

EFECTO DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* EN EL CONTROL DEL NEMATODO DEL NUDO RADICAL DEL CAFÉ

Jairo Eduardo Leguizamón-Caycedo*; Beatriz Elena Padilla-H **

RESUMEN

LEGUIZAMÓN C., J.E.; PADILLA H., B.H. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control del nematodo del nudo radical del café. Cenicafé 52(1):29-41. 2001

En Cenicafé se han encontrado resultados promisorios en el control del nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp. con microorganismos antagonistas como los hongos *Paecilomyces lilacinus* y *Verticillium chlamyosporium*. En esta investigación se midió el antagonismo de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre diferentes estadios y se hicieron pruebas de patogenicidad *in vitro*, *in vivo* y en almácigo sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Se evaluaron las variables, huevos sanos, número de estadios juveniles, mortalidad corregida y grado de infección. Se observaron muestras de microcultivos de cada hongo sobre huevos de *Meloidogyne* spp al microscopio óptico de luz y electrónico de barrido. En las pruebas de patogenicidad *in vitro* el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos al 5%, resultando mejor el control con *M. anisopliae*. *In vivo* se detectaron diferencias significativas entre el testigo y las dosis evaluadas de ambos hongos al 5%, y a mayor dosis hubo mejor control. La microscopía óptica de luz y electrónica de barrido evidenció el parasitismo sobre estadios de *Meloidogyne* spp. La evaluación en almácigo mostró menor grado de infección con las aplicaciones a partir de la dosis de 3g de cada uno de los hongos y el tratamiento químico, los cuales fueron diferentes estadísticamente con el testigo y mostraron potencial promisorio para el control de *Meloidogyne* spp. en almácigos de café.

Palabras claves: Control biológico, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, hongos entomopatógenos, nematodo del nudo radical, *Meloidogyne* spp.

ABSTRACT

Researches with antagonistic microorganisms for the knot root nematode control *Meloidogyne* spp. such as *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamyosporium* were carried out in Cenicafé. In this investigation *B. bassiana* and *M. Anisopliae* antagonisms on different stages were measured and pathogenicity tests *in vitro*, *in vivo* and under nursery conditions were made on *Meloidogyne* spp. eggs. The variables, healthy eggs, number of young stages, corrected mortality and infection degrees were assessed. Microcultures samples of every fungus on *Meloidogyne* spp. eggs were observed at light and scanning electron microscope. In the pathogenicity *in vitro* tests the variance analysis exhibited substantial differences among treatments at 5%, being control with *M. anisopliae* the best one. Meaningful differences (5%) *in vivo* tests between the control and the evaluated doses for both fungi at 5% were detected, and it was also observed that the higher the dose the better the control. Both light and scanning electron microscopy evidenced parasitism on *Meloidogyne* spp. stages. The evaluation in nursery exhibited lower infection degree with applications from 3g of each fungi and the chemical treatment, which were different with respect to the control and exhibited promising potential for *Meloidogyne* spp. control in coffee nurseries.

Keywords: Biologic control, *Beauveria bassiana*, *Mertarhizum anisopliae*, enthomopathogenic fungi, knot root nematode, *Meloidogyne* spp.

* Investigador Principal I. Fitopatología, hasta marzo de 2000. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná,

El nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp., es un patógeno de amplia distribución geográfica, con una gran variedad de hospedantes, diversidad de especies y causante de grandes pérdidas en algunas zonas cafeteras del mundo. En Colombia se registró la reducción de la producción de 78g de café cereza por planta por cada 1% de infección en la etapa de almácigo y posterior siembra en lotes infestados (8,17,18).

Es importante enfocar las medidas de control de éste patógeno a la etapa de almácigo, período en el cual se presenta mayor susceptibilidad al ataque. Cuando una planta sana supera esta etapa las cantidades naturales del nematodo presentes en el suelo, no afectan la productividad final del cultivo (18)

En cuanto a medidas de control, Cenicafé recomienda el manejo integrado en el cual se incluye la utilización de suelo más pulpa, las micorrizas, la solarización, el control biológico y en algunos casos, la aplicación de nematicidas (18). Actualmente se adelantan diversos estudios para determinar el potencial del control biológico en nematodos empleando sus enemigos naturales como la bacteria *Pasteuria penetrans* (7) y los hongos *Paecilomyces lilacinus* (7, 13) y *Verticillium chlamydosporium* (7, 14), que han mostrado resultados excelentes, reduciendo considerablemente poblaciones de *Meloidogyne* spp. (5, 10, 11, 15, 16, 20, 26).

Son pocos los estudios realizados con los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control de *Meloidogyne* spp. Mosquera y Murcia en 1997 (21), evidenciaron el control de *Meloidogyne* spp. en guayabo *Psidium guajaba* con el hongo *B. bassiana*. Morgan Jones y Rodríguez Kabana citados por Sidiiquei en 1996 (24), registran el género *Metarhizium* entre los hongos biocontroladores de nematodos. Por lo anterior y con base en resultados exploratorios obtenidos con estos hongos, se

planteó esta investigación con el objetivo de determinar la patogenicidad *in vitro* e *in vivo* de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y realizar además, observaciones microscópicas de su parasitismo sobre huevos de *Meloidogyne* spp., para evaluar el efecto de estos hongos en el control del nematodo del nudo radical del café en condiciones de almácigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Previamente se incrementó la población de *Meloidogyne* spp. en raíces de plantas de tomate variedad Rutgers, sembradas en suelo de la Unidad Chinchiná, esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 15 libras de presión y 121°C. Los hongos *B. bassiana* (Cenicafé 9205) y *M. anisopliae* (Cenicafé 9236) se incrementaron en sustrato de arroz, siguiendo la metodología propuesta por Antía en 1992 (1). Esta investigación se adelantó en Cenicafé y se desarrolló así:

ETAPA 1. Pruebas de patogenicidad *in vitro*.

