

# EVALUACIÓN EN EL LABORATORIO DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ

Pablo Benavides-Machado\*, Juliette Catalina Quintero-Vargas\*\*, Juan Carlos López-Núñez\*

## RESUMEN

**BENAVIDES M., P.; QUINTERO V., C.; LÓPEZ N., J.C. Evaluación en el laboratorio de nematodos entomopatógenos nativos para el control de la broca del café. Cenicafé 61 (2): 119-131. 2010**

Con el fin de buscar alternativas para controlar poblaciones de *Hypothenemus hampei* en frutos caídos en el suelo, en el laboratorio se evaluó la mortalidad causada a este insecto y el desplazamiento hacia frutos infestados, de siete nematodos entomopatógenos nativos (cinco *Steinernema* y uno *Heterorhabditis*), y como testigo una especie por cada género (*S. colombiense* SNI0198 y *H. bacteriophora* cepa Fresno HNI0100). El experimento se realizó en dos fases: en la primera se evaluó el porcentaje de los huevos que no eclosionaron, mortalidad de larvas y adultos de la broca, después de la aplicación de diez juveniles infectivos de los nematodos en cada estado, y en la segunda, se evaluó la capacidad de desplazamiento del nematodo y la mortalidad de las brocas en el interior de cerezas infestadas, posterior a la liberación de 1.000 juveniles infectivos a 5 cm de los frutos. Ambas fases contaron con un control. No hubo efecto de los nematodos sobre huevos de la broca. La mayor mortalidad de larvas se presentó con todas las especies de *Steinernema* evaluadas (> 75%) y en adultos se presentó con *Heterorhabditis* sp. (24,5%) a las 24 horas después de la infección, sin embargo, no hubo diferencias significativas posterior a las 48 horas. Todas las especies evaluadas se desplazaron hacia el fruto y las mortalidades oscilaron entre 83% y 100% de los estados de la broca presentes en los frutos. Los resultados muestran el efecto de estas especies de nematodos en el control de la broca dentro de los frutos caídos en el suelo bajo las condiciones evaluadas.

**Palabras clave:** Control biológico, *Hypothenemus hampei*, *Steinernema colombiense*, *S. websteri*, *Heterorhabditis bacteriophora*.

## ABSTRACT

In order to find new ways to control *Hypothenemus hampei* populations in fallen fruits on the ground, the mortality caused to this insect and the displacement to infested fruits of seven native entomopathogenic nematodes (five *Steinernema* and one *Heterorhabditis*), and one species per genus used as control (*S. colombiense* SNI0198 and *H. bacteriophora* Fresno strain HNI0100) were evaluated under laboratory conditions. The experiment was conducted in two phases: in the first one the percentages of unhatched eggs, larvae and adults mortality after application of 10 infective juveniles of the nematodes in each state were evaluated, and in the second one the nematode displacement capacity and the coffee berry borers mortality inside the infested berries after the release of 1000 infective juveniles at 5 cm from the fruits were evaluated. Both phases had a control. There was no effect of the nematodes on the berry borer eggs. The highest larvae mortality happened with all *Steinernema* species tested (> 75%) and most adult mortality occurred in *Heterorhabditis* sp. (24.5%) at 24 hours after infection. However, there were no significant differences after 48 hours. All tested species were moved toward the fruit and the mortalities ranged between 83 and 100% of the coffee berry borer states in the fruit. The results show the effects of these species of nematodes on the control of coffee berry borer inside the fruits fallen under the conditions tested.

**Keywords:** Biological control, *Hypothenemus hampei*, *Steinernema colombiense*, *S. websteri*, *Heterorhabditis bacteriophora*.

\* Investigador Científico II e Investigador Científico I, respectivamente. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones del Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

\*\* Estudiante Ingeniería Agronómica, Universidad de Caldas, Manizales.

La importancia de la comercialización del café como producto agrícola básico es innegable. En el 2003, superó en más de 14 mil millones de dólares las exportaciones agrícolas de Estados Unidos; en más de 50 países productores del grano es el sustento de por lo menos 20 millones de familias cafeteras, y teniendo en cuenta un promedio de cinco personas por familia, se podría estimar que al menos 100 millones de personas dependen directamente del cultivo del café (26, 36). La broca del café es el principal insecto plaga en las áreas donde se siembra este cultivo (19). Este insecto es originario del África y desde que se introdujo al continente americano, ha ocasionado reducciones en el rendimiento entre el 5% y 24% y en el peso de la almendra infestada hasta del 55%, lo que ha permitido estimar el costo en pérdidas al menos por 75 millones de dólares anuales para Colombia (14, 25, 28).

Los frutos de café que caen después de la cosecha, juegan un papel importante en la dinámica poblacional de la broca, debido a que le ofrecen al insecto refugio y alimento para su desarrollo durante la época de escasez de frutos (6). Después de un período seco, se presenta un aumento poblacional de la broca en dichos frutos, y con la llegada de las lluvias, los adultos emergen y se dispersan por el cafetal, atacando frutos sanos (3, 7)

El control de la broca requiere de un enfoque integral, en el cual se consideran todos los métodos de control disponibles que sean compatibles, que disminuyan la plaga de una manera armoniosa y eviten la contaminación del ambiente (8). Es así como se ha implementado un manejo integrado de la broca que incluye componentes culturales, químicos y biológicos.

