

# Desplazamiento y parasitismo de entomonemátodos hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)<sup>1</sup>

Displacement and parasitism of entomonematodes in berries infested by the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)

JUAN PABLO MOLINA A.<sup>2</sup>, JUAN CARLOS LÓPEZ N.<sup>3</sup>

Revista Colombiana de Entomología 28 (2): 145-151 (2002)

**Resumen.** El uso de nemátodos entomopatógenos o entomonemátodos (EN) es una posible alternativa para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en frutos caídos en el suelo. La textura del suelo es un factor limitativo del EN para su persistencia, desplazamiento y búsqueda de su hospedante. Así en este experimento se evaluó el desplazamiento en arena y en suelo de dos especies de EN: *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) y *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) hacia frutos de café (maduros y secos). Las variables evaluadas fueron índice de alcance (IA), e índice de penetración por fruto (IPF), variables evaluadas inicialmente en arena. Una vez seleccionado el fruto, se observó el efecto de dos texturas de suelo Franco Arcillo Arenosa (FArA) y Franca (F). Se utilizó como unidad experimental una cámara de acrílico (12x2x2 cm), dispensando 100 Juveniles Infeccivos (JI) por especie de EN a 5 cm del fruto (maduro o seco) cubierto y sobre arena y suelo de acuerdo con los tratamientos. La evaluación se hizo por 168 horas después del inicio del experimento. En la selección del fruto, el mayor IA se presentó para el fruto seco con  $21,13 \pm 3,3\%$  e IPF del  $10,91 \pm 2,2\%$  (promedio  $\pm$  error estándar), resultados estadísticamente diferentes (LSD 0,05) a los encontrados para el fruto maduro (IA:  $5,63 \pm 1,48\%$ ; IPF:  $3,56 \pm 1,06\%$ ) independiente de la especie de EN. Con relación a las texturas de suelo evaluadas, éstas no presentaron efecto en el desplazamiento de las especies de EN hacia el fruto seco, obteniéndose los mayores valores de IA e IPF para *H. bacteriophora* en la textura F con  $15,73 \pm 4,87\%$ ,  $7,47 \pm 3,51\%$  y *S. feltiae* en la textura FArA con  $7,33 \pm 3,51$  y  $4,33 \pm 1,12\%$ , respectivamente. Las tendencias de desplazamiento del EN y su efecto en la mortalidad de individuos de *H. hampei*, en diferentes estadios dentro del fruto, se discuten en este artículo.

**Palabras clave:** Nemátodos entomopatógenos. Movimiento. *Hypothenemus hampei*. *Steinernema feltiae*. *Heterorhabditis bacteriophora*.

**Summary.** The use of entomopathogenic nematodes or entomonematodes (EN), is a possible alternative for the control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, in berries that have fallen to the soil. The texture of the soil is a limiting factor of EN persistence, displacement and host finding. In this experiment, the displacement of two EN species: *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) towards coffee berries (mature and dry) was evaluated. The variables evaluated were index of displacement (IA), and penetration into berry (IPF), variables evaluated initially in sand. Once the berry type was selected, the effect of two soil textures, Loam clay Sandy (FArA) and loam (F) was evaluated. A rectangle of acrylic was used as an experimental unit, and 100 infective Juveniles (IJ) were placed to 5cm from the berry (mature or dry) in agreement with the treatments. The time of evaluation was 168 hours after the beginning of the experiment. In the selection of the berry, the greatest value for IA was exhibited by the dry berry and had a value of  $21,13 \pm 3,3\%$  and IPF of  $10,91 \pm 2,2\%$  (average  $\pm$  standard error), results which show that the values differ statistically (LSD 0,05) from those obtained for the mature berry (IA:  $5,63 \pm 1,48\%$ ; IPF:  $3,56 \pm 1,06\%$ ) independent of EN. With regards to the evaluated textures, they did not present any effect in the displacement of EN towards the dry berry, the greatest values for IA ( $15,73 \pm 4,87\%$ ) and IPF ( $7,47 \pm 3,51\%$ ) being obtained for *H. bacteriophora* in loam texture and for *S. feltiae* in Loam clay Sandy texture with  $7,33 \pm 3,51$  (IA) and  $4,33 \pm 1,12\%$  (IPF) respectively. The displacement tendencies of EN, and their effect on the mortality of individuals of *H. hampei* in different stages of development are discussed in this paper.

**Key words:** Entomopathogenic nematodes. Movement. *Hypothenemus hampei*. *Steinernema feltiae*. *Heterorhabditis bacteriophora*.

## Introducción

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), se considera como la plaga más importante del cultivo, por atacar directamente al fruto, causando pérdida de peso, depreciación del grano y pérdida en la cali-

dad de la bebida. Su primer registro en Colombia fue en agosto de 1988, en Tumaco (Nariño). Posteriormente, se evidenció un incremento rápido de su población con una adaptación alta (Bustillo *et al.* 1998). Hasta la actualidad afecta, en Colombia, la totalidad del área cultivada en café (860.000 Ha).

Uno de los mayores riesgos de infestación por la broca del café, en nuevas cosechas, lo ocasionan los frutos infestados con broca y los frutos sanos que han caído al suelo y han sido atacados por la plaga (Bustillo *et al.* 1999). Éstos albergan en su interior estadios inmaduros y adultos de la plaga y

1 Extracto trabajo de grado del primer autor como investigador en el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). Trabajo ganador del segundo puesto del premio Francisco Luis Gallego otorgado por la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN).

