



REPÚBLICA DE CUBA

UNIVERSIDAD DE SANCTI SPIRÍTUS JOSÉ MARTÍ PÉREZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Prospección de cepas de nemátodos  
entomopatógenos en la CCS cafetalera Alberto  
Delgado, municipio Trinidad.

Trabajo de Diploma

Josué Cuellar González

Sancti Spíritus, 2016



REPÚBLICA DE CUBA

UNIVERSIDAD DE SANCTI SPIRÍTUS JOSÉ MARTÍ PÉREZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Prospección de cepas de nemátodos  
entomopatógenos en la CCS cafetalera Alberto  
Delgado, municipio Trinidad.

Trabajo de Diploma

Autor: Josué Cuellar González

Tutor: Prof. Asist. Yander Fernández Cancio. MSc.

Sancti Spíritus, 2016

## **Pensamiento**

“La ciencia no tiene anchos caminos reales y sólo puede alcanzar sus cimas radiantes quien, sin temor al cansancio, trepa por sus senderos pedregosos.”

**Carlos Marx**

**Dedicatoria:**

A mi mamá Magalis González Sarosa, ejemplo de entrega y sacrificio.

A mi novia Eliany Hernández Bandomo por su ayuda comprensión.

A mis abuelos y a mis tías por el apoyo que me han brindado a lo largo de mis estudios.

## **Agradecimientos:**

Agradezco a:

A mi madre a quien a pesar de deberle mi vida, también le agradezco lo que soy y lo que puedo ser en el futuro.

A mi novia por estar siempre a mi lado.

A mi familia, por la comprensión brindada en los momentos difíciles.

A mi tutor MSc.Yander Fernández Cancio por su excelente conducción en la realización del trabajo.

Al MSc Luis Mario Valdés Palmero por los conocimientos otorgados.

A Armando Castellano Jaime, propietario de la Finca Castellano, donde se realizaron las tomas de muestras de suelo para el desarrollo de la investigación.

A, mis compañeros de estudio y amigos, por todo su estar presentes en las buenas y en las malas.

A mis profesores, por transmitirme sus conocimientos, experiencias y consejos siempre útiles.

A todos, Muchas Gracias

## Síntesis

La presente investigación se realizó en el Laboratorio Agropecuaria III de la Universidad de Sancti Spíritus José Martí Pérez con muestras de suelo de la CCS cafetalera Alberto Delgado, municipio Trinidad en el período comprendido desde noviembre 2015 hasta enero del 2016, con el objetivo de aislar cepas de nemátodos entomopatógenos con un alto grado de establecimiento y virulencia sobre la broca del café. Se tomaron muestras de suelos y mediante las trampas con *Galleria mellonella* se realizó el aislamiento de las cepas de nemátodos. Además, se efectuó una caracterización de los suelos de las áreas prospectadas con presencia de nemátodos y la identificación genérica y la morfometría de nemátodos aislados, así como la determinación del número de hermafroditas/ número de nemátodos por larvas de *G. mellonella*. Se efectuó la determinación de la viabilidad de la cepa prospectada y un Test de susceptibilidad de las larvas de *Galleria mellonella*. Donde se obtuvo que los suelos donde se realizaron los aislados las características físicas y químicas de las muestras donde se encontraba el plátano como cultivo presente mostró los mejores porcentajes de MO y FE con un mayor número de IJ<sub>3</sub> hermafroditas. Los nemátodos aislados se clasificaron como uno perteneciente al género *Heterorhabditis* (denominada JY-16) y otro a los *Mermithide* con valores de viabilidad superiores al 92% en 24 horas y superiores a la cepa P<sub>2</sub>M. Los porcentajes de mortalidad alcanzados con esta cepa en comparación con la P<sub>2</sub>M fueron inferior con todas las concentraciones utilizadas.

## Synthesis

This research was conducted at the Agricultural Laboratory III of the University of Sancti Spiritus with soil samples from the coffee at the collective farmer Alberto Delgado, municipality of Trinidad in the period from November 2015 to January 2016, with the aim of to isolate strains entomopathogenic nematode with a high degree of establishment and virulence on the coffee berry borer. Soil samples were taken and by the traps with *Galleria mellonella* isolation of nematode strains was performed. Moreover, a soil characterization prospected areas with presence of nematodes and generic identification and morphometry isolated nematodes, as well as determining the number of hermaphroditic / number of nematodes *G. mellonella* larvae was made. determining the viability of the strain and prospected susceptibility test *Galleria mellonella* larvae it was performed. Where it was found that soil isolates were performed where the physical and chemical characteristics of the samples where banana cultivation as this was showed the best percentages of organic matter and structural factor with a greater number of IJ3 hermaphrodites. The isolated nematodes were classified as one belonging to the genus *Heterorhabditis* (called JY-16) and another to the Mermithide with values greater than 92% viability at 24 hours and above strain P2M. Los mortality rates achieved with this strain compared with P2M they were lower with all concentrations used.

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Pág</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Capítulo I</b>	
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	4
1.1 Características generales de los EPNs	4
1.2 Ciclo de vida.	6
1.2.1 Búsqueda y Penetración	7
1.2.2 Proceso de infección	7
1.2.3 Bacterias asociadas	8
1.2.4 Métodos de obtención, Seguridad y Registro	9
1.2.5 Permanencia de los NEPs en el suelo y mecanismos de supervivencia	10
1.2.6 Rango de hospedantes	11
1.2.7 Reproducción Masiva in vivo y estrategias de aplicación en plagas agrícolas	14
<b>Capítulo II</b>	
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
2.1 Aislamiento de nemátodos entomopatógenos	15
2.2 Caracterización de los suelos de las áreas prospectadas de nemátodos entomopatógenos	16
2.3 Identificación genérica de los nemátodos entomopatógenos	16
2.4 Morfometría de nemátodos aislados y determinación del número de hermafroditas/ número de nemátodos por larvas de <i>G. mellonella</i>	17
2.5 Determinación de la viabilidad de la cepa prospectada	17
2.6 Test de susceptibilidad de las larvas de <i>Galleria mellonella</i>	18
2.7 Procesamiento estadístico	18
<b>Capítulo III</b>	
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	19
3.1 Descripción de los suelos prospectados y composición químico y físico	19
3.2 Identificación, morfometría de la cepa aislada	21
3.3 Determinación de la viabilidad	23
3.4 Susceptibilidad de los asilados sobre <i>Galleria mellonella</i>	25
<b>CONCLUSIONES</b>	29
<b>RECOMENDACIONES</b>	30
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	31



## **Introducción:**

A nivel mundial la exposición de las personas a los productos químicos en los alimentos y el ambiente va en ascenso y con mayor frecuencia provienen de los plaguicidas utilizados en los procesos agrícolas. Este hecho ha despertado el interés en toda la sociedad en especial de científicos y ecólogos que han enmarcado sus investigaciones en las evidencias que relacionan el uso inadecuado de químicos para el control de plagas, con degradación de la calidad de las aguas, contaminación de suelos, aparición de insecto-resistencia y problemas de salud en el hombre, así como el desarrollo técnicas y métodos ecológicas con enfoque conservacionista en la producción de alimentos (Clavel *et al*, 2009).

El empleo de entomófagos y entomopatógenos en el manejo de plagas, teniendo en cuenta el contexto sociocultural, económico y tecnológico de los sistemas agrarios, constituye una alternativa viable y sostenible para países en desarrollo. Los nemátodos de las Familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* (nemátodos entomopatógenos), son agentes de control biológico de amplia utilización a escala mundial, y existen numerosos productos comerciales en América Latina, Europa, Japón y Estados Unidos de América (Rodríguez *et al.*, 2012).

Estos nemátodos poseen una combinación casi única de atributos deseables en los biorreguladores, como su amplia gama de hospedantes y capacidad para provocar altos índices de mortalidad; son ambientalmente seguros; pueden producirse a diferentes escalas mediante métodos *in vivo* e *in vitro*; los estadios infectivos (j1 ó ij3) pueden ser formulados y almacenados; el registro de los productos se requiere en pocos países; son fácilmente aplicables con los equipos estándares, el riego y numerosas cepas son compatibles con diversos productos químicos y otros agentes biorreguladores (Rodríguez *et al.*, 2012).

Su uso en Cuba está extendido a zonas agrícolas en todo el territorio nacional, donde *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar cepa HC1 se reproduce artesanalmente en 33 Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) y se aplica en decenas de municipios. *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karunakar & David) cepa P<sub>2</sub>M se emplea en el manejo de diversas plagas, con énfasis en *Pachnaeuslitus* Guer, mientras *Heterorhabditis* spp. cepas CIAP-DEY-6 y CIAP DEY-7 se emplearon para *Phyllophaga* spp. En Cuba, estas cepas se emplean en el manejo de *Plutella xylostella* L., *Spodoptera frugiperda* Smith, *Heliothis* spp., y varios representantes de Hemíptera, entre otras (Pozo *et al.*, 2011).

Cuba posee un nivel medio de desarrollo en los estudios relacionados con NEPs; sin embargo, la información está dispersa y poco disponible en bases de datos de internet o revistas de amplia circulación. Como resultado de ello se conoce poco en otras latitudes acerca del trabajo de colectivos de investigadores cubanos en el desarrollo y uso de nemátodos entomopatógenos, elementos que son de interés para la comunidad científica y productiva en América Latina (Rodríguez *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta la aceptación de los nemátodos entomopatógenos por parte de los productores, se establecen entre otros retos para la temática en Cuba, emprender estudios para el desarrollo del cultivo in vitro (por fermentación líquida) de nemátodos entomopatógenos, al aprovechar así las capacidades instaladas y experiencia acumulada en el país en la producción de medios biológicos de uso agropecuario, mejorar las formulaciones de nemátodos entomopatógenos, continuar estudios relacionados con las aplicaciones en campo como dosis, frecuencia y momento de aplicación para cada diana y compatibilidad con otros productos químicos y biológicos (Vázquez *et al.*, 2010).

**Situación problemática:**

La búsqueda de nemátodos autóctonos en los lugares donde se realizarán las aplicaciones, constituye un pilar fundamental en los empeños de científicos por elevar la efectividad en el control de plagas, por lo que las prospecciones de cepas de nemátodos entomopatógenos son estudios que demandan la integración de equipos de trabajo multidisciplinarios e inter-institucionales, (Sharma *et al.*, 2011).

**Problema científico:** ¿Existen cepas autóctonas de nemátodos entomopatógenos en la CCS cafetalera Alberto Delgado, municipio Trinidad?

**Hipótesis:** Si se realiza una prospección de cepas autóctonas de nemátodos entomopatógenos en la CCS cafetalera Alberto Delgado, municipio Trinidad, se podría aislar cepas con un alto grado de establecimiento y virulencia sobre la broca del café.

**Objetivo general:** Aislar cepas de nemátodos entomopatógenos en la CCS cafetalera Alberto Delgado, municipio de Trinidad, con un alto grado de establecimiento y virulencia sobre la broca del café.

**Objetivos específicos:**

1. Caracterizar los suelos de las áreas prospectadas y su relación con el establecimiento de los nemátodos entomopatógenos.
2. Determinar genérica y morfométricamente los nemátodos aislados.
3. Evaluar la susceptibilidad de estos aislados sobre larvas de *Galleria mellonella*.

## 1. Revisión bibliográfica

### 1.1 Características generales de los EPNs:

Los nemátodos entomopatógenos se clasifican como nemátodos asociados con bacterias simbiotes y son gusanos cilíndricos no segmentados, que poseen una cutícula exterior acelular bajo la cual se encuentra la epidermis seguida por las fibras musculares longitudinales, carecen de peritoneo, razón por la cual se incluyen dentro de los seudocelomados. Tienen sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, pero sin sistema circulatorio y respiratorio, características que le brindan fácil adaptabilidad a diferentes medios y tipos de suelos (Díaz, 2004).

Los nemátodos entomopatógenos se enmarcan según (Castro, 2004) dentro del “*Phylum Nematelminthes* (del griego nema, filamento y helmis, gusano); este grupo comprende un muy rico en especies y variados en sus formas. Ellos presentan simetría bilateral, tres capas germinales, sin verdadera segmentación, apéndices o probóscide, son pequeños, algunos microscópicos con el cuerpo en forma cilíndrica. La pared del cuerpo está formada por una cutícula resistente lisa o estriada, a menudo con espinas, escamas, placas, entre otras. En la mayoría, la cutícula está sujeta a mudas durante el crecimiento o durante toda la vida y por debajo de esta presenta una epidermis sinsicial o celular a la que siguen las fibras musculares. Su cavidad corporal es un seudoceloma y los órganos son tubulares, con sistema digestivo completo, consistente en un tubo recto con boca y ano, casi siempre los sexos separados, el macho habitualmente más pequeño que la hembra y el ciclo de vida puede ser sencillo o complicado, con o sin hospedante intermediario”.

Fernández *et al.* (2011), exponen que dentro de los nemátodos entomopatógenos se encuentran algunos de gran importancia, los cuales pueden parasitar insectos como son los nemátodos pertenecientes a los órdenes *Mermithida* y *Rhabditida*; o

pueden ser utilizados para controlar fitonemátodos como es el caso del orden *Mononchida*. Las características generales de estos agentes son: presencia de una cutícula transparente que los protege de la deshidratación, el aparato bucal no es igual que el que posee los fitonemátodos, son altamente especializados debido a que tienen un hábito de vida diferente al de los nemátodos que atacan las plantas. Ellos tienen gran importancia como reguladores naturales de poblaciones de insectos, lo cual, a su vez, nos permite que algunos puedan ser utilizados en la lucha biológica.

Ehlers (2007), plantea que el orden *Rhabditida* está constituido por nemátodos pequeños que no tienen ningún estilete bucal, tienen un claro orificio bucal esclerosado, donde algunas especies se caracterizan por su modo de vida como parásitos de insectos. Sus larvas en el tercer estadio (larvas duraderas) pueden soportar largos periodos de condiciones desfavorables del medio, al garantizar de esta forma su posterior desarrollo.

Las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* constituyen nemátodos entomopatógenos que se presentan en varias regiones del mundo. Ellos infestan selectivamente muchos insectos y otros pequeños artrópodos, son inocuos al hombre, a los mamíferos y a 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 su uso en el control biológico como agente en el Manejo Integrado de Plagas (Woodring and Kaya, 1988) y su clasificación taxonómica es:

Reino: Animalia

Phylum: *Nematoda*

Clase: *Adenophorea*

Subclase: *Secernentea*

Orden: *Rhabditida*

Suborden: *Rhabditina*

Superfamilia: *Rhabditoidea*

Familias: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*

## 1.2 Ciclo de vida.

La mayoría de los nemátodos tienen un ciclo de vida simple que incluye el huevo, cuatro fases juveniles (separadas por mudas) y el adulto. La fase infectiva es el estado juvenil j3. Los infectivos juveniles (ij<sub>3</sub>) son particularmente resistentes a las condiciones desfavorables ambientales. Los ij<sub>3</sub> tienen células vivas de las bacterias simbiotas en su intestino y llevan la bacteria de hospedante a hospedante. Los infectivos generalmente son envainados dentro de la cutícula del j<sub>2</sub> que no se desprendió de la misma al pasar al ij<sub>3</sub>, pero está separado e intacto de esta segunda pared. Los ij<sub>3</sub> son los únicos de vida libre (fuera del hospedante) y contienen reservas de energía en carbohidratos, no se alimentan y pueden sobrevivir cuando las condiciones son desfavorables (humedad temperatura apropiada y oxígeno disponible) y miden de 400 a 1500 micras dependiendo del largo de las especies (Georgis y Hague, 2009).

*Steinernema* presenta sexos separados en todas las generaciones, de las cuales las hembras son consideradas gigantes y los machos pequeños con producción de prole, donde la primera generación está compuesta por hembras, adultos gigantes que producen la generación subsiguiente, condición que se ha creído sea debido a la abundancia de alimentos. La prole de la próxima generación en muchos casos se alimenta de los suplementos vacíos formando un nuevo infectivo juvenil. Se completa una tercera generación cuando las condiciones son beneficiosas y existe alimento disponible. Los ij<sub>3</sub> salen fuera del hospedante para buscar un nuevo hospedante. El ciclo descrito requiere de 10-14 días para *S. feltiae*, en los últimos instares de *Galleria mellonella*. En pequeños insectos puede permitir una generación (Woodring and Kaya, 1988).

El ciclo de vida de *Heterorhabditis* es esencialmente igual al de *Steinernema*, ya que ellos entran al hospedante además de las aberturas naturales del cuerpo, por otras aberturas y cutícula de la membrana intersegmental más suave, pues

poseen un diente que les permite entrar directamente. La primera generación que se desarrolla es hermafrodita y una generación a partir de esta produce adultos sexuados que producen a su vez los  $ij_3$  (Certis, 2003).

### **1.2.1 Búsqueda y Penetración.**

Estos nemátodos poseen dos estrategias básicas para encontrar al hospedante. 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 nemátodos penetran en el hospedante por las aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) y en el caso de *Heterorhabditis* también pueden penetrar directamente a través del tegumento intersegmental (Castro, 2004).

Esta atracción de los nemátodos a estímulos químicos es atribuida a menudo a la orientación Klinotáctica. Según (Gaugler, 2004) los juveniles infectivos de *Steinernema carpocapse*. Los nemátodos penetran en el hospedante por las aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) y en el caso de *Heterorhabditis* también pueden penetrar directamente a través del tegumento intersegmental (Cruz, 2007).

### **1.2.2 Proceso de infección.**

Una vez que el nemátodo 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 el desarrollo de los nemátodos, que se alimentan 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 escasea el alimento, momento en que los juveniles infestivos abandonan el cadáver y buscan de un nuevo insecto (Gaugler ,2004).

Según (Díaz, 2004) infestan selectivamente muchos insectos y otros pequeños artrópodos, son inocuos al hombre, a los mamíferos y a las plantas. Dentro de sus potencialidades se destacan la relativa rapidez con que causan la muerte a los insectos hospedantes (24-48 horas) y la alta variabilidad de su acción, así como sus habilidades de desplazarse en la búsqueda de los patógenos, lo cual constituye un elemento a tener en cuenta en la utilización como medios biológicos y biorreguladores en la producción agrícola.

### **1.2.3 Bacterias asociadas.**

(Woodring y Kaya ,1988) exponen que la bacteria asociada al mutualismo con *Steinernema* y *Heterorhabditis* pertenece al género *Xenorhabdus* y son móviles con flagelos peritricos, Gram negativas y anaerobias facultativas. Estos autores reconocen dos especies como *X. nematophilus* para *Steinernema* y *X. luminescens* para *Heterorhabditis*, pero (Pozo *et al.*,2003) describen la transferencia del género *Xenorhabdus* a *Photorhabdus*, ubicándose actualmente para los nemátodos del género *Steinernema* las bacterias del género *Xenorhabdus* y para *Heterorhabditis* el género *Photorhabdus*.

(Fisher-le Saux *et al*, 1998) en pruebas de PCR amplificado demostraron la existencia de cinco especies de *Xenorhabdus* asociadas a *Steinernema* de la región del Caribe y son ellas: *X. nematophilus*, *X. poinare*, *X. bovienii*, *X. beddingii* y *X. japonicus* y una sola especie de *Photorhabdus* que es *P. luminescens* para las especies del género *Heterorhabditis*.



La interrelación entre el nemátodo y la bacteria se considera simbiótica porque el nemátodo 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 nemátodo no la transporta ya que se ha demostrado que no es patógena cuando se ingiere directamente. En la simbiosis, el nemátodo posibilita la protección de la bacteria no solo ambiental sino incluso, es capaz de destruir el sistema inmune del insecto con la producción de toxinas extracelulares garantizando de esta forma el desarrollo bacteriano. Además, facilita el transporte de la bacteria desde un cadáver a otro organismo hospedante (K. Divya and M. Sankar, 2009).

Cada especie de nemátodo tiene una asociación natural con una sola especie de bacteria, mientras que una especie de bacteria puede asociarse con más de un tipo de nemátodo. Estos géneros de microorganismos producen antibióticos como característica primordial para la actividad biológica puesto que representa un mecanismo de minimización de la competición de otros organismos por los nutrientes lo cual ha de garantizar al nemátodo su máximo potencial de reproducción (Lewis *et al.*, 2003).

Estas especies de bacterias 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 nemátodo, pero además se ha determinado que juegan un importante papel en la inactivación del sistema de defensa de los insectos al igual que las quitinas (K. Divya and M. Sankar, 2009)

#### **1.2.4 Métodos de obtención, Seguridad y Registro.**

Estos nemátodos son de fácil obtención, pues *Rabditis* especiales de los géneros *Steinernema* (*Naeoplectana*) y Heterorhabditis se pueden criar en condiciones de laboratorio en polillas de la cera (*Galleria mellonella*) o en medios artificiales, lo

que permite utilizarlos como medios de control biológico de diferentes plagas; sus simbiontes son seguros y no muestran evidencia de patogenicidad a los mamíferos, además de lo que ha sido publicado en la literatura científica, han sido conducidas pruebas de seguridad por el Instituto Pasteur y compañías comerciales. Ningún atributo de los nemátodos pudo ser identificado como prohibitivo para el uso en el biocontrol (Ehlers, 2007).

Todas las evidencias científicas disponibles apoyan a la conclusión: los nemátodos entomopatógenos son seguros para el entorno, así como también la producción y el personal de aplicación, para el pueblo en general y para los consumidores de los productos agrícolas tratados con NEPs. Sólo un poco de los riesgos muy remotos pudiera ser identificado, ya que estos son animales beneficiosos y aunque están asociados con bacterias, en la mayoría de los países no se colocan en la categoría de microorganismos para el control de plagas (Ehlers, 2007).

#### **1.2.5 Permanencia de los NEPs en el suelo y mecanismos de supervivencia.**

Según (Blanca *et al.*, 2004) el suelo es un medio de cultivo y en el viven organismos que realizan un conjunto de procesos necesarios para la continuación de la vida, donde los nemátodos entomopatógenos parte de este grupo de organismos, muy importantes en la lucha biológica, destacándose el género *Heterhabditis*, el cual es de gran importancia en el control de plagas e integrante de la fase biológica del suelo.

Se ha demostrado que la mayor cantidad de nemátodos en el suelo se encuentra a unos 10 cm de profundidad aproximadamente, apreciándose una diferencia a los cinco y 15 cm. El hecho de que los mejores resultados se hayan obtenidos a los 10 cm de profundidad tiene su fundamentación biológica en que estos organismos descienden buscando la humedad y a una profundidad de cinco cm hay menor permanencia de estos debido a la influencia de las altas temperaturas y una elevada incidencia de los rayos solares que provocan que los nemátodos se

deshidratan y mueran, en tanto a los 15 cm de profundidad existe un déficit de oxígeno, por lo cual las poblaciones de nemátodos disminuyen (Blanca *et al.*,2004).

Debido a que estos nemátodos son muy susceptibles a condiciones ambientales extremas han desarrollado los siguientes mecanismos de supervivencia (Rodríguez *et al.*, 2012).

1- Agregación: Ocurre comúnmente en muchas especies de nemátodos y les permite protección contra la desecación y radiación solar. En este caso los nemátodos de la periferia mueren y actúan como una barrera que protege contra factores ambientales adversos a los individuos ubicados en el centro.

2- Inactividad: Si bien la movilidad constituye una ventaja en la búsqueda activa de los hospedantes la inactividad que pueden desarrollar se convierte en una ventaja para su supervivencia al reducir el uso de sus reservas energéticas y no resultar atractivos para sus depredadores, reduciéndose las probabilidades de ser encontrados por sus enemigos.

3- Deshidratación: La pérdida de gran parte del contenido del agua de su organismo hasta el punto donde el metabolismo es completamente detenido da como resultado un estado de suspensión total de la animación denominado criptobiosis anhidrobiótica. Esta puede desarrollarse tanto en ambiente natural como en condiciones de laboratorio.

#### **1.2.6 Rango de hospedantes.**

Más de 1000 especies de insectos pertenecientes a los órdenes *Coleóptera*, *Díptera*, *Himenóptera*, *Lepidóptera*, *Ortóptera*, *Isóptera*, *Thysanóptera*, *Homóptera* y *Hemíptera*, entre otros han resultado ser hospedantes de los nemátodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio y campo. A pesar de que se considera que prácticamente no existen especies de insectos que no sean

susceptibles a estos entomopatógenos, lo cierto es que las barreras de comportamiento provocan una reducción de la eficacia de los nemátodos para seleccionar pocos hospedantes o grupos de ellos, de ahí que una vez que son aplicados (al suelo o follaje) en condiciones de campo, las especies (aislamientos) se comporten de manera diferente (Hernández ,2010).

En experimentos de campo muchas plagas han sido controladas con éxito, entre las que se encuentran, *Cylas formicarius* L. (Tetuán del boniato); *Plutella xillostela* L. (polilla de la col); *Spodoptera frugiperda* y otras. (Castellanos ,2000) estudió en condiciones de laboratorio el parasitismo de los nemátodos entomopatógenos *H. bacteriophora* (HC<sub>1</sub>) y *Steinernema spp.* (SC<sub>1</sub>) sobre varias especies del Orden Homoptera: *Coccus viridis* Green (Coccidae), *Aphis gossypii* (Aphididae), *Aleuroglandulus malangae* y *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae). En la evaluación realizada a las 72 horas se determinó que *H. bacteriophora* resulto más eficiente que *Steinernema spp.* sobre las especies de insectos evaluadas con más de 80 % de mortalidad en todas las especies excepto en *tabaci* con un 38,9 %.

Los nemátodos entomopatógenos son utilizados en Cuba desde finales del pasado siglo y diversos colectivos de investigación han abordado su estudio, los que fueron iniciados por Magda Montes, pionera de la temática en Cuba. Los trabajos iniciados por la pionera de esta temática en Cuba, no fueron de prospección y el descubrimiento de la cepa P2M de *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karunakar & David) fue un hecho fortuito y se produjo cuando la autora estudiaba la biología del picudo verde azul de los cítricos (*Pachnaeuslitus* Germar) en campos de La Habana, (Rodríguez *et al.*, 2012).

En la década de los años noventa, la reproducción masiva de nemátodos recibió un impulso ostensible con la introducción de estos organismos en los Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) del Ministerio del Azúcar, donde la cepa HC1 de *H. bacteriophora* y las instrucciones básicas para producirla sobre *G. mellonella* fueron introducidas en 1994 en el Centro de

Referencia de Control Biológico de Quivicán por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (Sánchez, 2003).

Según la información consultada, el primer estudio de prospección lo desarrolló un grupo del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), liderado por la Dra. Lourdes Sánchez a inicios de los años 90. En él se colectaron y analizaron 251 muestras en 27 tipos de cultivos de 9 provincias y se hallaron 7 aislados de nemátodos entomopatógenos (6 de *Heterorhabditis* spp. y 1 de *Steinernema* spp.). Los aislados provinieron de campos de cítricos (*Citrus* spp.), cafeto (*Coffea* spp.) y guayabo (*Psidium guajava* L.), lo que representó un 2,79 % de muestras positivas (Rodríguez *et al.*, 2012).

En Villa Clara, desarrollaron posteriormente otro estudio de prospección, en cultivos de boniato (*Ipomoea batatas* L.), arroz (*Oriza sativa* L.), banano (*Musa* spp.) y sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), y encontraron dos aislamientos del género *Heterorhabditis* en el último cultivo, que denominaron CIAP-DEY-6 y JY-16 (Pozo *et al.*, 2003)

Para lograr el éxito en las aplicaciones de nemátodos entomopatógenos en el control de la broca del café se requiere del establecimiento y supervivencia del nemátodo en el suelo. Para suplir estas demandas se emplean dosis altas en manejo de las plagas incurriendo en grandes gastos económicos, por tanto, constar con cepas autóctonas de las áreas cafetaleras en las condiciones edafoclimáticas de las zonas montañosas de la región central del país en las provincias de Cienfuegos, Villa Clara y Sancti Spíritus sigue siendo una deuda pendiente en el manejo de plagas, que económicamente causan grandes daños a los rendimientos del cultivo.

### **1.2.7 Reproducción Masiva *in vivo* y estrategias de aplicación en plagas agrícolas.**

En este tipo de reproducción se utiliza a los insectos como pequeños reactores biológicos y generalmente se emplean larva de *Galleria mellonella*, lepidóptero conocido como polilla de la cera o de los apiarios, debido a su disponibilidad comercial. Tanto el inóculo como el producto del proceso son los estadios juveniles. Generaciones de nemátodos se desarrollan dentro del cuerpo de las larvas del insecto a temperaturas entre 20 y 25 °C, durante unos 10 días y son colectados empleando las denominadas " Trampas White". Según estos autores, los rendimientos promedios que se obtienen oscilan entre 30 000 y 50 000 juveniles /larva; (Woodring y Kaya ,1988).

Los nemátodos entomopatógenos son compatibles con algunos insecticidas clorinados, carbamatos y órgano fosforados en solución acuosa. Ciertos funguicidas, acaricidas, insecticidas y herbicidas no afectan o tiene poco efecto sobre los infestivos juveniles, potencialmente es factible su aplicación combinada, como lo demuestran los resultados de (Head *et al*, 2000). En cuanto a los medios biológicos, estos autores en 1989, descubrieron que *Bacillus thuringiensis* (Bt) también puede ser combinado con los nemátodos entomopatógenos, ellos observaron que los infestivos juveniles de *Steinernema carpocapsae* penetraron igualmente insectos infestados por Bt que los sanos, pero que los primeros murieron más rápido.

## **2. Materiales y métodos:**

El trabajo se realizó en el Laboratorio Agropecuaria III de la UNISS y en la CCS cafetalera Alberto Delgado, municipio Trinidad. Los suelos para la prospección se tomaron en horario de la mañana de 10 a 15 centímetros de profundidad y a una distancia de 20m entre las muestras dentro de una misma locación. El total de muestras tomadas por cada sitio de prospección estuvo en dependencia del área total y de los cultivos, así como de las condiciones edáficas del mismo.

### **2.1 Aislamiento de nemátodos entomopatógenos:**

Las muestras de suelo se tomarán en porciones pesadas de un kg  $\pm$  0.2 kg, se colocaron en bolsas de polietileno (PVC) y selladas para evitar la pérdida de humedad. En cada punto de muestreo se tomaron dos muestras o más y se anotaron el estado de los suelos respecto a estar o no cultivado, roturado y edad o fenología del cultivo, cercanía con afluentes y en el laboratorio se le agregó agua estéril cada 24 horas para mantener el suelo con la humedad requerida, hasta la colocación de las larvas de *G. mellonella* del último instar, según la metodología propuesta por (Bedding y Akhurst ,1975) de la “Trampa de Galleria”.

Las muestras se enumeraron y colocarán en bandejas de 31cm de largo por 24cm de ancho y 6,5cm de alto, se homogenizó el suelo y en los casos necesarios se aplicó agua destilada y estéril para corregir la humedad del suelo según la metodología de (Gaugler ,1999). En las bandejas se colocaron 10 larvas de *G. mellonella* y se realizaron observaciones cada 24 horas durante 10 días y se anotaron el número de larvas muertas por día, y los cadáveres se retiraron a una placa estéril de 7 cm de diámetro, con papel de filtro esterilizado y se les aplicarán hipoclorito de sodio al 1 % por un minuto, con el fin de esterilizar su cuerpo externamente y poder aislar sin contaminación los nemátodos entomopatógenos. Transcurridos de tres a cinco días posterior a la muerte de las larvas se realizó en el sistema White o Puente y para discernir entre nemátodos parásitos o saprófitos fueron aplicados los postulados de Koch (Poinar, 1990).

Las muestras de suelo una vez terminado el proceso de prospección serán llevadas a los laboratorios de física de suelo del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, para su identificación.

## **2.2 Caracterización de los suelos de las áreas prospectadas de nemátodos entomopatógenos:**

### ➤ **Análisis químico del suelo**

Se realizó utilizando los siguientes métodos:

pH (H<sub>2</sub>O) y pH (KCL): Mediante el potenciómetro. Relación suelo: solución

### ➤ **Análisis Físicos del Suelo**

Se realizó utilizando los siguientes métodos:

**Factor de Estructura (FE):** A través de la determinación de arcilla sin dispersar (b) y arcilla previamente dispersada, de acuerdo con el análisis mecánico (a) según la fórmula de Vageler y Alten citado por (Cairo ,2003).

$$FE = \frac{a - b}{a \cdot 100}$$

**Materia orgánica (M.O.) (%):** Se realizó por el método de Wualkley y Black para lo cual fue utilizado dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado. El pH en agua (pH H<sub>2</sub>O) y en cloruro de potasio (pH KCl), potenciométricamente, en relación suelo - solución 1:2,5. (Cairo, 2000)

## **2.3 Identificación genérica de los nemátodos entomopatógenos:**

Para identificar los nemátodos entomopatógenos y conocer a cual género pertenecen los nemátodos aislados de las larvas muertas se inocularon de nuevo en larvas de *G. mellonella* y después de obtenidos los nemátodos entomopatógenos se determinó el género de los mismos por las tonalidades y coloraciones adquiridas por las larvas cuando mueren. Según el color, se



caracterizan si corresponden a *Steinernema* (sin cambio de color) o *Heterorhabditis* (cambio a rojizo) y se montaron en preparaciones fijas con lugol en un portaobjetos, cubierto por un cubre objetos y observados para su medición y toma de valores cuantitativos en un microscopio clínico a 100 x inmersión.

#### **2.4 Morfometría de nemátodos aislados y determinación del número de hermafroditas/ número de nemátodos por larvas de *G. mellonella*:**

Se realizaron las mediciones a nemátodos colectados tomando la primera generación de infectivos juveniles conservados a 25 °C. Los aislados positivos fueron montados en preparaciones fijas con una solución de lactofenol y posteriormente se le añadió glicerina anhidra que sirvió para deshidratar al organismo y como soporte en el cubreobjetos para evitar el aplastamiento de los especímenes; luego se observaron para su medición y toma de valores cuantitativos en un microscopio clínico a 100 x inmersión.

#### **2.5 Determinación de la viabilidad de la cepa prospectada:**

La cepa aislada se conservó a temperatura ambiente en un frasco especial, de cultivo de microorganismos empleados también en el almacenamiento de estos organismos por autores como (Pozo, 2010) y para el cálculo de la viabilidad se tomó un mililitro de la solución final de los tratamientos y se realizaron N cantidad de disoluciones (1ml en 10ml) hasta que se pudieran cuantificar los individuos vivos y muertos por cada gota. Se realiza la sumatoria se calcula el porcentaje de viabilidad mediante las fórmulas siguientes propuesta por (Woodring y Kaya, 1988), Una vez determinada la viabilidad de esta cepa fue comparada con la cepa P<sub>2</sub>M de *H. indica*:

Donde:

JiV= Porcentaje de ij<sub>3</sub> Vivos

TJivc= Sumatoria de ij<sub>3</sub> vivos contados

TJic= Sumatoria de ij<sub>3</sub> contados

$$JiV = \frac{\sum TJivc \cdot 100}{\sum TJic}$$

## 2.6 Test de susceptibilidad de las larvas de *Galleria mellonella*:

Se realizaron pruebas de inoculación y recuperación con larvas de *G. mellonella* a inoculación de cinco concentraciones, las cuales se compararon los  $j_3$  cosechados con los  $j_3$  cosechados de la cepa control en este caso la identificada para Cuba por (Fisher Le-Soux et al ,1998), en el Centro Internacional de Nematología del Caribe como *Heterorhabditis indica* Poinar P<sub>2</sub>M, y se realizaron los análisis estadísticos para la comparación entre las mismas:

1. 20 individuos juveniles infestiles ( $j_3$ )/ larva en 1ml/ placa
2. 45 individuos juveniles infestiles ( $j_3$ )/ larva en 1ml/ placa
3. 75 individuos juveniles infestiles ( $j_3$ )/ larva en 1ml/ placa
4. 100 individuos juveniles infestiles ( $j_3$ )/ larva en 1ml/ placa
5. 200 individuos juveniles infestiles ( $j_3$ )/ larva en 1ml/ placa

Para el cálculo de las concentraciones del nemátodo se utilizaron las formulas

propuesta por de (Woodring y Kaya ,1988): 
$$S = N \cdot \frac{1}{M} \cdot (x + 1)$$

Donde:

N= Número de nemátodos observados por conteo bajo el microscopio.

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

X+1= Factor de dilución.

S= Concentración (nemátodos/ml.) de la solución inicial.

## 2.7 Procesamiento estadístico

Para la interpretación de los resultados del porcentaje de mortalidad de las larvas se realizó un análisis de varianza simple y comparación de las medias, previa comprobación del supuesto de normalidad por Kolmogorov Smirnov y homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene, estos análisis se realizaron en el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows para las variables viabilidad y susceptibilidad. Estos resultados fueron graficados y tabulados para la discusión.

### **3. Resultados y discusión.**

#### **3.1 Descripción de los suelos prospectados y composición químico y físico**

En el anexo 1 se muestra la descripción del lugar donde se realizó la prospección de y se observa que en los suelos de la finca Castellano se logró aislar muestras de nemátodos entomopatógenos. Este suelo tiene la característica de ser un suelo con limitaciones productivas como ligera pendiente y pedregosidad, pero con buenas características físicas y químicas como se observa en la tabla 1, además de un sistema de riego implementado, lo cual favorece el nivel de nemátodo en el suelo según (Blanca *et al.*, 2004) el suelo es un medio de cultivo, donde los organismos realizan un conjunto de procesos necesarios y en el cual se desarrolla los nemátodos entomopatógenos los cuales necesitan de determinados niveles de agua para su desplazamiento y movilidad en el medio.

En este suelo se aislaron dos cepas de nemátodos, uno perteneciente al género *Heterorhabditis* y otro a los *Mermithide* esto se debe a la influencia del sistema de riego, las precipitaciones y la temperatura durante el período de prospección los cuales favorecieron e influyeron en la metodología del aislamiento como se describe en el anexo 2. Según (Cairo *et al.*, 2007) En la medida que se intensifican las labores producto de la actividad antrópica y sin evaluar el proceso que está ocurriendo trae consigo un cambio en las propiedades que se manifiesta a través de un deterioro del agroecosistema.

Estos resultados refutan lo planteado por autores como (Hernández *et al.*, 2006), quienes afirman que se ha visto que en los suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados la mineralización de la materia orgánica del suelo, conlleva a la pérdida de la actividad biológica (Morell *et al.*, 2007), así como parte del almacén de agua en estos suelos (Borges *et al.*, 2006). La tabla 1 muestra la caracterización del suelo donde se encontraron las cepas de nemátodos, donde el valor del pH en KCl fue mayor la muestra 12, catalogado como medianamente ácido (4,78) además de presentar diferencias estadísticas con el resto que se hallaron dentro del rango de ácido.

Autores como (Jaramillo ,2002) y (Tandrón *et al.* ,2005) han encontrado valores de pH en KCl entre 3,7-4,0 y 3-4,4 respectivamente en este tipo de suelo. Los valores de pH en agua de estos suelos mostraron la muestra 10 se sitúa en el rango de medianamente ácido mientras que la M-6 y M-9 como ácido, existiendo discrepancias estadísticas entre ellas, lo que explica lo obtenido anteriormente en el factor estructura debido a que en la medida que al aumentar la acidez trae como resultado la dispersión de las arcillas, las cuales tienen una acción directa en el número de agregados y este a su vez con el factor estructura según corrobora (Cairo y Fundora ,1994).

En la tabla 1 se observa que los porcentajes de factor estructura para la M-12 y M-10 estuvieron entre 75,68 y 77,21 (Tabla 1) los cuales son valores catalogados como buenos, con diferencia estadística con el resto de las áreas. El menor valor lo presentó la M-10 (a pesar de encontrarse dentro del rango de bueno) con diferencia estadística del resto. En los sistemas se evidenciaron valores de mediano contenido de M.O., lo que concuerda con (Cairo *et al.*, 2007) cuando relacionan a este tipo de suelo con tenores medios de materia orgánica.

Tabla 1: Propiedades físicas y químicas de la finca Castellano

Suelos	Químicos		Físicos	
	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCL)	FE	MO (%)
6 (Plátano)	4.21 ab	5.56 b	71.03 b	4.63 a
9 (Frijol)	3.48 d	4.78 d	68.42 c	4.57 ab
10 (Plátano)	3.80 c	5.48 c	77.21 a	4.65 a
12 (Frijol)	4.78 a	5.92 a	75.68 a	3.69 c
14 (Frijol)	3.94 b	5.48 c	71.67 b	4.05 b
<b>EE (x)±</b>	0.94	0.90	0.82	0.70
<b>CV %</b>	10.70	12.30	13.00	13.20

### 3.2 Identificación, morfometría de la cepa aislada

Los nemátodos aislados fueron descritos por el Laboratorio de Patología de insectos del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas y clasificados como uno perteneciente al género *Heterorhabditis* (denominada JY-16) y otro a los *Mermithide*. Según lo informado por (Kaya y Stock,2007), la sintomatología que producen los nemátodos puede variar, inclusive, entre aislamientos de una misma especie y está relacionada con el color que toma el hospedante, el que puede ser rojo, marrón, púrpura, naranja, amarillo y algunas veces verde. Al respecto, plantea, que los insectos parasitados por *Heterorhabditis*, provocan una coloración roja y los tejidos asumen una consistencia untuosa. Por otra parte, Bertolotti y Doucet reportan una coloración violácea para las larvas de insectos parasitadas por aislamientos de *H. bacteriophora* procedentes de Córdoba, Argentina. En este caso se multiplicaron sobre larvas de *G. mellonella* y los cambios de coloración fueron evidentes.

Estos cambios de coloración que se producen en el período post-inoculación, pueden estar dados por todo el proceso que ocurre desde la entrada del nemátodo al insecto, hasta la salida de los juveniles infectivos en la búsqueda de nuevos hospedantes. Después de invadir la hemolinfa, el nemátodo segrega proteasas que inhiben la actividad del sistema inmune del insecto. De una forma simbiótica la bacteria crea condiciones favorables en el interior del cadáver, para el desarrollo del nemátodo, mediante la degradación de la hemolinfa (Alatorre y Hernández, 2000)

En esta clasificación se determinó además el número juveniles infectivos por cada larva de hermafroditas emergidos de las larvas de *G. mellonella* (Gm) (Figura 1). Tomando en cuenta que cada juvenil proveniente de *Heterorhabditis* que penetra en el insecto tiene potencialidades para la reproducción porque éste se desarrolla en un hermafrodita adulto, se puede inferir el número de nemátodos que penetró en el insecto mediante el conteo de los hermafroditas formados entre los 4 y los 8 días pos inoculación. Los huevos que libera el hermafrodita en el cadáver se

convierten en adultos que realizan otro ciclo reproductivo y los que retiene dentro, se desarrollan en juveniles infectivos.

La figura 1 muestra el resultado del número de hermafroditas entre los días cuatro y ocho pos inoculación, donde se observan que los mayores valores se alcanzan a los cuatro días con menor número de nemátodos por larva. Esta característica es de vital importancia debido a que ilustra el alto potencial de esta cepa quien puede reproducirse de forma rápida y con un número alto de hermafroditas.

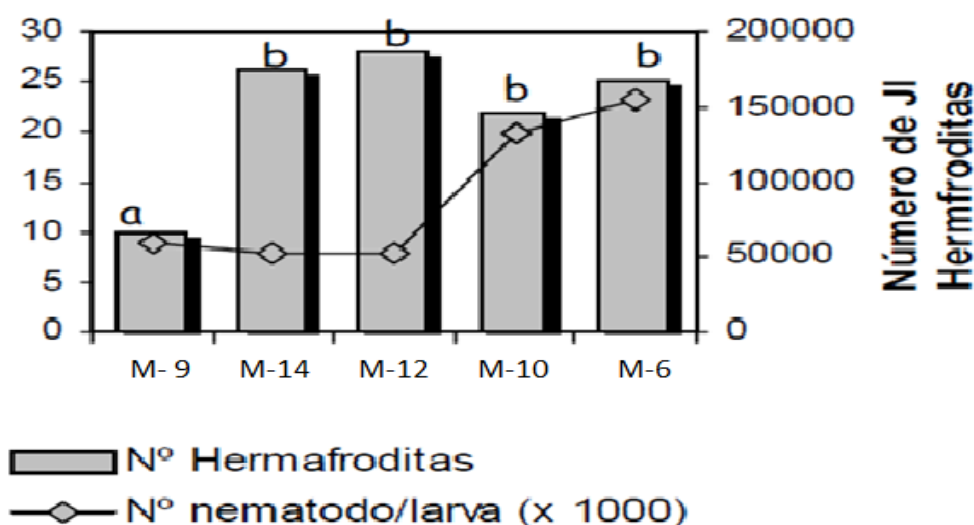


Figura 1: Numero de  $ij_3$  hermafroditas por número de larvas de *G. mellonella*

En trabajos realizados por (Kaya y Stock, 2007) empleando las cepas MC-2 y MC-3 estos valores fueron superiores a 25, lo que no se correspondió con los mayores recobrados de juveniles infectivos. Este comportamiento puede ser atribuido a características intrínsecas, de estos aislados, que pueden presentar un potencial reproductivo menor que el resto. Por el contrario, pudiera ser expresión de una mayor capacidad de búsqueda del hospedante, lo que traería como consecuencia una alta densidad de individuos en las sucesivas generaciones, para los cuales resultaría insuficiente la cantidad de alimento disponible para completar su ciclo biológico.

Al respecto, (Kaya y Stock ,2007) recomiendan de 20 JI/Gm como inóculo inicial para obtener la máxima eficiencia en el proceso de reproducción in vivo, sin embargo, (Sánchez *et al.*, 2003) (inédito)<sup>1</sup> informan de resultados satisfactorios para la cepa HC1 empleando 40 JI/Gm, por lo que fue utilizado este nivel en el trabajo, considerando además lo planteado por (Zervos *et al.*, 1991) quienes obtuvieron un mayor rendimiento con dosis de hasta 50 JI/huésped.

Todo lo anterior confirma que la selección del nivel de inóculo inicial estará en dependencia de las características inherentes a cada aislado. En la literatura se plantea que los rendimientos alcanzados por *H. indica* pueden alcanzar 50 000 – 400 000 JI/Larvas de *Galleria* (Zervos *et al.*, 1991). Los rendimientos de ij<sub>3</sub>/larva obtenidos en este estudio, para cada una de las cepas se encuentran comprendidos en este rango.

(Glazer *et al.*, 2000), compararon el potencial reproductivo de la cepa HP-88 a diferentes temperaturas de incubación, obteniendo a los 25 °C un rendimiento de alrededor de 90 000 JI/larva de *G. mellonella*, mientras que a los 30 y 33 °C se produce un brusco descenso del rendimiento a menos de 20 000 JI/larva. De acuerdo a lo anteriormente planteado podemos decir que el nicho térmico para esta cepa se encuentra comprendido en el rango de 25-30° C para el cual se obtienen los mejores rendimientos de JI. En este estudio, a 28 °C, el rendimiento de HP-88 fue de 155625 JI/larva, lo cual confirma el alto potencial reproductivo de esta cepa a esta temperatura.

### **3.3 Determinación de la viabilidad**

La tabla 2 muestra el resultado de la viabilidad de las cepas en estudios, donde en un primer momento los resultados obtenidos a partir de la cepa *H. indica* cepa P<sub>2</sub>M fueron inferiores a los obtenidos por la cepa JY-16 mostrándose el menor porcentaje de viabilidad a los 21 días en ambas cepas. Estos valores porcentuales inferiores en la cepa P<sub>2</sub>M están dados por la disminución del oxígeno en el medio,

el aumento de la temperatura, a pesar de haber sido expuestos en una solución de agua destilada en función de la adaptabilidad del organismo en cuestión.

Tabla .2 Viabilidad de las cepas P<sub>2</sub>M y JY-16 de *H. indica*

	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
<b>Tratamientos</b>	<b>horas</b>	<b>horas</b>	<b>horas</b>	<b>días</b>	<b>días</b>	<b>días</b>
P <sub>2</sub> M	72.5	67.35	55.3	36.5	30.7	25.2
JY-16	94.9	82.41	80.5	72.75	66.35	39.70

Esto se debe a su conducta y su alta demanda de oxígeno. Por sus características de agregamiento se protegen de las radiaciones solares, la intensidad luminosa y la falta de oxígeno. (Sánchez, 2003), plantea que la *H. indica*, tienen una considerable supervivencia (por encima de cinco meses), su estabilidad depende de las dimensiones del empaque, la especie de nemátodo y el número de ellos. Para obtener dichos resultados se utilizó la fórmula de (Woodring y Kaya ,1988).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Pozo ,2000), en un experimento donde utilizaron varias especies de nemátodos sometidas a diferentes rangos de temperatura y humedad alcanzando valores de viabilidad superiores al 20 % en 60 días, donde los juveniles infectivos deshidratados de *Steinernema feltiae* lograron matar, en 18 horas, a todas las hembras y machos de *Vespula pensylvanica*, tras una hora de exposición a altas temperaturas y humedad.

En otras investigaciones realizadas por (Woodring y Kaya, 1988) quienes obtuvieron generaciones de nemátodos una vez fuera del cuerpo de las larvas del insecto a temperaturas entre 20 y 25<sup>0</sup>C, durante unos 20 días antes de que comenzaran a morir y disminuir su movilidad se demuestra la coincidencia de los resultados obtenidos.

(Connick *et al.*, 1994) lograron un producto granular con los nemátodos uniformemente distribuidos en una matriz de trigo glutenado al que designaron



como Pesta. Con esta formulación lograron almacenar nemátodos durante 20 semanas a 21°C, que fueron capaces de causar un 100% de mortalidad en larvas de *G. mellonella*, además, hizo que disminuyera la emergencia de adultos de dos plagas importantes del maíz y la papa. Sin embargo, no tuvo éxito, pues el calor suministrado a los mismos para su secado, afectó la supervivencia de los nemátodos y los gránulos quedaron muy duros por lo que se dificultó su disolución en el momento de la aplicación.

Según (Pozo ,2000) previo a la formulación, son usualmente almacenados bajo refrigeración en suspensiones acuosas aereadas o en esponjas teniendo en cuenta la inmovilización de los nemátodos (12–15°C) y la oxigenación ajustando la lámina de agua.