Los nematodos entomopatógenos hacen parte de la estrategia de control biológico de la broca, no solo porque son habitantes naturales del suelo, sino también por la capacidad que tienen para detectarla en el suelo y desplazarse hacia el interior de frutos infestados, causando mortalidad del insecto y reproduciéndose en éste (2, 11, 18, 20, 24). Dentro de este grupo de parásitos, son los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* los que tienen las especies que se han detectado como agentes de control biológico promisorios contra muchas plagas, en numerosas partes del mundo (33, 34). Las especies de estos géneros reportadas para Colombia son *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (9), *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 cepa Villapinzón (31) y *S. kraussei* (Steiner 1923) (12). Trabajos adelantados en Cenicafé, reportan el hallazgo de dos especies de *Heterorhabditis* y cuatro de *Steinernema*, nuevas para la ciencia, y el primer registro en Colombia de *S. websteri* (21). Recientemente, en el país se describió una nueva especie *S. colombiense* (22), la cual junto con *H. bacteriophora* cepa Fresno <sup>1</sup>, son las especies nativas más evaluadas sobre la broca del café y que han mostrado ser promisorias para el control de poblaciones del insecto en el campo, por su gran capacidad de búsqueda, alta virulencia y multiplicación sobre la broca (20).

Ante la necesidad de contar con una alternativa efectiva, que controle las poblaciones de la broca en el suelo, y frente a la expectativa del uso de los nematodos entomopatógenos como herramienta prometedoras para tal fin, se realizó el presente trabajo en el laboratorio, en donde se evaluó el efecto de siete nuevos aislamientos en el desplazamiento hacia frutos de café infestados, la mortalidad en larvas y adultos y el efecto en la eclosión de los huevos de la broca del café.

<sup>1</sup>LÓPEZ N., J.C. 2007. Informe Anual de Actividades. Disciplina de Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafe. Chinchiná, Caldas (Colombia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de la Disciplina de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé, ubicado en el municipio de Chinchiná (Caldas), con una temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa del 80%, entre los meses de noviembre de 2006 y junio de 2007.

Se seleccionaron nueve cepas de nematodos procedentes de la zona cafetera colombiana (Tabla 1). Seis de ellas correspondieron a especies nativas nuevas, aún por describir. Se utilizaron como testigos las especies *Steinernema colombiense* y *Heterorhabditis bacteriophora* cepa Fresno.

Los nematodos se multiplicaron mediante infección tópica individual, en larvas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), obtenidas directamente de la colonia mantenida en el laboratorio de Entomología de Cenicafé, siguiendo la metodología de López (20).

Los estados de broca y los frutos infestados con este insecto fueron suministrados por el laboratorio Biocafé, ubicado en las instalaciones de Cenicafé. Para esto se infestaron frutos de café de 190 días de desarrollo fisiológico, con cuatro adultos de broca por cada fruto, donde se reprodujo el insecto durante 30 días.

Este trabajo se realizó en dos etapas. En la primera, se evaluó la mortalidad de larvas y adultos de la broca y el efecto en la reducción de la eclosión de huevos; y en la segunda, se evaluó el desplazamiento de los nematodos entomopatógenos desde su punto de liberación hasta el interior de un fruto de café infestado con broca.

### **Etapa 1. Mortalidad de los nematodos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *H. hampei***

Los estados de desarrollo de la broca evaluados fueron: huevos, larvas y adultos. La unidad de observación estuvo constituida por 24 individuos de broca, colocados en pozos individuales de una caja multipozo,

**Tabla 1.** Nematodos entomopatógenos nativos recolectados en diferentes departamentos de Colombia, evaluados sobre la broca del café.

Código de Cepa	Género	Departamento (Estación Experimental)
JCL0241	<i>Steinernema</i> sp 1	Quindío (Paraguaicito)
JCL0071	<i>Steinernema</i> sp 2	Caldas (Naranjal)
JCL0021	<i>Steinernema</i> sp 3	Risaralda (La Catalina)
JCL0041	<i>Steinernema</i> sp 3	Caldas (Cenicafé)
JCL0271	<i>Steinernema</i> sp 3	Cundinamarca (Santa Bárbara)
JCL0061	<i>Steinernema websteri</i>	Caldas (Naranjal)
JCL0031	<i>Heterorhabditis</i> sp 1	Risaralda (La Catalina)
SNI01982	<i>Steinernema colombiense</i>	Quimbaya, Quindío
HNI01001	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Fresno, Tolima

<sup>1</sup>(21); <sup>2</sup>(22)

donde en cada pozo se colocaron diez juveniles infectivos (JI) de los nematodos entomopatógenos, en 10 µl de agua estéril, con la ayuda de una micropipeta de 100 µl (Nichipet®). Cada pozo contenía doble papel filtro Whatman No. 1. Por cada estado de broca evaluado se tuvo un control, al cual solamente se le aplicó agua estéril. Se tuvieron diez unidades de observación por cada nematodo entomopatógeno evaluado y por cada estado de desarrollo de la broca. Las unidades de observación se sellaron con papel parafinado y junto con una toalla de papel húmeda se depositaron en una bolsa plástica para evitar desecación. Finalmente todas las unidades de observación, se incubaron a 23±2°C en oscuridad constante, durante el periodo de la evaluación.

Una vez se determinaron el número de huevos no eclosionados y el número de larvas y adultos de broca muertos por unidad de observación, se estimaron los porcentajes de huevos no eclosionados y de mortalidad para cada estado evaluado. Como variable complementaria, se tuvo el número de juveniles infectivos (JI) del nematodo entomopatógeno emergidos, de los individuos muertos.

La evaluación de la variable de respuesta se realizó cada 24 horas, durante tres días para larvas y durante cinco días para huevos y adultos. Como evidencia de la muerte de los estados, se tomó la carencia de movimiento al toque con un pincel y para los huevos la eclosión.