2 Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C. E-mail: juanpablo@molina.as

3 Autor para correspondencia: Asistente de Investigación. Cenicafé. Disciplina de Entomología. A. A. 2427 Manizales. Caldas. E-mail: juancarlos.lopez@cafedecolombia.com

constituyen el potencial más importante en el incremento de las poblaciones. Después de un período seco se presenta un aumento poblacional de la broca en estos frutos y, con la llegada de las lluvias, los adultos emergen y se dispersan por el cafetal, infestando frutos desarrollados a partir de las primeras floraciones de la siguiente cosecha (Baker *et al.* 1994).

En la actualidad, para el control de la plaga en el suelo no se cuenta con una herramienta efectiva que esté enmarcada dentro del conocido manejo integrado de la broca (MIB), utilizándose, sólo para su control, la aplicación de insecticidas y hongos entomopatógenos en el plato del árbol y la recolección de frutos del suelo (Bustillo *et al.* 1998).

Para el control de la broca en frutos que han caído al suelo, una estrategia posible es aplicar un agente biocontrolador a la superficie del suelo. En teoría, los entomonemátodos (EN) probablemente tienen la habilidad de penetrar en el fruto y causar una mortalidad significativa de los estadios de la plaga (Baker 1999). Es así como los EN al considerarse enemigos naturales de la broca (Commonwealth Institute of Biological Control 1990; Georgis y Hom 1992), se constituyen en un agente potencial para su control, al causar patogenicidad y muerte a sus estadios de acuerdo con diversos estudios realizados en laboratorio (Allard y Moore 1989; Georgis y Hom 1992; Castillo 1995; Baker 1999). Sin embargo, para su incorporación en el control de la plaga en el suelo como una herramienta efectiva dentro del MIB, es necesario establecer si tienen la capacidad de desplazarse en el suelo, penetrar en el fruto y causar patogenicidad y muerte a los estadios de la plaga en el interior de éste. Para tal efecto, se realizó el primer estudio básico con el objetivo de determinar el desplazamiento y parasitismo de dos especies de EN: *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) y *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), hacia frutos maduros y secos de café, infestados artificialmente con broca.

## Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe, localizado en el municipio de Chinchiná, Caldas, y ubicado a 1475 msnm.

Las especies de EN evaluadas en el experimento (*H. bacteriophora* y *S. feltiae*) fueron suministradas por los Drs. Bernard Briscoe y William Hominick del CABI<sup>1</sup>. Dichas especies se multiplicaron y reactivaron en larvas de *Galleria mellonella* (Fab.) (Lepidoptera: Pyralidae) de acuerdo con el método descrito por Poinar (1979) y se mantuvieron en laboratorio a una temperatura de  $12 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Los frutos de café utilizados fueron de la variedad Colombia con edad fisiológica entre 190 y 260 días de desarrollo; se infestaron utilizando una relación de tres (3) brocas por fruto durante 30 días. Al final el tiempo de infestación, se obtuvieron frutos de 220 y 290 días, que correspondieron a dos tipos de frutos: maduros y secos. Finalmente, se utilizaron frutos con un máximo de dos perforaciones por broca y se desinfectaron con NaOCl al 0,05%.

En la investigación se hicieron tres experimentos:

### Desplazamiento de entomonemátodos hacia frutos infestados por broca cubiertos con arena

Se evaluó el desplazamiento de las dos especies de EN hacia frutos infestados con broca cubiertos con arena y se seleccionó el tipo de fruto que más influyó en dicho desplazamiento. Como sistema de bioensayo se utilizó una cámara de acrílico (12 x 2 x 2 cm), con secciones removibles, colocadas a cada centímetro a lo largo de la cámara (Fig. 1). Inicialmente se retiraron todas las secciones, se adicionaron 68 g de arena y se colocó un fruto (maduro o seco) en un extremo. A 5 cm del fruto (en todo el centro de la cámara), se dispensaron 100 JI. La arena utilizada previamente se lavó y se secó en estufa, a una temperatura de  $110^\circ\text{C}$ , se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión y posteriormente se pasó por tamices (ASTM E-11-87 Standar U.S.A) número 60 y 325 obteniéndose un tamaño de partículas entre 425 a 585  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Finalmente esta arena se llevó a una humedad volumétrica (HV) del  $15 \pm 1,49\%$  (P/P), ajustada mediante un determinador halógeno de humedad (Mettler Toledo HR 73 con precisión de 0,01%).

### Desplazamiento de entomonemátodos hacia frutos infestados por broca dispuestos sobre arena

Se evaluó el desplazamiento de especies de EN hacia frutos infestados con broca dispuestos sobre arena; tanto el sistema de bioensayo como la metodología fueron las mismas relacionadas anteriormente, pero los frutos se colocaron sobre una capa fina de 30,5 g de arena. Al comprobarse desplazamiento, penetración y parasitismo en las primeras dos etapas del experimento, se seleccionó el mejor tipo de fruto para realizar el último experimento.

### Desplazamiento de entomonemátodos hacia frutos infestados cubiertos y dispuestos sobre dos texturas de suelo

Se evaluó el desplazamiento de las especies de EN en dos texturas de suelo y se determinó el efecto de éstas. Las dos texturas de suelo fueron: Franco Arcillo Arenosa (FArA) y Franca (F), las cuales procedieron de dos unidades características de suelos de la zona cafetera (Chinchiná y Montenegro, respectivamente). Cada textura de suelo se esterilizó en autoclave por seis horas a 15 libras de presión y posteriormente se acondicionó a la HV registrada para condiciones de campo para las mismas texturas (FArA con  $35 \pm 0,43\%$  y F con  $38 \pm 1,15\%$  (P/P)). Para la evaluación de frutos cubiertos y sobre textura de suelo, en cada cámara, se adicionaron 39,5 g y 16 g de suelo, respectivamente.

