

**Estimación de la concentración y tiempo letal
de los nematodos entomopatógenos
Heterorhabditis bacteriophora, *Steinernema
carpocapsae* para el control de Broca de café
(*Hypothenemus hampei*)**

Madai Yaraaí Durón Alvarado

Escuela Agrícola Panamericana Zamorano

Honduras

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Estimación de la concentración y tiempo letal
de los nematodos entomopatógenos
Heterorhabditis bacteriophora,
Steinernema carpocapsae para el control de
Broca de café (*Hypothenemus hampei*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Madai Yaraaí Durón Alvarado

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Estimación de la concentración y tiempo letal de los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae* para el control de Broca de café (*Hypothenemus hampei*)

Madai Yaraaí Durón Alvarado

Resumen. La broca del café *Hypothenemus hampei* es la plaga insectil más importante del cultivo. Los productores han buscado alternativas para su control, el más utilizado han sido los agroquímicos. También se han usado enemigos naturales como parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta*. Este estudio plantea determinar la dosis letal 50 y 95% (CL₅₀ y CL₉₅) y el tiempo letal 50 y 95 para los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* (*Hb*) y *Steinernema carpocapsae* (*Sc*). Con el fin de estimar la concentración y tiempo letal de estos nematodos producidos en Zamorano para el control la broca del café se hizo un bioensayo en laboratorio utilizando siete concentraciones, las cuales fueron de 0, 2, 6, 15, 42, 117, y 325 nemátodos /insecto los mismos tratamientos se usaron para ambas especies. Habiendo tres repeticiones, equivalente a 21 unidades experimentales por especie, la población de brocas utilizadas fue de 16 adultos/tratamiento a los cuales se les infecto con *Hb* y *Sc* respectivamente se evaluó la capacidad patogénica durante ocho días, cada 24 horas. La mortalidad más alta alcanzada fue de 94% para *H. bacteriophora* y 83% para *S. carpocapsae*. Se utilizó un análisis probit para estimar las concentraciones letales (CL) y tiempos letales (TL) para cada especie. Según los resultados de las líneas bases se determinó que la concentración letal media de CL₅₀ de 114.79 y CL₉₅ 628. 06 para la especie *Hb* la concentración letal media de CL₅₀ de 52.90 y CL₉₅ 405.3 nemátodos/insecto respectivamente para la especie *Sc*.

Palabras clave: Control biológico, CL₉₅, CL₅₀, nematodo entomopatógeno, TL₅₀, TL₉₅

Abstract: The coffee berry borer *Hypothenemus hampei* is the most important insect pest of the crop. Producers have sought alternatives for its control the most used are agrochemicals. They have also been used natural enemies such as parasitoids *Cephalonomia stephanoderis* and *Prorops nasuta*. This study raises determine the lethal dose 50 and 95% (LC₅₀ and LC₉₅) and the lethal time for 50 and 95 for entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (*Hb*) and *Steinernema carpocapsae* (*Sc*). In order to estimate the concentration and lethal time of these nematodes produced at Zamorano to control the coffee berry borer became a bioassay laboratory using seven concentrations, which were 0, 2, 6, 15, 42, 117, and 325 nematodes / insect the same treatments used for both species. Having three repetitions, equivalent to 21 experimental units per species, the population of bits used was 16 adults / treatment to which they were infected with *Hb* and *Sc* respectively the pathogenic capacity for eight days, every 24 hours was evaluated. It reached the highest mortality was 94% for *H. bacteriophora* and 83% for *S. carpocapsae* a probit analysis was used to estimate the lethal concentration (LC) and lethal times (LT) for each species. According to the results of the baselines determined that the median lethal concentration LC₅₀ and LC₉₅ 114.79 628. 06 for *Hb* species the median lethal concentration LC₅₀ and LC₉₅ 52.90 405.3 nematodes / insect species respectively for *Sc*.

