

CONTRIBUCIONES DE INSTITUCIONES DE EDUCACIÓN SUPERIOR EN CUBA EN LA TEMÁTICA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Contributions to the topic of entomopathogenic nematodes by institutions of higher education in Cuba

Mayra G. Rodríguez Hernández*

Grupo Plagas Agrícolas. Departamento de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Apartado 10, San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Este trabajo tuvo como objetivo resumir los aportes de investigadores y profesores del Ministerio de Educación Superior (MES) en el desarrollo y uso de los nematodos entomopatógenos (NEP), como agentes de control biológico, en la práctica social en Cuba. Se revisaron más de 80 artículos y capítulos de libros publicados en el país y el exterior, se pudo constatar que el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) y la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas (UCLV) hicieron las mayores contribuciones desde mediados de los años 90s hasta la actualidad. Numerosos insectos plaga de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Homoptera se estudiaron en laboratorios y condiciones semicontroladas y, en menor cuantía, en campo, para determinar su susceptibilidad a diversas especies y cepas del género *Heterorhabditis*. Importantes plagas de cultivos relacionados con la seguridad alimentaria, como maíz (*Zea mays* L.) y boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), y otros con relevancia como rubros exportables, como tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y café (*Coffea* spp.), se trataron en campo con NEP de forma efectiva, por lo que fueron incorporados como agentes de control biológico en programas de manejo. Se evidenciaron las potencialidades del establecimiento de alianzas de trabajo en diversos temas relacionados con el desarrollo y el uso eficiente de NEP en Cuba, en los que los especialistas del MES pueden contribuir, así como los retos de la temática, que pudieran ser objetivos de investigaciones en las alianzas universidad-empresas.

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

ABSTRACT: The objective of this work was to summarize the contributions to the entomopathogenic nematode (EPN) development and use as biological control agents in the social practice in Cuba by researchers and professors from the Ministry of Higher Education (MES). More than 80 articles and book chapters published in the country and abroad were reviewed. The National Center for Plant and Animal Health (CENSA) and the Central University "Marta Abreu" of Las Villas (UCLV) have been the greatest contributors since the mid-90s. Numerous pest insects of the orders Lepidoptera, Coleoptera, and Homoptera were studied under semi-controlled conditions in the laboratory and, to a lesser extent, in the field to determine their susceptibility to EPN, especially to various species and strains of the genus *Heterorhabditis*. Effective results were obtained when important pests of food-security crops, such as corn (*Zea mays* L.) and sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), and others with relevance as exportable items, such as tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and coffee (*Coffea* spp.), were treated with EPN in the field, and the studied EPN species and strain were incorporated as biological control agents in management programs. The potential to establish working alliances on various issues related to the development and efficient use of EPN in Cuba, to which MES specialists can contribute, was made evident, and so were the challenges of the subject, which could be research objectives in university-business alliances.

Key words: biological control, *Heterorhabditis amazonensis*, *Heterorhabditis indica*, pest management.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos (NEP) son nematodos parásitos que poseen una relación mutualista con bacterias simbioses (γ -Proteobacteria) y cuyo ciclo de vida transcurre dentro de los insectos parasitados, excepto el estadio juvenil infectivo (JI), única fase que tiene vida libre en los suelos (1) naturales y agrícolas de todos los continentes, excepto en Antártica (2, 3, 4).

Estos organismos desempeñan una importante función en los ecosistemas como agentes de control biológico

(ACB) de diversos insectos plaga (5); exhiben numerosos atributos positivos, pues son seguros para los humanos y, generalmente, los son también para organismos no diana y el ambiente; poseen un amplio rango de hospedantes, tienen un estadio perdurable que puede ser aplicado con equipos estándares de uso agrícola y es posible su reproducción masiva, *in vivo* (utilizando larvas de insectos) e *in vitro* (por fermentación sólida y líquida) (6). Los JI constituyen ingredientes activos de productos comerciales, cuyas formulaciones son sólidas, geles, cadáveres de insectos o soluciones acuosas contenidas en esponjas, entre otras (7, 8, 9).

*Correspondencia a: Mayra G. Rodríguez Hernández. E-mail: mayrag2531961@gmail.com

Recibido: 13/10/2020

Aceptado: 19/01/2021

Declaración de conflicto de intereses: La autora declara que no posee conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización, investigación, Escritura - borrador original, Redacción: revisión y edición.



Se describieron cuatro géneros de NEP (*Steinernema*, *Neosteinernema*, *Heterorhabditis* y *Oscheius*); sin embargo, solo *Steinernema* y *Heterorhabditis* poseen importancia como ACB (3); se describieron, a escala mundial, más de 100 especies del género *Steinernema* y 20 de *Heterorhabditis* (4).

En Cuba, los NEP representan un componente importante del Manejo Integrado de Plagas (MIP); la generalización de su producción masiva *in vivo* (utilizando *Galleria mellonella* L.) y su uso en el manejo de diversas plagas, se produjo en Cuba desde hace más de 20 años; estos organismos fueron objeto de estudio de entidades de los Ministerios de la Agricultura (MINAG) y de Educación Superior (MES) (8, 10, 11, 12). No obstante, aun cuando en Cuba se aplican agentes de control biológico en 1,7 millones de hectáreas, de las más de 6 millones dedicadas a la agricultura (12), y los NEP forman parte del grupo de biopreparados que se producen y aplican (8), las cantidades que se obtienen de estos ACB no satisfacen las demandas nacionales.

En el marco del Año Internacional de la Sanidad Vegetal decretado por la FAO en 2020, se elaboró este trabajo, para socializar resultados obtenidos por entidades del MES en el desarrollo y el uso de NEP en la agricultura en Cuba; se sintetizan contenidos relacionados con los grupos de trabajo del MES, las metodologías que emplearon y los temas de los artículos, tesis de maestría y doctorado presentadas o en proceso, entre otros aspectos, que pudieran interesar a especialistas y decisores del país en la búsqueda y materialización de alianzas para continuar avanzando en la temática.

El trabajo tuvo como objetivos *i*) agrupar los aportes que, investigadores, profesores y estudiantes del MES, ofrecieron desde sus entidades, al desarrollo de la Nematología Entomopatogénica en Cuba y *ii*) exponer las necesidades de investigación para consolidar la obtención de productos cuyos ingredientes activos sean cepas de NEP. Este artículo pretende, además, realizar un homenaje y expresar gratitud a profesores y colaboradores cubanos y extranjeros, así como recordar a los colegas que perecieron y dejaron un preciado legado de ética e integridad.

PARTE ESPECIAL

Inicios del estudio de los nematodos entomopatógenos en Cuba. Homenaje a las fundadoras

La historia del desarrollo de los nematodos como agentes de control biológico comenzó, en el mundo, con el uso de *Steinernema glaseri* (Steiner), en un programa de aplicaciones (control biológico por aumento) contra el escarabajo japonés en Estados Unidos de América en 1935. Se considera que hay más de 30 descubrimientos, entre 1923 y 2000, que marcaron hitos en el desarrollo hasta llegar a las producciones masivas y formulaciones de nematodos entomopatógenos; 10 de ellos se produjeron entre 1970 y 1990 (13).

En los años de efervescencia, se iniciaron en Cuba los estudios de nematodos entomopatógenos cuando, a finales de los 70s, dos distinguidas mujeres se vincularon, muy jóvenes, a las investigaciones en los sectores cítrica y frutícola del país. En esa época, la Dra. Magda Montes estudiaba el picudo verde-azul de los cítricos (*Pachnaeus*

litus Germar (Coleoptera: Curculionidae)) y encontró, de modo casual, que numerosos nematodos emergían de larvas y pupas muertas de este insecto. La investigadora sugirió que se trataba de representantes del género *Neoaplectana*, que podían ser reproducidos en larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) para obtener suficientes cantidades para el manejo del picudo en los viveros (14, 15).

