

Efecto de factores abióticos sobre la viabilidad e infectividad de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* cepa HC1



Effect of abiotic factors on viability and infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* strain HC1

<http://opn.to/a/VSnTK>

Giselle Calabuche-Gómez ^{1*}, Roberto Enrique Regalado ², Dayris García Perera ², Ileana Miranda Cabrera ², Dulce María Soler ¹, Mayra G. Rodríguez Hernández ²

¹Grupo de Investigación Farmacéutica, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Laboratorio de Nematología Agrícola, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de tres factores abióticos sobre la viabilidad y patogenicidad de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.*, cepa HC1, como estudios iniciales para la obtención de una formulación comercial. Se desarrollaron tres ensayos para determinar el efecto de tres tipos de agua diferentes (potable, hervida, destilada y desionizada), pH (5; 7 y 9) y rangos de temperaturas (22±1°C; 25±2°C; 27°C) sobre la viabilidad e infectividad de juveniles infectivos a los siete y 35 días. En el ensayo con los tipos de agua se utilizaron dos concentraciones de juveniles infectivos (JI): 5x10⁴ y 10⁵ JI por placa; los resultados se evaluaron a través de Análisis de Varianza bifactorial y prueba de rangos múltiples de Duncan (95 %). En los experimentos de pH y temperatura se presentan los resultados a los siete y 35 días, cuando se determinó viabilidad (%) e infectividad, medida a través del porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* L. Los datos se procesaron mediante Prueba de Wald por corrección y se usó software CompaProWin 2.0. En ambas concentraciones, los mayores valores de viabilidad se obtuvieron cuando se empleó agua destilada. Entre 60 y 100 % de los JI sobrevivieron a los siete días en pH entre 5 y 9, con los mayores valores en pH 7; mientras que, a los 35 días, fue de 40 y 60 %. La temperatura fue el factor abiótico que más efecto negativo tuvo en la viabilidad e infectividad de la cepa. Este estudio evidenció que *H. amazonensis* cepa HC1, puede ser almacenada en formulaciones acuosas, en bandejas y esponjas, utilizando agua destilada con pH neutro y a temperaturas frescas de unos 22±1°C.

Palabras clave: control biológico, bioplaguicida, juveniles infectivos, nematodos entomopatógenos.

ABSTRACT: The objective of this study was to determine the influence of selected abiotic factors on the viability and pathogenicity of *H. amazonensis* strain HC1, as initial studies to obtain a commercial formulation. Three trials were developed, where infective juveniles (IJ) were maintained under the effect of each factor for several weeks. In the first test, it was evaluated the effect of different types of water (tap water, boiled, distilled and deionized) on IJ at the concentrations of 5x10⁴ and 10⁵ IJ per plate (15 cm diameter). The data related to the viability of IJ were processed through the two-factor analysis of variance and the Duncan's multiple range test (95 % significance level). Using the water type selected in the first test, three solutions at pH 5, 7, and 9 were prepared and evaluated at the temperatures of 22±1°C, 25±2°C, and 27°C. The values were processed by Wald's test by correction, and CompaProWin 2.0 software was used. The viability and infectivity of IJ in the temperature and pH tests were determined by using the one-in-one test with larvae of *Galleria mellonella* L. The highest survival values of IJ were obtained with distilled and boiled water, pH 5 and 7, and at temperatures of 22±1°C.

Key words: biological control, biopesticides, entomopathogenic nematodes, infective juveniles.

*Autor para correspondencia: Giselle Calabuche-Gómez. E-mail: gisellecg@censa.edu.cu

Recibido: 22/09/2019

Aceptado: 12/11/2019

INTRODUCCIÓN

La desmedida utilización de los insecticidas químicos constituye uno de los mayores problemas actuales de la agricultura, pues afecta, a largo y mediano plazos, la salud del hombre, los ecosistemas (1) y conlleva a la aparición de poblaciones de plagas resistentes al control (2). El control biológico, con el uso de ácaros, virus, bacterias, hongos y nematodos entomopatógenos (3), representa una opción para el manejo de plagas de forma segura, pues no afectan las plantas y vertebrados, y su aplicación en el campo no presenta toxicidad aguda o crónica para los humanos (4).

Los nematodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son muy utilizados como agentes de control biológico (5). Ambas familias son parásitos obligados de insectos y matan rápidamente a sus hospedantes (6), incluyendo insectos que habitan en zonas protegidas como criptas y túneles (4). Estos nematodos poseen diversos atributos como agentes de control biológico, ya que son seguros para el hombre y, por lo general, seguros para organismos no dianas y el ambiente; además, por su relativa fácil producción y aplicación, amplia gama de hospedantes y capacidad de búsqueda (7).