Key words: Biocontrol, LC₉₅, LC₅₀, entomopathogenic nematode, LT₅₀, LT₉₅.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros y figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
4. CONCLUSIONES	9
5. RECOMENDACIONES	10
6. LITERATURA CITADA	11

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Porcentaje de mortalidad expresada por <i>Hypothenemus hampei</i> utilizado como huésped para <i>Steinernema carpocapsae</i> y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> al día cinco y ocho de evaluación.	5
2. Porcentajes de mortalidad y concentraciones letales estimadas por el análisis probit para los nematodos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Steinernema carpocapsae</i>	6
3. Tiempos letales calculadas en el análisis probit de mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> causado por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Steinernema carpocapsae</i> para la concentración de 325.	8

Figuras	Página
1. Nematodos entomopatógenos en estado juveniles de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> encontrados dentro de <i>Hypothenemus hampei</i> vista 40X.	4
2. Porcentaje de mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> durante el periodo de evaluación para el nematodo <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	7
3. Porcentaje de mortalidad de <i>Hypothenemus hampei</i> durante el periodo de evaluación para el nematodo <i>Steinernema carpocapsae</i>	7

1. INTRODUCCIÓN

El café es producido en más de 50 países en vía de desarrollo, es uno de los productos de mayor exportación y uno de los más importantes del mundo. Hace una importante contribución al desarrollo socioeconómico ayudando a reducir la pobreza, generador de empleos y es de importancia económica excepcional para los países exportadores. Dado que alrededor del 70% del café mundial lo producen 25 millones de pequeños agricultores y sus familias, el café es una importante fuente de ingresos en efectivo y ocasiona una considerable cantidad de empleo (OIC 2007).

La importancia de la comercialización del café como producto agrícola básico es innegable. En el 2003, superó en más de 14 mil millones de dólares las exportaciones agrícolas de Estados Unidos; en más de 50 países productores del grano es el sustento de aproximadamente 20 millones de familias cafetaleras (Machado *et al.* 2010).

El cultivo de café es susceptible al ataque de muchas plagas y enfermedades dentro de las principales plagas y la que más pérdidas ocasiona tenemos la broca (*Hypothenemus hampei*). La broca del café, es la principal plaga del cafeto en todos los países productores del mundo, afectando el cultivo desde el campo al causar la pérdida total de frutos reduciendo la calidad del producto final (CENICAFE 2013).

Las hembras pueden vivir en un promedio de 150 días y los machos entre 35 y 40 día. Las hembras colocan de uno a tres huevos por día para un promedio de 70 huevos por ciclo. Más de una hembra puede ovipositar en el mismo grano, se pueden encontrar hasta 27 insectos en diferentes estadios dentro de un grano brocado (ANACAFE 2011).

La broca daña la parte más valiosa que es la cereza, los productores se ven obligados a usar los agroquímicos en el mercado tal es el caso del Thiodan EC (i.a Endosulfán) ha sido el más usado durante años en la caficultura en todos los países productores de café. Este ya no se encuentra disponible ya que ha traído muchos problemas a los agricultores, son altamente tóxicos y persiste mucho tiempo en el ambiente y son los principales contaminantes del suelo (Betancur *et al.* 2013).

A raíz que el producto Endosulfán fue retirado su registro en los países Centro Americanos los productores buscan afanadamente una alternativa eficaz para su control. En Colombia desde 1990 se reportó que *Beauveria bassiana* un hongo entomopatógeno ataca a *H. hampei* desde entonces este controlador biológico ha sido usado por casi todos los cafetaleros de ese país (Góngora *et al.* 2009).

