

EVALUACION EN LABORATORIO DE NEMATODOS STEINERNEMATIDOS Y HETERORHABDITIDOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFE, *HYPOTHENEMUS HAMPEI* FERR.

A. Castillo¹ y N. Marbán-Mendoza²

ECOSUR, Tapachula Chiapas¹ y Departamento de Parasitología Agrícola,² Universidad Autónoma Chapingo, C.P. 56230, México.

RESUMEN

Castillo, A. y N. Marbán-Mendoza. 1996. Evaluación en laboratorio de nematodos Steinernematidos y Heterorhabditidos para el control biológico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferr. Nematropica 26:101-109.

Se comparó bajo condiciones de laboratorio el efecto de ocho cepas de nematodos pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae sobre adultos de *Hypothenemus hampei* Ferr. y su potencial para utilizarse en contra de la población localizada en frutos del suelo durante el período inter cosechas. Se empleó café pergamino infestado, simulando el suelo con arena. Se incluyeron en esta evaluación tres cepas nativas de México, cuatro originarias de Costa Rica y una cepa comercial. Una mortalidad del 10 al 90% se observó al aplicar de 12.5 a 400 juveniles infectivos (JI) por insecto inoculados sobre la arena conteniendo granos brocados. Cuatro cepas se presentaron con mayor efecto patogénico, tres pertenecientes al género *Heterorhabditis* sp. y la otra fue la cepa comercial de *Steinernema carpocapsae*. Una CL50 equivalente a 60 IJ por insecto infestado fue observada para la cepa más virulenta, LIM-1 *Heterorhabditis* sp.

Palabras clave: biocontrol, control integrado, entomógenos, *Heterorhabditis*, infectividad, *Steinernema*.

ABSTRACT

Castillo, A., and N. Marbán-Mendoza. 1996. Laboratory evaluation of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes for biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. Nematropica 26:101-109.

Eight nonselective insect-parasitic nematodes from two families, Steinernematidae and Heterorhabditidae, were selected for trials under laboratory conditions to determine pathogenicity against the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. The experimental design was based upon pergamine coffee set in sand. Included in the tests were a variety of strains: one Costa Rican and three native strains of *Steinernema* spp. from Mexico; one commercial strain of *Steinernema carpocapsae*; and three Costa Rican strains of *Heterorhabditis* sp. Mortality between 10-90% was observed when the nematodes were applied to the sand at concentrations of 12.5-400 infective juveniles per insect. Four strains displayed relatively higher levels of pathogenicity, three of which were *Heterorhabditis* sp., the other one was a commercial strain of *Steinernema carpocapsae*. An LC50 of 60 infective juveniles per insect was observed for the most virulent strain LIM-1 *Heterorhabditis* sp.

Key words: biocontrol, entomogens, *Heterorhabditis*, infectivity, integrated control, *Steinernema*.

INTRODUCCION

La broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) es la principal plaga del cultivo de café en el mundo (Le Pelley, 1968). El

insecticida más comunmente usado para su control es el endosulfan, pero se han encontrado evidencias de resistencia a este producto (Brun *et al.*, 1989). Además, las aplicaciones subsecuentes de este insecti-

cida sólo extienden la protección contra la broca, pero no ayudan a mejorar su manejo para el siguiente año (Manmsing, 1991). Lo anterior ha obligado a buscar métodos alternativos con el fin de reducir los riesgos que provoca el uso de plaguicidas en la estabilidad ambiental y la salud humana (Moore and Prior, 1989).

Aunque se sabe que los frutos caídos desempeñan un papel importante en la dinámica poblacional de la plaga albergándola durante la época de escasez de frutos (Baker, 1984), se ha contribuido poco a la reducción de la plaga a nivel del suelo. La recolección de los frutos del suelo después de la cosecha ('Pepena') es un método efectivo para reducir subsecuentes poblaciones de broca (Bergamin, 1944), pero es una actividad de trabajo intensiva.