Una vez montado el sistema de bioensayo para todos los experimentos, se sellaron las cámaras y se llevaron a incubación en oscuridad constante bajo condiciones controladas de temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad relativa (80%), hasta un tiempo final para la evaluación, de 168 horas; como testigo para cada especie se utilizó el mismo sistema de bioensayo, empleando ADE sin JI. Al término de este tiempo, se colocaron todas las secciones divisorias de la cámara para contar el número de EN, en cada una de ellas, sólo para la primera etapa del experimento. Finalmente en todas las etapas se abrieron los frutos y se contó el número de JI que penetraron en éstos y el número de estadios de la plaga muertos.

### Diseño experimental y variables evaluadas

La unidad experimental (U.E.) la constituyó la cámara de acrílico. Para el primer y segundo experimentos, se utilizó un diseño completamente aleatorio dispuesto en arreglo factorial  $2 \times 2 + 2$ , cuyos factores fueron: dos tipos de fruto, dos especies de EN y dos testigos, uno por cada tipo de fruto. En total se conformaron 6 tratamientos, cada uno con quince repeticiones (Tabla 1). En el tercer experimento en frutos cubiertos y sobre las texturas de suelo, se empleó el mismo arreglo factorial  $2 \times 2 + 4$ , cuyos factores fueron: dos texturas de suelo, dos especies de EN y cuatro testigos: (ADE sin JI, por cada textura y EN), para un total de ocho tratamientos, cada uno con quince repeticiones (Tabla 2).

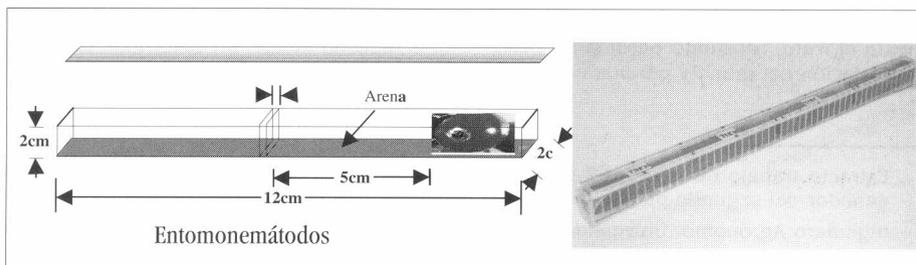


Figura 1. Modelo de las cámaras de acrílico utilizadas en el bioensayo.

1 Centre For Agriculture and Biosciences International. CABI-Biosciences, Lane, Egham.-Surrey. Inglaterra.

**Tabla 1.** Descripción de los factores y tratamientos involucrados en el experimento de desplazamiento de entomonemátodos hacia frutos brocados cubiertos por arena

Especie de EN	GMF	Testigo
<i>H. bacteriophora</i>	Maduro	Testigo fruto maduro
<i>S. feltiae</i>	Seco	Testigo fruto seco
	x	+
Tratamientos (especie de EN/GMF)		Nomenclatura
<i>S. feltiae</i> / fruto maduro		T1
<i>H. bacteriophora</i> / fruto maduro		T2
<i>S. feltiae</i> / fruto seco		T3
<i>H. bacteriophora</i> / fruto seco		T4
Testigo/ fruto seco		T5
Testigo/ fruto maduro		T6

**Tabla 2.** Tratamientos evaluados en el desplazamiento de entomonemátodos hacia frutos brocados cubiertos y sobre dos texturas de suelo

Textura	Especie de EN	Testigos
FArA	<i>S. feltiae</i>	Por cada EN y textura (cuatro)
F	<i>H. bacteriophora</i>	
	x	+
Tratamientos (EN/Textura)		Nomenclatura
<i>S. feltiae</i> /FArA		T1
<i>S. feltiae</i> /F		T2
<i>H. bacteriophora</i> /FArA		T3
<i>H. bacteriophora</i> /F		T4
Testigo (ADE sin EN) para el tratamiento (FArA/ <i>S. feltiae</i> )		T5
Testigo (ADE sin EN) para el tratamiento (F/ <i>S. feltiae</i> )		T6
Testigo (ADE sin EN) para el tratamiento (FArA/ <i>H. bacteriophora</i> )		T7
Testigo (ADE sin EN) para el tratamiento (F/ <i>H. bacteriophora</i> )		T8

Las variables que se evaluaron en los tres experimentos, en las cuales se determinó el desplazamiento de las especies de EN (IE, IA), la penetración (IPF) y la mortalidad de individuos en diferentes estadios de la broca (PMIB) en el fruto, se describen a continuación:

**Índice estático (IE)**, el cual está dado por la relación entre el número de JI que permanecen en el punto de inoculación y el total de JI aplicados al inicio de la evaluación, dado en porcentaje.

$$IE = \left[ \frac{\text{No. JI en el punto de inoculación}}{\text{No. JI aplicados}} \right] \times 100$$

**Índice de repulsión (IR)**, el cual está dado por la relación entre el número de JI que se encuentran en las secciones en sentido opuesto hacia el fruto antes del punto de inoculación de los JI y el total de JI recuperados al final de la evaluación.

$$IR = \left[ \frac{\text{No. JI en sentido opuesto}}{\text{No. JI recuperados}} \right] \times 100$$