Para la realización de estas pruebas se empleó la metodología descrita por Cardona en 1995 (7). Se determinó la concentración de esporas por mililitro para cada uno de los hongos cultivados en arroz y se ajustó a $5,5 \times 10^7$ esporas por mililitro para *B. bassiana* y a 9×10^7 esporas por mililitro para *M. anisopliae*. Los huevos de *Meloidogyne* spp. utilizados en esta etapa se obtuvieron según la metodología descrita por Hussey y Barker, citada por Barker (3), ajustada a una concentración de 200 huevos por mililitro. Las suspensiones de huevos y de los hongos se dejaron en agitación magnética constante hasta su uso.

De la suspensión de esporas de cada uno de los hongos se tomaron 3ml, los cuales se depositaron en cajas de Petri y se les adicionó 1ml de la suspensión de huevos. Para cada uno de los hongos se utilizaron diez cajas que contenían sólo la suspensión de huevos como testigo. Las

cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días, tiempo en el cual se evaluó la patogenicidad al microscopio invertido con los objetivos de 10X y 25X, adicionando a cada caja 15 gotas de azul de lactofenol.

En esta prueba se utilizó un diseño completamente al azar con 2 tratamientos y 20 repeticiones. La unidad experimental la constituyó la suspensión de esporas y de huevos dispuestos en una caja de Petri. La variable evaluada fue el número de huevos sanos. La variable mortalidad corregida se determinó por la diferencia entre los huevos sanos encontrados en el tratamiento evaluado con los del testigo, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número Huevos sanos testigo} - \text{Número Huevos sanos TTO}}{\text{Número Huevos Sanos Testigo}} \times 100$$

La variable mortalidad corregida se procesó mediante análisis de varianza y prueba de comparación de Tukey al 5%.

ETAPA 2. Evaluación de dosis *in vivo* de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el control de *Meloidogyne spp.* en suelo. Se evaluó el parasitismo de dosis crecientes de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* cultivado en arroz, sobre una cantidad constante de huevos de *Meloidogyne spp.* en suelo estéril, determinando así su patogenicidad *in vivo*.

Se inocularon separadamente los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en dosis de 2, 4, 6, 8, 16 y 32g de arroz colonizado por el hongo en vasos plásticos que contenían 150g de suelo de la Unidad Chinchiná esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 15 libras de presión y 121°C.

Los hongos se utilizaron en las siguientes concentraciones: 2,4 x 10⁹ esporas por gramo

para *B. bassiana* y de 8,6 x 10⁸ esporas por gramo para *M. anisopliae*. Estos se dejaron en incubación durante 10 días a temperatura ambiente y después de este período, se inoculó cada uno de los tratamientos con 5ml que contenían 2500 huevos de *Meloidogyne spp.* suspendidos en agua estéril y obtenidos mediante la metodología descrita por Hussey y Barker, citada por Barker en 1985 (3).

La evaluación se realizó a los 10 días después de la inoculación de los nematodos, tomando el contenido de cada vaso por tratamiento y procesándolo mediante la metodología del tamiz plástico - papel facial doble modificado por Baeza y Leguizamón en 1973, del método "filtro de algodón" de Oostenbrink (2).

En esta etapa se empleó un diseño completamente al azar para cada uno de los hongos, con 6 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue el vaso con 150g de suelo. Se evaluó la variable mortalidad corregida mediante la recuperación de formas activas que determinó el grado de parasitismo de los hongos sobre los huevos de *Meloidogyne spp.* La información obtenida se procesó utilizando la fórmula de Schneider - Orelli, la cual corrige los valores por mortalidad del testigo:

$$\frac{\% \text{ Individuos muertos tratamiento} - \% \text{ Individuos muertos testigo}}{100 - \% \text{ Individuos muertos Testigo}} \times 100$$

ETAPA 3. Evaluación en almácigo. Se evaluaron en condiciones de almácigo diferentes dosis de arroz colonizado por los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, seleccionadas con base en los valores obtenidos en la etapa 2, empleando por planta: 1,5; 3,6 y 12g y se compararon con un testigo no tratado. El control efectuado se comparó con el nematicida co-

mercial Furadan® en dosis recomendadas para café.

Como sustrato se utilizó suelo de la unidad Chinchiná, esterilizado en las instalaciones del CIAT (Palmira, Valle), en autoclave a 121°C a 15 libras de presión, durante 1 hora; de este se tomó 1700g y se depositó en materos de 2kg de capacidad. En cada uno de los materos se transplantó una planta de café de la variedad Caturra.

Las dosis seleccionadas de los hongos se inocularon el mismo día del transplante de las plantas de café. En cada materia se sembró una planta y antes de cubrirla con el suelo y alrededor de esta, se depositó la cantidad de inóculo del hongo de acuerdo al tratamiento. A los 15 días después del transplante se inocularon 2500 huevos de *Meloidogyne* spp obtenidos (3).

El producto químico Furadan® se aplicó 10 días después de inoculados los nematodos en dosis de 1g del producto por matero. Éste se aplicó en corona sobre la superficie del suelo y alrededor de la planta.

Las plantas se regaron diariamente y se fertilizaron con fosfato diamónico (DAP) 2g/planta a los 3 meses y con urea 10g/L en aplicación foliar, 3 veces a partir del tercer mes cada 15 días, según practicas de manejo de almácigos de café.

La unidad experimental la conformó una planta de café sembrada en una materia de 1700g de suelo estéril. Se evaluaron 6 tratamientos por hongo con 20 repeticiones, distribuidos en un diseño completamente al azar.