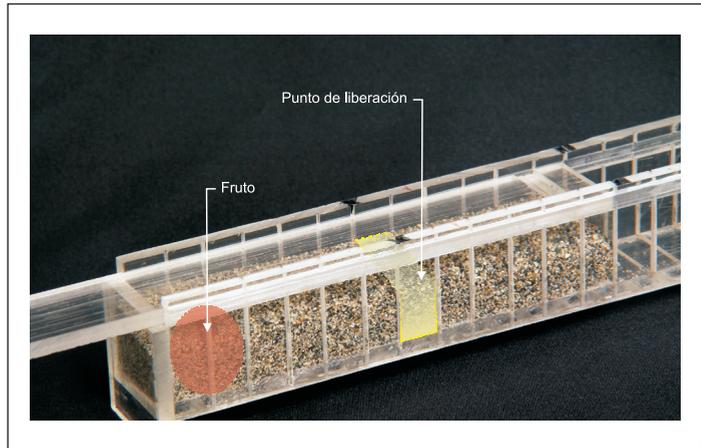
Para la evaluación de la variable complementaria, de cada unidad de observación y por nematodo entomopatógeno, se seleccionó la mitad de los insectos muertos diariamente, los cuales se colocaron individualmente en cámara "White" modificada, donde se recolectaron los JI una vez emergieron del insecto, contando la totalidad de estos. Esta evaluación se realizó hasta 20 días después de la muerte de los insectos.

## **Etapas 2. Desplazamiento de los nematodos entomopatógenos hacia un fruto infestado con broca**

Se evaluó el desplazamiento de los nematodos entomopatógenos desde su punto de liberación hasta el interior de un fruto maduro de café infestado con broca. La unidad de observación consistió en una cámara de acrílico (2 cm de ancho, 2 cm de alto y 12 cm de largo), la cual se llenó con 65 g de arena, con un tamaño de partícula entre 480 y 500 mesoporos, previamente esterilizada y con una humedad del 12%, según metodología de Hamblin (17). A 5 cm del punto de liberación del nematodo entomopatógeno, se depositó un fruto maduro infestado con una broca (Figura 1), y por cada nematodo entomopatógeno evaluado, se utilizó una concentración de 1.000 JI por 100 ml de agua estéril. Como control se utilizó agua sin nematodos, bajo las condiciones descritas anteriormente. Por cada nematodo entomopatógeno se tuvieron diez unidades de observación. Las cámaras se sellaron con papel parafinado (Parafilmâ) y se incubaron a 23±2°C, durante cinco días en oscuridad constante.

Como variable de respuesta se consideró el número de nematodos entomopatógenos que se desplazaron y entraron al fruto, al igual que el número de brocas muertas; con esta última información se estimó el porcentaje de mortalidad dentro del fruto. La evaluación se realizó cinco días después de la aplicación de los nematodos entomopatógenos. Pasado este tiempo, se extrajo el fruto de la cámara y se lavó tanto externa como internamente; con el agua que sirvió para lavar el fruto, se determinó el número de nematodos que lograron alcanzar e ingresar al fruto. Paralelamente al disecar el fruto, se determinó el número brocas y su estado, vivo o muerto, al igual que la presencia de JI u otro estado del nematodo al interior de las brocas muertas.

**Figura 1.**  
Cámara para la evaluación del desplazamiento de los nematodos entomopatógenos desde el punto de liberación hacia el fruto infestado con *H. hampei*



Como variable complementaria, por cada nematodo entomopatógeno evaluado, se determinó el número de JI que se desplazaron hacia el fruto con broca y aquellos que se quedaron en el punto de aplicación o que no se desplazaron. Para esto, se dividió la cámara en tres secciones, por medio de acetatos, así: 1) Sección del punto de liberación de los JI; 2) Sección comprendida entre el punto de liberación y el fruto; 3) Sección opuesta a la anterior que se dejó para dar libertad para el desplazamiento a los nematodos. A su vez, la Sección 2 se subdividió para cada uno de los 5 cm, desde el punto de liberación hasta donde estaba el fruto. Para cada sección, se hizo el recuento de JI, agregando en un beaker de 100 cc, 40 ml de agua estéril a la arena de cada sección y tomando de esta mezcla diez muestras de 1 ml, previamente agitadas. De esta forma, se estimó el número de JI recuperados por gramo de arena.

### **Análisis estadístico**

Con las variables de respuesta y complementarias se hizo la estimación de las medidas de tendencia central, de variabilidad (error estándar, coeficiente de variación) y el

límite inferior y superior, para el promedio con un coeficiente de confianza del 95% y prueba de comparación de promedios Duncan al 5%. Cuando los promedios de las cepas fueron diferentes al testigo se procedió a corregir la mortalidad de cada estado con la fórmula de Abbot (1).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Fase 1. Mortalidad de los nematodos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *H. hampei***

Para el estado de huevo no hubo diferencias estadísticas en el porcentaje de eclosión entre los nematodos entomopatógenos evaluados y el control ( $P > 0,05$ ). El porcentaje de huevos no eclosionados osciló entre 31,7% y 24,2% (Tabla 2); éstos fueron disecados y no contenían nematodos entomopatógenos en su interior.

Los nematodos entomopatógenos no presentaron efecto en la reducción de la eclosión de los huevos; sin embargo, 24 horas después de la aplicación, se observó que los

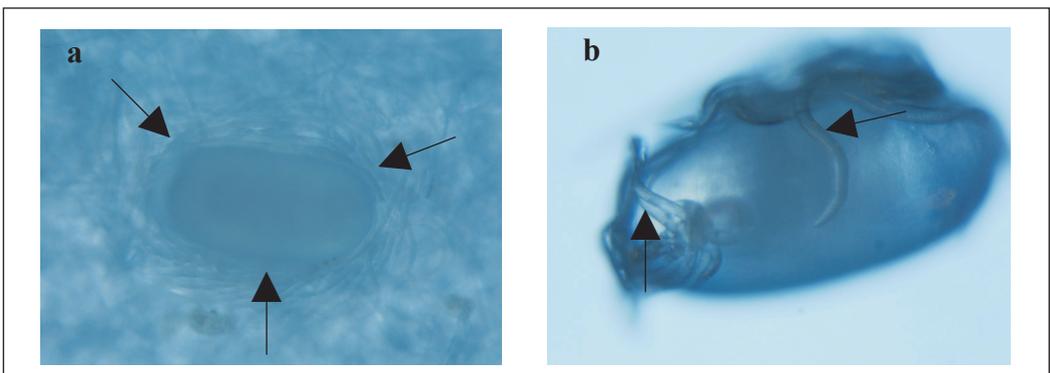
**Tabla 2.** Porcentaje de huevos de *H. hampei* no eclosionados, cinco días después de la aplicación de los nematodos entomopatógenos