La Dra. Montes laboraba en la Estación de Sanidad de los Cítricos y recibió a la Licenciada Eva Arteaga en su equipo de trabajo; esta estación, posteriormente, formó parte del Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT), institución que contribuyó, de manera esencial, al desarrollo de esta temática de trabajo en Cuba. Desde los años 70 y 80, este grupo de investigación estableció una fructífera cooperación con prestigiosos investigadores de instituciones extranjeras, entre los que sobresalieron los doctores Zdenek Mráček (Academia de Ciencias de Checoslovaquia) y Noël Boemare (UMII/INRA, Montpellier, Francia). Estas colaboraciones permitieron la identificación y caracterización de la población cubana de *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David (Rhabditida: Heterorhabditidae) (16, 17) y el informe de una nueva especie, *Steinernema cubana* Mráček, Hernández & Boemare (Rhabditida: Steinernematidae) (18).

Ambas investigadoras aportaron, a la literatura del NEP en Cuba y el mundo, valiosos elementos relacionados con la identificación de nuevas especies, así como a la producción y el uso de nematodos en el manejo de plagas de cítricos (*Citrus* spp.) y arroz (*Oryza sativa* L.) en ambientes tropicales, entre otros. Posteriormente, durante los 90s e inicios de este siglo, estas especialistas se mantuvieron activas; la Dra. Montes, investigando y formando jóvenes desde el IIFT y la Dra. Arteaga, compartiendo labores en la Dirección de Ciencias en el MINAG; las generaciones de nematólogos que les sucedieron agradecemos sus enseñanzas y contribuciones.

A partir de los años 90, la agricultura cubana se orienta hacia el uso de bajos insumos y un enfoque agroecológico (19). Ya por esos años, se poseía una rica historia en el desarrollo y uso de ACB en el país desde los años 30-40 del siglo XX (12) y fuerza técnica muy preparada teórica y prácticamente que, desde las universidades y centros de investigaciones del MES e institutos del MINAG, podían desarrollar y generalizar medios biológicos para apoyar la producción de alimentos.

Según Altieri (20), al comienzo del “Periodo Especial”, en la agricultura el esfuerzo se centró en una estrategia de sustituir los insumos químicos por biológicos y, ese enfoque del uso de bajos insumos, estableció las bases para el desarrollo y escalonamiento de estrategias agroecológicas de diversificación de las fincas, integración animal, reciclaje y control biológico, entre otros. Fue en esa etapa que, numerosos grupos de investigación del MES, desplegaron estudios de prospección, selección, desarrollo y uso de ACB, pues se requería incrementar esas opciones para el manejo de plagas.

A inicios de los 90s, el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) inició los estudios encaminados a la búsqueda y desarrollo de NEP, teniendo como líder a la entonces Maestra en Ciencias Lourdes Sánchez Portales† (1956 - 2004) (Fig. 1) quien, junto al Ingeniero

Ibrahim Rodríguez Gómez, realizaron una prospección buscando nuevos aislamientos, obtuvieron cepas, evaluaron su acción sobre diversas plagas diana y desarrollaron, junto a otros miembros del equipo de trabajo, la metodología de producción masiva de NEP que se introdujo en el Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) de Quivicán en 1994 (21) y que se encuentra generalizada en el país (8).



Figura 1. Dra. Lourdes Sánchez Portales†, iniciadora de la temática de NEP en el CENSA y que dirigió el equipo de trabajo que logró desarrollar una metodología de producción masiva adaptada al uso de bajos insumos (22), utilizando como base los elementos de la técnica descrita por Dutky *et al.* (23). / Dr. Lourdes Sánchez Portales†, initiator of the EPN subject at CENSA and the leader of the work team that succeeded in developing an adapting a low input methodology for mass rearing production (22) by using the technique described by Dutky *et al.* (23) as a base.

¿Cuáles fueron los aportes de entidades del MES al desarrollo de los NEP en Cuba a partir de los años 90s?

En una búsqueda efectuada recientemente, en diversas bases de datos y repositorios de universidades, se comprobó la existencia de más de 150 documentos generados desde Cuba en el tema de los NEP, mayormente artículos científicos y otros resultados recogidos en tesis de doctorado/ maestría, trabajos de diploma y resúmenes de ponencias en seminarios y congresos en Cuba y el exterior, que se originaron en más de 20 entidades (instituciones de investigación, universidades, centros universitarios municipales y centros de producción de controles biológicos, entre otros).

Dos instituciones del MES produjeron los mayores porcentajes de contribuciones, el CENSA y la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV). Ambas entidades también colaboraron con otros centros, por ejemplo, el CENSA apareció en artículos y ponencias con el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba; Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), España; Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA) e Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), ambos de Venezuela; el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la Montaña (CNRFM, MINAG), Cuba y el Instituto de Investigaciones de Caña de Azúcar (INICA), Cuba. Por su parte, la UCLV se acompañó con investigadores, profesores y estudiantes de la Universidad

de Ciego de Ávila (UNICA), Cuba; del INIVIT y estaciones provinciales de sanidad vegetal.

Otras entidades del MES que evidenciaron algún nivel de investigación en el tema de NEP fueron la Universidad “José Martí Pérez” de Sancti Spiritus, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, UNICA, Centro Universitario Municipal Trinidad, la Universidad Agraria de La Habana (UNAH) y la Universidad de Oriente, así como sedes universitarias de varios municipios del país.

Las relaciones del CENSA con instituciones internacionales fueron trascendentales para lograr avances sustanciales en tópicos como la identificación de poblaciones, la incorporación de herramientas moleculares y la reproducción y el uso de NEP; se destacan los intercambios y las conferencias, la elaboración de ponencias/ capítulos de libros y artículos conjuntos, la revisión de tesis de doctorados y la ejecución de proyectos binacionales con destacados investigadores de España, Estados Unidos de Norteamérica y Venezuela (Fig. 2). Cada uno de estos colaboradores extranjeros contribuyeron al desarrollo del trabajo en Cuba, por ello las actuales y las nuevas generaciones de nematólogos del país deben, además de estudiar sus artículos y libros, recordarles y agradecer su desinteresada y oportuna colaboración.

En la actualidad, esa colaboración internacional continúa impulsando las investigaciones de los NEP en el CENSA, pues desde 2018 en esa institución se desarrollan estudios en el marco de un proyecto financiado por la Unión Europea denominado “*Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases*” (MUSA), dirigido por el Dr. Aurelio Ciancio del Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Italia. El proyecto MUSA pretende robustecer el manejo sostenible de plagas de nematodos y picudo del banano - plátano (*Cosmopolites sordidus* Ger.) con enfoque integrado, combinando agentes de control biológico endófitos y la resistencia/ tolerancia de las plantas; los NEP representan objeto de estudio dentro del proyecto MUSA, para su uso en el manejo de poblaciones de picudo del banano-plátano.

A pesar de la fortaleza alcanzada en las alianzas internacionales en el tema de NEP, el análisis primario de esta información evidenció que aún es escasa la colaboración entre instituciones nacionales, lo que resultaría favorable y necesario para aprovechar las fortalezas de cada institución, optimizar el uso de recursos, acortar el tiempo de las investigaciones y la obtención de formulados competitivos para cubrir las demandas de NEP en Cuba.