Para la calificación de tratamientos se evaluó la varia-

ble porcentaje de infección, a los 130 días de inoculados los nematodos, utilizando la escala de calificación adoptada por la Universidad de Carolina del Norte en el proyecto internacional de *Meloidogyne* spp y modificada por Leguizamón para café (17) (Tabla 1). Los datos obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza unifactorial por rangos de Kruskal – Wallis, prueba descrita por Siegel y Castellán en 1995 (25), en estadística no paramétrica. Los tratamientos se compararon mediante la ecuación que ejecuta la prueba de comparación múltiple:

$$|\bar{R}_u - \bar{R}_v| > Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{N + (N + 1)}{12} \left(\frac{1}{n_u} + \frac{1}{n_v} \right)}$$

<<3>>

N= Número total de observaciones entre todos los tratamientos

n_u = Número total de observaciones para el tratamiento u

n_v = Número total de observaciones para el tratamiento v

$|\bar{R}_u - \bar{R}_v|$ = Diferencias de medidas de los rangos de los tratamientos a comparar.

$Z_{\alpha/2}$ = Es el valor de abscisa de la distribución normal sobre el cual se ubica el porcentaje de la distribución

Tabla 1. Escala de calificación para la infección de *Meloidogyne* spp. en raíces de café (17).

Grado	Descripción
1	Ausencia de daño
2	Con una nudosidad y hasta 10% de las raíces laterales afectadas.
3	Entre el 11% y el 25% de las raíces laterales con nudosidades.
4	Entre el 26% y el 50% de las raíces laterales con nudosidades.
5	Entre el 51% y el 75% de las raíces laterales con nudosidades.
6	Más del 76% de las raíces laterales con nudosidades.

ETAPA 4. Observación en Microscopía Óptica de Luz y Electrónica de Barrido.

El objetivo de esta etapa fue observar el parasitismo que ejercen *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. en condiciones *in vitro*.

Las observaciones se realizaron a partir de microcultivos de estos hongos los cuales se prepararon en portaobjetos de vidrio cubiertos con agar agua al 1,5%, adicionando 500 microlitros de la suspensión de esporas de los hongos y posteriormente 500 microlitros de la suspensión de huevos de *Meloidogyne* spp. Los microcultivos se colocaron dentro de una caja de Petri preparada como cámara húmeda, con el propósito de inducir la esporulación del hongo y se dejaron bajo condiciones de laboratorio a una temperatura promedio de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para la técnica de microscopía óptica de luz los microcultivos se tiñeron con azul de lactofenol antes de la evaluación, para detener la germinación y visualizar mejor el parasitismo. Diariamente y durante una semana, se observó al microscopio de luz con los objetivos 10X, 40X y 100X el parasitismo de los hongos sobre huevos del nematodo. Se seleccionaron algunas de las muestras para su observación al microscopio electrónico de barrido.

Para la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido, las muestras seleccionadas se procesaron en el CIAT de acuerdo a la metodología empleada en la Unidad de Microscopía, así: las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5% por 15 horas y luego se lavaron con buffer fosfato de sodio 0,2M durante 10 minutos.

Posteriormente se deshidrataron en etanol a 25%, 50% y 75%, por periodos de 20 minutos en cada uno de los alcoholes y 3 veces por 20 minutos en etanol al 100%. Posteriormente las muestras se colocaron en el secador de punto crítico y luego se recubrieron con oro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA 1. Pruebas de patogenicidad *in vitro*. El análisis de varianza para la variable huevos de *Meloidogyne* spp. recuperados detectó diferencias estadísticas significativas al 5% entre tratamientos y entre tratamientos y el testigo. En la Tabla 2 se observa como *B. bassiana* y *M. anisopliae* redujeron significativamente la población de estadios de *Meloidogyne* spp, siendo mayor esta reducción con *M. anisopliae*.

Como se aprecia en la Tabla 3, se detectaron diferencias estadísticas significativas al 5%, con la variable porcentaje de mortalidad corregida entre tratamientos, mostrando mayor efectividad en el control de *Meloidogyne* spp., el hongo *M. anisopliae*. *B. bassiana* también controló *Meloidogyne* spp y fue significativamente diferente al testigo.

Esta prueba permitió observar que los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* tienen la capacidad de parasitar huevos de *Meloidogyne* spp en condiciones de laboratorio, los cuales son comparables con los resultados de patogenicidad *in vitro* (70%) obtenidos por Hincapié (14), utilizando el hongo *V. chlamydosporium*, el cual se ha registrado con un alto potencial biocontrolador contra *Meloidogyne* spp. Además, los resultados indi-

Tabla 2. Número promedio de estadios de *Meloidogyne* spp. observados después de permanecer 7 días en contacto con una suspensión acuosa de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en cajas de Petri de 5cm de diámetro.

Tratamiento	Número promedio de huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.
<i>B. bassiana</i>	37,9 b*
<i>M. anisopliae</i>	25,3 c
Testigo (sin inocular)	103,2 a
CV %	17,8

*Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.

Tabla 3. Promedio del porcentaje de mortalidad de estadios de *Meloidogyne spp.* observados después de permanecer 7 días en contacto en suspensión acuosa de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en cajas de Petri de 5cm de diámetro.

Tratamiento	Promedio del porcentaje de mortalidad corregida de huevos de <i>Meloidogyne spp.</i>
<i>B. bassiana</i>	63,3 b*
<i>M. anisopliae</i>	75,5 c
Testigo (sin inocular)	0,0
CV %	20,68

*Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.

can buenas perspectivas de estos hongos para ser evaluados en condiciones de almácigo, etapa en la cual deben llevarse a cabo las medidas de control de nematodos.

