

ESTÍMULOS USADOS EN EL RECONOCIMIENTO DEL HOSPEDERO POR *Phymastichus coffea*, UN PARASITOIDE DE LA BROCA DEL CAFÉ

CUES USED DURING THE HOST RECOGNITION BY *Phymastichus coffea*, A PARASITOID OF THE COFFEE BERRY BORER

Marcela Chiu-Magaña, Alfredo Castillo*, Julio C. Rojas

El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5. 30700. Tapachula, Chiapas, México (acastill@ecosur.mx)

RESUMEN

La avispa *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) es un parasitoide que ataca a los adultos de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), considerada la plaga más importante de este cultivo. El objetivo de esta investigación fue evaluar la función de los estímulos físicos y químicos durante el reconocimiento del hospedero por *P. coffea*. Los bioensayos fueron realizados usando tubos de vidrio como arenas experimentales, en laboratorio. Se observó que la locomoción del hospedero no parece estar involucrada en su reconocimiento. Las hembras adultas de la broca, individuos de mayor tamaño, fueron más aceptadas que los machos como hospederos de *P. coffea*. El uso de modelos esféricos de plástico, en lugar de brocas, permitió confirmar que esta especie puede discriminar a su hospedero por su tamaño. El color no afectó el tiempo usado por los parasitoides para contactar al hospedero, pero los colores oscuros fueron manipulados por mayor tiempo por *P. coffea*. Los compuestos cuticulares no están involucrados en el reconocimiento del hospedero por *P. coffea*. Estas evidencias sirven de base para futuros estudios orientados a conocer aspectos relacionados con la eficiencia de este enemigo natural.

Palabras clave: *Hypothenemus hampei*, *Phymastichus coffea*, búsqueda del hospedero, control biológico.

INTRODUCCIÓN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), es la plaga mundial más importante del café (*Coffea arabica*) (Le Pelley, 1968). Este insecto logra penetrar hasta la pulpa de frutos jóvenes, ocasionando su pudrición y consecuente caída. La broca del café usa los frutos consistentes para reproducirse, destruyéndolos parcial o totalmente (Murphy y Moore, 1990). Una alternativa para combatir a esta plaga es el control biológico con parasitoides. La avispa *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) es el único

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Agosto, 2008. Aprobado: Marzo, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 393-401. 2009.

ABSTRACT

The wasp *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) is a parasitoid of the adults of the coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), considered the most important pest of this crop. A previous study has shown that *P. coffea* uses long-range chemical cues during the host location process. The objective of this study was to investigate the role of physical and chemical cues at short range during the host recognition by *P. coffea*. The assays were performed with glass vials used as experimental arenas under laboratory controlled conditions. The results showed that the movement of the host did not influence the recognition process. CBB females were better accepted than males by *P. coffea*, mostly because they are bigger than males. The use of spherical plastic models, instead of borers, allows confirming that size is an important cue for host recognition by *P. coffea*. Color did not affect the time spent by parasitoids in contacting the host, though dark colors were handled longer by *P. coffea*. Our results seem to suggest that cuticular compounds were not involved in host recognition by *P. coffea*.

Key words: *Hypothenemus hampei*, *Phymastichus coffea*, host-finding behavior, biological control.

INTRODUCTION

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), is coffee's (*Coffea arabica*) most important pest worldwide (Le Pelley, 1968). This insect can reach up to the pulp of young fruits, causing their rot and subsequent fall. The coffee borer reproduces itself in fruits where the endosperm has hardened, partially or completely destroying them (Murphy and Moore, 1990). An alternative to combat this pest is biological control with parasitoids. The wasp *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) is the only endoparasitoid of the adult coffee borer known so far. It is a gregarious species since the females generally oviposit two eggs inside the host, generating a progeny made up of one male and one female, growing in the host prothorax and abdomen, (Castillo *et al.*, 2004).

endoparasitoide del adulto de la broca del café hasta ahora conocido. Es una especie gregaria porque sus hembras depositan generalmente dos huevos dentro de cada hospedero, de los que se genera una progenie constituida por un macho y una hembra, que se desarrollan en el protórax y abdomen del hospedero (Castillo *et al.*, 2004). La longevidad de una hembra adulta de *P. coffea* no es mayor a tres días, aunque posee características biológicas deseables en un agente de control biológico efectivo, como un ciclo de vida más corto que su hospedero, alta actividad parasitaria (Feldhege, 1992), capacidad de discriminación (Castillo *et al.*, 2004) y breve período de pre-oviposición (Infante *et al.*, 1994). De todos los enemigos naturales de la broca del café, *P. coffea* posee el mayor potencial para ser usada como un agente regulador de las poblaciones de *H. hampei* (Gutiérrez *et al.*, 1998).

La efectividad de los parasitoides como agentes de control biológico depende ampliamente de su capacidad de localización del hospedero. Según Weseloh (1976), la localización del hospedero es determinante para el éxito reproductivo de los parasitoides, por lo que muchas especies han desarrollado mecanismos efectivos de orientación y detección. El proceso de localización se divide en localización del hábitat del hospedero, localización del hospedero y reconocimiento-aceptación del hospedero (Vinson, 1998). Durante la localización, los parasitoides usan estímulos complejos de corto y largo alcance, los cuales incluyen señales visuales, químicas, auditivas y táctiles (Godfray, 1994).