Los nematodos pertenecientes a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* han mostrado potencial para combatir algunas plagas relacionadas al suelo o de hábitos crípticos (Georgis and Hom, 1992). Un estudio preliminar ha demostrado la susceptibilidad de *H. hampei* al nematodo *Heterorhabditis* sp. (Allard and Moore, 1989), sugiriendo la posibilidad de utilización de estos organismos dentro de un programa de manejo de la plaga para disminuir la emergencia de adultos de los frutos residuales (Georgis and Hom, 1992).

El objetivo de este trabajo es comparar la efectividad de algunas cepas de *Steinernematidos* y *Heterorhabditidos* en contra de *H. hampei* bajo condiciones de laboratorio, con el fin de seleccionar las cepas con mayor potencial para combatir a esta plaga en los frutos del suelo durante los períodos intercosechas.

MATERIALES Y METODOS

Una cepa comercial de *Steinernema carpocapsae* fue proporcionada por la compañía de control biológico Biosys en Palo Alto,

California, EE.UU. Tres cepas de *Heterorhabditis* sp. y una de *Steinernema* sp. nativas de Costa Rica fueron proporcionadas por el laboratorio de entomopatógenos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; y tres cepas de *Steinernema* sp. nativas de México fueron localizadas en la región del Soconusco, Chiapas. Todas fueron reproducidas usando larvas de *G. mellonella* y almacenadas usando la metodología convencional (Woodring and Kaya, 1988).

Se utilizaron ejemplares de broca de tres meses de edad provenientes de una cría en dieta (Villacorta and Barrera, 1993). Los experimentos se efectuaron dentro de recipientes conteniendo solución C con 0.6 de cloro libre, que condicionó una humedad relativa de $95 \pm 5\%$, colocados dentro de una cámara climática a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y oscuridad constante.

Pruebas de patogenicidad: Tres tipos de pruebas de patogenicidad fueron realizadas en forma independiente usando dieta, frutos frescos y café pergamino como alimento de la broca, un período de infestación previo de tres días fue necesario para los dos últimos sustratos mencionados. El número de individuos utilizados por cepa de nematodo fue de 100 brocas en grupos de diez, con excepción de las pruebas en dieta donde se usaron grupos de 20 brocas. Se comparó la patogenicidad de las ocho cepas de nematodos mediante la aplicación de 2000 JI/0.5 ml de agua destilada estéril.

La prueba con dieta se efectuó en cajas Petri de 6 cm de diámetro dentro de las cuales se colocaron brocas sobre un papel humedecido con 0.5 ml de agua estéril. Previo a la aplicación de nematodos se agregaron 0.2 g de dieta dishidratada como alimento de broca.

Arena tamizada (200-400 mallas/pulgada cuadrada) y estéril fue empleada en los ensayos con frutos infestados para permitir un medio propicio de dispersión de los nematodos.

En la prueba con frutos frescos se emplearon cerezas color verde-amarillas recién recolectadas. Después de infestados con una broca, cada fruto fue colocado sobre 25 g de arena humedecida dentro de cajas Petri de 6 cm de diam.

Los ensayos con café pergamino se realizaron en cajas serológicas (2 × 2 cm), dentro de las cuales se colocaron los granos de café infestados con diez brocas sobre 5 g de arena con 5% de humedad. En el testigo se aplicó agua destilada estéril en lugar de la suspensión de nematodos. La mortalidad de la broca se evaluó a los seis días de la inoculación.

Tiempo letal medio (TL50): Se evaluó la mortalidad de *H. hampei* provocada al aplicar 200 JI/huesped después de diferentes tiempos de exposición a cepas que mostraron mayor efecto en las pruebas de patogenicidad.

Durante diez días contados a partir del momento de la inoculación se evaluó diariamente la mortalidad de la broca. La unidad experimental correspondió a un grano de café pergamino infestado con 10 brocas. Se evaluó la mortalidad de *H. hampei* en cada período después de realizada la inoculación con cinco repeticiones. Mediante un análisis de varianza se comparó la mortalidad ocurrida en los diferentes tiempos de exposición independientemente de cada nematodo.