#### **3.4 Susceptibilidad de los asilados sobre *Galleria mellonella*:**

Los valores en el porcentaje de mortalidad alcanzados a las 24 horas de evaluado el efecto sobre *G. mellonella* se muestran en la tabla 3 donde, se alcanzan valores superiores al 50% con todas las concentraciones empleadas, lo cual coincide con lo planteado por (Fernández et al,2011) quien refiere la habilidad para buscar e introducir sus bacterias simbióticas dentro del cuerpo del insecto, causando la muerte por septicemia dentro de las 24 a 72 horas, aunque según en insectos pequeños, la mortalidad del hospedero puede ocurrir en minutos. Durante las tres evaluaciones la concentración de 100 Ij<sub>3</sub>/adulto fue la mejor con diferencias estadísticas con las de 20, 45 y 75Ij<sub>3</sub>/adulto en las primeras 24 horas.

Estos resultados destacan la relativa rapidez con que causan la muerte a los insectos hospedantes entre 24 - 48 horas. Por este motivo además de la alta variabilidad de su acción ha despertado gran interés en su uso como control biológico en el manejo integrado de plagas lo cual coincide con (Certis ,2003).

Los efectos de los nemátodos en el control de plagas han sido reportados en experimentos de campo por diferentes autores, como (Jansson ,1991)

; (Castellanos ,2000) y (Marrero ,2003), donde los valores obtenidos en el porcentaje de mortalidad en esta investigación coinciden con sus resultados en el control de coleópteros, *Cosmopolites sordidus* (picudo negro del plátano) y *Cylas formicarius* (tetuán del boniato).

Resultados similares son referido por (Castellanos ,2000), quien en trabajos realizados en el control de insectos con nemátodos entomopatógenos de las especies *Heterorhabditis spp.* y *Steinernema spp.* en condiciones de laboratorio obtuvo valores porcentuales superiores al 80% a las 72 horas.

Estos resultados se deben a que según (Ehlers, 2007) los nemátodos entomopatógenos son seguros al ambiente y a su aplicador, presentan gran diversidad de hospedantes y presentan la ventaja de que buscan a su hospedante, lo localizan y penetran a través del integumento y partes abiertas de su cuerpo para causarles la muerte, lo cual explica estos porcentajes de mortalidad, ya que el experimento fue expuesto directamente y la acción del nemátodo se ve beneficiada.

Tabla 3. Efecto de la cepa *H. indica* P<sub>2</sub>M. Sobre el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Galleria*.

<b>Tratamientos</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
20 l <sub>j3</sub> /adulto	84.67 b	88.20 ab	94.70 ab
45 l <sub>j3</sub> /adulto	85.13 b	93.20 ab	94.60 ab
75 l <sub>j3</sub> /adulto	84.89 b	97.01 a	98.30 a
100 l <sub>j3</sub> /adulto	92.41 a	96.13 a	97.38 a
200 l <sub>j3</sub> /adulto	90.34 ab	90.00 b	94.60 ab
<b>EE (x) ±</b>	0.87	0.76	0.65
<b>CV =</b>	8.70	9.31	7.20

\* Letras no comunes en las columnas difieren según Tukey (p≤ 0.05).

Por su parte cuando se aplicaron estas concentraciones con la cepa de *H. spp.* aislada, los valores porcentuales de mortalidad de las larvas de *G. mellonella* son inferiores en las primeras 24 horas como se muestra en la tabla 4. Unos análisis más detenidos de estos resultados permiten establecer una diferencia entre estas cepas, puesto que a diferencia de la indica JY-16 no alcanza valores superiores al 90% transcurrido 72 horas del experimento.

En trabajos realizados por (Marrero ,2003) en el control de *Plutella xillostela* L. (polilla de la col) con nemátodos entomopatógenos obtuvo un 87% de mortalidad a los cinco días. Además, plantea que las larvas de *Heliothis virescen* (cogollero del tabaco) fueron más susceptibles a *H. indica* que los adultos de esta especie, lo cual coincide con lo expuesto por (Gómez ,1981) y consultado por (Marrero ,2003) que expone “las larvas jóvenes resultan más susceptibles que las larvas viejas y los adultos a la acción de los patógenos”.

En evaluaciones realizadas por (Marrero, 2003) con cepas *Heterorhabditis spp* en el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (palomilla del maíz) demostró que la cepa P<sub>2</sub>M fue la de mayor porcentaje de mortalidad de las larvas a las 72 horas. Los valores de mortalidad de las larvas del insecto inferiores a de los adultos demuestra lo planteado por (Giblen-Davis *et al.*,1996), quienes afirman que es más efectivo el control de adultos que las larvas por sus características de búsqueda e infección del patógeno y en este caso específico se garantiza el factor encuentro entre el nemátodo e insecto.

Tabla 4: Efecto de la cepa *H. spp.* JY. Sobre el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Galleria*.

<b>Tratamientos</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
20 Ij <sub>3</sub> /adulto	23.28 c	35.42 c	41.85 c
45 Ij <sub>3</sub> /adulto	58.85 b	64.57 b	75.00 b
75 Ij <sub>3</sub> /adulto	73.00 a	75.00 a	86.28 a
100 Ij <sub>3</sub> /adulto	75.00 a	77.00 a	84.85 ab
200 Ij <sub>3</sub> /adulto	79.71 a	82.57 a	84.14 ab
<b>EE (x)±</b>	0.77	0.80	0.96
<b>CV %</b>	9.31	7.73	6.24

Letras no comunes en la columna difieren según Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Conclusiones:**

1. Los suelos donde se realizaron los aislados las características físicas y químicas de las muestras donde se encontraba el plátano como cultivo presente mostró los mejores porcentajes de MO y FE con un mayor número de IJ<sub>3</sub> hermafroditas.
2. Lo nemátodos aislados se clasificaron pertenecientes al género *Heterorhabditis* (denominada JY-16) y otro a los *Mermithide* con valores de viabilidad superiores al 92% en 24 horas y superiores a la cepa P<sub>2</sub>M.
3. Los porcentajes de mortalidad alcanzados con la cepa JY-16 en comparación con la P<sub>2</sub>M fueron inferior con todas las concentraciones utilizadas con diferencias estadísticas.

**Recomendaciones:**

Realizar nuevas prospecciones en otros tipos de suelos en el municipio de Trinidad que permitan valorar el comportamiento de los nemátodos como agentes de control biológico.

## **Bibliografías**

Alatorre, R. y Hernández, M. The use of Heterorhabditis for white grub control. *Nematropica*, 2000, vol. 2, nº 30, p. 113. (Abstr.).

Bedding, R. A. y Akhursts, R. J. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 1975, nº 21, pp. 189-110.

Borges, Yenia 2006: Cambio de las propiedades de los suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados por el cambio de uso de la tierra. Tesis de Universidad para Ingeniero Agrónomo, UNAH, La Habana, 87p.

Blanca, L.R., Andino, M., Expósito, I., y Jiménez, C., (2004). Permanencia de Heterorhabditis spp. En el suelo a diferentes temperaturas. *Centro Agrícola*, 25(1), 43-45.

Caballero, S.; Carr, A.; Gil, J.; Armas, J. y Vázquez, L. Diagnóstico de la utilización de entomófagos y entomopatógenos para el control biológico de insectos por los agricultores en Cuba. *Fitosanidad*, 2010, nº 3, pp. 159-169.

Cairo, P. La fertilidad física del suelo y la agricultura orgánica en el trópico [CD-ROM]. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, 180p, 2003.

Cairo, P.: Alternativas para el mejoramiento de los suelos para el cultivo de la caña. *Agricultura Orgánica*, 14(2): 23-25, 2000.

Cairo, P.; A. Reyes: Manual de Edafología. Facultad Agropecuaria. UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, 2007.

Cairo, P.; O. Fundora: Edafología. La reacción del suelo. P. 127. Edición Revol, Cuba, 1994.

Castellanos, L. L. Efectividad de los nemátodos entomopatógenos Heterorhabditis bacteriophora (HC1) y Steinernema spp (SC1) en el control de insectos del Orden Homóptera (pulgones, coqueados y moscas blancas) en condiciones de laboratorio. *Centro Agrícola*, 2000, vol. 1, nº 27, pp. 25-30.

Castro, M. Empleo de nemátodos entomopatógenos (Heterorhabditis spp.) en organopónicos y huertos intensivos como contribución al Manejo Integrado de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae). Trabajo de Diploma. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Centro de Investigaciones Agropecuarias, Santa Clara, 2004.

Certis, S. Productos a base de nemátodos insecticidas para la protección del cultivo [en línea]. Cuba, 2003 [Consulta: 06 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.certis.com.mx/nematode.html>.

Connick, W.J., Jr.; Nickle, W.R.; Williams, K.S.; Vinyard, B.T. (1994): Granular formulations of *Steinernema carpocapsae* (strain All) (Nematoda: Rhabditida) with improved shelf life. *J. Nematol.* 26: 352-359.