Se han identificado otros organismos que tienen la capacidad de controlar a la broca, estos son los nematodos entomopatógenos los cuales se describen como gusanos que tienen forma de águila, tienen la capacidad de vivir en diferentes hábitats como el suelo, agua dulce, e incluso salada. Pueden adaptarse a diversos ambientes, tienen una alta capacidad de búsqueda de su hospedero, pueden sobrevivir cierto tiempo sin alimento. Los nematodos entomopatógenos son resistentes a una amplia variedad de agroquímicos y estos son compatibles con todas las estrategias de manejo integrado. Las dos familias más utilizadas hasta hoy son Steinernematidae y Heterorhabditidae que son patógenos obligados, ciclo de vida consiste en huevo cuatro estados de larva. Los infectivos juveniles (J3) de *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora* transportan la bacteria *Xenorhabdus nematophilus* y *Photorhabdus luminis* respectivamente con la cual realizan una relación simbiótica. Cuando se introducen en su huésped por cualquier orificio natural (boca, ano, espiráculos) y han alcanzado el hemocele la bacteria es liberada y esta se propaga. Esta provoca la muerte del hospedante en 48 horas, específicamente porque produce enzimas proteolíticas el nematodo se alimenta de la bacteria y los tejidos del hospedante (Cano *et al.* 2004).

Estos nematodos han sido aplicados en países como Cuba, Colombia y Honduras en este último se realizó un estudio para comparar la efectividad en el control de la broca en laboratorio obteniendo 96% de mortalidad de *Hypothenemus hampei* según lo reportó (Ávila 2010).

Conociendo la efectividad de los nematodos entomopatógenos en el control de la broca de café se determinó evaluar. La concentración letal y tiempo letal necesarios para matar el 50% y 99% de la población de brocas adultos. Cuando se habla de concentración letal nos estamos refiriendo a la dosis necesaria, obtenida estadísticamente, en cantidad del inóculo sobre la cantidad de insectos, para matar el 50% de una población. Cuando nos interesa registrar la producción de muerte, se maneja el denominado “tiempo letal” (TL) este último es el tiempo promedio transcurrido en los diferentes individuos, desde la aplicación del patógeno hasta su muerte (Morales 2012).

Los objetivos fueron determinar la concentración de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae* con la que se logra una concentración letal de (CL₅₀ y CL₉₅) y estimar el TL₅₀ y TL₉₅ en que los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae* actúan sobre las brocas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El ensayo se realizó en el Laboratorio de la unidad de control biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el valle del Yeguaire a 32 kilómetros de Tegucigalpa, Honduras.

Recolección de granos brocados. Para la recolección de los granos brocados fue necesario visitar diferentes lugares de la zona cafetalera. La primera recolecta se hizo en la finca de café de la Unidad de Frutales, café variedad Catuai, se recolectaron los granos caídos. La segunda colecta se realizó en la aldea Tabla Grande carretera a Danlí 37 km las Mesas, en esta se recolectaron tanto granos caídos como granos brocados en la planta. El último lugar de muestreo fue Hacienda Santa Elisa, ubicada a cinco kilómetros de Danlí, El Paraíso, Honduras, se recolectaron granos verdes, maduros y secos brocados, los cuales posteriormente fueron trasladados al laboratorio para proceder a la extracción de las brocas adultos.

Extracción de brocas. Los granos brocados que fueron recolectados se colocaron en bandejas plásticas, para evitar que las brocas escaparan de las bandejas se colocaron dentro de jaulas con tela malla. Para poder extraer la broca de los granos se utilizó un bisturí con el cual se partía el grano a la mitad, luego esta mitad se seguía cortando hasta encontrar el insecto. Una vez ya extraído el insecto del grano, se recogió con un pedazo de algodón humedecido. Todas las brocas recolectadas se colocaron dentro de un frasco de vidrio con 20 granos de café oro dentro cubierto con papel aluminio, esto con la intención de evitar cualquier tipo de estrés al insecto. Para evitar que este muera de hambre o por efecto de la luz y la temperatura.