Poco se conoce acerca de los estímulos que usa *P. coffea* durante la localización de su hospedero. Las hembras de *P. coffea* son atraídas a compuestos volátiles emitidos por frutos de café dañados mecánicamente e infestados por la broca del café, que son usados como señales de localización del hábitat del hospedero (Rojas *et al.*, 2006). Además, una parte de esta actividad proviene de los desechos alimenticios y fecales de la broca, aunque no se aislaron a los compuestos responsables (Rojas *et al.*, 2006). Se requieren más estudios para completar la información referente a los estímulos que usa *P. coffea* para localizar a la broca del café, imprescindible para desarrollar estrategias que puedan favorecer la capacidad de parasitismo de *P. coffea*. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la función de los estímulos físicos y químicos durante el reconocimiento del hospedero por *P. coffea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las brocas adultas se obtuvieron de frutos de café infestados, recolectados en cafetales cercanos a Tapachula, Chiapas, México.

The longevity of a *P. coffea* adult female is about three days at the most, though it has desirable biological properties as an effective biological control agent, like a shorter lifespan than the host, a high parasitic activity (Feldhege, 1992), discrimination capacity (Castillo *et al.*, 2004) and a short period of pre oviposition (Infante *et al.*, 1994). Of all the natural enemies of coffee borer, *P. coffea* has the greatest potential to be used as a regulating agent of *H. hampei* populations (Gutiérrez *et al.*, 1998).

The effectiveness of parasitoids as agents of biological control widely depends on their capacity of finding their host. The location of the host is decisive for the successful reproduction of parasitoids (Weseloh, 1976), reason why many species have developed effective mechanisms of orientation and detection. The location process includes the location of the host habitat, location of the host and recognition, and acceptance of the host (Vinson, 1998). During host location, parasitoids use visual, chemical, auditory and tactile cues at long and short range (Godfray, 1994).

Little is known about the cues used by *P. coffea* during the location of its host. The *P. coffea* females are attracted to volatile compounds emitted by coffee fruits mechanically damaged or infested by *H. hampei*, which are used as reliable cues for host habitat location (Rojas *et al.*, 2006). The attractiveness of infested fruits is due to coffee residues and fecal waste of borers (Rojas *et al.*, 2006). However, further research is required to completely understand the host location behavior of *P. coffea*. The information obtained may be indispensable to develop strategies to improve the efficiency of this parasitoid as a biological control agent through behavioral manipulation. Therefore, the objective of this research was to evaluate the role of physical and chemical cues during the recognition of the host by *P. coffea*.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Adult berry borers were obtained from infested coffee beans collected in plantations near Tapachula, Chiapas, México. Coffee beans were cut in half and the borers separated from the remains after being sieved and then placed in plastic containers (3×5 cm) covered with a fine mesh, and maintained there until being used in bioassays. Recently emerged *P. coffea* females were used, obtained from a progeny, as described elsewhere (Infante *et al.*, 1994). During the bioassays insects were observed for one hour inside glass vials used as experimental arenas. These observations were performed from 09:00 to 12:00 hours at 27±2 °C and relative humidity of 70±5 %. Illumination was provided by two 39-Watts lamps with an

Los frutos se cortaron por la mitad y las brocas separadas de los residuos con un tamiz y se colocaron en recipientes de plástico (3×5 cm) tapados con malla fina, hasta su uso en los ensayos. Se usaron hembras de *P. coffea* recién emergidas, obtenidas de una cría descrita por Infante *et al.* (1994). En los bioensayos se observaron por 1 h los insectos dentro de tubos de vidrio, usados como arenas experimentales. Estas observaciones se hicieron de 09:00 a 12:00 h, a 27±2 °C, humedad relativa de 70±5 % e iluminación de 712 lx suministrada por dos lámparas de 39 Watts colocadas a 50 cm de las arenas experimentales. Los insectos fueron usados una sola vez en los bioensayos.

Influencia del movimiento del hospedero en el comportamiento de *P. coffea*

La influencia del movimiento del hospedero para su localización y reconocimiento por el parasitoide usando brocas vivas y brocas muertas por enfriamiento (-10 °C por 1 h), fue evaluada en pruebas de no elección y de doble elección. En pruebas de no elección se confinó a una broca (viva o muerta) con una hembra del parasitoide dentro de un tubo de vidrio de 12×48 mm, con 50 repeticiones por tratamiento. En pruebas de doble elección, se colocaron dos brocas (una viva y una muerta) con una hembra del parasitoide dentro de un tubo de vidrio de 15×75 mm. Se realizaron 50 repeticiones. En ambas pruebas se registró el número de parasitoides que contactó por primera vez al hospedero, el tiempo de contacto (período transcurrido desde la liberación del parasitoide en el tubo hasta que éste se contactó con su hospedero) y el tiempo de manipulación (tiempo que tardó el parasitoide sobre el hospedero después de contactarlo). Cada repetición finalizó al momento que el parasitoide abandonó a su hospedero.

