

UNIVERSIDAD CENTRAL “Marta Abreu” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Trabajo de Diploma

NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL
CONTROL DE LA BROCA DEL CAFETO
Hypothenemus hampei (F.)

FELIX HERNÁNDEZ VERA

Santa Clara

2014



UNIVERSIDAD CENTRAL "Marta Abreu" DE LAS VILLAS

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Centro de Investigaciones Agropecuarias



Trabajo de Diploma

**NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL
CONTROL DE LA BROCA DEL CAFETO**
Hypothenemus hampei (F.)



Diplomante: Felix Hernández Vera

Tutores: Dr. C. Edilberto Pozo Velázquez

Dr. C. Roberto Valdés Herrera

Santa Clara

2014

PENSAMIENTO

*“Si uno no puede explicar lo que ha estado haciendo,
su trabajo carece de valor”
Edwin Shrödinger.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

El autor de este Trabajo desea agradecer a todas las personas que brindaron su ayuda para hacer posible la culminación de este estudio.

A mis padres por guiarme por el buen camino.

A mis hijos y esposa por su amor, ayuda y comprensión.

A mis tutores, Doctores en Ciencias Agrícolas Edilberto Pozo Velázquez y Roberto Valdés Herrera por su amistad y los conocimientos aportados en la realización de este estudio.

A Marlen Cárdenas Morales, por su amistad, sus consejos siempre útiles y por brindarme su ayuda en todos los momentos.

A mis compañeros de estudio por el apoyo brindado.

A los profesores de la UCLV, por transmitirme sus conocimientos.

A todos, Muchas Gracias.

DEDICATORIA

*“A mi esposa e hijos, sin los cuales no puedo vivir.
A mi madre, por darme el derecho de nacer y
guiarme por el buen camino”.*

SÍNTESIS

SÍNTESIS

Con el objetivo de evaluar aislamientos de NEPs provenientes de zonas cafetaleras de Jibacoa como control biológico de *Hypothenemus hampei* (F.) en condiciones de campo se realizaron diversos experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) ubicado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en seis entidades de la Empresa Agropecuaria “Jibacoa”, municipio de Manicaragua, provincia de Villa Clara, ubicadas a una altura promedio de 350 m.s.n.m., durante los meses comprendidos entre noviembre del 2013 y mayo del 2014. Para ello se realizaron aislamiento de nematodos entomopatógenos en cafetales. Posteriormente fueron determinadas las concentraciones letales de nematodos entomopatógenos para el control de *H. hampei* y evaluaron los NEPs en condiciones de campo. Se aislaron las cepas de nematodos entomopatógenos Pretiles-1, Pretiles-2 y Petriles-3 de la región cafetalera de Jibacoa, Villa Clara. La CL₅₀ obtenida con la cepa de NEPs Petriles-3 fue de 419 nematodos y el costo de aplicación por hectárea es de \$ 140.35 MN. No es factible el empleo de la cepa Pretiles-1 en el control de *H. hampei* porque el costo de la aplicación es de \$2062.60 MN. El tratamiento con NEPs fue efectivo en el control de la Broca, la eficacia obtenida en la primera aplicación fue del 66% mientras que con dos aplicaciones sucesivas se alcanzó el 80 %.

Palabras Clave: *Hypothenemus hampei*, *Heterhorhabditis indica*, control

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Antecedentes de <i>H. hampei</i> y su distribución actual	4
2.2 Biología y hábitos del insecto	5
2.3 Afectaciones económicas	7
2.4 Integración de métodos de control	8
2.5 Nematodos Entomopatógenos	9
2.5.1 Generalidades de los nematodos entomopatógenos	9
2.5.2 Ciclo de vida y aspectos bioecológicos	10
2.5.3 Búsqueda y Penetración	11
2.5.4 Proceso de infección	12
2.5.5 Asociación Mutualista Nematodo- Bacteria	12
2.5.6 Rango de hospedantes	13
2.5.7 Aislamiento de nematodos entomopatógenos	13
2.5.8 Multiplicación de los NEPs	14
a) Reproducción Masiva <i>in vitro</i> .	14
b) Reproducción Masiva <i>in vivo</i>	15
2.5.9 Efectividad y Estrategias de aplicación en plagas agrícolas	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos en cafetales	17
2.2 Concentraciones letales de nematodos entomopatógenos para el control de <i>H. hampei</i> .	19
2.3 Evaluación de los NEPs en condiciones de campo	20
Análisis Estadísticos	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos en cafetales	22
3.2 Concentraciones letales medias de nematodos entomopatógenos para el control de <i>H. hampei</i> .	25
3.3 Evaluación de los NEPs en condiciones de campo	28
CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Hypothenemus hampei Ferrari (Coleóptera: Curculionidae, Scolytinae) (la broca del café) constituye uno de los mayores problemas en la caficultura a nivel mundial, debido a que provoca pérdidas que sobrepasan el 50% de las producciones del grano (Ramírez y Mora, 2001); aunque Cuba (2012) refiere que es la plaga insectil de mayor importancia en las plantaciones de café. Tanto la hembra adulta como sus larvas ocasionan severos daños en los frutos por lo cual se encuentran registros con un 90 % de frutos atacados en las plantaciones.

La broca del café está presente en numerosos países del continente Americano aunque fue reportada en cafetales del oriente cubano en la década de los 90' (INSV, 2005). Durante muchos años la medida de control más utilizada fue la aplicación de insecticidas, utilizando para ello los piretroides y los organofosforados; que son productos muy eficaces en el control de insectos plagas (CENIAP, 1988 y Cuba, 2006). No obstante, la aplicación de una sola estrategia de control no ha sido eficaz en la disminución de las poblaciones de *H. hampei*, motivo por el cual, en vista de aprender a convivir con la broca, se habla de Manejo Integrado de Plagas, donde se mencionan los agentes biológicos. El conjunto de varios métodos de control, bien aprovechados, provocan que se obtengan mejores resultados en la lucha contra este insecto.

El control biológico fue concebido a inicios del siglo XIX cuando algunos naturistas reseñaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza. Con el empleo de este medio de control se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos beneficiosos, para eliminar o reducir los daños causados por los perjudiciales (Badii y Abreu, 2006).

Dentro de los agentes biológicos, los nematodos entomopatógenos han resultado ser una opción ambientalmente segura y eficiente en el control de insectos plagas,

fundamentalmente de aquellos que habitan o pasan parte de su ciclo biológico en el suelo o en ambientes protegidos como túneles y galerías (Begley, 1990).

Según Lara *et al.* (2004) el uso de nematodos entomopatógenos demostró ser efectivo en la reducción de poblaciones de brocas presentes en los frutos del suelo. Los nematodos entomopatógenos tienen la capacidad de penetrar por los orificios de los frutos brocados, causarle la muerte y multiplicarse en los estados de la broca que hay dentro de dichos frutos.

Por ello, si se tiene en cuenta estos antecedentes y que hasta el momento han sido insuficientes los estudios relacionados con la evaluación de nematodos entomopatógenos (NEPs) para el control de *H. hampei* en nuestro país, resulta necesario acometer estudios dirigidos a conocer el efecto de estos biorreguladores frente a esta plaga insectil que afecta de manera notable al cultivo del café y por tanto, a la economía del país. Por ello nos formulamos la siguiente hipótesis de trabajo:

- **Hipótesis**

El uso de nematodos entomopatógenos aislados de las zonas cafetaleras de Jibacoa, Villa Clara pudieran ser una alternativa eficiente en el control de poblaciones de *Hypothenemus hampei* (F.) presentes en el suelo, lo cual contribuiría a mitigar el impacto de esta plaga en los cafetales en esta zona.

Para dar cumplimiento a la hipótesis se trazó el siguiente objetivo general:

- **Objetivo General:**

Evaluar aislamientos de nematodos entomopatógenos provenientes de zonas cafetaleras de Jibacoa como control biológico de *Hypothenemus hampei* (F.) en condiciones de campo.

- **Objetivos específicos**

1. Obtener aislados de nematodos entomopatógenos provenientes de zonas cafetaleras de Jibacoa, Villa Clara.
2. Determinar las concentraciones letales medias de los aislados de nematodos entomopatógenos sobre *Hypothenemus hampei* (F.).
3. Determinar la eficacia biológica de los nematodos entomopatógenos como control biológico de *Hypothenemus hampei* (F.) en condiciones de campo.

*REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA*

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El cafeto (*Coffea* spp.) de la familia *Rubiaceae* es una planta de gran importancia económica en Cuba que se cultiva tradicionalmente en los cuatro sistemas montañosos: Sierra Maestra, Sagua - Nipe - Baracoa, Escambray y Guaniguanico, que abarcan ocho provincias y 40 municipios. En estos sistemas se siembran las variedades pertenecientes a *C. arabica* (Típica, Caturra, Catuay y Villalobos) y en los últimos años se ha introducido de *C. canephora* la variedad Robusta, además de los Catimores. Según Vázquez (2003) existe una estrategia de composición varietal y se conocen las mejores para cada región del país.

Los problemas fitosanitarios tienen una incidencia significativa en la producción y los rendimientos del cultivo son característicos para las distintas regiones del país. Las enfermedades causadas por hongos, insectos, nematodos y las malezas, constituyen los grupos de organismos nocivos que mayores pérdidas ocasionan. (Vázquez, 1993)

2.1 Antecedentes de *H. hampei* y su distribución actual

Según Le Pelley (1973) este pequeño escarabajo es la plaga más notoria en algunas de las más importantes áreas de producción de café en el mundo. La broca del cafeto ha causado enormes pérdidas en varios países del África Central, donde es endémico y en países en los que ha sido introducido, principalmente Indonesia y Malasia. En Brasil, con sus grandes producciones de café, ha causado pérdidas incalculables pero en sentido general, sigue siendo una de las plagas primarias más graves de dicho cultivo.