Desinfección de café oro. Se desinfectaron los granos de café oro (672 granos) con una solución de hipoclorito de sodio al 0.01%, se colocaron los granos en bandejas plásticas (40 cm x 27 cm x 8 cm) se colocó 1000 ml de la solución en la bandeja, se mantuvieron sumergidos durante dos minutos. Luego se les cambio la solución de hipoclorito de sodio, por agua destilada estéril, los granos permanecieron en esta solución dos minutos, para retirar cualquier residuo del hipoclorito de sodio. Finalmente, se colocaron sobre trazos de papel toalla estéril luego se dejaron dentro una jaula de malla durante 24 horas para asegurarse que el grano estuviese completamente seco y evitar el crecimiento de cualquier hongo.

Desinfección de las brocas. Las brocas se colocaron en una tela de gasa estéril, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.01% durante 30 segundos. Posteriormente se sumergieron en agua destilada estéril por 30 segundos. Se recolectaron las brocas de la gasa y se colocaron en un plato petri estéril.

Tratamientos. Se utilizaron los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb) y *Steinernema carpocapsae* (Sc) y fueron expuestos a siete diferentes concentraciones. Las concentraciones que se utilizaron fueron: 325, 117, 42, 15, 6, 2, 0 nematodos entomopatógenos.

Metodología de evaluación de las concentraciones de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae*. El estudio se realizó utilizando bandejas BIO-ASSAY en las cuales se colocó una broca por pozuelo, utilizando un pincel para introducir la broca al cual se agregó un grano de café oro por pozuelo. Se colocaron 16 brocas en cada unidad experimental. Luego las bandejas se colocaron en incubadora a 25 °C en completa oscuridad durante ocho días. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones.

Variables medidas. Se evaluó el porcentaje de brocas muertas por los nematodos. La unidad experimental se representó por 16 brocas por unidad experimental para un total de 672 unidades observacionales. También se evaluó el tiempo letal para cada unidad observacional, esto es el tiempo transcurrido desde la colocación de los nematodos hasta la muerte del hospedero. El conteo de brocas muertas se comenzó a partir de las 48 horas de haber sido expuestas a los nematodos. Se tomaron datos de mortalidad a intervalos de 24 horas hasta el día ocho.

Diseción de Brocas. Para determinar si las brocas murieron por efecto de los nematodos se disecaron al final de las evaluaciones de mortalidad, para luego observar en el microscopio las brocas que tuvieran presencia de nematodos.

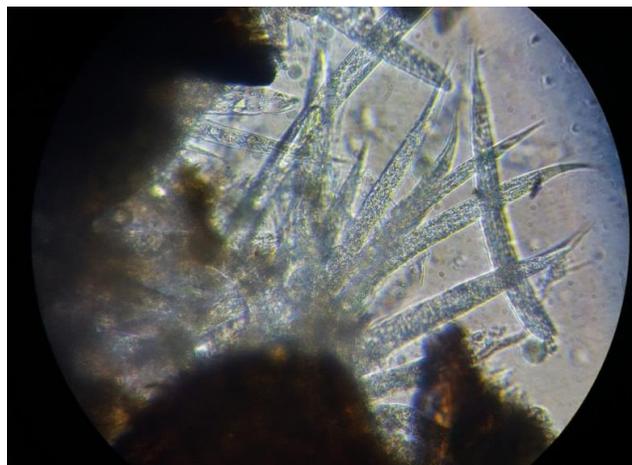


Figura 1. Nematodos entomopatógenos en estado juveniles de *Heterorhabditis bacteriophora* encontrados dentro de *Hypothenemus hampei* vista 40X.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de mortalidad de *Hypothenemus hampei*. Los niveles de mortalidad observados en ambos nematodos estuvieron en un rango desde 13% para *Steinernema carpocapsae* al día cinco y hasta un 83% en el día ocho después de inoculados. En cambio, para *Heterorhabditis bacteriophora* los niveles de mortalidad estuvieron entre 19 y 94 % para los días cinco y ocho respectivamente. La concentración de 2 nematodos por adulto de *H. hampei* fue la única concentración que no logro alcanzar 50% de mortalidad. (Cuadro 1). En el cuadro 1 se apreciar los datos de mortalidad que se utilizaron para el análisis probit.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad expresada por *Hypothenemus hampei* utilizado como huésped para *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora* al día cinco y ocho de evaluación.