Desarrollar productos, cuyo ingrediente activo sean especies/cepas de nematodos entomopatógenos eficientes en el control de plagas, requiere de estudios diversos que incluyan factores abióticos que afecten la eficacia de las formulaciones. Factores como la temperatura, humedad, pH, radiaciones UV y el tipo de suelo afectan la actividad biorreguladora de los nematodos entomopatógenos en dependencia de la especie/cepa, por lo que resulta necesario estudiar cada población para determinar los parámetros óptimos para su desempeño como controles biológicos (8).

En el año 2005, Chen y Glazer (9) refirieron que la viabilidad de los nematodos depende, en parte, de la cantidad de agua contenida dentro y alrededor de sus cuerpos, y que las altas temperaturas intervienen directamente sobre este punto, representando factores con alta influencia sobre los procesos fisiológicos y comportamental de los nematodos (10), constituyen los rangos

extremos (<1; >35°C) letales en la mayoría de los casos (11), al igual que los valores de pH por encima de diez; sin embargo, refieren que entre 4-8 no corren el riesgo de provocarles daño (12). Estos factores pueden no ocasionar la muerte de los nematodos, pero sí afectar su movilidad e infectividad, lo que tendría un impacto en su actividad biorreguladora.

La especie *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* (13) cepa HC1 se produce masivamente en más de dos decenas de laboratorios en Cuba y se utiliza para el manejo de diversas plagas en cultivos como col de repollo (*Brassica oleracea capitata* B.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y boniato (*Ipomoea batatas* Lam.) y, en menor medida, en café (*Coffea* spp.), cítricos (*Citrus* spp.) y maíz (*Zea mays* L.), entre otros (14). Sin embargo, resultan escasas las investigaciones sobre el efecto de factores abióticos sobre esta cepa.

Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la influencia de factores abióticos sobre la viabilidad e infectividad de *H. amazonensis* cepa HC1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios se realizaron en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (23° N; 82° O), Cuba, entre octubre y diciembre de 2017 y entre abril y julio de 2018.

Se utilizaron juveniles infectivos (JI) de la cepa HC1 de *H. amazonensis* (GenBank: BankIt1899363 Hamaz_HC1 KU870321), obtenidos en el Laboratorio de Nematología Agrícola (CENSA), utilizando el método de reproducción *in vivo* sobre *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) descrito por Dutky *et al.* (15), con modificaciones de Sánchez *et al.* (16) y utilizando los sustratos sugeridos por Enrique *et al.* (17).

Para todos los ensayos se emplearon JI recién emergidos, luego de las actividades iniciales para el “refrescamiento” de la cepa (16) y provenientes de cadáveres que presentaron la coloración que sugiere que la cepa está en buenas condiciones (14). Los JI se recolectaron utilizando Trampa White (18) modificada y presentaron 100 % de viabilidad.

Para los ensayos que lo requirieron, se utilizaron larvas del último instar de *G. mellonella*, obtenidas en el laboratorio (16,17). Para cada prueba, se pesaron las larvas de *G. mellonella* en balanza digital (Kern JKL®) y se utilizaron las que tuvieran ≥ 200 mg.

Para obtener las concentraciones de nematodos establecidas para cada ensayo, se utilizó el método descrito por Glazer y Lewis (19). Los tres ensayos siguieron diseños completamente aleatorizados.

Efecto del agua de diferentes características en la viabilidad de la cepa HC1 de *H. amazonensis*

Se evaluó el efecto del agua de diferentes características (agua potable, hervida, destilada y desionizada) sobre la viabilidad de los JI. El agua destilada se obtuvo en el laboratorio, tratando agua potable, por un destilador GFL (Gesellschaft für Labortechnik, Alemania) para todos los ensayos. El agua desionizada fue suministrada por el Centro de Biopreparados (BIOCEN). El agua hervida se obtuvo sometiendo a calor con un horno de microondas (PANASONIC invertir 1200W, USA) por 10 minutos y el agua potable del pozo situado en el centro.

Cada tratamiento (combinación de agua de diferentes características y concentración de JI) consistió en tres placas Petri de 15 cm de diámetro (réplicas) donde se añadieron 100 ml de cada tipo de agua y se utilizaron dos concentraciones de JI: 5×10^4 y 10^5 JI por placa.