Concentración letal media (CL50): Se evaluó la mortalidad de *H. hampei* causada por diferentes concentraciones de juveniles infectivos de las cepas que mostraron mayor efecto sobre la mortalidad de broca en las pruebas de patogenicidad. La concentración efectiva de cada cepa fue evaluada colocando sobre la superficie de la arena diferentes cantidades de juveniles infectivos aplicados en 0.5 ml de agua por grano.

Se usaron concentraciones de 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 JI/huésped, con dos

valores intermedios entre cada uno, las cuales sumaron 16 concentraciones por cepa de nematodo. Se usó un diseño completamente aleatorizado con diez repeticiones. La mortalidad de *H. hampei* provocada por cada concentración fue evaluada a los siete días de realizada la inoculación de nematodos.

Análisis estadístico: El análisis de varianza fue realizado con datos normalizados usando la transformación $\arcsen\sqrt{\%}$. Para calcular el valor de CL50 (el número de nematodos requeridos para matar al 50% de insectos) de cada cepa se realizó un análisis probit usando la mortalidad corregida con la fórmula de Abbot (1925).

RESULTADOS

Los datos presentados en el cuadro 1 muestran que la mortalidad provocada por las ocho cepas de nematodos no fue evidente en la prueba con frutos frescos. Sin embargo, en la prueba con dieta y en el café pergamino se observó una diferencia significativa en la mortalidad ocurrida entre los tratamientos y el testigo ($P \leq 0.05$). En ambas pruebas se observaron a las cepas LIM-1, BIOSYS, DOM-8 y PC-3 dentro del grupo que causó mayor mortalidad de broca y a las cepas RAY, ZAPOTE y RINCON dentro del grupo de menor efecto. Considerando la sensibilidad que mostró la prueba con café pergamino para evaluar el potencial de uso de estos nematodos sobre frutos infestados, se utilizó a este sistema como modelo de evaluación de las fases posteriores de este trabajo. Las cuatro cepas que destacaron en la prueba de café pergamino provocaron mortalidad arriba del 50% (BIOSYS, LIM-1, PC-3 y DOM-8), criterio que se tomó en consideración para la eliminación del resto de las cepas de los posteriores ensayos.

La mortalidad causada por las cuatro cepas de nematodos evaluadas durante un

Cuadro 1. Promedios de la mortalidad transformada con $\arcsin\sqrt{\%}$ y en el correspondiente porcentaje de mortalidad de *Hypothenemus hampei* a los seis días de inoculación con 200 juveniles infectivos de ocho cepas de nematodos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* en tres diferentes sustratos diferentes sustratos alimenticios de broca (n = 100 brocas/tratamiento).⁴

Clave de la cepa	Nematodo	Lugar de origen	En café fesco	En dieta	En café pergamino
Biosys	<i>Steinernema carpocapsae</i>	E.E.U.U.	0.221	1.414 a	1.233 a
Lim-1	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	0.271	1.275 ab	1.168 a
Pc-3	<i>Heterorhabditid</i> sp.	Costa Rica	0.221	1.153 a-c	1.122 a
Dom-8	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	0.203	1.142 a-d	0.928 ab
Añirro	<i>Steinernema</i> sp.	Costa Rica	0.175	0.900 b-d	0.657 bc
Ray	<i>Steinernema</i> sp.	México	0.122	0.881 b-d	0.547 bc
Rincón	<i>Steinernema</i> sp.	México	0.170	0.743 cd	0.524 cd
Zapote	<i>Steinernema</i> sp.	México	0.253	0.672 d	0.351 cd
Testigo	—	—	0.189	0.172 e	0.285 d

⁴Letras diferentes entre tratamientos significan $P \leq 0.05$ con la prueba Tukey.

período de diez días mostró una tendencia a incrementarse durante este tiempo. En todas las cepas evaluadas no se observó diferencia significativa en la mortalidad de la broca a partir del tercer día de realizada la inoculación. En base a esta observación se aplicó el criterio de utilizar el tiempo promedio de las más altas mortalidades observadas en este experimento como valor de tiempo letal, la cual fue de siete días posteriores a la inoculación de los juveniles infectivos (Fig. 1).