PROSPECCIONES, IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS CUBANOS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS Y SUS SIMBIOTES BACTERIANOS REALIZADOS POR GRUPOS DEL MES

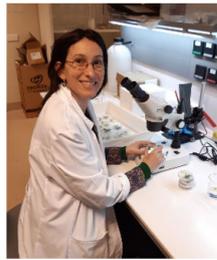
Aun cuando en Cuba, en los años 70 y 80 se avanzó con las investigaciones de la cepa nativa P₂M de *H. indica*, las especies y cepas obtenidas no provenían de encuestas o prospecciones, que representan tipos de investigaciones muy valiosas en la exploración de la biodiversidad de determinados grupos de interés.



Dr. Randy Gaugler.
Universidad de Rutgers.
Estados Unidos de Norteamérica



Dra. S. Patricia Stock.
Universidad de Arizona.
Estados Unidos de Norteamérica



Dra. Raquel Campos Herrera.
Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino. CSIC.
España



Dra. L. Carolina Rosales.
Instituto Nacional de Inv. Agrícolas-INIA.
Venezuela



Dr. Ernesto San Blas.
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas-IVIC.
Venezuela

Figura 2. Investigadores vinculados al estudio de nematodos entomopatógenos cuya colaboración, a través de intercambio de información y/o proyectos conjuntos, contribuyó, de manera ostensible, al desarrollo de la temática en instituciones de la educación superior (MES) en Cuba / Researchers involved in entomopathogenic nematode studies, whose collaboration, through information exchange and / or joint projects, contributed to the subject development ostensibly in Cuban higher education institutes (MES)

La obtención de aislamientos nativos puede proveer aislados más apropiados para aplicaciones inundativas contra plagas locales, debido a su adaptación al clima y a los reguladores presentes en estos ambientes, por lo que la selección se convierte en una necesidad; por ello, a escala mundial, se desarrollaron prospecciones durante décadas, con el objetivo de descubrir cepas más adaptadas a condiciones locales e insectos plaga (5). En América Latina y Caribe, estudios de prospección y hallazgos fortuitos proporcionaron una docena de especies nuevas de *Steinernema* y cuatro de *Heterorhabditis*; sin embargo, recientemente se sugirió que existe una reserva de especies y aislamientos que no fueron aún descritos en esta zona geográfica (11).

Se encontró evidencia publicada de prospecciones realizadas por el CENSA y la UCLV. Entre 1992 y 1994, el CENSA desarrolló la primera prospección, evaluando más de 250 muestras provenientes de 27 cultivos que se fomentaban en nueve de las 15 provincias del país, informando el hallazgo de seis aislados de *Heterorhabditis* y uno de *Steinernema*, lo que representó 2,8 % de muestras positivas a NEP (24).

Los aislados de *Heterorhabditis* se denominaron HC1, HC2, HC3, MC1, MC2 y MC3 y se depositaron en una incipiente colección en el CENSA y las letras de sus denominaciones se corresponde con H y M, significando la inicial de la provincia donde se hallaron, H de Habana (actual provincia Mayabeque) y M, correspondiente a la provincia Matanzas, seguidas de la letra C, inicial de la sigla del CENSA, y el número en el cepario. Este equipo de trabajo realizó estudios morfológicos, moleculares (análisis de ADN Polimórfico (RAPDs)) y los relativos a la caracterización y selección de cepas descritos por Glazer y Lewis (25).

Los estudios iniciales sugirieron que la cepa HC1, seleccionada por sus atributos como ACB, pertenecía a la especie *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (24, 26); sin embargo, la Dra. Raquel Campo Herrera analizó las secuencias de la cepa de nematodo, tanto de la región ITS como de la D2D3, e informó al equipo del CENSA que coincidían con *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* (99 % ID, 99 % cover), y esta colaboradora realizó el depósito en GenBank con el identificador KU870321 para la cepa cubana de *H. amazonensis* HC1. Los valores del estudio morfométrico de la cepa HC1 (26) están dentro de los rangos ofrecidos por Andaló *et al.* (27) para *H. amazonensis*. En la actualidad, resulta necesario realizar un estudio morfológico más detallado de la cepa HC1 y la publicación de imágenes;

esto, junto al estudio molecular que se realizó en años recientes, debe quedar de forma pública para los especialistas en el ámbito nacional, como elementos distintivos de una de las cepas de mayor uso en Cuba.

Estudios del impacto de factores abióticos seleccionados sobre la viabilidad e infectividad de la cepa HC1 se desarrollaron recientemente (28, 29) y se determinó el efecto de las temperaturas, pH y aguas de diferentes características sobre el comportamiento de los JI, estudios básicos para la formulación y el desempeño en campo de los juveniles.

Otros estudios de la cepa HC1 evidenciaron que es compatible con *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., Endosulfan (Thiodan) (30) y *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (31); se informó también que la viabilidad de los JI no se afectó por los herbicidas Diuron 80 % PH, Glufosinato de Amonio (Asta 15 % CS), Isoxaflutol (Merlin 75 % WGD) y propaquizafop (Agil 10 % CE) a concentraciones similares a las utilizadas en campo (29).

Por su parte, se hicieron estudios de las bacterias simbiotes de los aislados de nematodos: formas de aislamiento, estudio bioquímico, serológico, diferencias entre las fases fenotípicas I y II del simbiote de la cepa HC1 (*Photorhabdus luminescens*), entre otros (32, 33, 34).

Hacia finales de los años 90s, Rodríguez *et al.* (35) hicieron una limitada prospección en sitios seleccionados de zonas de Buey Arriba, provincia Granma, cuando evaluaban el efecto de los nematodos entomopatógenos en la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), plaga que arribó al país en 1995 (www.ecured.cu>broca del café) y encontraron un aislamiento de *Steinernema*; sin embargo, esa población no se adaptó a su reproducción y mantenimiento en *G. mellonella* y no se pudo concretar su identificación y estudio.

Recientemente, en el marco del proyecto MUSA, el equipo de trabajo del CENSA realizó una nueva prospección en los años 2018 y 2019 en banano / plátano (*Musa* spp.), establecidos en cuatro provincias (Pinar del Río, Mayabeque, Matanzas y Granma) y se obtuvieron cinco aislados de *Heterorhabditis*. Utilizando la técnica del cebo (36), se pudieron extraer estos nuevos aislados a partir de muestras de suelos de Pinar del Río, lo que incrementó el número de aislados de este género mantenidos en la colección del CENSA. Se estudian estos aislamientos, tanto nematodos como sus bacterias simbiotes, para establecer su identificación definitiva.

Otras prospecciones desarrollaron el equipo de investigación del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) dirigido por el Dr. Edilberto Pozo (37). En el primer estudio, estos autores analizaron suelos de la Estación Experimental «Álvaro Barba Machado» de la UCLV, región central de Cuba, donde tomaron 13 muestras. El estudio se efectuó en los cultivos de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), arroz (*Oryza sativa* L.), *Musa* spp. y sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); se hallaron dos aislados de *Heterorhabditis* en sorgo, denominados por los autores como CIAP-DEY-6 y CIAP-DEY-7. Los investigadores acotaron que, a pesar de ser aislados de un mismo campo, estos se nombraron por separado porque demostraron comportamientos desiguales en cuanto a la cantidad, viabilidad y factibilidad de su manejo.

En un trabajo de diploma que se desarrolló en 2014 en la UCLV, su autor Félix Hernández¹, describió que en la Empresa Agropecuaria de Jibacoa, en el campo “Pretils”, encontró tres muestras con nematodos entomopatógenos. El estudiante, de conjunto con sus tutores, los Doctores Edilberto Pozo y Roberto Valdés, sugirieron que los aislamientos representaron al género *Heterorhabditis* y, a pesar de ser aislados en un mismo campo y profundidad, los nombraron por separado como Pretils-01, Pretils-02 y Pretils-03, pues demostraron comportamientos desiguales en cuanto a la cantidad y viabilidad.