El insecto fue descrito originariamente por Ferrari en 1867 a partir de especímenes recibidos con un café elaborado, pero no hay testimonios, aparentemente de su presencia en el campo hasta 1901, año en el que fue citado en Gabón. Poco después (1902 a 1904) fue reportado en Oubangi-Charin y Tchad, territorios

franceses por aquel entonces, en el Congo en 1903. En Uganda se describieron algunos ataques importantes en 1908 y 1909. Después de lo cual las referencias empiezan a ser numerosas. La broca se introdujo en Java en 1909 y en Tahití aparece por primera vez en 1963, sin reportarse en las restantes Islas de la Polinesia francesa (Le Pelley, 1973). En 1913 llega a América manifestándose en Brasil. Haití, República Dominicana y Cuba reportaron la presencia de la misma en 1995. (INISAV, 2005)

2.2 Biología y hábitos del insecto

La broca del cafeto es un coleóptero muy pequeño de aproximadamente 1,8 mm de largo y 0,8 mm de ancho, de color negro y apariencia similar a los gorgojos, con metamorfosis completa (huevo, larva, pupa, adulto). Este insecto presenta la siguiente posición taxonómica:

Clase: *Insecta*

Orden: *Coleoptera*

Suborden: *Polyphaga*

Familia: *Curculionidae*

Subfamilia: *Scolytidae*

Género: *Hypothenemus*

Especie: *Hypothenemus hampei* Ferrari (1867)

Las hembras de la broca del café penetran en el interior de la cereza por un punto de la cicatriz floral, haciendo una galería a través del mucílago, pergamino y semilla, en cuyo interior pone sus huevecillos cuando los granos han alcanzado suficiente desarrollo, aproximadamente 120 días después de ocurrir la floración. Al cabo de 5 a

9 días emergen las larvas blanco-amarillentas, que empupan de 15 a 19 días más tarde en el interior de la cereza. Posteriormente, a los 5 - 9 días, salen los adultos jóvenes. El número de mudas larvarias es de una para los machos y dos para las hembras. Las larvas destruyen los frutos con su actividad masticadora. (MINAGRI, 2005)

Los huevos de 0,5 a 0,8 mm de largo y 0,2 mm de ancho son globosos, de color blanco al principio y después amarillento, las larvas son apodas, de color blanco, de 0,7 a 2,2 mm de largo y de 0,2 a 0,6 mm de ancho, provistas de mandíbulas y cubiertas de setas blancas, las pupas de 0,5 a 1,9 mm de largo y 0,6 mm de ancho. La vida media de un adulto hembra es de 156 días y la del macho es de 103 días. Los machos son de menor tamaño 1,1 mm aproximadamente, tienen alas atrofiadas, no pueden volar y raramente se encuentran fuera del grano. Las hembras quedan fecundadas aún sin melanizarse y ponen 30 huevecillos como promedio, pero se han contado 60 y más de una sola hembra. (CNRFM, 2007)

Cada hembra puede atacar varios frutos tiernos en busca del idóneo para establecerse. Los machos, fecundan a las hembras antes que éstas abandonen el grano y en condiciones favorables, pueden desarrollarse hasta siete generaciones a partir de la misma hembra. En dependencia del estado de madurez estas abandonan la cereza donde se han desarrollado y de ahí emprenden el vuelo, que ordinariamente hacen en horas avanzadas de la tarde, próximo al oscurecer. El vuelo más largo que se ha podido medir de forma experimental, fue de 346 m, por lo que su diseminación a distancias mayores está relacionada con factores antropogénicos. (MINAGRI, 2008)

La broca del café ha sido clasificada como plaga monófaga, cuyos únicos hospedantes pertenecen al género *Coffea*. Sin embargo, también se mencionan algunos hospedantes complementarios de los géneros *Tephrosia* sp., *Crotolaria* sp., *Centrosema* sp., *Caesalpinia* sp, *Leucaena* sp., *Hibiscus* sp, *Rubus* sp, *Cajanus* sp.,

Phaseolus sp., *Arachis* sp., *Ricinus* sp, *Gossipium* sp. e *Inga* sp, cuyos frutos son atacados por brocas adultas, no obstante en estos frutos *H. hampei* no se reproduce. La broca no tiene hospedero alternativo para completar su ciclo de vida. (Urbina, 1986; Johanneson y Mansingh, 1984; citados por Feliz, 2002)

La etapa de post-cosecha, es en la que las poblaciones de *H. hampei* sobreviven dentro de las cerezas que cayeron al suelo durante la cosecha, así se convierten en fuente de infestación para la recolección siguiente. (Vázquez *et al.*, 2005)

Pierre (2008) afirma que al finalizar la cosecha, cuando el número de frutos escasea, pueden encontrarse más de 50 individuos en un solo fruto, fundamentalmente en los maduros y secos. También cuando son elevados los índices de infestación de la plaga pueden encontrarse dos o más perforaciones por fruto.

Las cerezas de café muestran generalmente una sola perforación. Al abrir la cerezas, en las galerías que realiza el insecto, se pueden encontrar todas las fases del mismo en diferentes estadios de desarrollo y cantidades variables, que dependen en gran medida, de la intensidad de la plaga y el número de frutos aptos existentes. (CNRFM, 2007)

2.3 Afectaciones económicas

Según Bustillo (2005), *H. hampei* es considerada la plaga de mayor importancia económica por los daños que ocasiona directamente al fruto y el costo de las medidas de control que es necesario aplicar para evitar pérdidas severas, ya que daña frutos jóvenes y viejos, aunque prefiere las cerezas de aproximadamente 120 días de edad en adelante, hasta los maduros.

Por otra parte Cintrón y Grillo (2006), expresan que aunque el insecto no se reproduce en los frutos tiernos, si puede causar daños considerables en éstos, reportándose en algunos países pérdidas significativas, ya que provoca la caída de los frutos al suelo antes de madurar y es capaz de multiplicarse en la semilla cuando

el endospermo comienza a endurecerse hasta que el fruto está maduro, en los sobremaduros; manteniéndose en éstos, en los secos que permanecen en la planta y los que caen al suelo.

Los granos carcomidos constituyen una pérdida directa, puesto que no pasan la inspección que se hace a la plantación y si lo hacen, son eliminados en la prueba final, en la cual se escoge y clasifica el café o van a parar a las clases peores. (MINAGRI, 2005)

2.4 Integración de métodos de control

El control de la broca del café según Bustillo *et al.* (1998). Debe ser enfocado a través de un manejo integrado, pero para que este sea eficiente económica y ecológicamente, deben de comprenderse a fondo todos los factores que componen el ecosistema cafetalero y sus múltiples interacciones, para esto es imprescindible, conocer la fenología del cultivo en las diferentes zonas, especialmente lo relacionado con las épocas de floración y por tanto la edad de los frutos a la cual son susceptibles para ser atacados por la broca.

Rodríguez *et al.* Evaluaron el efecto de liberaciones de *Cephalonomia stephanoderis* Bertem y aplicaciones de *H. bacteriophora* cepa HC1 en parcelas de cafeto, donde el Índice de Infestación por broca de café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) disminuyó a 1,5% en los campos tratados con ambos biorreguladores.

El control de la broca del Café detalla Cintrón y Grillo (2006), que debe enmarcase dentro de una estrategia general de manejo integrado de plagas: sobre la base de un manejo agronómico del cultivo, donde se integren las medidas del control manual, etológico, biológico y químico que estén disponibles en una realidad determinada.

El control de la broca se realiza mediante un programa de manejo integrado (MIB) que comprende varias tácticas y opciones de control, según Pierre (2008):

- El control cultural: incluye la cosecha sanitaria, el registro de floraciones, el corte de frutos prematuros y el manejo agronómico.
- El control biológico: se basado en la liberación en los cafetales, de diferentes especies de parasitoides y la aplicación de hongos entomopatógenos.
- El control etológico o trampeo: se realiza utilizando trampas cebadas con atrayentes (Kairomonas) para capturar las hembras colonizadoras.
- El control químico: realizando aplicaciones de insecticida pero como último recurso, cuando los otros métodos no han dado resultados adecuados.
- Control Genético: Schuller (2005) considera esta como otra vía para el control efectivo de esta plaga cuando expresa, que existen características genéticas de cultivares de café que pueden ser aprovechadas en el marco de una estrategia de Manejo Integrado de Plagas como son: plantas con mayor uniformidad de floración que permitirían concentrar la cosecha e introducir un período más largo de descanso, lo que desfavorece el desarrollo de la broca. Otra es la utilización de algunos cultivares de *Coffea canephora* los cuales han mostrado mayor susceptibilidad en pruebas de brocamiento en condiciones de laboratorios, y podrían ser utilizadas como plantas trampa.

2.5 Nematodos Entomopatógenos

2.5.1 Generalidades de los nematodos entomopatógenos

Según Woodring and Kaya (1988) y Elher (1998) la clasificación taxonómica de los nematodos entomopatógenos los ubica en el Orden *Rhabditida* Suborden: *Rhabditina* Superfamilia *Rhabditoidea*; a esta superfamilia pertenecen las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* (Rosales et al., 1999) encontrándose en asociación simbiótica con bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los nematodos entomopatógenos infestan selectivamente muchos insectos y otros pequeños artrópodos, son inocuos al hombre, los mamíferos y las plantas. La relativa rapidez con que causan la muerte a los insectos hospedantes (24-48 horas) y la alta

variabilidad de su acción ha despertado gran interés en el control biológico como agente en el manejo integrado de plagas (Woodring and Kaya, 1988 y Certis, 2003).