ETAPA 2. Evaluación de dosis *in vivo*. El análisis de varianza detectó diferencias significativas al 5% entre el testigo y las dosis evaluadas, así como entre las dosis de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

En la Tabla 4 se observa cómo a medida que se incrementó la dosis de arroz colonizado por *B. bassiana* y *M. Anisopliae* se redujo la población de estadios juveniles de *Meloidogyne spp.* Aunque las dosis menores redujeron la pobla-

ción, en relación con el testigo, las mayores dosis de los hongos fueron significativamente diferentes a éstas y ejercieron un mejor control de la población de nematodos en el suelo.

En la Tabla 5 se observa cómo los porcentajes de mortalidad de estadios infectivos de *Meloidogyne spp.* fueron superiores a medida que las dosis de los hongos fueron más altas, presentándose una relación directa entre la dosis y la mortalidad del nematodo. De acuerdo con los resultados anteriores se podrían seleccionar las dosis menores de estos hongos cultivados en arroz (porcentaje de mortalidad mayor del 50%), para realizar evaluaciones en condiciones de almácigo y poder determinar el control del daño radical ocasionado por *Meloidogyne spp.* Teniendo en cuenta que con la utilización de dosis pequeñas el control biológico puede ser más rentable, se realizaron las conversiones de la dosis mínima evaluada *in vivo* para 1700g de suelo (almácigo) y a partir de ese valor se evaluaron 3 dosis menores.

Los resultados obtenidos son comparables a las investigaciones realizadas utilizando otros biocontroladores (12, 13), lo cual permite que el manejo integrado de nematodos pueda apoyarse en el uso de estos hongos entomopatógenos. El potencial de *B. bassiana* como

Tabla 4. Promedio del número de estadios juveniles (J2) de *Meloidogyne spp.* extraídos de suelo inoculado con diferentes dosis de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en sustrato de arroz.

DOSIS (gramos de arroz colonizado por el hongo)	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>
	J2/150 g de suelo	J2/150 g de suelo
0 (Testigo)	969,5 a [†]	660,4 a
2	346,3 b	315,4 b
4	246,5 b	237,7 bc
6	172,0 bc	130,0 cd
16	34,7 c	87,5 d
32	50,0 c	57,8 d
C.V %	45,51	37,89

[†]Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.

Tabla 5. Promedio del porcentaje de mortalidad corregida de estadios de *Meloidogyne* spp extraídos de suelo inoculado con diferentes dosis de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en sustrato de arroz.

Dosis (gramos de arroz colonizado por el hongo)	<i>B. bassiana</i> % de mortalidad corregida	<i>M. anisopliae</i> % de mortalidad corregida
0 (Testigo)	0,0 c*	0,0
2	64,28 b	52,24 c
4	74,58 b	64,01 bc
8	82,26 ab	80,32 ab
16	96,42 a	86,75 a
32	94,84 a	91,25 a
C.V %	20,70	22,81

* Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.

controlador de nematodos fue registrado por Mosquera y Murcia (21), quienes al usar tratamientos con este hongo encontraron disminución de la población de nematodos en cultivos de guayaba (21).

Aunque son pocos los estudios realizados con *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control de *Meloidogyne* spp, el potencial de estos puede deberse a su habilidad biocontroladora contra patógenos del suelo. Estos hongos se han registrado infectando larvas de coleópteros que se alimentan de las raíces de plantas (19) y el antagonismo de *M. anisopliae* contra diferentes insectos plagas del suelo ha sido demostrado por Ferron (12) y Zimmerman (27).

El ecosistema del suelo puede proveer muchas condiciones favorables para que sobrevivan los hongos, entre ellas, la protección a la radiación solar (19). Cuando *M. anisopliae* se aplica al campo, la germinación, crecimiento, esporulación y supervivencia son favorecidas por los nutrientes presentes en los exudados de las raíces, suelo y superficie de los hospedantes (22). El antagonismo de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre insectos plagas del suelo puede servir de referencia por su supervivencia en este ambiente para ser utilizados con otros patógenos del suelo como es *Meloidogyne* spp; parasitismo que se comprobó en esta investigación.

Etapas 3. Evaluación en almácigo. Grado de infección de *Meloidogyne* spp en plantas de la variedad Caturra. El análisis de varianza unifactorial por rangos de Kruskal - Wallis detectó diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre tratamientos para la variable grado de infección causado por *Meloidogyne* spp a las raíces del café. En las evaluaciones con *B. bassiana* el tratamiento que presentó un mayor grado de infección fue aquel en el cual no se aplicó el hongo (testigo), que resultó igual estadísticamente al tratamiento con 1,5g del hongo, pero difirió estadísticamente ($P > 0,05$) de los demás tratamientos. Este mismo tratamiento no difirió estadísticamente del tratamiento de 3g del hongo y el testigo, pero sí de los demás. Los tratamientos que causaron disminución en el grado de infección fueron aquellos en los cuales se aplicaron 3, 6 y 12g del hongo y 1g de Furadan®, y presentaron diferencia estadística ($P > 0,05$) con el Testigo que sólo recibió la aplicación de nematodos, sin el hongo (Tabla 6).

En las evaluaciones con *M. anisopliae* el Testigo sin aplicación del hongo fue estadísticamente diferente ($P > 0,05$) a los demás tratamientos, encontrándose una disminución en el grado de infección de *Meloidogyne* spp con los tratamientos que se les aplicó 1,5; 3; 6 y 12g del hongo y 1g de Furadan®. Los tratamientos con aplicaciones de 1,5 y 3g del

hongo y 1g de Furadan® fueron iguales estadísticamente ($P>0,05$) y los tratamientos de 3, 6 y 12g del hongo y 1g de Furadan®, también presentaron igualdad estadística (Tabla 7).

