

MÉTODO DE LABORATORIO PARA EVALUAR EL EFECTO DE INSECTICIDAS SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ

Leidy Johana Tapias Isaza*; Claudia Patricia Martínez Díaz*; Pablo Benavides Machado**; Carmenza Esther Góngora Botero**

TAPIAS I., J.; MARTÍNEZ D., C.P; BENAVIDES M., P; GÓNGORA B., C.E. Método de laboratorio para evaluar el efecto de insecticidas sobre la broca del café. Revista Cenicafé 68(2):76-89. 2017

Continuamente se busca evaluar nuevos productos que ocasionen efectos adversos sobre la broca del café, tales como mortalidad y repelencia de adultos, disminución de la capacidad reproductiva o que afecten la metamorfosis de los estados inmaduros; sin embargo, los métodos de evaluación que se emplean actualmente permiten solamente evaluar el efecto en la mortalidad de adultos, lo que limita el uso de los productos que causan otros efectos. El propósito de este trabajo fue establecer metodologías en el laboratorio que permitan evaluar productos con diferentes efectos sobre la broca del café, de manera rápida y económica. Se plantearon dos metodologías que emplean frutos de café verde desinfectados. Para determinar el método de desinfección de los frutos, se evaluaron diferentes tratamientos, siendo el mejor el que consistió en sumergir los frutos en hipoclorito de sodio al 0,5% y después irradiarlos con luz UV durante 15 min. Además, se realizaron ensayos con la finalidad de establecer las condiciones de infestación óptimas para obtener frutos brocados con los adultos iniciando la penetración del fruto. Se determinó que transcurridas 5 h a 21°C se obtiene la mayor cantidad de frutos con esta condición. Una vez establecido el método de desinfección y las condiciones de infestación, se propusieron dos metodologías, una para evaluar sobre la broca del café el efecto de contacto directo de los productos y otra para evaluar el efecto de ingestión, las cuales permitirán realizar evaluaciones aproximadas a las condiciones reales de campo.

Palabras clave: *Hypothenemus hampei*, desinfección, metodología, café verde, infestación.

LABORATORY METHOD TO EVALUATE THE EFFECT OF INSECTICIDES ON COFFEE BERRY BORER

There is a permanent interest in evaluating new products that may cause adverse effects on coffee berry borer, such as mortality and repellence of adults, reduction of reproductive capacity or complications in the metamorphosis of immature states. However, the methods currently used allow to evaluate only the effect on the mortality of adults, which limits the use of products that cause other effects. The purpose of this research work was to establish laboratory methodologies to evaluate products with different effects on coffee berry borer, in a fast and cost-effective manner. Two methodologies that use disinfected green coffee beans are proposed. In order to determine the beans disinfection method, different treatments were evaluated, the best one consisted of immersing the beans affected by coffee berry borer in 0.5% sodium hypochlorite and then irradiating them with UV light for 15 minutes. In addition, tests were made to establish the optimal infestation conditions to obtain beans affected by adult coffee berry borers that are starting the drilling. After 5 h at 21° C the largest number of beans with this condition is obtained. Once the disinfection method and the infestation conditions were established, two methods were proposed: One to evaluate the effect of direct contact of the products on coffee berry borer and another one to evaluate the effect of ingestion; both of them will allow results resembling actual field conditions.

Keywords: *Hypothenemus hampei*, disinfection, methodology, green coffee, infestation.

* Asistente de Investigación e ** Investigador Científico III, respectivamente, Disciplina de Entomología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia

El control químico de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) se basa en el uso de insecticidas organofosforados y productos que contienen diamidas antranílicas (4, 6). A pesar de que éstos han sido eficaces (2, 3) y permiten la rotación con diferentes modos de acción para evitar la selección por resistencia en los insectos (22), la toxicidad de los organofosforados y su estatus actual en la producción agrícola mundial los hace susceptibles de ser restringidos en el futuro, por lo que se hace necesario ampliar las opciones de pesticidas para el control de la plaga. Para la evaluación de nuevos insecticidas se requiere de metodologías expeditas y económicas que permitan seleccionar productos rápidamente. Actualmente se usan procedimientos de laboratorio y campo empleando dietas artificiales conteniendo café (27, 29), realizando aspersiones sobre café pergamino seco (1, 2, 25) y usando mangas entomológicas sobre ramas con frutos (5, 34). Las dietas, a pesar de permitir la evaluación del efecto sobre todos los estados del insecto (27, 28), son costosas (30). El café pergamino facilita la evaluación de la capacidad reproductiva del insecto; sin embargo, la composición del pergamino difiere a la del pericarpio del fruto. Cuando se emplea café pergamino los granos de café son asperjados o sumergidos con la sustancia a evaluar; como la estructura y la composición del pergamino de la semilla es distinta al pericarpio del fruto, se esperaría que la interacción entre el insecticida y el café sea diferente. Con el café pergamino la molécula puede absorberse fácilmente y así generarse una mortalidad mayor a la que se presentaría en frutos de café. Además, el café pergamino es comparativamente caro y no es el sustrato natural del insecto (24). En el caso de la dieta artificial, el producto es adicionado a ésta, permitiendo la evaluación de los productos no solo en el insecto adulto sino también en el estado larval o huevos.

En este caso el insecto se ve obligado a permanecer, alimentarse y desarrollarse en la misma. Lastimosamente el costo de estas dietas es alto debido a sus componentes (30). Para evitar estos inconvenientes y si no existen limitaciones con respecto a la cantidad de producto a evaluar, algunos estudios se llevan a cabo en el campo, pero este método exige mano de obra y largos períodos de evaluación (3).

Una condición más próxima a la real, rápida y económica, requeriría usar frutos de café verdes o maduros; sin embargo, cuando se usan frutos provenientes del campo en el laboratorio, con frecuencia muestran altas contaminaciones y deshidratación, ya que en la epidermis del fruto del café están presentes microorganismos y ácaros (1, 24, 31). Debido a las dificultades para mantener la broca en los frutos de café frescos en el laboratorio, éstos aún no se usan para la evaluación de productos para el control de la broca del café, pero sí se usan para mantener crías del insecto, en estos casos existen procedimientos para la desinfección y conservación de los frutos, empleando combinación de diferentes agentes.