Las características más relevantes que han propiciado que los nematodos sean atractivos como agentes biocontroladores son las siguientes:

- a) Poseen un amplio rango de hospedantes. (Morris, 1985; Doucet y Giayetto, 1994; Stock, 2004)
- b) Son fácilmente aplicables con los equipos estándar (Georgis, 1990; Li *et al.*, 1991; Rosales *et al.*, 1999; Valdés, 2003).
- c) Es factible la selección genética de los mismos. (Gaugler 1987; Glazer *et al.*, 1997)
- d) Son compatibles con muchos insecticidas químicos (Hara y Kaya, 1993) y con otros agentes biorreguladores. (Barbercheck y Kaya, 1991; Gothama *et al.*, 1995; Rosales *et al.*, 1999)
- e) Son ambientalmente seguros tanto para las plantas y vertebrados, como para otros organismos. (Akhurst, 1990; Georgis y Hague 1991; Bathon, 1996; Boemare *et al.*, 1996; Ehler, 1998)

2.5.2 Ciclo de vida y aspectos bioecológicos

Tanto la familia *Steinernematidae* como *Heterorhabditidae* tienen un ciclo de vida similar y simple que incluye el huevo, cuatro fases juveniles: J₁, J₂, J₃ y J₄ (separadas por mudas) y el adulto. La fase infestiva es el estado juvenil J₃, el cual posee la región cefálica con armadura, a manera de diente dorso lateral o subventral y tiene células vivas de su bacteria simbiote en el intestino, las que lleva de hospedante a hospedante. Los infestivos juveniles (ijs) generalmente son envainados dentro de la cutícula del J₂ que no se desprendió de la misma al pasar al ij₃, pero está separado e intacto de esta segunda pared. Esta extracutícula le confiere gran resistencia a las

condiciones medioambientales desfavorables, aunque la fisiología de estos le otorga resistencia. (Woodring and Kaya, 1988)

Los infestivos juveniles son los únicos de vida libre fuera del hospedante que tienen la capacidad para moverse de un insecto a otro. Ellos contienen reservas de energía en carbohidratos, no se alimentan y pueden sobrevivir más de ocho meses cuando las condiciones son favorables (humedad, temperatura apropiada y oxígeno disponible). (Woodring and Kaya, 1988)

El ciclo descrito requiere de 10 a 14 días para *Sterneinerma feltiae* en los últimos instares de *Galleria mellonella* L. Lepidóptera: Pyralidae En pequeños insectos solo obtienen una generación. El ciclo de vida de *Heterorhabditis* es esencialmente igual al de *Steinernema* aunque requiere menor cantidad de días para cumplimentar el mismo. (Woodring and Kaya, 1988)

2.5.3 Búsqueda y Penetración

Estos nematodos poseen dos estrategias básicas para encontrar al hospedante (Kaya y Gaugler, 1993; Lewis *et al.*, 1993). Algunas especies manifiestan el tipo de “espera pasiva” (ambusher) en la que los individuos permanecen cerca o en la superficie del suelo e infestan a los insectos móviles que se alimentan en la interfase del suelo y los que tienen una estrategia de “búsqueda activa” (cruiser) como ocurre en *H. bacteriophora* que tienden a ser muy móviles y responden a las emanaciones químicas de los hospedantes, infestando fundamentalmente a los insectos menos móviles.

Los nematodos penetran en el hospedante por las aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) y en el caso de *Heterorhabditis* también puede penetrar directamente a través del tegumento intersegmental. (Beeding y Molineux, 1982)

2.5.4 Proceso de infección

Una vez que el nematodo se instala en el hemocele, libera las células de la bacteria a través del ano, las que proliferan y matan al insecto a partir de las primeras 24 h, modificando los tejidos y creando condiciones para permitir que continúe su desarrollo. El ij_3 se alimenta tanto de los tejidos semidegradados como de las propias células bacterianas. Rápidamente ocurre el paso al cuarto estadio los que darán origen a adultos hermafroditas (*Heterorhabditis*) o machos y hembras (*Steinernema*). Una o más generaciones anfimicticas pueden ocurrir en el hospedante hasta que escasee el alimento, momento en que los juveniles infestivos abandonan el cadáver y buscan de un nuevo insecto. (Poinar, 1990; Kaya *et al.*, 1993)

2.5.5 Asociación Mutualista Nematodo- Bacteria

La interrelación entre el nematodo y la bacteria se considera simbiótica porque el nematodo no se puede reproducir dentro del hospedante sin la acción de la bacteria y esta no puede penetrar a la hemolinfa del insecto para reproducirse y causar la infección si el nematodo no la transporta. (Kondo e Ishibashi, 1991; Georgis, 1992)

En la simbiosis, el nematodo posibilita la protección de la bacteria no solo de los cambios ambientales sino incluso, es capaz de destruir el sistema inmune del insecto con la producción de toxinas extracelulares que garanticen el desarrollo bacteriano (Akhurst y Boemare, 1990). Además facilita el transporte de la bacteria desde un cadáver a otro organismo hospedante.

Estos géneros de bacterias producen antibióticos como característica primordial para la actividad biológica puesto que representa un mecanismo de minimización de la competencia con otros organismos por los nutrientes, lo cual ha de garantizar al nematodo su máximo potencial de reproducción (Richardson *et al.*, 1988 citados por Evans, 2004). Además son notoriamente proteolíticas, como se ha de esperar para organismos que viven en medios altamente enriquecidos con proteínas tal como es

la hemolinfa de los insectos. Las proteasas ayudan a degradar los tejidos hemolinfáticos y hacerlos asequibles al nematodo, pero también se ha determinado que juegan un importante papel en la inactivación del sistema de defensa de los insectos al igual que las quitinasas. (Chen *et al.*, 1996)

2.5.6 Rango de hospedantes

Más de 1000 especies de insectos pertenecientes a los órdenes *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Orthoptera*, *Isoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera* y *Hemiptera*, entre otros, han resultado ser hospedantes de los nematodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio y campo (Poinar, 1990; Doucet y Giayetto, 1994; Alatorre y Hernández, 2000).

2.5.7 Aislamiento de nematodos entomopatógenos

Según Quintero (2003) desde 1929, en diferentes partes del mundo se han registrado aislamientos de especies y cepas de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*. Estos nematodos entomopatógenos, han sido aislados de insectos del suelo y de insectos infestados (Poinar, 1990). Bedding y Akhurst (1975) desarrollaron el método para recuperar nematodos parásitos de insectos de muestras de suelo, mediante la utilización de larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae). Los resultados de extensas investigaciones utilizando éste método, han demostrado que están ampliamente distribuidos y son comunes en todos los continentes (Poinar, 1990), incluso en el desierto. Aunque, parecen estar extremadamente agrupados dentro de algunos sitios. (Cambell *et al.*, 1996)

En América Latina y el Caribe diversos estudios han contribuido significativamente a la taxonomía y descubrimiento de nematodos entomopatógenos, incluyendo nuevas especies de *Steinernema* y *Heterorhabditis*, que han sido recuperados de insectos plagas y de muestras de suelos (Georgis y Hom, 1992).

Para verificar la existencia de nematodos entomopatógenos, la recolección de las muestras en suelo se debe de realizar por el método de Poch, para lo cual se selecciona dentro de cada cultivo de uno a tres sitios, y en cada uno de ellos debe recolectarse tres muestras de suelo de aproximadamente 1 kg, en donde las sub-muestras al azar se obtienen a una profundidad entre 10-20 cm, cubriendo un área de aproximadamente 20 m². Los sitios deben de estar al menos 100 m de separado (Stock *et al.* 1999). En los cultivos perennes las muestras deben tomarse a 30-90 cm de la base del tronco de la planta, abarcando un área de 100 m². Cada muestra de suelo que se tome hay que limpiar la pala de jardinería con agua y esperar que la misma se seque al aire.

Con la finalidad de detectar la presencia de los nematodos entomopatógenos, las muestras de suelo se tamizan y después se colocan 300 g de la misma en un recipiente de 500 mL, humedeciendo la muestra obtenida. En cada recipiente se agregan cinco larvas del último estadio de *G. mellonella*, y posteriormente se tapan e invierten durante siete días (Stock *et al.*, 1999). Woodring y Kaya (1988) expresan que los cadáveres de las larvas deben de ser recuperados después del tiempo de incubación y ser lavados con agua destilada estéril, desinfectándose superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 30 segundos. Posteriormente, para recolectar los juveniles infestivos los cadáveres se colocan trampas de “White” por una semana hasta que los juveniles infestivos emerjan y migren al agua.

2.5.8 Multiplicación de los NEPs

a) Reproducción Masiva *in vitro*.

En la década del 40, Glazer y sus colaboradores fueron los primeros en establecer el cultivo axénico (a partir de *Steinernema* sp.), pues en aquel momento se desconocía el importante papel que desempeña la bacteria simbiótica presente en los infestivos juveniles. El cultivo monoxénico (bacteria y nematodo) se ha desarrollado a partir de

la década de los años 60, utilizándose tanto la fermentación en sustrato líquido como sólido (Friedman, 1990).

Los nematodos del genero *Heterorhabditis* no han podido ser eficientemente producidos mediante la fermentación líquida, debido fundamentalmente a requerimientos de aireación, a la gran sensibilidad de los nematodos al proceso, así como a la interacción nematodo-bacteria, que afecta la producción de estadios infestivos viables. Sin embargo, la adecuación de un medio de cultivo sólido a base de proteínas y grasas, y la inclusión de matrices para proveer oxígeno y permitir movilidad es capaz de garantizar la reproducción optima de *Heterorhabditis* spp. (Hominick y Reid, 1990 citado por Sánchez, 2002)

Una amplia variedad de componentes ha sido empleada para suplir las necesidades del complejo nematodo-bacteria, los que comprenden entre otros, vísceras de aves y mamíferos, aceite de maíz, levadura, colesterol, soya, grasa de origen animal y yema

b) Reproducción Masiva in vivo

En este tipo de reproducción se utiliza a los insectos como pequeños reactores biológicos y generalmente se emplean para la reproducción de los mismos a las larvas de *Galleria mellonella* L., lepidóptero conocido como polilla de la cera o de los apiarios, debido a su disponibilidad comercial (Woodring y Kaya, 1988). Tanto el inóculo como el producto del proceso son los estadios juveniles.

Generaciones de nematodos se desarrollan dentro del cuerpo de las larvas del insecto a temperaturas entre 20 y 25 °C, durante unos 10 días y posteriormente son colectados empleando las denominadas "Trampas White". (Woodring y Kaya, 1988)

2.5.9 Efectividad y Estrategias de aplicación en plagas agrícolas

Los nematodos entomopatógenos son compatibles con algunos insecticidas clorinados, carbamatos y órgano fosforados en solución acuosa (Kaya, 1985).

