite la determinación de la posición de los adultos de broca. La posición AB indica que la hembra ha iniciado la penetración dentro del fruto, pero no ha alcanzado a llegar al endospermo; posición CD indica que la hembra ha entrado al endospermo 13.
	3. Utilizando un bisturí o un implemento similar, haga cortes paralelos a través del disco del fruto para una evaluación preliminar de la posición de la broca. Posteriormente, haga una serie de cortes poco profundos perpendiculares al disco central y alrededor del orifico de entrada, para determinar si la broca está en la posición AB o CD.
	4. Subdivida AB y CD en categorías “viva” “Muerta por *Beauveria bassiana*”, “muerta por otra causa” y “broca perdida”. Si no es fácil de ver si el adulto está muerto o vivo, magnifique el estereoscopio y vea el movimiento de la patas.
	5. Coloque los individuos contados dentro de un plato con agua o alcohol. Esto ayuda para mantener seguimiento de lo que ha contado y previne el escape de adultos del laboratorio.
	6. Una vez la disección por cada sitio ha sido completada, navegue en la base de datos Disección de Frutos y del sitio de servicio, entre y grabe el número total de broca en cada categoría.
	7. Las muestras disecadas deberían de ponerse en un recipiente y debería de ser congeladas por 72 horas.
2. **Mantenimiento manual de las estaciones climáticas**
	1. Las estaciones climáticas requieren ser grabadas cada dos semanas o cada mes para asegurar que los sensores están trabajando apropiadamente. Las variables del clima que son importantes para considera y entender la biología de la broca del café incluyen: lluvia, humedad relativa, temperatura del aire y del suelo, radiación solar, radiación fotosintéticamente activa (RFA), humedad del suelo y velocidad y dirección del viento.
	2. Localice la estación climática manual en el campo. En el sistema eléctrico, abra el sito de servicio y navegue en la base de datos Estación del Clima. Genere un nuevo registro del clima que está enlazado a la grabación de despliegue de la estación del clima.
	3. Use un transportador resistente al agua para directamente conectar el HOBO al computador portátil para la descarga de los datos. Nótese que la estación del clima ha sido descargada y grabada.
	4. Una vez los datos han sido descargados, manualmente re-instarle la temperatura y humeada para asegurar que estén correctamente ajustados, (el registro de lluvia no necesita ser re-instalado). Revise las baterías y remplácelas si es necesario. Nótese que el sistema electrónico ha sido ajustado.
	5. Una vez usted ha regresado al laboratorio, adicione los datos más recientes al registro de la estación climática.
3. **Registro de las prácticas de mantenimiento.**

11.1 Información de las prácticas de manejo pueden ser usadas para entender las tendencias de la actividad de la broca del café y el tamaño de las poblaciones. Las practicas relevantes del manejo incluyen (pero no están limitada a): aplicaciones del hongo *Beauveria bassiana*, aplicaciones de pyrethrins, u otros insecticidas, poda, manejo de las malezas, recolección sanitaria de frutos, recolección de frutos maduros, recolección de frutos pasas del suelo, etc.