Las metodologías empleadas para incrementar la vida útil de los frutos durante su almacenamiento conllevan el uso de técnicas que impidan alteraciones del fruto y que disminuyan la carga y desarrollo microbiano, con el fin de mantener la calidad y propiedades de los productos. Con este fin, se utilizan desinfectantes como hipoclorito de sodio, cloruro de benzalconio y fungicidas, así como procedimientos con calor y radiación (1, 7, 13, 17, 24, 25, 31). Adicionalmente, los métodos para la evaluación de insecticidas en el control de la broca requieren simular que las hembras adultas estén volando en búsqueda de frutos o se encuentran penetrándolos (6, 10). Para esto se realizan infestaciones artificiales de los frutos en el campo (2, 3, 34).

Esta investigación empleando frutos de café verdes se realizó con el objetivo de estandarizar un bioensayo para la evaluación de productos con efecto de contacto y con efecto por ingestión, usados para el control de la broca del café bajo ambientes controlados que se asemejen a las condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el laboratorio de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café “Pedro Uribe Mejía” Cenicafé, ubicado en el municipio de Manizales (Caldas, Colombia), a 04° 59’ de latitud Norte, 75° 35’ de longitud Oeste y altitud de 1.413 m.

Para alcanzar el objetivo se realizaron dos evaluaciones, la primera con el fin de seleccionar un método de desinfección de frutos verdes de café y, la segunda, con el fin de estandarizar las condiciones de laboratorio para garantizar que las brocas hembras permanezcan en posición de entrada al fruto durante la aplicación de los tratamientos. Se utilizaron brocas hembras adultas recién emergidas, proporcionadas por el laboratorio Biocafé¹, los mismos días del montaje de los bioensayos. Estos adultos fueron desinfectados usando el protocolo de Bustillo y Marín (9), donde las brocas fueron sumergidas en solución de hipoclorito al 0,5% mientras se agitaron lentamente con un pincel durante 10 min, transcurrido este tiempo se filtraron con una tela muselina y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Se retiró el exceso de agua con toallas de papel estéril. Se usaron frutos verdes de árboles de café *C. arabica* Variedad Castillo®, con una edad de 120 a 150 días después de floración, conteniendo más del 20% de materia seca,

los cuales fueron recolectados en la Estación Experimental Naranjal (Cenicafé), ubicada en el municipio de Chinchiná (Caldas, Colombia), a 04° 58’ de latitud Norte, 75° 42’ de longitud Oeste y altitud de 1.400 m.

Selección del método de desinfección de frutos verdes

Para la selección del método de desinfección se realizaron dos bioensayos, en donde se evaluaron diferentes agentes desinfectantes y combinaciones de éstos.

Los bioensayos se realizaron en el laboratorio, donde fueron seleccionados frutos sanos y de tamaño uniforme, a los cuales se les retiró el pedúnculo, se lavaron con agua y jabón líquido y se secaron con toallas de papel. Estos frutos se dividieron en grupos y se sometieron a los diferentes tratamientos.

Bioensayo 1: Se evaluaron seis tratamientos, T1: irradiación con luz UV durante 24 h; T2: inmersión en hipoclorito 0,5% por 30 min + irradiación con luz UV durante 4 h; T3: inmersión en hipoclorito 0,5% por 30 min; T4: inmersión en carbendazim al 1,5% durante 8 h; T5: inmersión en cloruro de benzalconio al 2% durante 4 h; y T6: frutos sin tratar (control). La unidad experimental (UE) estuvo conformada por una caja plástica (20 cm x 30 cm) conteniendo 20 frutos de café y 40 adultos de broca.

Bioensayo 2: Se seleccionaron tres tratamientos, T1: irradiación con luz UV durante 4 h; T2: inmersión con hipoclorito 0,5% por 15 min + UV 15 min; y T3: frutos sin tratar (control). La UE estuvo conformada por una caja plástica (20 cm x 30 cm) conteniendo 30 frutos de café y 60 adultos de broca.

¹ <http://avispititas.blogspot.com.co/p/biocafe.html>

Una vez aplicados los tratamientos a los frutos, aquellos sumergidos en agentes químicos, fueron lavados con agua destilada estéril y secados con toallas de papel estériles. Posteriormente se conformaron las UE. Por tratamiento se tuvieron cinco UE, las cuales fueron ubicadas aleatoriamente en un estante en el laboratorio, bajo condiciones controladas de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad de $71 \pm 5\%$, con un fotoperíodo de 12 h. A los 20 días se registró el porcentaje de frutos con signos de necrosis (contaminación) y la mortalidad de adultos de broca por UE. Se disecaron los frutos y se contabilizaron en el interior los estados biológicos para determinar el número de estados de broca por fruto.

Como variables de respuesta se tomaron el porcentaje de mortalidad de adultos y el porcentaje de contaminación de los frutos. Como variable complementaria se determinó el promedio de estados inmaduros de broca por fruto.

El análisis estadístico consistió en estimar el promedio y el error estándar para cada tratamiento con todas las variables. Se realizó el análisis de varianza, bajo el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio al 5% y se aplicó la prueba Dunnett al 5%. Se seleccionó como mejor estrategia de desinfección aquella que presentara la menor mortalidad de adultos, la menor contaminación e implicara el menor tiempo de ejecución.

Estandarización de las condiciones de laboratorio que garantizaran obtener frutos infestados con adultos de broca en posición A

Se realizaron bioensayos para establecer las condiciones de laboratorio que permitieran obtener frutos infestados con una sola

perforación en el canal de entrada al fruto (Figura 1), para esto se realizaron tres bioensayos empleando frutos verdes desinfectados y a 66% de humedad relativa en el ambiente.

Bioensayo 3: Se realizaron infestaciones de 50 frutos con proporción de brocas a frutos de 2:1 y se evaluaron diferentes condiciones de temperatura y tiempo de infestación; T1: 21°C por 15 h; T2: 21°C por 6 h; T3: 25°C por 7 h; y T4: 27°C por 8 h.