El cuadro 2 exhibe los valores de CL50, límites fiduciales y la ecuación de regresión de los cuatro nematodos que fueron incluidos en la prueba para encontrar la dosis efectiva para matar a la broca. Cada cepa esta ubicada en orden ascendente de acuerdo a su respectiva CL50. La cepa LIM-1 presenta la CL50 más baja, le siguen en orden descendente PC-3 y DOM-8 sp. y la cepa comercial.

Rectas de regresión fueron calculadas para estas mismas cuatro cepas usando el

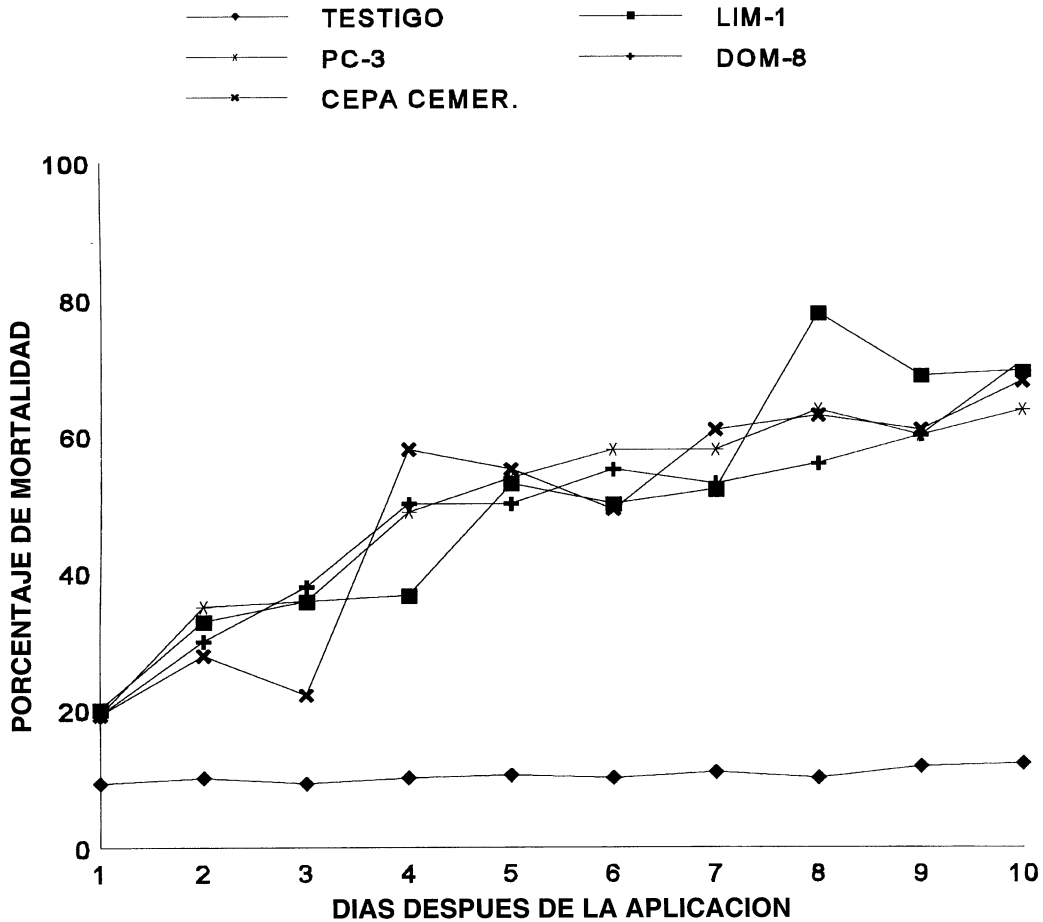


Fig. 1. Mortalidad de adultos de *H. hampei* causada por la aplicación de 200 juveniles infectivos/insectos de cuatro cepas de nematodos.

Cuadro 2. Valores de CL50, límites fiduciales y ecuación de regresión de cuatro cepas de nematodos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* evaluadas sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*.