A cada tipo de agua se le determinó pH y conductividad eléctrica, utilizando un pH-

conductímetro LPt 100 Meter Toledo® y se comprobó que cumplían los estándares establecidos en normas cubanas e internacionales (20,21,22). (Tabla 1)

Las placas se mantuvieron en el laboratorio ($T=22 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 49 días y las evaluaciones se realizaron cada siete días, momento en que se evaluaron el pH y conductividad del agua. En cada evaluación se determinó el número de JI vivos en cada tratamiento; para ello se colectó el agua de cada placa (réplica) en probetas de 100 ml, se homogenizó, se tomaron 5 ml con una pipeta y se trasvasaron a probetas de 50 ml que se completó a su volumen total con cada tipo agua. De esa suspensión final se tomó 1 ml y se vertió en una placa contadora de PVC de paredes verticales para contabilizar el total de JI vivos, utilizando un microscopio estereoscópico Zeiss STEMI DV 4® a 25 aumentos.

Antes de cada evaluación, se constató el olor y color del agua; así como la aparición de contaminantes y la formación, por parte de los JI, de acumulaciones semejantes a pequeñas rosetas, relacionadas con el fenómeno de agregación descrito por Ishibashi y Kondo (23).

Análisis estadístico

Los tratamientos se evaluaron semanalmente durante 49 días, determinando el número de JI vivos y se presentan, en este trabajo, los resultados de la viabilidad a los 7 y 35 días. Se probó la normalidad de la variable viabilidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas por la prueba F. Se compararon los datos mediante un análisis de varianzas bifactorial y prueba de rangos múltiples

Tabla 1. Valores promedios de pH y conductividad eléctrica de los tipos de aguas utilizadas en el estudio del efecto de estas sobre la viabilidad de los JI de *H. amazonensis* cepa HC1 y su comparación con sus correspondientes rangos establecidos en las normas cubana e internacionales / Table 1.

Average pH values and electrical conductivity of the water types used in the study of their effect on viability of the IJ of *H. amazonensis* strain HC1 and their comparison with the corresponding ranges established in Cuban and international standards

Tipos de agua	Valores de pH y conductividad en tipos de agua			
	Obtenidos en el estudio		Informados por normas (20,21,22)	
	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Potable	7,5	560	6-9	<4000
Hervida	8,6	47,2	No obtuvimos referencias	
Destilada	7,4	0,3	5-7	<1,1
Desionizada	7,2	0,1	5-7	<1,1

de Duncan para un nivel de significación de 95 %. Se empleó el paquete estadístico InfoStat versión 2016.

A partir de los resultados en este ensayo, se seleccionó el tipo de agua que se utilizó en los experimentos posteriores de pH y temperatura.

Efecto del pH y la temperatura sobre la viabilidad y patogenicidad de *H. amazonensis* cepa HCl

Para cada ensayo se utilizaron placas plásticas de 24 celdas (marca Costar®), una placa por tratamiento (tres pH y tres temperaturas). Las celdas de las placas plásticas se enrasaron con 2 ml de las soluciones de pH (para estudio de pH) o de agua destilada (ensayo de temperatura) y se colocaron diez JI en cada pocillo. Los JI se extrajeron de las suspensiones de nematodos utilizando un pelo o selector y con el auxilio de un estereomicroscopio Zeiss STEMI DV 4® a 25 aumentos.

Ensayo de pH

Utilizando agua destilada, se prepararon soluciones con diferente pH 5; 7 y 9, mediante el uso de HCl (0,1 mol/L) y NaOH (0,01 mol/L). Para preparar las soluciones se utilizaron una balanza digital Kern JKL®, un pHmetro Sevencompact® 5220 Meter Toledo y un agitador magnético IKA C-MAG MS7®. Las soluciones se mantuvieron a 22±1°C hasta su uso.

En cada evaluación se determinó el pH y se comparó con las soluciones antes preparadas (soluciones reservadas en recipientes de vidrio, tapadas y mantenidas en oscuridad a 22±1°C), para conocer si existía modificación del pH por parte de los JI; además, se tomó la temperatura diariamente.

Ensayo de temperatura

En este ensayo, los JI se colocaron en agua destilada (pH 7,4; Conductividad: 0,3 µS/cm) y se evaluaron tres temperaturas, 22±1°C (en cuarto climatizado), 25±2°C (condiciones de laboratorio con temperatura ambiente) y 27°C (en incubadora FRIOCELL®).

Efecto sobre la viabilidad

En ambos ensayos, las evaluaciones se realizaron cada siete días hasta completar los 42 días. Se observó la viabilidad de 40 JI al evaluar cuatro pocillos por semana en cada tratamiento;

para ello se tuvieron en cuenta su movilidad, la adherencia de partículas extrañas en sus cuerpos, así como la translucidez o no de la parte terminal de sus cuerpos, como signo de sus reservas lipídicas (16,24).

Los JI vivos se extraían de los pocillos y se mantenían en una placa, para luego evaluar su infectividad.