Bioensayo 4: Se realizó la infestación de 100 frutos a 21°C , con proporción de brocas a frutos de 3:2. Las evaluaciones se realizaron transcurridas 5 y 6 h de infestación.

Bioensayo 5: Se validaron las condiciones de infestación, utilizando 90 frutos y se realizaron infestaciones en relación brocas a frutos de 4:3 y se dejaron a 21°C durante 5 h.

Se evaluaron tres repeticiones en cada bioensayo, para las cuales se usaron cajas plásticas de 20 cm x 30 cm, donde se depositaron los frutos y las brocas desinfectadas, en el número y proporciones descritas. Se evaluó el porcentaje de infestación de los granos, el número de perforaciones por fruto y la posición de las brocas en los frutos. Como variable de respuesta se tomó el porcentaje de frutos con una sola perforación en posición A.

El análisis estadístico consistió en estimar el promedio y el error estándar para cada tratamiento con la variable. Se realizó el análisis de varianza, bajo el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio al 5% y se aplicó la prueba Duncan al 5%. Se seleccionó como mejor condición aquella que presentara el mayor porcentaje de frutos con una sola perforación en posición A, de acuerdo a la Figura 1.

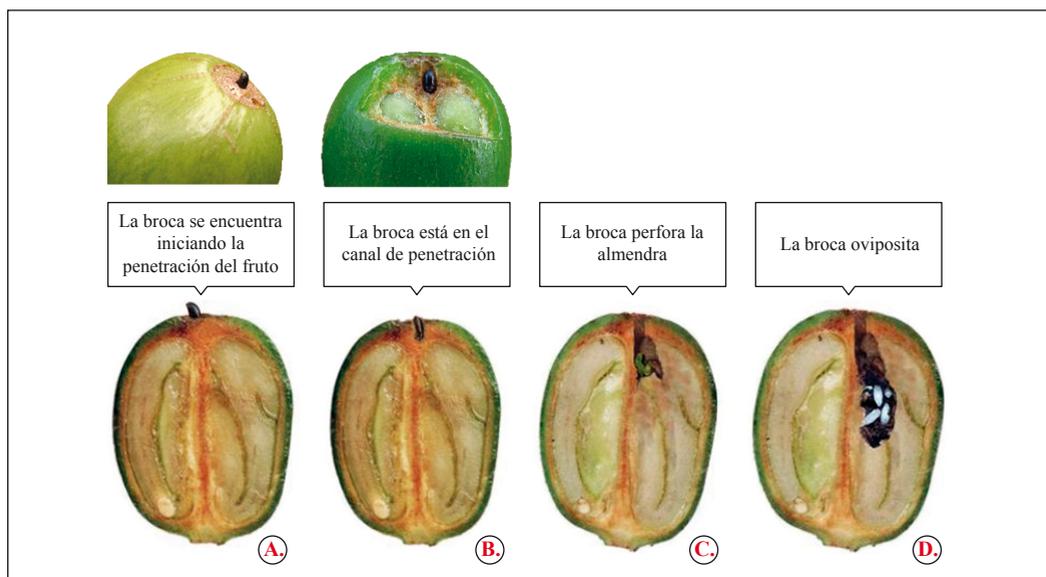


Figura 1. Posiciones de penetración de la broca en frutos de café.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del método de desinfección de frutos verdes

Biensayo 1: En la Tabla 1 se presentan los resultados de la evaluación de frutos expuestos a los diferentes tratamientos de desinfección respecto a las variables porcentaje de mortalidad de adultos, porcentaje de contaminación de los frutos y promedio de los estados de la broca por fruto, a los 20 días de infestación, en el bioensayo 1.

Con respecto a la variable porcentaje de contaminación, el análisis de varianza mostró diferencias entre tratamientos ($F = 12,38$; $P = 0,0001$); la comparación de Dunnett al 5% indicó que todos los tratamientos redujeron la carga microbiana con respecto al testigo. También se presentaron diferencias entre tratamientos con respecto a la variable porcentaje de mortalidad de adultos ($F = 11,13$; $P = 0,0001$), siendo el hipoclorito

al 0,5% y el carbendazim los que mayor mortalidad presentaron con respecto al testigo, mientras que los demás tratamientos ocasionaron una mortalidad comparable con la encontrada en el control, siendo ésta la condición deseada. En cuanto a la variable promedio de estados inmaduros de broca por fruto no hubo diferencias significativas ($F = 0,67$; $P = 0,65$) (Tabla 1), al evaluar el error tipo II, éste fue menor del 20%. Es decir, ninguno de los procedimientos aplicados afectó la capacidad reproductiva de las brocas que sobrevivieron.

La efectividad en la desinfección de los frutos con los tratamientos se debió a las propiedades de cada uno de los agentes empleados. En el caso del carbendazim, al ser un fungicida sistémico de rápida penetración, amplio espectro y efecto preventivo-curativo (14, 15), se evitó la proliferación y reproducción de hongos durante un tiempo prolongado; sin embargo, este tratamiento fue descartado ya que causó la muerte del 37% de los adultos.

Tabla 1. Efecto de los tratamientos de desinfección de los frutos en el desarrollo de la broca del café, después de 20 días de realizar la infestación con adultos del insecto. Biensayo 1.

Tratamiento	N	Contaminación (%)	E.E.	Mortalidad (%)	E.E.	N	Total estados de broca por fruto	E.E.
Irradiación con luz UV 24h	5	2% *	2%	16%	2%	64	7,8	1,1
Hipoclorito de sodio 0,5% + UV 4 h	5	9% *	2%	11%	3%	57	8,9	0,7
Hipoclorito de sodio 0,5%	5	8% *	4%	25% *	4%	64	7,3	0,9
Carbendazim 3%	5	0% *	0%	37% *	3%	59	7,2	1,6
Cloruro de benzalconio 2%	5	4% *	1%	22%	2%	61	7,2	0,9
Control	5	17%	3%	12%	2%	66	9,0	0,8

* Medias significativamente diferentes al control (Dunnet 0,05; $P \leq 0,05$). E.E.: Error Estándar.