Código de Cepa	Género	Promedio de no eclosión (%)	C.V.
JCL024	<i>Steinernema</i> sp 1	24,2	26,70
JCL007	<i>Steinernema</i> sp 2	26,2	38,20
JCL002	<i>Steinernema</i> sp 3	26,7	48,40
JCL004	<i>Steinernema</i> sp 3	27,9	34,50
JCL027	<i>Steinernema</i> sp 3	31,7	36,30
JCL006	<i>Steinernema websteri</i>	27,1	36,40
JCL003	<i>Heterorhabditis</i> sp 1	31,7	28,55
SNI0198	<i>Steinernema colombiense</i>	28,3	30,84
HNI0100	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	29,2	26,08
Control		26,7	27,75

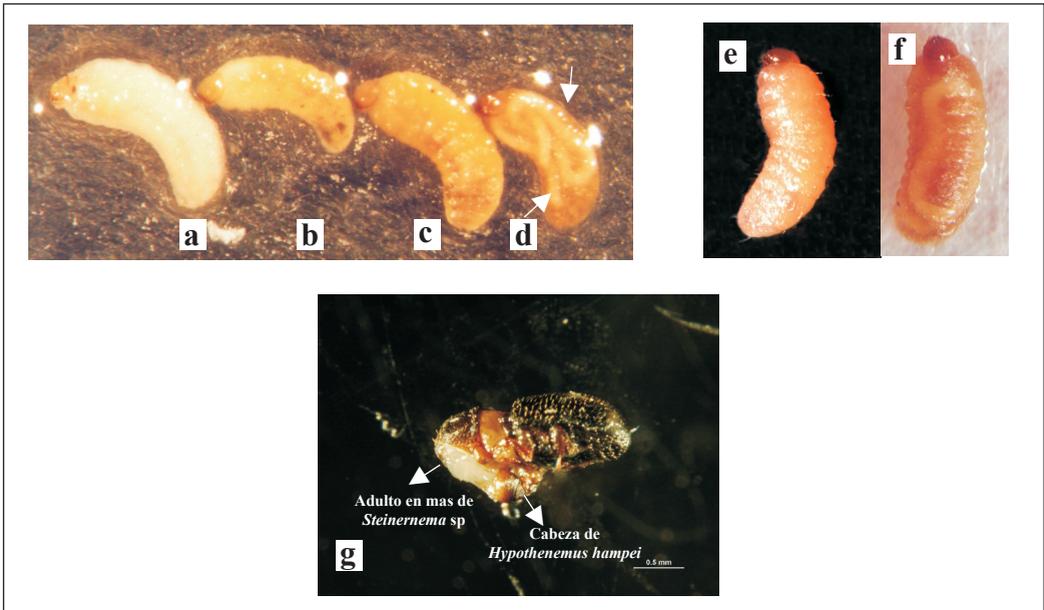
JI se ubicaron alrededor y sobre la superficie del huevo (Figura 2), lo que sugiere que se vieron atraídos hacia éstos pero tuvieron limitación para su entrada, posiblemente por las características morfológicas del huevo en relación con la dureza de la envoltura coriónica que lo protege del ataque de patógenos (23).

Bajo las condiciones de bioensayo evaluadas, el estado larval de *H. hampei* fue el más susceptible al ataque de todas las cepas de

nematodos. En este estado los nematodos lograron completar las etapas de parasitismo, desarrollo y multiplicación, evidenciando la coloración y signos de la infección característicos para cada género evaluado (Figura 3). A diferencia de lo anterior, los adultos de *H. hampei* que fueron infectados no exhibieron esta coloración diferencial, pues su tonalidad oscura impidió apreciar fácilmente el cambio de color; sin embargo una característica que se observó para algunos de estos adultos, fue la separación



**Figura 2.** Atracción de los nematodos entomopatógenos hacia el huevo de la broca. **a.** Vista superior de huevo de *H. hampei* en papel filtro; las flecha señalan las masas de JI de *Steinernema* sp1, siendo atraídos y circundando un huevo de broca. **b.** Vista lateral de huevo de *H. hampei*; las flechas señalan algunos JI que siendo atraídos, han saltado sobre el huevo de *H. hampei*.



**Figura 3.** Desarrollo de los signos de infección por nematodos entomopatógenos en larvas tardías y adultos de *Hypothenemus hampei*. **a.** larva sana; **b-d.** Larvas infectadas por *Steinernema* sp. El cadáver se torna de amarillo a beige por la multiplicación del simbionte *Xenorhabdus* sp., las flechas en **d.**, indican el desarrollo de hembras adultas de primera generación. **e-f.** Larvas infectadas por *Heterorhabditis* sp., la coloración de la larva se torna rojiza por la multiplicación de su simbionte *Photorhabdus* sp., se observa el desarrollo de adultos hermafroditas el interior de la larva (**f**); **g.** adulto de *H. hampei* parasitado por *Steinernema* sp., se observa desprendimiento de la cabeza por desarrollo de estados adultos al interior del cadáver del insecto.

de la cabeza del tórax, seguramente debido a la presión generada por el aumento del tamaño del nematodo durante su desarrollo (Figura 3).