Influencia del tamaño del hospedero en el comportamiento de *P. coffea*

La influencia de este factor fue investigado en dos experimentos. En el primero se evaluó el comportamiento de *P. coffea* a hospederos naturales de diferente tamaño, para lo cual se usaron hembras y machos de la broca del café muertas por congelación. Las brocas hembras son aproximadamente el doble en tamaño que las brocas machos. Este experimento se realizó en pruebas de no elección y de doble elección. En la de no elección se ofreció una broca hembra o una broca macho al parasitoide dentro de un tubo de 12×48 mm, realizando 50 repeticiones para cada sexo de la broca. En la prueba de doble elección se confinó, dentro de un tubo de vidrio de 15×75 mm, a dos brocas (hembra y macho) con el parasitoide, con 50 repeticiones. En el segundo experimento se ofreció al parasitoide una esfera de vidrio negro (1 mm o 2 mm diámetro), en una prueba de no elección. La esfera se colocó dentro de un tubo de vidrio (15×75 mm) y se introdujo el parasitoide, realizando 50 repeticiones para cada tipo de esfera. En ambos experimentos se registró el número de parasitoides que contactó por primera vez a cada hospedero, el tiempo de contacto

intensity of 712 lx located at 50 cm from the experimental arenas. Insects were used only once in bioassays.

Influence of the host movement on the *P. coffea* behavior

The influence of the host movement for its location and recognition by the parasitoid was evaluated in non-choice and double choice tests using alive and dead borers from freezing (-10 °C for 1 h). In non-choice tests, a borer (dead or alive) was confined together with a parasitoid female in a vial of 12×48 mm. In total, 50 replicates per treatment were performed. In double choice tests, two borers (one dead and one alive) were put together with a parasitoid female inside a 15×75 mm vial. In total, 50 replicates were made. In both tests the number of parasitoids contacting the host for the first time as well as the time of contact (period of time passed from the release of the parasitoid in the vial until it contacted the host) and the time of handling (time spent by the parasitoid with the host after contacting it) were recorded. Each replicate ended when the parasitoid abandoned the host.

Influence of the host size on the behaviour of *P. coffea*

The influence of size was examined in two experiments. In the first one, the behavior of *P. coffea* to natural hosts of different sizes was evaluated by using coffee berry borer females and males frozen to death. Female borers are approximately twice as big as male borers. This experiment was performed in non-choice and double choice tests. In the non-choice test, a female borer or a male was offered to the parasitoid inside a 12×48 mm vial. In total, 50 replicates for each sex were performed. In the double choice tests, two borers, female and male, were confined to a 15×75 mm vial together with the parasitoid. In total, 50 replicates were made.

In the second experiment, a black glass sphere (1 or 2 mm in diameter) was offered to the parasitoid in a non-choice test. The sphere was placed inside a vial (15×75 mm) and then the parasitoid was introduced. In total 50 replicates for each sphere size was performed. In both experiments, the number of parasitoids contacting to the host for the first time, as well as the time of contact and of handling were recorded. Each replicate ended when the parasitoid abandoned the host.

Influence of the host color on the behavior of *P. coffea*

The influence of color on the parasitoid behavior was evaluated in non-choice tests by using spherical plastic models (2 mm in diameter), instead of adult borers, placed in 12×48 mm vials. The colors evaluated were: intense blue (RGB = 25, 25, 112), turquoise (RGB = 0, 195, 205), lemon green (RGB = 50, 205, 50) and black (RGB = 0, 0, 0). In total, 50 replicates were performed for each color. The number of parasitoids contacting the host for the first time as well as the time of contact and handling were recorded. Each replicate ended when the parasitoid abandoned the host.

y el tiempo de manipulación. Cada repetición finalizó al momento que el parasitoide abandonó a su hospedero.

Influencia del color del hospedero en el comportamiento de *P. coffea*

La influencia del color en el comportamiento del parasitoide se evaluó en una prueba de no elección usando modelos esféricos de plástico (2 mm diámetro), en lugar de brocas adultas, colocados en tubos de vidrio de 12×48 mm. Los colores evaluados fueron: azul fuerte (RGB = 25, 25, 112), turquesa (RGB = 0, 195, 205), verde limón (RGB = 50, 205, 50) y negro (RGB = 0, 0, 0). Se realizaron 50 repeticiones por cada color. En ambos experimentos se registró el número de parasitoides que contactó por primera vez a cada hospedero, el tiempo de contacto y el tiempo de manipulación. Cada repetición finalizó al momento que el parasitoide abandonó a su hospedero.

Influencia del estímulo químico de la broca en el comportamiento de *P. coffea*

Se realizaron pruebas de no elección para evaluar el estímulo que representa una broca hembra previamente lavada con 1 mL de tres distintos disolventes (hexano, acetona o metanol). Las brocas vivas se sumergieron por 1 min dentro del disolvente, y antes de ofrecerlas a los parasitoides se dejaron escurrir por 30 min a 28-30 °C para permitir la evaporación del disolvente. Todas las brocas murieron por efecto del tratamiento y se ofrecieron individualmente a los parasitoides dentro de tubos de vidrio de 12×48 mm. Se incluyó un grupo testigo con brocas no tratadas, muertas por enfriamiento. Se realizaron 50 repeticiones por tratamiento. En ambos experimentos se registró el número de parasitoides que contactó por primera vez a cada hospedero, el tiempo de contacto y el tiempo de manipulación. Cada repetición finalizó al momento que el parasitoide abandonó a su hospedero.

