

ARTÍCULO RESEÑA

## Nematodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la agricultura en Cuba

Mayra G. Rodríguez<sup>1</sup>, Dainé Hernández-Ochandía<sup>1</sup>, Lucila Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dirección de Protección de Plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas. Provincia Mayabeque, Cuba. Email: [mrguez@censa.edu.cu](mailto:mrguez@censa.edu.cu)

**RESUMEN:** Los nematodos entomopatógenos son eficientes agentes de control biológico y su uso en Cuba está extendido a zonas agrícolas en todo el territorio nacional. Para la elaboración de este artículo se consultaron más de un centenar de documentos de diferentes fuentes y bases de datos. Se recoge la evolución histórica de la Nematología Entomopatogénica en Cuba, desde sus inicios en la década de los 70 y sus actuales desafíos. Instituciones cubanas abordaron investigaciones básicas y aplicadas en todas las fases de desarrollo de un producto contentivo de nematodos entomopatógenos. A partir de diversos estudios se seleccionó a *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar cepa HC1, que 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 *Pachnaeus litus* 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 Hemiptera, entre otras. Teniendo en cuenta la aceptación de los nematodos entomopatógenos por parte de los productores, se establecen entre otros retos para la temática en Cuba: a) Emprender estudios para el desarrollo del cultivo *in vitro* (por fermentación líquida) de nematodos entomopatógenos, aprovechando así capacidades instaladas y experiencia acumulada en el país en la producción de medios biológicos de uso agropecuario; b) Mejorar las formulaciones de nematodos entomopatógenos; c) 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), estudios que demandan la integración de equipos de trabajo multidisciplinarios e inter-institucionales; entre otros retos.

**Palabras clave:** control biológico, *Heterorhabditis* spp., manejo de plagas.

---

### Entomopathogenic nematodes: historical development and challenges for their efficient use as biological control in Cuban agriculture

**ABSTRACT:** The entomopathogenic nematodes are efficient biological control agents and their use in Cuba has been expanded to agricultural areas along the national territory. For this study, more than one hundred documents from different sources and databases were reviewed. The historical evolution of Entomopathogenic Nematology in Cuba, from the beginning in the 70 decade, and the current challenges are summarized. Several Cuban institutions have carried out basic and applied research in all the phases of the scheme to develop an entomopathogenic nematode-based product. From diverse studies, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar strain HC1 was selected, and it is being mass reared in a handmade manner in 33 Entomophagous and Entomopathogenous Mass Rearing Centers (CREE) and applied in dozens of municipalities. The strain P<sub>2</sub>M of *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karunakar & David) is used in the management of different pests, with emphasis on *Pachnaeus litus* Guer; whereas the strains CIAP-DEY-6 and CIAP DEY-7 of *Heterorhabditis* spp. are being used for *Phyllophaga* spp. In Cuba, these strains are used for the management of *Plutella xylostella* L., *Spodoptera frugiperda* Smith, *Heliothis* spp., and several Hemiptera, among others. Taking into account the acceptance of entomopathogenic nematodes by the farmers, the challenges established for this topic in Cuba are: a) to take on studies on *in vitro* culture (liquid fermentation) of entomopathogenic

nematodos, taking advantage of the facilities and experience accumulated in the country in the production of biological control agents for agricultural use; .b) to improve the entomopathogenic nematode formulations; c) to continue the studies related to field applications such as doses, frequency and moment of applications for each key pest, and the compatibility with others products (biological and chemical); studies that demand the integration into multidisciplinary and inter-institutional work teams, among other challenges.

**Key words:** biological control, *Heterorhabditis* spp., pest management.

## INTRODUCCIÓN

Cada día las personas están expuestas con mayor frecuencia a productos químicos a través de los alimentos y el ambiente (1) y gran parte de ellos provienen de los plaguicidas. La preocupación de la sociedad por este hecho se debe a evidencias que relacionan el uso inadecuado de químicos para el control de plagas, con degradación de la calidad de las aguas (2), contaminación de suelos, aparición de insecto-resistencia y problemas de salud en el hombre (3).

En los últimos veinte años crece el número de miembros de los sectores científico, académico y productivo que estudian y/o utilizan otras tácticas de manejo de plagas como el empleo de agentes de control biológico, los que demostraron su efectividad y propiciaron menor uso de los plaguicidas. El empleo inteligente de biorreguladores en el manejo de plagas, teniendo en cuenta los contextos sociocultural, económico y tecnológico de los sistemas agrarios, constituye una alternativa viable, sostenible y posible para países en desarrollo (4).

Los nematodos de las Familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (nematodos 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, entre otros.

Estos nematodos 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 J<sub>3</sub>) pueden ser formulados y almacenados; el registro de los productos se requiere en pocos países; son fácilmente aplicables con los equipos estándares y el riego y numerosas cepas son compatibles con diversos productos químicos y otros agentes biorreguladores (4).

No obstante, poseen también limitaciones, como la necesidad de llevar a cabo aplicaciones múltiples y con altas dosis (0,1 a 1x10<sup>6</sup> JI. m<sup>2-1</sup>) (5), insuficiente

capacitación de extensionistas y productores, así como escasa divulgación acerca de las bondades y del uso correcto de estos organismos en el manejo de plagas (4).

Cuba posee un nivel medio de desarrollo en los estudios relacionados con nematodos entomopatógenos; sin embargo, la información está dispersa en revistas y otras fuentes que con frecuencia no están disponibles en bases 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 nematodos entomopatógenos, elementos que son de interés para la comunidad científica y productiva en América Latina.

Un estudio reciente de Rodríguez y Gómez (6) ofreció un amplio análisis del tema en Cuba, tomando como base la información recogida en decenas de artículos disponibles en revistas científicas y divulgativas y otras fuentes, pero su publicación fue a través de una multimedia de distribución limitada, y resulta necesario hacer una síntesis de los resultados, plasmarlos en un medio de amplia circulación y visibilidad a través de sitios de internet en la Revista Protección Vegetal.

Por ello el objetivo de este artículo fue realizar un análisis de tópicos relevantes del desarrollo histórico de la temática de Nematología Entomopatogénica en Cuba, para dar a conocer algunos de los resultados obtenidos y establecer los retos en la temática para investigadores y productores en el futuro inmediato.

## PARTE ESPECIAL

Los nematodos entomopatógenos ejercen un control efectivo sobre una amplia variedad de plagas en diversos cultivos, pero es necesario determinar el mejor candidato (especie/cepa de nematodo) que será utilizado. Para ello se necesita información de la biología, ecología y susceptibilidad de la plaga hospedante, tolerancia a factores ambientales de la especie/cepa de nematodo, su estrategia de búsqueda, compatibilidad con otros agentes de control biológico, entre otros aspectos (7), estudios que se iniciaron en Cuba desde los años 70 del pasado siglo.

El desarrollo de una cepa hasta constituir el ingrediente activo de un producto recorre un largo camino y generalmente sigue la ruta descrita por Gaugler (8), que abarca: *prospección; aislamiento; establecimiento del rango de hospedantes; estudios de virulencia; estudios para la reproducción masiva y formulación*. Paralelamente, se desarrollan sistemas de gestión de calidad, que aseguren el adecuado mantenimiento de los aislados en los laboratorios, la producción (artesanal o industrial) hasta la evaluación de las formas de aplicación y efectividad del producto en campo (4).

Instituciones científicas y universidades cubanas abordaron diferentes aspectos en la ruta de desarrollo de estos biorreguladores y los aportes de cada grupo propiciaron que en la actualidad cepas seleccionadas de nematodos se empleen en diversos agroecosistemas para el manejo de plagas. Además, especialistas cubanos colaboraron con Venezuela (9) y la Organización No Gubernamental PROBIOMA (Bolivia), contribuyendo así al desarrollo de la temática en países de Latinoamérica.

Del análisis de unos 100 documentos (artículos, tesis de Doctorado y Maestría, informes técnicos de Programas Nacionales de Ciencia y Tecnología, comunicaciones en eventos, otras) que fueron consultados para este estudio, sobresale el hecho de que tres instituciones concentran más del 50% de la información generada: el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), la Universidad Central «Martha Abreu» de Las Villas (UCLV) y el Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT). Este último fue la única institución del país que en los años 70 y 80 abordó la temática. Otros centros científicos y universidades del país se acercaron al tema en diversos momentos, pero los trabajos no fueron sistemáticos y resultaron escasos los estudios publicados.

## **PROSPECCIÓN, IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS Y SUS BACTERIAS SIMBIOTES EN CUBA**

### **Prospección, identificación y caracterización de nematodos y bacterias simbiotes**

Los trabajos iniciados por la pionera de esta temática en Cuba, la insigne profesora Magda Montes, no fueron de prospección y el descubrimiento de la cepa P<sub>2</sub>M 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 (*Pachnaeus litus* Germar) en campos de La Habana (10).

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 nematodos entomopatógenos (6 de *Heterorhabditis* spp. y 1 de *Steinernema* sp.). Los aislados provinieron de campos de cítricos (*Citrus* spp.), café (*Coffea* spp.) y guayabo (*Psidium guajava* L.), lo que representó un 2,79 % de muestras positivas (11).

En Villa Clara, Pozo *et al.* (12) desarrollaron posteriormente otro estudio de prospección, en cultivos de boniato (*Ipomoea batatas* L.), arroz (*Oriza sativa* L.), banano (*Musa* sp.) y sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), y encontraron dos aislamientos del género *Heterorhabditis* en el último cultivo, que denominaron CIAP-DEY-6 y CIAP-DEY-7.

Los aislados de nematodos entomopatógenos informados en Cuba se ubicaron en los géneros *Steinernema* Travassos y *Heterorhabditis* Poinar, destacándose la presencia de la especie nativa *Steinernema cubana* (*cubanum*) Mrazek, Artaega-Hernández & Boemare (13).

Los resultados publicados evidenciaron mayor frecuencia de aparición de *Heterorhabditis* spp., género en el cual se ubicaron las cepas P<sub>2</sub>M de *H. indica* Poinar, Karunakar & David (14), HI-24, CIAP-DEY-6 y CIAP DEY-7 (12, 15) y HC1 de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (11).

Ambos géneros de nematodos, poseen relación simbiótica con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente, cuyo metabolismo secundario propicia la muerte del insecto y condiciones para la nutrición del nematodo, por ello se realizan en paralelo el estudio del nematodo y su bacteria simbiote. No obstante, aún cuando se conoce de la importancia de la bacteria asociada a cada cepa y de su especificidad, resultaron escasos los resultados publicados en Cuba acerca de identificación y caracterización de los simbiotes.

Al respecto, Pérez *et al.* (16) estudiaron las bacterias simbiotes de *H. indica* cepa P<sub>2</sub>M y *S. cubana*, e identificaron a *Photorhabdus luminescens* P-01 y *Xenorhabdus* sp. X-01, respectivamente, acotando que mostraron actividades proteasa, lipasa, lectinasa y antibiótica.

Por su parte, Martín (17) encontró que la cepa bacteriana HC1 asociada a *H. bacteriophora* poseía 97% de similitud fenotípica con la especie *P. luminescens*, con una mayor asociación fenotípica con el grupo de subespecies *P. luminescens* subsp. *laumondii* / *kayaii* / *thracensis*.

Estas bacterias presentan dos fases, primaria y secundaria, las que difieren en adsorción de colorantes, respuesta a pruebas bioquímicas y producción de antibióticos (18). Ambas son patógenas a insectos, sin embargo, la fase primaria es la de mayor actividad biológica, de ella depende la efectividad patogénica del complejo y la factibilidad de su reproducción masiva (19), por lo que resulta importante monitorear la estabilidad de la fase primaria en los procesos de reproducción y mantenimiento de ceparios.

En este sentido, se determinaron como indicadores de calidad de la fase primaria de la cepa *P. luminescens* P<sub>2</sub>M, el desarrollo de actividad lipídica considerable, hidrólisis de proteína (agar gelatina), producción de antibiótico y bioluminiscencia (20).

Por su parte, Martín (17) determinó que *P. luminescens* cepa HC1 fue catalasa y ureasa positiva e indol y Nitrato-reductasa negativa. La cepa posee fuerte actividad lipolítica y proteolítica, y posee hemolisina (citolisina).

Sabiendo que la bacteria puede cambiar de fase en los procesos de mantenimiento de cepas y cría masiva, Sánchez *et al.* (21) determinaron que la cepa HC1 de *H. bacteriophora*, después de ser sometida a reproducción continua durante 3 años en laboratorio, cambió sus características, pues disminuyó significativamente su potencial reproductivo y bioluminiscencia. De igual modo, Martín (17) utilizando electroforesis de proteínas totales (SDS-PAGE), constató que la bacteria en fase I presenta una proteína de unos 40Kd que no se presentó en las bacterias de la cepa mantenida en laboratorio durante 20 ciclos seguidos.

### **Evaluación de la efectividad en diferentes dianas como parte de los estudios de selección**

Como parte de la caracterización de cepas, en Cuba se evaluaron los nematodos entomopatógenos contra diversas plagas (11, 22, 23, 24, 25, 26) en diferentes condiciones experimentales y todos los insectos fueron susceptibles en mayor o menor medida en al menos uno de sus estadios. La mortalidad varió en dependencia de la combinación especie de nematodo/ cepa y del hospedante/estadio del insecto.

En el análisis se evidenció que la mayor parte de los estudios se efectuaron en condiciones *in vitro* o semicontroladas y emplearon mayoritariamente dianas de los órdenes Lepidoptera, Hemiptera y Coleoptera, debiéndose ampliar el espectro de dianas a evaluar, entre ellas minadores, trips y otros invertebrados de importancia agrícola y sanitaria en Cuba.

Las primeras evaluaciones en campo se realizaron hace más de 30 años, cuando se determinó el impacto de sus-

pensiones de nematodos entomopatógenos y de larvas de *G. mellonella* infectadas con nematodos, sobre poblaciones conocidas de *P. litus* en viveros de cítricos (27).

En campo, se evaluó también la efectividad *H. bacteriophora* (cepa HC1) en el manejo de chinches harinosas, aplicando al ruedo de plantas de cafeto (*Coffea* spp.) suspensiones de  $8 \times 10^4$  JI.L<sup>-1</sup>. Cuatro meses después, las plantas tratadas exhibieron poblaciones de chinches significativamente menores que las testigos sin tratar (25).

Por su parte, *H. indica* cepa CIAP DEY-7, fue evaluada en condiciones de campo en el manejo de *S. frugiperda* en maíz, donde aplicaron 500 JI.planta<sup>-1</sup> con una efectividad técnica de 72,2% (28). De igual modo, las cepas de *Heterorhabditis* sp. CIAP-DEY-6 y CIAP-DEY-7 y P<sub>2</sub>M (*H. indica*), fueron efectivas en el manejo de plagas, pues redujeron poblaciones de larvas de *S. frugiperda*, *P. xylostella* y *H. virescens* en campo (29).

En condiciones de organopónico, se comprobó que *H. indica* cepa P<sub>2</sub>M y *Heterorhabditis* sp. cepas CIAP-DEY-6 y CIAP-DEY-7 disminuyeron poblaciones de *D. hyalinata* en pepino (*Cucumis sativus* L.), con superior efectividad técnica de 67,65% (cepa P<sub>2</sub>M) y 61,65% (CIAP-DEY-6), respectivamente (30).

Otros estudios en campo se efectuaron también con *H. bacteriophora* HC1, y se constató su potencial en el manejo de chinches harinosas (Pseudococcidae) de la vid (*Vitis vinifera* L.), piña (*Anana comosus* (L.) Verr.) y mariposa (*Hedychium coronarium* Koeng.), así como plagas de suelo en el césped de campos de golf (4).

### **Dosis de aplicación en campo**

Recientemente, Rodríguez *et al.* (4) dieron a conocer elementos acerca de dosis, momentos y frecuencia de aplicaciones de nematodos entomopatógenos en varias combinaciones cultivos/plagas clave. Los autores indicaron que en cultivos temporales (boniato, maíz, col de repollo, calabaza (*Cucurbita* spp.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.)) se deben hacer 2 ó 3 aplicaciones por ciclo, mientras que en cultivos permanentes (cafeto, piña y otros), la frecuencia depende del ciclo de la plaga, fenología del cultivo, otros.

En un estudio reciente (5), se reafirmó que a nivel mundial las dosis que demostraron mayor efectividad se encontraron por encima de  $10^5$  JI.m<sup>-2</sup>.

Este tema requiere de mayor investigación en Cuba, resultando necesario establecer protocolos para el trabajo de varios grupos de investigación en diferentes condiciones agroecológicas y cultivos, lo que ofrecerá información que luego será validada en condiciones de producción agrícola en diversos territorios del país.

### Evaluaciones de uso combinado de nematodos entomopatógenos y otros agentes bioactivos

El uso de diversos agentes de control biológico en el manejo de plagas es una práctica usual y en Cuba se efectuaron estudios de laboratorio y campo donde se utilizaron nematodos entomopatógenos y otros agentes de control biológico o bioproductos de uso agrícola.

Las combinaciones de la cepa HC1 de *H. bacteriophora* con *Beauveria bassiana* Balm. V. (31), *Lecanicillium lecanii* (Zimm) Viegas (32), y FitomaS-E® (bio-estimulante cubano - Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar) se evaluaron en laboratorio y la cepa resultó compatible con los tres productos (33).

De igual forma, se estudió en campo el efecto de la aplicación conjunta de *H. bacteriophora* cepa HC1 y FitomaS-E® en boniato, maíz y col de repollo con resultados muy favorables, lo que sugirió la posibilidad de utilizarlos en el manejo de estos cultivos (33), y se convirtió en una práctica habitual en zonas de la Provincia Mayabeque.

Por su parte, Rodríguez *et al.* (26) evaluaron el efecto de liberaciones de *Cephalonomia stephanoderis* Bertem y aplicaciones de *H. bacteriophora* cepa HC1 en parcelas de cafeto, donde el Índice de Infestación por broca de café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) disminuyó a 1,5% en los campos tratados con ambos biorreguladores.

Un estudio similar fue llevado a cabo en col de repollo (34), donde se combinaron aplicaciones de *H. bacteriophora* y liberaciones de *Tetrastichus howardi* (Olliff) para el control de *P. xylostella*, con resultados satisfactorios, pues los daños de *P. xylostella* (expresados como el porcentaje de hojas dañadas) fueron mayores en la parcela testigo (50,94%), y menores (10,79%) en el área donde actuaron parasitoides y nematodos entomopatógenos.

### Permanencia de poblaciones de nematodos entomopatógenos en campo luego de su aplicación para el manejo de plagas

Con relación a la supervivencia de los J1 en suelo, se evaluó en condiciones de campo (*I. batata*) la persistencia de *Heterorhabditis* sp., luego de que se aplicaron 800J1.m<sup>-2</sup>, y se constató mayor permanencia de los nematodos a 10cm de profundidad y la mayor viabilidad en el suelo apróximadamente entre los 30 y 35 días (35).

Por su parte, Rodríguez *et al.* (36) encontraron que la cepa HC1 de *H. bacteriophora*, se mantuvo en suelos de cafeto de Buey Arriba (Provincia Granma) tres me-

ses después de aplicarse en campo para el manejo de broca del café, lo que está relacionado con la capacidad de reciclar en el suelo utilizando como hospedantes a insectos que habitan ese agroecosistema.

### ESTUDIOS PARA LA REPRODUCCIÓN MASIVA Y FORMULACIÓN EN CUBA

Los nematodos entomopatógenos pueden reproducirse *in vivo* e *in vitro*. El tipo y escala productiva depende de varios factores, entre ellos la disponibilidad de recursos, mano de obra, tipo de mercado, entre otros aspectos (37).

#### Producción *in vivo*

En Cuba, la producción de agentes de control biológico es mayoritariamente artesanal y se realiza en unos 264 Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE), contando también con cuatro plantas industriales que producen generalmente *Bacillus thuringiensis* Ber. (38).

La reproducción de nematodos entomopatógenos en Cuba se ejecuta en 33 CREE enclavados en zonas de producción de caña de azúcar, donde producen unos 700 millones de juveniles infectivos cada mes (39), para el manejo de plagas de caña de azúcar y otros cultivos. En estos establecimientos los nematodos se producen exclusivamente por el método *in vivo*, que emplea a insectos como pequeños reactores biológicos, utilizando *Galleria mellonella* Lin. pues se utiliza como hospedante en la cría de *Lixophaga diatraea* Towns y otros biorreguladores y resulta económico su empleo (40).

Aun cuando los nematodos entomopatógenos fueron estudiados desde finales de los años 70 en Cuba, no es hasta los 90 que su desarrollo recibió impulso, con la introducción de esa línea de producción en los CREE de zonas cañeras, que llegó en los 90 e inicios de este siglo, a producirse en más de 60 CREE. Esto fue posible porque la cepa HC1 de *H. bacteriophora* e instrucciones básicas para su reproducción, fueron introducidas en el CREE del Central «Pablo Noriega» en 1994 por el CENSA (40).

Posteriormente se diseñó una metodología de reproducción, basada en la descrita por Dutky *et al.* (41) y modificada por el equipo del CENSA, que incorporó elementos de control de calidad y sustratos alternativos para la cría de *G. mellonella* (11, 42).

La metodología, los sustratos alternativos y la cepa HC1 fueron transferidas también a un centro en zonas montañosas para su generalización en zonas cafetaleras para el manejo de la broca del café (43), trabajo

que se lleva a cabo por el Ministerio de la Agricultura en la actualidad, donde CREE enclavados en zonas productoras de café producirán estos biorreguladores para el manejo de la broca.

Recientemente, Pozo *et al.* (44) determinaron la factibilidad de emplear *S. frugiperda*, como hospedante alternativo en la producción masiva de los nematodos entomopatógenos, utilizando en su alimentación *Sorghum halepense* Pers.

En Cuba, el uso de sistemas de gestión de calidad en los CREE permite obtener diversos agentes de control biológico. Dicho sistema incluye, entre otros, controles de materias primas, procesos de producción del hospedante y del producto final (nematodos entomopatógenos).

### Reproducción masiva *in vitro*

El cultivo monoxénico de estos organismos (bacteria y nematodo) se desarrolló a partir de los años 60, empleando la fermentación en sustratos líquidos y sólidos (45).

A partir de los estudios iniciales, una amplia variedad de componentes fueron empleados para suplir las necesidades del complejo nematodo-bacteria, que comprenden entre otros, vísceras de aves y mamíferos, aceite de maíz, levadura, colesterol, soya, grasa de origen animal y yema de huevo. La mayor parte de estos componentes son alimento humano y poseen altos costos en el mercado internacional, por lo que en Cuba se evaluaron sustratos alternativos para el cultivo *in vitro* de nematodos entomopatógenos.

En este sentido, dos equipos de investigación desarrollaron medios de cultivos alternativos. Los primeros estudios los emprendió el colectivo del CENSA (11) que evaluó sustratos sólidos que contenían grasa de pescado, papa, boniato, maíz, harina de soya y otros, encontrando combinaciones muy favorables (46). Este estudio culminó en la escala de producción en erlenmeyer de 1L de capacidad, donde eran embebidos fragmentos de esponja de polieter-poliuretano. La patogenicidad de los nematodos obtenidos fue evaluada de forma satisfactoria.

Por otra parte, Valdez *et al.* (47) evaluaron cuatro medios de cultivos nutritivos en sistema bidimensional y para la reproducción del complejo *H. indica* - *P. luminescens* emplearon combinaciones de hígado de pollo con almidón e hígado de cerdo combinado con melaza, almidón y polvo de arroz, demostrando que todos estos sustratos permitieron la reproducción del complejo.

A pesar de los modestos avances logrados en Cuba en el cultivo sólido de nematodos entomopatógenos, se sabe que, para los propósitos de biocontrol, el cultivo líquido es preferible para la reproducción de *Heterorhabditis* spp. Al respecto Shapiro-Ilan y Gaugler (48) señalaron que este tipo de reproducción es el proceso más eficiente en costo para obtener productos.

Teniendo en cuenta la demanda actual de nematodos entomopatógenos y la existencia en Cuba de capacidades instaladas en la industria del biocontrol para acometer la reproducción *in vitro* líquida, deben desarrollarse investigaciones para establecer una tecnología de reproducción masiva por fermentación en medio líquido de nematodos entomopatógenos que permita avanzar en la escala productiva y lograr formulaciones comerciales de amplio uso en agricultura, salud pública y otros sectores.

Con relación a las formulaciones de nematodos, Sánchez *et al.*, (49) recomendaron el uso de esponjas de polieterpoliuretano y determinaron las dimensiones, concentración de JI y tiempo de conservación de *H. bacteriophora* cepa HC1 en dichas esponjas, indicando que la viabilidad de los nematodos depende de la calidad del agua en la formulación y las reservas de lípidos que posean.

A pesar de la existencia de la metodología para formular los nematodos en esponjas, la mayoría de los CREE comercializan los nematodos en suspensiones acuosas en embases de diferentes dimensiones, lo que trajo en no pocas ocasiones problemas en las aplicaciones por muerte de los JI en la transportación.

## CUBA: EXPERIENCIAS DEL USO DE BIOPREPARADOS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN CAMPO

En Cuba, el uso los nematodos entomopatógenos en campo se registró mayormente en zonas donde están enclavados los 33 CREE que producen la cepa HC1 (*H. bacteriophora*) y que generan biorreguladores para el manejo de plagas en plantaciones de caña de azúcar.

Las producciones en esos establecimientos son de unos 700 millones de juveniles infectivos por mes (39), los que se emplean en el manejo de plagas de lepidópteros en plantaciones cañeras y otros cultivos.

Los productores refirieron resultados muy satisfactorios en el manejo de las siguientes combinaciones cultivo/plaga: Arroz/ *Lissorhoptrus brevirostris* Su.; cítrico / *P. litus* y *Atta insularis* Guérin; boniato / *C.*

*formicarius*; café / *H. hampei* y pseudococcidos; piña / *Phyllophaga* spp. y pseudococcidos; col de repollo / *P. xylostella*; hortalizas/ varios lepidópteros; ornamentales/ *A. insulares*; maíz/ *S. frugiperda*; forestales/*Ips* spp., entre otros (40, 50, 51).

En zonas de la Provincia Mayabeque, importantes polos de producción agrícola en el occidente de Cuba, los nematodos entomopatógenos representan uno de los agentes de control biológico de mayor uso y popularidad entre los productores por su acción rápida y alta eficiencia técnica (52).

Otros cultivos importantes en Cuba como tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), banano-plátano (*Musa* spp.), y otros en desarrollo como soya (*Glicina max* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), flores de corte y ornamentales deben ser objeto de estudios futuros para establecer la efectividad de nematodos entomopatógenos en el manejo de sus plagas más importantes.

Para el desarrollo de estudios en campo se debe potenciar el trabajo colaborativo entre instituciones cubanas y la incorporación de estudiantes de universidades a las investigaciones, lo que potenciaría el conocimiento y uso de estos agentes de control biológico en diversos territorios.

## RETOS PARA LA NEMATOLOGIA ENTOMOPATOGÉNICA EN CUBA

La temática posee un nivel de desarrollo en Cuba, el camino transitado desde los estudios desarrollados por las profesoras Magda Montes y Eva Arteaga, hasta nuestros días, aportaron elementos muy valiosos que hicieron que los nematodos entomopatógenos sean agentes de control biológico populares y demandados por los productores en el país. Sin embargo, numerosos son los desafíos que enfrentan los equipos de investigadores/extensionistas y productores para ser emprendidos en los próximos años. Señalamos algunos que, en nuestra opinión deben recibir atención prioritaria:

- Desarrollar estudios de todas las cepas seleccionadas con el empleo de técnicas de biología molecular para el estudio de nematodos y sus bacterias simbiotas, como elementos importantes en el proceso de obtención y protección de formulados comerciales.
- Iniciar estudios de toxinas de origen proteico y metabolitos secundarios de los simbiotas bacterianos de las cepas que han demostrado alta eficacia en el manejo de plagas, los que pudieran tener nuevas aplicaciones agrícolas.

- Lograr la infraestructura necesaria para el establecimiento y mantenimiento de colecciones especies/ cepas, así como una página web con información relevante, con fines docentes y científicos.
- Empezar el desarrollo del cultivo líquido (por fermentación), aprovechando así capacidades instaladas y experiencia acumulada en el país en la producción de medios biológicos de uso agropecuario.
- Mejorar las formulaciones de nematodos entomopatógenos para facilitar las aplicaciones e incrementar su vida en anaquel y la persistencia luego de ser aplicados.
- Continuar estudios relacionados con las aplicaciones en campo como: dosis, frecuencia y momento de aplicación para cada diana; equipos de aplicación; compatibilidad con otros productos (químicos y biológicos) y su uso en nuevas dianas.
- Elevar la preparación de profesionales, productores, decisores y la sociedad en el tema de nematodos entomopatógenos.
- La creación y/o fortalecimiento de redes de trabajo debe ser incorporada como un estilo de trabajo para las instituciones cubanas que abordan el tema trabajo.
- Aumentar la divulgación de los resultados obtenidos en Cuba a través de revistas científicas.

Los elementos recogidos en este estudio evidencian los resultados obtenidos por Cuba en el desarrollo y uso de nematodos entomopatógenos en el manejo de plagas y los retos que deben aun enfrentar los equipos de investigación/extensión y productores, en aras de lograr cubrir las demandas de estos biorreguladores en el país, en un contexto en que resulta necesario producir alimentos sanos.

## AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Hector Rodríguez Morell y Belkis Peteira Delgado-Oramas, por la revisión crítica del documento. A la Ing. Nery Hernández, de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), por facilitarnos parte de la información contenida en diversas revistas cubanas del periodo 1978-1990.

## REFERENCIAS

1. Reffstrup TK, Larsen JC, Meyer O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2009;56:174-192.

2. Rice PJ, Horgan BP, Rittenhouse JL. Evaluation of core cultivation practices to reduce ecological risk of pesticides in runoff from *Agrostis palustris*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010;29(6):1215-1223-
3. Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, Alpérovitch A, et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2009;66(4):494-504.
4. Rodríguez MG, Rosales LC, Enrique R, Gómez L, González E, Peteira B, et al. Los nematodos entomopatógenos y su uso como agentes de control biológico para el manejo de plagas agrarias. 2011. ISBN: 978-959-125-39-6 (Cuba). 95pp.
5. Sharma MP, Sharma AN, Hussaini SS. Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: mass production and commercialisation status - a mini review. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2011;44(9):855-870.
6. Rodríguez MG, Gómez L. Nematodos 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». 2011. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Ed.). 30pp.
7. Lawrence AL. The role of basic and operational research in the development of entomopathogenic nematodes for control of insect pests. *Bio-control Matters*. (Association of Natural Bio-control Producers). 2006;7(1):6.
8. Gaugler R. Mass Production technology of entomopathogenic nematodes. Conferencia ofrecida en Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Habana, Cuba. 21/6/2002.
9. García R, Rosales LC, Fernández-Larrea O, Pérez MC, Rodríguez MG. Impacto del programa de transferencia tecnológica de control biológico en el INIA, mediante el convenio Cuba Venezuela. *INIAHOY*. 2009;3:217-223.
10. Montes M. Informe sobre un nematodo del género *Neoapectana* como enemigo natural de las larvas del picudo verde azul *Pachnaeus litus* (Coleoptera, Curculionidae). *Cienc. Téc. Agric. Cítricos y otros frutales*. 1978;3(1):43-45.
11. Sánchez L. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. [Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 100 pp. 2002. (Número de depósito Centro Nacional de Derecho de Autor, CENDA. Ciudad de la Habana, 9613-2002).
12. Pozo E, López D, Martínez Y. Nuevos aislados de nematodos entomopatógenos en la región central de Cuba. *Centro Agrícola*. 2003; No. 4, año 30: 94-95.
13. Mracek Z, Hernández EA, Boemare NE. *Steinernema cubana* sp. n (Nematoda: Rhabditidae: Steinernematidae) and preliminary characterisation of its associated bacterium. *Jour Inverteb Pathol*. 1994;64:123-129.
14. Stack CM, Easwaramoorthy SG, Metha UK, Downes MJ, Griffin CT, Burnell AM. Molecular characterisation of *Heterorhabditis indica* isolates from India, Kenya, Indonesia and Cuba. *Nematology*. 2000;2(5):477-487.
15. Castellanos LL, González JB, Jacomino M. Efectividad del aislado HI-24 de *Heterorhabditis* sp, en el control biológico del pulgón negro del plátano (*Pentalonia nigronervosa* Cq1. (Homoptera: Aphididae), en condiciones de laboratorio. *Centro Agrícola*. 2000;27(3):19-22.
16. Pérez Y, Márquez ME, Gómez M. Caracterización de la fase primaria de las bacterias simbiotas de los nematodos entomopatógenos *Steinernema cubanum*, *Heterorhabditis indica* y *H. bacteriophora*. *Fitosanidad*. 2006;10(3):193-195.
17. Martín D. Identificación, caracterización y reproducción masiva del simbiote bacteriano de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HC1. [Tesis presentada en opción al Título de Maestro en Ciencias Biológicas]. 2007. Universidad de La Habana, Cuba. 80pp.
18. Boemare N. Biology, Taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Pp 35-56 En *Entomopathogenic Nematology*. R. Gaugler (Ed.). CABI Publishing. 2002.
19. Gaugler R, Grewal P, Kaya HK; Smith-Fiola D. Quality Assessment of Commercially Produced

- Entomopathogenic Nematodes. Biological Control. 2000;17:100-109.
20. Márquez ME, Fernández-Larrea O, Arteaga E. Indicadores para determinar la fase primaria de *Photorhabdus luminescens*. Rev Protección Veg. 1997;12(2):85-88.
  21. Sánchez L, Christopher JE, Rodríguez MG, Gómez L, Soler DM. Alteraciones en el comportamiento de una cepa de *Heterorhabditis bacteriophora*. Rev Protección Veg. 2003;18(1):49-52
  22. Lobaina AA, Calzadilla V, Piedra F. Estudio preliminar del control de *Spodoptera frugiperda* con nematodos entomopatógenos. Fitosanidad. 1999;3(1):81-82.
  23. Gómez L, Soler DM, Sánchez L. Virulencia y potencial reproductivo de aislamientos cubanos de nematodos entomopatógenos. Rev Protección Veg. 2001;16(1):50-54.
  24. Pozo E, Sisne ML, Rodríguez U, González Y, Valdés R. Susceptibilidad de escarabajos (Coleoptera; Scarabaeidae) presentes en la piña *Ananas comosus* (L.) Merrill en Ciego de Ávila a nematodos entomopatógenos. Parte II. Géneros *Phyllophaga* y *Cyclocephala*. Centro Agrícola. 2006; año 33, no. 3: 83-86.
  25. Rodríguez I, Martínez MA, Sánchez L, Rodríguez MG. Comprobación en campo de la efectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HC1 en el control de chinches harinosas (Homoptera: Pseudococcidae) del café. Rev Protección Veg. 1998;13(3):195-198.
  26. Rodríguez MG, García M, Gómez G, Rodríguez Y, Enrique E, et al. Producción y utilización de nematodos entomopatógenos en el manejo de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). [Informe final de Proyecto de Investigación, 2008. Programa Ramal de Entidades Exóticas. Ministerio de la Agricultura]. República de Cuba. 177pp.
  27. Arteaga E, Montes M, Broche R, Chang B. Utilización de *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae) contra *Pachnaeus litus* (Coleoptera, Curculionidae) en Cuba. Cienc. Téc. Agric. Citricos y otros frutales. 1984;7(2):79-85.
  28. Rojas J, Gómez-Sousa JR, Barreada A. Control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) con diferentes medios biológicos. Centro Agrícola. 2001;28 (2):19- 22.
  29. Marrero MA. Nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Plutella xylostella* (Linnaeus.) y *Heliothis virescens* (Fabricius). [Resumen de tesis de MSc]. Centro Agrícola. 2006;33(2):90.
  30. Pozo E, Valdés R, Mora E, Cárdenas M. Consumo de área foliar del pepino y umbral económico y señalización de *Diaphania hyalinata* (Linn.) (Lepidoptera; Pyralidae) y control con nematodos entomopatógenos en organopónicos. Rev Protección Veg. 2004;19(3):196.
  31. Sánchez L, Rodríguez MG. Potencialidades de *Heterorhabditis bacteriophora* Milstead y Poinar cepa HC1 para el manejo de *Hypothenemus hampei* Ferr. II. Compatibilidad con *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y Endosulfan. Rev Protección Veg. 2008;23(2):104-111.
  32. González E, Enrique R, Rodríguez MG. Compatibility between *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar strain HC1 and *Lecanicillium lecanii* Zare & Gams strain Verticen-01 in laboratory conditions. Rev Protección Veg. 2012;27(3): 214.
  33. Rodríguez MG, Enrique R, González E, Gómez L, Bertolí M, Montano R, et al. Desarrollo y uso racional de nematodos entomopatógenos en el manejo de plagas. En VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Ciudad de la Habana, Cuba. 2008.
  34. Casanova Y, Díaz M, Naranjo F, Álvarez JF, Barroso G, Albuernes F, et al. Evaluación de las potencialidades parasíticas de *Tetrastichus howardi* (Olliff) y efectividad combinada con *Heterorhabditis bacteriophora* contra *Plutella xylostella* Lin. en col. Congreso Internacional del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Mayabeque, Cuba. 2010.
  35. Liens BR, Andino M, Expósito I, Jiménez C. Permanencia del *Heterorhabditis* sp. en el suelo a diferentes profundidades. Centro Agrícola. 1998;25(1):43-44.
  36. Rodríguez MG, Hernández M, Borrero Y, Gómez L, Enrique R. Recycle of entomopathogenic

- nematodes in soils grower coffee crop (*Coffea* spp.) in Buey Arriba. *Rev Protección Veg.* 2011;26(1): 67.
37. Gaugler R, Han R. Production technology. En *Entomopathogenic nematology*. R. Gaugler (Ed), CAB International, Wallingford. 2002. pp. 289-310.
38. Jiménez-Ramos J. Importancia estratégica del programa nacional de lucha biológica para la producción de alimentos en Cuba. En *Memorias del Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria*. Habana, 3 al 6 mayo 2011. Pp.13.
39. Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA-AzCuba). Informe de la XIX Reunión Nacional de variedades, semilla y sanidad vegetal. Sancti Spiritus, Cuba. 23-25 febrero 2011. 152pp.
40. Sánchez S. El CREE de Margarita, algo más que un sueño. *Agricultura Orgánica*. 1997; Año 3 (2-3): 5-8.
41. Dutky SR, Thompson JV, Canwell GE. A technique for mass propagation of the DD-136 nematodes. *Jour Insect Pathol.* 1964;6:417.
42. Enrique R, Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L; Valle Z. Dietas alternativas para la cría de *G. mellonella*. Influencia sobre el rendimiento - peso de larvas de *Galleria mellonella* y recobrado de juveniles infectivos. 2006. Obra depositada en Centro Nacional de Derecho de Autor, Cuba. (CENDA). Ciudad de la Habana. Registro 2874-2006.
43. García M, Rodríguez Y, Cabrera D, Gómez L, Rodríguez MG. Producción de nematodos entomopatógenos en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la Montaña en Cuba. *Rev Protección Veg.* 2007;22(2):131-133.
44. Pozo-Velázquez E, Sandi-St. Louis LL, Valdés-Herrera R, Alizar-Saavedra T. *Spodoptera frugiperda* (Smith) como sustituto para la reproducción del nematodo entomopatógeno, *Heterorhabditis indica* Poinar (cepa P2M). En *Memorias del Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria*, La Habana. Cuba. 3 al 6 de mayo 2011: 104.
45. Friedman MJ. Commercial production and development. Pp. 153-172. En *Entomopathogenic nematodes in biological control*. R. Gaugler; H. K. Kaya (Eds). CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor-Boston. 1990.
46. Sánchez L, Soler DM, Gómez L, Martín D. Medios de cultivo para la cría *in vitro* de *Heterorhabditis* spp. Oficina Cubana de Propiedad Industrial: Patente OCPI 882/2006.
47. Valdés Y, Lobaina A, Márquez ME, Gómez M, Escobar M. Reproducción de *Heterorhabditis indica* en cultivos bidimensionales elaborados con proteína animal. *Fitosanidad*. 2006;10(1):29-31.
48. Shapiro-Ilan DI, Gaugler R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2002;28:137-46.
49. Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Soler DM, Hernández MA, Castellanos L, et al. Desarrollo de una Metodología para la reproducción artificial de nematodos entomopatógenos para el control de plagas en café. PNCT: Desarrollo Sostenible de la Montaña. Código: 0703023. Informe final proyecto- CENSA. 2001 (Metodologías Depositadas en Centro de Derechos de Autor, (CENSA), Cuba, número 09613/ 2002).
50. Infante C. Manejo integrado del tetuán del boniato. *Agricultura Orgánica*. 2005;11(1):19-20.
51. Vázquez LL, Caballero S, Carr A, Gil J, Armas JL, et al. Diagnóstico de la utilización de entomófagos y entomopatógenos para el control biológico de insectos por los agricultores en Cuba. *Fitosanidad*. 2010;14(3):159-169.
52. Rodríguez MG, González E, Rosales LC, Miranda I, Hernández MA, Gómez L, et al. Factores que limitan el uso apropiado del control biológico en zonas de las Provincias Habana y Matanzas, Cuba (Resultados preliminares). CD *Memorias del V Congreso Internacional de Control Biológico*. 25, 26 y 27 de Noviembre del 2008. Mérida, Venezuela.

**Recibido: 20-11-2011.**

**Aceptado: 5-5-2012.**