Con el objeto de conocer la eficacia de cada nematodo evaluado sobre larvas y adultos, el porcentaje de mortalidad para cada tiempo y tratamiento, se corrigió de acuerdo con la fórmula de Abbot (Tablas 3 y 4).

El análisis de varianza para el porcentaje de mortalidad de larvas, mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), para cada tiempo de evaluación. Todos los tratamientos mostraron diferencias frente al testigo según la prueba de comparación de Dunnett (95%), y desde el inicio de la

evaluación a las 24 horas de acuerdo con la prueba de comparación de promedios (Duncan 95%), de manera consistente se destacan tres diferentes especies del género *Steinernema*, como los tratamientos que mayores porcentajes de mortalidad causaron sobre las larvas de broca. A las 72 horas de evaluación, esta diferencia en mortalidad es más notoria a favor de *S. websteri*, *S. colombiense* y *S. sp1*, presentando valores superiores al 88% de mortalidad (Tabla 3). Para este mismo tiempo de evaluación, se destacan las especies *S. sp2* y *S. sp3* de *Steinernema* que causaron mortalidades del 75%, siendo diferentes estadísticamente del grupo que mayor mortalidad causó.

**Tabla 3.** Promedio ( $\bar{x}$ ) y error estándar (E.E.) para la mortalidad corregida de larvas de *H. hampei*, en tres tiempos, para cada una de las cepas de entomonematodos evaluadas.

Código de Cepa	Género	Mortalidad (%)					
		24 horas		48 horas		72 horas	
		$\bar{x}$	E.E	$\bar{x}$	E.E	$\bar{x}$	E.E
JCL006	<i>S. websteri</i>	78,6 a	1,7	85,7 a	2,3	91,2 a	2,1
SNI0198	<i>S.colombiense</i>	64,3 bc	3,3	82,8 ab	3,4	90,5 a	4,0
JCL024	<i>Steinernema</i> sp 1	71,4 ab	3,5	79,8 ab	2,7	87,6 a	2,7
JCL002	<i>Steinernema</i> sp 3	62,9 bc	3,2	75,9 bc	2,5	83,9 ab	2,6
JCL027	<i>Steinernema</i> sp 3	32,1 d	3,2	56,2 d	4,6	79,6 ab	2,8
JCL007	<i>Steinernema</i> sp 2	56,7 c	3,8	67,5 c	2,8	75,2 b	2,2
JCL004	<i>Steinernema</i> sp 3	32,1 d	3,6	58,1 d	3,0	75,2 b	5,6
JCL003	<i>Heterorhabditis</i> sp 1	13,8 e	1,5	23,6 e	2,7	41,6 c	4,1
HNI0100	<i>H.bacteriophora</i>	10,7 e	2,7	24,6 e	2,3	36,5 c	6,5
Prob > F**		< 0,0001		< 0,0001		< 0,0001	

\*Letras no comunes indican diferencia estadística entre promedios de cepas, de acuerdo con la prueba de Duncan.

**Tabla 4.** Promedio ( $\bar{x}$ ) y error estándar (E.E.) para la mortalidad corregida de adultos de *H. hampei*, en cinco tiempos, para cada una de las cepas de entomonematodos evaluadas.

Código de Cepa	Género	Mortalidad (%)									
		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas	
		$\bar{x}$	E.E.	$\bar{x}$	E.E.	$\bar{x}$	E.E	$\bar{x}$	E.E	$\bar{x}$	E.E
HNI0100	<i>H. bacteriophora</i>	7,9 a	1,6	12,7 ab	2,4	15,2 ab	3,7	21,0 a	4,3	24,6 a	4,0
JCL002	<i>Steinernema</i> sp 3	0,0 c	0,0	12,7 ab	2,6	13,5 abc	3,6	20,0 a	3,5	23,2 a	4,6
JCL003	<i>Heterorhabditis</i> sp 1	10,4 a	2,6	14,8 a	3,0	17,4 a	2,2	21,8 a	2,2	22,3 a	2,3
JCL006	<i>S. websteri</i>	1,7 bc	1,1	9,8 abc	3,0	17,0 a	4,9	19,6 a	5,4	20,1 a	5,9
JCL024	<i>Steinernema</i> sp 1	0,4 bc	0,4	5,5 bcd	1,9	10,9abc	4,6	10,9 ab	4,5	12,5 ab	4,6
JCL004	<i>Steinernema</i> sp 3	0,4 bc	0,4	4,7 cd	1,3	9,1 abc	3,6	12,0 ab	3,7	12,5 ab	3,8
JCL027	<i>Steinernema</i> sp 3	4,2 b	1,5	9,3 abc	3,4	10,4 abc	3,8	11,1 ab	3,7	12,1 ab	4,5
JCL007	<i>Steinernema</i> sp 2	1,3 bc	0,9	4,2 cd	1,6	4,4 bc	1,7	4,4 b	2,0	4,5 b	1,7
SNI0198	<i>S. colombiense</i>	0,0 c	0,0	0,0 d	0,0	2,6 c	1,5	2,7 b	1,7	3,6 b	1,9
Prob > F **		< 0,0001		< 0,0003		< 0,0319		< 0,0005		< 0,0001	

\*Letras no comunes indican diferencia estadística entre promedios de cepas, de acuerdo con la prueba de Duncan.

Adicionalmente, el análisis de comparación mostró que las dos especies evaluadas del género *Heterorhabditis* (*H. bacteriophora* y *H. sp1*), causaron mortalidades inferiores al 42% y su efecto de baja virulencia sobre larvas, es consistente durante los tres tiempos de evaluación (Tabla 3). Bajo las condiciones de bioensayo en que se realizó el experimento, las especies de *Steinernema* causaron mayor mortalidad en larvas de broca, que las de *Heterorhabditis*. La presencia de *S. colombiense* (SNI0198), en el grupo de mayor virulencia, se reporta en trabajos previos en los que se ha podido determinar su efecto patogénico sobre la broca del café (18, 20, 22); no obstante, con estos resultados se comprueba la existencia de otros aislamientos con igual o mayor virulencia sobre larvas de la broca.