Análisis estadístico

Para detectar diferencias en el número de parasitoides que contactaron por primera vez a los hospederos ofrecidos en los experimentos, se usó una prueba G con corrección de Williams. Los datos del tiempo de contacto y tiempo de manipulación se describieron con la mediana y se analizaron con una prueba de Mann-Whitney cuando se compararon dos tratamientos o una prueba de Kruskal-Wallis cuando se compararon más de dos tratamientos. Los análisis se realizaron con el programa Statistica versión 6.1 (Statsoft Inc, 2003).

RESULTADOS

Influencia del movimiento del hospedero en el comportamiento de *P. coffea*

El número de parasitoides que contactó por primera vez a las brocas vivas no fue diferente estadísticamente

Influence of the borer chemical cues on the behavior of *P. coffea*

The influence of host contact chemical cues on the behavior of *P. coffea* was investigated using female borers previously rinsed with 1 ml of hexane, acetone or methanol. The borers were submerged for 1 min in the solvent, and all of them died as a result of this treatment. Once the solvent had evaporated, borers were individually offered to the parasitoids in vials of 12×48 mm in non-choice tests. A group of untreated borers frozen to death was included as a control. All treatments were replicated 50 times. The number of parasitoids contacting the host for the first time as well as the time of contact and of handling were recorded. Each replicate ended when the parasitoid abandoned the host.

Statistical analysis

To compare the number of parasitoids that contacted the hosts for the first time we used the log-likelihood ratio test (G test) for goodness-of-fit with Williams' correction. Data from contact time and handling time were described with the median and analyzed with a Mann-Whitney test when two treatments were compared, or with a Kruskal-Wallis test when more than two treatments were compared. Most of the data were analyzed using the computer package Statistical ver 6.1 (Statsoft Inc, 2003).

RESULTS

Influence of the host movement on the behavior of *P. coffea*

There were no significant differences in the number of parasitoids that contacted the alive and dead borers in both tests (Table 1). The results showed that the movement of the host did not influence contact time or handling time of the host in both tests (Table 1).

Influence of the host size on the behavior of *P. coffea*

In the first experiment, there were no significant differences in the number of parasitoids that contacted female and male borers in both tests (Table 2). In both tests, the size of the host had no influence on the time spent by the parasitoid in contacting its host, but *P. coffea* took longer in handling the females than the males (Table 2).

In the second experiment, significantly more parasitoids contacted the 2 mm spheres in comparison to those that contacted 1 mm spheres (Table 3). There were no differences in the time employed by the parasitoids to contact the 1 and 2 mm black spheres, but handling time differed between both treatments (Table 3).

de aquel que contactó a las brocas muertas en ambas pruebas (Cuadro 1). Los resultados de las pruebas de no elección muestran que el movimiento del hospedero no influye en el tiempo de localización ni en el tiempo de manipulación del hospedero (Cuadro 1). Un resultado similar se encontró en las pruebas de doble elección debido a que el movimiento del hospedero tampoco influyó en el tiempo de localización y el tiempo de manipulación del hospedero (Cuadro 1).

Influencia del tamaño del hospedero en el comportamiento de *P. coffea*

En el primer experimento, el número de parasitoides que contactó por primera vez a brocas hembras no fue diferente del que contactó a brocas machos en ambas pruebas (Cuadro 2). En ambas pruebas, el tamaño del hospedero no influyó en el tiempo usado por el parasitoide para localizar a su hospedero; pero *P. coffea* tardó más tiempo manipulando a las hembras que a los machos (Cuadro 2).

En el segundo experimento, el número de parasitoides que contactó por primera vez a las esferas de 2 mm fue mayor comparado con el que contactó a las esferas de 1 mm (Cuadro 3). No se encontraron diferencias en

Influence of the host color on the behavior of *P. coffea*

There were no differences in the number of parasitoids that contacted spheres of different color (Table 4). There were no differences in the time taken by parasitoids to contact the different color models (Table 4). However, the time of handling varied in models of different colors. Parasitoids handled longer intense blue and black models than the turquoise. The time the parasitoid handled the green model was intermediate between the time spent to handle the intense blue and the black and turquoise models (Table 4).

Influence of the borer chemical cues on *P. coffea* behavior

There were no differences between the number of parasitoids that contacted the borer females rinsed with the different solvents and that of the control borers (Table 5). No differences were registered in the time spent by parasitoids in contacting borers rinsed with hexane, acetone and methanol in comparison to the control (no rinsed borers) (Table 5). There were no

Cuadro 1. Número de hembras de *Phymastichus coffea* que realizaron el contacto y tiempo (mediana) usado para contactar y manipular a brocas vivas y muertas en pruebas de no elección (1) o doble elección (2).