Clave	Nematodo	CL50 (JI/insecto)	Límites fiduciales (95%)	Ecuación de regresión
Lim-1	<i>Heterorhabditis</i> sp.	59.9	54.5 - 65.7	$Y = 0.231 + 1.71 X$
Pc-3	<i>Heterorhabditis</i> sp.	89.0	80.9 - 98.2	$Y = 0.169 + 1.63 X$
Dom-8	<i>Heterorhabditis</i> sp.	116.8	105.2 - 130.5	$Y = 0.304 + 1.53 X$
Biosys	<i>Steinernema carpocapsae</i>	134.5	120.8 - 151.3	$Y = 0.233 + 1.52 X$

valor probit de la mortalidad de la broca con el logaritmo del número de JI/grano de pergamino cada uno infestado con diez brocas (Fig. 2).

DISCUSION

La drástica diferencia en los resultados de las pruebas de patogenicidad donde se usaron frutos como sustrato alimenticio, indica que se necesitan ciertas condiciones del fruto infestado para facilitar un efecto patogénico sobre la broca, lo que sugiere la sensibilidad del café pergamino infestado para evaluar este efecto.

En esta prueba se revela la capacidad de los nematodos para infectar a *H. hampei* bajo condiciones parecidas a las que tienen los frutos del suelo durante los períodos inter cosecha. La efectividad de los nematodos para matar a la broca en las pruebas con café pergamino, también muestra indirectamente su capacidad para alcanzar a la población de broca dentro del grano de café.

Un aspecto importante a considerar en el resultado obtenido con frutos infestados es que la concentración de nematodos por volumen de arena fue de 100 JI/ml en la prueba con fruto fresco y de 500 JI/ml en el café pergamino. Este hecho confiere mayor oportunidad para producirse un encuentro nematodo-broca en la prueba

con café pergamino, lo que pudo haber causado la diferencia en ambas pruebas.

Con una broca por fruto, el fruto fresco se asemeja a frutos infestados al inicio de la fructificación. En estas condiciones la broca emergió del fruto, quedando confinada en la arena donde no mostró ser afectada durante los seis días que duró el ensayo, aún cuando una revisión realizada a la arena infestada mostró poca mortalidad de nematodos. Contrariamente, en el ensayo con café pergamino la broca se mantuvo mayormente agregada dentro del fruto, permitiendo una actividad más parecida a la de los frutos residuales en la época inter cosechas.

Las cepas nativas causaron en las tres pruebas el más bajo porcentaje de mortalidad de broca probablemente porque a diferencia de las cepas LIM-1, PC-3 y DOM-8 las cuales fueron elegidas por su efecto sobre larvas de *Phylophaga* sp., estas no fueron preseleccionadas por tratarse de solo tres cepas.

La CL50 representa el número de nematodos con que se puede matar al 50% de la población de la broca. El valor más bajo de CL50 de la cepa LIM-1 *Heterorhabditis* spp. indica que es la más virulenta de cepas evaluadas. Le siguen en orden descendente las cepas *Heterorhabditis* sp. PC-3 y *Heterorhabditis* sp. Dom-8 y la cepa comercial de *S. carpocapsae*. Aunque se pueden considerar iguales a las dos últimas cepas,