Los resultados publicados en Cuba evidenciaron que resultan aún insuficientes los estudios de prospección que se realizaron, existiendo posibilidades de hallar nuevos aislados nativos en ecosistemas de la isla, pues solo se han evaluado suelos cultivados y se conoce que hay presencia de NEP en zonas forestales, costeras, reservas naturales y otros hábitats. De igual modo, se puso de manifiesto que resulta imprescindible realizar la secuenciación de cepas y el depósito de las secuencias en GenBank, así como el establecimiento de las condiciones materiales para la conservación de un cepario de NEP en Cuba, con propósitos científicos, productivos y educativos.

Otra vertiente del trabajo con NEP es la oportunidad de conformar equipos de trabajo multidisciplinarios en el abordaje del estudio de complejos simbióticos nematodos-bacterias, lo que no fue aprovechado convenientemente por todos los grupos de investigación en Cuba y que, en el marco de universidades y centros de investigación, sería una plataforma de trabajo para diversas especialidades en proyectos nacionales e internacionales.

En lo referente a cepas de NEP, resulta indispensable establecer y mantener una colección en algún laboratorio del MES, para preservar el material con fines docentes y de investigación; el CENSA custodia la cepa HC1 para aprovisionar, frecuentemente, a los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) que reproducen esta cepa en el país.

Desarrollo de cepas como ACB

En junio de 2002, el colectivo del CENSA recibió en sus instalaciones la visita del experto mundial en el tema de NEP, Dr. Randy Gaugler². Este investigador ofreció una conferencia sobre aspectos relevantes para el desarrollo de productos cuyos ingredientes activos fueran NEP.

En su conferencia, el Dr. Gaugler diagramó el proceso como un embudo o triángulo invertido donde, en su parte superior y más ancha, colocó la **Colección** (librería) de aislados y el extremo inferior y más estrecha el **Producto** y, entre esos dos extremos, se ubicaron de arriba hacia abajo los términos **Aislamiento**, **Rango de hospedantes**, **Virulencia** y **Producción masiva**, los que fueron explicados, por el eminente investigador, como etapas de investigación. Este esquema se adoptó por el grupo de trabajo del CENSA y, a partir de la colección de aislados, se hicieron los estudios que permitieron seleccionar una cepa para desarrollar un producto a base de NEP.

Debido a que los nematodos difieren en su comportamiento, un único bioensayo no puede ser utilizado como una medida universal de la virulencia para todas las especies y cepas (38). Los ensayos recomendados por Glazer y Lewis (25), para la caracterización de cepas, son bastante simples y permitirían evaluar, cuantitativamente, la respuesta de comportamiento como criterio específico de la virulencia del nematodo y ubicar la actividad de los mismos en los diferentes pasos del proceso de infección. Estos son, tiempo de exposición, que refleja la proporción de penetración (de JI) de una población dada; columnas de arena, que evalúa el rango de penetración y se manifiesta la habilidad para localizar y penetrar el insecto diana y la prueba uno en uno, que representa el proceso de infección completo (39, 40, 41).

En el CENSA se efectuaron estos estudios utilizando larvas de último instar de *G. mellonella* inoculadas con JI de cada aislamiento y se empleó, como cepa de referencia internacional, *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) HP 88 (24). En este estudio, los valores más altos de mortalidad y de JI producidos se obtuvieron con la cepa HC1 (24).

Gómez *et al.* (42) evaluaron la virulencia y el potencial reproductivo de tres aislamientos de NEP (los denominados MC-1, MC-2 y MC-3), procedentes de suelos citrícolas de Jagüey Grande que se compararon con la cepa HC1 y *H. bacteriophora* cepa HP88. Los autores informaron que la cepa HC1 resultó ser la más virulenta y obtuvo altos rendimientos (número de JI) por larva de *G. mellonella*.

Señaló Gaugler (2002)² que el estudio de rango de hospedantes resulta importante, luego de hacer la colecta de especies / aislamientos de NEP; Poinar y Thomas (43) acotaron que es necesario explorar el rango de hospedantes de un parásito y que, si no se conoce cómo el parásito entra al huésped en el entorno natural, resulta beneficioso evaluar la infección, colocando al hospedante y los nematodos juntos

¹ Félix Hernández. Trabajo de Diploma. 2014. Disponible en <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/1107/A0024.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

² Gaugler R. “Mass production technology of entomopathogenic nematodes”. 21 junio, 2002. Conferencia ofrecida, por el Dr. Gaugler, de la Universidad de Rutgers, USA, al personal vinculado al trabajo con nematodos entomopatógenos en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Cuba.

en una cámara de infección; así como que, a veces, la infección se puede alcanzar colocando ambos organismos entre piezas de papel de filtro humedecido. Los resultados de esos ensayos varían, desde no tener efecto hasta provocar el 100 % de mortalidad en el insecto evaluado.

Ensayos de laboratorio y condiciones semicontroladas

Los bioensayos en laboratorio y condiciones semicontroladas se desarrollaron en Cuba desde finales de los años 90 hasta la actualidad, y muchos de ellos los realizaron colectivos del MES o del MINAG con la participación, como tutores o asesores, de especialistas de la educación superior. Estos estudios poseen relevancia como base para los ensayos en condiciones de campo y se pueden desarrollar con relativa facilidad en los laboratorios disponibles en universidades y centros de investigación del MES, pues solo se necesitan las condiciones mínimas de cristalería, estereomicroscopio, la cepa de nematodo bien identificada, la población del insecto a evaluar y cierto entrenamiento del personal en la preparación de soluciones de concentración definida de JI, la inoculación y evaluación de mortalidad. Estos tipos de ensayos pueden ser incluidos en trabajos de diploma para desarrollar, en los estudiantes y tutores, habilidades para el trabajo con NEP y aportarían al conocimiento y uso de NEP en Cuba.

De manera general, los experimentos de laboratorio se centraron en el estudio de la eficacia de cepas de NEP sobre una o pocas especies de insectos plagas y solo Sánchez (24) evaluó, en un mismo ensayo y para una sola cepa, ocho especies de insectos representantes de cuatro familias (Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera).

En estudio reciente, publicado por especialistas de América Latina, se recogen detalles de las plagas estudiadas en Cuba, los estadios de los insectos evaluados y los porcentajes de mortalidad exhibidos por diversas especies y cepas de NEP (11).

De manera general, los especialistas del MES o de equipos mixtos, donde participaron investigadores de ese ministerio, estudiaron, mayoritariamente, insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Homoptera, debido a que incluyen plagas importantes para la agricultura en Cuba (44).

La mayoría de los estudios utilizaron larvas (de diferentes estadios) de los insectos seleccionados, pues se conoce la susceptibilidad de este estado; mientras que, los porcentajes de mortalidad fueron variables en los casos de adultos, ninfas o pupas. Generalmente, los autores utilizaron, como arenas experimentales, placas Petri con papeles de filtro; sin embargo, en algunos ensayos se utilizaron bandejas, envases plásticos, placas con suelo y un olfatómetro (24, 45, 46).

En el orden Lepidoptera, equipos de investigación del MES evaluaron el efecto de JI de NEP sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Heliothis virescens* (F.), *Manduca sexta* (L.), *Plutella xylostella* (L.) y *Diaphania hialinata* (L) (24, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

Por otra parte, el efecto de NEP en especies de Coleoptera se evaluó en plagas de cultivos importantes como boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), plátanos y banano (*Musa* spp.), café (*Coffea* spp.) y otros cultivos y plantas de uso en jardinería, entre otras. Así se evaluaron las especies de Curculionidae, *Cylas formicarius* (F), *Cosmopolites*

sordidus (Guer.), *Metamasius hemipterus sericeus* (L.) e *Hypotenemus hampei* (F); así como los representantes de Scarabaeidae, *Phyllophaga* y *Cyclocephala* (24, 45, 53, 54, 55, 56, 57). Representantes del Orden Hemiptera, evaluados por especialistas del MES, fueron *Planococcus* spp., *Planococcus minor* Maskell y *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Pseudococcidae); todas resultaron parasitadas por NEP (24, 58, 59). Otras especies, como *Piezodorus guildinii* W Small y *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae), fueron susceptibles, a escala de laboratorio, a la cepa HC1 de *H. amazonensis* (60).

Insectos sociales (Formicidae), como *Solenopsis geminata* Fabricius y *Atta insularis* Guér, se confrontaron con *H. amazonensis* cepa HC1; en la primera especie, los nematodos parasitaron a los adultos, no así los otros estados (61). En la bibijagua (*A. insularis*) solo se produjo mortalidad de los adultos, en porcentajes que variaron entre 30 (cuando se usó papel de filtro en la placa) y 70 % (con el uso de suelo en la placa) (24). Otro insecto social, de importancia en ambientes agrarios y domiciliarios, fue *Nasutitermes* sp. (Hexapoda; Isoptera), donde diferentes estadios resultaron parasitados por *H. indica* cepa P2M (62).

Ensayos de campo

Señaló Waage (63) que uno de los principales problemas en la transferencia de plaguicidas biológicos fue de naturaleza técnica, pues muchos organismos se desempeñaron excelentemente en laboratorio o pequeñas parcelas y fallaron cuando se aplicaron a escala de campo. Por ello, los estudios de campo resultan importantes en varios sentidos, para determinar la eficacia de los NEP en el manejo de plagas en esas condiciones, establecer dosis, momento y frecuencia de las aplicaciones. Este tipo de estudio resulta relevante también para demostrar a los agricultores los atributos de estos organismos como ACB; sin embargo, fueron más escasos que los estudios de laboratorio y condiciones semicontroladas.

Estudios de eficacia de NEP en campo desarrollaron diferentes colectivos de universidades y centros del MES en diversas partes del país, donde se constató que numerosas especies/cepas de NEP fueron efectivas en el manejo de plagas de Lepidoptera, Coleoptera, y Hemiptera.

En Lepidoptera, se estudiaron insectos como *D. hyalinata* (49); *Homeosoma electellum* (Hulst) (64); *Keiferia lycopersicella* (Walsingham) (65); *P. xylostella* (52, 66, 67); *H. virescens* y *S. frugiperda* en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (8); mientras que, el complejo *H. virescens* y *M. sexta* en tabaco, se manejó con *H. amazonensis* cepa HC1 en Las Tunas, con resultados satisfactorios (51). Por su parte, *S. frugiperda*, plaga clave del maíz (*Zea mays* L.), resultó manejada favorablemente con NEP en condiciones de campo (68, 69, 70), aspecto que debe ser socializado, con mayor intensidad, entre agricultores para propiciar el uso de NEP en este importante cultivo para la seguridad alimentaria.

En Coleoptera, cepas de NEP disminuyeron las poblaciones de *C. formicarius* var. *elegantulus* (69, 71, 72); se corroboraron así las potencialidades de estos organismos para el manejo de esta plaga. Adicionalmente, una investigación de la Universidad de Granma a fines de los 90s (73), evidenció que *Heterorhabditis* sp. permanecía entre

30 y 35 días después de ser aplicado en campos sembrado con boniato (*I. batatas*). Otros miembros de Coleoptera, como *Phyllophaga* sp., *Cyclocephala* sp. y *M. hemipterus sericeus*, mostraron susceptibilidad a NEP (74).

Otra importante plaga de coleópteros en Cuba es la broca del café (*H. hampeii*); para su manejo se evaluaron en campo y se sugiere el uso de los NEP como parte del MIP (8, 75, 76). Meses después de ser aplicada al suelo, se demostró la permanencia de poblaciones de *H. amazonensis* cepa HC1 en área cafetaleras (77).

Plagas de Hemiptera, como chinches harinosas del cafeto y del cultivo de mariposa (*Hedychium coronarium* Koenig), también se manejaron satisfactoriamente en campo (59, 78).

Debido a la importancia que revisten los estudios de campo, se debían planificar y desarrollar este tipo de investigaciones (Fig. 3) aprovechando las estancias de prácticas laborales de los estudiantes de facultades de agronomía en entidades productivas, los que aportarían datos valiosos y podrían establecer parcelas demostrativas para la capacitación y la divulgación de resultados científicos.

Estudios para la reproducción masiva y formulación de NEP impulsados por personal del MES

Los NEP se pueden producir *in vivo*, utilizando diferentes insectos como bioreactores, donde el hospedante más utilizado es *G. mellonella* y/o *in vitro* (cultivos sólidos o líquidos), empleado diferentes medios de cultivo y equipos de fermentación. La selección del método para la reproducción está determinada por elementos de disponibilidad de capital, costos de la mano de obra, materiales, bienes y maquinarias, la factibilidad de escalado, experticia técnica requerida, requerimientos de investigación-desarrollo, disposición de deshechos, disponibilidad de manufactureros, requerimiento de espacio, facilidad de la cosecha y confiabilidad de materias primas (79), entre otros elementos.

La producción de NEP *in vivo* requiere de muy poco capital y baja experticia técnica, resultando fácil el manejo y la cosecha de JI (79); este tipo de producción utiliza *G. mellonella*. Los detalles de este tipo de producción en Cuba, los centros en los que se producen y de la tecnología preparada por el CENSA (24), se ofrecieron antes en

diversos artículos (8, 10, 11). Esa metodología posibilitó la producción anual de más de 907 000 millones de JI en el país (12). Otro estudio para la reproducción masiva *in vivo* realizó un equipo de trabajo en la UCLV, que estudió la posibilidad de reproducir NEP utilizando como biorreactor a *S. frugiperda*, mantenida en laboratorio sobre hojas de *Sorghum halepense* Pers. (Poales: Poaceae) y determinó que el V instar de *S. frugiperda* fue el más productivo cuando se inoculó con 250 - 500 JI/larva (80).

La reproducción *in vitro* del complejo nematodo-bacteria se abordó por especialistas del CENSA (22, 24, 81, 82), con resultados modestos, pero que sentaron la línea base para el desarrollo del cultivo *in vitro* de NEP en Cuba.

Otra arista del trabajo con NEP es la transferencia de tecnologías y de cepas seleccionadas dentro y fuera del país. Además de la transferencia hecha en los años 90s al CREE de Quivicán (21), el equipo de trabajo del CENSA (Fig. 4) transfirió las metodologías de reproducción de *G. mellonella* y NEP a la Organización No Gubernamental PROBIOMA de Bolivia en 1996-1997, al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la Montaña (CNRFM) entre 2005 y 2007, al Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA) (2007-2012) y al Instituto Nacional de Investigaciones Científicas (IVIC) (2015), ambos de Venezuela (8, 11, 83, 84), así como a una cooperativa agroecológica de El Salvador (2015-2016) (11).

En cuanto a la formulación, Sánchez *et al.* (22) calcularon la cantidad de JI a colocar en esponjas de poliéster-poliuretano en bolsas de polietileno transparente, donde los JI de *H. amazonensis* cepa HC1 se conservan a temperaturas frescas (22-25°C) por 60 a 90 días. La generalización de esta formulación evitaría pérdidas de calidad del producto que, numerosos CREE, comercializan en recipientes con agua.

Los NEP son eficaces ACB que poseen como ventaja adicional, en las condiciones de Cuba, de que no necesitan ser registrados (85) y son recomendados y utilizados en la actualidad en el manejo de diversas plagas (86, 87, 88), teniendo como base teórica-metodológica, en gran medida, los estudios desarrollados por entidades del MES.

La preparación de capital humano, relacionado con el estudio y uso de ACB, en el caso de los NEP, tuvo fuerte componente del trabajo realizado por instituciones científicas y universidades del MES; así como la conducción y ejecución de trabajos de diploma, tesis de posgrado, cursos, talleres y la edición de materiales para los agricultores.



Figura 3. Imágenes del trabajo de evaluaciones de impacto de NEP en el manejo de plagas en experimentos de campo desarrollados por el equipo del CENSA, con estudiantes y agricultores en zonas agrícolas de La Habana, Mayabeque (Cuba) y Chalatenango (El Salvador) / Images of the evaluation work of the EPN impact on pest management in field experiments developed by CENSA's team with students and farmers in agricultural areas of Havana, Mayabeque (Cuba) and Chalatenango (El Salvador)



Figura 4. Miembros del equipo del CENSA, Cuba, que desarrollan los estudios moleculares de cepas de NEP y caracterización de bacterias simbiotes; compatibilidad de nematodos con productos naturales; optimización de la producción masiva y formulación de *H. amazonensis* cepa HC1 / Members of CENSA's team, Cuba, in charge of molecular studies of EPN strains and characterization of symbiotic bacteria and studies on compatibility of nematodes with natural products and optimization of mass production and formulation of *H. amazonensis* strain HC1

Retos de las instituciones del MES para contribuir al fortalecimiento de los estudios de NEP en Cuba

1. Creación de la **Red de Universitaria de Nematología Agrícola (RedUNEMA)** que aglutine a los nematólogos y estudiantes de la Educación Superior, como plataforma para la comunicación y el crecimiento de la masa crítica dedicada a la especialidad.
2. Incrementar el número (y calidad) de materiales de consulta para especialistas, estudiantes y agricultores; así como la publicación de resultados de investigaciones e innovaciones vinculadas a la especialidad en revistas arbitradas cubanas y extranjeras
3. Elevar la preparación de profesionales, productores, decisores y la sociedad en el tema de nematodos entomopatógenos.
4. Fortalecer el vínculo entre el sector académico del MES y los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE), para el suministro de asistencia técnica sistemática y la elevación de la preparación técnica del personal de esos centros.
5. Lograr la homogenización de protocolos y el uso de ensayos establecidos por la literatura internacional en los laboratorios de investigación del MES.
6. Desarrollar la tecnología de producción masiva *in vitro* (líquida) con un eficaz sistema de aseguramiento de calidad en la producción de NEP, para su transferencia al sistema empresarial, como parte del vínculo universidad-empresa.
7. Estudiar el impacto de las aplicaciones del NEP sobre las comunidades de nematodos del suelo.
8. Desarrollar estudios de todas las cepas seleccionadas con el empleo de técnicas de biología molecular para el estudio de nematodos y sus bacterias simbiotes, como elementos importantes en el proceso de obtención y protección de formulados comerciales.
9. Estudiar las toxinas de origen proteico y metabolitos secundarios de los simbiotes bacterianos de las cepas que demostraron alta eficacia en el manejo de plagas, los que pudieran tener nuevas aplicaciones agrícolas.
10. Lograr el establecimiento y mantenimiento de colecciones especies/ cepas, así como una página web con información relevante, con fines docentes y científicos.
11. Mejorar las formulaciones de nematodos entomopatógenos para facilitar las aplicaciones e incrementar su vida en anaquel y la persistencia de estos organismos luego de ser aplicados.
12. 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Belkis Peteira Delgado-Oramas (Cuba) por su revisión y valiosas sugerencias. Al Dr. Luis L. Vázquez Moreno y el M. Sc. Daniel Rafael Vuelta, por la provisión de diversos materiales de consulta. Este artículo se elaboró en el marco del proyecto “*Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases*” (MUSA), financiado por el Programa de Investigación e Innovación de la Unión Europea Horizonte 2020, en virtud del acuerdo de subvención 727624.

REFERENCIAS

1. Stock SP. Diversity, biology and evolutionary relationships. En Campos-Herrera R. (Ed.). Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests – Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection; Springer, Cham Heidelberg, New York, Dordrecht, London. 2015. pp 3-28.
2. Hominick WM, Reid AP, Bohan DA, Briscoe BR. Entomopathogenic Nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. Biocontrol Sci Technol. 1996; 6: 317-331.

3. Shapiro-Ilan DI, Hiltbold I, Lewis EE. Nematodes. En Hajek AE, Shapiro-Ilan D. (Eds.). Ecology of Invertebrate Diseases. First Ed, John Wiley & Sons Ltd. Hoboken, NJ, USA. 2018. pp 414-440.
4. Hussain AB, Kumar AC, Hassan TA. Global distribution of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. Egypt J Biol Pest Control. 2020; 30- 31:1-15. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0212-y>
5. Campos-Herrera R, Barbercheck M, Hoy CW, Stock SP. Entomopathogenic nematodes as a model system for advancing the frontiers of ecology. Jour. Nematol. 2012; 44(2):162–176.
6. Shapiro-Ilan DI, Grewal PS. Entomopathogenic nematodes and insect management. En Capinera JL. (Ed.). Encyclopedia of Entomology, Second Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008. pp 1336–1340.
7. Lewis EE, Clarke DJ. Nematode Parasites and Entomopathogens. En Vega FE, Kaya H K. (Eds.). Insect Pathology, 2nd ed.; Academic Press. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2012; pp 395-424. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00011-7>
8. Rodríguez MG. Entomopathogenic nematodes in Cuba: from laboratories to popular biological control agents for pest management in a developing country. En Campos-Herrera R. (Ed.). Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests – Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Springer, Cham. 2015. pp 343–364.
9. Touray M, Gulcu B, Ulug D, Gulsen SH, Cimen H, Kaya HK, *et al.* Evaluation of different sponge types on the survival and infectivity of stored entomopathogenic nematodes. Jour. Invertebrate Pathol. 2020; 171:1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107332>
10. Rodríguez MG, Hernández-Ochandía D, Gómez L. Nematodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la agricultura en Cuba. Rev. Protección Veg. 2012; 27(3):137–146.
11. San-Blas E, Campos-Herrera R, Dolinski C, Monteiro C, Andaló V, Garrigós Leite L, *et al.* Entomopathogenic nematology in Latin America: A brief history, current research and future prospects. Jour. Invertebrate Pathol. 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.010>
12. Márquez ME, Vázquez LL, Rodríguez MG, Ayala JL, Fuentes F, Ramos M, *et al.* Biological control in Cuba. En Van Lenteren, VHP Bueno, MG Luna, YC Colmenarez (Eds). Biological control in Latin America and the Caribbean: Its rich history and bright future. CABI Invasives Series. 2020. pp 176-193. ISBN: 978 1789 2424 47
13. Grewal PS, Kaya HK. History of the development of nematodes as biocontrol agents. En B Eriksson, D McNamara, J Webster (Eds). An anecdotal history of Nematology. 2008. pp 246–257. ISBN: 978-954-642-426 (e-book)
14. Montes M. Informe sobre un nematodo del género *Neoaplectana* como enemigo natural de las larvas del picudo verde azul *Pachnaeus litus* (Coleoptera, Curculionidae). Ciencia y Técnicas Agrícolas. Serie Cítricos y otros frutales (Cuba). 1978; 3(1):43–45.
15. Montes M, Broche R, Hernández MR, Gómez M, Hernández D, Rodríguez JL. Curculiónidos que atacan los cítricos en Cuba y sus enemigos naturales. 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5380/UltimoCurculi%C3%B3nidos%20Trabajo%20FAO.pdf> [revisado: 26/03/2014]
16. Arteaga EM, Mráček Z. *Heterorhabditis heliothidis*, a parasite of insect pests in Cuba. Folia Parasitologia (Praha). 1984; 31:11-17.
17. 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.
18. Mráček Z, Arteaga E, Boemare NE. *Steinernema cubana* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae: Steinernematidae) and preliminary characterisation of its associated bacterium. Jour. Invertebrate Pathol. 1994; 64:123–129.
19. Altieri MA, Funes-Monzote FR. The paradox of Cuban agriculture. Monthly Review. 2012; 63(8). Disponible en: <http://monthlyreview.org/2012/01/01/the-paradox-of-cuban-agriculture/> [revisado: 20/10/2014]
20. Altieri M. Patrimonio ecológico de la humanidad. En Funes F, LL Vázquez (Eds.). Avances de la agroecología en Cuba. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. 2016. pp 11-12. ISBN: 978-959-7138-21-1
21. Sánchez S. El CREE de Margarita, algo más que un sueño. Agricultura Orgánica (Cuba). 1997; 3(2–3):5–8.
22. 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. 2001. Código: 0703023. Informe final proyecto–CENSA. (Metodologías Depositadas en Centro de Derechos de Autor (, Cuba, número 09613/2002).
23. Dutky SR, Thompson JV, Canwell GE. A technique for mass propagation of the DD–136 nematodes. Journal of Insect Pathology. 1964; 6:417.
24. Sánchez L. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. [Tesis de doctorado]. 2002. La Habana, Cuba. Universidad Agraria de La Habana. 100 pp. (Documento depositado en el Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA) Número 9613–2002).
25. Glazer I, Lewis EE. Bioassays for entomopathogenic nematodes. En Navon A, Ascher KRS. (Eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Wallingford, UK. CAB International. 2000. pp. 229–.247.
26. Rodríguez MG, Rodríguez I, Sánchez L, Iglesia A. Identificación y caracterización morfológica de tres cepas de nematodos entomopatógenos de Cuba. Rev. Protección Veg. 1996; 11(3):159-163.
27. Andaló V, Nguyen KB, Moino Jr A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditidae: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. Nematology. 2006; 8(6):853-867.