**Índice de alcance (IA)**, el cual está dado por la relación entre el número de JI que

llegan tanto a la superficie como los que ingresan al fruto, sobre el número de JI aplicados por tratamiento.

$$IA = \left[ \frac{\text{No. JI en la superficie del fruto} + \text{No. JI dentro del fruto}}{\text{No. JI aplicados}} \right] \times 100$$

**Índice de penetración en fruto (IPF)**, el cual está dado por la relación entre el número de JI encontrados dentro del fruto y el número de JI iniciales aplicados por tratamiento.

$$IPF = \left[ \frac{\text{No. JI dentro del fruto}}{\text{No. JI aplicados}} \right] \times 100$$

**Porcentaje de mortalidad (PM)**, el cual se estimó como la relación entre el número de individuos de broca en diferentes estadios muertos (larvas, pupas y adultos) y el número total de individuos de broca (vivos y muertos) en diferentes estadios de la plaga presentes dentro del fruto.

$$PM = \left[ \frac{\text{No. de individuos de broca en diferentes estadios muertos}}{\text{No. total de individuos de broca en diferentes estadios dentro del fruto}} \right] \times 100$$

Luego de obtener los porcentajes de mortalidad para cada tratamiento y testigos, se procedió a estimar el **porcentaje de mortalidad de individuos en diferentes estadios de broca por fruto (PMIB)**, mortalidad corregida para los tratamientos con el porcentaje de mortalidad de su testigo respectivo:

$$PMIB = \left[ \frac{\text{PM del tratamiento} - \text{PM del testigo}}{100 - \text{PM del testigo}} \right] \times 100$$

En todos los experimentos se calcularon para las variables respuesta IA, IPF, PMIB, IE, IR promedios, variación, análisis de varianza (ANAVA) al nivel del 5%. Se aplicó una prueba de contraste al nivel del 5%, en el caso que la interacción simple entre los factores de los tratamientos evaluados por variable, fuera significativa. Se aplicó una prueba de comparación de diferencia mínima significativa (LSD) y Tukey al nivel del 5%. Finalmente para el análisis de los resultados, los datos que presentaron una alta variabilidad, se transformaron con la fórmula:  $TD = (\sqrt{x+5})$  donde TD significa transformación de datos.

## Resultados y Discusión

### Desplazamiento de entomonemátodos hacia frutos infestados en una cámara cubiertos con arena

En general, las dos especies de EN (*H. bacteriophora* y *S. feltiae*) se desplazaron 5 cm a lo largo de la cámara dispuesta en sentido horizontal, desde el punto de inoculación inicial de los JI hasta localizar el fruto, penetrándolo por el orificio de perforación hecho por la broca. Los resultados de dicho desplazamiento y la mortalidad de los estadios de la plaga a causa de las especies de EN evaluadas, se observan en las Tablas 3-7 donde se presentan el promedio y coeficiente de variación de las variables evaluadas IE, IA, IPF, PMIB, e IR, respectivamente.

El desplazamiento de los JI en arena es gradual, puesto que a las 168 horas, momen-

to de la evaluación para todos los tratamientos, los IA e IPF guardan una relación directa. Los primeros JI que lograron alcanzar el fruto penetraron, quedando los demás JI en la proximidad del fruto o en las diferentes secciones de la cámara en dirección a éste (Tablas 3 y 4).

En este orden de ideas, esta misma tendencia de desplazamiento se refleja en el IE para las dos especies de EN evaluadas, con promedios de 12,06% y 36,18% para *S. feltiae* y *H. bacteriophora*, respectivamente. Todos los JI no se desplazaron al mismo tiempo y una parte de éstos permaneció en la primera sección de la cámara (punto de inoculación de los JI).

Por otra parte, las dos especies de EN presentaron respuesta para las variables IA e IPF en los dos tipos de frutos de café (maduros y secos), donde *S. feltiae* fue la es-

pecie que presentó los mayores valores para dichas variables (Tablas 4 y 5); estos valores explican la menor respuesta para la variable IE para dicha especie. Sin embargo, para *H. bacteriophora*, a pesar de que presentó un IE mayor y una menor respuesta para las variables IA e IPF mostró el PMIB más alto de este experimento (Tabla 6).

Estos resultados demuestran que una parte de los JI de *H. bacteriophora* se desplazaron, penetraron el fruto e infectaron individuos de broca en diferentes estadios en un tiempo menor al transcurrido para la evaluación final del experimento (168 horas); en las distintas secciones de la cámara (sin tener en cuenta la sección donde se inocularon los JI), sólo se recuperó el 3% de sus JI, a diferencia de la especie *S. feltiae* donde se recuperó el 14% de sus JI en las mismas secciones.

**Tabla 3.** Promedios y variación para la variable IE en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos con arena

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>			<i>H. bacteriophora</i>			
	GRADO DE MADUREZ	Media (%)	E.E	C.V	Media (%)	E.E	C.V
Fruto maduro		13,6	1,92	54,59	39,33	2,61	25,74
Fruto seco		10,53	1,22	56,83	33,07	2,93	34,28

**Tabla 4.** Promedios y variación para la variable IA en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos con arena

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>		<i>H. bacteriophora</i>		Media (%)	C.V	
	GRADO DE MADUREZ	Media (%)	C.V	Media (%)			C.V
Fruto maduro		10,40	88,48	0,87	194,38	5,63B	189,32
Fruto seco		32,79	55,72	9,47	82,97	21,13A	129,17
Media (%)		21,60A		5,17B			
C.V		85,25		137,24			

Los datos fueron transformados por la fórmula  $TD = (\sqrt[3]{\bar{x}+5})$ . Promedios seguidos por letras no comunes, implica diferencias estadísticas al nivel del 5%.