En esta etapa se observó que los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* le ofrecieron protección a las plantas de café variedad Caturra en condiciones de almácigo contra el ataque de *Meloidogyne* spp. Las dosis superiores a 3g de arroz colonizado por los hongos redujeron la infección por *Meloidogyne* spp, obteniéndose un mayor número de plantas con grados de infección 1, comparados con el testigo, el cual presentó un mayor número de plantas con grado de infección radical entre 5 y 6. Sin embargo la dosis de 1,5g de *M. anisopliae* fue diferente estadísticamente al testigo ($P>0,05$).

El control efectuado por el producto químico Furadan®, fue igual estadísticamente a los mejores tratamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Teniendo en cuenta los inconvenientes que ofrecen estos productos por su impacto ambiental, es necesario desarrollar otras medidas de control en las cuales se podría incluir la utilización de estos hongos, ya que ofrecieron protección en condiciones de almácigo contra *Meloidogyne* spp, similar a la del nematicida Furadan®.

Los resultados obtenidos en esta etapa fueron comparables a los obtenidos por Hincapié (14) con el hongo *V. chlamydosporium*, y Giraldo (13) con *P. lilacinus*, los cuales utilizaron la misma alternativa de aplicación con sustrato arroz y emplearon de igual forma la escala de grados de infección de *Meloidogyne*

Tabla 6. Número de plantas de café variedad Caturra por grados de infección con *Meloidogyne* spp. después de 130 días de ser inoculados con diferentes dosis de *Beauveria bassiana*.

Tratamiento	Número repetición	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	Grado 6
0g Testigo a*	20	-	-	-	-	6	14
1,5g ab	20	5	2	7	-	6	-
3 g bc	20	12	8	-	-	-	-
1g Químico c	20	16	4	-	-	-	-
6g c	20	17	-	3	-	-	-
12g c	20	18	2	-	-	-	-

* Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente. Prueba no paramétrica, rangos de Kruskal – Wallis al 0,05.

Tabla 7. Número de plantas de café variedad Caturra por grados de infección con *Meloidogyne* spp. después de 130 días de ser inoculados con diferentes dosis de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamiento	Número repetición	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	Grado 6
0g testigo a*	20	-	-	-	-	8	12
1,5g b	20	6	8	6	-	6	-
3 g bc	20	12	8	-	-	-	-
1g Químico bc	20	17	3	-	-	-	-
6g c	20	20	-	-	-	-	-
12g c	20	20	-	-	-	-	-

* Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente. Prueba no paramétrica, rangos de Kruskal – Wallis al 0,05.

spp, en raíces de café, para su evaluación. La aplicación de los hongos en el suelo, con nutrimentos, puede aumentar la supervivencia y actividad antagonica (5).

Cano y Gil (6) mostraron que independiente de la cantidad inicial del inóculo del nematodo que se aplica a plantas de café en condiciones de almácigo, estas alcanzan un grado 5 de infección si el nematodo no se somete a ningún control. Estos resultados demuestran la dificultad que presenta el control del nematodo del nudo radical con el empleo de una sola medida de control, pues ninguna de ellas, salvo la esterilización del suelo, garantiza la supresión total del inóculo. Por tanto, los resultados obtenidos muestran un promisorio potencial de estos hongos en el control biológico de *Meloidogyne* spp en condiciones de almácigo, para ser incluidos en un manejo integrado recomendado por Cenicafé.

ETAPA 4. Observación microscópica. Con las observaciones de microscopía óptica de luz y electrónica de barrido, el antagonismo de *M. anisopliae* fue aparentemente mayor al observado con *B. bassiana*.

El parasitismo de estos hongos sobre huevos de *Meloidogyne* spp. parece ser de naturaleza enzimática, tal como se observó en microscopía óptica de luz y electrónica de barrido, debido a la degradación de la pared celular, la pérdida de turgencia de los huevos y la lisis de estadios J2 de *Meloidogyne* spp.

Las masas de huevos pueden ser invadidas por algunos organismos patógenos u oportunistas que derivan sus nutrimentos de los compuestos presentes en éstos. Desde el contacto con los huevos, estos hongos crecen rápidamente y parasitan los huevos que están en etapa temprana de desarrollo embrionario (15). La mayoría de estos organismos se conocen por tener actividad quitinolítica; la quitina es un constitutivo de gran proporción de la capa del

huevo y si la cutícula pierde quitina probablemente es lo que limita al hongo para penetrar la cutícula del juvenil tan rápidamente como la cubierta del huevo (15).

Se ha demostrado experimentalmente la producción de enzimas quitinasa, lipasa, proteasa entre otras de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, las cuales destruyen la cutícula de *Hypothenemus hampei* (4). La pared de los huevos de *Meloidogyne* spp. está constituida por lípidos, proteínas y quitinas, por lo cual las enzimas ya indicadas pueden degradarla (23).

Microscopía óptica de luz. El ataque de *B. bassiana* parece que se inicia en la pared celular del huevo, localizándose las esporas a su alrededor donde germinan, penetran y destruyen la membrana. Luego se presenta lisis de la pared celular y del contenido interno del huevo con incremento considerable del inóculo del hongo.

Se observó la colonización del hongo *B. bassiana* penetrando a través de la pared celular de los huevos de *Meloidogyne* spp. especialmente en uno o en ambos extremos del huevo, con abundante producción de esporas del hongo (Figura 1). Como consecuencia del ataque del hongo en estados tempranos de desarrollo del huevo hubo total destrucción de la pared celular, de las membranas y del tejido interno, con agregado de origen fúngico en ambos extremos del huevo (Figura 2).