De igual forma ocurrió con el tratamiento hipoclorito, éste afectó a los microorganismos, pero también a los insectos debido a su poder oxidante, que no solo promueve la inhibición enzimática irreversible por la sustitución de hidrógeno con cloro y la oxidación de los grupos sulfhidrilo (SH), sino que además ocasiona la degradación de lípidos (18). Por su parte, el cloruro de benzalconio se mostró efectivo en la desinfección de frutos, ya que es un bactericida y fungicida que inactiva las enzimas productoras de energía, desnaturaliza proteínas celulares esenciales y ocasiona la ruptura de la membrana celular de microorganismos (21); sin embargo, a pesar de la efectividad no se escogió por el riesgo que puede representar para la salud y el medio ambiente de acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1272/2008 (19).

La efectividad de los procedimientos en los que se irradió con luz UV se debe a daños directos e indirectos en el ADN de los microorganismos potenciales contaminantes de los frutos. El daño directo al ADN resulta de la formación de foto-productos tales como dímeros de pirimidinas, hidratos de pirimidina y entrecruzamientos entre ADN y proteínas.

El daño indirecto se debe a la aparición de peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radicales hidroxilos que oxidan la pentosa del ADN y rompen la hebra de la molécula (16). Ambos tipos de daño interfieren en la replicación normal del ADN y, finalmente, producen mutaciones o la muerte de la célula, dependiendo de la cantidad de energía recibida (12).

De acuerdo a los resultados se seleccionaron los tratamientos para el biensayo 2. Se disminuyó el tiempo de exposición de los frutos al UV de 4 h a 15 min, debido a que la irradiación por largo tiempo ocasionó necrosis en el fruto y deshidratación de las semillas.

Biensayo 2: En este bioensayo se presentaron diferencias estadísticas entre el control y los tratamientos con respecto a la variable porcentaje de contaminación de frutos ($F = 16,19$; $P = 0,0004$) (Tabla 2), mostrándose los dos tratamientos igualmente efectivos en la remoción de la carga microbiana en los frutos. Con respecto a la variable porcentaje de adultos muertos se presentaron diferencias con el tratamiento que contenía hipoclorito

Tabla 2. Efecto de los tratamientos de desinfección de los frutos en el desarrollo de la broca del café, después de 20 días de realizar la infestación con adultos del insecto. Biensayo 2.

Tratamiento	N	Contaminación (%)	E.E.	Mortalidad (%)	E.E.	N	Total estados de broca por fruto	E.E.
UV 4 h	5	5% *	1,3	8%	1,8	93	6,4	1,0
Hipoclorito 0,5% + UV 15'	5	6% *	1,2	5% *	2,0	97	6,5	0,7
Control	5	19%	2,9	17%	3,7	96	7,0	0,7

* Medias significativamente diferentes al control (Dunnet 0,05; $P \leq 0,05$). E.E.: Error Estándar.

(Tabla 2) ($F = 5,37$; $P = 0,0216$), siendo menor la mortalidad del insecto cuando se empleó este procedimiento, al ser comparado con el de 4 h de luz UV. El uso de hipoclorito y UV combinados fue el tratamiento que permitió tener más insectos adultos viables.

Con respecto al promedio de estados inmaduros de broca por fruto, tanto en los tratamientos como en el control, los resultados fueron similares ($F = 0,17$; $P = 0,846$) (Tabla 2). Los dos tratamientos fueron igualmente efectivos, por lo que se seleccionó la inmersión de los frutos por 15 min en hipoclorito de sodio al 0,5% seguida de irradiación con luz UV durante 15 min, como procedimiento de desinfección (Figura 2). Este método de desinfección no alteró las propiedades de los frutos dado que no se necrosaron, no afectó la viabilidad ni la capacidad reproductiva de la broca, al no disminuir los estados del insecto en los frutos, y puede garantizarse que no queden residuos de hipoclorito de sodio que interfieran con las sustancias a evaluar, debido a que la literatura reporta que la radiación UV degrada el ion hipoclorito (11, 20, 32) mediante la catálisis de reacciones en las que se produce oxígeno molecular y ion cloruro, o clorato y cloruro (23, 26), las cuales son menos reactivas y tóxicas (33).

Estandarización de las condiciones de laboratorio que garanticen la obtención de frutos infestados con adultos de broca en posición A

Establecido el método de desinfección de frutos se continuó con los bioensayos para determinar las condiciones de infestación en el laboratorio que permitieran obtener frutos con brocas hembras en posición de entrada.

Biensayo 3: En el bioensayo 3 los porcentajes de infestación, estuvieron entre 81% y 89%, para todos los tratamientos ($F = 2,87$; $P = 0,104$) (Tabla 3). Resultados comparables con los reportados por Bustillo *et al.* (8), quienes lograron niveles de infestación del 88% a 26°C, con una relación brocas a frutos de 2:1.

Con respecto a la variable porcentaje de frutos con una sola perforación en posición A, se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($F = 47,40$; $P < 0,0001$). Los resultados indican que la mejor condición fue a 21°C durante 6 h, donde el 38% de los frutos se encontró con una sola perforación, el 24% correspondió a brocas en posición A y el 14% tenía brocas en posición B (Tabla 3). Cuando el proceso de infestación continuó por un tiempo mayor a 21°C, el 32% de los