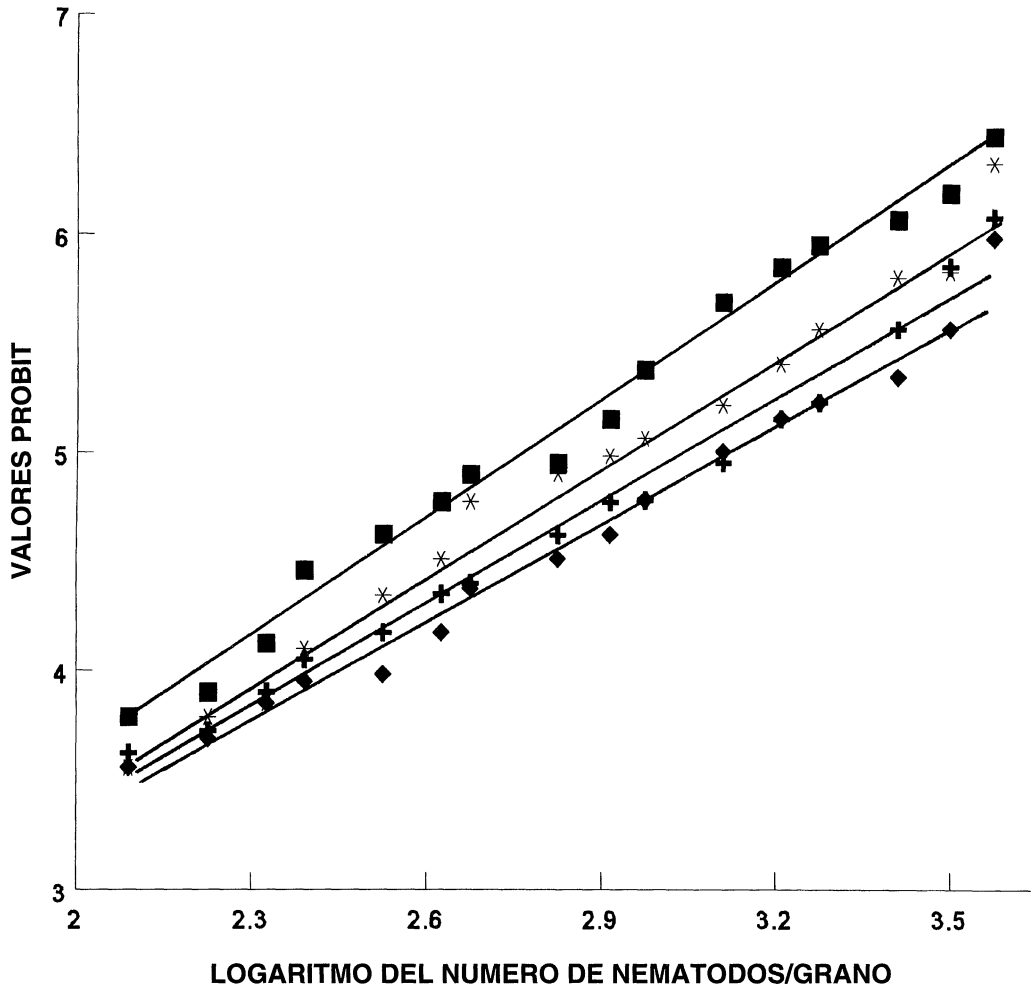


Fig. 2. Rectas de regresión del valor probit de la mortalidad y logaritmo del número de IJ/grano de café, correspondientes a *Heterorhabditis* sp. LIM-1 (■), *Heterorhabditis* sp. PC-3 (*), *Heterorhabditis* sp. DOM-8 (⊕) y *Steinernema carpocapsae* (◆) sobre *Hypothenemus hampei*.

ya que sus límites fiduciales se traslapan. Por el contrario las cepas *Heterorhabditis* sp., PC-3 son estadísticamente diferentes porque sus límites fiduciales no se traslapan. Los resultados muestran que LIM-1 presenta su CL50 dos veces más baja que la cepa DOM-8 y la cepa comercial de *S. carpocapsae* (1 052 y 1 345, respectivamente), que le imponen mejores expectativas para usarse dentro de un programa de control biológico de la broca.

El valor de la pendiente está relacionado positivamente con la homogeneidad de respuesta. De acuerdo a esto podemos observar la cepa LIM-1 mostrando el valor de la pendiente más alta (1.74). Le siguen en orden descendente Dom.8, PC-3 y *S. carpocapsae* con pendientes de 1.6, 1.54 y 1.5, respectivamente. En nuestro caso el valor de las cuatro pendientes tiene diferencias pequeñas que nos hace considerar que no existe diferencia entre la homoge-

neidad de respuesta entre estas cuatro cepas.