**Tabla 5.** Promedios y variación para la variable IPF en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos con arena

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>		<i>H. bacteriophora</i>		Media (%)	C.V	
	GRADO DE MADUREZ	Media (%)	C.V	Media (%)			C.V
Fruto maduro		6,60	104,94	0,47	227,16	3,53B	211,71
Fruto seco		18,5	70,76	3,33	108,56	10,91A	156,57
Media (%)		12,55A		1,9B			
C.V		95,90		157,80			

Los datos fueron transformados por la fórmula  $TD = (\sqrt[3]{\bar{x}+5})$ . Promedios seguidos por letras no comunes, implica diferencias estadísticas al nivel del 5%.

**Tabla 6.** Promedios y variación para la variable PMIB en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos con arena

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>		<i>H. bacteriophora</i>		Media (%)	C.V	
	GRADO DE MADUREZ	Media (%)	C.V	Media (%)			C.V
Fruto maduro		42,49	52,13	33,22	67,34	37,84A	125,4
Fruto seco		24,41	138,24	48,82	45,52	36,61A	103,1
Media (%)		33,45A		41,02A			
C.V		58,94		84,29			

Los datos fueron transformados por la fórmula  $TD = (\sqrt[3]{\bar{x}+5})$ . Promedios seguidos por letras no comunes, implica diferencias estadísticas al nivel del 5%.

Schroeder y Beavers (1987), en un bioensayo al evaluar el desplazamiento de algunos EN utilizando una columna en sentido horizontal, encontraron que Heterorhabditidos como *H. bacteriophora* y *H. heliothidis* presentaron un mayor desplazamiento con relación a algunos Steineremátidos como *S. glaserie*. Así mismo, trabajos realizados por Mannion y Jansson (1992) señalan que JI de la especie *H. bacteriophora* tienen una mayor velocidad de desplazamiento en sentido horizontal y causan mayor infectividad, en relación con los Steineremátidos *S. feltiae* y *S. glaserie*.

Cabe resaltar que a pesar de que las mortalidades de individuos de broca fueron menores en fruto maduro así mismo es alta, con promedios en el orden del 42,49 y 32,33% para la especie *S. feltiae* y *H. bacteriophora*, respectivamente (Tabla 6). Estos resultados son satisfactorios si se tiene en cuenta que los JI en menos de 168 horas tuvieron que desplazarse y localizar los estadios de la plaga para causar las mortalidades registradas. Teniendo en cuenta el IPF obtenido para ambas especies,  $3,56 \pm 1,06\%$ , se puede suponer que a mayor tiempo de evaluación, el PMIB aumente.

En cuanto a la respuesta para la variable IR, ésta fue muy baja para las dos especies de EN, debido a que no se encontraron JI en las secciones en sentido opuesto hacia el fruto, antes del punto de inoculación inicial, lo

que reafirma que los volátiles emitidos por el fruto y los estadios de la plaga son factores de atracción para los JI (Tabla 7).

En segunda instancia, en este experimento se seleccionó el GMF que influyó más en la respuesta de las variables evaluadas. El análisis de varianza no sugiere efecto de la interacción el tipo de fruto y las especies de EN evaluadas para las variables IA e IPF, pero en el PMIB sí presentó efecto dicha interacción, lo que determinó que el fruto es factor de atracción de los EN e incidió directamente en las variables respuesta. Por otra parte el análisis de varianza mostró efecto del GMF en el IA e IPF y la diferencia mínima significativa (LSD  $P \leq 0.05$ ) mostró diferencias a favor del fruto seco para las mismas variables (Tablas 3 y 4) seleccionándose finalmente el fruto seco para los bioensayos con las texturas de suelo en el último experimento.

Así mismo, al evaluar el PMIB, la prueba de comparación utilizada en el análisis de covarianza, igualmente sugiere efecto a favor del fruto seco. Esta respuesta se presenta en el PMIB a causa de la acción patogénica de la especie *H. bacteriophora*, cuya mortalidad fue la más alta de todo el experimento (48,82%) (Tabla 6).

La respuesta presentada a favor del fruto seco en todas las variables evaluadas, puede obedecer a que éste presentó cerca de un 50% más de individuos de broca en su

interior ( $15,89 \pm 1,37$ ) en relación con el número de estadios encontrados en fruto maduro ( $8,64 \pm 0,76$ ), lo que pudo atraer en mayor escala a los EN, por la concentración de volátiles emitidos por la plaga.

#### Desplazamiento de entomonemátodos hacia frutos infestados por broca disueltos sobre arena

Se presentó una respuesta muy baja para las variables evaluadas, IA e IPF, con valores de  $0,93 \pm 0,18\%$  y  $0,07$  respectivamente.

De esta forma se confirma que la posición del fruto en arena determina el desplazamiento y penetración de los JI, debido a que éstos, al no estar directamente en contacto con el orificio de perforación del fruto, se encuentran impedidos para ingresar e infectar los estadios de la broca, a diferencia del experimento anterior, donde las partículas de arena se constituyeron como el puente de contacto entre los JI y el orificio del fruto para que éstos ingresen.