Ciertos funguicidas, acaricidas, insecticidas y herbicidas no afectan o tienen poco efecto sobre los infestivos juveniles por lo que potencialmente es factible su aplicación combinada, como lo demuestran los resultados de varios autores. (Rovesti *et al.*, 1989; Zimmerman y Cranshaw, 1990; Desagro, 2000 y Head *et al.*, 2000)

En cuanto a los medios biológicos Kaya y Burlando (1989) descubrieron que *Bacillus thuringiensis* (Bt) también puede ser combinado con los nematodos entomopatógenos, ellos observaron que los infestivos juveniles de *Steinernema carpocapsae* penetraron igualmente insectos infestados por Bt que los sanos, pero los primeros murieron más rápido.

En diversos experimentos de campo se han controlado muchas plagas con éxito, entre las que se encuentran *Cylas formicarius* L. (Tetuán del boniato) (Jansson, 1991); *Cosmopolites sordidus* (Germ.) (Picudo negro del platano); *Pachnaeus litus* (Germ.) (Picudo verde –azul de los cítricos) (Georgis y Hague, 1991); *Plutella xillostela* L. (polilla de la col); *Spodoptera frugiperda* (Smith) (palomilla del maíz) y *Heliothis virescens* F. (cogollero del tabaco). (Marrero, 2003)

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) ubicado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en seis entidades de la Empresa Agropecuaria “Jibacoa”, municipio de Manicaragua, provincia de Villa Clara, ubicadas a una altura promedio de 350 m.s.n.m., durante los meses comprendidos entre noviembre del 2013 y mayo del 2014, en plantaciones de *Coffea arábica* L.

2.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos en cafetales

Para obtener aislados de NEPs se realizaron muestreos en diversos cafetales de las seis entidades pertenecientes a la Empresa Agropecuaria. Las muestras de suelo (45 muestras tomadas en 14 fincas de productores) fueron tomadas a tres profundidades (5, 10 y 15 cm de profundidad), conformándose cada una por muestras compuestas de varios puntos del cafetal, hasta completar 1 kg de suelo. Posteriormente, en el laboratorio, se colocaron 5 larvas del quinto instar de *Galleria mellonella* L. en 300 g de suelo dentro de una placa de Petri de 15 cm de diámetro y después de humedecer el sustrato con agua destilada des-ionizada, fue invertida la placa durante 96 h. Las observaciones fueron realizadas cada 24 h, separando en las mismas las larvas que presentaron síntomas de infestación por NEPs.

Las larvas aisladas, previamente lavadas con agua y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % durante 30 segundos, se colocaron en trampa White o Puente a los 3 o 5 días después de muertas, según lo recomendado por Woodring and Kaya (1988).

Los juveniles infestivos (IJ₃) obtenidos en el agua de las trampas se inocularon en larvas de *G. mellonella* para realizar la prueba de re-infección siguiendo los postulados de Koch.

Para la reproducción de los NEPs se utilizaron placas Petri de 15 cm de diámetro con papel de filtro en el fondo de las mismas. En cada placa fueron colocadas 10

lavas del quinto instar de *G. mellonella* a las que se les inoculó NEPs con una concentración de 250 nematodos/mL de suspensión. Las placas fueron colocadas dentro de una bolsa plástica durante 12-15 días para mantener la humedad y posteriormente fueron colocados los cadáveres en trampa White para la cosecha de los IJ. Al emerger los NEPs fueron colocados en bandejas de aluminio con una película de agua inferior a los 2 cm para garantizar la vitalidad del nematodo.

Las soluciones de nematodos fueron preparadas por dilución horas antes del montaje del ensayo según lo orientado por Kaya y Stock (1997). Los conteos se realizaron bajo el microscopio-estereoscopio “Olympus” y se calcularon las concentraciones de nematodos mediante las fórmulas expuestas por Woodring y Kaya (1988),

$$S = N \times \frac{1}{M} \times (X + 1)$$

Dónde:

N= Número de nematodos observados por conteo bajo el microscopio. (Mínimo dos)

M= Número de mililitros en que se llevó a cabo el conteo.

X+1= Factor de dilución.

S= Concentración (nematodos/mL.) de la solución inicial.

Para realizar los ajustes en las concentraciones de NEPs se utilizó la siguiente fórmula según lo referido por Woodring y Kaya (1988):

$$A = \frac{D \times C}{B}$$

Dónde:

A= Mililitros de la suspensión de concentración conocida para ser diluida.

B= Número de nematodos/mL de la suspensión que va a ser diluida.

C= Volumen final que se necesita calcular.

D= número de nematodos por mL en la solución final.

Lo que se necesita calcular es el valor de C, y se obtiene por despeje.

2.2 Concentraciones letales de nematodos entomopatógenos para el control de *H. hampei*.

Con el objetivo de determinar las concentraciones letales de los nematodos entomopatógenos para el control de *H. hampei* en granos de café, se realizó un experimento empleando la cepa P₂M (perteneciente a la especie *Heterorhabditis indica* Poinar) y los aislados obtenidos. En el montaje del experimento se procedió a colocar cinco granos de café infestados por broca en placas de Petri de 6 cm de diámetro sobre un papel de filtro y posteriormente se adicionaron la suspensión de NEPs en las placas, una dosis por cada placa. Las dosis empleadas fueron 100, 500 y 1000 nematodos/mL siguiendo la metodología expuesta por Rosales y Suárez (1998) y Evans (2004). Para mantener la humedad en las placas, se adicionó diariamente 1 mL de agua destilada. Se contó con 15 réplicas por dosis de inoculación (5 granos por dosis) y un tratamiento control sin aplicación de nematodos.

Posteriormente, a las 72 horas se realizó la disección de los granos y fueron contados el número de insectos totales en el interior e insectos muertos mediante el uso de un microscopio estereoscopio.

2.3 Evaluación de los NEPs en condiciones de campo

El experimento se realizó en la Finca del productor Ivanovis Muñoz, Jibacoa, en un lote de café *C. arabica* de diez años de edad sembrado a 1 m entre planta por 2 m entre surco. En la finca se marcó una parcela experimental de 10 m × 10 m con 50 plantas de café. Previo a la aplicación se realizó un muestreo para determinar el porcentaje de infestación de broca en el suelo, este muestreo se efectuó tomando 5 puntos y evaluando 5 plantas de café por punto de muestreo para un total de 25 plantas, luego se recolectaron todos los granos existentes en el suelo en un radio de 0,50 m alrededor de cada planta de café a los que se les contó el total de broca presente dentro de los frutos.

Para las aplicaciones de NEPs se utilizó una mochila manual, marca Matabi, con tanque de 1000 mL de capacidad, con boquilla de cono hueco. Se seleccionaron 25 plantas a las que se les realizaron dos aplicaciones de 15 mL / planta, al suelo, en un radio de 0,5 m. En la primera aplicación se utilizó una dosis de 32 nematodos/mL, pasados tres y 10 días se muestrearon 5 plantas para determinar el porcentaje de mortalidad de la broca en los granos del suelo. A los 30 días se realizó la segunda aplicación con una dosis de 57 nematodos/mL, donde se procedió a evaluar la eficiencia biológica de los NEPs a los tres días después de la aplicación. Los granos brocados se trasladaron al laboratorio para determinar la mortalidad corregida de los insectos. El experimento contó de un testigo absoluto al que solo se le aplicó agua destilada des-ionizada.

Análisis Estadísticos

Todos los resultados obtenidos en los experimentos fueron analizados y procesados por programas y software soportado sobre Microsoft Windows XP Profesional ver. 2002 Service Pack 3. Los datos fueron ordenados y tabulados en el software Microsoft Office Excel 2003. Para el procesamiento estadístico se utilizaron los paquetes de programas STATGRAPHICS Centurión XV ver. 15.2.14 Edición Multilingüe y Statistix ver. 9 sus programas ANOVA. Se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis, Múltiple de Rangos y Duncan, con un nivel de confianza de un 95 % para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

En la determinación de las concentraciones letales los porcentajes de mortalidad de los insectos fueron sometidos al análisis Probit para estimar las dosis en la cual la población en el suelo de *H. hampei* fue reducida en un 50 % y 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos en cafetales

Como resultado del aislamiento de NEPs en los suelos de Jibacoa se obtuvieron tres muestras positivas a los 15 cm de profundidad para nematodos entomopatógenos (6,67 %) en suelos ferralítico rojo lixiviado típico (tabla 1). De cada muestra positiva se extrajeron los nematodos mediante el sistema de trampa “White” propuesto por Woodring and Kaya (1988). Estos resultados coinciden con Stock *et al.* (1999); Pozo *et al.* (2003); Stock y Reid (2004) y Castillo *et al.* (2010) en estudios realizados sobre aislamientos y caracterización de nematodos entomopatógenos cuando refieren que los mismos deben ser aislados a la profundidad antes mencionada.

Tabla 1. Fincas muestreadas en la Empresa Agropecuaria de Jibacoa

Nombre de la Finca	Nematodos entomopatógenos	Profundidad (cm)	Suelo
Ivanovis	-		Pardo sin carbonato típico
Manuel	-		Aluvial diferenciado
Matojo	-		Gleysoso
Genaro	-		Salonet diferenciado
Veguita	-		Salonet diferenciado
La nave	-		Pardo sin Carbonato típico
Pretilis	+++	15	Ferralítico rojo lixiviado típico
Herradura	-		Pardo sin Carbonato típico
Fermín	-		Ferralítico rojo lixiviado típico
Inoel	-		Ferralítico rojo lixiviado típico
Emilio	-		Ferralítico rojo lixiviado típico
Evelio	-		Ferralítico rojo lixiviado típico
El Algarrobo	-		Pardo sin Carbonato típico
La Guasima	-		Pardo sin Carbonato típico

Estudios realizados por Campos-Herrera *et al.* (2006) en la Rioja y Makete *et al.* (2005) en Ethiopia revelaron nematodos entomopatógenos en aproximadamente el 6 % del total de muestras analizadas, en regiones mucho mayores que Jibacoa, Villa

Clara. Los nematodos aislados del insecto muerto pueden ser parásitos o saprófitos y para discernir y encontrar el verdadero nematodo entomopatógeno fueron empleados los postulados de Koch (Poinar, 1975, citado por Woodring and Kaya, 1988). Cada aislado de nematodo provocó la muerte de las larvas de *G. mellonella* (100 % de las expuestas a la prueba) en 36 horas, lo que demostró que eran entomopatógenos. Los cadáveres insectiles adquirieron una coloración pardo-rojiza, color característico de los cuerpos infestados por NEPs representantes del género *Heterorhabditis*, lo que se tomó como evidencia para identificar el género de los mismos.