La mortalidad de broca causada por las ocho cepas incluidas en este trabajo implicó evaluarles indirectamente su capacidad de introducirse a las galerías hechas por la broca, localizarla e infectarla. De las ocho cepas fueron tres *Heterorhabditidos* los que mostraron mayor capacidad infectiva en *H. hampei* y solo un *Steinernematido*. Estos resultados apoyan lo encontrado por otros autores quienes observaron que la capacidad de búsqueda de los *Heterorhabditidos* es mayor que la de *Steinernematidos* (Choo *et al.*, 1989).

La cepa LIM-1 mostró ser la mejor candidata para usarse en un posible control de broca, pero es preferible confirmar la presencia de nematodos nativos de la región del Soconusco con características iguales o mejores que LIM-1 antes de tratar de liberar nematodos exóticos que impliquen riesgos de causar alteraciones no deseadas en la población nativa de otros organismos.

Los resultados obtenidos arrojan indicaciones sobre la potencialidad de estos organismos para controlar las poblaciones de broca. Sin embargo, es obvio la necesidad de corroborar esto bajo condiciones de campo donde la variabilidad de factores físicos y biológicos podrían interferir con lo observado en laboratorio.

Finalmente, aunque exista una esperanza de utilización de estos nematodos en contra de la broca, aún no podríamos incluirlos dentro de un programa de control biológico, sin antes evaluar su efecto sobre otros organismos, especialmente sobre la fauna benéfica, como los parasitoides de la broca cuya efectividad en campo se ha comprobado (Barrera *et al.*, 1990).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos de CONACYT (Consejo Nacional de Cien-

cia y Tecnología de México) con apoyo de ECOSUR (El Colegio de la Frontera Sur de México). Agradecemos a la compañía BIOSYS de EE.UU. y al laboratorio de entomopatógenos del CATIE en Costa Rica, el habernos proporcionado el material biológico incluido en este trabajo.

LITERATURA CITADA

- ABBOT, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of insecticide. *Journal of Economic Entomology* 54:256-257.
- ALLARD, G. B. y D. MOORE. 1989. *Heterorhabditis* sp. nematodes as control agents for coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Scolytidae). *Journal Invertebrate Pathology* 54:45-48.
- BAKER, P. S. 1984. Some aspects of the behavior of the berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomológica Mexicana* 61:32-33.
- BARRERA, J. F., D. MOORE, Y. J. ABRAHAM, S. T. MURPHY y C. PRIOR. 1990. Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in México and possibilities for further action. Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases - 1990, Pp. 391-396.
- BERGAMIN, J. 1944. O "repose" como metodo de controle da broca do café "*Hypothenemus hampei*" (Ferrari 1867) (Col. Ipidae). *Arquivos do Instituto Biológico Sao Paulo* 15:197-208.
- BRUN, L. O., C. MARCILLAUD, V. GAUDICHON y D. M. SUCKLING. 1989. Endosulfan resistant *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. *Entomological Society of America* 82:1311-1316.
- CHOO, H. Y., H. K. KAYA, T. M. BURLANDO y R. GAUGLER. 1989. Entomopathogenic nematodes: Host-finding ability in the presence of plants roots. *Environmental Entomology* 18:1136-1140.
- GEORGIS, R. y A. HOM. 1992. Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. *Nematropica* 22:81-98.
- LE PELLEY, R. H. 1968. "Pests of Coffee". Longmans, London, U.K.
- MANMSING, A. 1991. Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. *Journal of Coffee Research (India)* 21:67-98.
- MOORE, D. y C. PRIOR. 1989. Present status of control biological of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*: Brighton Crop Protection Conference: Pest and Disease - 1988, Pp. 1119-1124.

WOODRING, J. L. y H. K. KAYA. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Southern Cooperative Series Bulletin No. 331, 29 pp.

VILLACORTA, A. y J. F. BARRERA. 1993. Nova dieta meridica para criacao de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). Comunicacao cientifica. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 22:405-409.

Recibido:

06.VI.1994

Aceptado para publicación:

03.III.1996

Received:

Accepted for publication: