

Prospección e identificación genérica de nuevas poblaciones cubanas de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes


<https://cu-id.com/2247/v39e20>

Prospection and generic identification of new cuban populations of entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts

✉Dairys García Perera¹, ✉Ileana Miranda Cabrera¹, ✉Belkis Peteira Delgado-Oramas¹, ✉Roberto Enrique Regalado¹,
✉Mayra G. Rodríguez Hernández^{1*}, ✉Giselle Calabuche-Gómez², ✉Lilian Sánchez²

¹Departamento Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Grupo de Investigaciones Farmacéuticas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Los objetivos del estudio fueron: I) realizar prospección y aislamiento de nuevas poblaciones de nematodos entomopatógenos en *Musa* spp. (plátanos y bananos) en Cuba y II) identificar, hasta género, los aislamientos de nematodos y bacterias simbiotes, estableciendo su potencial reproductivo y virulencia sobre *Galleria mellonella* L. Se recolectaron muestras de suelo de cuatro provincias y, utilizando larvas de *G. mellonella*, se recuperaron nuevos aislados, determinándose la Frecuencia de Recuperación (FR) y Abundancia (A). Utilizando criterios de color de los cadáveres de *G. mellonella* y presencia de hermafroditas en la primera generación de nematodos, así como el estudio fisiológico y bioquímico de las bacterias simbiotes, se establecieron los géneros de ambos organismos. Se determinaron el potencial reproductivo e hicieron pruebas de virulencia de cada uno y los resultados se analizaron (ANOVA/Duncan) ($p \leq 0,05$). Se obtuvieron cinco aislados de nematodos entomopatógenos en plantaciones de *Musa* spp. en la occidental provincia Pinar del Río, Cuba; con valores de FR= 12,8 y A=0,27. Los cinco complejos nematodos/bacterias representaron la combinación *Heterorhabditis/Photorhabdus*.

Palabras clave: biodiversidad, control biológico, *Heterorhabditis*, *Photorhabdus*.

ABSTRACT: The objectives of the study were: I) to survey and isolate new populations of entomopathogenic nematodes in *Musa* spp. (plantain and banana) in Cuba and II) to identify the isolates of nematodes and their symbiotic bacteria to the genus level and establish their reproductive potential and virulence on *Galleria mellonella* L. Soil samples were collected in four provinces, and by using *G. mellonella* larvae, new entomopathogenic isolates were recovered and their Recovery Frequency (FR) and Abundance (A) determined. By the color of the *G. mellonella* corpses and the presence of hermaphrodites in the first generation of nematodes, as well as by the physiological and biochemical studies of the bacterial symbionts, the genera of both organisms were established. Their reproductive potential and virulence were determined and the results statistically analyzed (ANOVA/Duncan) ($p \leq 0,05$). Five isolates of entomopathogenic nematodes, with values of FR= 12.8 and A=0.27, were obtained in plantations of *Musa* spp. in the western Pinar del Rio Province, Cuba. The five nematode/bacteria complexes represented the *Heterorhabditis/Photorhabdus* relationship.

Key word: biodiversity, biological control, *Heterorhabditis*, *Photorhabdus*.

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) constituyen cultivos prioritarios en Cuba. Ello se debe a su capacidad de producir durante todo el año, elevado potencial productivo, así como el arraigado hábito de consumo por parte de la población y la diversidad de sus usos (1).

Estos cultivos son afectados en todo el país por insectos plaga destacándose el picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) (Coleoptera: Curculionidae), cuyas larvas causan daños mecánicos al provocar galerías o túneles en pseudotallos y rizomas. Las plantas muy afectadas pueden caer, por

el efecto del viento o el peso de los racimos; adicionalmente, las galerías y orificios favorecen la entrada de patógenos en el cormo y base del pseudotallo. Este insecto es uno de los principales responsables de la reducción de la productividad de estos cultivos (2).

Para manejo del picudo negro se sugirieron en el país alternativas agrotécnicas, químicas y la lucha biológica y, en esta última, se indicaron aplicaciones de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, así como, liberaciones de hormigas depredadoras como *Pheidole megacephala* Fabricius (hormiga leona) y *Tetramorium guineense* Bernard (2).

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

Recibido: 02/08/2024

Aceptado: 28/08/2024

En una revisión sistemática de literatura y meta-análisis reciente (3) se informó que los nematodos entomopatógenos (NEP) pudieran ser otra opción para el manejo del picudo, lo que es factible en Cuba, al contarse en el país con laboratorios que producen estos organismos (4). Por ello, se evaluó, en condiciones de laboratorio, la especie *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* cepa HC1, la cual produjo alta mortalidad en adultos de picudo negro (86,7 %) a los 21 días (5).

A pesar de estos resultados de laboratorio y del amplio uso en campo en Cuba de *H. amazonensis* cepa HC1(6), se desconoce acerca de la existencia de aislados de NEP procedentes de suelos donde se cultiva *Musa* spp., que pudieran ser más patogénicos al picudo. Al respecto, se señaló que se deben desarrollar estudios que permitan encontrar nuevas poblaciones, que se deben comparar con los existentes, pues los aislados nativos pueden exhibir mejores adaptaciones a las condiciones locales (7).

A partir de este planteamiento, los objetivos de este estudio fueron I) realizar una prospección y el aislamiento de nuevas poblaciones de nematodos entomopatógenos en campos de *Musa* spp. y II) identificar, hasta género, los nuevos aislamientos de nematodos y sus bacterias simbios, estableciendo su potencial reproductivo y virulencia en *Galleria mellonella* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios se desarrollaron en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (22°59'20,9"N; 82°09'10,2"W), Municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba; entre los años 2019 y 2022.

Las larvas de *G. mellonella*, de unos 200 mg, que se emplearon para los estudios de prospección, caracterización de aislados, mantenimiento de la cepa HC1 y de los aislados que se encontraron, se obtuvieron en crías establecidas en este laboratorio (8, 9).

Prospección de nuevos aislados de nematodos entomopatógenos en suelos de plantaciones de *Musa* spp.

Las metodologías para el muestreo de suelos, colección de muestras y técnica de extracción de nematodos, siguieron los protocolos generales descritos por Hazir *et al.* (10).

La prospección se realizó en campos seleccionados de bananos/plátanos (*Musa* spp.) de más de tres años de establecidos, donde no existía historial de aplicaciones de agentes de control biológico, ubicados en las provincias de Pinar del Río, Mayabeque, Matanzas y Granma. En cada campo, se tomaron muestras alrededor de plantas seleccionadas

al azar, separadas entre 8 y 10 m cada una, donde, primeramente, se retiró la capa superficial de hojarasca y residuos y, posteriormente, con una pala o guataca/azadón, se extrajeron sub-muestras de unos 250 g de suelo a unos 15-25 cm de profundidad. Para la extracción de las muestras, se tuvo en consideración que la humedad de suelo fuera inferior a la capacidad de campo. En la toma de muestras se lavaron los implementos con agua corriente y se desinfectaron con alcohol (70 %), entre una muestra y otra.

Con las sub-muestras, se estructuró una muestra compuesta de 1 kg y se recolectaron dos muestras por campo. Las muestras se introdujeron en bolsas de polietileno negro, se identificaron y colocaron en cajas frías para su traslado al CENSA. Se anotaron datos para caracterizar el sitio, como: fecha, nombre de la finca y el agricultor, municipio, provincia, ubicación y observaciones preliminares (cultivar de *Musa* spp., años de producción).

El procesamiento de muestras se hizo en el laboratorio, donde se dispersaron sobre papeles, se homogenizaron, se retiraron piedras o fragmentos orgánicos y tamizaron (tamiz de 5 mm) y, de cada muestra, se reservó una cantidad de suelo para análisis físico-químico. Los datos relativos a ese tipo de análisis, en muestras positivas a NEP, se obtuvieron en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (11).

Del suelo tamizado, se tomaron porciones de ~100 g, se colocaron en placas Petri (9 cm de diámetro), el suelo se humedeció hasta capacidad de campo y se colocaron 10 larvas saludables de último instar de *G. mellonella* (técnica de cebo) (10). Las placas se sellaron con Parafilm®, se rotularon con datos de la muestra/fecha y se mantuvieron en oscuridad (25°C) durante cinco días. Se prepararon cuatro placas por cada campo evaluado.

A partir de los 5 días, las placas se revisaron diariamente y las larvas muertas, con síntomas semejantes a los producidos por nematodos entomopatógenos (flácidas, de colores del ocre a marrón oscuro e inodoras) se extrajeron del suelo, se enjuagaron cuidadosamente con agua (corriente y destilada), se secaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en placas Petri con papel de filtro, unos 3 días más, a temperatura ambiente. En las placas de las que se extrajeron larvas muertas, se colocaron otras saludables para continuar extrayendo nematodos.

Posteriormente, los cadáveres se colocaron en trampas White (10) y se mantuvieron a temperatura ambiente en el laboratorio (~25°C). Las trampas se observaron diariamente y todos los nematodos emergidos de los cadáveres de una muestra se consideraron un aislado y se inocularon a larvas de *G. mellonella* para confirmar los postulados de Koch (10). Los aislados se codificaron y mantuvieron en el cepario del CENSA, con ciclos sucesivos de infección/reproducción en *G. mellonella*.

Todos los aislados de nematodos se mantuvieron en bolsas de polietileno transparente con esponjas y agua destilada a 25°C (cuarto con penumbra), hasta su uso para los estudios requeridos en esta investigación.

La frecuencia de recuperación (FR) total y la abundancia (A) de NEP por provincia y total se calcularon mediante las fórmulas sugeridas (12):

$$FR = (\text{número de muestras positivas} \div \text{número total de muestras}) \times 100$$

$$A = \text{número de lugares positivos} \div \text{número total de lugares muestreados}$$

Identificación genérica de nuevos aislamientos de nematodos entomopatógenos y bacterias simbios, procedentes de suelos cubanos con cultivos de *Musa* spp.

Identificación preliminar de aislados de nematodos

En el primer momento, la determinación de géneros se efectuó según la **coloración** que presentaron las larvas de *G. mellonella* posterior al parasitismo donde, generalmente, el color marrón rojizo es producido por el género *Heterorhabditis* y los tonos beige crema se adjudican a nematodos del género *Steinernema* (13, 14).

Identificación genérica de aislados de nematodos entomopatógenos

Para la identificación genérica de los NEP recolectados se prepararon tres placas Petri (9 cm de diámetro) por aislado, se les colocaron 20 larvas del último instar de *G. mellonella* que se inocularon, después de la recolección de los aislados y comprobar que la muerte de las larvas de *G. mellonella* se debió a los NEP recobrados. Se inocularon las larvas de este insecto y, al quinto día, se disecaron 10 cadáveres para determinar la **existencia de adultos hermafroditas** en la primera generación, lo que indicaría la presencia del género *Heterorhabditis* o de **machos y hembras**, indicativo del género *Steinernema* (14) y para esto se utilizó un estereomicroscopio Zeiss (5X).

Los ejemplares recolectados de la primera generación se colocaron en solución salina (NaCl-0,9 %), se mataron y fijaron con TAF caliente (10). Relevantes detalles de caracteres morfológicos externos de los especímenes se fotografiaron utilizando un microscopio invertido con sistema de foto-documentación (Leica®). Los juveniles infectivos (JIs) que emergieron de las larvas parasitadas correspondientes a los cinco campos se mantuvieron por separado en ciclos de infección en *G. mellonella* y se almacenaron en bolsas de polietileno transparente, con agua destilada y esponjas.

Aislamiento e identificación genérica de bacterias simbios

Para la identificación genérica de la bacteria simbiote se preparó una suspensión de juveniles infectivos de cada aislamiento, se inocularon tres larvas de *G. mellonella* (con 20 JI/larva) y se colocaron en placas Petri (9 cm de diámetro) con papel de filtro, conformando cámaras húmedas.

Las placas se colocaron en incubadora refrigerada (Friocell™, Alemania) (27°C) por 48 horas y transcurrido ese tiempo, se desinfectaron superficialmente por inmersión en etanol (70 %), se realizó la disección en la región ventral de la larva, cercana a la cabeza y se aplicó presión para provocar la salida de hemolinfa, la que se tomó con un asa de siembra esterilizada por flameo con etanol (10).

Con la muestra tomada con el asa se realizó la siembra de la bacteria por el método de agotamiento, preparando cinco placas Petri (9 cm de diámetro) para cada aislado, contentivas de 20 ml de medio agar McConkey (A. Mc) (BioCen, Cuba) y agar Bromotimol azul-tetrazolium (NBTA) (BioCen, Cuba) (15).

Las placas se sellaron con Parafilm® e incubaron a 28°C en una incubadora (Friocell™, Alemania). Transcurridas 48 horas se observaron macroscópicamente las colonias y las que exhibieron las características descritas para las bacterias de los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* (16) se marcaron para continuar los estudios. El procedimiento de aislamiento se realizó tres veces.

Para el estudio morfológico celular, se desarrolló la tinción de Gram y se realizaron las observaciones en el microscopio óptico (Zeiss modelo Axio Lab A1) con aumento de 100x/1,25 Oil M27 (inmersión). La morfología de las colonias se observó en un estereoscopio (Zeiss®) con aumento de 2,5X.

Caracterización bioquímica

Preparación del concentrado celular de cada aislado de bacteria simbiote: De cada aislado, se prepararon los inóculos a partir de cultivos de 48 horas que crecieron en Agar Nutriente (AN) (Biocen, Cuba) y se sembraron las colonias en erlermeyers de 150 ml con 50 ml de Caldo Nutriente e incubaron (24 horas) en una zaranda orbital (RETOMED, Cuba) con una agitación de 150 rpm. min⁻¹.

Después del crecimiento, los erlermeyers se centrifugaron a 7500 g (15 min.) a 4°C (centrifuga Beckman GS -6R, Alemania). El sobrenadante se descartó y la biomasa se resuspendió en 20 ml de solución salina (0,8 %). El concentrado celular se ajustó a una absorbancia (A) de 0,9 ± 0,2; mediante medición a 560 nm en un espectrofotómetro (T90+UV/VI; PG Instruments, Ltd).

Para precisar la motilidad de las células, se utilizó el método de la gota colgante y para determinar el metabolismo respiratorio de las células, se sembraron en el medio de cultivo Hugh-Leifson.

La actividad proteasa se determinó (17) en el medio AN suplementado con 0,4 % de gelatina y agar leche (18). Adicionalmente, se determinó la acción de las fosfolipasas, mediante el método descrito por Boemare *et al.* (19) y se empleó el medio de cultivo AN suplementado con yema de huevo (10 %). Para establecer si los aislados bacterianos presentaban actividad de lipasas se utilizó el medio Agar Tween 80 (19); mientras que, se usó Agar Triptona Soya para determinar la presencia y difusión de pigmentos (18).

Se cultivaron los aislados bacterianos en Agar Sangre de cordero (10 %) para determinar la presencia de hemolisina (19) y la producción de catalasa se determinó por el goteo de una solución de Peróxido de Hidrógeno (30 %) sobre un portaobjeto con 0,2 ml de la concentración celular descrita anteriormente.

El uso y acidificación de carbohidratos se determinó mediante el juego de reactivos API ® 20 E™ (20) en solución salina fisiológica (0,85 %) y se utilizó el Bromofenol Azul como indicador de pH. En esta técnica, además, se evaluaron las actividades de las enzimas β -galactosidasa (orto-nitrofenil- β D galactopiranosidasa) (ONPG), Arginina dihidrolasa (ADH), Lisina Decarboxilasa (LDC), Ureasa (URE), Triptofano Desaminasa (TDA), así como la formación de Sulfuro de Hidrógeno (H_2S), el uso del Citrato de Simmons (CIT), el tests de Vogues- Proskauer (VP), la producción de Esculina (ESC) e Indol (IND) y se empleó, en este último caso, el reactivo de Kovacs como revelador de la reacción.

Además, se analizó el uso y acidificación de Glucosa, Ramnosa, Sacarosa, Inositol, Melibiosa, Arabinosa, Sorbitol, Manitol, Glicerol, Amigdalina, Manosa, Sorbosa, Xilosa, Maltosa, Celobiosa, Melezitosa, Rafinosa y Trehalosa. Para el ensayo con los API se siguieron las instrucciones del fabricante (20).

Los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó, como control positivo, el simbionte bacteriano de la cepa HCl1 identificado como *Photorhabdus luminescens* (4).

Caracterización preliminar de nuevos aislamientos de nematodos entomopatógenos (complejo simbiótico)

Estudio de potencial reproductivo de aislamientos de nematodos entomopatógenos provenientes de suelos de *Musa* spp.

Para cada aislado se prepararon cuatro placas (9 cm de diámetro) con 10 larvas de *G. mellonella* ($0,23 \pm 0,2$ g). Las placas se inocularon con una serie de tres dosis de juveniles infectivos (JI): 20, 60 y 80 JI/larva⁻¹ y se incubaron a 28°C (Friocell™, Alemania).

Transcurridos 12 días desde la inoculación se determinó el potencial reproductivo, colocando 10 cadáveres en trampa White, una placa por cada aislado. Una vez concluida la emergencia, a los siete días, se determinó el total de JI utilizando un estereomicroscopio (Zeiss, 5X) y se calculó el número medio de JI/ larva del insecto.

Todos los datos se vertieron en hojas del procesador Excel y se graficaron.

Estudios de virulencia de los nuevos aislamientos de NEP

Se realizaron estudios estandarizados (21) para determinar virulencia a través de los ensayos “uno en uno” y de “columna de arena”. Para estas pruebas se obtuvo una suspensión de JI y, a partir de los nuevos aislados, se desarrollaron los siguientes estudios:

Prueba uno en uno: Por cada aislado obtenido se prepararon placas plásticas de 24 pocillos donde, en cada pozo, se colocó un disco de papel de filtro.

En el estereomicroscopio Zeiss® (2,5X), utilizando un selector, se extrajo un ejemplar (JI) para colocarlo en cada pozo, ubicando posteriormente una larva de *G. mellonella* por celda. Las placas se taparon e incubaron (28°C), el experimento se repitió 2 veces. La mortalidad del insecto se determinó a las 72 h y se expresó en porcentaje.

Rango de penetración: Se utilizó el método de las columnas de arena, con el uso de cilindros de vidrio de 4,5 x 5 cm que se colocaron sobre una placa Petri (5 cm de diámetro), se llenaron con arena previamente lavada y esterilizada (2 h a 120°C) y humedecida (10 %).

En uno de los extremos de cada cilindro se colocó una malla plástica y se aplicó presión para conformar una concavidad y colocar en ella una larva de *G. mellonella*. Posteriormente, los cilindros se cubrieron con una placa Petri y se invirtieron, quedando hacia abajo la parte sellada con la placa. Una vez colocado el insecto, se añadió 1 ml de la suspensión de nematodos (100 ± 9 JI.ml⁻¹).

Se conformaron 10 repeticiones para cada aislado y se incubaron (28°C, 24 h). Transcurrido ese período de tiempo se extrajeron las larvas, se enjuagaron y se colocaron en placa Petri (9 cm de diámetro), preparadas como cámaras húmedas (72 h). Se determinó el porcentaje de larvas muertas y, mediante la disección de los cadáveres, se cuantificó el número de nematodos. El rango de penetración se calculó mediante la fórmula siguiente (21):

$$P = N \times 100 \div T$$

donde: N= número medio de nematodos contados por cada cadáver; T= número medio original de nematodos en la celda (100 JI) y P= porcentaje de penetración.

Los datos relacionados con los ensayos de prueba uno en uno y columnas de arena se analizaron a través de una Comparación Múltiple de Proporciones por el Método de Wald, usando el programa CompaProp 2.0 (22).

RESULTADOS Y DISCUSION

Prospección de nuevos aislados de nematodos entomopatógenos en suelos de plantaciones de *Musa* spp.

Se analizaron 39 muestras, el 85,18 % provenientes de cultivos establecidos de plátanos/bananos y uno de acerola (*Malpighia emarginata* DC) que crecía junto a un platanal, recolectadas en 4 provincias y se obtuvieron cinco aislados. Sólo se encontraron nuevos aislamientos de NEP en la provincia Pinar del Río (Tabla 1). Los aislados obtenidos se codificaron y conservan en la colección del Laboratorio de Nematología del CENSA.

El porcentaje de muestras positivas, encontradas en los sitios de este estudio, fue superior a lo hallado por Sánchez (23) en Cuba, quien analizó 251 muestras procedentes de 144 sitios correspondientes a 27 tipos de cultivos y recolectadas en nueve provincias y 20 localidades del país, obteniendo solo siete aislados de NEP, lo que representó una FR=2,79 %. Sin embargo, en la prospección realizada por Pozo *et al.* (24) en una finca, en los cultivos de arroz (*Oriza sativa* L.), banano, boniato (*Ipomoea batatas* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L.), recolectaron 13 muestras y dos resultaron positivas a NEP, evidenciando un FR=15,38 % y una Abundancia cuyo valor fue 0,5.

El porcentaje de recuperación varió entre regiones, pues solo se encontraron aislados en fincas de plátanos y bananos de Pinar del Río (Tabla 1) las que, según sus propietarios, no recibieron tratamientos químico o biológico alguno. Mientras que, la abundancia (total) fue baja, relacionado con el hecho de que se hallaron solo 5 sitios positivos a NEP del total de 22 sitios muestreados.

El alto porcentaje de muestras positivas en Pinar del Río, sugiere la existencia de amplia distribución de poblaciones de NEP en esa provincia, destacándose el hecho de que cuatro de los cinco sitios poseen suelos del Agrupamiento Ferralítico, debiéndose muestrear, en otras prospecciones, estos tipos de suelo en esta y otras provincias.

Diversos factores abióticos pueden afectar la ocurrencia y persistencia de los NEP, entre ellos, factores físicos y químicos (pH, textura y estructura del suelo), así como las actividades humanas (disturbios físicos o químicos del suelo), patrones de uso de las tierras, coberturas vegetales, tipos de preparación de los suelos, entre otros (25).