Table 1. Number of *Phymastichus coffea* females that contacted host for the first time, and time of contact and handle (median) of alive and dead borers in non-choice (1) or double choice (2) tests.

| Variable | Prueba | Tratamiento | | Estadístico | P |
|----------------------------|--------|-------------|--------|-------------|-------|
| | | Viva | Muerta | | |
| Frecuencia de contacto | 1 | 46 | 33 | G = 2.13 | 0.144 |
| Tiempo de contacto (s) | 1 | 872 | 872 | K-W=0.75 | 0.387 |
| Tiempo de manipulación (s) | 1 | 234 | 245 | K-W=0.00 | 0.945 |
| Frecuencia de contacto | 2 | 23 | 27 | G = 0.317 | 0.57 |
| Tiempo de contacto (s) | 2 | 780 | 778 | K-W=0.209 | 0.647 |
| Tiempo de manipulación (s) | 2 | 237 | 268 | K-W=0.016 | 0.899 |

Cuadro 2. Número de hembras de *Phymastichus coffea* que realizaron el contacto y tiempo (mediana) usado para contactar y manipular brocas hembras (hospedero grande) y machos (hospedero pequeño) en pruebas de no elección (1) o doble elección (2).

Table 2. Number of *Phymastichus coffea* females that contacted host for the first time, and time of contact and handle (median) of female borers (big host) and males (small host) in non-choice (1) or double choice (2) tests.

| Variable | Prueba | Tratamiento | | Estadístico | P |
|----------------------------|--------|-------------|-------|-------------|--------|
| | | Hembra | Macho | | |
| Frecuencia de contacto | 1 | 42 | 29 | G = 2.37 | 0.123 |
| Tiempo de contacto (s) | 1 | 515 | 716 | K-W=0.11 | 0.738 |
| Tiempo de manipulación (s) | 1 | 341 | 185 | K-W=12.8 | <0.001 |
| Frecuencia de contacto | 2 | 25 | 25 | G = 0 | 1 |
| Tiempo de contacto (s) | 2 | 783 | 412 | K-W=6.81 | 0.009 |
| Tiempo de manipulación (s) | 2 | 960 | 231 | K-W=12.67 | <0.001 |

el tiempo empleado por el parasitoide para localizar a las esferas negras de 1 y 2 mm de tamaño, pero si en el tiempo de manipulación (Cuadro 3).

Influencia del color del hospedero en el comportamiento de *P. coffea*

No se encontraron diferencias en el número de parasitoides que contactaron por primera vez a las esferas de diferente color (Cuadro 4). No se observó diferencia en el tiempo que tardó el parasitoide para contactar a los diferentes modelos de colores (Cuadro 4). En contraste, el tiempo de manipulación fue variable en modelos de diferente color. Los modelos azul fuerte y negro fueron manipulados por mayor tiempo en comparación con el modelo turquesa. El tiempo que el parasitoide manipuló el modelo verde fue intermedio entre el tiempo para manipular los modelos azul fuerte, negro y turquesa (Cuadro 4).

Influencia del estímulo químico de la broca en el comportamiento de *P. coffea*

No hubo diferencias entre el número de parasitoides que contactaron a las hembras de broca lavadas

significant differences in the time of handling between treatments either (Table 5).

DISCUSSION

Host size, shape and texture are major physical cues used by parasitoids during recognition and acceptance (Norlund *et al.*, 1981). Some species of parasitoids are stimulated by the movement of hosts to locate and accept them (Stireman, 2002; Cournoyer and Boinvin, 2005). Other species are attracted by vibrations emitted by the host during its location (Ryan and Rudinsky, 1962; Meyhöfer *et al.*, 1997, Godfray, 1994). In the present study, we found that *P. coffea* did not show any preference for alive or dead insects, suggesting that the movement or vibrations emitted by the *H. hampei* females are not used by the parasitoid to locate and recognize its host. These results match with the natural biology of this parasitoid that attacks borers as they begin to bore into the coffee bean. During this stage, the borer exhibits less mobility and therefore is more exposed to the attack of a parasitoid.

In the present study, we found that *P. coffea* uses the host size to recognize it. In the first experiment, the parasitoid took longer in handling the females than

Cuadro 3. Número de hembras de *Phymastichus coffea* que realizaron el contacto y tiempo (mediana) usado para contactar y manipular esferas grandes (2 mm) o esferas pequeñas (1 mm) ofrecidas en sustitución de la broca en pruebas de no elección.

Table 3. Number of *Phymastichus coffea* females that contacted host for the first time, and time of contact and handle (median) of big spheres (2 mm) or small ones (1 mm) provided to replace the borer in non-choice tests.

| Variable | Tratamiento | | Estadístico | P |
|----------------------------|-------------|-------|-------------|--------|
| | Grande | Chica | | |
| Frecuencia de contacto | 45 | 15 | G = 15.56 | <0.001 |
| Tiempo de contacto (s) | 749 | 843 | K-W = 0.06 | 0.812 |
| Tiempo de manipulación (s) | 43.5 | 12.4 | K-W = 4.6 | 0.03 |

Cuadro 4. Número de hembras de *Phymastichus coffea* que realizaron el contacto y tiempo (mediana) usado para contactar y manipular a modelos de plástico de diferentes colores ofrecidos en pruebas de no elección.