Efecto sobre la infectividad

Para la evaluación de la infectividad de los JI se utilizó el ensayo de infectividad *uno en uno* (19) sobre papel de filtro, con la modificación relacionada con la extracción de un JI y su colocación sobre la larva. Se utilizaron placas de 24 celdas (marca Costar®) y se colocaron pequeños discos de papel de filtro (Whatman No.GB/T1914-2007, Ø 15 cm) humedecidos con 30 µl de agua destilada, utilizando una pipeta TopPette Single Channel Pipettor vol. 0,5-10 µl.

De los 40 JI evaluados anteriormente en la prueba de viabilidad, se tomaban 10 JI por cada ensayo de pH y temperatura y se procedió de la siguiente forma: dentro de cada celda se dispuso una larva de *G. mellonella*, previamente inmovilizada a temperaturas entre -8 a -5°C durante tres a cinco minutos. Transcurrido este tiempo, se extraía un JI de la suspensión formada de los cuatro pocillos, con un pelo o selector, y se colocaba encima de la larva. Esta operación se repitió con los nueve JI restantes. Para evitar la salida de las larvas, se cubrieron los pocillos con discos de mallas de 300 µm y se incubaron a 27°C en oscuridad; el porcentaje de mortalidad se registró a las 72 h. Igualmente, se observó si los cadáveres de *G. mellonella* presentaron la coloración marrón oscura a las 72 h, descrita para la cepa evaluada (14).

Las larvas parasitadas se aislaron y se almacenaron de 5-10 días a 26±2°C (temperatura tomada dos veces al día con un termómetro analógico FISIONS) en placas Petri, forradas internamente con una capa de papel de filtro (Whatman No.GB/T1914-2007, Ø 15 cm), humedecidas con 1 ml de agua destilada. Posteriormente, las larvas almacenadas se les realizó una pequeña disección bajo un estereomicroscopio (Zeiss®Stemi, DV4) con ayuda de una aguja y una espátula entomológica y se comprobó la presencia de nematodos

entomopatógenos en varios estadios, como indicador de patogenicidad (25).

Análisis Estadístico

Se realizaron tres réplicas de cada ensayo. Se seleccionaron los mejores valores de pH y temperatura en cuanto a viabilidad y patogenicidad mediante la prueba de Wald por corrección por continuidad, del software CompaProWin 2.0 (26).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del agua de diferentes características en la viabilidad de la cepa HC1 de *H. amazonensis*

En cuanto a porcentaje de vivos, se originaron diferencias significativas entre los tratamientos (diferentes características de agua), con ambas concentraciones de JI, a los siete y 35 días. (Fig. 1)

A los siete días, los mayores resultados de supervivencia se obtuvieron con agua destilada y hervida a la concentración de 5×10^4 JI por placa, con valores por encima de 90 % de viabilidad, seguido del agua potable con 82,1 %; no así en agua desionizada con un resultado de 67,6 %. Estos rangos de viabilidad se mantuvieron a los 35 días de haberse establecido el ensayo.

Por otro lado, al aumentar la concentración de JI a 10^5 en 100 ml en los tratamientos de agua

destilada, hervida y potable, se observó una disminución significativa del porcentaje de vivos con respecto a la concentración anterior.

Los resultados de este estudio coinciden con los obtenidos por Sánchez (30) al comparar la viabilidad de los JI de esta cepa cuando se mantenían en aguas destilada y potable. Estas se usaron como soportes líquidos de formulados en bolsa de polietileno transparente y fragmentos de esponjas de poliéster-poliuretano para su almacenamiento; el agua idónea fue la destilada. Se produjo menor proliferación de contaminantes y fue mayor el periodo en que los JI se mantuvieron con altos porcentajes de viabilidad entre 45 y 60 días. El agua hervida, donde se produjo menor cantidad de contaminantes que en el agua potable, exhibió mayores porcentajes de viabilidad de JI.

Las características organolépticas se mantuvieron en todos los tipos de agua durante los primeros días; sin embargo, se produjo fetidez con la aparición de contaminantes en el agua potable en las últimas dos semanas. Por otro lado, la formación de agregados de JI que se observó en todos los tratamientos disminuyó gradualmente al pasar de los días.

Según Ishibashi y Kondo (23), la agregación ocurre, comúnmente, en muchas especies de nematodos entomopatógenos y es un

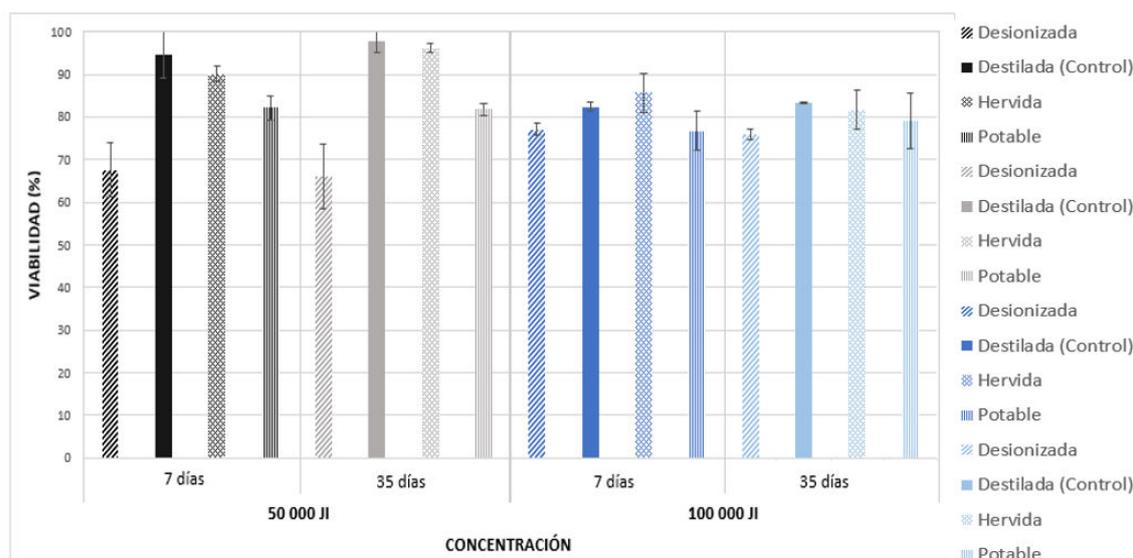


Fig. 1. Viabilidad (%) de los juveniles infectivos (JI) de *H. amazonensis* cepa HC1 mantenidos por 35 días en agua de diferentes características, utilizando dos concentraciones de JI en placas Petri (5×10^4 JI y 1×10^5 JI) ($p < 0,05$) / Viability (%) of infectives juveniles (IJ) of *H. amazonensis* strain HC1 maintained in water with different characteristics for 35 days; two concentrations of IJ in Petri dishes (5×10^4 JI y 1×10^5 JI) were used ($p < 0.05$)

comportamiento que puede ser conducido por sensibilidad mecánica o táctil; este posee valor en la supervivencia de los JI contra la desecación o la luz solar. Es un fenómeno frecuentemente observado en los estudios de laboratorios.

La mortalidad de los JI en agua “potable” podría estar relacionada con el aumento que se produjo de organismos contaminantes en las suspensiones de JI, los que pudieran haber competido por el oxígeno con estos últimos.

El oxígeno es esencial para la supervivencia de los nematodos entomopatógenos (27). Se pudo comprobar en diversos estudios donde, previo a ensayos de formulación, los JI se mantuvieron en laboratorios en suspensiones acuosas en refrigeración entre 6 y 12 meses donde recibieron aireación (28). El oxígeno constituye también un factor limitante para los JI en diferentes tipos y condiciones de suelos (27). Otra causa de la mortalidad de JI en las suspensiones de agua potable podría estar relacionada con el hecho de que los contaminantes excretaran al medio productos de su metabolismo, que pueden ser tóxicos a los JI y provocarles la muerte.

Sánchez (16) sugirió utilizar agua hervida para lograr la limpieza de soluciones de nematodos cuando no se posea agua destilada en los laboratorios. Sin embargo, para la formulación de nematodos entomopatógenos en esponjas siempre se debe elegir el agua destilada, como medio

eficiente para ofrecer la humedad requerida para la supervivencia, dispersión y acción de los nematodos en general (27,30).

Efecto del pH y la temperatura sobre la viabilidad y patogenicidad de la cepa HC1 *Heterorhabditis amazonensis*

Tanto a los siete días como a los 42, los mayores valores de viabilidad e infectividad de los JI de *H. amazonensis* cepa HC1 se obtuvieron a pH 5 y 7; mientras que, los mayores valores de mortalidad en larvas de último instar de *G. mellonella*, se obtuvieron con JI que se mantuvieron en soluciones de pH=7. El pH= 9 afectó a los JI desde los siete y hasta los 42 días, donde murieron más del 50 % de los JI. (Fig. 2)

A los 42 días los valores más bajos de viabilidad se produjeron en pH 9, lo que ratifica lo planteado por Kung *et al.* (31), quienes señalaron que un rango de pH entre 4-8 aseguraba la sobrevivencia de los nematodos. Según Strauch *et al.* (32), pH bajos inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico; sin embargo, valores de pH por debajo de 3 tienen un efecto negativo sobre *H. bacteriophora* y *H. indica*.

A los 42 días los JI mostraron sus cuerpos transparentes con solo algunas pequeñas zonas oscurecidas, relacionadas con sus reservas de lípidos. Un estudio realizado por Patel *et al.* (33) indicó que dos especies de *Steinernema* agotaron sus reservas de lípidos entre 44 y 47 días, lo que

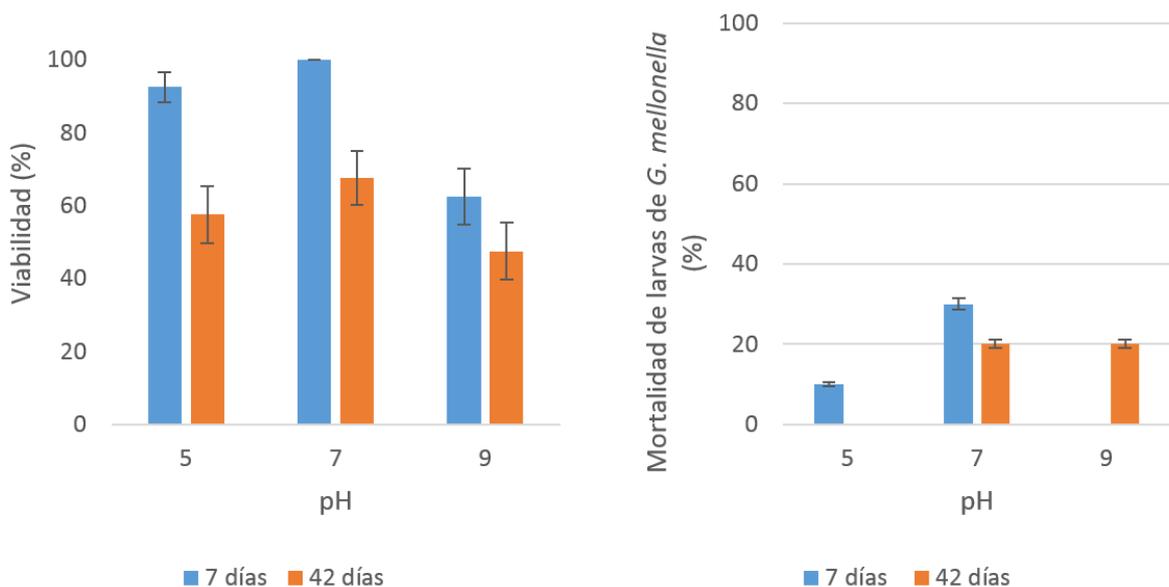


Fig. 2. Valores de viabilidad de JI y mortalidad de *G. mellonella* (en el ensayo de infectividad *uno en uno*) mantenidos en soluciones de pH 5,7 y 9 ($p < 0,05$) / Fig. 2 Viability and mortality values of *G. mellonella* in the one-on-one trial at pH 5,7, and 9 ($p < 0.05$).

comprobaron utilizando una tinción con aceite Rojo O, que les permitió proponer una escala o índice de lípidos de ocho puntos. Esa escala no se aplicó en este estudio, pero se constató que los JI estaban traslúcidos al término de 42 días, con la observación de los JI al microscopio estereoscópico.

La temperatura afectó más la viabilidad de los JI (Fig. 3) que el pH, pues la cepa no alcanzó 100 % de viabilidad en los tres valores evaluados, como ocurrió en pH 7; adicionalmente, la infectividad sobre *G. mellonella* evidenció valores menores. La T podría afectar las reservas de lípidos y, por tanto, aumentar la mortalidad de JI y disminuir su infectividad. Al respecto, señalaron Grewal *et al.* (34) que los rangos de temperaturas del nicho termal de los NEP fueron para el movimiento (4-40°C), penetración del hospedante (5-39°C), muerte del hospedante (8-39°C) y reproducción (10-35°C).

Este estudio evidenció que *H. amazonensis* cepa HC1 puede ser almacenada en formulaciones acuosas, en bandejas y esponjas, utilizando agua destilada con pH neutro y a temperaturas frescas de unos 22±1°C. Estos elementos resultan importantes en los estudios de formulación que se desarrollan en el grupo de trabajo de Nematología Agrícola del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA),

donde se pretende obtener formulaciones comerciales que tengan como ingrediente activo esta cepa de nematodos entomopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud a la Dra. Dainé Hernández-Ochandía y técnico Lidia López Perdomo, por su colaboración en los procesos de producción de *G. mellonella* y NEP; así como a las doctoras Oriela Pino y Luz María Sánchez por el suministro de algunos insumos y la asesoría técnica en la preparación de soluciones de diferente pH. A la Dra. Carolina Rosales por la minuciosa revisión del artículo y sus valiosos señalamientos y sugerencias. Este estudio se desarrolló en el marco del Proyecto “Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases” (MUSA, 727624; tópico: SFS-11-2016), financiado por la Unión Europea.