Con relación a las características de los suelos a partir de los cuales se obtuvieron poblaciones de NEP, los valores de pH estuvieron entre 6,5 y 8 (de neutral a moderadamente básico) (Tabla 2), rango informado, por otros autores como adecuado para el desarrollo de NEP (26). Por otra parte, los porcentajes de materia orgánica de los suelos que resultaron positivos a NEP estuvieron entre los valores del intervalo informado por otros autores para suelos con poblaciones de estos nematodos (27, 28). En cuanto al efecto de los contenidos de bases (calcio, potasio, otros), Alumai *et al.* (29) señalaron que no encontraron correspondencias entre la presencia de NEP y esos elementos en los suelos.

Los platanales donde se encontraron los NEP tenían entre 3 y 10 años, lo que denota estabilidad de esos agroecosistemas. Al respecto, Sánchez (23) señaló que los siete aislados hallados en su prospección en Cuba, se encontraron en sitios de frutales, cítricos (*Citrus* spp.) y cafeto (*Coffea* spp.), sugiriendo que esto guardaba relación con la presencia de hospedantes de NEP en esos sistemas.

Se deben realizar prospecciones futuras en sitios donde se asegure no se aplicaron NEP, con el objetivo de incrementar el conocimiento de la biodiversidad de estos organismos en el país.

Tabla 1. Provincias de procedencia de las muestras de suelo recolectadas y número de aislamientos de nematodos entomopatógenos encontrados, reflejados en los valores de Frecuencia de Recuperación (FR) y Abundancia (A) / Provinces of origin of the collected soil samples and number of entomopathogenic nematodes isolates found, shown by the Recovery Frequency (FR) and Abundance (A) values.

Provincia	No. total de muestras	No. aislamientos recolectados	Total de sitios	FR		A***
				total*	Provincia**	
Pinar del Río	6	5	6	12,8	83,33	0,83
Mayabeque	13	0	7	0	0	0
Matanzas	2	0	1	0	0	0
Granma	18	0	8	0	0	0
Total	39	5	22	12,8	n.a	0,27

*(muestras positivas / total de muestras) x 100; **(muestras positivas / total de muestras para cada provincia) x 100; ***sitios positivos / sitios totales muestreados; n/a: No aplica

Tabla 2. Caracterización de sitios de los que se obtuvieron aislamientos de NEP en la provincia de Pinar del Río, Cuba / Characterization of the sites in Pinar del Río province, Cuba, where EPNs were found.

Ident.	Finca	Municipio	Coord.	Observ.	Tipo de suelo	Análisis de suelo						
						Na	K	Ca	Mg	P	MO	pH
						Cmol (+).kg ⁻¹			mg.l ⁻¹		%	
C-5	Finca Productor “Allende”	Pinar del Río	22°24'58.5"N 83°41'10.4"W	Plátano (burro) y banano; > 10 años	Fluvisol	0,32	0,99	12,5	2,5	134	2,41	7,7
C-1	Politécnico “Tranquilino S. de Noda”	Pinar del Río	22°20'20.4"N 83°40'44.0"W	Plátano burro; > 5 años	Ferralítico Amarillento	0,21	0,12	12,0	2,0	111	2,05	8,0
C-4	Finca “Bardi Pino”	Consolación de Sur	22°28'40.7"N 83°23'21.6"W	Plátano Pisang awak; > 10 años	Gley Ferralítico	0,42	0,33	21,3	6,2	78	3,16	6,5
C-SJ	Productor Aníbal Casaña	Los Palacios	22°39'00.3"N 83°12'20.2"W	Plátano Pisang awak; > 3 años	Ferralítico Rojo	0,23	0,24	18,3	5,3	65	1,94	6,7
C-2	El Blay	Los Palacios	22°34'48.3"N 83°16'12.9"W	Plátano vianda; > 3 años	Ferralítico Rojo	0,11	0,66	7,5	2,5	74	1,66	7,3

MO: materia orgánica, Na: sodio; P: fósforo; K: potasio; Ca: calcio, Mg: magnesio

Identificación genérica de nuevos aislamientos de nematodos entomopatógenos y bacterias simbiotes, procedentes de suelos cubanos con cultivos de *Musa* spp.

Ambos géneros de NEP (*Heterorhabditis* y *Steinernema*) son identificados, usualmente, considerando varios criterios que incluyen la fenética (morfología/morfometría), aspectos biológicos (ensayos de hibridación cruzada) y filogenética (taxas delimitadas en base a sus relaciones evolutivas considerando datos de secuencias de varios géneros), pero estos criterios requieren experiencia y mucho tiempo para llegar a la adecuada identificación del taxón, siendo la identificación precisa de la especie NEP una necesidad esencial solo para la implementación y liberación de nematodos en programas de manejo (30). Por esto, este trabajo solo abarcó la identificación genérica, hasta tanto no se desarrollen estudios de patogenicidad que sugieran la necesidad de hacer un trabajo de identificación a nivel de especie.

Identificación preliminar de aislados de nematodos

Los cinco aislamientos obtenidos produjeron **coloración rojiza/marrón oscuro** en las larvas de *G. mellonella*; los cadáveres no tenían olores desagradables y se mostraron flácidos al tacto, lo que sugirió la presencia de nematodos del género *Heterorhabditis*.

