

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOGENOS (RABDITIDA:  
STEINERNEMATIDAE Y HETERORHABDITIDAE) PARA EL CONTROL  
BIOLÓGICO DE BROCA DEL CAFE *Hypothenemus hampei* FERR. EN CHIAPAS,  
MÉXICO

T E S I S  
SOMETIDA A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ  
TÉCNICO DE POSGRADO Y CAPACITACIÓN  
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y RECURSOS  
NATURALES DEL CATIE  
PARA OPTAR AL  
GRADO DE

MAGISTER SCIENTIAE

POR

ALFREDO CASTILLO VERA

TURRIALBA, COSTA RICA.

ABRIL, 1995

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Nahúm Marbán, Ph.D.  
Profesor Consejero

Philip Shannon, M.Sc.  
Miembro del Comité

Caroline Smith, M.Sc.  
Miembro del Comité

Joseph Saunders, Ph.D.  
Miembro del Comité

Juan Antonio Aguirre, Ph.D.  
Jefe, Area de Postgrado

Pedro Ferreira, Ph.D.  
Director, Programa de Enseñanza

Alfredo Castillo Vera  
Candidato

## BIOGRAFIA

El autor es originario de Tapachula, Chiapas, México, donde cursó estudios de Química Agrícola en la Universidad Autónoma de Chiapas. Ha laborado como docente en centros educativos de nivel medio superior del estado de Chiapas y participado en diversos proyectos de investigación en control de plagas. Desde hace ocho años presta sus servicios como investigador en El Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR (anteriormente denominado Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, CIES) en Chiapas, México. En 1993 fue becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México para ingresar al programa de posgrado del CATIE.

## **DEDICATORIA**

**A SUSANA,**

Por su integro y total apoyo.

**A ITZEL,**

La razón principal de este esfuerzo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado una beca para la realización de estos estudios.

Al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza por permitirme realizar mis estudios.

Al Colegio de la Frontera Sur por darme todas las facilidades para llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Nahum Marban por su orientación, su siempre comprensiva actitud y constante apoyo.

Al Dr. Joseph Saunders, Ms.C. Phillip Shannon y Ms.C. Caroline Smith por sus observaciones al inicio y en la revisión de la tesis.

Al M. en C. William De La Rosa Reyes por las sugerencias recibidas durante el transcurso de esta investigación.

A la Dra. Raquel Alatorre por sus valiosos comentarios y al Dr. Cid del Prado por la identificación de especímenes incluidos en el trabajo.

Al Dr. J. Pablo Liedo por su confianza e incondicional apoyo recibido durante la realización de estos estudios.

Al personal del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, especialmente al proyecto broca del café, quienes desinteresadamente me brindaron su ayuda.

Al laboratorio de entomopatógenos del CATIE que me proporcionó material biológico para la realización del trabajo.

A la compañía comercializadora de organismos benéficos Biosys que me facilitó material biológico para realizar los ensayos.

## INDICE GENERAL

	pagina
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS	3
2.1. Objetivos generales	3
2.2. Objetivos específicos	3
2.3. Hipotesis	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. La broca del café <i>Hypothenemus hampei</i>	4
3.1.1. Taxonomía	4
3.1.2. Sinónimia	4
3.1.3. Origen y distribución	5
3.1.4. Morfología	5
3.1.4.1. Huevo	5
3.1.4.2. Larva	5
3.1.4.3. Prepupa	7
3.2.1.4. Pupa	7
3.2.1.5. Adulto	7
3.1.5. Biología	7
3.1.5.1. Ciclo biológico	7
3.1.5.2. Longevidad de adultos	9
3.1.5.3. Reproducción	9
3.1.6. Ecología	9
3.1.6.1. Descripción del daño	9
3.1.6.2. Humedad del grano	10
3.1.6.3. Humedad relativa	10
3.1.6.4. Temperatura	11
3.1.6.5. Altitud	11
3.1.6.6. Lluvia	11
3.1.6.7. Humedad del suelo	11
3.1.6.8. Sombra	12
3.1.7. Métodos de control	12
3.1.7.1. Control cultural	12
3.1.7.2. Control manual	12
3.1.7.3. Control Químico	13
3.1.7.4. Control Biológico	14

	<b>pagina</b>
3.2. Nematodos entomogenos	16
3.2.1. Taxonomía y sinonimia	17
3.2.2. Mecanismo de acción	18
3.2.3. Relación mutualista	20
3.2.4. Ciclo de vida	20
3.2.5. Ecología	21
3.2.5.1. Factores abióticos	21
3.2.5.2. Factores bióticos	22
3.2.5.3. Relación con el huesped	23
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>25</b>
4.1. Ubicación del trabajo	25
4.2. Cría de la broca del café	25
4.3. Cría de <i>G. mellonella</i>	25
4.4. Cría de nematodos	26
4.5. Conteo de nematodos	27
4.6. Infestación de café verde	28
4.7. Infestación de café pergamino	28
4.8. Búsqueda de nematodos nativos	29
4.9. Pruebas de patogenicidad	29
4.9.1. Procedimiento general	29
4.9.1. Prueba de patogenicidad en fruto verde	31
4.9.2. Prueba de patogenicidad en dieta	31
4.9.3. Prueba de patogenicidad en café pergamino	32
4.10. Tiempo letal medio (TL50)	32
4.11. Concentración letal media (CL50)	33
4.12. Efecto de la condición del fruto infestado.	34
4.13. Analisis Estadístico	35
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
5.1. Muestreo de nematodos.	36
5.2. Pruebas de patogenicidad.	37
5.3. Desarrollo de los nematodos en <i>H. hampei</i>	43
5.5. Tiempo letal medio (TL50).	44
5.6. Concentración letal media (CL50).	45
5.7. Efecto de la condición del fruto infestado.	50
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>55</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>56</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>70</b>

## RESUMEN

En este trabajo se determinó bajo condiciones de laboratorio el parasitismo que ejercen los nematodos pertenecientes a las familia Steinernematidae y Heterorhabditidae sobre adultos de *Hypothenemus hampei* y su potencial para utilizarse en contra de la población localizada en frutos caídos al suelo durante el periodo inter cosechas en Chiapas, México. Como modelo de evaluación se empleó café pergamino infestado, simulando el suelo con arena. Se observó un efecto patogénico en la broca del café cuando se aplicaron de 125 a 4000 juveniles infectivos de nematodos sobre la arena conteniendo el grano brocado. Se incluyeron en esta evaluación tres cepas nativas de la región del Soconusco, cuatro originarias de Costa Rica y una cepa comercial. Cuatro cepas se presentaron con mayor efecto parasítico, tres de las cuales fueron del género *Heterorhabditis* y la cepa comercial de *Steinernema carpocapsea*. Una CL50 de 600 juveniles infectivos por grano infestado fue observada para la cepa más agresiva, LIM-1 *Heterorhabditis* spp. El efecto parasítico usando café pergamino infestado fue mayor que cuando se usó café verde y café seco.

## SUMMARY

Non-selective insect-parasitic nematodes from 2 families, Steinernematidae and Heterorhabditidae were selected for trials under laboratory conditions, to determine infectivity against the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, and their potential use to control the population of this pest found within coffee berries fall in the soil between harvests at Chiapas, México. The experimental design was based upon pergamine coffee set in sand. Parasitism was observed when the nematodes were applied to the sand at 125 to 4000 infective juveniles. Included in the tests were a variety of strains: one from Costa Rican and 3 native strains of *Steinernema* spp. from the Soconusco region; a commercial strain of *Steinernema carpocapsea* and 3 Costa Rican strains of *Heterorhabditis* spp. Four strains displayed relatively higher levels of parasitism, 3 of which were of *Heterorhabditis* spp., the other *Steinernema* spp. An LC50 of 600 infective juveniles per infested berry was observed for the most aggressive strains, *Heterorhabditis* spp., LIM-1. Greater parasitism was observed using pergamine coffee than with green or dried berries.

## LISTA DE CUADROS

CUADRO	TITULO	PAGINA
1	Composición de la dieta para criar a la broca del café	26
2	Descripción de las cepas de nematodos evaluados.	38
3	Promedios de la mortalidad transformada con $\arcsen\sqrt{\%}$ y el correspondiente porcentaje de mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> a los seis días de inoculación con 200 juveniles infectivos por insecto de ocho cepas de nematodos de los géneros <i>Heterorhabditis</i> y <i>Steinernema</i> usando dieta como alimento de la broca.	38
4	Promedios de la mortalidad transformada con $\arcsen\sqrt{\%}$ y el correspondiente porcentaje de mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> a los seis días de inoculación con 200 juveniles infectivos por insecto de ocho cepas de nematodos de los géneros <i>Heterorhabditis</i> y <i>Steinernema</i> usando fruto verde como alimento de la broca.	39

- 5 Promedios de la mortalidad transformada con  $\arcsen\sqrt{\%}$  y el correspondiente porcentaje de mortalidad de *Hypothenemus hampei* a los seis días de inoculación con 200 juveniles infectivos por insecto de ocho cepas de nematodos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* usando café pergamino como alimento de la broca. 41
- 6 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*. 47
- 7 Promedios de la mortalidad transformada con  $\arcsen\sqrt{\%}$  y el correspondiente mortalidad de *Hypothenemus hampei* observada en cuatro condiciones de frutos infestados siete días después de aplicados 600 juveniles infectivos de la cepa LIM-1 *Heterorhabditis* spp. 51

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Distribución geográfica de <i>Hypothenemus hampei</i>	6
2	Vista lateral de adulto macho y hembra de la Broca del café <i>Hypothenemus hampei</i> Ferr.	8
3	Ciclo infectivo de nematodos del género <i>Steinernema</i> .	19
4	Localización de los sitios de muestreo	29
5	Hembra adulta de <i>Hypothenemus hampei</i> afectada por la cepa LIM-1 <i>Heterorhabditis</i> sp..	44
6	Mortalidad de adultos de broca del café <i>Hypothenemus hampei</i> causada por la aplicación de 200 juveniles por insecto de cuatro cepas en laboratorio.	46

- 7 Rectas de regresión del valor probit de la mortalidad y el logaritmo del número de juveniles infectivos por grano de café, correspondientes a *Heterorhabditis* spp. LIM-1, *Heterorhabditis* spp. PC-3, *Heterorhabditis* spp. DOM-8 y *Steinernema carpocapsae* sobre *Hypothenemus hampei*.

## LISTA DE ANEXOS

CUADRO	TITULO	PAGINA
1A	Análisis de varianza para la mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> a los seis días de inoculación con 2000 juveniles infectivos de ocho cepas de nematodos de los géneros <i>Heterorhabditis</i> y <i>Steinernema</i> usando dieta como alimento de la broca.	70
2A	Análisis de varianza para la mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> a los seis días de inoculada con 2000 juveniles infectivos de ocho cepas de nematodos de los géneros <i>Heterorhabditis</i> y <i>Steinernema</i> usando fruto verde como alimento de la broca.	70
3A	Análisis de varianza para la mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> a los seis días de inoculación con 2000 juveniles infectivos de ocho cepas de nematodos de los géneros <i>Heterorhabditis</i> y <i>Steinernema</i> usando café pergamino como alimento de la broca.	71

- 4A      Análisis de varianza para la mortalidad de *Hypothenemus hampei* a observada en períodos de 24 horas durante diez días después de la inoculación con 2000 juveniles infectivos de cuatro cepas de nematodos 71
- 5A      Análisis de varianza para la mortalidad de *Hypothenemus hampei* causado por la cepa LIM-1 *Heterorhabditis* spp. en cuatro diferentes condiciones de café como alimento de broca 72

## I. INTRODUCCION

La broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) es la principal plaga insectil que ataca al cultivo de café en el mundo. Su importancia en México y Centroamérica es aún más relevante, dado que el café constituye una de las principales fuentes de captación de divisas en los países de la región; además es una considerable generadora de empleos (Alonzo 1984).

Para el control de la broca del café el único insecticida utilizado es el endosulfán; pero se han encontrado evidencias de resistencia a este producto (Brun 1988). Además, las aplicaciones subsecuentes de este insecticida sólo extienden la protección contra la broca, pero no ayudan a mejorar su manejo para el siguiente año (Mansing 1991). Lo anterior ha obligado a buscar métodos de control alternativos orientados a reducir los riesgos que provoca el uso de plaguicidas en contra de la estabilidad ambiental y la salud humana (Moore y Prior 1989).

Los avances obtenidos hasta el momento han contribuido poco a la reducción de la plaga a nivel del suelo. Los frutos caídos desempeñan un papel importante en la dinámica poblacional de la plaga, al albergar al insecto durante la época de escasez de frutos (Kraker 1988). La recolección de los frutos del suelo después de la cosecha ("Pepena") ha resultado ser un método efectivo para reducir subsecuentes poblaciones de broca (Bergamin 1944). Sin embargo, en la práctica, es un método caro por la gran cantidad de mano de obra que se necesita (Zelaya y Vargas 1989).

Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* se han mostrado como alternativa para combatir algunas plagas relacionadas al suelo o de hábitos crípticos (Georgis y Hom 1992). Estos organismos podrían tener un potencial para disminuir poblaciones de *H. hampei* en los frutos en el suelo, especialmente porque las galerías provocadas por la broca brindan condiciones propicias para el desarrollo de ciertos nematodos (Averna 1926). Estudios preliminares han demostrado la susceptibilidad de *H. hampei* al nematodo *Heterorhabditis* spp. (Allard y Moore 1988). Georgis y Hom (1992) consideraron la posibilidad de usar nematodos entomopatógenos dentro de un programa de manejo de *H. hampei* para disminuir la emergencia de adultos en la siguiente generación.

La factibilidad de su reproducción masiva y la seguridad ambiental que ofrecen los nematodos entomopatógenos, los hace atractivos para que puedan ser usados contra esta plaga, e incorporados dentro de un programa de manejo integrado.

El objetivo de este trabajo es determinar, bajo condiciones de laboratorio, la patogenicidad y el potencial de los nematodos steirnematidos y heterorhabditidos para usarse en contra de *H. hampei* en Tapachula, Chiapas, México..

## II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

### 2.1. Objetivo general

- Estudiar el parasitismo y uso potencial de nematodos *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. como agentes biocontroladores de *H. hampei* en Tapachula, Chiapas, México.

### 2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la infectividad de estos nematodos entomogenos para matar a *H. hampei* bajo condiciones de laboratorio.

- Analizar factores como el tiempo, dosis y condición del fruto infestado que condicionan el parasitismo de los nematodos sobre *H. hampei* a nivel de laboratorio.

### 2.3. Hipotesis

- Los nematodos infectan a *H. hampei* en condiciones controladas de laboratorio.

- El parasitismo de los nematodos en *H. hampei* es influenciado por el tiempo de exposición, la concentración de nematodos y condición del fruto infestado.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. La broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferr.

##### 3.1.1. Taxonomía

Wood (1982) señala su posición taxonómica de la siguiente manera:

Orden: Coleoptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Curculionoidea

Familia: Scolytidae

Subfamilia: Scolytinae

Tribu: Cryphalini

Género: *Hypothenemus*

Especie: *hampei* (Ferrari 1867)

##### 3.1.2. Sinonimia

Para nombrar a esta especie también se han empleado las siguientes formas (Cárdenas 1991):

*Cryphalus hampei* Ferrari 1867

*Stephanoderes hampei* Ferrari 1867

*Stephanoderes coffeae* Hargerdon 1910

*Xyleborus coffeivorus* van der Wiele 1910

*Stephanoderes cooki* Hopkins 1915

*Xyleborus coffeicola* Campos novais 1922

*Sptephanoderes punctatus* Eggers 1924

### 3.1.3. Origen y distribución

Es originaria de África Ecuatorial (Bergamin 1943). Actualmente se encuentra distribuida en casi todos los países productores del grano situados dentro de la franja ecuatorial (Figura 1). En mesoamerica se le detectó en 1971 en Guatemala (Hernández y Sánchez 1972), 1977 en Honduras (Muñoz 1985), 1978 en México (Baker 1984), 1981 en El Salvador (Vega 1985) y 1988 en Nicaragua (Decazy y Castro 1990).