#### Desplazamiento de dos especies de entomonemátodos hacia frutos de café cubiertos por texturas de suelo

En general *H. bacteriophora* y *S. feltiae* se desplazaron en las texturas de suelo presentando respuesta para las variables evaluadas IA, IPF y PMIB (Tablas 8-10). Dichas variables, al igual que los experimentos en

**Tabla 7.** Promedios y variación para la variable IR en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos con arena

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>		<i>H. bacteriophora</i>	
	Media (%)	C.V	Media (%)	C.V
Fruto maduro	0,02	134,63	0,01	178,19
Fruto seco	0,005	307,89	0,001	157,99

**Tabla 8.** Promedios y variación para la variable IA en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos en diferentes texturas de suelo

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>		<i>H. bacteriophora</i>		Media (%)	C.V
	Media (%)	C.V	Media (%)	C.V		
F	4,8	122,80	15,73	119,83	10,27A	226,0
F Ar A	7,33	146,20	6,8	110,08	7,07 <sup>a</sup>	206,63
Media (%)	6,07 <sup>a</sup>		11,27 <sup>a</sup>			
C.V	141,72		131,44			

Los datos fueron transformados por la fórmula  $TD = \sqrt{\frac{X+5}{5}}$ . Promedios seguidos por letras no comunes, implica diferencias estadísticas al nivel del 5%.

**Tabla 9.** Promedios y variación para la variable IPF en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos en diferentes texturas de suelo

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>		<i>H. bacteriophora</i>		Media (%)	C.V
	Media (%)	C.V	Media (%)	C.V		
F	4,47	129,13	7,47	182,08	5,97A	263,82
F Ar A	4,33	159,33	4,20	155,66	4,27A	239,4
Media (%)	4,4A		5,83A			
C.V	142,07		181,93			

Los datos fueron transformados por la fórmula  $TD = \sqrt{\frac{X+5}{5}}$ . Promedios seguidos por letras no comunes, implica diferencias estadísticas al nivel del 5%.

**Tabla 10.** Promedios y variación para la variable PMIB en los tratamientos evaluados en el desplazamiento de JI hacia frutos cubiertos en diferentes texturas de suelo

ENTOMONEMÁTODO	<i>S. feltiae</i>		<i>H. bacteriophora</i>		Media (%)	C.V
	Media (%)	C.V	Media (%)	C.V		
F	33,43	51,59	31,20	61,38	32,32A	161,52
F Ar A	14,08	99,40	29,18	64,96	21,63A	155,31
Media (%)	23,75A		30,19A			
C.V	76,80		98,47			

Los datos fueron transformados por la fórmula  $TD = (\frac{2}{\sqrt{x+5}})$ . Promedios seguidos por letras no comunes, implica diferencias estadísticas al nivel del 5%

arena, mostraron una relación directa, donde parte de los JI que lograron desplazarse al fruto (IA), penetraron a éste (IPF), para el tiempo de evaluación final, tendencia que se observa en las dos texturas y especies de EN evaluadas.

El análisis de varianza no mostró efecto de la interacción entre las texturas de suelo y las especies de EN evaluadas (factores) para las variables respuesta IA e IPF; sin embargo, los factores por separado sí presentaron significancia. Igualmente, no existieron diferencias significativas para estas variables ni por especie de EN ni por textura de suelo, de acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD  $P \leq 0.05$ ) (Tablas 8 y 9).

Estos resultados confirman que las texturas de suelo no presentan efecto alguno en el desplazamiento de las especies de EN hacia el fruto, ya que éstas tienen características óptimas que facilitan la movilidad de los JI, como la baja densidad aparente con valores de 0,7 y 0,8 g/cc para las texturas FArA y F, respectivamente.

De esta forma la especie *H. bacteriophora* es favorecida principalmente por la baja densidad aparente en las texturas empleadas, presentando los valores más altos para las variables respuesta IA e IPF, debido a que los JI se desplazaron con facilidad, conservando su viabilidad (Tablas 8 y 9). De acuerdo con estudios realizados por Portillo *et al.* (2000), una densidad alta aparente afecta el desplazamiento y sobrevivencia de los JI, por el reducido tamaño de poro, ya que los JI de algunas especies de EN pueden tener un diámetro mayor con respecto al diámetro de poro de la textura, ante lo cual ven impedido su desplazamiento hacia el hospedante. Por el contrario las densidades bajas permiten el movimiento continuo de los JI entre las partículas.

Con base en lo anterior se plantea que, a pesar de que no hay un efecto en el desplazamiento y penetración hacia el fruto infestado para las texturas probadas y las especies de EN, cada una presenta características particulares que hacen que su desplazamiento hacia el fruto se vea favorecido en mayor o menor grado, donde *H. bacteriophora* y *S. feltiae* presentaron una mayor respuesta para las variables evaluadas en las texturas F y FarA, respectivamente (Tablas 8 y 9). En este mismo sentido, tra-