En cuanto al efecto de los nematodos sobre la mortalidad de los adultos de la broca, los resultados mostraron valores menores en comparación con la mortalidad causada en larvas, y no superaron el 25%. El análisis de varianza para el porcentaje promedio de mortalidad corregida de adultos, mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), en todos los tiempos de evaluación (Tabla 4).

Todos los tratamientos mostraron diferencias frente al testigo según la prueba de comparación de Dunnett (95%), y bajo la prueba de comparación de promedios de Duncan (95% de confiabilidad), se presentaron diferencias entre tratamientos para todos los tiempos de evaluación (Tabla 4). Cabe destacar, que para las 96 y 120 horas de evaluación las mayores mortalidades las causaron las dos especies evaluadas de *Heterorhabditis*, *Steinernema websteri* y un aislamiento de *S. sp3* (JCL002), con porcentajes de mortalidad superiores al 20%. Para este mismo lapso, dos especies de *Steinernema* (*S. colombiense* y *Steinernema Sp2*), causaron porcentajes de mortalidad que no superaron el 5% (Tabla 4).

En contraste con el efecto de los nematodos sobre larvas de broca, bajo las condiciones en que se realizó el experimento, no se destacó ningún género evaluado en cuanto a virulencia sobre adultos. Dentro de los factores que afectan la efectividad de un nematodo entomopatógeno, las inherentes al hospedero, como son las leves variaciones morfológicas o reducción de las aberturas naturales, por las que el nematodo accede a su hospedero, son barreras físicas durante la infección (16). Para el caso del estado adulto de la broca del café, los pequeños espiráculos escondidos debajo de los élitros, boca con mandíbulas grandes y ano estrecho (30), con deyecciones continuas, además de su gran movilidad, a diferencia de las condiciones sésiles de la larva, son razones por las que este estado del insecto se resiste al ataque del nematodo, sin lograr una infección exitosa y con bajas mortalidades. Este efecto se encontró de la misma forma en otros Curculionidae como *Cosmopolites sordidus*, cuyos estados inmaduros resultaron ser más susceptibles que los adultos, al ataque de los nematodos, al requerir más de 15 días de continua exposición para alcanzar la mayor mortalidad (94%) (35).

Se observó un efecto diferencial del efecto de las cepas de nematodos entomopatógenos sobre la mortalidad de larvas y adultos de broca, especialmente cuando se compararon por género. Todos los nematodos evaluados de *Steinernema* causaron mortalidades mayores del 75% a las larvas de broca del café, y solamente dos aislamientos de este género, se ubicaron en el grupo que mayor mortalidad causó en adultos; en contraste con *Heterorhabditis*, cuyas dos cepas evaluadas se ubicaron en el grupo que causó la mayor mortalidad sobre los adultos de broca. Esto se podría explicar bajo las diferencias morfológicas de los estados infectivos para cada género, debido a que en las especies de *Heterorhabditis* los JI cuentan con una estructura quitinosa,

a manera de diente, con la cual raspan y atraviesan la cutícula del hospedero y entran directamente en su cavidad hemocélica (4). Estas diferencias en la acción de los nematodos entomopatógenos sugieren que podría existir una relación específica entre estos organismos y el estado de desarrollo del hospedero (32), cuyo entendimiento es necesario para hacer una correcta selección de un nematodo como agente de control de una plaga en particular (5). Poinar (27) afirma que estas diferencias pueden estar dadas por distintos mecanismos de entrada de los nematodos entomopatógenos al hospedero, como también por posibles estrategias de defensa del insecto y las condiciones ambientales en las que se encuentre.

Desde el punto de vista del hospedero, los resultados de la susceptibilidad de los diferentes estados de *H. hampei* pueden explicarse a partir de diferencias en su morfología. Las larvas favorecen la entrada de los JI, debido a que su cutícula es más blanda y los espiráculos se encuentran más expuestos (29, 30), a diferencia de los huevos y los adultos, que limitan su entrada al poseer una envoltura coriónica y cutícula más resistentes, actuando como barrera física ante la penetración del nematodo (23).

Esta condición de las larvas, en este estudio se refleja tanto en la alta mortalidad presentada, como en la capacidad de desarrollarse y multiplicarse a partir de las larvas parasitadas. En este experimento, aunque el número de JI producidos por larva no presentó diferencias entre tratamientos (Anova  $P = 0,6$ ), todas las especies se multiplicaron en las larvas de broca con valores máximos de 192 JI/larva (para *Steinernema* sp3: JCL027) y mínimo de 122 JI/larva (para *Steinernema* sp3: JCL004), con errores estándar de 29 y 30 JI / larva, respectivamente. Este proceso ocurrió en un lapso de 8 a 13 días después de la muerte de la larva, tiempo similar al

encontrado por Allard y Moore (2), y su variación dependió del número de estados infectivos que lograron desarrollarse hasta su estado adulto.

## **Fase 2. Desplazamiento de los nematodos entomopatógenos hacia un fruto infestado con broca**

La evaluación del número de nematodos que se desplazaron hacia los frutos se determinó a partir del número de JI encontrados en la arena, en el centímetro próximo donde se encontraba el fruto, y el número de nematodos entomopatógenos encontrados dentro de los estados muertos de la broca, esto debido a que no se encontraron nematodos libres en los frutos.