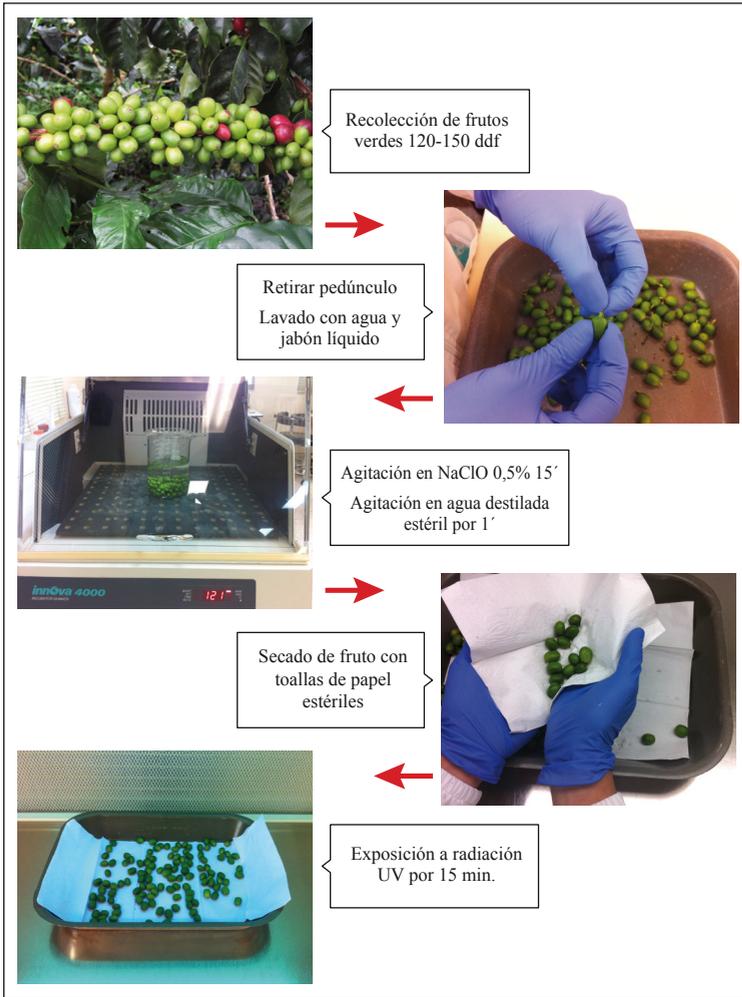


Figura 2. Procedimiento de desinfección de frutos verdes.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos de temperatura y tiempo de infestación (relación brocas-frutos 2:1), en la infestación de los frutos, número de perforaciones y posición de la broca. Bioensayo 3.

Condición	N	Infestación (%)	EE	Frutos con una perforación (%)		Frutos con múltiples perforaciones (%)
				Posición A	Posición B	
21 °C (15 h)	3	84,7	3,3	2,0 B	32,0 A	50,7 AB
21 °C (6 h)	3	77,3	1,8	24,0 A	14,0 B	39,3 B
25 °C (7 h)	3	80,9	3,6	1,3 B	37,3 A	42,3 AB
27 °C (8 h)	3	88,7	2,4	0,0 B	35,3 A	53,3 A

Letras diferentes indica diferencias significativas (Duncan 0,05).

insectos pasó a posición B, y sólo el 2% se encontró en posición A (Figura 3), además se observó el 51% de los frutos con múltiples perforaciones. Cuando se incrementó la temperatura entre 25 y 27°C, la mayor parte de los insectos alcanzaron la posición B en menos de 8 h. La penetración más rápida de la broca dentro del fruto es consecuencia de una mayor actividad del insecto debido al incremento en las temperaturas (8). Jaramillo *et al.* (24) reportan que a 25°C la broca tarda entre 1 y 2 h para alcanzar posición A y entre 6 y 8 h para llegar a la posición B.

Otro factor importante en el resultado obtenido fue la relación broca a fruto. La proporción en la que se infestó fue de dos brocas por cada fruto, la cual favoreció que los frutos presentaran múltiples perforaciones. Para obtener un mayor número de brocas, en posición A, pero en frutos con una sola perforación, en el bioensayo 4 se varió la proporción de brocas por fruto, realizándose infestaciones con relación tres brocas por cada dos frutos (3:2).

Bioensayo 4: En estas condiciones los porcentajes de infestación bajaron al 65%. Sin embargo,

se encontraron menos frutos con múltiples perforaciones (Tabla 4). También se evidenció que dejar la infestación avanzar a 21°C, por 1 h más, no muestra diferencias en el proceso (Figura 4). De acuerdo a estos resultados se establecieron las condiciones y relación de infestación brocas:frutos para el bioensayo 5.

Bioensayo 5: En este bioensayo el porcentaje promedio de infestación fue del 71%, el 13% de los frutos presentaron múltiples perforaciones, 59% de los frutos tenía una sola perforación, donde el 35% correspondieron a brocas en posición A.

Determinado el método de desinfección de frutos (Figura 2) y establecidas las condiciones de infestación que permiten que los adultos de la broca permanezcan en posición de entrada a los frutos (liberación en proporción 3:2 ó 4:3 a 21°C por 6 h), se plantearon dos protocolos de evaluación empleando frutos de café.

El primer método consiste en aplicar los tratamientos sobre frutos desinfectados, donde 30 frutos se llevaron a cajas plásticas y luego se infestaron con los adultos de broca en

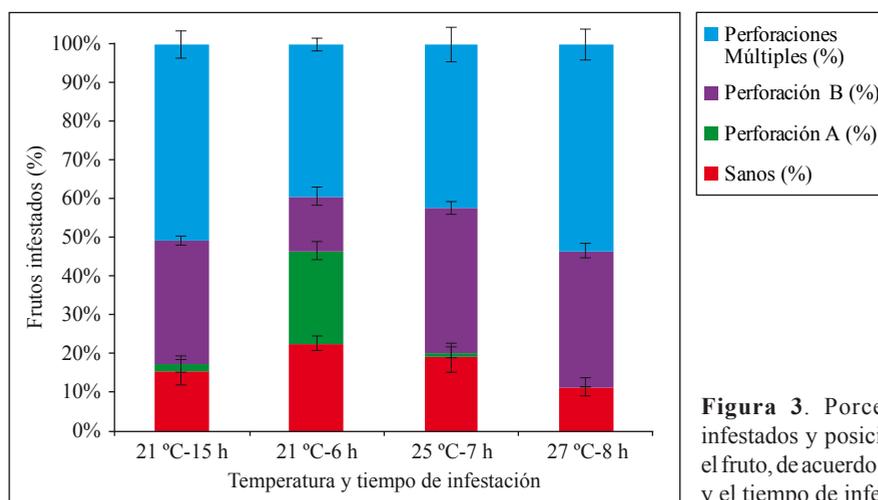


Figura 3. Porcentaje de frutos infestados y posición de la broca en el fruto, de acuerdo con la temperatura y el tiempo de infestación.