Identificación genérica de aislados de nematodos entomopatógenos

Cuando se disectaron los cadáveres de *G. mellonella* inoculados con los cinco aislados, se observaron adultos hermafroditas, ratificando que

los aislados representaban al género *Heterorhabditis*. Otros detalles de la **morfología externa** de este estado se deben observar, como son la presencia de seis papilas en la región cefálica, la presencia de la vulva en la zona media del cuerpo y de un pliegue o protuberancia post-anal (Fig. 1). De acuerdo con Poinar (31) las características antes señaladas se corresponden con el género *Heterorhabditis*.

En Cuba, en prospecciones anteriores, se encontraron más aislamientos de *Heterorhabditis* que de *Steinernema* (4), sugiriendo una presencia mayor de este género en el país que de poblaciones de *Steinernema*.

Aislamiento e identificación genérica de bacterias simbiotes

La tinción de Gram realizada a los aislados obtenidos presentó una coloración de roja a rosa (Gram negativo), lo que los ubica como miembros de *Enterobacteriaceae*, característica que representa a *Photorhabdus* como un género de la familia (16).

Los resultados obtenidos, en la caracterización de las bacterias simbiotes de los nuevos aislamientos (Tabla 3), se corresponden con los exhibidos por representantes del género *Photorhabdus* (16), asociado a *Heterorhabditis*.

La emisión de bioluminiscencia por las colonias bacterianas, y el hecho de que hay cepas de *Photorhabdus* que son Indol negativas, hidrolizan la urea y no reducen el nitrato, tal como se manifestaron los aislamientos en este estudio confirman lo sugerido por Boemare (16), de que representan al género *Photorhabdus*. De igual forma, todos los aislamientos crecieron bien en Agar MacConkey, produciendo colonias rojas, creciendo en otros medios como AN;

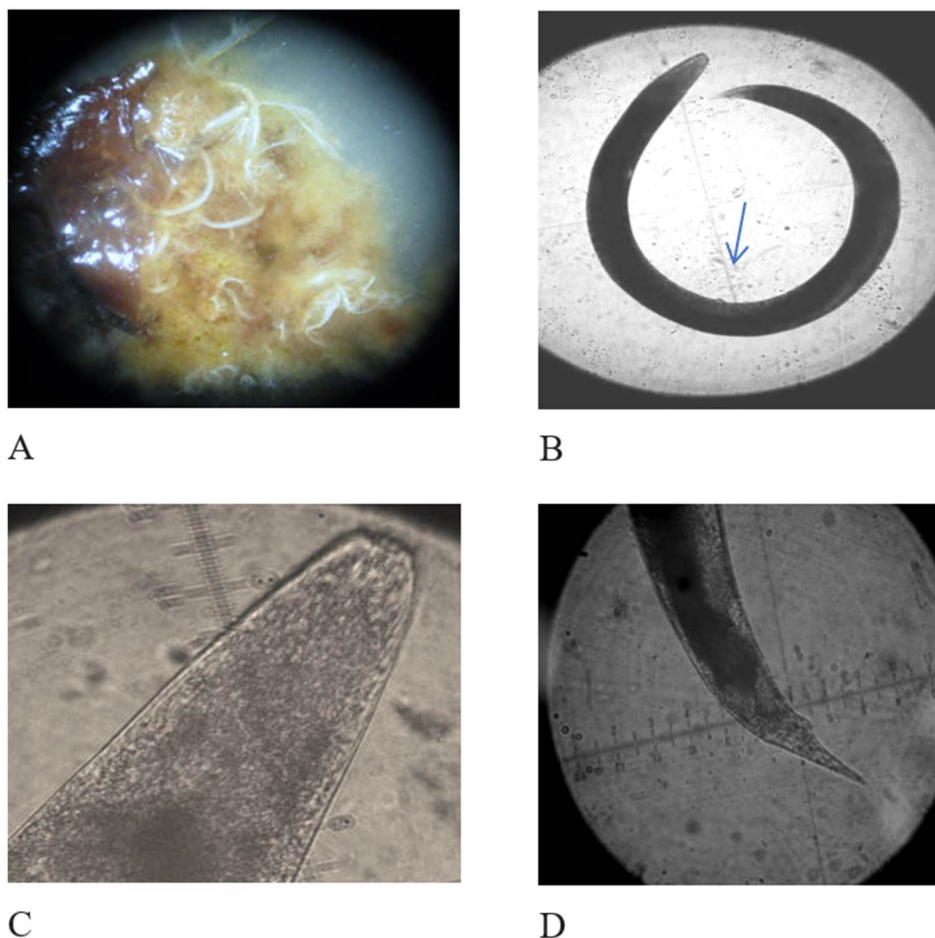


Figura 1. A) Adultos hermafroditas emergiendo del cadáver de *G. mellonella*. B) Hermafrodita mostrando la vulva en la zona media del cuerpo (ambas imágenes tomadas en estereomicroscopio; C) región cefálica y D) pliegue o protuberancia postanal (100x, microscopio óptico) / A) Hermaphrodite adults emerging from the corpse of *G. mellonella*. B) Hermaphrodite showing the vulva in the middle area of the body (both images taken under stereomicroscope; C) cephalic region and D) postanal fold or protuberance (100x, optical microscope)

sin embargo, hubo diferencias entre los aislamientos en cuanto al uso y acidificación de carbohidratos (manosa, arabinosa) y uso de citrato de Simmons. (Tabla 3)

Las cepas de *Photorhabdus* son hemolíticas (16), tal como se puso de manifiesto en este estudio (Tabla 3; Fig. 2). Estos aislamientos difieren, en ciertas características, del simbiote bacteriano de *H. amazonensis* cepa HC1 (utilizado como cepa de referencia) (23, 32). Los aislados del campo 5 (C-5) y San José (C-SJ) fueron arabinosa y manosa negativas y citrato de Simons positivas, estas reacciones pueden estar relacionadas con variaciones entre cepas (33), lo que podría tener implicaciones en el desenvolvimiento de las cepas bacterianas. El estudio de estos simbioses bacterianos debe continuar, por el impacto que pudieran tener las enzimas y otros productos del metabolismo secundario de estos nuevos aislamientos, en el manejo de plagas u otros fines.

El crecimiento de los aislamientos en los medios agar Mac Conkey, agar nutriente y medio Triptonasoya fue semejante a lo descrito para aislamientos/ cepas de *Photorhabdus* (16).

Los aislamientos no produjeron sulfuro, la acción de las proteasas es negativa, pues no licuaron la gelatina; mientras que, el metabolismo es anaerobio facultativo, pues el medio Hugh- Leifson no cambió de color y produjeron hemólisis total, siendo del tipo β hemolítico, produciendo hemolisina, lo que significa que son patogénicos. (Fig. 2)

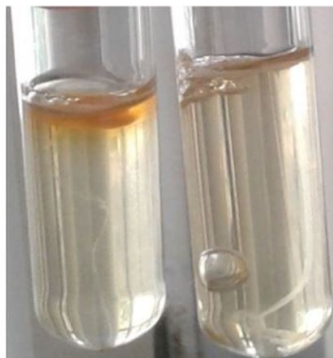
El estudio de estos nuevos aislamientos, donde algunos de ellos muestran diferencias con aislados conocidos (como HC1), debe continuar. La presencia de sistemas enzimáticos y otras características de las bacterias simbioses de NEP está llamando poderosamente la atención en los campos agrícolas y de salud humana, por el amplio rango de actividades biológicas que presentan contra plagas/patógenos de plantas, animales y el humano.

Tabla 3. Caracterización cultural, fisiológica y bioquímica de los nuevos aislados bacterianos de NEP procedentes de campos de *Musa* spp., de Pinar del Río, Cuba. / Cultural, physiological and biochemical characterization of new EPN bacteria isolates from fields of *Musa* spp., Pinar del Río, Cuba

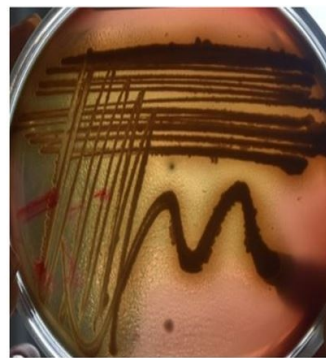
Caracterización de colonias	Resultados
Colonias	Lisas, bordes regulares, brillosas y no se disuelven en agua
Bioluminiscencia	Fuerte
Crecimiento en agar Mac Conkey	Colonias rojo intenso por la absorción del rojo neutral
Crecimiento en agar Bromotimol azul- trifeniltetrazolium	Colonias Azules (absorben el azul de bromotimol)
Motilidad de las células	Positiva
Metabolismo respiratorio	Anaerobio facultativo
Morfología	Bacilos
Gram	Negativo
Mucosidad	Positiva
Esporulación	Negativa
Pigmento en Agar Nutriente	Colonias lisas, de bordes regulares, muy brillosas, de color amarillo cremoso, con centros naranjas
Pigmento Agar Triptona soya	Pardo oscuro
Acción de las fosfolipasas	Positiva
Acción hemolítica en Agar sangre de carnero	β hemolítica
Uso y Acidificación de Carbohidratos (técnica API® 20E™)	
Glucosa	Positivo
Manosa	C-1, C-2 y C-4(Pos); C-5 y C-SJ(Neg)
Melibiosa	Negativo
Sacarosa	Negativo
Sorbosa	Negativo
Manitol	Negativo
Arabinosa	C-1, C-2 y C-4(Pos); C-5 y C-SJ(Neg)
Inositol	Negativo
Melibiosa	Negativo
Sorbitol	Negativo
Actividad enzimática	
Arginina dihidrolasa (ADH)	Negativo
β-galactosidasa (ONPG)	Negativo
Nitrato reductasa	Negativo
Lisina descarboxilasa (LDC)	Negativo
Triptofano deaminasa (TDA)	Negativo
Ureasa (URE)	Positiva
Uso de citrato de Simmons (CIT)	C-1, C-2 y C-4 (Neg); C-5 y C- SJ(Pos)
Tests de Vogues-Proskauer (VP)	Negativo
Indol	Negativo



Medio Hugh-Leifson



Medio Gelatina

Agar sangre de carnero
(hemólisis total)**Figura 2.** Representación del crecimiento bacteriano de los nuevos aislamientos de bacterias del género *Photorhabdus*, asociadas a NEP procedentes de campos de *Musa* spp. en diversos medios, indicativo de la presencia de complejos enzimáticos / Representation of the bacterial growth of the new EPN-associated isolates of bacteria of the genus *Photorhabdus* from fields of *Musa* spp. on various media, indicative of the presence of enzyme complexes.

Caracterización preliminar de nuevos aislamientos de nematodos entomopatógenos (complejo simbiótico)

La mortalidad que provoca un aislamiento de NEP en el hospedante constituye un elemento que se emplea para la diferenciación y caracterización de aislamientos. Los estudios de virulencia y potencial reproductivo de NEP ofrecerán elementos para la selección de aislados en estudios posteriores.

Ravensberg (34) señaló que los estudios de selección y caracterización de aislados usualmente evalúan infectividad, mortalidad y determinación de dosis letales y, en ocasiones, combinan el desenvolvimiento del aislado ante factores ambientales. Este autor indicó que la selección en NEP es compleja, pues están involucrados dos organismos, el nematodo y la bacteria. El comportamiento del nematodo es crucial para hallar e invadir el insecto hospedante y la bacteria determina la patogenicidad sobre el hospedero.