Espece de nematodo	Concentración	Día 5	Día 8
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	0	19	19
	2	38	38
	6	38	63
	15	50	69
	42	50	69
	117	56	75
	325	69	94
<i>Steinernema carpocapsae</i>	0	13	19
	2	25	38
	6	44	50
	15	54	58
	42	60	69
	117	65	75
	325	69	83

La concentración que ocasionan el 50% y (CL₅₀ y CL₉₅) de mortalidad de los adultos de *Hypothenemus hampei* utilizando el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* es de 114.79 y 628.06 respectivamente y la concentración que ocasiono el 50 y 95% (CL₅₀ y CL₉₅) de mortalidad utilizando *Steinernema carpocapsae* fue de 52.9 y 405.3 (Cuadro2).

Cuadro 2. Porcentajes de mortalidad y concentraciones letales estimadas por el análisis probit para los nematodos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae*.

Nematodo entomopatígeno	n	Pendiente	CL₅₀ Nematodos/insectos. L.F 95%	CL₉₅ Nematodos/insectos. L.F 95%
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	336	0.026	114.79 37 ± 279.23	628.06 391.12 ± 1936.26
<i>Steinernema carpocapsae</i>	336	0.025	52.9 0.1 ± 113.2	405.3 274.8 ± 839.2

n: población de brocas.

L.F: límites de fiabilidad.

En la figura 3 y 4 se observa el comportamiento de la mortalidad de *Hypothenemus hampei*, se aprecia que existe una relación directa entre la concentración y el porcentaje de mortalidad, ya que a mayor concentración hay un mayor porcentaje de brocas muertas, misma relación se observa con el tiempo letal. A medida que transcurren las horas de aplicado el nematodo va incrementando el número de individuos muertos.

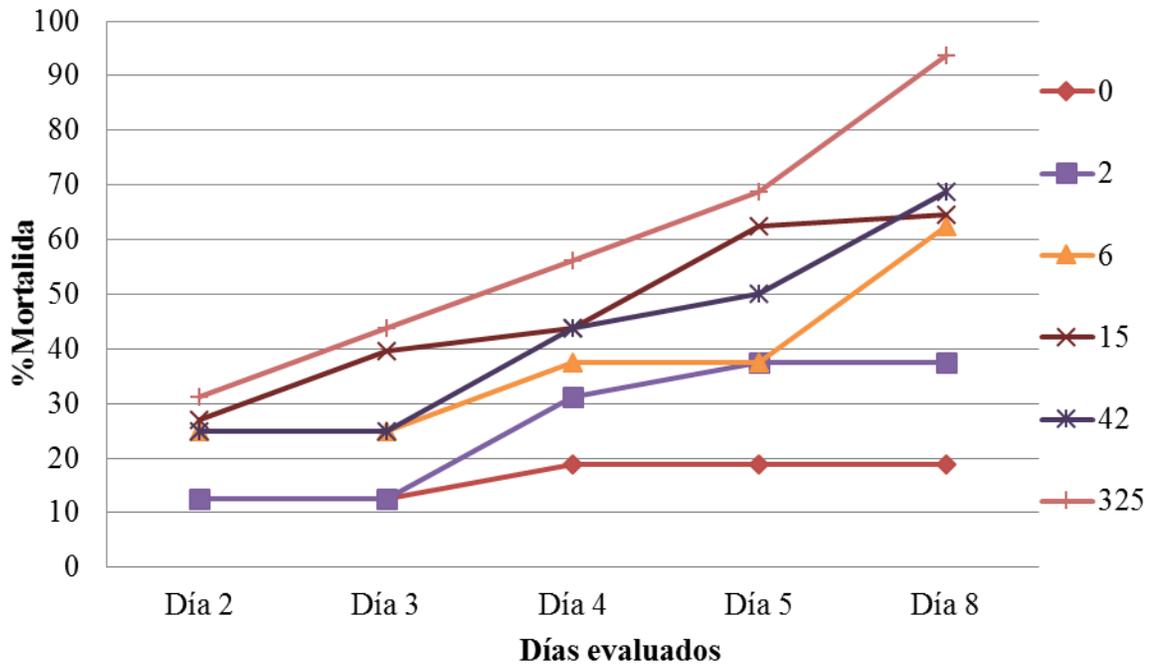


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de *Hypothenemus hampei* durante el periodo de evaluación para el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora*.