Tabla 4. Efecto de los tratamientos de temperatura y tiempo de infestación (relación brocas-frutos 3:2), con relación a la infestación de los frutos, número de perforaciones y posición de la broca. Bioensayo 4.

Condición	N	Infestación (%)	E.E.	Frutos con una perforación (%)		Frutos con múltiples perforaciones (%)
				Posición A	Posición B	
21 °C (6 h)	3	65,2	1,4	27,4	23,7	14,0
21 °C (5 h)	3	63,3	1,8	20,0	26,0	17,3

No hay diferencias significativas ($P \leq 0,05$). E.E.: Error Estándar.

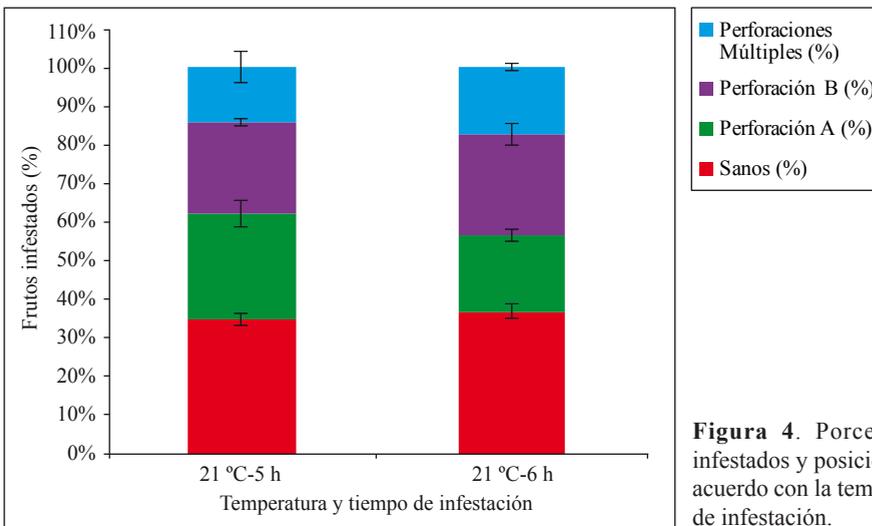


Figura 4. Porcentaje de frutos infestados y posición de la broca, de acuerdo con la temperatura y tiempo de infestación.

relación broca fruto 2:1, conformando así la UE. Éstas se dejaron en un cuarto bajo condiciones controladas de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $71\% \pm 5\%$, con un fotoperíodo de 12 h; transcurridos 20 días después de la infestación se evaluaron las UE y se contabilizaron los estados biológicos al interior de cada fruto y la mortalidad de adultos de broca por UE (Figura 5). Con este método la aplicación se realiza antes de la infestación, lo cual permite evaluar el efecto por contacto e ingestión del producto, una vez la broca tiene que caminar y comer al perforar el fruto.

En el segundo método se tomaron frutos desinfectados, se llevaron a cajas plásticas y luego se infestaron con los adultos de broca en las relaciones, temperaturas y tiempos determinados (3:2 ó 4:3 a 21°C por 5 h). Posteriormente, se seleccionaron los frutos verdes infestados con una broca en posición A, se llevaron a gradillas plásticas de 96 pozos y se colocaron de tal forma que los tratamientos fueran aplicados directamente sobre la broca perforando, efecto curativo (Figura 6). La UE se conformó por 96 frutos brocados en gradillas, éstas se dejaron en un cuarto bajo las mismas condiciones controladas del primer método.

Transcurridos 20 días después de la infestación se evaluaron las UE y se contabilizaron los estados biológicos al interior de cada fruto (Figura 7). Con este método se determinó el efecto por contacto de un producto sobre la broca, debido a que la aspersión se realizó directamente sobre el insecto.

Con este trabajo se estableció un método de desinfección de frutos de café verdes, cuyas aplicaciones van más allá de la evaluación de insecticidas. Esta también puede ser usada para la evaluación del efecto de antibiosis o

antixenosis de diferentes genotipos de café que varíen por su susceptibilidad a la broca. Además, se determinaron las condiciones de infestación para obtener brocas en posición A, lo cual permite realizar evaluaciones con resultados que se aproximan a las condiciones de campo. Se proponen dos metodologías, una que permite evaluar el efecto de contacto de los productos, y otra para evaluar el efecto de ingestión de los productos, de tal manera que pueden evaluarse diferentes modos de acción de productos sobre la broca del café.

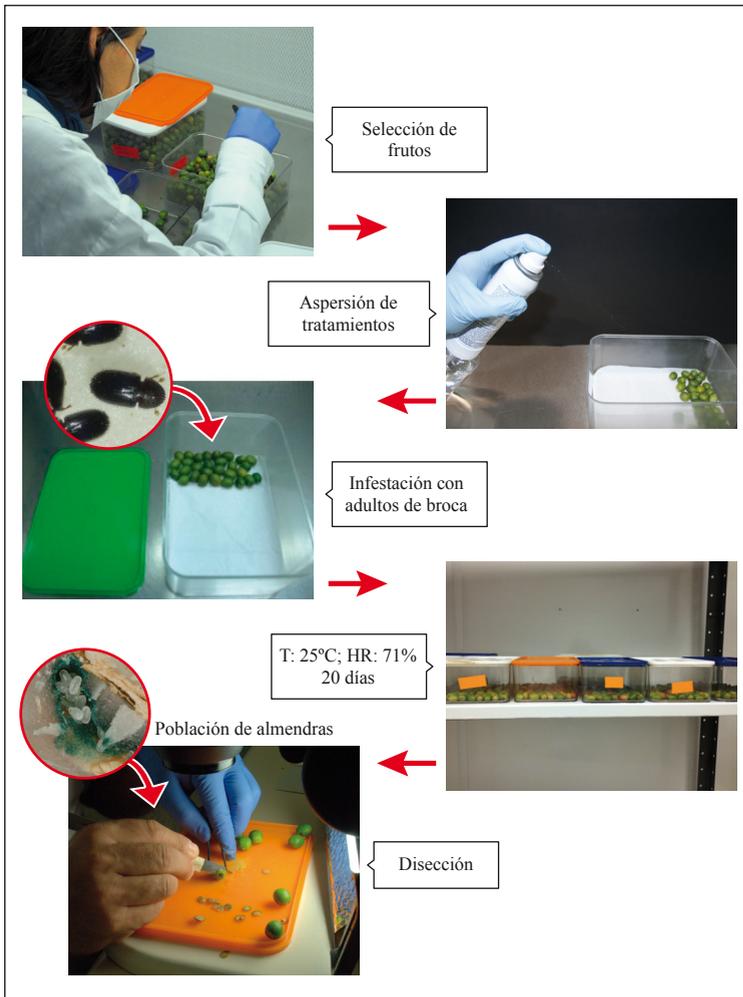


Figura 5. Procedimiento para la evaluación de productos con efectos adversos sobre la broca del café por ingestión y contacto, usando frutos verdes.

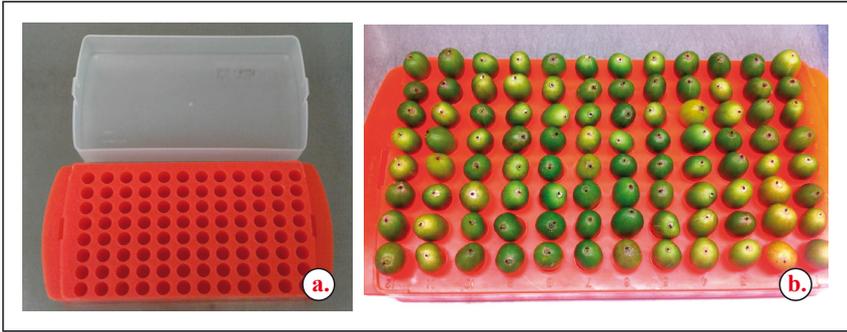


Figura 6. a. Gradilla de 96 pozos. b. Unidades de observación de la evaluación del efecto curativo; gradilla de 96 pozos con frutos brocados en posición A.

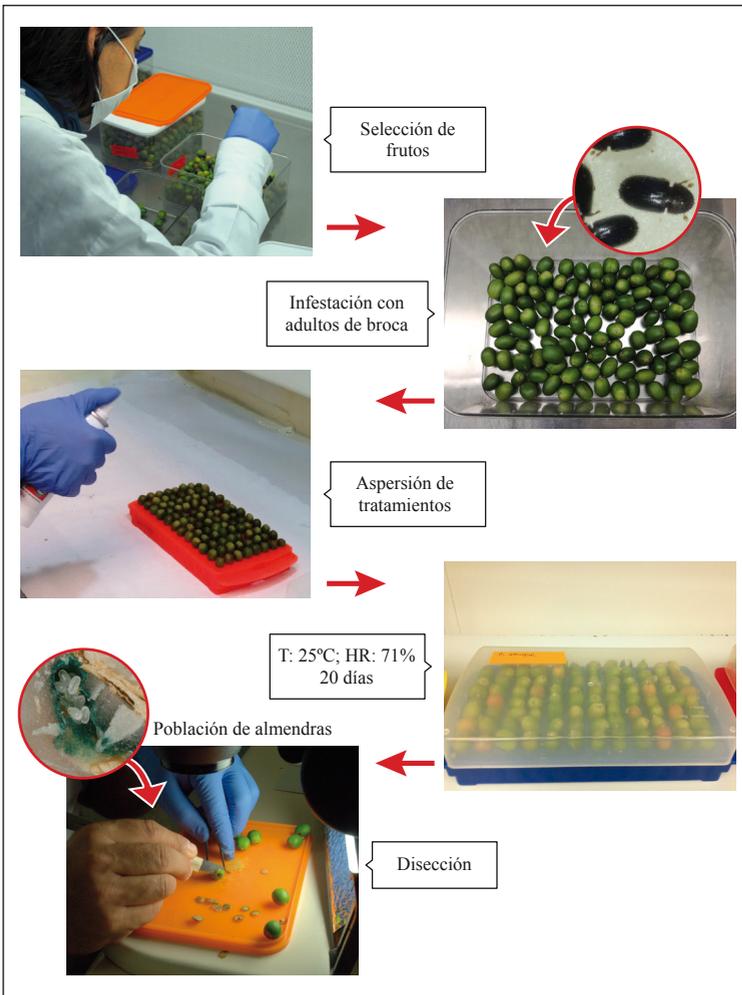


Figura 7. Procedimiento para la evaluación de productos con efectos adversos sobre la broca del café, por contacto, usando frutos verdes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, al Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), a Colciencias, al grupo de coloides de la Universidad de Antioquia, a la empresa Nexentia-Sumicol S.A, a los auxiliares de la Disciplina de Entomología: Diana María Giraldo, Gloria Patricia Naranjo y Juan Paulo Pimentel; a la Estación Experimental Naranjal y a Jhon Félix Trejos.