Con *B. bassiana* no se apreció la formación de micelio, sino degradación del nematodo y producción de esporas sobre el tejido afectado. La acumulación del tejido fúngico en los extremos del huevo podría explicarse porque la pared celular del huevo en esos sitios es más delgada y podría ser más susceptible a ser degradada por las enzimas proteolíticas, lipolíticas y quitinolíticas de *B. bassiana*, teniendo en cuenta que la penetración de estos hongos entomopatógenos por la cutícula de insectos se

hace por degradación enzimática en los sitios más débiles del hospedante (9). En el caso de *M. anisopliae* se observó un mayor antagonismo, mayor proliferación de micelio y de estructuras de reproducción en los huevos afectados. El micelio de *M. anisopliae* forma una red que entra en contacto con la superficie del huevo y posteriormente destruye la cubierta, penetrando al huevo y reemplazando con sus estructuras el contenido interno de éste. El micelio de *M. anisopliae* sale del tejido interno del huevo a través de la membrana y en forma periférica (Figura 3). También se observa abundante producción de esporas y tejido micelial externo. Con este hongo se pudo observar un parasitismo muy similar al que presentan algunos hongos que han sido registrados como

antagonistas de *Meloidogyne* spp, como *P. lilacinus* y *V. chlamydosporium*. (13, 14).

M. anisopliae afecta al huevo en todos sus estados de desarrollo (Figura 4). Los estadios juveniles del nematodo también son parasitados por *M. Anisopliae* que penetra a través de la membrana, provocando lisis de tejidos (Figura 5). Alrededor se observa proliferación de micelio y esporas del hongo.

Microscopía electrónica de barrido. En microscopía electrónica de barrido se observa que *B. Bassiana* destruye los huevos de *Meloidogyne* spp , y en el interior del huevo crece el micelio del hongo (Figuras 6 y 7). Se observaron restos del medio de cultivo (arroz)

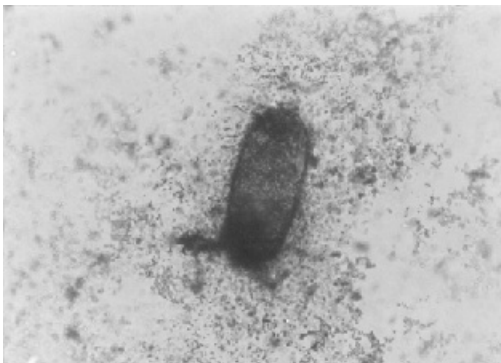


Figura 1. Huevo de *Meloidogyne* spp. parasitado por *B. bassiana* y rodeado por esporas del hongo (40X).

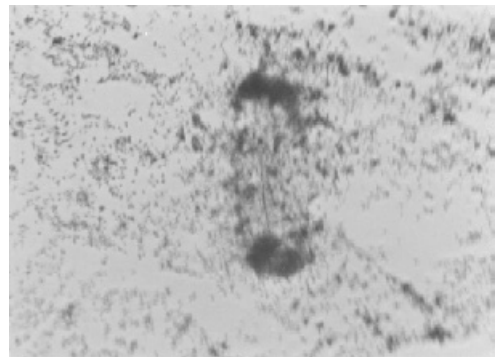
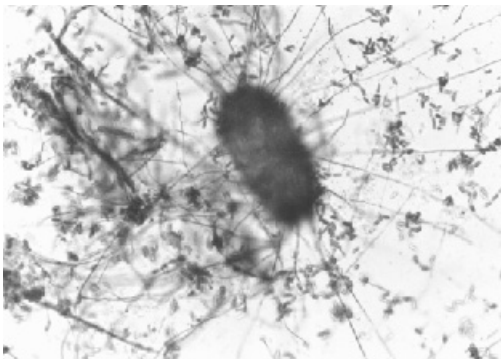
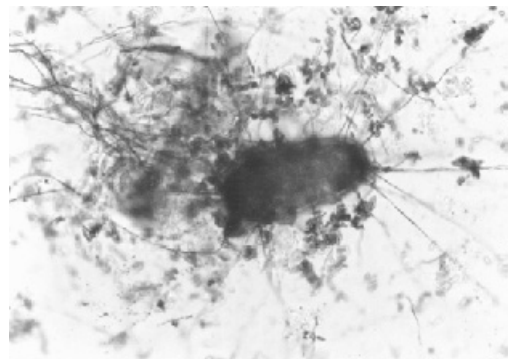


Figura 2. Lisis del huevo de *Meloidogyne* spp, con agregado fúngico de *B. bassiana* (40X).



Figuras 3. Huevos de *Meloidogyne* spp., con abundante agregado micelial interno y externo, de *M. anisopliae* y abundante proliferación de esporas del hongo (40X).



alrededor de los huevos los cuales pierden turgencia y presentan superficie corrugada por efecto del ataque del patógeno, en comparación con un huevo de *Meloidogyne* spp. sano, que aparece turgente y de superficie lisa (Figura 8).

M. anisopliae destruye completamente los huevos de *Meloidogyne* spp. y en su superficie hay abundante producción de esporas del hongo (Figuras 9 y 10). En los ataques iniciales se observan lesiones en la parte superior de los huevos, con algunas estructuras del patógeno (Figura 11). El parasitismo de *M. anisopliae* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. se confirmó (Figuras 9,10 y 11) al observarse la des-

trucción del huevo de *Meloidogyne* spp. por el patógeno y la emergencia de sus estructuras desde el interior del nematodo.

AGRADECIMIENTOS

A Carlos Alberto Zuluaga, a Doris Hincapié y al personal de la Disciplina de Fitopatología de Cenicafé. A los Drs. Bernardo Chaves y Lucelly Orozco y al Sr. Hernando García de la Disciplina de Biometría. Al Ing. José Alejandro Arroyave de la Unidad de Microscopía del CIAT y al Dr. Francisco Posada de la Disciplina de Entomología de Cenicafé.