La obtención de estos aislados permiten contar con nuevos medios biológicos que apoyan el sistema de control biológico de plagas en esta región del país, pues presentan adaptabilidad ambiental a esta región por lo que sean más efectivos que los aislados y cepas de otras regiones y países del mundo. Por otro lado, estos resultados evidencian un nuevo aporte al estudio de la biodiversidad en Jibacoa y responde a la Cumbre de la Tierra de 1992 (Brasil, 1992).

A pesar de ser aislados los NEPs de un mismo campo y profundidad se nombraron por separado como Pretiles-01, Pretiles-02 y Pretiles-03, pues demostraron comportamientos desiguales en cuanto a la cantidad, durabilidad y viabilidad frente a larvas de *G. mellonella*. Estos resultados coinciden con Pozo *et al.* (2003) cuando refiere que aislados obtenidos en un mismo campo de sorgo y a una misma profundidad demostraron tener comportamientos diferentes entre ellos al controlar diversas especies de insectos.

De los lugares donde se tomaron las muestras en Pretiles, las positivas se encontraron cerca del río (figura 1), lo que coincide con resultados obtenidos por Castillo *et al.* (2010) cuando describen que las condiciones de humedad elevada en los suelos favorecen la supervivencia de los nematodos entomopatógenos.



Figura 1. Aislamiento de nematodos entomopatógenos en Pretiles.

Según Sánchez (2002) en campos de cafeto de Jibacoa no se hallaron NEPs resultado que no coincide con los obtenidos en el presente trabajo, pues al tomar las muestras en la región se tuvo en cuenta la cercanía a los espejos de agua y tres de las mismas fueron positivas. A pesar de ello, esta autora refiere que los aislados cubanos han sido obtenidos en plantaciones establecidas de cítricos, cafeto y guayabo, lo que puede guardar relación con la presencia en estos cultivos de abundantes insectos que poseen una fase de su desarrollo en el suelo, tales como el complejo de curculionidos, las moscas de la fruta y la broca del cafeto. Mracek *et al.* (1999) encontró una gran dependencia entre la presencia de nematodos entomopatógenos en el suelo y los cultivos con alta incidencia de insectos plagas, principalmente en árboles y arbustos.

En jibacoa no existen antecedentes acerca de la introducción de productos comerciales a base de nematodos entomopatógenos, por lo que podemos asegurar que los nematodos obtenidos resultan nuevos aislados que ocurren de forma natural en el sitio donde fueron colectados; estos constituyen importantes candidatos para la

selección de cepas a partir de las cuales es posible el desarrollo de un nuevo agente de control biológico.

Kaya and Gaugler (1993) refieren que es necesario caracterizar a los nematodos entomopatógenos en aspectos como la virulencia y la capacidad para buscar y matar a los hospedantes por las implicaciones que conlleva contar con nuevos medios biológicos que pueden emplearse en el mismo lugar.

Campos-Herrera *et al.* (2006) exponen que los aislamientos, identificación y estudios bioecológicos de algunos organismos que viven en el suelo, como los nematodos entomopatógenos, pueden proporcionar las bases para el desarrollo de nuevas tecnologías en el control de insectos plagas.

3.2 Concentraciones letales medias de nematodos entomopatógenos para el control de *H. hampei*.

Las curvas obtenidas al determinar las concentraciones letales medias (figura 2) indican una tendencia ascendente en la mortalidad de *H. hampei*, causada por el efecto que ejercen los NEPs evaluados, a medida que transcurre el tiempo. El mayor porcentaje de insectos muertos se obtuvo con la cepa Pretiles-2, donde se alcanzó el 88.9 % a una concentración de 1 000 JI por cada espécimen de broca. No obstante, esta cepa no se comportó de forma estable debido a que las concentraciones inferiores controlaron menos del 30 % de insectos y los valores obtenidos se encontraron disgregados, lo que demostró que se necesitan elevadas concentraciones de NEPs para realizar un control eficiente de *H. hampei*. El R^2 obtenido en el análisis de la cepa antes mencionada fue de 0.645, o sea, podemos asegurar que los NEPs realizaron un control de los adultos de broca pero existe la probabilidad de que algunos insectos murieran por otras causas en un 35.5%.

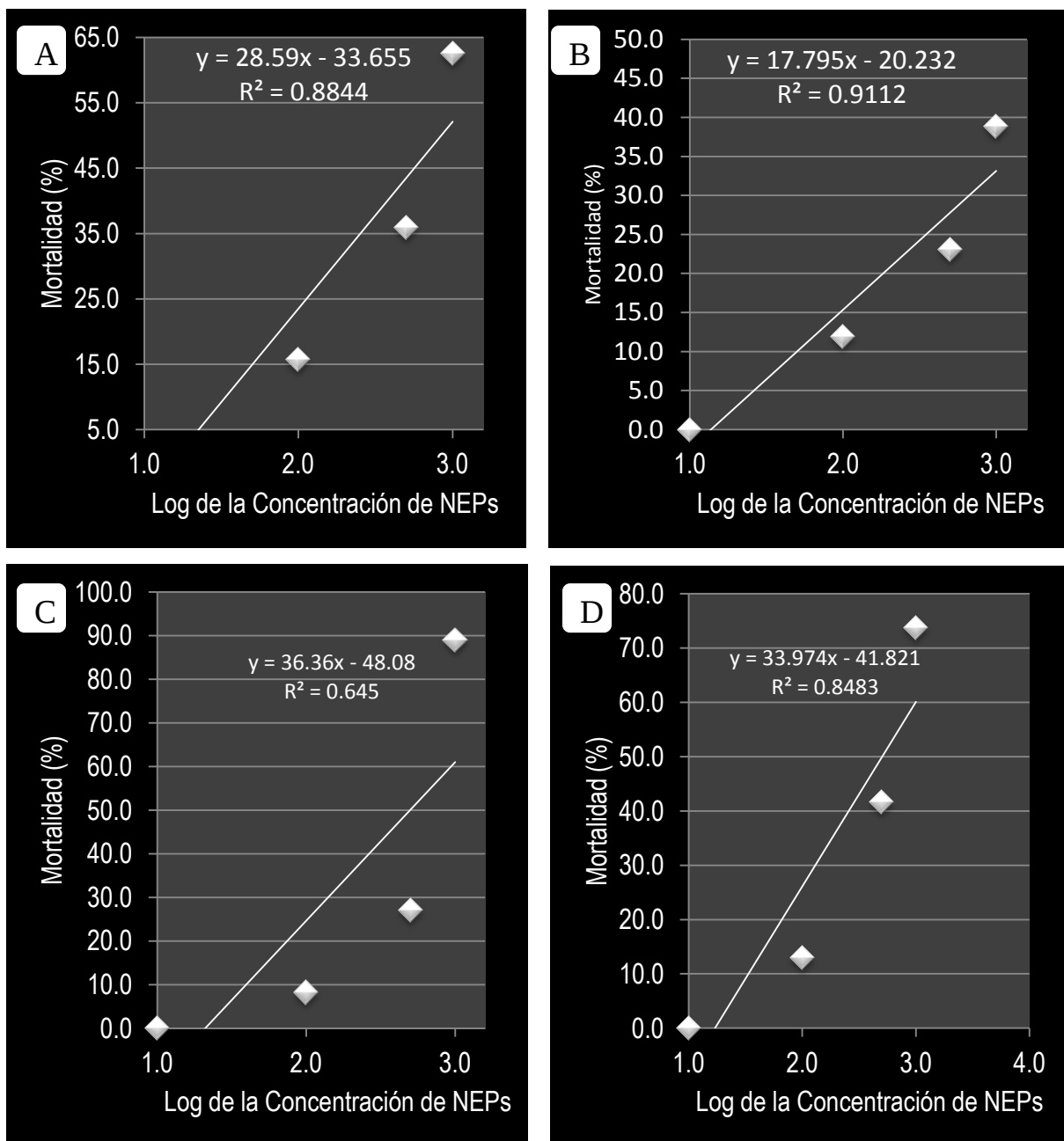


Figura 2. Curvas Sigmoides de las concentraciones de nematodos entomopatógenos en *H. hampei*. A) Cepa P₂M; B) Cepa Pretile-1; C) Cepa Pretiles-2; D) Cepa Pretiles-3

Los infestivos juveniles de la cepa Pretiles-1 nunca alcanzaron el 50 % de mortalidad de los insectos, lo que nos demuestra que todas las cepas aisladas en la localidad no son eficientes en el control de *H. hampei*.

Con la cepa P₂M, a pesar de ser la cepa foránea más utilizada por los productores en los campos cubanos donde se aplican este agente de control, solo se alcanzó el 62.5% de mortalidad a la concentración de 1000 nematodos/mL. La cepa Pretiles-3 obtuvo una mortalidad superior al 70 % con la concentración de nematodos antes mencionada.

Rosales y Suárez (1998) refieren que al escoger un nematodo entomopatógeno como un agente de control biológico, la agresividad, la concentración y la patogenicidad, son factores de decisión muy importantes. Por ello es preciso la búsqueda de nuevas especies y el conocimiento de sus características bioecológicas, siendo una de las principales la capacidad infectiva. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran una variabilidad entre las cepas y coinciden con estudios realizados en otros países (Bedding *et al.* 1983 citado por Doucet y Giayetto 1994; Rosales y Suárez, 1998).

