

POTENCIALIDADES DE *Heterorhabditis bacteriophora* POINAR CEPA HC1 PARA EL MANEJO DE *Hypothenemus hampei* FERR. I. PARASITISMO Y CAPACIDAD DE BÚSQUEDA

Lourdes Sánchez† y Mayra G. Rodríguez

Dirección de Protección de Plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10.
San José de las Lajas. La Habana, Cuba. Correo electrónico: mrguez@censa.edu.cu

RESUMEN: En Cuba, *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HC1 ha demostrado cualidades favorables como agente de control biológico de diversos insectos plagas, empleándose con éxito en el manejo del complejo de chinches harinosas (Pseudococcidae) del cafeto, tetuán del boniato (*Cylas formicarius*) y plutela (*Plutella xylostella*) en col de repollo; entre otras. Con el objetivo de comprobar su efectividad sobre la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*), plaga del cafeto en Cuba, se evaluó la susceptibilidad de los diferentes estadios del insecto y la capacidad de penetración de los nematodos a los granos de café infestados. A las 48 horas se registró el 100 % de mortalidad de las larvas y pupas en el ensayo *in vitro* y también dentro de los granos de café tratados. Se observó una agregación de juveniles infectivos del nematodo sobre los huevos, los que parasitaron a las larvas en el momento de la emergencia. En condiciones simuladas de campo, se obtuvo un 60% de mortalidad en estos estadios dentro de los granos de café con un incremento progresivo, en dependencia del momento de evaluación, registrándose una mortalidad media del 93% a los 17 días.

(Palabras clave: nematodo entomopatógeno; cafeto; *Heterorhabditis bacteriophora*; *Hypothenemus hampei*; broca del café)

POTENTIALITIES OF *Heterorhabditis bacteriophora* POINAR STRAIN HC1 FOR THE MANAGEMENT OF *Hypothenemus hampei* FERR. I. PARASITISM AND SEARCH CAPACITY

ABSTRACT: In Cuba, *Heterorhabditis bacteriophora* strain HC1 has demonstrated favourable qualities as biological control agent of diverse pest insects under the Cuban conditions. It is being used successfully against mealybugs (Pseudococcidae) complex in coffee *Cylas formicarius* in sweet potato and diamond back (*Plutella xylostella*) in cabbage, among others. In order to check its effect on the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), main pest in coffee in Cuba, the susceptibility on different insect stages and the capacity of nematodes for penetrating coffee grains infested were evaluated. A mortality of 100% of larvae and pupae placed in Petri dishes and in coffee grains treated was registered at 48 hours. Infective juveniles, which parasite larvae at the moment of the emergency, were aggregated on the eggs. Under simulated field conditions, a 60% mortality was obtained in these stages inside coffee grains with a progressive increment in dependance of the evaluation moment, registering a half mortality of 93% at 17 days.

(Key words: entomopathogenic nematode; coffee; *Heterorhabditis bacteriophora*; *Hypothenemus hampei*; coffee berry borer)

INTRODUCCION

En términos de valor económico, el café es considerado uno de los cultivos agrícolas más importante del mundo destinándose alrededor de 55 billones de dólares anualmente a su producción (5) porque constituye el segundo renglón de intercambio, después del petróleo, para muchos países en desarrollo (14).

La broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) es el principal problema fitosanitario que afecta los rendimientos del cultivo. Esta plaga, endémica de África Central se encuentra distribuida actualmente en casi todos los países productores (2). En América está presente en numerosos países y en Cuba se informó su presencia en plantaciones del oriente del país en la década del 90' (7).

El daño que ocasiona el insecto al alimentarse del grano trae como consecuencia la merma en el rendimiento y la baja calidad del mismo; el fruto afectado puede caer al suelo y convertirse en fuente de infestación postcosecha. El ciclo biológico se desarrolla completamente dentro del grano, excepto, cuando las hembras salen en busca de un nuevo grano para colonizarlo, lo que hace extremadamente difícil su control (14).

En la actualidad, para su manejo, se han evaluado y se ejecutan programas de manejo de plagas (MIP), que poseen como componentes el control cultural, el uso de agentes de control biológico y cuando es absolutamente necesario el control químico.

Para el control biológico, se ha hecho énfasis en el uso de parasitoides y hongos entomopatógenos que van dirigidos hacia los granos infestados de la planta (2); sin embargo las bayas infestadas que caen al suelo y se enmascaran en la hojarasca, escapan de la acción de estos agentes y se convierten en reservorios de la plaga, por lo que deben ser recolectados manualmente.

En condiciones de laboratorio los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* han demostrado la capacidad de parasitar diferentes estadios del insecto y causar alta mortalidad (1), la que puede variar en dependencia de la especie de nematodo (6).

Los juveniles infectivos de *H. bacteriophora* Poinar, cepa HC1 nativa de Cuba han demostrado ser eficientes agentes de control y se ha aplicado con éxito en el agroecosistema cafetalero para el combate del complejo de chinches harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae) (11), donde el estudio de sus potencialidades como agente de control biológico para ser insertado en el programa de manejo de la broca del café debe ejecutarse.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los nematodos empleados pertenecen a la cepa HC1 de *H. bacteriophora* previamente caracterizada (12) y fueron reproducidos sobre larvas de *Galleria mellonella* y/o *Corcyra cephalonica* en condiciones de Buey Arriba, utilizando la metodología de Sánchez *et al.* (12).

Experimento 1: Para la evaluación de la efectividad de los nematodos sobre estadios de la broca, se ejecutaron experimentos *in vitro*, donde se emplearon placas Petri de 9,5 cm de diámetro, forradas interiormente con papel de filtro, se humedecieron con una suspensión de juveniles infectivos (JI) del nematodo a razón de 5000 ejemplares placa Petri⁻¹. Otras placas Petri se humedecieron con agua destilada y se utilizaron como testigo.

Mediante disección de bayas de café infestadas por la broca, procedentes de una cría de laboratorio se obtuvieron las siguientes fases del insecto (larvas, pupas y adultos) y se distribuyeron separadamente 15 individuos de cada estado placa Petri⁻¹, con tres repeticiones por tratamiento. Todas las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (25±2 °C).

A las 48 horas se realizó el conteo de individuos vivos y muertos por placas con auxilio de un estereomicroscopio. Cuatro días después se realizó la disección de 15 especímenes con síntomas típicos de parasitismo para verificar la presencia de nematodos.

Experimento 2: Con el objetivo de comprobar si el nematodo era capaz de penetrar los granos brocados, se colocaron bayas de café infestadas en placas Petri forradas con papel de filtro y se inocularon con 12000±153 JI placa⁻¹, colocando 10 granos placa⁻¹ y replicándose 10 veces. Igual número de placas Petri y bayas pero sin nematodos se mantuvieron como control. Todas se conservaron a temperatura de 25±2°C.

A los 10 días se abrieron los granos de café y se determinó el porcentaje de larvas, pupas y adultos vivos y muertos en su interior.

Experimento 3: Con el mismo propósito, se realizó otro ensayo pero empleando suelo como sustrato para colocar los granos. En bandejas metálicas de 0.06 m² de superficie y 7 cm de profundidad, se colocó suelo y hojarasca para simular las condiciones naturales de la capa superficial de una plantación de café.

A partir de una suspensión del nematodo recién obtenida en trampa White (15) se preparó un inóculo

de concentración de 50 JI mL⁻¹ y se aplicó en los diferentes tratamientos con un aspersor manual a razón de 120 mL (6000 JI bandejas⁻¹).

Para el estudio se emplearon granos de café de más de seis semanas de infestados en crías de laboratorio. Se conformaron los siguientes tratamientos:

Tto. 1. Control. Se situaron los granos de café infestados en el suelo y se asperjaron con 120 mL de agua.

Tto. 2. Se situaron los granos de café e inmediatamente se asperjaron con el biopreparado.

Tto. 3. Se asperjó el biopreparado y 3 horas después se situaron los granos.

Tto. 4. Se asperjó el biopreparado y 3 días después se situaron los granos.

Cada tratamiento consistió en una bandeja con 50 bayas de café infestadas por broca y cada grano constituyó una repetición dentro del tratamiento. Durante la ejecución del experimento las bandejas permanecieron cubiertas con una malla antiáfidos y la temperatura media registrada en el suelo fue de 25 ± 1°C.

Las evaluaciones se efectuaron a los 5, 8, 11, 14 y 17 días después de establecidos los tratamientos. En cada evaluación se seleccionaron 10 granos de café al azar por tratamiento y mediante disección en el estereomicroscopio se extrajeron todos los individuos y se contaron los vivos y muertos por grano, calculándose el porcentaje de mortalidad total. Los cadáveres fueron disectados para confirmar la presencia de nematodos.

Los datos se transformaron a arcsen v% y se procesaron mediante un modelo bifactorial considerando como factores: los tratamientos y el momento de evaluación. Para determinar la significación de las medias se empleó la prueba Duncan, utilizando el Paquete Estadístico SAS para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1: En el experimento *in vitro*, los juveniles infectivos (JI) penetraron y parasitaron las larvas, pupas y adultos de *H. hampei*, provocando un 100% de mortalidad en los dos primeros estadios y 88.2% en los adultos. En las placas Petri utilizadas como testigos, la mortalidad de cada estadio fue de 15, 18 y 15% en larvas, pupas y adultos respectivamente. Las larvas parasitadas a las 48 horas se desintegraron por la acción del complejo nematodo-bacteria y no fue posible constatar la presencia de nematodo. Por su parte, las pupas, presentaron el color pardo roji-

zo, provocado por esta cepa en los hospedantes (12) y en su interior, al igual que en los adultos se encontraron juveniles de nematodo a los 4 días.

En las condiciones en que se ejecutó este experimento, los aislamientos de nematodos entomopatógenos parasitan a la mayor parte de los insectos en sus diferentes estadios, pues es seguro el contacto entre estos y los insectos hospedantes; las condiciones ambientales son óptimas y las barreras ecológicas y de comportamiento son removidas (8).

Experimento 2: En el experimento se utilizaron granos de café brocados. Los JI de *H. bacteriophora* HC1 penetraron las bayas a través de los orificios producidos por la broca y causaron la muerte al 100% de larvas, pupas de los insectos y en más del 80% de los adultos. En el control la mortalidad fue inferior al 13% (Fig. 1).

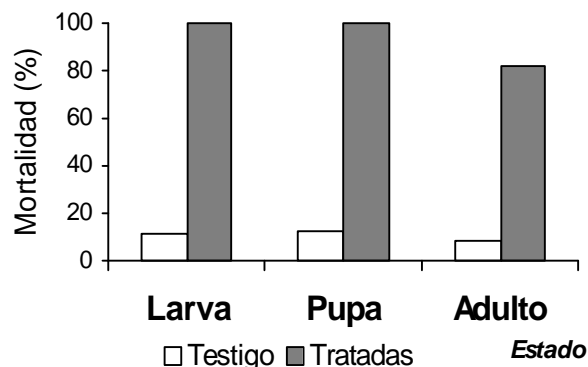


FIGURA 1. Mortalidad causada por los nematodos entomopatógenos en estadios de broca del café (individuos parasitados dentro de los frutos)./ *Mortality caused by entomopathogenic nematodes in coffee berry borer stages (specimens inside of berry).*

Resulta curioso que los huevos no fueron parasitados. Cuando se abrían los granos, se observaba que los JI se situaban sobre la superficie de los huevos sin penetrarlos y cuando emergen las larvas se efectúa su acción parasítica, las cuales se deterioran rápidamente por la acción del complejo nematodo-bacteria.

La capacidad que poseen los nematodos entomopatógenos para penetrar a través de las galerías y orificios que producen los insectos, buscarlos y parasitarlos, ha permitido su uso exitoso contra plagas que habitan en lugares protegidos, tales como barrenadores del tallo y perforadores de los frutos y las raíces (3, 4, 10).

Los resultados en este experimento corroboraron los obtenidos con los nematodos en placas Petri, donde el porcentaje de mortalidad en los adultos resultó menor que en larvas y pupas. En estudios con otro coleóptero, *Cylas formicaris* F., los nematodos entomopatógenos son efectivos para el manejo de larvas-pupas y menos para adultos, según los resultados de Jansson *et al.*, 1993 citados por Bélair (4).

Experimento 3: Para las condiciones de campo simuladas resultó significativa la interacción entre los diferentes tratamientos ensayados y el momento de evaluación (Fig. 2). En sentido general, se observa que no hubo diferencias cuando se aplicó el biopreparado de nematodos a los granos de café en el suelo (Tto. 2). Específicamente en el tratamiento 3, se asperjaron los nematodos al suelo y 3 horas después se situaron los granos, lo que indica que son capaces de penetrar a las bayas, tanto si se aplican directamente sobre estas o si se ha realizado la aspersión recientemente al suelo cuando caen los granos; aunque en el primer caso la penetración fue mayor, ya que las medias superiores de mortalidad se asociaron a dicho tratamiento, lo que evidencia en algunos nematodos la adherencia a la corteza de las bayas y por ende, resulta más fácil su entrada.

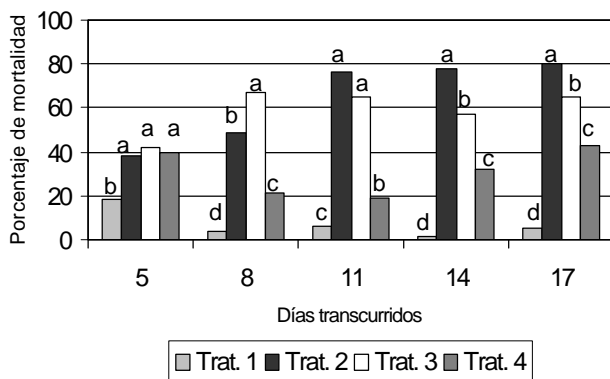


FIGURA 2. Mortalidad provocada por los JI de la cepa HC1 sobre los estadios de broca del café, en dependencia de los tratamientos (momentos en que entran en contacto nematodos y granos brocados). (n=10; ESx=1.83). Media con letras iguales en un mismo grupo no difieren; ($p < 0.05$)./ *Mortality caused by JI of HC1 strain in stages of coffee berry borer in the different treatments (moment with entomopathogenic nematodes and coffee berry are in contact).*

Los mayores valores de mortalidad se registraron a partir del octavo día de realizada las aplicaciones, lo

que sugiere que una vez dentro, los nematodos son capaces de multiplicarse y parasitar nuevos individuos, los que conforman las colonias.

En los tratamientos que se aplicaron a los nematodos se observó con frecuencia en algunos granos la presencia de uno o dos insectos parasitados. Al hacerles la disección se observó un único adulto hermafrodita con gran cantidad de huevos, lo que indica que un solo JI que penetre puede parasitar y ejercer un control eficiente sobre el total de la población allí presente. Allard y Moore (1) consideran posible que los nematodos reproducidos dentro de los granos puedan elevar su nivel poblacional e infestar los nuevos granos que caen al suelo.

A partir de los 14 días en el tratamiento 4 (ubicación de los granos tres semanas después de la aplicación del biopreparado) ocurrió un incremento considerable en el porcentaje de parasitismo, que aunque no llegó a alcanzar valores similares a los de los tratamientos 2 y 3, indica que el nematodo fue capaz de persistir en las condiciones experimentales durante algún tiempo en el suelo, manteniendo su capacidad de migración hacia los granos y penetrarlos en busca de sus hospedantes, para ello es posible que se oriente por estímulos químicos que emanan de las heces de los insectos, como ocurre con *Neoplectana carpocapsae* (13).

En el caso del tratamiento control, la mortalidad se mantuvo por debajo del 20% lo que verifica el efecto producido por los nematodos.