28. Calabuche-Gómez G, Enrique R, García-Perera D, Miranda I, Soler DM, Rodríguez MG. Efecto de factores abióticos sobre la viabilidad e infectividad de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* cepa HC1. Rev. Protección Veg. 2019; 34 (3):1-9.
29. Martínez-Perea Y, Jiménez-Cid LC. Influencia de factores abióticos en la viabilidad del nematodo *Heterorhabditis* sp. cepa HC1. Rev. Protección Veg. 2021; 36 (No. Especial - SISA 2019): 63-64.
30. 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.
31. 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.
32. Martín D, Calzadilla M, Rodríguez I. Bioquímica y serología de dos aislamientos cubanos de *Photorhabdus luminescens* (Poinar & Thomas) Poinar, Akhurst y Mourant. Rev. Protección Veg. 1996; 11(2):109-111.
33. Martín D, Calzadilla M, Rodríguez I. Obtención de un antisuero de *Photorhabdus luminescens* (Thomas y Poinar) Boemarre, Akhurst y Mourant. Rev. Protección Veg. 1996; 11(1):52-53.
34. Martín D. Identificación, caracterización y reproducción masiva del simbiote bacteriano de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HC1. 2007. [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas]. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. 80 pp.
35. Rodríguez I, Rodríguez MG, Sánchez L. Efectividad de los nematodos entomopatógenos sobre la broca del café. Informe de trabajo en Bueay Arriba, Granma. Cuba. Laboratorio de Nematología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). 1997. 15 pp.
36. Bedding RA, Akhurst RJ. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica. 1975; 21:109-116.
37. Pozo E, López D, Martínez Y. Nuevos aislados de nematodos entomopatógenos en la región central de Cuba. Centro Agrícola. 2003; 30(4):94-95.
38. Grewal PS, Lewis EE, Gaugler R, Campbell JF. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. Parasitology. 1994; 108:207-215.
39. Glazer I. Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes to insects. Jour. Invertebrate Pathol. 1991; 59:90-94.
40. Griffin C, Downes MJ. Recognition of low-temperature infective isolates of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* spp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). Nematologica. 1994; 40(1):106-115.
41. Miller RW. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes. Jour. Nematol. 1989; 21:574.
42. Gómez L, Soler DM, Sánchez L. Virulencia y potencial reproductivo de aislamientos cubanos de nematodos entomopatógenos. Rev. Protección Veg. 2001; 16(1):50-54.
43. Poinar GO, Thomas GM. Nematodes. En Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites. Plenum Press: New York & London. 1984. pp 235-280. ISBN 978-1-4684-8544-8 (eBook).
44. Martínez E, Barrios Sanromá G, Rovesti L, Santos Palma R. (Eds). Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), Cuba. Editora Entre Pueblos, España. Grupo de Voluntariado Civile (GVC), Italia. 2006. 485pp.
45. Sánchez L, Rodríguez MG. Potencialidades de *Heterorhabditis bacteriophora* Milstead y Poinar cepa HC1 para el manejo de *Hypothenemus hampei* Ferr. I. Parasitismo y capacidad de búsqueda. Rev. Protección Veg. 2007; 22:80-84.
46. Calabuche-Gómez G, Enrique R, López L. La introducción de cilindros de vidrio y mallas plásticas en olfatómetro facilita ensayos de comportamiento de nematodos entomopatógenos. Rev. Protección Veg. 2019; 34(3):1-5.
47. 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 M. Sc.]. Centro Agrícola. 2006; 33(2): 90.
48. 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.
49. Valdés R, Moya E, Castro M, Pozo E, Cárdenas M. Empleo de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) como contribución al Manejo Integrado de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) en el cultivo del pepino en sistemas de organopónicos. Centro Agrícola. 2005; 32(4):47-53.
50. Pozo E, Valdés R, Cárdenas M, Winchel O. Susceptibilidad de *Heliothis virescens* Fabr. (Lepidoptera; Noctuidae) a nematodos entomopatógenos. Centro Agrícola. 2007; 34(3):39-43.
51. Rivas A. Lepidópteros en cultivares de tabaco: elementos ecológicos y alternativas biológicas para su manejo en Las Tunas. Rev. Protección Veg. 2012; 27(3): 216.
52. 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 Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (www.inca.edu.cu). 2010. Cd ISBN: 978-959-7023-48-7.
53. 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; 33(3):83-86.
54. Pozo E, Sisne ML, Rodríguez U, González Y. Susceptibilidad de escarabajos (Coleoptera; Scarabaeidae) presentes en la piña (*Ananas comosus*