### 3.1.4. Morfología

3.1.4.1. **Huevo:** Forma elíptica de 0.45 a 0.83 mm de largo, de color translúcido que se opaca conforme ocurre la madurez (Bergamin 1943).

3.1.4.2. **Larva:** Son generalmente rectas y ligeramente comprimidas de la parte ventral, curvandose en la madurez. Posee 11 segmentos, 3 toraxicos y 9 abdominales. De tamaño variable aproximadamente entre 0.8 y 2 mm, dependiendo de su estado de desarrollo. Con mandibulas color pardo, cápsula cefálica amarilla y cuerpo blanco (Bergamin 1943).

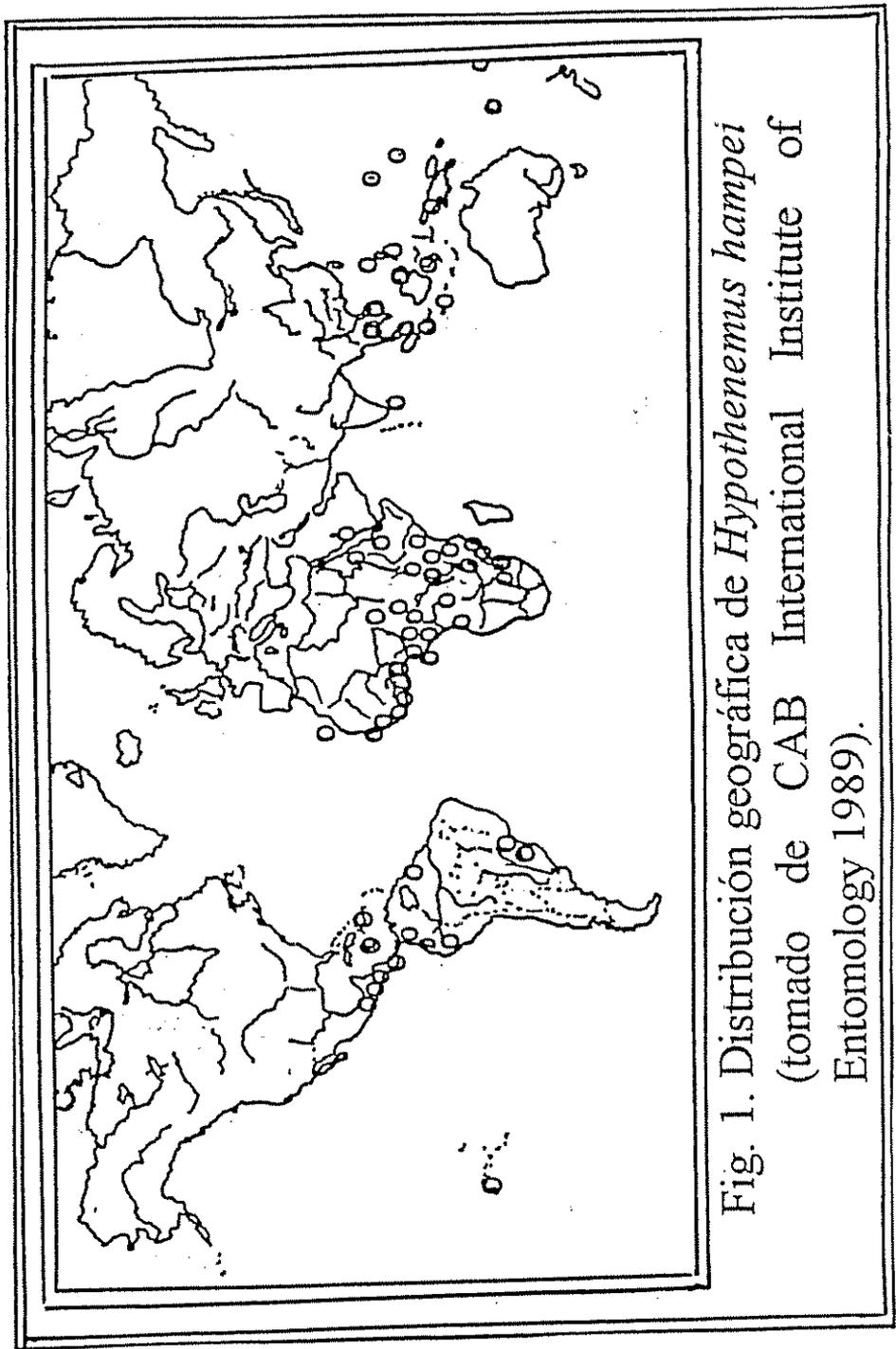


Fig. 1. Distribución geográfica de *Hypothenemus hampei*  
(tomado de CAB International Institute of  
Entomology 1989).

3.1.4.3. **Prepupa:** Es la etapa final del estado larval, de cuerpo curvo mas grueso en la parte cefalotóraxica que en la abdominal, con muy poca actividad.

3.1.4.4. **Pupa:** Son desnudas, con dimensiones similares al adulto. Se le observan bien definidas la mayor parte de las estructuras del adulto, que son de color blanco.

3.1.4.5. **Adulto:** Tiene un marcado dimorfismo sexual (Figura 2). Los machos miden 1.18 mm de largo y 0.55 mm de ancho, las hembras miden 1.8 mm de largo y 0.73 mm de ancho. Ambos son de color obscuro, cabeza globular y antenas con terminación en forma de mazo con cinco segmentos. Cuerpo cubierto con pelos que crecen hacia atras. Sobre los élitros se le observan diminutas puntuaciones longitudinales que son acompañadas paralelamente por lineas deprimidas. Abdomen con cuatro segmentos el último de los cuales es cubierto por los élitros (Penados 1979). Las hembras poseen un segundo par de alas membranosas. Los machos no tienen capacidad de vuelo porque tienen atrofiado este segundo par de alas.

### 3.1.5. Biología

3.1.5.1. **Ciclo biológico:** Varía de acuerdo a las condiciones donde se presente. Baker (1985) menciona que el ciclo dura 36 días en los cafetales de la región del Soconusco, donde también Hulsoff (1989) señala tiempos generacionales de 45 a 50 días. En condiciones de laboratorio controladas a 27 °C y humedad relativa entre 70 y 80 % el ciclo puede durar en promedio 24 días de huevecillo a adulto, siendo 7 días en la etapa de huevecillo, 9 días en la etapa de larva, 3 días en prepupa y 5 días en pupa (Gómez 1994).

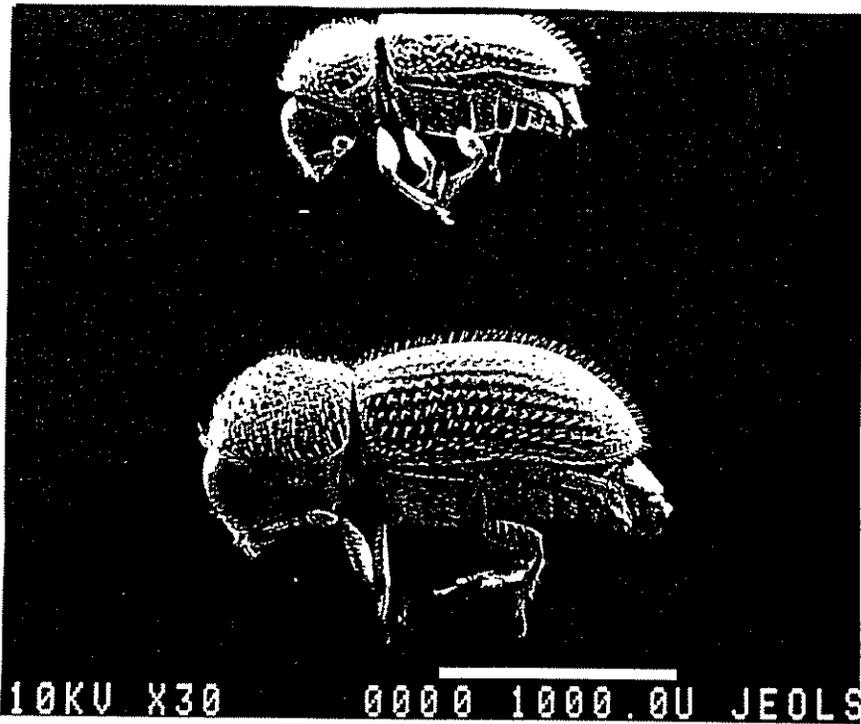


Fig 2. Vista lateral de adulto macho (arriba) y hembra (abajo) de la broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Fotografía de F. Infante, ECOSUR).

**3.1.5.2. Longevidad de adultos:** Las hembras pueden vivir en promedio entre 80 y 123 días y el macho un promedio 46 días (Oliveira 1927). Bergamin (1943) menciona que para machos varía de 78 a 103 días y para la hembra de 81 a 282 días. Los machos mueren en el grano donde nacieron, rara vez lo abandonan (Cárdenas 1991).

**3.1.5.3. Reproducción:** La relación de sexos es de aproximadamente un macho por diez hembras (Bergamin 1943). Las hembras son copuladas 3 o 4 días después de transformarse en adultos. El apareamiento se lleva a cabo entre congéneres en el interior de los frutos (Bergamin 1943).

Todas las hembras que abandonan los frutos infestados están fecundadas. La hembra pone en promedio 74 huevecillos, con un mínimo de 31 y un máximo de 119 (Bergamin 1943). Las hembras tienen un período de preoviposura de 3 o 5 días (Cárdenas 1991). En 12 semanas el número de huevecillos puestos por una hembra es de 60 (Heargraves 1935). Ticheler (1961) sugiere que la broca no sale del fruto una vez iniciada la postura a causa de una degeneración de los músculos del vuelo.

Hargreaves (1926) señala que la broca necesita ser fecundada por el macho para que los huevecillos sean fértiles, contrariamente Muñoz (1989) observó que la broca puede reproducirse partenogenéticamente.

### 3.1.6. Ecología

**3.1.6.1. Descripción del daño:** La hembra perfora el fruto en el disco o coronilla, raramente lo hace en los lados o base del fruto (Corbett 1933). El tiempo que transcurre desde la penetración hasta la desaparición de la parte posterior del abdomen

dentro del fruto es de 1 a 2.5 horas. Al perforar el fruto, alcanza uno de los cotiledones, hace galerías y deposita sus huevecillos dentro de estas. En el interior de un fruto abandonado durante la cosecha se puede presentar de 3 a 4 generaciones las cuales consumirían totalmente el grano. En cada uno de estos frutos se pueden encontrar poco más de 100 adultos (Baker 1985).

En el sureste de Chiapas se determinó que entre enero y febrero la broca se encuentra presente en los frutos que no fueron cosechados, pero en mayor número en los frutos caídos al suelo. En abril ocurre la emergencia en masa de los adultos desarrollados en los frutos del ciclo vegetativo anterior. En mayo, por razones fisiológicas el cafeto tira de frutos los cuales son abandonados por la broca. En junio la plaga se localiza en la pulpa de los nuevos frutos debido a la poca consistencia de los mismos (Barrera y Baker 1986).

**3.1.6.2. Humedad del grano:** La oviposición ocurre cuando la broca encuentra frutos consistentes. Un factor importante en la penetración al grano es la humedad del mismo. Si una broca perfora un fruto aún acuoso, abandona la cereza o espera en la pulpa hasta que la humedad del grano sea la adecuada (Hernández y Sánchez 1972). Baker (1985) encontró una relación entre la producción de huevecillos y la humedad del grano, señalando que se necesita un 20% o más de peso seco del grano para que la broca ponga huevecillos.

**3.1.6.3. Humedad relativa:** Este factor incide significativamente en la mortalidad de la broca, ya que a humedades relativas de 20, 33 y 55% presentaron mayor cantidad de individuos muertos que en 76, 93.5 y 100% (Balbuena 1987). Su actividad se reduce en humedades bajas (Baker 1985).

3.1.6.4. **Temperatura:** Condiciones extremosas de este factor son mortales para la broca, prefiere temperaturas entre 20 y 30°C y se inactiva a menos de 15°C (Yamamoto 1948). Se ha observado un marcado incremento en la emergencia de adultos entre 20 y 25°C (Baker 1992). Bajas temperaturas retardan su ciclo biológico (Bergamin 1943). Cardenas (1991) menciona que la longevidad del adulto es de 40 días a 27 °C y 150 días a 19 °C.

3.1.6.5. **Altitud:** Los niveles de infestación son menores a altitudes mayores de 1000 msnm (Alonzo 1985). En el Soconusco su distribución de mayor importancia ocurre en altitudes entre 400 y 1100, con un máximo en el rango de 700-900 (Baker y Barrera 1985).

3.1.6.6. **Lluvia:** La lluvia es un disparador de la salida o emergencia de broca adulta en frutos dejados después de la cosecha, provocando infestaciones en los frutos de la primera floración de los cafetos. Debido a que la longevidad de la broca se ve considerablemente reducida en humedades relativas bajas, la lluvia pudiera servirle como un indicador de un ambiente humedo (Baker 1987). En el sureste de Chiapas las primeras lluvias que ocurren alrededor de abril o mayo, provocan la emergencia de las hembras de los frutos caídos al suelo para atacar nuevas cerezas (Baker y Barrera 1985). La lluvia hace las condiciones más favorables para el insecto y las sequías disminuyen la incidencia de la plaga para el siguiente ciclo de cosecha (Bergamin 1943).

3.1.6.7. **Humedad del suelo:** En los frutos que caen al suelo la incidencia de la plaga se puede afectar con un exceso de humedad que pudre los frutos o con falta de humedad que los seca (Barrera y Baker 1986).

**3.1.6.8. Sombra:** Las infestaciones aumentan gradualmente conforme la cantidad de sombra es mayor (Barrera y Covarrubias, 1984). Cuando se cultiva el café bajo nes de sombra la producción de huevecillos y especialmente larvas es mayor que cuando se cultiva a pleno sol (Baker 1987). Por el contrario Monterrey (1991) encontró en Nicaragua una tendencia a presentarse mayores infestaciones de broca en plantaciones bajo sol durante un año de observación y al final superada por infestaciones bajo sombra

### **3.1.7. Métodos de control**

**3.1.7.1. Control cultural:** Dentro del control cultural se incluye la regulación de sombra del cafetal, la poda de los cafetos, el control de malezas y la fertilización apropiada. Las podas, el desombre y el control de malezas desfavorecen las condiciones para el desarrollo de la broca dentro del cafetal. Para prevenir la dispersión de la plaga se debe evitar movimiento o uso de sacos, canastos o material procedente de cafetales infestados (Hernández y Sánchez 1978).

**3.1.7.2. Control manual:** La recolección de frutos infestados después de la cosecha ("repase"), tanto sobre la planta ("repela") como en el suelo ("pepena"), son una medida eficiente para disminuir los niveles de infestación en un cultivo ya que reduce el grado de infestación del siguiente ciclo de cosecha (Ingram 1969).

Hernández y Sánchez (1978), han obtenido buenos resultados mediante la recolección de frutos caídos al suelo y dejados en la planta después de la cosecha, eliminandose una gran cantidad de adultos que utilizan estos frutos para sobrevivir hasta el siguiente ciclo productivo del cafeto. Con esta actividad se eliminan sitios de

abrigo de la broca, consiguiendo así un menor número de individuos en la cosecha siguiente. Este método ha sido ampliamente utilizado en Africa (Le Pelley 1968) y recomendado en varias regiones del mundo. Bergamin (1944) indica que los frutos del suelo ofrecen mayor peligro que los que están sobre la planta porque estos últimos generalmente poseen menor cantidad de humedad, lo que es indispensable para el desarrollo de la broca. También señala que el período entre cosechas es la mejor época para controlar la broca porque toda la población existente se concentra en café dejado en el cafetal.

Dentro de algunos inconvenientes el "repase" se puede mencionar que quizá necesita de mayor mano de obra que la cosecha, requiriendo de una fuerte erogación para estos trabajos. El precio del café es oscilante, y muchas veces el "repase" sería menospreciado a pesar de la imperiosa necesidad de hacerlo para evitar altas poblaciones en años venideros. También porque existen ciertas épocas donde la plaga alcanza magnitudes alarmantes que traen como consecuencia un aumento de esfuerzos para lograr obtener beneficios.

**3.1.7.3. Control químico:** Anteriormente fue utilizado Lindano a 800 g.i.a./ha, pero se necesitaban dos o tres aplicaciones porque la persistencia no era mayor de doce días (Lavabre 1989). Con mayor efecto residual se uso BHC 1% a una dosis de 40 gr por planta, pero provocaba mal sabor a la bebida (Amaral y Oliveira 1974). El primer antecedente de la eficacia del Endosulfan en el combate de plagas de escolitidos fue establecido por Saunders (1963). Trabajos posteriores demostraron la efectividad del Endosulfan para el control de la broca del café (Almeida, 1967).

Pruebas efectuadas en Brasil con aplicaciones al suelo de BHC 2%, efectuadas en una época en la que los frutos se encuentran en una fase inicial de crecimiento, demostraron que esta es una medida que disminuye considerablemente en número de frutos brocados al final de la cosecha (Amaral *et al.* 1959).

Durante los primeros años después de la detección de la broca en México, el insecticida comunmente recomendado para el control de esta plaga fue el Endosulfan. Aplicaciones de Endosulfan 3% polvo fueron hechas a la base de la planta para eliminar los adultos que pudieran encontrarse en frutos caídos y hojarasca, utilizandose aproximadamente 30 kg de polvo por hectárea. Al follaje se aplicaba de 800 a 1000 ml de concentrado emulsificable del mismo producto en 200 litros de agua (Galán y Bodegas 1984).

Recientes pruebas de laboratorio han mostrado que el Endosulfan es el insecticida más tóxico a la broca del café al compararlo con seis insecticidas de diferentes grupos toxicológicos (Choy 1992). En la actualidad la recomendación más generalizada continua siendo el uso del Endosulfan, aunque se ha buscado la forma racionalizar su uso debido a la posible presencia de efectos residuales en los frutos y brotes de resistencia al producto (Brun *et al.* 1989). Así, Penados y Ochoa (1979) recomiendan hacer sólo una aplicación cuando el fruto esta en estado de semiconsistencia, lo que se alcanza a los 137 días después de la floración a 1000 msnm y a los 147 días a 1300 msnm.

**3.1.7.4. Control biológico:** Existen varios organismos, dentro de los que se encuentran parasitoides, depredadores y patógenos, que han mostrado afectar a la broca y tienen un potencial de aplicación en el control de esta plaga.

Los parasitoides de la broca encontrados son: *Phymastichus coffea* (Hymenoptera: Eulophidae), que parasita adultos; *Prorops nasuta* y *Cephalonomia stephanoderis*, dos betílidos que se alimentan de todas las fases de *H. hampei* parasitando larvas y pupas. *Heterosphilus coffeicola* (Hymenoptera: Braconidae) cuya larva mata al adulto. Otros parasitoides son *Sclerodermus cadavericus* (Hymenoptera: Bethyilidae), y *Aphanogmus dictyma* (Hymenoptera: Ceraphronidae) (Murphy y Moore 1990). *C. stephanoderis* y *P. nasuta* fueron introducidas a México, Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua (Barrera *et al.* 1990). La especie *P. coffea* aún no se han logrado exportar exitosamente de Africa a otros países. *H. coffeicola* no se ha podido cuarentenar, por tanto no se puede importar debido al riesgo que existe de diseminar enfermedades del café.

En cuanto a depredadores se ha señalado la incidencia de *Dindymus rubiginosus* sobre poblaciones de adultos de broca en Brasil. La hormiga *Crematogaster curvispinosus* destruye inmaduros de broca dentro del fruto (Klein-Koch *et al.* 1988).

Los hongos *Beauveria bassiana* y *Spicaria javanica* son patógenicos a la broca (Klein-Koch *et al.* 1988). Aunque se ha determinado que el efecto que produce de manera natural *B. bassiana* sobre los adultos de la broca no sobrepasa el 1% en algunas regiones cafetaleras (Méndez 1990), pero trabajos recientes han avanzado en la propagación de este hongo y en la selección de cepas agresivas para el combate de *H. hampei* (Barrios 1992). *B. bassiana* es un enemigo natural de *H. hampei* que esta siendo involucrado dentro de programas de manejo de la plaga (Moore y Prior 1991). Moore (1989) menciona también a *Metarhizium anisopliae* como un hongo patógenico a la broca.

### 3.2. Nematodos entomogenos

Durante los últimos años se ha incrementado el interés en el control biológico de insectos utilizando nematodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estos nematodos y su asociación con bacterias entomopatógenas satisface los criterios esenciales para el control biológico aumentativo. Los avances obtenidos en su producción masiva, formulación y métodos de aplicación los hace factibles de utilizarse en el control de ciertas plagas (Georgis y Hom 1992).

La variedad de especies y cepas geograficas las sitúan como organismos con potencialidad de uso en el control de plagas, especialmente del suelo. Estos podrían sustituir a los insecticidas por el amplio número de huéspedes, movimiento, seguridad y facilidad de aplicación, y la ausencia de restricciones de registro en algunos países (Capinera y Epsky 1992).

Algunas regiones de América son potencialmente propicias para su utilización, por las condiciones de tipo de suelo, humedad y temperatura, presencia de hospederos durante todo el año, la alta incidencia del daño causado por lepidópteros y coleópteros, las cuales son susceptibles a infección (Capinera y Epsky 1992).

Se ha demostrado la efectividad de estos nematodos en el control de poblaciones de ciertos escolítidos. Este es el caso de *Scolytus scolytus* que fue parasitado por una raza de *Steinernema* (= *Neoplectana*) spp (Finney y Mordue 1976). Existen otros como *Scolytus multistriatus* los cuales no pueden controlar o estimular su reproducción al ser afectados por nematodos (Saunders y Norton 1961). Otros casos son *Hexacolus guyanensis* y *Dendroctonus adjunctus* los cuales fueron

parasitadas por *Neoplectana carpocapsae* (Wassink y Poinar 1984). En un experimento de laboratorio, una especie de *Heterorhabditis* penetró a cerezas infestadas y causó una significativa mortalidad en larvas y adultos de la broca del café (Allard y Moore 1989). Georgis y Hom (1992) consideraron que el control de la broca con nematodos entomopatógenos puede ser factible dentro de un programa de manejo integrado de la plaga después de la cosecha cuando la broca sobrevive en los frutos caídos al suelo.

### 3.2.1. Taxonomía y sinonimia

La ubicación de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae in en el Phylum nematoda es la siguiente (Woodring y Kaya 1988):

Phyllum: Nematoda

Clase: Adenophorea

Clase: Secernentea

Orden: Rhabditidae

Suborden: Rhabditina

Superfamilia: Rhabditoidea

Familia: Steinernematidae y Heterorhabditidae

Existe controversia con respecto a las especies que posee cada una de estas dos familias. Poinar (1990) señala que son aproximadamente diez especies de *Steinernema* y tres de *Heterorhabditis* las que están reconocidas actualmente.

En la nomenclatura de estas familias de nematodos existen varios sinónimos, como el caso del género *Neoplectana*, la cual algunos autores la mencionan como

*Steinernema*. También se puede señalar a la especie *S. feltiae* con el nombre de *N. carpocapsae*.

Dentro de la familia Heterorhabditidae también se presentan sinonimias como es el caso de *H. bacteriophora* (*H. heliothidis*, *H. zealandica* o *Cromonema heliothidis*), *H. hambletoni* (*Rhabditis hambletoni*) y *H. Hoptha* (*Neoplectana Hoptha*) (Poinar 1990).

### 3.2.2. Mecanismo de acción

Los nematodos pertenecientes a las familias *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae* difieren de otros que se alimentan de bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* con las cuales tienen una asociación mutualística, las cuales proteje y transporta valiéndose de un tercer estado juvenil. Este juvenil infeccioso se introduce al insecto por sus espiráculos, ano o boca. Los nematodos de la familia *Heterorhabditidae* poseen un diente dorsal que les da capacidad de atravesar la cutícula de un insecto. Dentro del insecto el juvenil infeccioso se mueve hacia la hemolinfa donde inocula la bacteria. Una septicemia se presenta en el huésped por la inoculación de esta bacteria, provocando su muerte en aproximadamente 48 horas (Capinera y Epsky 1991).

El nematodo se desarrolla y multiplica dentro del insecto, después emergen los nuevos juveniles infecciosos para iniciar la búsqueda de otros hospederos (Figura 3). Dependiendo de su tamaño, dentro del cuerpo del insecto se pueden presentar dos generaciones del nematodo; eventualmente algunas especies de nematodos pueden

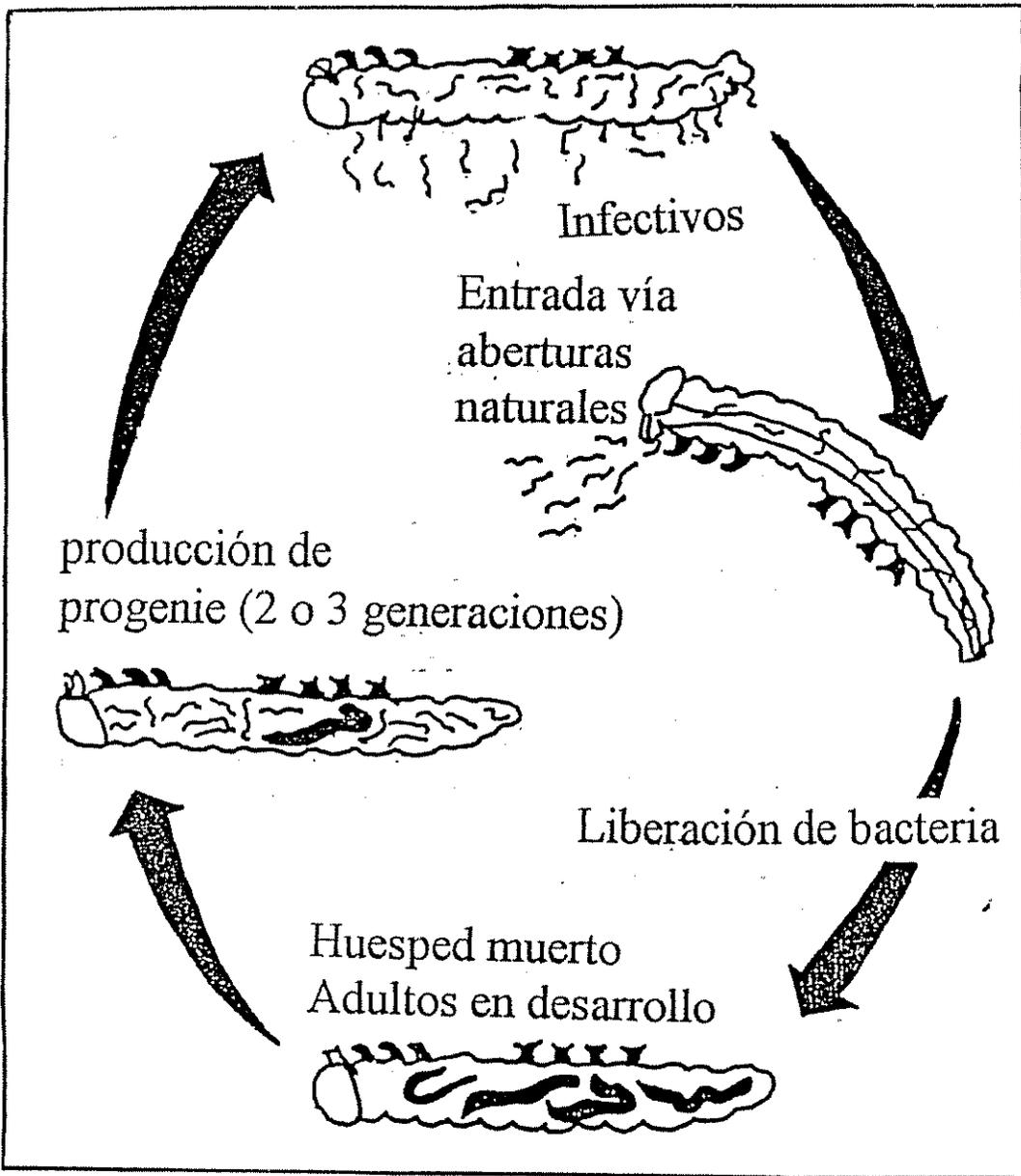


Fig.3. Ciclo infectivo de nematodos del género *Steinernema* (tomado de Woodring y Kaya 1988).

alcanzar una tercera generación dentro del insecto, como es el caso de *Steinernema feltiae* en larvas del último estadio de *Galleria mellonella*. En insectos pequeños puede ocurrir una sola generación o quizá una generación incompleta (Capinera y Epsky 1992).

### 3.2.3. Relación mutualista

Estos nematodos mantienen una asociación simbiótica con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, las cuales son fácilmente susceptibles a la degradación y no tienen formas para penetrar dentro del huésped, por lo tanto necesitan de estos nematodos para propagarse. Después de la penetración el juvenil infectivo deposita la bacteria y secreta un inhibidor de las enzimas antibacteriales en el insecto huésped. La bacteria mata al insecto y proporciona nutrientes para el desarrollo y reproducción del nematodo mientras inhibe el crecimiento de otras bacterias. La reproducción de los nematodos sin la presencia de estas bacterias es posible, pero su multiplicación se reduce en forma drástica. Se han identificado dos especies de bacterias: *X. nematophilus*, asociada con steinernematidos, y *Photorhabdus spp.*, asociada a heterorhabditidos (Akhurst y Boermare 1994).

### 3.2.4. Ciclo de vida

Los nematodos steinernematidos y heterorhabditidos tienen un ciclo de vida simple constituido por los estados de huevo, cuatro estados juveniles y el adulto. El tercer juvenil es un estado especial protegido con la cutícula de segundo, que lo hace resistente a condiciones ambientales y le confiere mejor capacidad de alcanzar el

interior de un insecto. Poseen además reservas alimenticias que permiten su sobrevivencia por largos periodos (Jansson 1992)

Ambas familias tienen un ciclo de vida parecido. Las especies de *Heterorhabditidae* producen una generación de hembras hermafroditas alternada con otra donde se presentan hembras y machos. Para el caso de las especies de *Steinernematidae* su descendencia siempre está constituida por machos y hembras (Woodring y Kaya 1988).

### 3.2.5. Ecología

**3.2.5.1. Factores abióticos:** La radiación solar y luz ultravioleta afectan la sobrevivencia de los nematodos. Como todos los nematodos, los pertenecientes a estas dos familias son muy susceptibles a la desecación, pero pueden sobrevivir a esta si no es muy drástica. Un secado rápido como el que se presenta a nivel del follaje de las plantas, puede provocar alta mortalidad, especialmente si están expuestos a la luz solar (Capinera y Epsky 1992).

La persistencia e infectividad están influenciados por el tipo de suelo, humedad y temperatura del suelo y humedad relativa. Las características del suelo más importantes que afectan a los nematodos son: tamaño del poro, humedad, presencia de oxígeno, temperatura, pH y solución del suelo. Tienen preferencia por suelos de textura porosa, como es el caso de *S. glaseri*. En general tienen mayor capacidad dispersiva en suelos con textura arenosa. La presencia de oxígeno en el suelo es importante porque son organismos que necesitan oxígeno para sus actividades vitales. Muestran una gran variabilidad inter e intraespecífica en la tolerancia a la temperatura,

pero de forma general los heterorhabditidos prefieren temperaturas entre 10° y 16°C y los steinernematidos entre 3° y 14° C. El pH con un nivel abajo de 4 limita la infección de la especie *S. kraussei*, mientras que *S. carpocapsae* sobrevivio y mantuvo su infectividad en pH's de 4, 6, 8 y 10. En suelos salinos se presentan problemas con altas concentraciones de iones que afectan su concentración intracelular, mientras que en suelos acidos los patogenos pueden ser afectados por los altos niveles de aluminio (Barbercheck 1992).

**3.2.5.2. Factores bióticos:** Se ha demostrado que estos organismos son más eficientes en suelos estériles, esto es debido a que se sabe que pueden ser afectados por hongos, microsporidios, acaros, colembolos, y otros nematodos (Kaya 1990).

Además se puede presentar competencia interespecifica por un huesped cuando se encuentran heterorhabditidos y steinernematidos en un mismo sitio (Alatorre-Rosas y Kaya 1990).

La presencia constante de hospederos es un factor importante para la persistencia de estos nematodos en el suelo. Por esa razón, los ambientes tropicales y subtropicales pueden proporcionar suplementos constantes de insectos hospederos para garantizar una población endemica del nematodo (Capinera y Epsky 1992).

La habilidad de busqueda y la capacidad de desplazamiento de los nematodos es muy importante en la efectividad de localizacion del huesped(Jansson 1992). La capacidad de desplazamiento es diferente entre especies, al parecer *S. capocapsae* busca en la superficie del suelo y *H. bacteriophora* se mueve hacia abajo de la superficie (Gaugler 1988).

**3.2.5.3. Relación con el huésped:** El éxito en la aplicación de los nematodos entomopatógenos para el control de una plaga puede ser medido de dos formas: 1) el efecto sobre la población de la plaga y la evaluación del daño en el cultivo, y 2) su persistencia en el hábitat (Jansson 1992).

Los nematodos varían su virulencia e infectividad de acuerdo al huésped, por esa razón es necesario determinar a nivel de laboratorio a el o los nematodos más virulentos para una determinada plaga y hábitat asociado. Esta virulencia puede ser afectada por los mecanismos defensivos de comportamiento, fisiológicos y morfológicos del insecto. Aunque los resultados en laboratorio no siempre concuerdan con los resultados de campo (Barbercheck 1992).

La mayoría de las especies han mostrado tener un amplio rango de huéspedes, otros aparentemente son más restringidos, como es el caso de *S. scapterisciis* que se encontró infectando grillos pero no lepidópteros. Aún no es claro el mecanismo de selección del huésped en estos nematodos, pero algunos han sugerido estímulos provocados por fuentes de dióxido de carbono o compuestos kairomonales emitidos para la localización del huésped, pero principalmente determinado por encuentros al azar (Capinera y Epsky 1992).

El estado de desarrollo del insecto influye en la capacidad de infección del nematodo. Se ha observado que las larvas son más susceptibles que los adultos y pupas.

El habitat de la plaga es muy importante en el éxito de la aplicación de nematodos para su control. Comunmente son más exitosos aquellos casos que tratan con plagas del suelo o de hábitos crípticos que con plagas del follaje. Esto se debe a que las condiciones en el suelo son mas favorables para los nematodos, porque es su ambiente natural (Jansson 1992).

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Ubicación del trabajo

Todos los experimentos se realizaron en los laboratorios del proyecto Broca del Café de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) antes denominado Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste ubicado en la ciudad de Tapachula, estado de Chiapas, México, el cual se localiza a 14° 54' latitud norte y 92° 16' longitud oeste a 136 msnm (Helbig 1976).

### 4.2. Cría de la broca del café

La broca del café empleada en todos los experimentos se obtuvo de una cría en dieta establecida en los laboratorios de ECOSUR (Cuadro 1). En todos los experimentos se emplearon brocas provenientes de dietas con tres meses de infestadas. Estas dietas fueron elaboradas usando los ingredientes definidos por Villacorta y Barrera 1993), cuya mezcla fue colocada dentro de tubos de vidrio con fondo plano de 6 cm de alto por 2cm de diámetro.

### 4.3. Cría de *Galleria mellonella*

Este insecto se reprodujo en laboratorio usando el medio descrito por Poinar (1975) citado por Woodring y Kaya (1988). Una modificación de esta dieta se elaboró con 100 ml de miel de abeja, 100 ml de glicerina, 100 gr de germen de trigo, 50 gr de cereal vitaminado y 5 gr de levadura de cerveza. La cría de *G. mellonella* se

efectúo a 27 °C colocando huevecillos en una mezcla hecha con estos componentes. Las larvas obtenidas se colocaban en agua a 50 °C por 30 segundos, después en agua fría y se guardaban a 14-15 °C envueltas en papel toalla para evitar su desarrollo a adultos.

CUADRO 1.COMPOSICIÓN DE LA DIETA PARA CRIAR A LA BROCA DEL CAFÉ, *Hypothenemus hampei* .

INGREDIENTES	CANTIDAD
Agua hervida	750 gr
Dextrosa	14 gr
Levadura de torula	20 gr
Caseína	20 gr
Semilla de café en polvo	100 gr
Sales de Wesson	2 gr
Agar	27 gr
Nipagin	1 gr
Benzoato de sodio	0.6 gr
Formol 40%	2 ml
Etanol absoluto	10 ml
Colesterol	0.6 gr

#### 4.4. Cría de nematodos

Una cepa comercial fue obtenida de la compañía de control biológico Biosys en Palo Alto, California, EE.UU, cinco especies no comerciales originarias de Costa Rica se obtuvieron de la Unidad de Control Microbial del CATIE y tres cepas nativas de Tapachula, Chiapas, México fueron incluidas en este trabajo (Cuadro 2).

CUADRO 2. DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS DE NEMATODOS EVALUADAS

CLAVE DE LA CEPA	NEMATODO	FUENTE O TIPO DE AISLAMIENTO	LUGAR DE ORIGEN
BIOSYS	<i>Neoplectana carpocaaesae</i>	Cepa comercial de Biosys	E.E.U.U.
LIM-1	<i>Heterorhabdis</i> sp	Aislado del suelo	Costa Rica
PC-3	<i>Heterorhabdis</i> sp	Aislado del suelo	Costa Rica
DOM-8	<i>Heterorhabdis</i> sp	Aislado del suelo	Costa Rica
ATIRRO	<i>Steneirnema</i> sp	Aislado del suelo	Costa Rica
RAY	<i>Steneirnema</i> sp	Aislado del suelo	Tapachula, México
RINCÓN	<i>Steneirnema</i> sp	Aislado del suelo	Tapachula, México
ZAPOTE	<i>Steneirnema</i> sp	Aislado de frutos de café tomados de la planta.	Tapachula, México

Todas las cepas fueron reproducidas *in vivo* empleando larvas de *G. mellonella*, con el método descrito por Woodring y Kaya (1988). Después de la extracción, los nematodos juveniles infectivos fueron almacenados a 10 °C en una solución de formaldehído al 0.01 %. Todos los nematodos usados en los bioensayos tenían menos de diez días de cosechados.

#### 4.5. Conteo de nematodos

La cuantificación de los nematodos se realizó diluyendo una alicuota de un mililitro de la solución conteniendo juveniles infectivos en 100 ml de agua. Empleando un estereoscopio se contó la cantidad de nematodos contenidos en un mililitro de la dilución colocado sobre un plato Petri (Woodring y Kaya 1988), luego se ajusto la concentración con agua destilada esteril.

#### 4.6. Infestación de café verde

Esta actividad se realizó utilizando frutos verde-amarillos frescos recién recolectados del campo. La infestación se realizó como lo describe Gómez (1994), empleando broca criada en laboratorio. Antes de la infestación, las cerezas se lavaron en agua corriente, se secaron y se colocaron dentro de recipientes con tapa, dentro de los cuales se liberó una broca hembra por fruto. Para los ensayos se seleccionaron frutos con una perforación al tercer día de realizada la infestación.

#### 4.7. Infestación de café pergamino

Café arábica maduro fue despulpado, sumergido en agua por 24 horas y lavado hasta quitar el múscilago. Para evitar presencia de contaminantes en los bioensayos las semillas se sumergieron por dos horas en una solución con 0.06 de cloro libre. Transcurrido este tiempo se lavó y se aireó para quitar el exceso de la solución clorada. El café desinfectado se almacenó en recipientes cerrados para evitar pérdidas de humedad. La infestación se realizó en granos de café con humedad mayor al 40%, los cuales fueron previamente perforados para facilitar la penetración de la broca. Para lograr la infestación se colocó cada grano de café junto con 10 brocas dentro de tubos de vidrio, remplazándose las brocas que no penetraron al siguiente día. Para determinar la humedad del café pergamino se utilizó un medidor de humedad para semillas marca DOLE modelo 400B.

#### 4.8. Búsqueda de nematodos nativos

Al inicio de lluvias se tomaron cinco muestras de suelo en la zona agrícola baja ubicada a menos de 100 metros de altitud dentro del municipio de Tapachula. Otras cinco muestras se tomaron en la finca cafetalera "El Rincón" ubicada a 40 km al noroeste de la ciudad de Tapachula por la carretera Tapachula-Nueva Alemania dentro de un rango de altitud entre 320 y 580 msnm (Figura 4).

Las muestras fueron tomadas eligiendo sitios húmedos, antes de tomar la muestra se quitó la hojarasca de la superficie del suelo; a 15 cm del suelo se tomaron aproximadamente 2 kg de cada muestra; para aislar los nematodos del suelo se empleó el método descrito por Bedding y Akhurst (1975), usando larvas del último instar de *G. mellonella*. 250 gr de la muestra humedecida fueron colocados dentro de potes con 7 cm de alto por 13 cm de diámetro. Las larvas se colocaron dentro del suelo hasta su muerte. Después fueron colocadas en cámaras húmedas en espera de la emergencia de los nematodos.

#### 4.9. Pruebas de patogenicidad

##### 4.9.1. Procedimiento general

Se prepararon suspensiones con cantidades conocidas de juveniles infectivos de las diferentes cepas de nematodos utilizando agua destilada esteril. Estos ensayos fueron acompañados de un testigo que verificó la patogenicidad de los nematodos utilizando larvas de *G. mellonella*. Los experimentos se efectuaron dentro de recipientes conteniendo solución saturada de cloruro de sodio que condicionó una

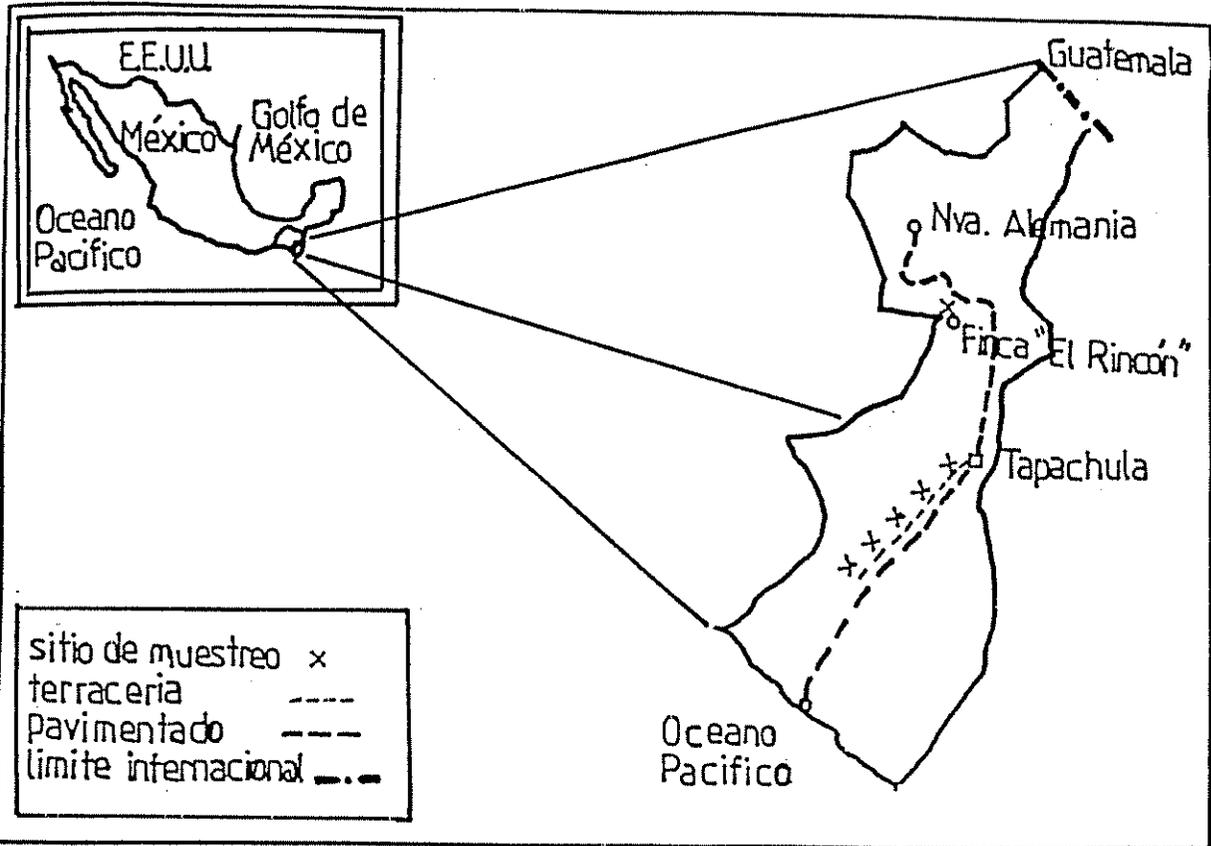


Fig 4 . Localización de sitios de muestreo.

humedad relativa de  $95 \pm 5$  % dentro de una cámara climática apagada que proporcione una temperatura de  $27 \pm 1$  °C y oscuridad constante. La temperatura y la humedad relativa fueron condiciones del medio medidas con un termógrafo y higrómetro, respectivamente. El número de individuos utilizados por cepa de nematodo fue de 100 brocas. Todos los ensayos se realizaron a una misma hora por la tarde. Antes de aplicarse las suspensiones se dejaban ambientar media hora.

#### **4.9.2. Prueba de patogenicidad en fruto verde**

Estos ensayos se realizaron usando cajas Petri de 6 cm de diámetro dentro de las cuales se colocaron 10 frutos infestados sobre una cama de 25 gr de arena con 15% de humedad. Esta arena fue previamente tamizada descartándose lo que se retuvo en un tamiz de 200 mallas por pulgada cuadrada y usándose lo retenido en un tamiz de 400 mallas por pulgada cuadrada. La arena se lavó, se secó por dos días en un horno a 40 °C y se esterilizó por 20 minutos a 2 libras de presión a 120 °C en un autoclave.

Con una pipeta se aplicó 0.5 ml de una suspensión de nematodos que contenía 4000 juveniles infectivos/ml sobre la arena de cada caja. Cada experimento consistió de diez cajas Petri por cepa de nematodo en las cuales se evaluó la mortalidad de la broca a los seis días de realizada la inoculación con nematodos.

#### **4.9.3. Prueba de patogenicidad en dieta**

En el fondo de una caja Petri de 6 cm de diámetro se colocaron círculos de papel filtro Whatman # 1. Sobre el papel fueron distribuidos 0.2 gr de dieta deshidratada en polvo (Villacorta y Barrera 1993) humedecida con 0.5 ml de agua

destilada estéril. En la dieta humedecida se colocaron 20 brocas y 0.5 ml de una suspensión conteniendo 4000 juveniles infectivos/ml. En el testigo solo se aplicó 0.5 ml de agua destilada estéril en lugar de la suspensión de nematodos.

Cada experimento consistió de cinco cajas Petri por cada cepa de nematodo y el testigo en la cuales se evaluó la mortalidad de la broca a los seis días de realizada la inoculación.

#### **4.9.4. Prueba de patogenicidad en café pergamino**

En espacios de 2 cm de diametro y 2 cm de profundidad de una caja serológica se colocó una semilla de café pergamino infestada sobre 5 gr de arena tamizada y estéril con 5% de humedad. Posteriormente se aplicó 0.5 ml de una suspensión de nematodos que contenía 4000 juveniles infectivos/ml. En el testigo solo se aplicó 0.5 ml de agua destilada estéril en lugar de la suspensión de nematodos.

Cada experimento consistió de 10 granos (infestados con 10 brocas) por cepa de nematodos y su respectivo testigo en la cuales se evaluó la mortalidad de la broca a los seis días de la inoculación.

#### **4.10. Tiempo letal medio (TL50)**

En este experimento se evaluó la mortalidad de *H. hampei* provocada por diferentes tiempos de exposición a las cuatro razas que mostraron mayor efecto sobre la mortalidad de broca en las pruebas de patogenicidad con café pergamino. A cada semilla de café infestada con diez brocas se le aplicó 2000 juveniles infectivos de una

cada cepa de nematodo. Las condiciones experimentales en cuanto a granos infestados, número de brocas, de humedad de la arena, humedad relativa y temperatura ambiental fueron las iguales a las descritas en las pruebas de patogenicidad con café pergamino.

Los tratamientos fueron tiempos de exposición con lapsos de 24 horas durante 10 días consecutivos, iniciados después de realizada la inoculación. En el testigo solo se aplicó agua destilada sobre la arena. La unidad experimental fue formada por una semilla de café pergamino infestada con 10 brocas. Se utilizó un diseño con cinco bloques al azar. Los tratamientos se observaron en el tiempo y las observaciones se consideraron como subparcelas de un diseño en parcelas divididas en el tiempo. Se evaluó la mortalidad de *H. hampei* en cada período después de realizada la inoculación.

#### 4.11. Concentración letal media (CL50)

En este experimento se evaluó la mortalidad de *H. hampei* causada por diferentes concentraciones de juveniles infectivos de los cuatro nematodos que mostraron mayor efecto sobre la mortalidad de broca en las pruebas de patogenicidad con café pergamino. Por esa razón, la metodología usada fue la descrita previamente para los ensayos donde se utilizó café pergamino como sustrato alimenticio de la broca. La efectividad de la aplicación fue evaluada colocando sobre la superficie de la arena diferentes cantidades de juveniles infectivos aplicados en 0.5 ml de agua por semilla.

Inicialmente se elaboró una ventana biológica usando seis concentraciones, incluida la concentración utilizada en el ensayo de patogenicidad. Se procuró que estas concentraciones estuvieran comprendidas entre el número mínimo de nematodos que causó una mortalidad cercana al 100% y un número máximo de nematodos que causó cerca del 0% de mortalidad. El testigo consistió de arena libre de nematodos.

Después se añadieron concentraciones intermedias entre cada concentración de la ventana biológica las cuales sumaron 16 tratamientos por nematodo. De una solución de 8000 juveniles infectivos se prepararon diluciones que dieron como resultado 16 soluciones con 4000, 3333, 2666, 2000, 1666, 1333, 1000, 833, 666, 500, 416, 333, 250, 208, 166 y 125 juveniles infectivos por cada 0.5 ml. Cada repetición se realizó diariamente, con un tamaño de muestra diario de 170 brocas incluyendo al testigo. La unidad experimental fue formada por una semilla de café pergamino infestada con 10 brocas. Se realizaron con diez repeticiones. En el gradiente de concentración de nematodos se evaluó la mortalidad de *H. hampei* en cada dosis a los ocho días de realizada la inoculación de nematodos.

#### 4.12. Efecto de la condición del fruto infestado

En este experimento se evaluó la mortalidad de *H. hampei* provocada por los nematodos al variar la condición del fruto infestado, incluyendo tratamientos que tuvieran diferente grado de penetración de la broca en el fruto que ofrecieran diferentes grados de exposición a los nematodos. Para ello se usó las mismas condiciones que se usaron en la prueba de patogenicidad con café pergamino. Los tratamientos fueron: café verde a los 3 días de infestado con 10 brocas; café verde a los 10 días de

infestado con 10 brocas; granos de café pergamino a los tres días de infestado con 10 brocas; frutos maduros infestados 30 días después de colectados en campo.

Considerando los resultados obtenidos en el tiempo letal y CL50, se aplicó 600 juveniles infectivos de la cepa LIM-1 (*Heterorhabditis* spp) por cada fruto infestado. Como testigos se usaron los mismos tratamientos aplicandose 0.5 ml de agua destilada esteril en lugar la suspensión con nematodos.

La unidad experimental la constituyó un fruto o grano de café infestado. El análisis de los datos se realizó empleando un diseño completamente aleatorizado con 10 repeticiones por tratamiento. La variable evaluada fue el porcentaje de la población muerta de *H. hampei* que se produjo en cada uno de los diferentes frutos a los días después de la inoculación de nematodos. Las significancias de los tratamientos se establecieron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorizado.

#### 4.13. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se efectuaron desde archivos ASCII derivados de Q-PRO de acuerdo al modelo planteado en los experimentos usando el paquete estadístico SAS (1989). Los datos analizados mediante análisis de varianza fueron previamente transformados a  $\arcsen\sqrt{\%}$ . Para obtener las líneas de respuesta del logaritmo del número de nematodos y la mortalidad de la broca, los datos fueron corregidos con la fórmula de Abbot (1925). El análisis probit fue corroborado empleando el programa SAS-probit del Centro de Estadística y Cálculo del Colegio de Posgraduados en Chapingo, México.

## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Muestreo de nematodos

En el muestreo realizado al suelo se pudieron aislar dos cepas de nematodos del género *Steinernema*, una en la zona agrícola baja (<100 msnm) y otra recolectada en la finca cafetalera "El Rincón" (580 msnm).

Eventualmente una tercer cepa del mismo género fue aislado de muestras de frutos infestados con broca colectados en un municipio vecino a Tapachula, como parte de un muestreo para detectar poblaciones de broca en un trabajo independiente. Esta cepa fue aislada de las galerías hechas por la broca, dentro de las cuales solo se observó restos de brocas adultas, lo que impidió evidenciar la ocurrencia de un parasitismo natural en la broca. Estos tres aislamientos se sumaron a la lista de las cepas evaluados .

Averna (1926) señala la presencia de nematodos dentro del fruto como una manifestación patológica que acompañan infestaciones de *H. hampei*. Además de comprobar lo anterior, con este aislamiento se pudo constatar que las galerías hechas por la broca parecen ser un sitio propicio para la sobrevivencia y desarrollo de los nematodos entomopatógenos en un ambiente natural.

La región cafetalera de Tapachula posee suelos típicamente arcillosos, con alta proporción de bases intercambiables que son lixiviadas de los niveles superficiales del suelo por las abundantes lluvias, lo que influye en un pH con valores inferiores a 5.0

(López, 1992). El pH ácido en un suelo restringe el crecimiento microbial y consecuentemente afecta el control microbiológico de insectos en el suelo (Barbercheck, 1991). Infecciones de *Cephalia abietis* por el nematodo *Steinernema krauseri* son limitadas en suelos con un pH abajo de 4.0 (Fischer y Fuhrer 1990). Pruebas de sobrevivencia y retención de infectividad mostraron que *S. carpocapsae* presentó mejores aptitudes en pH altos, al evaluarse estas características dentro de un rango de 3.0 a 8.0 (Kug *et al.* 1990). A pesar de las condiciones de pH prevalentes, la presencia natural de nematodos entomopatógenos en el suelo y en las galerías hechas por la broca, aumentan las posibilidades de utilización de estos organismos para incorporarlos como alternativa de control contra *H. hampei* en esta región. Debido a esto, es indispensable ampliar la búsqueda de nematodos entomopatógenos en la zona, con el fin de localizar la mayor cantidad posible de cepas nativas y posteriormente evaluar su efecto patogénico en *H. hampei* para seleccionar las mejores contra la broca del café y el efecto del pH sobre estos nematodos.

## 5.2. Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad utilizando dieta como alimento de broca muestran que existe diferencia estadística entre la mortalidad de *H. hampei* ocurrida a un nivel de 5% de significancia entre los tratamientos. Todas las cepas fueron diferentes al testigo. Los índices de mortalidad más altos de esta prueba se observaron en seis cepas de nematodos entre los cuales no existió diferencia estadística, los cuales causaron mortalidades entre 59 y 94 % (Cuadro 3).

CUADRO 3. PROMEDIOS DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA CON  $\text{ARCOSEN}\sqrt{\%}$  Y EL CORRESPONDIENTE PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* A LOS SEIS DÍAS DE INOCULACIÓN CON 100 JUVENILES INFECTIVOS POR INSECTO DE OCHO CEPAS DE NEMATODOS DE LOS GÉNEROS *Heterorhabditis* Y *Steneirnama* USANDO DIETA COMO ALIMENTO DE BROCA (N=100 BROCAS/TRATAMIENTO).

CLAVE DE LA CEPA	NEMATODO	LUGAR DE ORIGEN	PROMEDIO DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA	MORTALIDAD (%)
BIOSYS	<i>Neoplectana carpocapsae</i>	E.E.U.U.	1.414 A	94
LIM-1	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	1.275 BA	86
PC-3	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	1.153 CBA	79
DOM-8	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	1.142 DCBA	79
ATIRRO	<i>Steneirnama</i> sp.	Costa Rica	0.900 DCB	61
RAY	<i>Steneirnama</i> sp.	Tapachula, México	0.881 DCB	59
RINCON	<i>Steneirnama</i> sp.	Tapachula, México	0.743 DC	46
ZAPOTE	<i>Steneirnama</i> sp.	Tapachula, México	0.672 D	39
TESTIGO			0.172 E	7

Letras diferentes entre tratamientos significan  $P < 0.05$  con la prueba Tukey

Aunque esta prueba resalta la capacidad patogénica de la mayoría de las cepas evaluadas en este trabajo, sería más conveniente utilizar un ensayo que permita evaluar el efecto patogénico sobre *H. hampei* utilizando frutos infestados, con el fin de simular lo mas cercanamente las condiciones que se presentan naturalmente en los períodos de inter cosechas.

Con la misma cantidad de nematodos aplicada, las pruebas de patogenicidad efectuadas con frutos verdes mostraron que la mortalidad de la broca ocurrida en todos los tratamientos no fueron diferentes al 5% de significancia. En esta prueba la mortalidad provocada por las ocho cepas de nematodos no superó el 10 % (Cuadro 4)

CUADRO 4. PROMEDIOS DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA CON  $\text{ARCOSEN}\sqrt{\%}$  Y EL CORRESPONDIENTE PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* A LOS SEIS DÍAS DE INOCULACIÓN CON 200 JUVENILES INFECTIVOS POR INSECTO DE OCHO CEPAS DE NEMATODOS DE LOS GÉNEROS *Heterorhabditis* Y *Steneirnema* USANDO FRUTO VERDE COMO ALIMENTO DE BROCA (N=100 BROCAS/TRATAMIENTO).

CLAVE DE LA CEPA	NEMATODO	LUGAR DE ORIGEN	PROMEDIO DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA	MORTALIDAD (%)
LIM-1	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	0.271 A	9
ZAPOTE	<i>Steneirnema</i> sp.	Tapachula, México	0.253 A	9
BIOSYS	<i>Neoplectana carpocapsae</i>	E.E.U.U.	0.221 A	8
PC-3	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	0.221 A	8
DOM-8	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	0.203 A	8
TESTIGO			0.189 A	7
RINCON	<i>Steneirnema</i> sp.	Tapachula, México	0.175 A	6
ATIRRO	<i>Steneirnema</i> sp.	Costa Rica	0.175 A	6
RAY	<i>Steneirnema</i> sp.	Tapachula, México	0.122 A	5

Letras diferentes entre tratamientos significan  $P < 0.05$  con la prueba Tukey

Este resultado es interesante vincularlo con el comportamiento de la broca en campo al inicio de la fructificación (mayo), cuando la broca abandona los frutos recién infestados que la planta tira en un proceso llamado "purga" (Barrera y Baker 1986). Los frutos usados en los ensayos con café verde tenían únicamente tres días de infestados, al disectarlos se observó que la broca solo alcanzó a perforar la pulpa del fruto. La broca emergió del fruto verde inmediatamente después de la inoculación con nematodos y después se mantuvo permanentemente en la arena, observándose este comportamiento también en el testigo. Esta observación le concede pocas expectativas a los nematodos en el control de broca en frutos verdes a nivel del suelo en esa época del año, ya que al parecer el comportamiento de emergencia de la broca ante una excesiva humedad (Baker 1987), activa un abandono del fruto que podría limitar el contacto con los nematodos y consecuentemente en su infectividad sobre la población localizada en frutos verdes recién infestados.

La drástica diferencia en los resultados obtenidos en estas dos últimas pruebas, nos indica que se necesitan ciertas condiciones para facilitar un efecto patogénico de los nematodos sobre la broca, lo que sugiere la necesidad de buscar un ensayo lo suficientemente sensible para evaluar este efecto empleando en frutos de café.

El principal inconveniente con el uso de nematodos entomopatogenos es su susceptibilidad a la desecación, porque la humedad juega un papel importante en su persistencia e infectividad (Barbercheck 1992). La humedad en la prueba con dieta fue mayor que en frutos verdes, aunque no podriamos aseverar un efecto determinante de este factor en la diferencia de estos resultados, porque una revisión reveló nematodos vivos en el experimento con fruto verde.

El volumen de la dieta, apenas suficiente para cubrir la superficie del papel filtro, fue 125 veces menor que la arena utilizada en la prueba con fruto verde. Esto pudo producir una menor concentración de juveniles infectivos en la prueba de frutos verdes que en la dieta.

Las pruebas de patogenicidad efectuadas con café pergamino denotaron una mortalidad diferente entre los tratamientos al 5% de significancia. Cuatro cepas destacaron en su efecto patógeno provocando mortalidades arriba del 50% (Cuadro 5), criterio que se tomó en consideración para la eliminación del resto de las cepas para posteriores ensayos.

Un aspecto importante de esta prueba es que revela la capacidad de los nematodos a infectar a la broca bajo condiciones parecidas a las que tienen los frutos

del suelo durante los períodos inter cosecha. La efectividad de los nematodos para matar a *H. hampei* en las pruebas con café pergamino, también muestra indirectamente la capacidad de estos nematodos para alcanzar a la población de broca dentro del grano de café.

CUADRO 5. PROMEDIOS DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA CON  $\text{ARCOSEN}^{\sqrt{4}}\%$  Y EL CORRESPONDIENTE PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* A LOS SEIS DÍAS DE INOCULACIÓN CON 200 JUVENILES INFECTIVOS POR INSECTO DE OCHO CEPAS DE NEMATODOS DE LOS GÉNEROS *Heterorhabditis* Y *Steinernema* USANDO CAFÉ PERGAMINO COMO ALIMENTO DE BROCA (N=100 BROCAS/TRATAMIENTO).

CLAVE DE LA CEPA	NEMATODO	LUGAR DE ORIGEN	PROMEDIO DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA	MORTALIDAD (%)
BIOSYS	<i>Neoplectana carpocapsae</i>	E.E.U.U.	1.233 A	86
LIM-1	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	1.168 A	82
PC-3	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	1.122 A	79
DOM-8	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Costa Rica	0.928 BA	61
ATIRRO	<i>Steinernema</i> sp.	Costa Rica	0.657 CB	38
RAY	<i>Steinernema</i> sp.	Tapachula, México	0.547 CD	30
RINCÓN	<i>Steinernema</i> sp.	Tapachula, México	0.524 DC	21
ZAPOTE	<i>Steinernema</i> sp.	Tapachula, México	0.351 DC	19
TESTIGO			0.285 D	10

Letras diferentes entre tratamientos significan  $P < 0.05$  con la prueba Tukey

Es interesante observar que las cepas LIM-1, PC-3, DOM-8 y la cepa comercial de *S. carpocapsae* mostraron mayor patogenicidad en las dos pruebas donde se logró demostrar un efecto de los nematodos sobre la broca. Las cepas RINCON y ZAPOTE fueron menos patogenicas en ambas pruebas. Estas últimas son las cepas nativas, las cuales no habían pasado un proceso de selección como sucedió con las cepas enviadas de Costa Rica y la cepa comercial, lo que explica su posición dentro de esta evaluación comparativa.

Los 5 gr de arena usados en la prueba con fruto pergamino equivalen a un volumen de 4 ml y los 25 gr de arena de la prueba con café verde a 20 ml. Aunque la cantidad de nematodos por fruto se mantuvo constante en ambos ensayos, la dosis de nematodos aplicada en relación al volumen de arena fue de 100 juveniles infectivos/ml en la prueba con café verde y de 500 juveniles infectivos/ml con el café pergamino. Este hecho confiere mayor oportunidad para producirse un encuentro nematodo-broca en la prueba con café pergamino, lo que significa que aún aplicandose la misma cantidad de nematodos en ambos ensayos, es muy importante considerar la concentración de nematodos por volumen de suelo.

Se debe considerar que los granos de café pergamino se infestaron con 10 brocas cada uno y que la broca del café tiene un comportamiento de agregación que se manifiesta mas fuertemente en los frutos inter cosechas. En esta época los frutos caidos al suelo albergan gran cantidad de brocas, dentro de los cuales pueden encontrarse eventualmente poco mas de 100 adultos por fruto (Baker 1985). Este factor puede jugar un papel importante en la infectividad de los nematodos dentro del grano de pergamino, sobre todo si consideramos que brocas inicialmente infectadas pudieron aumentar el número de nematodos en las galerias, aumentando con ello las posibilidades de infectar al resto, ya que se ha comprobado que insectos infectados son una efectiva fuente de infección de *G. mellonella* (Jansson y Lechone 1994).

Con una broca por fruto, el fruto verde se asemeja a frutos infestados al inicio de la fructificación. En estas condiciones la broca confinada en la arena no mostró ser afectada en los seis días que duró el ensayo, aún cuando una revisión realizada a la arena infectada mostró poca mortalidad de los nematodos. Por el contrario, la broca se mantuvo activa dentro de la arena. En *Popillia japonica* se ha demostrado un

comportamiento agresivo y evasivo como una forma defensiva en contra del ataque de nematodos entomopatogenos (Gaugler *et al.*). Podría suponerse que la movilidad del insecto dentro de la arena fue una reacción ante la presencia de los nematodos.

De cualquier manera, si la potencialidad de uso de estos nematodos es orientada hacia los frutos del suelo, entonces de las tres pruebas de patogenicidad la más adecuada para observar el efecto de estos nematodos sobre la broca es el realizado con café pergamino por su sensibilidad y por similitud a las condiciones en el período intercosechas.

### 5.3. Desarrollo de los nematodos en *H. hampei*

Para observar el efecto patógeno de estos nematodos sobre *H. hampei*, se colocaron los insectos con siete días de muertos dentro de cámaras húmedas. Estos insectos presentaron hinchamiento del cuerpo a causa de la bacteriosis, provocando separamiento de las partes intersegmentales del insecto. Al siguiente día de colocarse en cámaras húmedas se observó presencia de bacterias agrupándose alrededor de los insectos muertos, sin un aparente rompimiento de las partes del cuerpo del insecto. La emergencia de los nematodos se presentó 24 horas después de colocados los insectos en la humedad. Los nematodos salieron del cuerpo del insecto rompiendo las partes intersegmentales o por el ano. Emergieron de la broca casi siempre en su forma juvenil, pero en el caso de *Steinernema carpocapsea* lo hicieron en su mayor parte en forma adulta. En los heterorhabditidos, se observaron emerger juveniles del insecto, logrando reproducirse cientos de ellos de una sola broca (Figura 5).

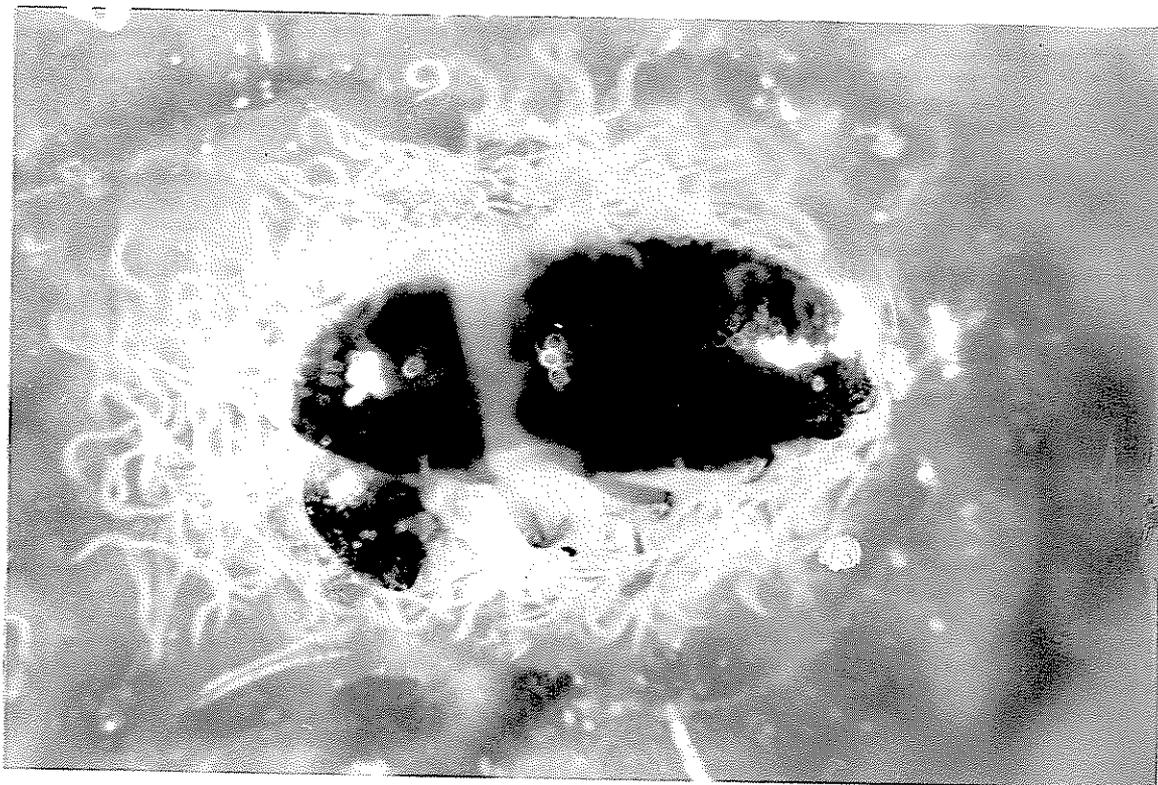


Fig. 5. Hembra adulta de *Hypothenemus hampei* afectada por la cepa LIM-1 (*Heterorhabditis* sp). Alrededor se observan juveniles que emergiendo del insecto.

#### 5.4. Tiempo letal medio (TL50)

En esta prueba se incluyeron solo las cepas que resultaron tener una mortalidad mayor al 50 % en la prueba de patogenicidad con café pergamino. El análisis de varianza efectuado indica que no existen diferencias significativas entre las cepas las cuatro cepas evaluadas. Sin embargo si la hubo con respecto al tiempo a una significancia del 5%. La prueba de contrastes ortogonales mostró una significancia de tipo cubica en la relación mortalidad tiempo y mortalidad ocurrida durante los diez días de evaluación.

En la Figura 6 se muestra el efecto de la mortalidad causado por la aplicación de las cuatro cepas de nematodos. Un incremento significativo fue observado a partir del cuarto día de evaluación.

Un incremento gradual de la mortalidad causada por las cepas evaluadas fue observada a lo largo de todos los tratamientos. Como valor del tiempo letal se considero al promedio de tiempo de las mas altas mortalidades observadas en este experimento, el cual fue de siete días posteriores a la inoculación de los juveniles infectivos.

El tiempo que el nematodo tarda en localizar a la broca en el interior del fruto, quizá este influyendo los resultados obtenidos en este experimento, pero también sería probable que la inactividad como comportamiento de defensa en el insecto este jugando un papel importante en la efectividad, ya que esto evitaría un rápido encuentro nematodo-broca. Hokkanen (1989) señala que la capacidad de localización del huesped y la habilidad de desplazamiento del nematodo son factores importantes para la selección de un efectivo agente biocontrolador.

### 5.5. Concentración letal media (CL50)

Para la elección de un agente dentro de un programa de control biológico inundativo, una de las características importantes que debe de tomarse en cuenta es una buena respuesta a la densidad por parte del patógeno. Esto es porque en muchos casos la densidad del agente de control no resulta directamente relacionado con el efecto de control sobre la plaga (Hokkanen 1989).

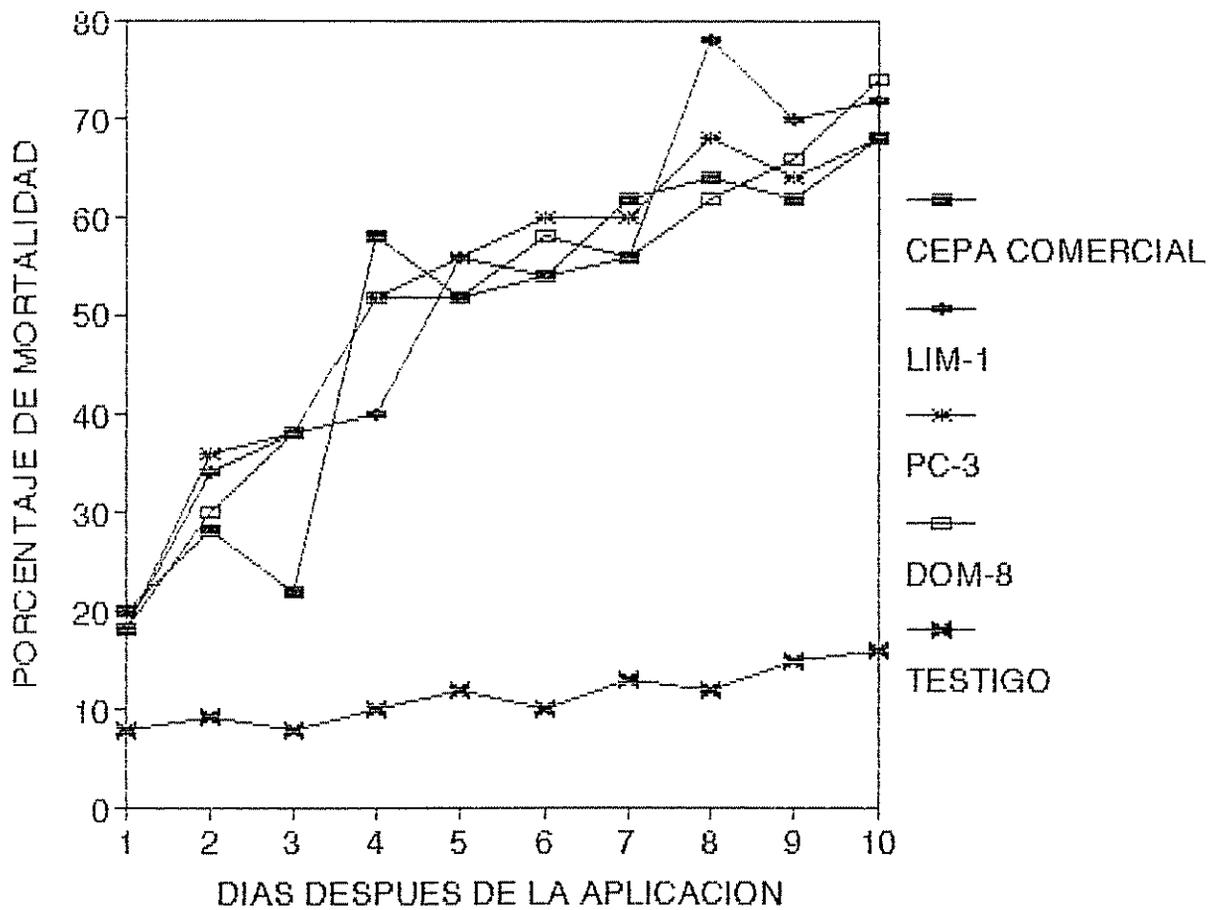


Fig. 6. Mortalidad de adultos de *H. hampei* causada por la aplicación de 200 juveniles infectivos/insecto de cuatro cepas de nematodos.

El cuadro 6 exhibe los valores de CL50, límites fiduciales y la ecuación de regresión de las cuatro cepas de nematodos que fueron incluidos en la prueba para encontrar la dosis efectiva en contra de la broca. Cada cepa está ubicada en orden ascendente de acuerdo a su respectiva CL50. Este valor significa el número de nematodos con que se puede llegar a matar al 50% de la población de broca. Se observa que *Heterorhabditis* sp. LIM-1 tiene el valor de CL50 más bajo, que indica que es el más virulento de las cuatro cepas. Le siguen en orden descendente las cepas *Heterorhabditis* sp. PC-3, *Heterorhabditis* spp. DOM-8 y *Steinernema carpocapsae*. Aunque se puede considerar iguales a las dos últimas cepas, ya que sus límites fiduciales se traslapan. Por el contrario las cepas *Heterorhabditis* sp. LIM-1 y *Heterorhabditis* sp. PC-3 son diferentes a cualquiera debido a que sus límites fiduciales no se traslapan.

CUADRO 6. 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.	59.900	54.514,	65.670	$Y = 0.231 + 1.71 X$
PC-3	<i>Heterorhabditis</i> sp.	89.032	80.921,	98.190	$Y = 0.169 + 1.63 X$
DOM-8	<i>Heterorhabditis</i> sp.	116.759	105.207,	130.513	$Y = 0.304 + 1.53 X$
BIOSYS	<i>Steinernema carpocapsae</i>	134.500	120.750,	151.337	$Y = 0.233 + 1.52 X$

La CL50 de LIM-1 fue 600 juveniles infectivos por grano, que corresponde a 60 juveniles infectivos por broca. Esta es una dosis relativamente alta considerando que Allard y Moore (1988), uso 125 juveniles infectivos para matar al 90% de la población a los trece días despues de la aplicación. Aunque las condiciones del ensayo fueron diferentes y la cepa no fue la misma, convendría realizar una evaluación con un tiempo de observación mayor que diez días. 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* (1167.52. y 1345.00, respectivamente), que le imponen mejores expectativas para usarse dentro de un programa de control biológico de la broca.

Según Lagunes (1991) el valor de la pendiente esta relacionado positivamente con la homogeneidad de respuesta . De acuerdo a esto, podemos observar nuevamente a LIM-1 mostrando una pendiente ligeramente mas alta que las demás cepas, con una pendiente de 1.72. Le siguen en orden descendente DOM-8, PC-3 y *S. carpocapsea*, con pendientes de 1.60, 1.54 y 1.50 respectivamente (Figura 7). Pero la variación entre estos valores tan pequeña que puede considerarse que no existe diferencias en este aspecto.

La mortalidad de broca causada por las ocho cepas incluidas en este trabajo, implicó evaluarles indirectamente su capacidad para introducirse a las galerías hechas por la broca, localizarla e infectarla. De las ocho cepas fueron tres heterorhabditidos las que mostraron mayor capacidad infectiva en *H. hampei*, y solo una de *Steinernema*. Estos resultados soportan lo encontrado por Choo *et al.* (1989) quienes observaron que la capacidad de busqueda de los heterorhabditidos era mayor que los steinernematidos en pruebas realizadas usando *G. mellonella* como huesped.

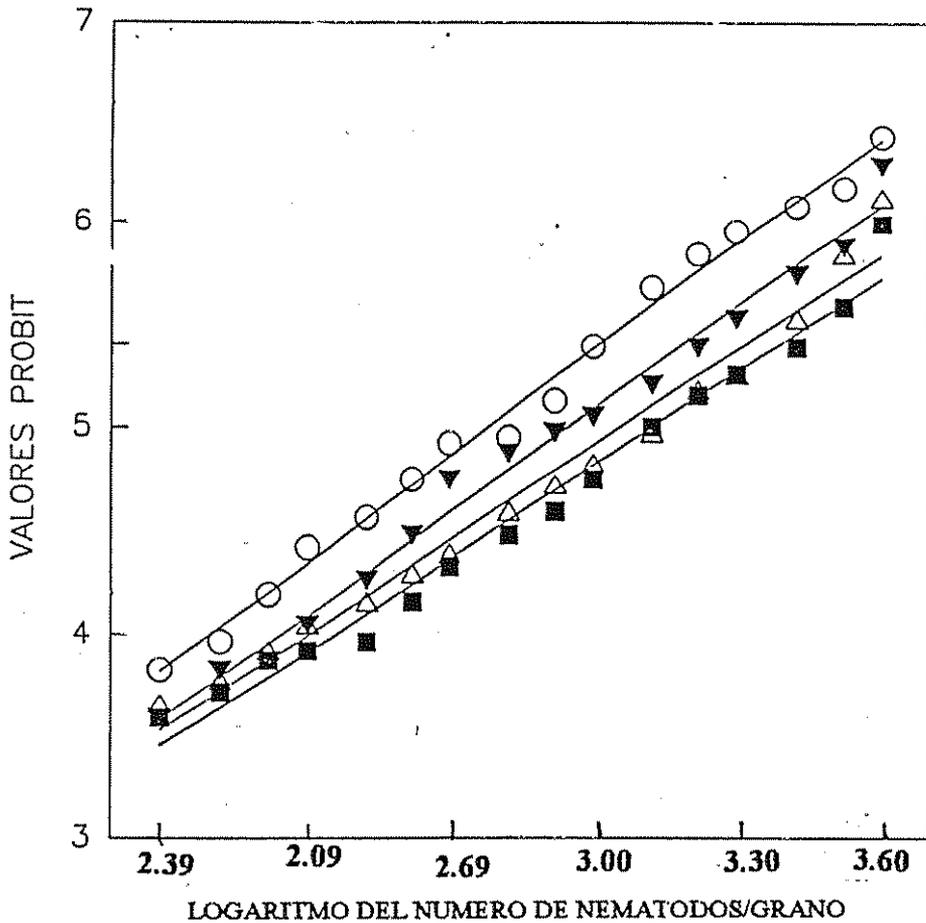


Fig. 7. Rectas de regresión del valor probit de la mortalidad y logaritmo del número de IJ/ grano de café, correspondientes a *Heterorhabditis* spp LIM-1 ( O ), *Heterorhabditis* spp PC-3 ( ▼ ), *Heterorhabditis* spp DOM-8 ( Δ ) y *Steinernema carpocapsea* ( ■ ) sobre *Hypothenemus hampei*

De las ocho cepas evaluadas, la cepa LIM-1 mostró ser la mejor candidata para usarse en un posible control de la broca, pero es preferible confirmar la presencia de nematodos nativos de la región con características patogénicas 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. Se ha observado que la liberación de nematodos entomopatógenos exóticos puede afectar nematodos nativos rabadidos y parásitos de plantas (Jansson 1992).

#### **5.6. Efecto de la condición del fruto infestado.**

Algunos autores han concedido pocas posibilidades a los nematodos para su aplicación contra la broca en un futuro próximo, por su alta susceptibilidad a la desecación y poca sobrevivencia a las condiciones de campo a corto plazo (Murphy y Moore 1990). La mejor opción lo representa su aplicación en los frutos infestados caídos al suelo, que tiene las ventajas de tener condiciones propicias para la sobrevivencia de los nematodos y encontrar a la broca concentrada en estos frutos durante la época intercosecha.

El análisis de varianza indica diferencias estadísticas en la mortalidad ocurrida bajo cuatro diferentes condiciones de fruto infestado y sus respectivos testigos a una significancia del 5%.

El tratamiento con café pergamino mostró una mortalidad mayor a todos los demás tratamientos (Cuadro 7). Quizá porque la exposición de las brocas a los

nematodos es mayor en este tratamiento a falta de el epicarpio del fruto ("pulpa") y por las perforaciones realizada para ayudar a la broca para facilitar su penetración.

No se observaron diferencias significativas en la mortalidad ocurrida entre frutos verdes recién infestados, verdes con 10 días de infestación y secos. Sin embargo la mortalidad de frutos verdes con 10 días de infestados fue diferente con respecto a los testigos.

La única variación de los frutos verdes recién infestados de este ensayo con respecto a la prueba de patogenicidad fue el mayor número de brocas por fruto, la presencia de la broca dentro del endospermo del fruto y el aumento de nematodos por volumen de arena, factores que pudieron producir la diferencia con su testigo.

CUADRO 7. PROMEDIOS DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA CON  $\text{ARCSENO}\sqrt{\%}$  Y EL CORRESPONDIENTE PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* OBSERVADA EN CUATRO CONDICIONES DE FRUTOS INFESTADOS SIETE DIAS DESPUÉS DE APLICADOS 60 JUVENILES INFECTIVOS POR INSECTO DE LA CEPA LIM-1 *Heterorhabditis* sp.

TRATAMIENTO	PROMEDIO DE LA MORTALIDAD TRANSFORMADA	MORTALIDAD (%)
Café pergamino infestado	0.797 A	51
Café verde c/10 días de infest.	0.565 BA	29
Café seco infestado	0.375 CB	23.3
Café verde recién infestado	0.314 CB	12
Café verde c/10 días de infest(testigo).	0.239 CB	8
Café verde recién infestado(testigo)	0.189 C	7
Café seco infest.(testigo)	0.161 C	6.2
Café pergamino infest.(testigo)	0.161 C	5

Letras diferentes entre tratamientos significan  $p < 0.05$  con la prueba de Tukey.

De las condiciones evaluadas, los frutos secos son lo más parecido a los frutos donde se refugia la broca en los periodos intecosechas. Allard y Moore (1988) observaron un evidente efecto de *Heterorhabditis* spp. sobre *H. hampei* después de 10 días de aplicación utilizando este tipo de fruto. Debido que en nuestro caso este tratamiento no fue diferente al testigo, consideramos que en un futuro sería interesante extender el periodo de observación en este tipo de frutos para reconfirmar con mayor rigor el efecto mortal sobre *H. hampei*. De igual manera sería importante que en los proximos ensayos se incluyera una dosis más elevada para observar su efecto en este mismo ensayo.

Los resultados muestran la sensibilidad de los granos pergamino infestados para evaluar el efecto patogénico de los nematodos sobre la broca porque es el tratamiento donde se observó mayor mortalidad de la broca, que unicamente lo señala como una herramienta para evaluar este efecto, ya que no es el estado del grano donde se propone aplicar.

Analizando los resultados obtenidos se deduce que el potencial de estos nematodos para matar a *H. hampei* dentro del fruto puede variar dependiendo de las condiciones a las que se sujete el ensayo, especialmente las relacionadas con los frutos infestados.

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 fisicos y biológicos podrían interferir con lo observado en laboratorio.

Finalmente, aunque exista una una esperanza de utilización de estos nematodos en contra de la broca, aún no podríamos pensar en 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.* 1993).

## VII. CONCLUSIONES

- La broca del café es susceptible al efecto patogenico que inducen los nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhaditis*.
- Las condiciones del fruto infestado determinan la efectividad de los nematodos para matar a la broca a nivel laboratorio.
- De las ocho cepas incluidas en este trabajo, cuatro de ellas provocaron mayor mortalidad de *H. hampei*, de las cuales tres fueron las cepas LIM-1, PC-3 y DOM-8 del género *Heterorhabditis* y la cepa comercial *Steinernema carpocapsea*.
- La más virulenta resulto ser la cepa LIM-1 (*Heterorhabditis* sp), con una CL50 de 600 juveniles infectivos por grano infestado, equivalente a 60 juveniles infectivos por broca.
- Los nematodos de ambos géneros son capaces de reproducirse en el interior de la broca y emerger por las partes intersegmentales del insecto.

## VII. RECOMENDACIONES

- Efectuar una búsqueda más exhaustiva de nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhaditis* nativos de la región.-
- Realizar ensayos usando mayores concentraciones de nematodos para observar el efecto en frutos infestados en campo.
- Avanzar con el proceso evaluativo de las cepas involucradas en este trabajo a nivel microparcela y campo.
- Evaluar el efecto de estos organismos sobre los enemigos naturales de *Hypothenemus hampei* que actualmente están siendo utilizados como alternativa de combate contra la broca y sobre otros organismos del suelo.
- Evitar utilizar estos organismos como agentes de control de la broca, sin antes comprobar si existe algún efecto negativo sobre la fauna nativa.
- Realizar ensayos que contribuyan a aclarar la falta de efectividad de estos organismos en los frutos verdes.

## VIII. - BIBLIOGRAFIA.

ABBOT, W.S. 1925. A methods for computing the effectiveness of insecticide. *Journal of Economic Entomology* (EE.UU.) 18:256-257.

ALLARD, G.B.; MOORE, D. 1989. *Heterorhabditis* sp. nematodes as control agents for coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Scolytidae). *Journal Invertebrate Pathology* (EE.UU.) 54:45-48.

ALONZO P., F.R. 1984. La broca y su importancia en la agricultura. In \_\_\_\_\_ El problema de la broca (*Hypothenemus hampei* Ferr)(Coleoptera:Scolytidae) y la cafcultura. Aspectos relacionados con importancia, daño, identificación, biología, ecología y control. San José, Costa Rica. IICA-PROMECAFE. p. 1-20.

AKHUST, R.; N. BOENARE. 1994. Taxonomy of *Photorhabdus*. In International Colloquium on Invertebrate Pathology. (4, 1994, London). Proceedings. U.K: Asociation of Pathology Invertebrate. p. 89-94.

\_\_\_\_\_. 1985. Avances de un programa integrado de investigación contra la broca (*Hypothenemus hampei*: Ferrari, 1836-1867). In Congreso de Manejo Integrado de Plagas (3, 1985, Guatemala). Memorias. Guatemala, PROMECAFE. p.105-143.

- ALMEIDA, P.R.; CAVALVANTE, R.D.; HOLANDA, A.A. 1967. Novos resultados no combate a broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferr., 1867). *Biológico (Bra.)* 33(1):14-17.
- ALATORRE R., R.; KAYA, H.K. 1990. Interespecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steineinema* for an insect host in sand. *Journal of Invertebrate Pathology (EE.UU.)* 55:179-188.
- AMARAL, P.R.; PUZZI, D.; ORLANDO, A. 1959. Polvilhamento do solo como método de combate á broca de café. *Arquivos do Instituto Biológico (Bra.)* 26(5):33-42.
- AMARAL, S.F.do; OLIVEIRA, D.A. 1974. Comportamento de alguns inseticidas clorados no controle da broca do café "*Hypothenemus hampei*" (Ferr., 1867). *Biológico (Bra.)* 40(4):106-110.
- AVERNA, R. 1926. As manifestações pathologicas que acompanham o desenvolvimento da broca *Stephanoderes hampei* Ferr. (st. coffea Hag.) nos frutos ou nos sementes do cafeeiro. Secretaria de Agricultura, Comercio e Obras Públicas. Boletín Técnico no.15. 87 p.
- BAKER, P.S. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomológica Mexicana (Méx)* 61:32-33.

- \_\_\_\_\_. 1985. Biología e historia natural de la broca del café. In Curso de Manejo Integrado de Plagas del Cafeto con Enfoque en Broca del Fruto (*Hypothenemus hampei* Ferr.) (1, 1985, Guatemala). Memorias. Guatemala, IICA-PROMECAFE-ANACAFE. p. 105-143.
- \_\_\_\_\_; BARRERA, J.F. 1985. Distribución, ecología y comportamiento de la broca del café en el Soconusco; la información necesaria para ensamblar un programa de control integrado. In Congreso de Manejo Integrado de Plagas (3, 1985, Guatemala). Memorias. Guatemala, AGMIP. p. 291-310.
- \_\_\_\_\_. 1987. Biología, ecología, y Hábitos de la broca. In curso Regional sobre Manejo Integrado de Plagas del Cafeto con Enfoque en Broca del Fruto (*Hypothenemus hampei* Ferr.) (2, 1987, San Pedro Sula, Hond.). Memorias. San Pedro Sula, Hond., IHCAFE-PROMECAFE-IICA p. 119-147.
- \_\_\_\_\_; BARRERA, J.F.; VALENZUELA, J.E. 1989. The distribution of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in southern México: A survey for a biocontrol project. *Tropical Pest Management* (U.K.) 35(2):163-168.
- \_\_\_\_\_. 1991. La bioecología de la broca del café, *Hypothenemus hampei*: *Misilanea de la Sociedad Colombiana de Entomología* (Col.) 18:14-40.
- \_\_\_\_\_; LEY, C.; BALBUENA, R.; BARRERA, J.F. 1992. Factors affecting the emergence of (*Hypothenemus hampei*; Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* (EE.UU.) 35:163-168.

- BALBUENA V., R. 1987. Sobrevivencia y comportamiento de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), bajo condiciones de laboratorio en Tapachula, Chiapas, México. Tesis Ing. Agr. Villaflores, Chiapas, México, Universidad Autonoma de Chiapas. 86 p.
- BARBERCHECK, M.E. 1992. Effect of soil physical factors on biological control agents of soils insect pests. *Florida Entomologist* (EE.UU.) 75(4):539-548.
- BARRERA, J.F.; COVARRUBIAS, M.L. 1984. Efecto de diferentes condiciones de la sombra del cafetal sobre la intensidad del ataque de la broca del grano del café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) en el Soconusco, Chiapas, México. In Congreso Nacional de Manejo Integrado de Plagas (2, 1990, Guatemala). Memorias. Guatemala, AGMIP. p. 208-218.
- \_\_\_\_\_ ; BAKER, P:S: 1986. Períodos críticos para el control de la broca del cafeto (Coleoptera: Scolytidae). In Congreso Nacional de Entomología (XXI, 1986, Monterrey, N.L.). Resúmenes. Monterrey, Nvo. León, México, CONACYT-CP-UANL. p. 159-161.
- \_\_\_\_\_ ; MOORE, D.; ABRAHAM, Y:J.; MURPHY, S.T.; PRIOR, C. 1990. Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in México and possibilities for further action. In Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases (1990). Proceedings. London (U.K.) p. 391-396.
- \_\_\_\_\_ ; INFANTE, F.; VEGA, M.; GONZALEZ, O.; SERRANO, A.; CARRILLO, E.; MUÑOZ, R.; OSORTO, J.; DECAZY, B.; MOORE, D. 1990. Introducción de *Cephalonomia stephanoderis*

(Hymenoptera: Bethyilidae) a Centroamérica para el control biológico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Turrialba (C.R.) 40(4): 570-574.

BARRIOS A., M. 1992. Producción y virulencia de algunas cepas del hongo entomopatogeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. contra la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza. 47 p.

BEEADING, R.A.; AKHURS, R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* (EE.UU.) 21:109-110.

BERGAMIN, J. 1943. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca do café "*Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867)" (Col: Ipidae). *Arquivos do Instituto Biologico* (Bra.) 132 (3): 31-72.

\_\_\_\_\_. 1944. O "repassé" como método de controle da broca do café "*Hypothenemus hampei*" (Ferrari 1867) (Col.: Ipidae). *Arquivos do Instituto Biologico Sao Paulo* (Bra.) 15:197-208.

BRUN, L.O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V.; SUCKLING, D.M.: 1989. Endosulfan resistance of *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera:Scolytidae) in New Caledonia. *Journal of Economic Entomology* (EE. UU.) 82:1311-1316.

- C.A.B. International Institute of Entomology. 1989. World Distribution of *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Distribution maps of pests, Map No. 170. (1989). London, C.A.B. International Institute of Entomology. 3 p. Series A (Agricultural).
- CAPINERA, J.L.; EPSKY, N.D. 1992. Potential for biological control of soil insects in the caribbean basin using entomopathogenic nematodes. Florida Entomologist (EE.UU.) 75(4):525-532.
- CARDENAS, R. 1991. La broca del café. Miselanea de la Sociedad Colombiana de Entomología (Col.) 18: 21-26.
- CHOY, M. J. G. 1992. Suceptibilidad de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleptera: Scolytidae) a siete insecticidas de diferentes grupos toxicológicos. Tesis Quím. Agric. Tapachula, Chiapas, México, Universidad Autónoma de Chiapas. 96 p.
- CHOO, H.Y.; KAYA, H.K.; BURLANDO, T.M.; GAUGLER, R. 1989. Entomopathogenic nematodes: Host-findings ability in the presence of plant roots. Enviromental Entomology (EE.UU.) 18:1136-1140.
- CORBET, G. 1930. Entomological notes. First Quarter, 1930. Malayan Agriculture Journal. (Malasia) 18:212-214.

- DECAZY, B.; CASTRO, T. 1990. El manejo integrado de la broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*, Ferrari). Manual Técnico. Guatemala, IICA-PROMECAFE. 20 p.
- FINNEY, J.R.; MORDUE, W. 1976. The susceptibility of the elm bark beetle *Scolytus scolytus* to the DD-136 strain of *Neoplectana* sp. *Annals of Applied Biology* (U.K.) 83:311-312.
- FISCHER, P.; FUHRER, E. 1990. Effect of soil acidity on the entomophilic nematode *Steinernema Krausseri* Steiner. *Biology and Fertility of Soils* (Alemania) 9:174-177.
- GALAN C., L.M.; BODEGAS, P.R. 1984. Estudio preliminar para el desarrollo de una estrategia de manejo integrado de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei* Ferr.) para la región del Soconusco, Chiapas, México (Coleoptera: Scolytidae). *In* Congreso Nacional de Manejo Integrado de Plagas (2, 1984, Guatemala). Memorias. Guatemala, AGMIP. p.195-206.
- GAUGLER, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-inhibiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems and Environmental* (Holanda) 24:351-360.
- GAUGLER, R.; Y. WANG; J. F. CAMPBELL. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera:Scolytidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. *Journal of Invertebrate Pathology*. (EE.UU.) 64:193-199.

- GEORGIS, R.; HOM, A. 1992. Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. *Nematropica* (EE.UU.) 22(1):81-98.
- GÓMEZ, J. 1994. Biología y propagación en laboratorio de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) y su parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethyridae). Tesis Ing. Agríc. Cuautitlan, México, Universidad Autónoma de México. 79 p.
- HARGREAVES, H. 1926. Notes of the coffee berry borer *Stephanoderis hampei* Ferr. in Uganda. *Bulletin of Entomological Research* (U.K.) 16:347-354.
- \_\_\_\_\_. 1935. *Stephanoderis hampei* Ferr., coffee berry borer, in Uganda. *The East African Agricultural Journal* (Kenia) 1:218-224.
- HELBIG, A.C. 1976. Chiapas. Geografía de un estado mexicano. Tuxtla Gutierrez, Gobierno del Estado de Chiapas. 398 p.
- HERNÁNDEZ, M.; SÁNCHEZ, A. 1972. La broca del fruto del café. Asociación Nacional del Café, Guatemala. Boletín No. 11. 35 p.
- \_\_\_\_\_; SANCHEZ, A. 1978. La broca del fruto del café. *Revista Cafetalera* (Guatemala) 174:12-26.
- HOKKANEN, H.M. 1989. Choosing an effective biocontrol agent - an evolutionary perspective. *Acta Entomologica Fennica* (Grecia) 53:19-24.

- HULSOLF, M. 1989. *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyridae), parasitoid of coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Field trials on life cycle and parasitism. Report of field experiments. Wageningen, Holanda, Universidad de Wageningen. 20 p.
- INGRAM, W.R. 1969. Cherry fall in robusta coffee: Pest damage and frequency of picking. East African Agricultural and Forestry Journal (Kenia) 34(4): 464-467.
- JANSSON, R.K. 1992. Introduction of exotic entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for control of insects: potential and problems. Florida Entomologist (EE.UU.) 76(1):83-96.
- KAYA, H.K. 1990. Soil ecology. In GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Press, Boca Ratón, Florida, CRC Press. p. 93-116.
- KLEIN-KOCH, C.O.; ESPINOZA, O.; TANDAZO, A.; CISNEROS, P.; DELGADO, D. 1988. Factores naturales de regulación y control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferr.). Sanidad Vegetal (Ecuador) 3:5-30.
- KRAKER, J. DE. 1988. The coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.): Factors affecting emergence and early infestation. Report of field experiments. Wageningen, Holanda, Universidad de Wageningen. 70 p.

- KUNG, S.P. 1990. Influence of soils pH and oxigen on persistence of *Steinernema* spp.. *Journal of Nematology* (EE.UU) 22:440-445.
- LAGUNES, T.A. 1990. Curso de toxicología y manejo de insecticidas. Montecillo, Chapingo. Centro de Entomología y Acarología/Colegio de Postgraduados 228 p.
- LAVABRE, E.M. 1989. Control químico de la broca del fruto del café. In Taller Regional de Broca (3, 1989, Antigua Guatemala). Memorias. Antigua, Guatemala, IICA-PROMECAFE. p. 129-132.
- LE PELLEY, R.H. 1968. Pests of coffee. London, Logmans Green. 590 p.
- LÓPEZ A., M.A. 1992. Estudios edafológicos de dos fincas cafetaleras del Soconusco, Chiapas con diferentes manejos agrícolas. Tesis Quím. Agríc. Tapachula, Chiapas, México, Universidad Autónoma de Chiapas. 93 p.
- MANSING, A. 1991. Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. *Journal of Coffee Research* (India) 21(2):67-98.
- MENDEZ L., I. 1990. Control microbiológico de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), con el hongo *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. (Deuteromycetes) en el Soconusco, Chiapas,

México. Tesis Mag. Sc. Texcoco, México, Universidad Autónoma de Chapingo. 135 p.

MONTERREY M., J.A. 1991. Fluctuación poblacional de la broca de los frutos de café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) en plantaciones cafetaleras de la región VI de Nicaragua, durante la cosecha 1989-1990. Revisión Interna Anual. (1990, Turrialba) Resúmenes. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. p. 29.

MOORE, D. 1989. Integrated management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. In Integrated pest management in tropical and subtropical cropping systems. Babdurkheim, Fed. Rep. of Germany. p. 31.

\_\_\_\_\_; PRIOR, C. 1989. Present status of control biological of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. In Brighton Crop Protection Conference. Pest and Disease (1989 UK). Proceedings. London. 3:1119-1124.

MURPHY, ST.; MOORE, D. 1990. Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. Biocontrol News and Information (U.K.) 11(2):107-117.

MUÑOZ, R. 1985. Medidas de control de broca del fruto del cafeto efectuadas en Honduras. In Curso sobre Manejo Integrado de Plagas del Cafeto con Énfasis

en Broca del Café *Hypothenemus hampei* Ferr. (2, 1985, Guatemala) Memorias. Guatemala, PROMECAFE-ANACAFE p.170-177.

\_\_\_\_\_. 1989. Ciclo biológico y reproducción partenogenética de la broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei* Ferr.). Turrialba (C.R.) 39(2):415-421.

OLIVEIRA, M.L. DE 1927. Contribução para o conhecimento da broca do café, *Stephanoderes hampei* (Ferr. 1867) modo de comportarse e ser combatida em Sao Paulo, Brasil. Comissao do Estudo e Debellação da Praga Caffeira (Bra.) 20:1-95.

PENADOS, R.; OCHOA, M.H. 1979. La consistencia del fruto del café y su importancia en el control de la broca, *Hypothenemus hampei* Ferr. Revista Cafetalera (Guatemala) 181:10,12,14-16.

POINAR Jr., G.O. 1975. Entomogenous nematodes. Leiden, Netherlands: E.J. BRILL. Citado por: WOODRING, J.L.; H.K. KAYA. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Ed. WYATT, N.G. Fayetteville, Arkansas, Arkansas Agricultural Experiment Station. 29 p. Southern Cooperative Series Bulletin 331.

\_\_\_\_\_. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Ratón, Florida, CRC Press. p. 23-61.

- REID, J.C.; MANSINGH, A. 1985. Economic losses due to *Hypothenemus hampei* Ferr. during processing of coffee berries in Jamaica. *Tropical Pest Management (U.K.)* 31:55-59.
- SAUNDERS, J. 1963. *Scolytidae y platypodidae* associated with *Ceratocystis* wilt of *Theobroma cacao* L. in Costa Rica. Tesis Ph. D. Wisconsin, EE.UU. University of Wisconsin. 67 p.
- SAS INSTITUTE. 1989. PC DOS Statistical Analysis System/ STAT release 6.06.01. Cary, Nort Carolina. 956 p.
- SCHMITT, A.T.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G. 1992. Baiting techiques for the control of *Cosmopolita sordidus* Germar (Coleoptera: Scolytidae). *Nematropica (EE.UU.)* 22(2):159-163.
- TICHELER, J.H. 1961. Étude anaytique de lépidemiologie du scolyte des graines de café *Stephanoderis hampei* Ferr., en Cote d'Ivoire. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen (Holanda)* 61(11):1-49. Publicada en español en: *CENICAFE (Col.)* 6(11):1-33.
- VEGA, M.; ROMERO, C.E. 1985. Combate de la broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) en El Salvador. In *Curso sobre Manejo Integrado de Plagas del Cafeto con Enfasis en la Broca del Fruto (Hypothenemus hampei, Ferr.)* (2, 1985, Guatemala) *Memorias. Guatemala, PROMECAFE-ANACAFE.* p.178-179.

- VILLACORTA, A.; BARRERA, J.F. 1993. Nova dieta meridica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera:Scolytidae): Comunicação científica. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil (Bra.) 22(2):405-409.
- WASSINK, H.; POINAR Jr., G.O. 1984. Use of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae: Rhabditidae), in latin america. Nematological reviews. Nematropica (EE.UU.) 14(1):97-109.
- WOOD, S.L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomy monograph great basin naturalists. Memoria No. 6 Brizham Young Univ. Provo. UTAH. p.875-911.
- WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Southern Cooperative Series Bulletin no. 331. 29 p.
- YAMAMOTO, K. 1948. "Assim falou a vespa da Uganda". Guia pratico para o combate biologico a broca do café. Sao Paulo, Brasil, Biblioteca Agropecuaria Brasileira. 79 p.
- ZELAYA R., R.; VARGAS, J.C. 1989. Rentabilidad del control cultural de broca del fruto del cafeto (*Hypothenemus hampei*) en parcelas de validación. In Seminario Taller Regional sobre validación de Tecnología en Café (II, 1989, Tegucigalpa, Hond.). Trabajos presentados. Ed. G. Vejarano M. Tegucigalpa, Honduras. 5 p.

CUADRO 1A. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* A LOS SEIS DÍAS DE INOCULACIÓN CON 2000 JUVENILES INFECTIVOS DE OCHO CEPAS DE NEMATODOS DE LOS GÉNEROS *Heterorhabditis* Y *Steinernema* USANDO DIETA COMO ALIMENTO DE LA BROCA.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F (calculada)		P>F
TRATAMIENTOS	8	37.2391	4.6549	18.578	**	0.0001
ERROR	36	9.0199	0.2505			
TOTAL	44	46.2591				

C.V.= 14.7414

\*\* = Significativo al 1%

CUADRO 2A. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* A LOS SEIS DÍAS DE INOCULACIÓN CON 2000 JUVENILES INFECTIVOS DE OCHO CEPAS DE NEMATODOS DE LOS GÉNEROS *Heterorhabditis* Y *Steinernema* USANDO FRUTO VERDE COMO ALIMENTO DE LA BROCA.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F (calculada)		P>F
TRATAMIENTOS	8	0.4116	0.051	0.407	N.S.	0.827
ERROR	81	10.233	0.126			
TOTAL	89	10.644				

C.V.= 33.922

N.S.= No significativo

CUADRO 3A. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* A LOS SEIS DÍAS DE INOCULACIÓN CON 2000 JUVENILES INFECTIVOS DE OCHO CEPAS DE NEMATODOS DE LOS GÉNEROS *Heterorhabditis* Y *Steinernema* USANDO CAFÉ PERGAMINO COMO ALIMENTO DE BROCA.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F (calculada)		P>F
TRATAMIENTOS	8	38.666	4.833	33.93	**	0.0001
ERROR	81	11.5368	0.542			
TOTAL	89	50.2030				

C.V.= 17.51

\*\* = Significativo al 1%

CUADRO 4A. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* OBSERVADA EN PERIODOS DE 24 HORAS DURANTE DIEZ DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN CON 2000 JUVENILES INFECTIVOS DE CUATRO CEPAS DE NEMATODOS...

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F (calculada)		P>F
CEPAS	3	0.113	0.037	1.69		0.172
TIEMPO	9	4.449	0.494	22.01	**	0.0001
BLOQUES	4	2.014	0.503	22.43	**	0.0001
BLOQUE*CEPA	12	0.341	0.028	1.27		0.243
ERROR	144	3.232	0.022			
TOTAL	199	11.371				
LINEAL	1	0.092	0.092	2.68		0.103
CUADRATICA	1	0.102	0.102	2.96		0.087
CUBICA	1	0.345	0.345	9.97	**	0.0019

C.V.= 18.88

\*\* = Significativo al 1%

CUADRO 5A. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MORTALIDAD DE *Hypothenemus hampei* CAUSADO POR *Heterorhabditis* spp. LIM-1 EN CUATRO DIFERENTES CONDICIONES DEL CAFÉ COMO ALIMENTO DE BROCA.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F (calculada)		P>F
TRATAMIENTOS	7	0.5853	0.0836	12.90	**	0.0001
ERROR	72	0.4857	0.0067			
TOTAL	79	1.0710				

C.V. = 10.0834

\*\* = Significativo al 1%