REFERENCIAS

1. Díaz O, Betancourt Aguilar CR. Los pesticidas; clasificación, necesidad de un manejo integrado y alternativas para reducir su consumo indebido: una revisión. Revista Científica Agroecosistemas. 2018; 6(2): 14-30.

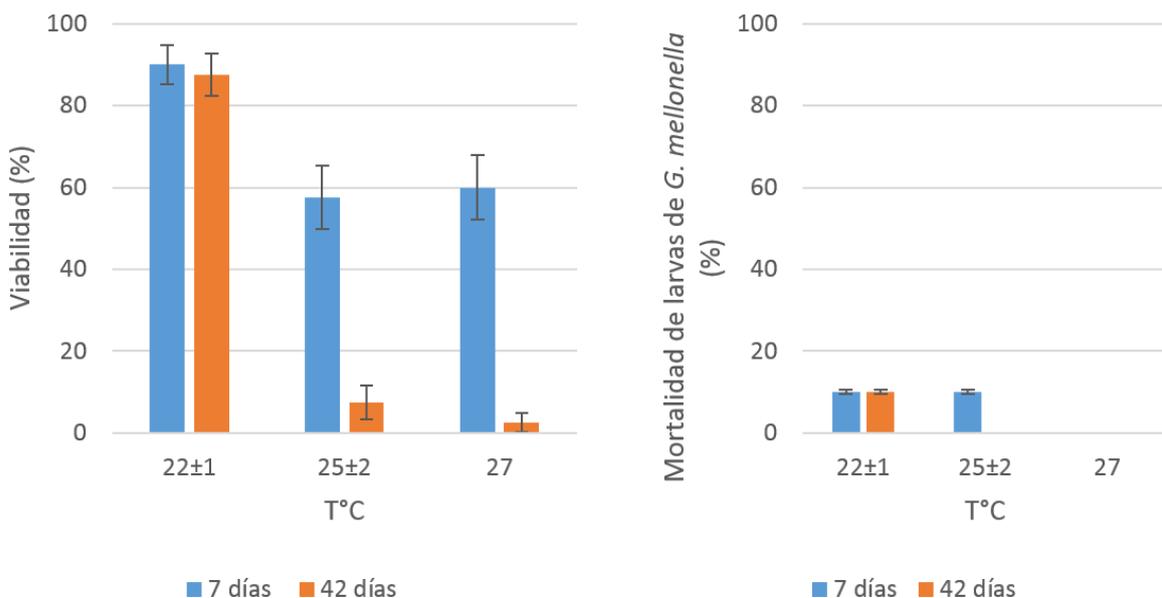


Fig. 3. Viabilidad de JI de *H. amazonensis* cepa HC1 e infectividad (conocida a través de los valores de mortalidad de *G. mellonella* del ensayo de infectividad *uno en uno*), cuando los JI se mantuvieron en tres temperaturas ($p < 0,05$) / Fig. 3 Viability of IJ of *H. amazonensis* strain HC1 and mortality values of *G. mellonella* in the one-on-one trial at 22±1, 25±2 and 27°C.