Al comparar las cuatro cepas de nematodos entomopatógenos utilizadas se apreció que las de menores CL₅₀ fueron Pretiles-2, Pretiles-3 y P₂M pero Pretiles-1 no es económicamente factible al ser irrentable. De las cepas aisladas, Pretiles-3 fue estable en el control de los insectos y en las re-infestaciones sucesivas que se realizaron sobre *G. mellonella* se cosecharon más de 200 000 nematodos como promedio por cada larva, lo que demostró que puede ser utilizada como agente de control. Para el caso particular de Pretiles-1 las cosechas de IJ no se comportaron de forma similar (tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones Letales media CL₅₀ de las diferentes cepas de nematodos aplicados a broca dentro del grano de Café

Cepa	CL ₅₀	MM de nematodos/ha	Costos/ha (CUP)	Costo Ficha de Costo Nueva (CUP)
P ₂ M	650	43.55	217.75	99.29
Pretiles-1	6157	412.52	2062.60	940.55
Pretiles-2	325	21.78	108.90	49.66
Pretiles-3	419	28.07	140.35	64.00

Evans (2005) al comparar regresiones lineales de diversas cepas de NEPs obtuvo que 12 cepas evaluadas frente a diversos coleópteros, a pesar de tratarse de una misma especie, presentaran diversas DL_{50} y DL_{95} , lo que se debió a las características propias de cada aislado.

Estos resultados fueron obtenidos en el laboratorio, donde las condiciones son óptimas para la infección de los insectos por lo que al ser aplicadas en el campo, debido a la influencia de otros factores, los porcentajes de mortalidad tienden a disminuir y para evitar esto las dosis de aplicación deben ser más elevadas.

3.3 Evaluación de los NEPs en condiciones de campo

Al evaluar las Brocas en los granos de cafeto caídos (Figura 3) se apreció que tres días después de la aplicación de NEPs, se evaluaron 40 insectos vivos en el interior de los granos, existiendo diferencias significativas con el tratamiento control, donde fueron contabilizados 61 insectos como promedio (figura 4). Transcurridos 10 días de aplicados los NEPs, se evaluó un incremento en la cantidad de insectos vivos, no mostrando diferencias las plantas tratadas con el control pero esto estuvo dado por la re-infestación de los granos presentes en el suelo debido a que el número de frutos en las plantas disminuyó después de la cosecha.

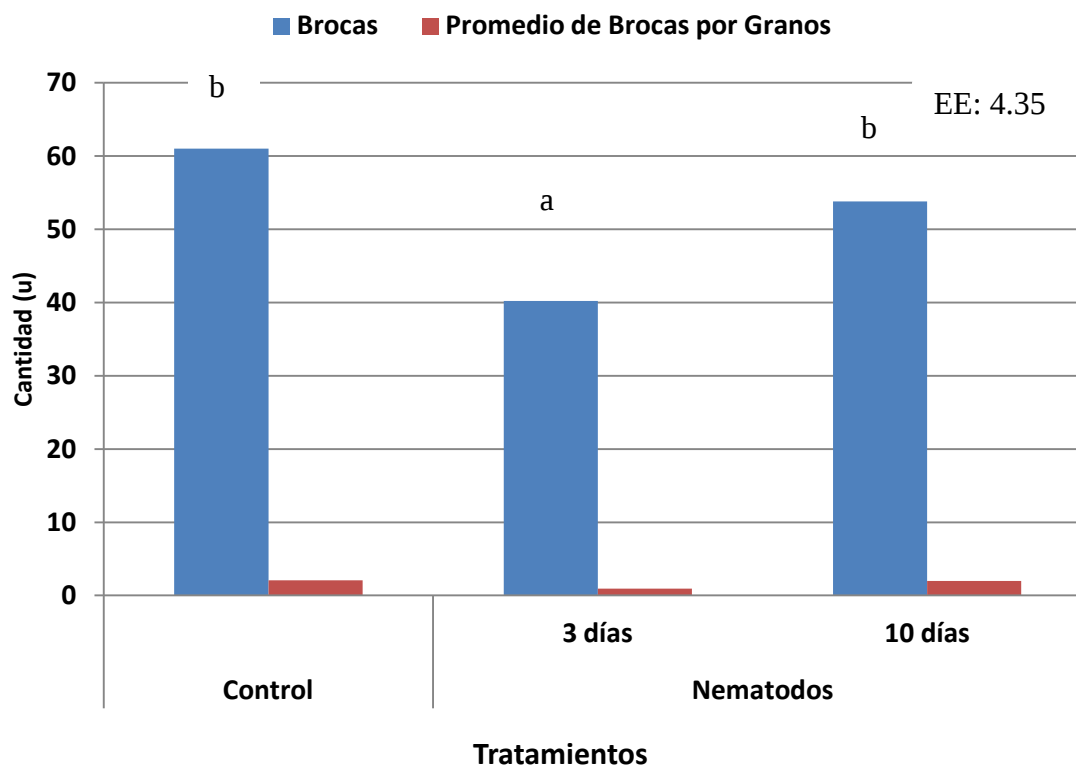


Figura 3. Promedio de insectos vivos en el interior de los granos de cafeto.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cintrón y Grillo (2006) cuando refieren que al finalizar la cosecha, el número de frutos escasea y pueden encontrarse más de 50 individuos en un solo fruto y re-infestar secos. También cuando son elevados los índices de infestación de la plaga pueden encontrarse dos o más perforaciones por fruto.

En la figura 4 se puede observar como aumenta la mortalidad de los insectos dentro de los granos a medida que transcurren los días después de la aplicación. A los 10 días de aplicados los NEPs alrededor de las plantas de cafeto más del 50 % de los insectos se encontraron muertos y al analizar el R^2 se puede decir que la mortalidad alcanzada con el tratamiento de NEPs fue debido al efecto controlador de este agente biológico a pesar de no haberse aplicado una dosis más elevada. Evans (2004) refiere que los NEPs necesitan varios días para provocar la muerte a insectos coleópteros como el picudo rayado del plátano, factor que al unirse al tamaño de los adultos de Broca, afectan la rapidez del agente para controlar la plaga insectil.

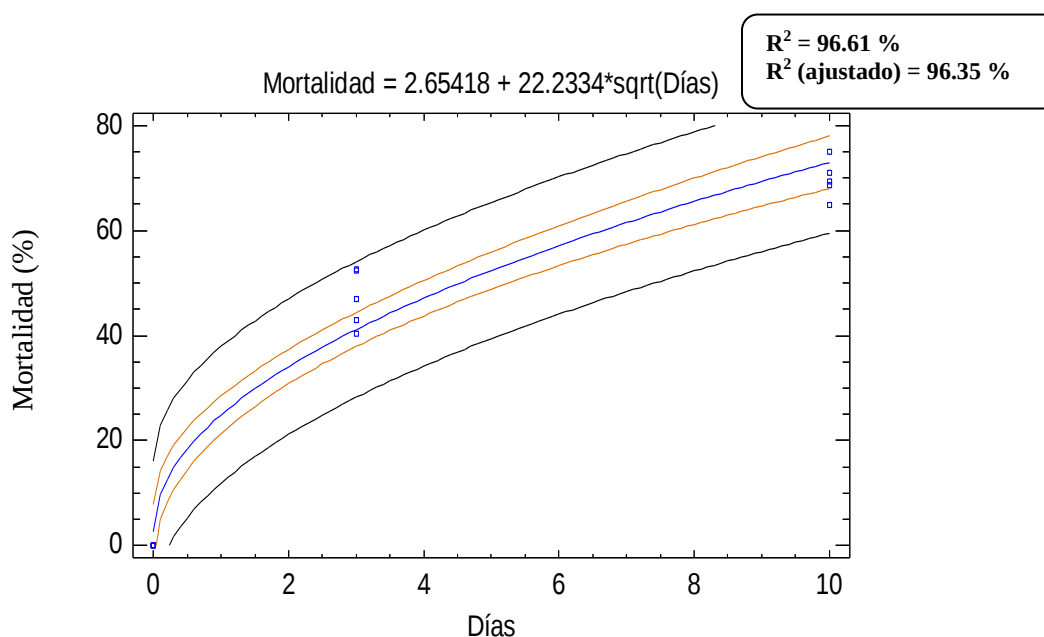


Figura 4. Curva de mortalidad de la Broca del cafeto presente en granos caídos después de aplicar NEPs al suelo.

Cuando se calcula los días necesarios para garantizar el 100 % de mortalidad los resultados arrojaron que la misma se alcanza a los 19-20 días pos-aplicación (tabla3). No obstante, en este análisis no se tiene en cuenta la re-infestación de los granos por lo cual se necesitan varias aplicaciones para realizar un control efectivo.

Tabla 3. Pronóstico de la mortalidad de adultos en el interior de los granos.

Predicción		Pronóstico de nuevas observaciones		Promedio de las observaciones	
		Límite	Predicción	Límite	Confianza
X	Y	Inferior	Superior	Inferior	Superior
0.0	2.65418	0.0	16.1848	0.0	7.84798
10.0	72.9623	59.5051	86.4195	67.9628	77.9618
15.0	88.7637	74.7001	100.00	82.3073	95.2201
19.0	99.5672	84.979	100.00	92.0363	100.00

Al evaluar las Brocas existentes a los 30 días, se puede apreciar que en el tratamiento control no variaron considerablemente el número de insectos. En el tratamiento con NEPs, a pesar de contarse menor cantidad de insectos que a los 10 días después de aplicados, se apreció que existieron insectos vivos dentro de los granos. Esto nos demuestra que los NEPs ejercen un control sobre los insectos pero este no es suficiente para lograr el 100 % de los mismos (figura 5).