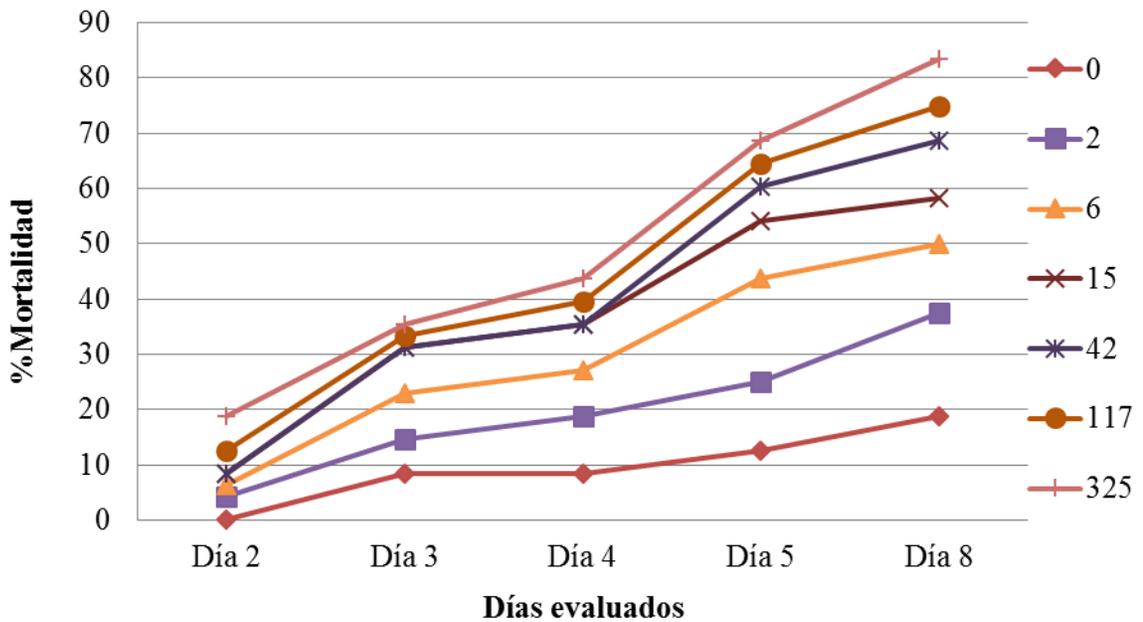


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de *Hypothenemus hampei* durante el periodo de evaluación para el nematodo *Steinernema carpocapsae*.

Tiempos letales. Los tiempos letales 50 y 95 (TL₅₀ y TL₉₅) se detallan en el cuadro 3, en el cual se observó que para *Heterorhabditis bacteriophora* se necesitan 3.45 días para matar el 50% de la población adultos de *Hypothenemus hampei* y el tiempo letal 95 fue de 8.42 días. Para el nematodo *Steinernema carpocapsae* el tiempo letal 50 y 95 fue de 4.33 y 9.7 días respectivamente. Estos tiempos fueron mayores para *Steinernema carpocapsae* que para *Heterorhabditis bacteriophora*.

Cuadro 3. Tiempos letales calculadas en el análisis probit de mortalidad de *Hypothenemus hampei* causado por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae* para la concentración de 325.