LITERATURA CITADA

1. ÁLVAREZ S., J.H.; CORTINA G., H.A.; VILLEGAS M., J.F. Métodos para evaluar antibiosis a *Hypothenemus hampei* en café bajo condiciones controladas. *Cenicafé* 52(3):205-214. 2001.
2. ARCILA M., A.; DUARTE C., A.F.; VILLALVA G., D.A.; BENAVIDES M., P. Nuevo producto en el manejo integrado de la broca del café en Colombia. *Manizales : CENICAFÉ*, 2013. 8 p. (*Avances Técnicos* No. 437).
3. ARCILA M., A.; BENAVIDES M., P.; MEJÍA O., J. Nueva alternativa de control químico para el manejo integrado de la broca del café. *Manizales : Cenicafé*, 2015. 8 p. (*Avances Técnicos* No. 453).
4. ARCILA M., A. Insecticidas químicos recomendados para el control de la broca del café. *Manizales : Cenicafé*, 2016. 2 p. (*Brocarta* No. 49).
5. BASTIDAS, A.; VELÁSQUEZ, E.; MARÍN, P.; BENAVIDES M., P.; BUSTILLO P., A.E.; OROZCO, F.J. Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. *Agronomía* 17(1):44-45. 2009.
6. BENAVIDES M., P.; GIL P., Z.N.; GÓNGORA B., C.E.; ARCILA M., A. Manejo integrado de plagas. p. 179-214. En: *Cenicafé. Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Manizales : FNC : Cenicafé*, 2013. 3 vols.
7. BUSTILLO P., A.E.; OROZCO H., J.; BENAVIDES M., P.; PORTILLA R., M. Producción masiva y uso de parasitoides para el control de la broca del café en Colombia. *Cenicafé* 47(4):215-230. 1996.
8. BUSTILLO P., A.E.; CÁRDENAS, A.E.; VILLALBA, R.; BENAVIDES, D.A.; OROZCO, F.J.; POSADA, F.J.; GRISALES, F.L. DA. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. *Chinchiná : Cenicafé*, 1998.
9. BUSTILLO P., A.E.; MARÍN M., P. ¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café?. *Manejo integrado de plagas* 63:i-iv. *Hoja Técnica* No. 40. 2002.
10. BUSTILLO P., A.E. A review of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in Colombia. *Revista colombiana de entomología* 32(2):101-116. 2006.
11. CLARKSON, R.M.; MOULE, A.J. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Australian dental journal* 43(4):250-256. 1998.
12. CERDÁ O., E.; MARTÍN R., V.; CUBERO, B. Causes of cell death following ultraviolet B and C exposures and the role of carotenes. *Photochemistry and photobiology* 64(3):547-551. 1996.
13. CELESTINO, F.N.; PRATISSOLI, D.; MACHADO, L.C.; SANTOS J., H.J.G.D.; MARDGAN, L.; RIBEIRO, L.V. Adaptação de técnicas de criação da broca do café [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)]. *Coffee science* 11(2):161-168. 2016.
14. DAVIDSE, L.C.; FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *The journal of cell biology* 72(1):174-193. 1977.
15. DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Annual review of phytopathology* 24(1):43-65. 1986.
16. DIFFEY, B.L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in medicine and biology* 36(3):299. 1991.
17. DOMÍNGUEZ, L.; PARZANESE, M. Luz ultravioleta en la conservación de alimentos. [en línea]. Secretaría de agricultura, ganadería y pesca, 2012. Disponible en internet: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/revista/ediciones/52/articulos/r52_13_LuzUltravioleta.pdf. Consultado el 22 de septiembre de 2014.
18. ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.; BARBIN, E.L.; SPANÓ, J.C.E.; MARCHESAN, M.A.; PÉCORÀ, J.D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal* 13(2):113-117. 2002.

19. EUROPEA, U. Reglamento (CE) no 1272/2008 del parlamento europeo y del consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el reglamento (CE) no 1907/2006. Bélgica : Consejo de la unión europea, 2009.
20. FRAIS, S.; NG, Y.L.; GULABIVALA, K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. *International endodontic journal* 34(3):206-215. 2001.
21. GILBERT, P.; MOORE, L.E. Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of applied microbiology* 99(4):703-715. 2005.
22. GÓNGORA B., C.E., POSADA, F.J.; BUSTILLO, A.E. Detección molecular de un gen de resistencia al insecticida endosulfan en una población de broca *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera: Scolytidae) en Colombia. Pereira : SOCOLEN, 2001.
23. GORDON, G.; ADAM, L.C.; BUBNIS, B.P. Minimizing chlorate ion formation in drinking water when hypochlorite ion is the chlorinating agent. Denver : AWWA, 1995.
24. JARAMILLO, J.; CHABI O., A.; POEHLING, H.M.; KAMONJO, C.; BORGEMEISTER, C. Development of an improved laboratory production technique for the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, using fresh coffee berries. *Entomologia experimentalis et applicata* 130(3):275-281. 2009.
25. JARAMILLO, J.L.; MONTOYAR., E.C.; BENAVIDES M., P.; GÓNGORA B., C.E. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. *Revista colombiana de entomología* 41(1):95-104. 2015.
26. LISTER, M.W. Decomposition of sodium hypochlorite: The uncatalyzed reaction. *Canadian journal of chemistry* 34(4):465-478. 1956.
27. MARTÍNEZ, C.P.; ECHEVERRI, C.; FLÓREZ, J.C.; GAITÁN B., A.L.; GÓNGORA B., C.E. In vitro production of two chitinolytic proteins with an inhibiting effect on the insect coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) and the fungus *Hemileia vastatrix* the most limiting pests of coffee crops. *AMB express* 2(1):1-11. 2012.
28. PADILLA, B.E.; ACUÑAZ., R.J.; VELÁSQUEZ, C.S.; RUBIO, G.; DAVID, J. Inhibidores de α -amilasas de la broca del café *Hypothenemus hampei* en diferentes especies de vegetales. *Revista colombiana de entomología* 32(2):125-130. 2006.
29. PORTILLA R., M. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para la cría de *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 50(1):24-38. 1999.
30. PORTILLA R., M.; STREETT, D. Nuevas técnicas de producción masiva automatizada de *Hypothenemus hampei* sobre la dieta artificial Cenibroca modificada. *Cenicafé* 57(1):37-50. 2006.
31. PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F.E. Does the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) have mutualistic fungi?. *Annals of the entomological society of America* 98(4):483-490. 2005.
32. ROJAS V., R.A.; GUEVARA V., S. Estabilidad del hipoclorito de sodio producido in situ mediante electrólisis. *Hojas de divulgación técnica* 79:1-5. 2000.
33. TYAGI, V.P. Essential chemistry. Delhi : Ratna sagar, 2009.
34. VILLALBA G., D.A.; BUSTILLO P., A.E.; CHAVES C., B. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. *Cenicafé* 46(3):152-163. 1995.