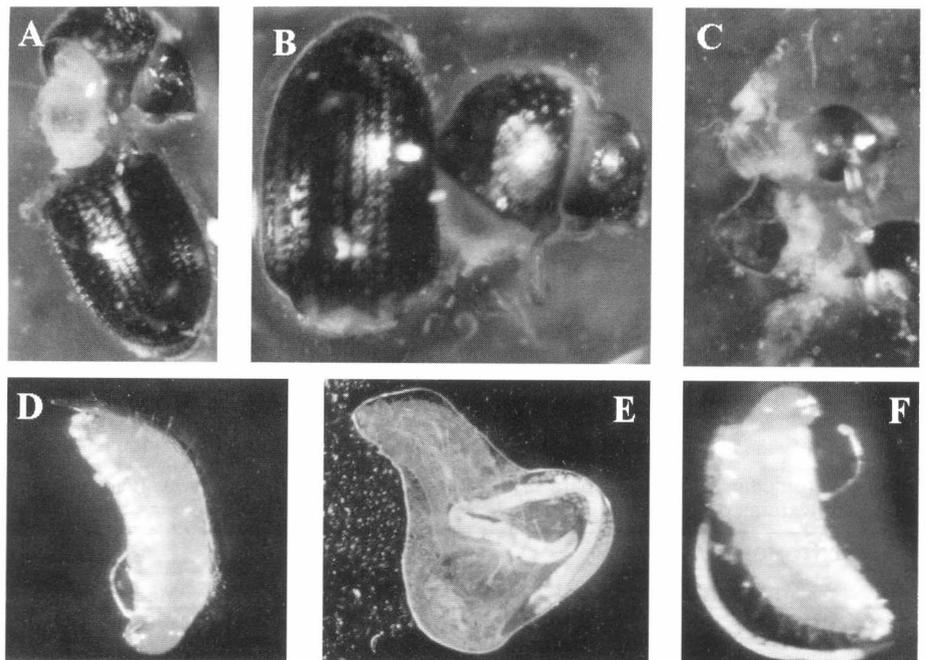
bajos realizados por Barbercheck y Kaya (1991), concluyen que el desplazamiento y movilidad de *H. bacteriophora* es mayor en texturas franco arenosas y orgánicas que en suelos de texturas arcillosas; así mismo, *S. carpocapsae* presenta un desplazamiento mayor en un suelo arenoso que en un suelo orgánico.

Con relación a la variable PMIB, el análisis de varianza sugiere el efecto de la textura y la prueba de comparación utilizada en el análisis de covarianza, sugiere el efecto a favor de la textura F para ambos EN, donde los mayores PMIB se obtuvieron por *S. feltiae* (33,43%) y *H. bacteriophora* (31,20%) (Tabla 10). En trabajos realizados con otros insectos tales como *Galleria mellonella* (Fab.), *Lucilia cuprina* (Wied.) y *Cyrtomenus bergi* (Fro.), donde se determinó la infectividad de especies como *H. bacteriophora*, *S. glaserie* y *S. carpocapsae*, se pudo comprobar que el tipo de textura influía en la infectividad de los JI y decrecía si la proporción de arcilla aumentaba (Choo y Kaya 1991; Barbercheck

1992). Lo anterior respalda los resultados encontrados en este experimento, de tal manera que suelos con contenidos de arcilla dificultan el desplazamiento de las especies de EN hacia el fruto infestado y por ende afectan la infectividad sobre los individuos en diferentes estadios de la broca.

Es de resaltar que la especie *H. bacteriophora*, en las dos texturas evaluadas, fue la única que se desarrolló y multiplicó en estadios de broca dentro del fruto, con emergencia de  $141,6 \pm 4,86$  y  $26,8 \pm 7,8$  JI en las texturas F y FarA, respectivamente.

En adultos de broca se observó emergencia de JI por las regiones intersegmentales del insecto, iniciando con la separación de la cabeza y el tórax del insecto (Fig. 2.A.B.) y culminando con la separación de todos los segmentos, hasta dejar totalmente desintegrado el insecto (Fig. 2.C.). De la misma forma se presentó un desarrollo completo pasando de JI, una vez llega al interior de la larva de broca, a J4, formán-



**Figura 2.** A.B.C. Secuencia del proceso de emergencia de JI de adultos de *H. hampei* D.E.F. Secuencia del proceso de emergencia de adultos de *H. bacteriophora* de larvas de *H. Hampei*. Fotos tomadas por Juan Carlos López N. y D, E, F tomadas por Juan Pablo Molina A. Disciplina de Entomología. Cenicafé.

dose finalmente el adulto de *H. bacteriophora*, que rompe la cutícula del insecto y emerge muchas veces con su carga de huevos. En la figura 2 (D.E.F.) se presenta la secuencia de desarrollo encontrada en las disecciones para este evento.

Finalmente tanto en larvas como en adultos de broca dentro de fruto, se presentó un completo desarrollo de *H. bacteriophora*. Estudios realizados en laboratorio con estadios de la broca, también han evidenciado la reproducción de JI de *Heterorhabditis* en adultos y larvas de broca (Alard y Moore 1989; Castillo 1995).

#### **Desplazamiento de entomonemátodos hacia cerezas infestadas, colocadas sobre texturas de suelo**

Se presentó igualmente para esta posición de fruto, una respuesta muy baja para las variables evaluadas, IA e IPF, con promedios de  $0,83 \pm 0,14\%$  y  $0,66 \pm 0,03\%$  respectivamente. Estos resultados corroboran los obtenidos en los experimentos con arena, donde el JI no es capaz de desplazarse desde el suelo hasta subir por la superficie del fruto y penetrarlo, sino que necesariamente tiene que haber un sustrato (puente) con el orificio de perforación del fruto para que los JI accedan a éste.

#### **Conclusiones**

- Ambas especies de entomonemátodos tienen alta capacidad de desplazamiento hacia frutos cubiertos por arena, a partir del punto de inoculación. Sin embargo, el Índice Estático (IE) para la especie *S. feltiae* fue menor que para *H. bacteriophora*. Lo anterior indica que *S. feltiae* parece tener mayor capacidad de desplazamiento en grupos de JI que *H. bacteriophora*.

- Con las variables IA e IPF se demuestra que los entomonemátodos que migraron del punto de inoculación se dirigieron en dirección al fruto infestado e inclusive llegaron hasta el interior del mismo.

- Ambas especies de entomonemátodos tuvieron mayor preferencia y atracción hacia frutos secos. Sin embargo, el fruto maduro, a pesar de que presentó una respuesta menor, atrajo a los EN a su interior y se observó un efecto en la reducción de poblaciones de broca.