Table 4. Number of *Phymastichus coffea* females that contacted host for the first time, and time of contact and handle (median) of plastic models of different colors in non-choice tests.

| Tratamiento | Variable | | |
|-------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| | Frecuencia de contacto | Tiempo de contacto (s) | Tiempo de manipulación (s) |
| Azul fuerte | 23a | 2066a | 82.5a |
| Negro | 37a | 859a | 65.5a |
| Verde limón | 27a | 1374a | 35ab |
| Turquesa | 25a | 1271a | 29b |
| Estadístico | G = 3.94 | K-W = 4.53 | K-W = 10.87 |
| P | 0.267 | 0.209 | 0.012 |

Valores en una columna con diferente letra son significativamente diferentes ❖ Similar letters within a column indicate no significant difference.

con los diferentes disolventes y con las brocas testigo (Cuadro 5). El tiempo que tardaron los parasitoides en contactar las brocas lavadas con hexano, acetona y metanol no difirió del tiempo para el testigo (brocas no lavadas) (Cuadro 5). Para el tiempo de manipulación tampoco hubo diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

Norlund *et al.* (1981) mencionan que el tamaño, forma y textura del hospedero son estímulos físicos importantes usados por los parasitoides durante el reconocimiento y su aceptación. Algunas especies de parasitoides son estimuladas por el movimiento de su hospedero, para que estos sean localizados y aceptados (Stireman, 2002; Cournoyer y Boinvin, 2005). Otras especies de parasitoides son atraídas a vibraciones emitidas por su hospedero durante su localización (Ryan y Rudinsky, 1962; Meyhöfer *et al.*, 1997, Godfray, 1994). Los presentes ensayos no muestran una preferencia de *P. coffea* por los insectos vivos o muertos, sugiriendo que la movilidad o las vibraciones emitidas por las hembras de *H. hampei* no están involucradas en el reconocimiento del hospedero por este parasitoide. Estos resultados coinciden con la biología natural de este parasitoide, que ataca a las brocas justo en el momento que penetran al fruto de café. Durante esta fase la broca presenta menor movilidad y por tanto está más expuesta al ataque del parasitoide.

En el presente trabajo *P. coffea* reconoció a su hospedero en función de su tamaño. En el primer experimento el parasitoide tardó más tiempo manipulando a las hembras que a los machos, los cuales difieren en tamaño. La sustitución de brocas por esferas de plástico, permitió confirmar que el tamaño del hospedero es un estímulo importante durante el reconocimiento por *P. coffea*. El efecto del tamaño del hospedero en este proceso ha sido observado en otras especies de

the males, as they differ in size. The substitution of plastic spheres for borers allowed us to confirm that the size of the host is an important stimulus during the recognition by *P. coffea*. The effect of the host size during the host-finding process has been reported in other species of parasitoids (Morehead y Freener, 2000; Demas *et al.*, 2002). For an insect parasitoid, host size has a major influence on its fitness as it determines the maximum amount of food available for its offspring (Godfray, 1994). *P. coffea* generally lays two eggs on the abdomen of its host; both individuals develop in the host abdomen, but at the end of the larval stage, the smallest larva (male) moves and begins to feed from the tissue of the prothorax, where it finally pupates. The biggest larva (female) remains in the abdomen (Castillo *et al.*, 2004). Therefore the discrimination of the host in relation to its size is important for *P. coffea*, as it reduces the larva competition and increases the possibility of its progeny survival.

Data from the first experiment about the influence of the host size showed no relation between this factor and the time used by *P. coffea* to contact it. In the second experiment, the difference was significant since the parasitoids contacted the large spheres more frequently than the small ones. The difference between the two experiments indicates that the shape—in addition to the size—may influence the behavior of the parasitoid, as observed in other insects (Bernays and Chapman, 1995).

Color did not affect the time used by parasitoids to contact the host, though dark colors were manipulated longer by *P. coffea*, which suggests that color does influence the process of recognition. In other species of parasitoids, color is important during the host selection process (Fischer *et al.*, 2004; Lobdell *et al.*, 2005). In the case of *P. coffea*, further studies are necessary to better understand the biological meaning of the results obtained here.

Cuadro 5. Número de hembras de *Phymastichus coffea* que realizaron el contacto y tiempo (mediana) usado para contactar y manipular a brocas hembras lavadas con diferentes disolventes ofrecidas en pruebas de no elección.
Table 5. Number of *Phymastichus coffea* females that contacted host for the first time, and time of contact and handle (median) of female borers rinsed with different solvents in non-choice tests.

| Tratamiento | Variable | | |
|-------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| | Frecuencia de contacto | Tiempo de contacto (s) | Tiempo de manipulación (s) |
| Hexano | 39a | 1027a | 286a |
| Acetona | 32a | 1059a | 353a |
| Metanol | 41a | 529a | 398a |
| Control | 40a | 619a | 397a |
| Estadístico | G = 1.36 | K-W = 6.91 | K-W = 7.52 |
| P | 0.714 | 0.074 | 0.057 |

Valores en una columna con diferente letra son significativamente diferentes ❖ Similar letters within a column indicate no significant difference.

parasitoides (Morehead y Freener, 2000; Demas *et al.*, 2002). Estos resultados coinciden con antecedentes de que el tamaño del hospedero influencia la aptitud de un parasitoide y determina la disponibilidad de alimento para su progenie (Godfray, 1994). *P. coffea* deposita generalmente dos huevos sobre su hospedero y sus larvas se alimentan de los tejidos internos de la broca. La larva más pequeña (macho) se ubica en el pro-torax y la más grande (hembra) en el abdomen, donde se transforman a pupas (Castillo *et al.*, 2004). Por tanto, la discriminación del hospedero con base en su tamaño es importante para *P. coffea*, ya que reduce la competencia larval y aumenta la posibilidad de supervivencia de su progenie.