Bajo las condiciones en que se condujo el bioensayo, todos los nematodos evaluados se desplazaron a lo largo de las secciones de la cámara y fueron atraídos hacia el fruto brocado (Tabla 5), con diferencias significativas entre tratamientos. No obstante, al observar el promedio del porcentaje de mortalidad causado por cada nematodo, se destacan las mortalidades entre el 98% y 100% con las dos cepas de *Heterorhabditis* y los *Steinernema* *S. sp2*, *S. sp3* (JCL002) y *S. websteri*. Lo anterior permite pensar que este grupo de nematodos presenta una rápida atracción y por consiguiente una mayor velocidad de desplazamiento hacia la fuente, que en este caso fue el fruto infestado con broca, debido a que en el mismo lapso alcanzaron el fruto, ubicado a 5 cm de distancia, y lograron matar la población de broca presente en el interior de estos frutos. Es importante anotar que el testigo no presentó mortalidad de estados de la broca al interior del fruto. El único aislamiento que presentó diferencias estadísticas, con el grupo de mayor atracción fue *S. colombiense*; los resultados para este nematodo pueden interpretarse como la lenta respuesta del nematodo al estímulo

**Tabla 5.** Número promedio ( $\bar{x}$ ) y coeficientes de variación (C.V.) de Juveniles Infecciosos que se desplazaron hacia el fruto de café infestado con broca y porcentaje de mortalidad de *H. hampei* dentro del fruto, después de 5 días de la aplicación de los nematodos.

Código de Cepa	Género	JI / fruto		Mortalidad (%)	
		$\bar{x}$	C.V.	$\bar{x}$	C.V.
JCL024	<i>Steinernema</i> sp 1	94 a	48	94,4 a	17,6
JCL027	<i>Steinernema</i> sp 3	84 ab	21	89,3 ab	15,3
JCL006	<i>Steinernema websteri</i>	75 bc	12	98,2 a	5,10
JCL003	<i>Heterorhabditis</i> sp 1	73 bc	13	100 a	0,00
HNI0100	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	73 bc	11	100 a	0,00
SNI0198	<i>Steinernema colombiense</i>	66 bc	11	82,6 b	29,0
JCL007	<i>Steinernema</i> sp 2	64 c	7	100 a	0,00
JCL004	<i>Steinernema</i> sp 3	64 c	14	92,6 ab	14,7
JCL002	<i>Steinernema</i> sp 3	60 c	15	100 a	0,00

\*Letras no comunes indican diferencia estadística entre promedios de cepas, de acuerdo con la prueba de Duncan.

quimiotáctico generado por el fruto infestado, la cual se vio reflejada en la disminución de la mortalidad de los estados al interior del fruto.

La capacidad de los JI de buscar y encontrar a su hospedero, ha sido registrada por varios autores. Steiner (34), al evaluar la dispersión de diferentes aislamientos de steinernematidos y heterorhabditidos, observó un comportamiento diferencial una vez el JI había hallado al hospedante. Gaugler y colaboradores (15), encontraron que el 8% de los JI, de 22 cepas de nematodos entomopatógenos, localizaron el insecto en una hora a una distancia de 3,5 cm. Corredor *et al.* (13), indicaron que el 50% de los JI de *S. feltiae*, se desplazaron 3 cm después de 3 horas. Molina y López (24) encontraron que las especies exóticas *S. feltiae* y *H. bacteriophora* fueron atraídas hacia el fruto de café infestado con broca, siendo mayor el desplazamiento de las especies de *Steinernema* que de aquellas de *Heterorhabditis*, después de siete días.

Todas las estrategias utilizadas por estos nematodos para la búsqueda de hospedantes, diferenciándolos como emboscadores o cruceros, de acuerdo con su comportamiento frente al insecto, son detalladamente relacionados por Campbell y Kaya (10), quienes hacen énfasis en que la respuesta al estímulo químico puede variar de una especie de nematodo a otra, lo que resulta relevante en el momento de seleccionar acertadamente un nematodo para el control de una plaga determinada. En este sentido, los resultados encontrados ratifican la necesidad de que la selección de los nematodos que se puedan considerar para el control de la broca, incluyan condiciones de búsqueda activa de la broca refugiada en los frutos de café, para causar en corto tiempo epizootias al interior de éstos.

Con esta investigación, se comprueba la existencia de nuevos aislamientos con igual o mayor efectividad que los que se han utilizado hasta el momento (*S. colombiense* y *H. bacteriophora*), para el control de la broca del café.

Con base en algunos criterios de selección como mortalidad sobre larvas y adultos, multiplicación, capacidad de desplazamiento y búsqueda de broca en frutos infestados, fueron seleccionados *S. websteri*, *S.sp3* (JCL002, JCL027) y *Heterorhabditis* Sp1, como las cepas con mejores atributos. Lo anterior, abre un abanico de candidatos para el uso de especies nativas, surgiendo la necesidad de realizar estudios para evaluar su efectividad en diversas condiciones ambientales, tipos de suelo, densidades de poblaciones de la plaga, su efecto con otros agentes de control y estrategias de aplicación, para aumentar su eficacia y disminuir los costos de su uso en el campo.

### AGRADECIMIENTOS

A la Federación Nacional de Cafeteros y al Centro Nacional de Investigaciones de Café, al señor Óscar Gómez de Biocafé por su permanente colaboración y suministro de material, a los auxiliares de Entomología Diana Rodríguez y Arturo Gómez por su respaldo en los trabajos de laboratorio, a los Doctores Alex Bustillo y Esther Montoya por la asesoría en la investigación y a los revisores anónimos del manuscrito por los importantes aportes. Esta investigación fue financiada por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia en el experimento ENT1706 de Cenicafé.

### LITERATURA CITADA

1. ABBOT, W.S. A method for computing the effectiveness of insecticides. *Journal of economic entomology* 18:256-257. 1925.
2. ALLARD, G.B.; MOORE, D. *Heterorhabditis* sp. nematodes as control agents for coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Scolytidae). *Journal of invertebrate pathology* 54:45-48. 1989.