Estos resultados son de gran importancia si se tiene en consideración que *H. hampei* constituye una plaga devastadora del café y que su control se hace muy difícil por sus hábitos barrenadores, lo que disminuye la efectividad de los productos químicos empleados contra el mismo por lo cual disponer de un agente nativo, biorregulador activo y eficaz abre las perspectivas para su combate. Teniendo en cuenta que en países como Colombia se estudia a los nematodos entomopatógenos como una alternativa más para el manejo de la broca (9), se impone la realización de experimentos a nivel de campo en aras de determinar su efectividad, dosis, frecuencia y momento de su aplicación, insertados como una práctica más dentro de un Programa de Manejo Integrado.

AGRADECIMIENTOS

Al Técnico Roberto Enrique por su valiosa colaboración en la ejecución de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Allard, G.B. y Moore, D. (1989): *Heterorhabditis* sp. Nematodes as control agents for coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Scolytidae). *J. Invertebr. Pathol.* 54(1): 45-48.
2. Baker, P.S. (1999): The coffee berry borer in Colombia. Final report of the DFID – CENICAFÉ – CABI Bioscience IPM for coffee project. DFID – Cenicafé, Chinchiná, Colombia.
3. Begley, J.W. (1990): Efficacy against insects in habitats other than soil. En *Entomopathogenic nematodes in biological control*. R. Gaugler; H. K. Kaya (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp. 215-231.
4. Bélair, G.; Wright; D.J. y Curto, G. (2006): Vegetables and Tuber Crop Applications. En *Nematodes as Biocontrol Agents*. P.S. Grewal; R.U. Ehlers; D.I. Shapiro-Ilan (Eds.). CAB International. Pp 255-264.
5. Cárdenas, J. (2001): The World Coffee Crisis. En *Proceedings of the World Coffee Conference*, London, May 2001.
6. Castillo, A. y Marban-Mendoza, N. (1996): Evaluación en laboratorio de nematodos Steinernematidos y Heterorhabditidos para el control biológico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferr. *Nematropica*. 26 (2): 101-109.
7. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (2004): Programa de Defensa Broca del Café. Estrategias para su cumplimiento. Dirección Nacional de Café y Cacao. Ministerio de Agricultura, Cuba. 15pp.
8. Kaya, H.K. y Koppenhofer, A.M. (1999): Biology and Ecology of Insecticidal Nematodes. En *Optimal Use of Insecticidal Nematodes in Pest Management*. S. Polavarapu (Ed.). Rutgers University. Proceeding of the workshop. Pp. 1-8.
9. López Núñez, J.C. (2006): Avances en el uso de nematodos entomopatógenos para el control de la broca del café. En *IV Congreso Internacional de Control Biológico*. Sesión Neotropical, Organización Internacional de Control Biológico. Memorias: Control Biológico de plagas, patógenos y arvenses en Agricultura. Palmira, Colombia. Pág. 20.
10. Poinar, G.O., Jr. y Deschamps, N. (1981): Susceptibility of *Scolytus multistriatus* to neoaplectanid and heterorhabditid nematodes. *Environ. Entomol.* 10(1): 85-87.
11. Rodríguez, I.; Rodríguez, Mayra G.; Sánchez, Lourdes; Martínez, María A. (1997): Efectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidae: Heteroderidae) sobre Chinchas Harinosas del Cafeto (Homoptera: Pseudococcidae). *Rev. Protección Veg.* 12(2): 119-122.
12. Sánchez, Lourdes (2002): *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. *Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas*. UNAH, La Habana. Cuba. 100 pp. (número de depósito CENDA 09613-9613-2002).
13. Schmidt, J. y All, J.N. (1979): Attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insects. *Environ. Entomol.* 8(1): 55-61.
14. Vega, F.E. y Rosenquist, E. (2001): The Coffee Berry Borer and Coffee Research at the United States Department of Agriculture. En *Proceedings of the World Coffee Conference*, London, May 2001.
15. Woodring, Jennifer L. y Kaya, H.K. (1988): Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. En *A Handbook of Biology and Techniques*. Southern Coop. Series Bull. 331: 1-30.

(Recibido 2-5-2006; Aceptado 4-4-2007)