Los datos del primer experimento sobre la influencia del tamaño del hospedero no muestran una relación entre este factor y el tiempo que usó *P. coffea* para contactarlo. En el segundo experimento sí se observó una diferencia significativa ya que los parasitoides contactaron más frecuentemente a las esferas grandes que a las pequeñas. La diferencia entre ambos experimentos sugiere que la forma, además del tamaño, puede influenciar el comportamiento del parasitoide como se ha observado en otros insectos (Bernays y Chapman, 1995).

El color no afectó el tiempo usado por los parasitoides para contactar al hospedero, pero los colores oscuros fueron manipulados por mayor tiempo por *P. coffea*, lo que sugiere que el color sí influye en el proceso de reconocimiento. En otras especies de parasitoides se ha observado la importancia del color en la selección de un hospedero (Fischer *et al.*, 2004; Lobdell *et al.*, 2005). Sin embargo, es indispensable evaluar otros colores para entender mejor el significado biológico de los resultados encontrados en el presente trabajo.

Para la localización y reconocimiento de un hospedero, un parasitoide puede requerir estímulos químicos que pueden ser de largo o corto alcance o de contacto. Sin embargo, en el presente trabajo no hubo evidencias de que los parasitoides usen compuestos químicos provenientes de la broca para su reconocimiento. Rojas *et al.* (2006) tampoco observaron la atracción a larga distancia de *P. coffea* hacia compuestos volátiles liberados por los adultos de la broca del café. En contraste, *Cephalonomia stephanoderis* Betrem y *Prorops nasuta* Waterston, ectoparasitoides de larvas de la broca del café, son atraídos a larga y corta distancia hacia los estados inmaduros y adultos de dicho insecto (Felipe-Silvestre *et al.*, 2005; Chiu-Alvarado y Rojas, 2008; Chiu-Alvarado *et al.*, 2009). El uso de hidrocarburos cuticulares como estímulos para el reconocimiento de su hospedero se ha evidenciado en varias especies de parasitoides (Morehead y Feener,

For the location and recognition of a host, a parasitoid may use chemical cues at long or short range or by contact. A previous study has shown that *P. coffea* females were attracted to volatile compounds released by mechanically damaged and infested coffee berries, but not to uninfested ones. A mixture of dust and frass collected from infested berries were highly attractive to parasitoids, whereas immatures and adults of *H. hampei* isolated from infested berries were not attractive to *P. coffea* (Rojas *et al.*, 2006). In contrast, *Cephalonomia stephanoderis* Betrem and *Prorops nasuta* Waterston, ectoparasitoids of coffee berry larvae, were attracted at long and short distances to the immatures and adults of coffee borers (Felipe-Silvestre *et al.*, 2005; Chiu-Alvarado and Rojas, 2008; Chiu-Alvarado *et al.*, 2009). In the present study, our results seem to suggest that parasitoids do not use contact chemical compounds coming from the borer for its recognition. Several studies have shown that parasitoid species use cuticular hydrocarbons as cues for host recognition (e.g. Morehead and Feener, 2000; Muratori *et al.*, 2006). The analysis of the results of our study indicate the tendency that *P. coffea* females spent less time in handling hexane-washed borers in comparison to un-washed borers. Also, *P. coffea* can discriminate its primary host among various Scolitydae species, some of the same color and size of the coffee berry borer, which suggests the possibility that contact chemical cues may be involved in this discrimination (Castillo *et al.*, 2004). In this way, further studies are required to elucidate the role of the chemical cues during the recognition of the host by *P. coffea*.

CONCLUSIONS

Phymastichus coffea, an endoparasitoid of the coffee berry borer, uses its host size and color as cues for its recognition, while the movement of a coffee berry borer does not affect the behavior of the parasitoid. No evidence was found over possible chemical cues involved in the recognition of the host by *P. coffea*.

—End of the English versión—



2000; Muratori *et al.*, 2006). El análisis de los resultados del presente estudio indica que las hembras de *P. coffea* manipularon por menos tiempo a las brocas lavadas con hexano, en comparación con las brocas no lavadas. Adicionalmente, *P. coffea* puede discriminar a su principal hospedero entre varias especies de escolítidos, algunas del mismo color y tamaño de la broca,

lo que sugiere la posibilidad de que un estímulo químico pueda estar involucrado en esta discriminación (Castillo *et al.*, 2004). En este sentido, se requieren más estudios, para esclarecer la función del estímulo químico durante el reconocimiento del hospedero por *P. coffea*.

CONCLUSIONES

Phymastichus coffea, endoparásitoide de la broca del café, usa el tamaño y color de su hospedero como estímulos para su reconocimiento, mientras que el movimiento que posee una hembra de la broca no afecta el comportamiento del parasitoide. No se encontraron evidencias de posibles estímulos químicos involucrados en el reconocimiento del hospedero por *P. coffea*.