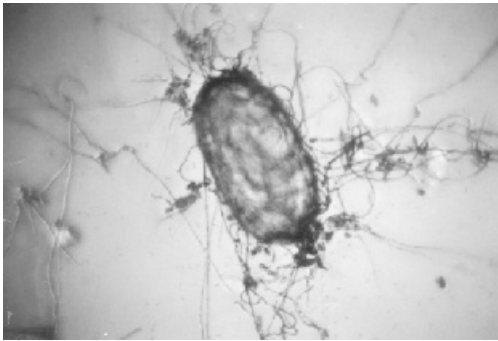


Figura 4. Estadio J1 de *Meloidogyne* spp. afectado por *M. anisopliae* (40X), obsérvese crecimiento fúngico en él.

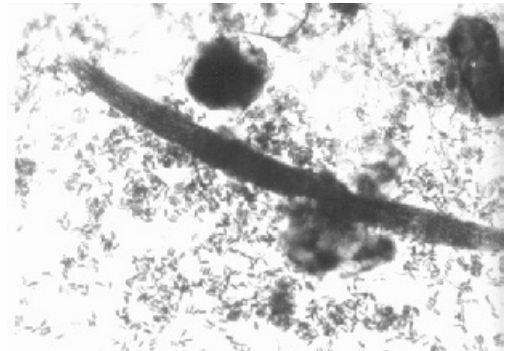


Figura 5. Estadios J2 de *Meloidogyne* spp. parasitados por *M. anisopliae*, con abundante producción de esporas del hongo (40X).

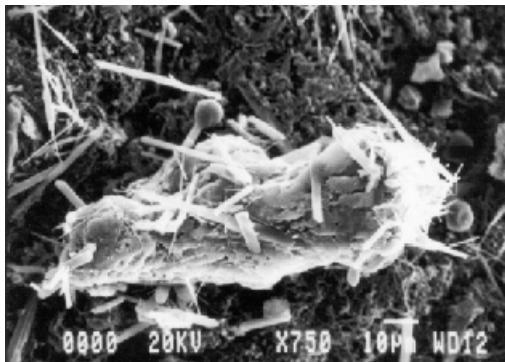


Figura 6. Huevo de *Meloidogyne* spp. destruido por *B. Bassiana*. Obsérvese la pérdida de su turgencia, su pared roturada y presencia de residuos de cristales empleados en el montaje microscópico (750X).

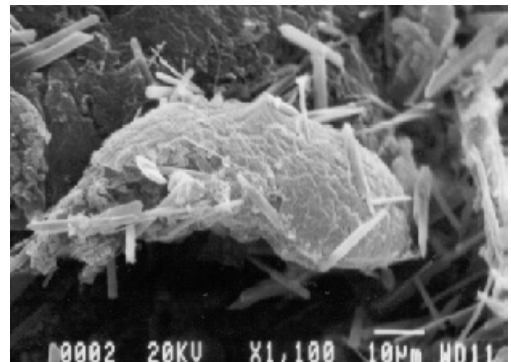


Figura 7. Huevo de *Meloidogyne* spp. afectado por *B. bassiana*, presenta la membrana destruida y su superficie corrugada. Se aprecian residuos de cristales de los reactivos utilizados en la preparación microscópica (1100X)

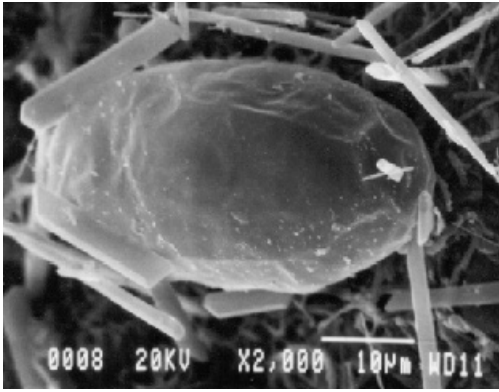


Figura 8. Huevo de *Meloidogyne* spp. sano, con el tejido turgente y la superficie lisa, así como restos de cristales de los reactivos empleados en el montaje microscópico (2000X).

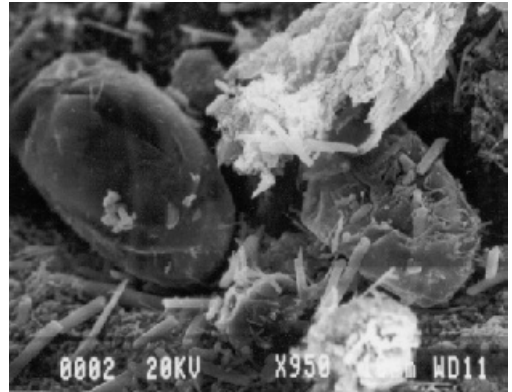


Figura 9. Obsérvese a la derecha de la fotografía tomada en microscopio electrónico de barrido, huevos de *Meloidogyne* spp. completamente destruidos por *M. anisopliae*, esporas y micelio del hongo emergiendo del tejido afectado. A la izquierda se observa un huevo roto por el efecto del hongo (950X).

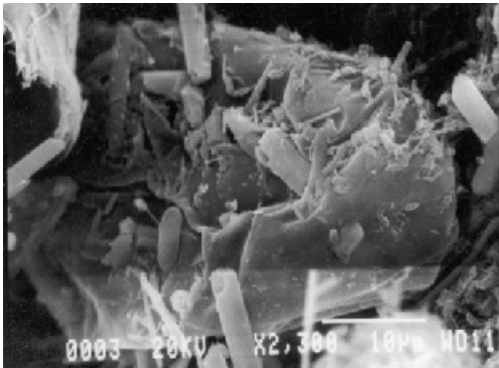


Figura 10. Huevo de *Meloidogyne* spp. parasitado por *M. anisopliae*. Se observan en detalle las hifas del hongo saliendo del interior del huevo, esporas y restos de medio de cultivo (2300X).