- A pesar de que *H. bacteriophora* mostró menores índices de desplazamiento, alcance y penetración menores que *S. feltiae*, el PMIB fue mayor, lo que indica que algunos JI de *H. bacteriophora* tuvieron una mayor velocidad de desplazamiento, los cuales penetraron y mataron los estadios de broca dentro del fruto en un tiempo menor que los JI de *S. feltiae*.

- En el experimento utilizando frutos dispuestos sobre arena, se demostró la preferencia de desplazamiento y penetración de *S. feltiae* por frutos secos.

- Cuando el sustrato (arena o suelo) está en contacto directo con el fruto se facilita más el ingreso de los JI al orificio de perforación del fruto.

- La textura del suelo no tuvo efecto sobre el desplazamiento de las especies de entomonemátodos, ya que éstos alcanzaron el fruto, lo penetraron y en su interior se presentó una importante mortalidad de individuos en diferentes estados biológicos de la plaga.

- A pesar que no se presentaron diferencias estadísticas en el desplazamiento y penetración entre las dos especies de entomonemátodos en las diferentes texturas de suelo, *H. bacteriophora* fue la única especie capaz de infectar y reproducirse dentro de estados biológicos de la broca presentes en el interior del fruto.

- *S. feltiae* fue la única especie que presentó una respuesta positiva a la variable IA, cuando tienen que alcanzar frutos de café que se encuentran sobre diferentes texturas de suelo.

- El uso de entomonemátodos, para el control de poblaciones de broca en el suelo, se presenta como una herramienta efectiva que podría constituir un nuevo componente dentro del MIB; sin embargo, es necesario continuar con estudios referentes a la producción masiva de entomonemátodos, formulación y evaluación de las especies nativas en campo.

#### **Recomendaciones**

Se deben realizar trabajos de investigación básica para evaluar las características de desplazamiento y penetración de especies nativas de entomonemátodos aisladas de suelos de zona cafetera e investigar métodos de producción masiva *in vitro* de entomonemátodos con el objetivo de elaborar una formulación para la aplicación en frutos infestados con broca del café en el campo.

#### **Agradecimientos**

A los Drs. Bernard Briscoe y William Hominick del CABI por el suministro de las especies de EN, al personal de la Disciplina de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café "Cenicafé", en especial al Sr. Uriel Posada por su colaboración durante la realización del experimento en el laboratorio, al Dr. Fernando Cantor de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Militar Nueva Granada (Bogotá), por sus valiosos aportes en la versión final del documento.

#### **Literatura citada**

ALLARD G., B.; MOORE, D. 1989. *Heterorhabditis* sp., nematodes as control agents for coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Scolytidae). Journal of Invertebrate Pathology 54(1): 45-48.

BAKER, P. S. 1999. La broca del café en Colombia; informe final del Proyecto MIB para el café DFID - CENICAFE - CABI Bioscience. Chinchiná, (Colombia), DFID, 154 p.

BAKER, P. S.; RIVAS, A.; BALBUENA, R.; BARREIRA, J. F. 1994. Abiotic mortality factors of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). Entomologia Experimentalis et Applicata 71: 201-209.

BARBERCHECK, M. E. 1992. Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. Florida Entomologist 75 (4): 539-548.

BARBERCHECK, M. E.; KAYA, H. K. 1991. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). Environmental Entomology 20 (2): 582-589.

BUSTILLO, A. E.; CÁRDENAS M., R.; VILLALBA G., D.; BENAVIDES, P.; OROZCO H., J.; POSADA F., J. 1998. Manejo Integrado de la Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) en Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café "Pedro Uribe Mejía" Cenicafé. 127 p.

BUSTILLO, A. E.; BERNAL, M. G.; BENAVIDES, P.; CHAVES, B. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Florida Entomologist 82 (4): 491-498.

CASTILLO, A. 1995. Evaluación de nemátodos entomógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae), para el control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferr. en Chiapas, México. Turrialba, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. 72 p. (Tesis: M. Sc. Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales).

CHOO, H. Y.; KAYA H, K. 1991. Influence of soil texture and presence of roots on host finding by *Heterorhabditis bacteriophora*. Journal of Invertebrate Pathology 58 (2): 279-280.

COMMONWEALTH INSTITUTE OF BIOLOGICAL CONTROL-CIBC. 1990. LONDRES. INGLATERRA. Control biológico de la broca de la cereza del café. En: MANUAL de capacitación de control biológico. Chinchiná, Cenicafé. p. 140-153.

GEORGIS, R.; HOM, A. 1992. Introduction of entomopathogenic Nematode Products into Latin America and the Caribbean. Nematropica 22 (1): 81-98.

MANNION, C., M.; JANSSON R., K. 1992. Movement and postinfection emergence of entomopathogenic nematodes from sweetpotato weevil, *Cylas formicarius* (F.) (Coleoptera: Apionidae). Biological Control 2 (4): 297-305.

POINAR, G. O. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press, Boca Ratón, p. 143-148.

PORTELLO, A. C.; VILLANI, G. M.; TAUBER, J. M.; TAUBER, A. C.; NYROP, P. J. 2000. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. Environmental Entomology 28 (6): 1021-1035.

SCHROEDER, W. J.; BEAVERS, J. B. 1987. Movement of the entomogenous nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae in soil. Journal of Nematology 19 (2): 257-259.

Recibido Jun. 30 / 2001

Acceptedo Abr. 13 / 2002