AGRADECIMIENTOS

A Enrique López Pascasio y Javier Valle Mora por el apoyo en la cría del material biológico usado en el presente estudio y por el análisis estadístico de los datos. Al CONACYT por el apoyo financiero al Proyecto de Investigación Básica SEP-CONACYT, No. 40338.

LITERATURA CITADA

- Bernays, E. A., and R. F. Chapman. 1995. Host-plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman and Hall, London. 312 p.
- Castillo, A., F. Infante, J. Vera-Graziano, and J. Trujillo. 2004. Host-discrimination by *Phymastichus coffea*, a parasitoid of the coffee berry borer. *BioControl* 49: 655-663.
- Cournoyer, M., and G. Boivin. 2005. Short distance cues used by the adult parasitoid *Microctonus hyperodae* Loan (Hymenoptera: Braconidae, Euphorinae) for host selection of a novel host *Listronotus oregonensis* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Insect Behav.* 18: 577-591.
- Chiu-Alvarado, P., and J. C. Rojas. 2008. Host location behaviour by two *Cephalonomia* spp. (Hymenoptera: Bethylinidae) wasps associated with the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Inter. J. Tropical Insect Sci.* 28: 179-184.
- Chiu-Alvarado, P., J. F. Barrera, and J. C. Rojas. 2009. Attraction of *Prorops nasuta*, a parasitoid of the coffee berry borer, to host-associated olfactory cues. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102: 166-171.
- Demas, F. A., E. N. Mwangi, A. Hassanali, and E. C. Kunjeku. 2002. Visual evaluation and recognition of hosts by the tick parasitoid, *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae). *J. Insect Behav.* 15: 477-494.
- Feldhege, M. R. 1992. Rearing techniques and aspects of biology of *Phymastichus coffea* (Hymenoptera: Eulophidae), a recently described endoparasitoid of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Café, Cacao, Thé* 31: 45-54.
- Felipe-Silvestre, J. M., J. Gomez, J. F. Barrera, y J. C. Rojas. 2005. Respuesta comportamental del parasitote *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethylinidae) a estímulos químicos de su huésped *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). *Vedalia* 12: 139-148.
- Fischer S., J. Samietz, F. L. Wäckers, and S. Dorn. 2004. Perception of chromatic cues during host location by the pupal parasitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environ. Entomol.* 33: 81-87.
- Godfray, H. C. J. 1994. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton University Press, Chichester, West Sussex, England. 473 p.
- Gutiérrez, A. P., A. Villacorta, J. R. Cure, and K. Ellis. 1998. Tritrophic analysis of the coffee (*Coffea arabica*)-coffee berry borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)]-parasitoid system. *Ann. Soc. Entomol. Bras.* 27: 357-385.
- Infante, F., S. T. Murphy, J. F. Barrera, J. Gómez, W. de la Rosa, y A. Damon. 1994. Cría de *Phymastichus coffea* parasitoide de la broca del café, y algunas notas sobre su historia de vida. *Southwest. Entomol.* 19: 313-315.
- Le Pelley, R. H. 1968. Las plagas del Café. Ed. Labor. Barcelona, España. Vol 2. 693 p.
- Lobdell, C. E., T. H. Yong, and M. P. Hoffmann. 2005. Host color preferences and short-range searching behavior of the egg parasitoid *Trichogramma ostrinia*. *Entomol. Exp. Appl.* 116: 127-134.
- Meyhöfer, R., J. Casas, and S. Dorn. 1997. Vibration-mediated interactions in a host-parasitoid system. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 264: 261-266.
- Morehead, S. A., and D. H. Feener Jr. 2000. Visual and chemical cues used in host location and acceptance by a dipteran parasitoid. *J. Insect Behav.* 13: 613-625.
- Muratori, F., A. Le Ralec, G. Lognay, and T. Hance. 2006. Epicuticular factors involved in host recognition for the aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphii*. *J. Chem. Ecol.* 32: 579-593.
- Murphy, S. T., and D. Moore. 1990. Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News Inf.* 11: 107-117.
- Norlund, D. A., R. L. Jones, and W. J. Lewis. 1981. Semiochemicals. Wiley & Sons, N. Y. 306 p.
- Rojas, J. C., A. Castillo, and A. Virgen. 2006. Chemical cues used in host selection by *Phymastichus coffea*, a parasitoid of the coffee berry borer adults, *Hypothenemus hampei*. *Biol. Control* 37: 141-147.
- Ryan, R. B., and J. A. Rudinsky. 1962. Biology and habits of the Douglas fir beetle parasite *Coeloides brunneri* Viereck (Hymenoptera, Braconidae), in western Oregon. *Can. Entomol.* 94: 748-763.
- Statsoft Inc. (2003). Statistica (data analysis software systems), Version 6. www.statsoft.com.
- Stireman III, J. O. 2002. Host location and selection cues in a generalist tachinid parasitoid. *Entomol. Exp. Appl.* 103: 23-34.
- Vinson, S. B. 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biol. Control* 11: 79-96.
- Weseloh, R. M. 1976. Behavioral responses of the parasite *Apanteles melanoscelus*, to gypsy moth silk. *Environ. Entomol.* 5: 1128-1132.