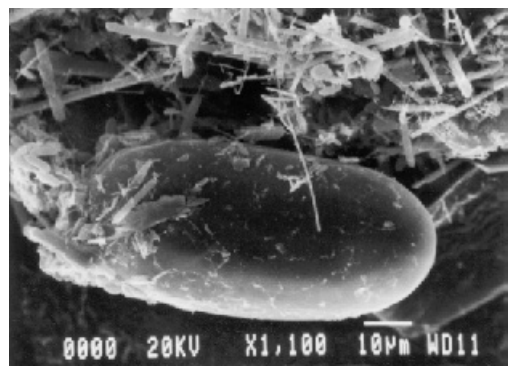


Figura 11. Obsérvese el hemisferio izquierdo del huevo de *Meloidogyne* spp. atacado por *M. anisopliae*, con esporas y restos del medio de cultivo (1100X).

LITERATURA CITADA

1. ANTIA L., O.P.; POSADA F., F.J.; BUSTILLO P., A.E.; GONZALEZ G., M.T. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avances Técnicos Cenicafé No 182: 243-254. 1992.
2. BAEZA A., C.A.; LEGUIZAMON C, J.E. Evaluación de cuatro métodos de extracción de formas activas de nematodos del suelo. Cenicafé 24 (4): 90 - 99. 1973.
3. BARKER, K.R. The application of micro plot technique in nematological research. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 2 Raleigh, N.C., North Carolina State University Graphics, 1985. p.127-134. p. 232 - 253.
4. BUSTILLO, A.E.; POSADA, F.J. El desarrollo y uso de entomopatógenos en el control de la broca del café. In: Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, 23. Cartagena, Julio 17 - 19, 1996. Memorias. Cartagena, Socolen, 1996.
5. CABANILLAS, E.; BARKER, K.R.; NELSON, L.A. Survival of *Paecilomyces lilacinus* in selected carriers and related effects on *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 21 (1): 121-130. 1989.

6. CANO J, A.; GIL V, L.F. Dinámica de poblaciones de *Meloidogyne incognita* a diferentes densidades en café var. Caturra en vivero. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Agronomía, 1980. 120 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
7. CARDONA B., N.L. Aislamiento de hongos y bacterias y pruebas de patogenicidad al nematodo del nudo radical del café *Meloidogyne* spp. Goeldi. Manizales, Universidad de Caldas, 1995. 129 p. (Tesis: MSc).
8. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CHINCHINÁ. Nematodos. In: Resumen del informe anual de actividades 1996-1997. Chinchiná, Cenicafé, 1992. p. 62-64
9. CHARNLEY, A. K.; LEGER, R.J. The role of cuticle - degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C The fungal spore and disease initiation in plants and animals. New York, Plenum Press, 1991. p. 267 - 286.
10. DAVIES, K.G.; LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R. Microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes in tropical agriculture. *Tropical Management* 37 (4): 303-320. 1991.
11. FERNANDEZ, E.; LOPEZ, M.; PEREZ, J.; ACOSTA, N. Efectividad *in vitro* del hongo *Paecilomyces lilacinus* como control biológico de *Meloidogyne incognita*. *Revista de Protección Vegetal* 4 (1): 66-70 1989.
12. FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442. 1978.
13. GIRALDO F., M.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E.; CHAVES C., B. Control de *Meloidogyne* spp en almácigos de café con el hongo *Paecilomyces lilacinus*. *Cenicafé* 49(2): 85 - 101. 1998.
14. HINCAPIER., D. Efecto de *Verticillium chlamyosporium* Goddar. En el control de *Meloidogyne* spp. Goeldi en almácigos de café *Coffea arabica*. Manizales, Universidad Católica de Manizales. 1998. 118p. (Tesis: Especialista en Microbiología).
15. JATALA, P.R. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopatology* 24: 453-489. 1986.
16. KERRY, B.R. Biological control. In: BROWN, R.H.; KERRY, B.R. (eds). Principles and practice of nematode control in crops. Sidney, Academic Press, 1987. p. 233-263.
17. LEGUIZAMÓN C, J.E. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café var caturra. In: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Informe Anual de actividades de la Disciplina de Fitopatología 1991-1992. Chinchiná, Cenicafé, 1991.
18. LEGUIZAMÓN C, J.E. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café var. Caturra. In: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Informe Anual de actividades, Disciplina de Fitopatología 1993-1994. Chinchiná, Cenicafé, 1993.
19. McCOY, C.W. Entomopatogenous fungi as microbial pesticides. In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. New directions in biological control alternatives for suppressing agricultural pest and diseases. New York, Alan R. Liss, 1990. p. 139- 159.
20. McCLURE, M. Biological control of nematodes In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. New directions in biological control, alternatives for suppressing agricultural pest and diseases. New York, Alan R. Liss, 1990. p. 255-269.
21. MOSQUERA E., A.T; MURCIAR., N. Efectos de extractos vegetales y hongos patógenos en la población de nematodos en guayaba *Psidium guajava* L. *Fitopatología Colombiana*. 21: 25-29. 1997.
22. NARVAEZ C., M. DEL P. Estimación de la cantidad de esporas producidas por los aislamientos patogénicos de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, cultivados en arroz y sobre la broca del café. Manizales, Universidad Católica, 1996. 66 p. (Tesis: Bacterióloga).
23. SASSER, J.N.; CARTER, C.E. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol 1. Raleigh, North Caroline State University, 1985. p. 303-308.
24. SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi. A review. *Bioresource Technology*. 58: 229 - 239. 1996.
25. SIEGEL, S.; CASTELLAN, N.J. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. México, Trillas, 1995. 437 p.
26. STIRLING, G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. Progress, problems and prospects. Wallingford, CAB International, 1991. p. 137-142, 146-150, 166-175.
27. ZIMMERMAN, G *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 45 (63): 113-128. 1992.