Nematodo entomopatógeno	n	Pendiente	TL₅₀ Nematodos/insectos. L.F 95%	TL₉₅ Nematodos/insectos. L.F 95%
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	336	0.55	3.45 2.14 ± 4.4	8.42 6.7 ± 13.7
<i>Steinernema carpocapsae</i>	336	0.43	4.33 3.33 ± 5.5	9.7 7.66 ± 15.42

n: población de brocas.

L.F: límites de fiabilidad.

4. CONCLUSIONES

1. Se determinó que para el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* para el control de *Hypothenemus hampei* la concentración letal media 50% (CL₅₀) es de 114.79 y una Concentración letal de 95% (CL₉₅) es de 628.26 nematodos/insecto, el tiempo letal medio 50% (TL₅₀) es de 3.45 y tiempo letal (TL₉₅) es de 8.42 días.
2. Se determinó que para el nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* para el control de *Hypothenemus hampei* la concentración letal media 50% (CL₅₀) es de 52.90 y una concentración letal 95% (CL₉₅) 839.23 nematodos/insecto, el tiempo letal medio de 50% (TL₅₀) de 4.33 y tiempo letal (TL₉₅) 9.7 días.

5. RECOMENDACIONES

1. Realizar un ensayo de campo donde se evalué estas concentraciones con las que se lograron los mejores resultados para ambas especies de nematodos, para determinar cuál es la dosis óptima para el control de la broca del café.
2. Establecer una crianza de *Hypothenemus hampei* en el laboratorio de la Escuela Agrícola Panamericana, para evaluar de una manera más eficiente la mortalidad por un periodo más largo.

6. LITERATURA CITADA

- ANACAFE 2011. Plagas y su control [Internet]. Guatemala: Asociación Nacional del café. [consultado 2015 Octubre 29]. https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Caficultura_ControlPlagas
- Ávila OA. 2010. Control de broca del café (*Hypothenemus hampei*) utilizando once cepas del hongo beuveria bassiana y el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* [Tesis]. Escuela Agrícola, Zamorano-Honduras. 14 p. [consultado 2015 octubre 29]. [Http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/575/1/t2905.pdf](http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/575/1/t2905.pdf).
- Betancur L, Ocampo R, Ríos LA. 2013. La problemática del endosulfán: aspectos químicos, analíticos y ambientales. Luna azul; [consultado 2015 noviembre 26]. [Http://www.scielo.org.co/pdf/luaz/n40/n40a19.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/luaz/n40/n40a19.pdf).
- Cano E, Carballo M, Guharay F, López JA. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Turrialba, Costa Rica, Managua, Nicaragua: CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 224 p. (Serie técnica Manual técnico; no. 53). ISBN: 9992403160.
- CENICAFE 2013. Manejo integrado de la broca [Internet]. Colombia: Centro Nacional de Investigación de Café. [consultado 2015 octubre 29].
- Góngora C, Marín P, Machado P. 2009. Claves para el Éxito del Hongo Beauveria bassiana como controlador biológico de la broca del café. [Internet]. CENICAFE; [consultado 2016 Agosto 10]. <http://www.cenicafe.org/es/publications/avt0384.pdf>.
- Machado P, Quintero Vargas J, Lopez JC. 2010. Evaluación en el laboratorio de nematodos entomopatógenos nativos para el control de la broca del café: CENICAFE 61(2):119-131. [consultado 2016 Mayo 24]. [http://www.cenicafe.org/es/publications/arc61\(02\)119-131.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/arc61(02)119-131.pdf)
- Morales F. 2012. Estimación de la concentración y tiempo letal del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) para el control del picudo *Cosmopolites sordidus* (Coleóptera: Curculionidae) [Tesis]. Escuela Agrícola, Zamorano-Honduras. 16 p. [consultado 2015 octubre 29]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1236/1/T3404.pdf>
- OIC. 2007. Acuerdo internacional del café de 2007 ventajas de la afiliación [Internet]. Organización internacional del café. [consultado 2016 Mayo 24]. http://www.ico.org/es/Benefits_ICA2007_c.asp