- (L.) Merrill) en Ciego de Ávila a nematodos entomopatógenos. Parte I. Complejo de especies. Centro Agrícola. 2006; 33(1):69-73.
55. Evans G, Valdés R, Cárdenas M, Largo M, Alizar T, Pozo E. Susceptibilidad de *Metamasius hemipterus sericeus* (L.) (Coleoptera; Curculionidae) a una cepa nativa de nematodos. Centro Agrícola. 2009; 36(2):65-69.
 56. Jiménez LC, del Pozo E. Patogenicidad, virulencia y potencial reproductivo de *Heterorhabditis bacteriophora* (Cepa HC1) sobre *Cylas formicarius* var. *elegantulus* (Summers). Rev. Protección Veg. 2010; 25(2):113-118.
 57. García-Perera D, Enrique R, López L, Hernández-Ochandía D, Miranda I, Calabuche-Gómez G, et al. Susceptibilidad de adultos de *Cosmopolites sordidus* (Germer) a *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. cepa HC1. Rev. Protección Veg. 2019; 34(3):1-8.
 58. Rodríguez I, Rodríguez MG, Sánchez L, Martínez MA. Efectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidae: Heteroderidae) sobre chinches harinosas del cafeto (Homoptera: Pseudococcidae). Rev. Protección Veg. 1997; 12(2):119-122.
 59. Rodríguez Hernández MG, Hernández-Sabourin I, Miranda-Cabrera I, Rosales-Amado LC, Martínez-Rivero MA. Manejo de *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) en cultivo de *Hedychium coronarium* (Koenig) con *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló et al.) cepa HC1. Agronomía Tropical. 2021; 71: e4568340. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4568340>
 60. Marrero L, Suárez Y, O'Reilly J, Fernández M, Acosta J, Torren J. Patogenicidad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) sobre las chinches de la soya *Piezodorus guildinii* West y *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). Fitosanidad. 2015; 19(3):227-231.
 61. Castellanos L, Rodríguez I, Martínez MA. Susceptibilidad de *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) frente a *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidae: Heterorhabditidae). Rev. Protección Veg. 1997; 12(2):159-162.
 62. Cuevas M, Lavastida M, Avellan J, Rivas F, Cárdenas M, Valdés R, et al. Susceptibilidad de obreras y soldados de *Nasutitermes* sp. a *Heterorhabditis indica* cepa P₂M. Centro Agrícola. 2013; 40(4):91-93.
 63. Waage J. Yes, but does it work in the field? The challenge of technology transfer in biological control. Entomophaga. 1996; 41(4):315-332.
 64. Limonte A, Grillo H, Hernández U, Pozo E, Valdés R, Cárdenas M. Nematodos entomopatógenos en el control de *Homeosoma electellum* (Hulst) en campos de girasol. Centro Agrícola. 2010; 37(2):13-17.
 65. Sierra A, Pozo E, González E, Pérez B. Lucha biológica de *Keiferia lycopersicella* (Walsg.) en tomate en producciones protegidas de Ciego de Ávila. VII Congreso Internacional de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba. Abril 2014. Disponible en: <http://ahorainternet.net/mail/Norlen/Multimedia/MultimediaVIICongSV/Ponencias/P12/SIERRA.%20A.pdf> [Acceso: 12 octubre 2014]
 66. Rojas R, Pita M, Llanes D. Control de *Plutella xylostella* L. con medios biológicos en áreas de la Empresa de Cultivos Varios de Manacas (E.C.V.M). Centro Agrícola. 2002; 29(84):95-96.
 67. Rodríguez MG, Enrique R, Gómez L, Hernández-Ochandía D, Miranda I, Hernández A, et al. Impact of entomopathogenic nematode applications on diamond back moth population. Rev. Protección Veg. 2013; 28(2):158-160.
 68. Rojas J, Gómez-Sousa JR, Barreada A. Control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) con diferentes medios biológicos. Centro Agrícola. 2003; 30(4):94-95.
 69. 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. Fitosanidad. 2008; 12(4): 254-255.
 70. Olivera D, Rodríguez M, Calero A, López G. Efectividad de *Heterorhabditis indica* cepa P₂M como control biológico de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en el cultivo del maíz en dos agroecosistemas de la provincia de Sancti Spiritus. Fitosanidad. 2015; 19(2): 174.
 71. Rodríguez M, Meléndrez JF, Calero A, Viera R, Plasencia R. Efectividad de *Heterorhabditis indica* en el control biológico del Tetuán del boniato (*Cylas formicarius* var. *elegantulus* Fab.) en Sancti Spiritus. Fitosanidad. 2008; 12(4): 271.
 72. Valdés LI, Rodríguez M, Vargas AD. Comportamiento de diferentes concentraciones de nemátodos *Heterorhabditis* spp. en el control de *Cylas formicarius* var. *elegantulus* Sun. Revista Infocencia. 2012; 16(1): 12 pp.
 73. 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.
 74. Pozo E, Valdés R, Cárdenas M, Grillo H, Sisne ML, Rodríguez K, et al. Nematodos entomopatógenos en el control de escarabajos plaga de la piña y el plátano. Fitosanidad. 2008; 12(4): 282.
 75. Rodríguez MG, García M, Gómez G, Rodríguez Y, Enrique R, Alemán J, et al. Producción y utilización de nematodos entomopatógenos en el manejo de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). 2008. Informe final de Proyecto de Investigación. Programa Ramal de Entidades Exóticas. Ministerio de la Agricultura. La Habana, Cuba. 177 pp.
 76. Valdés D, Ramírez R, Chaviano M, Morales I, Duarte AC. Efecto de *Heterorhabditis bacteriophora* sobre la broca del café en la zona del Algarrobo, Trinidad, Cuba. Centro Agrícola. 2016; 43(1):15-20.
 77. Rodríguez MG, Hernández M, Borrero Y, Gómez L, Enrique R. Recycling of entomopathogenic nematodes in coffee crop (*Coffea* spp.) growing soils in Buey Arriba. Rev. Protección Veg. 2011; 26(1): 67.
 78. 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 cafeto. Rev. Protección Veg. 1998; 13(3):195-198.
 79. Gaugler R, Han R. Production technology. En R Gaugler (Ed). Entomopathogenic nematology. CAB International, Wallingford. 2002. pp 289-310.

80. Saavedra AT, St Louis L, Cárdenas M, Valdés R, Pozo E. Determinación del instar óptimo de *Spodoptera frugiperda* en la reproducción de *Heterorhabditis indica*. Centro Agrícola. 2010; 37(2):19-25.
81. Castellanos L, Sánchez L. Crecimiento de *Photorahdus luminiscens* (Enterobacteriaceae) en medios alternativos. Centro Agrícola. 2000; 27(2):22-27.
82. 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 (Cuba). 2006.
83. García R, Rosales LC, Peñaranda MC, Fernández Larrea O, Rodríguez MG. Impacto de la implementación del programa transferencia tecnológica en el INIA en el área de control biológico mediante el Convenio Cuba Venezuela. INIA HOY. 2009; 6: 17-223. ISSN: 1856-9951.
84. Rosales LC, Rodríguez MG, Enrique R, Puente L, García J. Cría masiva de nematodos entomopatógenos para el control de insectos plagas. INIA Divulga. 2009; 12:19-22.
85. Ceballos M, Montes de Oca N. Registro sanitario de bioplaguicidas microbianos en América Latina y Cuba. Caso de estudio: bionematicida cubano KlamiC®. Rev. Protección Veg. 2016; 31(2):120-133.
86. Infante C. Manejo integrado del Tetuán del boniato. Agricultura Orgánica (Cuba). 2005; 11(1):18-20.
87. Almádoz J, Fernández E, González G, Casanueva K, Baró Y, Porras A, *et al.* Análisis de la utilización de agentes de control biológico en los sistemas de cultivos protegidos en Cuba. Fitosanidad. 2016; 20(1):45-51.
88. Pozo E. Empleo de los nematodos entomopatógenos en el manejo de plagas. En Vázquez LL (Ed.). Manual para la adopción del manejo agroecológico de plagas en fincas de la agricultura suburbana. Volumen II. La Habana, Cuba. INISAV-INIFAT. 2013:59-74.