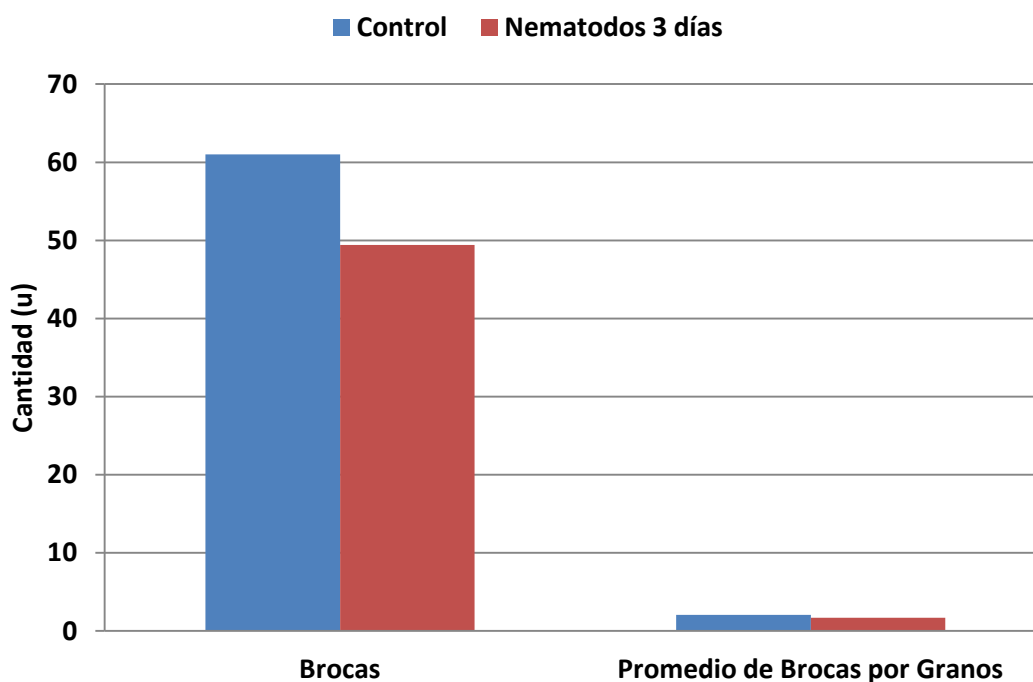


Figura 5. Brocas existentes por planta a los 30 días en el interior de los granos.

Por su parte, Rodríguez *et al.* Evaluaron el efecto de liberaciones de *Cephalonomia stephanoderis* Bertem y aplicaciones de *H. bacteriophora* cepa HC1 en parcelas de cafeto, donde el Índice de Infestación por broca de café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) disminuyó a 1,5% en los campos tratados con ambos biorreguladores.

El tratamiento con NEPs fue efectivo en el control de la Broca (figura 6). Al realizar dos aplicaciones de NEPs con 30 días de separación entre una y otra se obtuvo una mortalidad superior al 80 %. Esta aplicación mostró diferencias significativas con respecto a la primera y al tratamiento control, lo cual nos demuestra que el efecto de

los NEPs fue acumulativo debido al establecimiento de estos organismos en el suelo, lo que permite continuar el control de los adultos de la plaga.

Resultados similares fueron obtenidos por Cisnero (2014) cuando refiere que al realizar aplicaciones de NEPs para controlar los escarabajos de la piña se apreció la presencia de los mismos en el suelo debido a las características presentes en los JI, lo que facilita el control de otras plagas insectiles existentes en el cultivo.

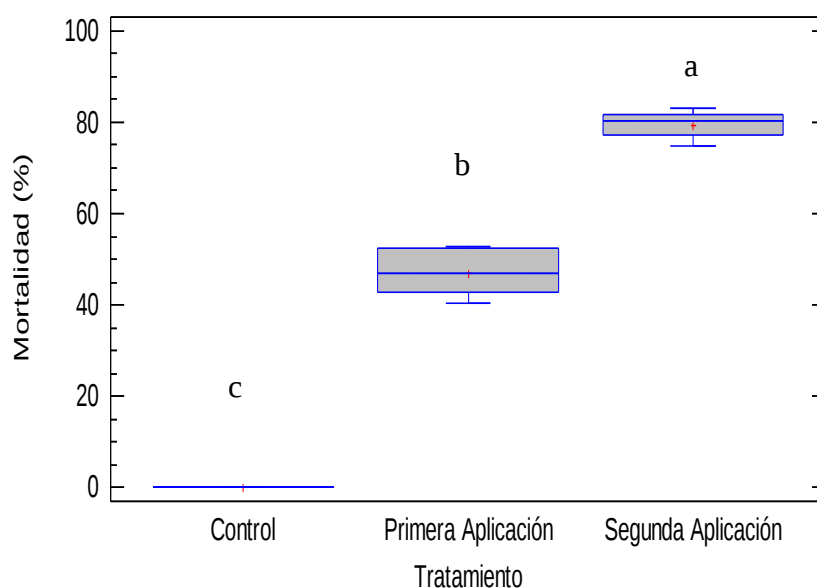


Figura 6. Análisis del porcentaje de mortalidad en los tratamientos con NEPs.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se aislaron las cepas de nematodos entomopatógenos Pretiles-1, Pretiles-2 y Pretiles-3 de la región cafetalera de Jibacoa, Villa Clara.
2. La CL_{50} obtenida con la cepa de NEPs Pretiles-3 fue de 419 nematodos y el costo de aplicación por hectárea es de \$ 140.35 MN.
3. No es factible el empleo de la cepa Pretiles-1 en el control de *H. hampei* porque el costo de la aplicación es de \$2062.60 MN.
4. El tratamiento con NEPs fue efectivo en el control de la Broca, la eficacia obtenida en la primera aplicación fue del 66% mientras que con dos aplicaciones sucesivas se alcanzó el 80 %.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

De acuerdo con las conclusiones expuestas hacemos las siguientes recomendaciones:

- Aplicar la cepa de NEPs Pretiles-3 en el periodo post-cosecha del cafeto, como parte del MIP realizado al cultivo.
- Realizar muestreos de suelo en otras zonas para aislar nuevas cepas de nematodos entomopatógenos que sean eficientes en el control de *H. hampei*.
- Evaluar la combinación de las aplicaciones de NEPs con otros medios de control.

*REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akhurst, R. J. (1990). Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. En: *Safety of microbial Insecticides*. L.A. Laird; E.W. Lacey; E.W. Davidson (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 233-240.
2. Akhurst, R. J. and N. E. Boemare (1990). Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. En: *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. R. Gaugler; H.K. Kaya (Eds.). CRC Press. Boca Raton –Ann Arbor- Boston. pp. 75-90.
3. Alatorre – Rosas, R. and M. A. Hernández (2000). The use of *Heterorhabditis* for white grub control. *Nematropica* 30(2): 113. (Abstr.).
4. Badii, M.H., J.L. Abreu (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience* 1(1): 82-89.
5. Barbercheck, M. E. y H. K. Kaya (1991). Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environmental Entomology* 20 (2): 582-589.
6. Bathon, H. (1996). Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 421-434.
7. Bedding, R. A. y R. J. Akhurst (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*. 21: 109-110.
8. Beeding, R. A and A. S. Molineux (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28: 354-359.
9. Beeding, R. A., A. S. Molyneux y R. J. Akhurst (1983). *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and *Steinernema kraussei*: Interspecific and intraespecific differences in infectivity for insects. *Exp. Parasitol.* 55(22): 249-257.
10. Begley, J. W. (1990). Efficacy against insects in habitats other than soil. En: *Entomopathogenic nematodes in biological control*. (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 215-231.

11. Boemare, N. E., C. Laumond y H. Mauleon (1996). The entomopathogenic nematode-bacterium complex: Biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontr. Sci. Technol.* 6: 333-346.
12. Brasil (1992). Informe a Las Naciones. Cumbre de la tierra Rio de Janeiro. En sitio web: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Cumbre-De-La-Tierra-Rio-De/612872.html>. [Consultado el 14 de marzo de 2014].
13. Bustillo, A. (2005). El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 29 (110): 55-69, Santafé de Bogotá, Colombia.
14. Bustillo, A. E., M. R. Cárdenas, G. D. Villalba, P. Benabides, B. Chávez (1998). Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) en Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía, Cenicafé.
15. Campbell, J. F., E. Lewis, F. Yoder y R. Gaugler (1996). Entomopathogenic nematode *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae* spatial distribution in turfgrass. *Parasitol.* 113: 473-482.
16. Campos-Herrera, Raquel; M. Escuer; Sonia Labrador y Carmen Gutierrez. Asilamiento, identificación y caracterización ecológica de nematodos entomopatógenos de la Rioja. *Zubia*. (23-34):27-58, Logroño, 2005-2006.
17. Castillo, O., E. Pozo y O. Ferrera (2010). Aislados de nematodos entomopatógenos de los suelos del Consejo Popular Quintín Bandera, municipio Corralillo. Trabajo de Diploma no publicado. Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas. 25 p.
18. CENIAP (Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela). 1988. Recomendaciones para la prevención y control de plagas en granos almacenados. Foniap Divulga n. 27. Enero/Marzo. En sitio web: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd27/texto/recomendaciones.htm>. [Consultado el 27 abril, 2014].