2. Dos Santos Ferreira KD, Dolinski C, De Freitas Ferreira T, Moreira de Souza R. Potential of entomopathogenic nematodes (Rhabditida) for control of pink pineapple mealybug adult females, *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), under laboratory conditions. *Nematoda*. 2015; 2: e092015.
3. Sahayaraj K. (ed.). *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. New Delhi. Springer India 2014. 384 pp.
4. Atawa A. Entomopathogenic Nematodes as Biopesticides. In: Sahayaraj K. (ed.). *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. New Delhi. Springer India. 2014. pág 69-98.
5. Askary TH, Ahmad MJ. Entomopathogenic Nematodes: Mass Production, Formulation and Application. In: M.M.M Abd-Elgawad, T.H Askary & J. Coupland (Eds.). *Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes*. (c)CAB International. 2017. pág 261-286.
6. Gulcu B, Cimen H, Raja RK, Hazir S. Entomopathogenic Nematodes and their Mutualistic Bacteria: Their Ecology and Application as Microbial Control Agents. *Biopestic*. 2017; 13 (2): 79-112.
7. Shapiro-Ilan DI, Grewal PS. Entomopathogenic nematodes and insect management. En: Capinera, J.L. (Ed.), *Encyclopedia of Entomology*, second ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008; pp. 1336-1340. Second Edition. ISBN: 978-1-4020-6242-1
8. Peters A. Formulation of nematodes. In: Glare, T.R. & Moran-Diez, M.E. (eds). *Microbial-Based Biopesticides: methods and protocols*. New York, USA, Springer, 2016. pág 121-135.
9. Chen S, Glazer I. A novel method for long term storage of the Entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control*. 2005; 32: 104-110.
10. Ramakuwela T, Hatting J, Laing MD, Hazir S, Thiebaut N. Effect of Storage Temperature and Duration on Survival and Infectivity of *Steinernema innovationi* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology*. 2015; 47(4): 332-336.
11. Shapiro-Ilan DI, Han R, Qiu X. Production of Entomopathogenic Nematodes. In: Morales-Ramos, J., Guadalupe-Rojas M, Shapiro-Ilan DI (eds) *Mass Production of Beneficial Organisms*. Copyright (c) 2014 Elsevier Inc. pág 321-356.
12. Kung S, Gaugler R, Kaya HK. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. *Journal of Nematology*. 1990; 22: 440-445.
13. Andaló V, Santos V, Moreira C, Freire M, Moino A. Movement of *Heterorhabditis amazonensis* and *Steinernema arenarium* in search of corn fall armyworm larvae in artificial conditions. *Scientia Agricola*. 2012; 69 (3): 226-230.
14. Rodríguez MG. Entomopathogenic Nematodes in Cuba: From Laboratories to Popular Biological Control Agents for Pest Management in a Developing Country. In: Campos-Herrera R (ed.). *Nematodes Pathogenic of Insects and Other Pests*. Suecia. Springer International Publishing Switzerland. 2015; 353-374.
15. Dutky SR, Thompson JV, Canwell GE. A technique for mass propagation of the DD-136 nematodes. *Journal of Insect Pathology*. 1964; vol. 6: 417.
16. 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. CODIGO: 0703023. Informe final proyecto- CENSA. (Metodologías Depositadas en Centro de Derechos de Autor (<http://www.cenda.cult.cu>), Cuba, número 09613/2002. 2001;110 pp.
17. 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. Obra depositada en Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA), Cuba.

- Certificación de Depósito Legal facultativo de Obras Protegidas, Registro 2874-2006. Ciudad de la Habana, Cuba. 2006; 30 pp.
18. White GF. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*. 1927; 66: 302-303.
 19. Glazer I, Lewis EE. Bioassays for entomopathogenic nematodes. En: Navon A, Ascher KRS (Eds.). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CABI Publishing, UK. 2000: 229-247.
 20. Especificaciones Farmacopea americana USP35-NF30. Vol. 1. 2012. ISBN 978-1-936424-03-0. 2219 pp.
 21. NC 827:2010. Norma Cubana. Obligatoria. Agua potable. Requisitos sanitarios.
 22. NC 27:1999. Vertimientos de Aguas Residuales.
 23. Ishibachi N, Kondo E. Behavior of Infective Juveniles. En: Randy Gaugler & Harry K. Kaya (Eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London New York. 1990: 139-150.
 24. Rodríguez MG, Rosales CL, Enrique R, Gómez L, González E, Peteira B, et al. Nematodos entomopatógenos y su uso como agentes de control biológico para el manejo de plagas agrarias. 2009. 95 pp. ISBN: 978-959-125-39-6
 25. Lortkipanidze M, Hwseynov K, Kokhia M, Gorgadze O, Kuchava M. Effect of temperatura on the virulence of Entomopathogenic nematodes. *Advances in Ecological and Environmental Research*. 2019: 32-38.
 26. Duvergel YC, Miranda I. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Rev. Protección Vegetal*. 2014; 29 (3): 231-234.
 27. Kaya H, Stock P. Techniques in insect nematology. In: *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press Limited. 1997. pp 281- 324.
 28. Kaya HK. Soil ecology. In: Gaugler, R. & Kaya, H.K. (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. 1990. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 93-116.
 29. Georgis R. Formulation and Application Technology. In: Gaugler, R. and Kaya, H. (eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York. pp 173-191.
 30. Sánchez L. Heterorhabditis bacteriophora HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. 2002. (Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas). Universidad Agraria de La Habana. Cuba. (Número de depósito Centro Nacional de Derecho de Autor, CENDA. Ciudad de la Habana, Cuba. Número de depósito 9613-2002). 100 pp.
 31. Hominick WM. Biogeography. In: Gaugler, R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*. CAB International. 2002. Wallingford, UK. pp 115-143.
 32. Kung S, Gaugler R, Kaya HK. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. *J. Nematol*. 1990: 22. pp. 440-445.
 33. Patel MN, Stolinski M, Wright DJ. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. *Parasitology*. 1997; 114: 489-496
 34. Grewal PS, Bai X, Jagdale GB. Longevity and Stress Tolerance of Entomopathogenic Nematodes. In: R.N. Perry & D.A. Wharton (eds). *Molecular and Physiological Basis of Nematode Survival*. CAB International. 2011. Pp. 157-181.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)