3. BAKER, P.S.; [et al.]. Abiotic mortality factors of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Entomologia experimentalis et applicata* 71:201-209. 1994.
4. BEDDING, R.A.; MOLYNEUX, A.S. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (*Heterorhabditidae*: *Nematoda*). *Nematologica* 28:354-359. 1982.
5. -----; [et al.]. *Heterorhabditis* spp., *Neoplectana* spp. and *Steinernema krausseri*: Interspecific and intraspecific differences in infectivity for insects. *Experimental parasitology* 55:249-257. 1983.
6. BERNALU., M.G.; [et al.]. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre poblaciones de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) que emergen de frutos en el suelo. *Revista Colombiana de Entomología* 25(1/2):11-16. 1999.
7. BUSTILLO P., A.E. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. Chinchiná : Cenicafé, 2002. 40 p. (Boletín Técnico No. 24).
8. -----; [et al.]. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Cali : Feriva, 1998. 134 p.
9. CAICEDO, A.M.; BELLOTI, A. Reconocimiento de nemátodos entomopatógenos nativos asociados con *Cirtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en ocho localidades de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 22:19-24. 1996.
10. CAMPBELL, J.F.; KAYA, H.K. How and why a parasitic nematode jumps. *Nature* 397:485-486. 1999.
11. CASTILLO, A. Evaluación de nemátodos entomopatógenos (*Rhabditida*: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferr. en Chiapas México. Turrialba : CATIE, 1995. 72 p. Trabajo de grado: *Magister scientiae*
12. CIAT. Soil pests cassava and other crops. [En línea]. p. 53-70. En: -----. Integrated pest and disease management in major agroecosystems. Cali : CIAT, 2004. 417 p. Disponible en internet: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/report\\_2004/ipm\\_2004\\_3.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/report_2004/ipm_2004_3.pdf). Consultado el 03/05/2011
13. CORREDOR, T.; [et al.] Avances en el estudio del comportamiento de *Steinernema feltiae* (Filipjev 1934) (*Rhabditida*: *Steinernematidae*). p. 2. En: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología (26 : Julio 28-30 1999 : Santafé de Bogotá).

14. DUQUE, H.O.; BAKER, P.S. Devouring profit: The socioeconomics of coffee berry borer IPM. Cali: Cenicafé: CABI, 2003. 106 p.
15. GAUGLER, R.; [et al.]. Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of invertebrate pathology* 54:363-372. 1989.
16. GREWAL, P.S.; [et al.]. Lawn, turfgrass and pasture applications. p. 115-146. En: -----, Nematodes as biological control agents. Wallingford : CABI, 528 p. 2005.
17. HAMBLIN, A.P. Filter-paper methods for routine measurement of field water potential. *Journal of hydrology* 53:355-360. 1981.
18. LARA, J.C.; [et al.]. Efecto de entomonematodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en frutos en el suelo. *Revista colombiana de entomología* 30(2):179-185. 2004.
19. LE PELLEY, R.H. Las plagas del café: Agricultura tropical. Barcelona : Labor, 1968. 693 p.
20. LÓPEZ N., J.C. Nematodos para el control de insectos plagas. p. 150-183. En: Bustillo P., A.E. Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchiná : CENICAFÉ, 2008. 466 p.
21. -----; [et al.]. Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the central andean region of Colombia. *Nematology* 9(3):333-341. 2007.
22. -----; [et al.]. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) from Colombia. *Nematology* 10(4):561-574. 2008.
23. MILLER, T.A. Cuticle techniques in arthropods. New York : Springer Verlag, 1980. 399 p.
24. MOLINA, J.P.; LÓPEZ N., J.C. Desplazamiento y parasitismo de entomonematodos hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Revista colombiana de entomología* 28(2):145-151. 2002.
25. MONTOYA R., E.C. Caracterización de la infestación del café por la broca y efecto del daño en la calidad de la bebida. *Cenicafé* 50(4):245-258. 1999.
26. OSORIO, N. The global coffee crisis: A threat to sustainable development. [En línea]. London : ICO, 2002. Disponible en internet: <http://www.ico.org/documents/globalcrisis.pdf>. Consultado el 30/05/2011
27. POINAR, G.O., Jr. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. p. 23-62. En: Gaugler, R.; Kaya, H.K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Florida : CRC Press, 1990. 277 p.
28. RAMÍREZ, G.; MORA, M. Boletín informativo: La broca del fruto del café nos amenaza. San José de Costa Rica : ICADE, 2001.
29. ROMOSER, W.S.; STOFFOLANO, J.G., Jr. The science of entomology. 4a. Ed. Boston : McGraw Hill, 1998. 605 p.
30. RUBIO G., J.D. Estudios morfológicos de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) en la búsqueda de estructuras de *Mycangia*. Manizales : Universidad de Caldas. Facultad de ciencias agropecuarias, 2003. 180 p. Trabajo de grado: Ingeniero agrónomo.
31. SÁENZ, A. *Steinernema feltiae* cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae) ciclo de vida, patogenicidad y métodos de cría. Santafé de Bogotá : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de agronomía, 1998. 125 p. Trabajo de grado: Maestría en ciencias agrarias.
32. SIMOES N.; ROSA, J.S. Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol science and technology* 6:403-411. 1996.
33. SMART, G.C. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of nematology* (Supl.) 27(4S):529-534. 1995.
34. STEINER, W.A. Dispersal and host-finding ability of entomopathogenic nematodes at low temperatures. *Nematologica* 42(2):243-261. 1996.
35. TREVERROW, N.L.; BEDDING, R.A. Development of system for the control of the banana weevil borer, *Cosmopolites sordidus* with entomopathogenic nematodes. p. 41-47. En: Bedding R.; [et al.]. Nematodes and the biological control of insect pest. Australia : CSIRO, 164 p. 1993.
36. VEGA, F.E.; [et al.]. Global project needed to tackle coffee crisis. *Nature* 425:343. 2003.