19. Certis (2003). Productos a base de nematodos insecticida para la protección del cultivo. En sitio web: [www.Certis.com.mx/nematode .html](http://www.Certis.com.mx/nematode.html). [Consultado el 11 de febrero de 2014] .
20. Chen, H., Y. Zhang, J. Li, G. B. Dunphy, Z. K. Punja y J. M Webster (1996). Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. *J. Inv. Path.* 68: 101-108.
21. Cintrón, B. y H. Grillo (2006). Caracterización de la dinámica poblacional de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Curculionidae: Scolytinae) durante el desarrollo de los frutos. *Revista Centro Agrícola*. año 33, no.3, jul.-sept., 55-60.
22. Cisnero, M. L. 2014. Comunicación Personal. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
23. CNRFM (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Montaña) (2007). Orientaciones Metodológicas para CREE de Montaña. Broca del cafeto. *Hypothenemus hampei*. MINAGRI. Buey Arriba, Granma.
24. Cuba (2006). Agricultura. Silos que cambian la vida. En sitio Web: http://cubaalamano.net/sitio/muestra_especial.asp?art=6345. [Consultado el 19 de abril de 2014].
25. Cuba (2012). La broca del cafeto. ECURED. Enciclopedia de la Red Digital. Ecured Portable versión 1.5.
26. Desagro (2000). Productos y servicios: Protección Vegetal. En Sitio Web: [www.desagro.com/oldsite/productos y servicios/proteccion vegetal/main.htm](http://www.desagro.com/oldsite/productos_y_servicios/proteccion_vegetal/main.htm). [Consultado el 19 de abril de 2014].
27. Doucet, M. M. A. y A. Giayetto (1994). Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematol. Medit.* 22: 171-178.
28. Ehlers, R.-U. (1998). Entomopathogenic nematodes - Save biocontrol agents for sustainable systems. *Phytoprotection* 79: 94-102.
29. Evans, G. (2004). Nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.). Una alternativa para el control del picudo rayado del plátano *Metamasius*

hemipterus sericeus L. (Coleoptera; Curculionidae). Tesis no publicada. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 42 p.

30. Feliz, M. D. (2002). Incidencia de *Hypothenemus hampei* Ferr. y sus controladores naturales en plantas de café bajo diferentes tipos de sombra en San Marcos, Nicaragua. Tesis públicamente defendida en CATIE. Área de Agroforestería, 7170, CATIE. Turrialba, Costa Rica. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0307e/A0307e.pdf>. [Consultado el 13 de abril de 2014].
31. Friedman, M. J. (1990). Commercial production and development . En: Entomopathogenic nematodes in biological control. Gaugler, R. y Kaya, H.K. (eds) pp. 153-172. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
32. Gaugler, R. (1987). Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvement. En Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cells Culture. K. Maramorosch (Ed) . New York. Academic Press. pp. 457-484.
33. Georgis, R. (1990). Formulation and application technology. En *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. R. Gaugler; H. K. Kaya (Eds). CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor-Boston. pp. 173-191.
34. Georgis, R. (1992). Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. *Biocontrol Sci. Technol.* (2): 83-99.
35. Georgis, R. and N. G. M. Hague. (1991). Nematodes as biological insecticides. *Pesticides Outlook* 2:29-32.
36. Georgis, R. y Hom, 1992 Introduction of Entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbeans . *Nematropica* 22:81.98
37. Glazer, I.; L. Salame and D. Segal. (1997). Genetic enhancement of nematicide resistance in entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci. Technol.* 7(4): 499.
38. Gothama, A. A. A; P. P. Sikorowski and G. W. Lawrence. (1995). Interactive effects of *Steinernema carpocapsae* and *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus on *Spodoptera exigua* larvae. *J. Invert. Path.* 66(3): 270-276.

39. Hara, A. H and H. Kaya. (1993). Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocasae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environ. Entomol.* 12(2): 496-501.
40. Head, J.; K. F. A. Walters and S. Langton. (2000). The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. *Biocontrol.* 45(3): 345-353.
41. Hominick, W.M.; Reid, A.P. (1990): Perspectives on entomopathogenic nematology. En: Entomopathogenic nematodes in biological control. (eds) pp. 327-345. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
42. INISAV Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (2005). Broca del café CIDISAV. p 35.
43. Jansson, R. K. (1991). Biological control of *Cylas* spp. En *Sweet Potato Pest Management: A Global Perspective*. R. K. Jansson; K. V. Raman. (Eds.) Westview Press, Boulder, Colorado, USA. pp. 16-201.
44. Kaya, H. (1985). Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems. p 23-302. En *Biological Control in Agricultural IPM Systems*. M. A. Hoy; D. C. Herzog (Eds:) Academic Press, New York.
45. Kaya, H. and R. Gaugler (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38:181-206.
46. Kaya, H. and S. P. Stock (1997). Techniques in Insect Nematology. En: L. Lacey (ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Biological techniques series. Academic Press. Wapato. EE. UU. pp. 281-324.
47. Kaya, H. K. and T. M. Burlando. 1989. Development of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in diseased insect hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 53(2): 164-168.
48. Kaya, H. K.; R. A. Bedding and R. J. Akhurst. 1993. An overview of insect-parasitic and entomopathogenic nematodes. Pp. 1-10. En *Nematodes and*

the Biological Control of Insect Pests. R. Bedding; R. Akhurst; H. Kaya (Eds.)
CSIRO, East Melbourne, Australia.

49. Kondo, E. and N. Ishibashi (1991). Dependency of the *Steinernematid* nematodes on their symbiotic bacteria for growth and propagation. *Jap. J. Nematol.* 21:11-17.
50. Lara, J.C., J.C. López, E. Alex y P. Bustillo (2004). Efecto de entomonemátodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Scolytidae), en frutos en el suelo. *Revista Colombiana de Entomología*. 30 (2):179–185.
51. Le Pelles (1973). Las Plagas del Café. La Habana, Ed. Ciencia y Técnica, Instituto Cubano del Libro. pp. 140-170.
52. Lewis, E. E., R. Gaugler and R. Harrinson (1993). Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae*) to host volatile cues. *Can J. Zool.* 71: 765-769.
53. Li *et al.*, 1991; Li, Y; F. L Zhang; Z. Liu and J; Zong (1991). Study on vitality of entomopathogenic nematodes applied with a high pressure sprayer. *Chin. J. Biol.* 7(1): 23.
54. Makete, T., R. Gaugler, K. B. Nguyen, W. Mandefro, and M. Tessera. (2005). Biogeografía de nematodos entomopatógenos en Etiopía. *Nematropica* 35:31-36.
55. Marrero, P. Maria. 2003. Nematodos Entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Plutella xylostella* (Linnaeus.) y *Heliothis virescens* (Fabricius). Tesis presentada para aspirar al título de Master en Ciencias en Agricultura Sostenible. CIAP. 54p.
56. MINAGRI. (2005). Programa de Defensa de la Broca del Café. Centro Nacional de Sanidad Vegetal y Dirección de Café y Cacao. La Habana, Cuba. p.13.

57. MINAGRI. (2008). Programa de Defensa de la Broca del Café. Emitido por Centro Nacional de Sanidad Vegetal y Dirección de Café y Cacao. La Habana, Cuba. p. 10.
58. Morris, O. N. (1985). Susceptibility of 31 species of agricultural insect pests to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Can. Ent.* 117(4): 401-407.
59. Mracek, Z., S. Becvar, P. Kindlmann (1999). Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the Czech Republic. *Folia Parasitologica* 46 (2): 145-148.
60. Poinar Jr., G.O. (1975). Entomogenous nematodes, a manual and host list of insect-nematode associations. Leiden, E.J. Brill, 254 p.
61. Poinar, G. O. (1990). Biology and taxonomy. Entomopathogenic nematodes in biological control. R, Gaugler, H. K. Kaya (Eds) CRC Press. Boca Raton – Ann Arbor-Boston. pp. 23-61.
62. Pozo E, López D, Martínez Y. (2003). Nuevos aislados de nematodos entomopatógenos en la región central de Cuba. *Centro Agrícola*. 2003; No. 4, año 30:94-95.
63. Quintero (2003). Comparación En Laboratorio De La Patogenicidad De Tres Especies Nativas De Nematodos Entomopatógenos (Rhabditida) Sobre Larvas De Tercer Instar De *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae). Trabajo de diploma para optar al título de Bióloga. Cali. Colombia. 58 p.
64. Ramírez, G y Mora, M. (2001). La broca del fruto del café nos amenaza. Boletín informativo ICAFE. San José, Costa Rica.
65. Rodríguez M.G., M. García, G. Gómez, Y. Rodríguez, E. Enrique (2008). Producción y utilización de nematodos entomopatógenos en el manejo de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). Informe final de Proyecto de Investigación. Programa Ramal de Entidades Exóticas. Ministerio de la Agricultura. República de Cuba. 177pp.

66. Rosales, L. C. y Z. Suárez H. (1998). Evaluación de nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control biológico contra *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Revista de Entomología Venezolana*. 13 (2): 122-140.
67. Rosales, L.C., Suárez H., Z. y Balza, R. (1999). Cría masiva de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). XVI Congreso.
68. Rovesti, L; E. W. Heinzpeter; F. Tagliente and K. V. Deseo. (1989). Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 34(4): 462-476.
69. Sánchez L. (2002). *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. [Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 100 pp. (Número de depósito Centro Nacional de Derecho de Autor, CENDA. Ciudad de la Habana, 9613-2002).
70. Stock, S. P., Pryor, B. M., Kaya, H. K. (1999). Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in natural habitats in California. *Biodivers. Conserv.* (8), 535-549.
71. Stock, S. P., Reid, A. P. (2004). Biosystematic (Steinernematidae, Heterorhabditidae): current status and future directions. *Nematol. Monographs Perspectives* (2), 435-446.
72. Valdés, R. (2003). Umbral económico de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) en pepino (*Cucumis sativus* L.) y lucha biológica con el empleo de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) en organopónicos. Trabajo de Diploma no publicado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
73. Vázquez, L. (2003). Manejo Integrado de Plagas. Preguntas y respuestas para extensionistas y agricultores. INISAV. Ministerio de la Agricultura. La Habana. Cuba. 566 p.

74. Vázquez, L. L. (1993). Manejo Integrado de Plagas en cafeto. Informe Técnico. INISAV. Ciudad de La Habana. 3 p.
75. Vázquez, L.; García, R. y Peña, E. (2005). Observaciones sobre la presencia de broca del café (*Hypothenemus hampei*) en los frutos que caen al suelo. Fitosanidad vol. 9, no. 2, junio.
76. Woodring Jennifer.L and H. Kaya (1988). *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes: A hand handbook of biology and Techniques southerncoopserves Bull (331): 1-30 p.
77. Zirmeman, R. J. and W. S. Cranshaw. (1990). Compatibility of thee entomogenous nematodes (Rhabditid) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. J. Econ. Entomol. 83(1): 97-100.