Clavel, J.; Rathouz, P.; Moisan, F.; Galanaud, J.; Delemotte, B.; Alpérovitch, A. y Elbaz, A. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*, 2009, vol. 66, nº 4, pp. 494-504.

Cruz A. Estudios bioecológicos de *Homoeosoma electellum* (HULST) y susceptibilidad a agentes entomopatógenos. [Tesis de Maestría]. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas: Santa Clara, Cuba; 2007.

Díaz, Y. Determinación de cepas y concentraciones efectivas de nemátodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) en el control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en el cultivo del maíz *Zea mays*. Trabajo de Diploma. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Santa Clara, 2004.

Ehlers, R. U. Entomopathogenic nematodes. Save biocontrol agents por sustainable systems. *Rev. Phitoprotection*, 2007, nº 79, pp. 94-113.

Fisher, M.; Manleon, H.; Boemare, N.; Brunel, B. y Constant, P. PCR - ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts. *Appl. Environ: Microbiol*, 1998. pp. 4246-4254. 64 (11).

Fernández, J. L.: «Ecología y elementos para el control biológico y cultural de insectos plagas del maíz en cuatro municipios de la provincia Granma, Cuba». Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Universidad Central de Las Villas. Villa Clara. Cuba. Resumen, 31p. 2001.

Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects pest with entomopathogenic nematodes. *Agric Ecosyst. Environ.* 24: 351-360.

Glaugler, R. (1999): Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and *Heterorhabditidae*). En: *Biological control: a guide to natural enemies in North*



América. Weeden, Shelton y Hoffmann (eds).

Gaugler, R. Nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) [en línea]. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, 2004 [Consulta: 04 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/nemátodos.html>.

Georgis, R., y Hague, N.G., (2009). Nematodes as biological insecticides. *Pesticides Outlook*, 2, 29-32.

Giblen-Davis, R. M.; J. E. Peña and R. E. Duncan 1996. Evaluation of an Entomopathogenic Nematode and Chemical Insecticides for Control of *Metamasius mitternervi* (Coleoptera: Curculionidae) *J. Entomol. Sci* 31 (3): 240-51.

Gómez, S. Los entomófagos. En S.J. Gómez (Ed), *Control Biológico*. La Habana, Cuba: Pueblo y Educación, 1981, pp. 172-193.

Glazer, I.; Lewis, E. E. (2000): Bioassays of entomopathogenic nematodes. En: *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Navon, A. y Ascher, K. R. S. (Eds). CAB International

Head, J. K.; Walters, F. A. y Langton, S. The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. *Biocontrol*, 2000, nº 45(3), pp. 345-353.

Hernández, H. Valoración Económica de los daños causados por *Hypothenemus hampei* (Broca del fruto), en granos de *Coffea arabica* Var. Robusta en el Municipio de Pio Vila Nova de Seles, Kuanza Sul, R.P. de Angola. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Protección de Plantas*, 2010, vol. 5, nº 1, pp. 51-60.

Hernández, A., M.O. Ascanio, M. Morales, F. Morell y Yenía Borges, 2006. Consideraciones sobre impactos de los Cambios globales en los suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados (Nitisol ferrálico, éutrico, ródico) de la llanura roja de La Habana. *Cultivos Tropicales* 24(2):41-55.

Jansson, R.K., (1991). *Biological control of Cylas spp. Sweet Potato Pest Management*: Westview Press, 2, 16-201.

Jaramillo, D. F.: Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Medellín, Colombia, 2002, 613 pp.

Kaya H.K., Stock, P., (2007). Techniques in insect nematology. Manual of Techniques in Insect Pathology, 7, 282-324.

K. Divya and M. Sankar. Entomopathogenic nematodes in pest management. Indian Journal of Science and Technology. 2009; Vol. 2 (No. 7).

Lewis, E.E., Gaugler, R., y Harrison, R., (2003). Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. Can. J. Zool, 71, 765-769.

Marrero, P. Nemátodos Entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Plutella xylostella* (Linnaeus.) y *Heliothis virescens* (Fabricius). Tesis de Maestría. Universidad Central Marta Abreu de las Villas: Santa Clara, Villa Clara, Cuba, 2003.

Morell, F., A. Hernández, F. Fernández y Yuselín Toledo 2007. Caracterización agrobiológica de los suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados de la región de San José de las Lajas, en relación con el cambio en el manejo agrícola. Cultivos Tropicales 27(4):13-18.

Poinar, G. Biology and taxonomy. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, 1990, nº 3, pp. 23-61.

Pozo, E., (2000). *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) en la región central de Cuba. Bionomía y lucha biológica. Tesis de doctorado, Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Pozo, E.; López, D. y Martínez, Y. Nuevos aislados de nemátodos entomopatógenos en la región central de Cuba. Centro Agrícola, 2003, nº 4.

Pozo-Velázquez, E.; Sandi-st, L. L. T.; Valdés Herrera, R. y Alizar-Saavedra, T. *Spodoptera frugiperda* (Smith) como sustituto para la reproducción del nemátodo entomopatógenos, *Heterorhabditis* indica Poinar (cepa P2M). En Memorias del Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana. Cuba. 3 al 6 de mayo 2011: 104.

Pozo, E., (2010). Programa de control biológico de los gusanos de las cucurbitáceas. Recuperado de: Curso-Taller para la formación de facilitadores en

provinciales en control biológico (Primer Ciclo), Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

Rodríguez, M. G.; Hernández-Ochandía, D. y Gómez, L. Nemátodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la agricultura en Cuba. *Protección Vegetal*, 2012, vol. 27, nº 3.

Rodríguez, M. y Gómez, L. Nemátodos entomopatógenos: Desarrollo histórico y retos para su eficiente explotación como agentes de control biológico en Cuba. Multimedia «La Sanidad Vegetal al servicio de la Producción de Alimentos». Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Ed.), 2011, p. 30.

Sánchez, L., *Heterorhbditis bacteriphora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Tesis de Doctorado publicado en *Fitosanidad*, Bogotá, Colombia, 84p, 2003.

Sharma, M.; Sharma, A. y Hussaini, S. Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: mass production and commercialisation status - a mini review. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2011, nº 44(9):855-870. 6.

Stuart R. J., Shapiro-Ilan D. I., James R. R., Nguyen K. B. and Mc Coya C. W. (2004) Virulence of new and mixed strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* to larvae of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus*. *Biological Control* 30, 439–445.

Tandrón, I.; P. Cairo; A. Reyes; R. Jiménez; Oralia Rodríguez; Inés Abreu: Relaciones entre propiedades físicas y químicas en suelos ferralíticos rojos de montaña bajo condiciones de experimento de abonos orgánicos y minerales naturales. *Centro Agrícola* 32(3): 75-82, 2005.

Vázquez, L.; Fernandez, E. y Ovies, J. Alcance de Manejo Integrado de Plagas en Cuba. *Manejo Integrado de Plagas en una Agricultura Sostenible*. Recuperado de: Intercambio de Experiencias entre Cuba y Perú, diciembre 2011, p. 225.

Webster, J. M.; Punja, Z. K.; Dunphy, G.; Zhang, J. y Chen, H. Y. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. *J. Inv. Path.*, 1996, nº 68, pp. 101-108.

Wetzel, T. Integrierter Pflanzenschutz und Agrookosysteme. 1995. p. 248.

Woodring, J. L. y Kaya, H. K. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A Handbook of Biology and technique. Southern Cooperative Series. Bulletin 331, Arkansas, USA: 1988. p. 32.

Zervos, S.; S. C. Johnson; Webster, J. M. (1991): Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. Can. Jour. Zool. 69: 1261-1264.

Anexo 1: Descripción del lugar de los muestreos:

Muestreo	Lugar	Tipo de Suelo	Categoría agroproductiva	Régimen de riego y/o posición respecto a reservas de agua	Cultivo actual o precedente
Fecha:22/11/2015					
1	Finca 1: Olivas	Pardos sin carbonato	Apto con limitaciones	Sin sistema de riego	Café
2					Plátano
3					frijol
4					
5					
Fecha:14/12/2015					
6	Finca2: Castellanos	Ferralítico Rojo	Apto con limitaciones	Riego por gravedad	Plátano
7					Frijol
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
Fecha: 24/1/2016					
18	Finca Borge	3: Ferralíticos Rojos	Apto con limitaciones	Sin sistema de riego	Plátano
19					Barbecho
20					
21					
22					

Anexo 2: Comportamiento de las variables temperatura y precipitaciones durante el periodo de investigación

Decenales	Nov.(2015)	Dic.(2015)	Ener.(2016)
1			
T	27.0	25.3	24.1
H	77	83	79
2			
T	26.5	25.3	24.0
H	77	77	73
3			
T	24.7	28.8	24.8
H	76	82	78