Estudio de potencial reproductivo de aislamientos de nematodos entomopatógenos provenientes de suelos de *Musa* spp.

De manera general, la reproducción de los aislados de NEP procedentes de suelos de *Musa* spp., estuvo por encima de los 100 000 JI x larva de *G. mellonella*⁻¹, nivel aceptable para la reproducción masiva *in vivo*; se destacan los aislamientos C1, con más 500 000 JI x larva de *G. mellonella* cuando se emplearon densidades de inóculo de 40 y 80 JI por larva y C2, que fue de 400 000 JI cuando se emplearon iguales densidades de inóculo inicial (Fig. 4). Al respecto, Sánchez (23) informó la existencia de diferencias en el potencial reproductivo de los seis aislados nativos de *Heterorhabditis* que estudió. En diversos estudios, cepas de *Heterorhabditis* produjeron rendimientos en JI superiores a los 350 000 / larva de *G. mellonella*⁻¹ (36, 37). Grewal y Georgis (35) informaron que en el proceso de reproducción *in vivo* sobre *G. mellonella*,

los rendimientos de los NEP fluctuaron entre 50 000-400 000 JI x larva de *G. mellonella*⁻¹. En el presente estudio, solo el aislamiento C5 exhibió un rendimiento muy bajo, cuando se inoculó con una densidad de 40 JI x larva de *G. mellonella*⁻¹. (Fig. 3)

El potencial reproductivo de cada aislamiento está en dependencia de su capacidad reproductiva intrínseca y la calidad del hospedante, que determina la disponibilidad de alimento (35). Al emplear larvas saludables y de buen contenido de lípidos, como las obtenidas en el laboratorio, el potencial reproductivo es el reflejo de la capacidad que, para esta actividad, posea cada aislamiento.

De manera general, el aislamiento SJ presentó elevados valores de potencial reproductivo con las tres densidades iniciales de inóculo. Estudios posteriores se deben realizar para determinar el potencial reproductivo en hospederos que se están proponiendo para la reproducción masiva *in vivo* por otros autores, de manera de contar con elementos adicionales en la selección de aislados para fines de reproducción masiva en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) del país.

Estudios de virulencia de los nuevos aislamientos de NEP

Se produjeron diferencias entre los nuevos aislados procedentes de campos de *Musa* spp. y cepa HC1. El aislamiento C-5 y la cepa HC1 mostraron los mayores valores de mortalidad en la prueba “uno en uno” y en la de columnas de arena, sin diferencias significativas. Señaló Yang *et al.* (38) que este último indicador parece ser mejor para medir la infectividad de aislados en *G. mellonella*. (Tabla 4)

Los ensayos efectuados fueron sugeridos por Glazer y Lewis (21), quienes señalaron que son pruebas simples y factibles para evaluar el comportamiento de los aislados de forma cuantitativa. El ensayo de columnas de arena se relaciona con la habilidad de los NEP de localizar y penetrar al hospedante; mientras que, la prueba uno en uno, representa el proceso de infección (39, 40).

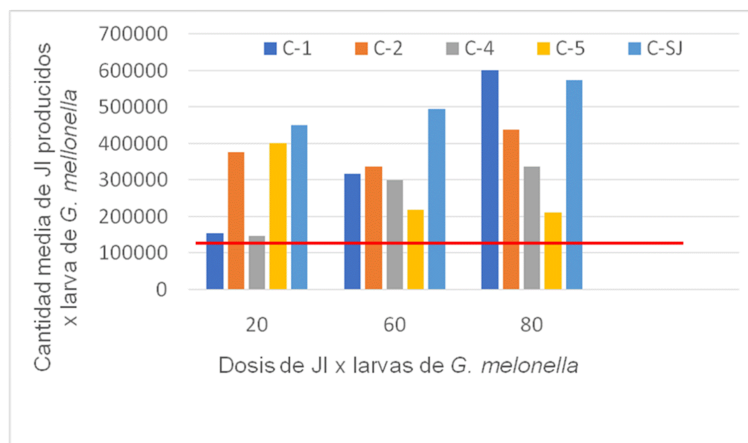


Figura 3. Potencial reproductivo de aislados de NEP procedentes de suelos de *Musa* spp./ Reproductive potential of EPN isolates from *Musa* spp. soils. (Líneas rojas indican límites de valores aceptables de producción de JI)

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad provocados en *G. mellonella* por los nuevos aislamientos y su comparación con la cepa HC1 de *H. amazonensis* en la prueba uno en uno y las columnas de arena / Percentages of *G. mellonella* mortality caused by the new isolates and their comparison with the strain HC1 of *H. amazonensis* in one-on-one comparison and the sand columns.

Denominación de aislados/ cepa	Prueba uno en uno (n=24)	Columnas de arena (n=10)
	% de mortalidad	% de mortalidad
C-1	16,6 ab	80 ab
C-2	20,8 ab	80 ab
C-4	4,16 b	70 b
C-5	33,3 a	100 a
C-SJ	20,8 ab	80 ab
Cepa HC1	33,3 a	100 a

Letras diferentes difieren en la misma columna ($p \leq 0,05$)

Estos bioensayos constituyen herramientas útiles para la caracterización primaria y la selección de aislamientos potencialmente eficientes a nivel de laboratorio y representan elementos para el control de calidad en la reproducción masiva y formulación (21).

Sin embargo, la valoración completa de los nuevos aislados se obtendrá mediante ensayos donde se evalúe la mortalidad que son capaces de provocar en adultos del *Cosmopolites sordidus* (en laboratorio y campo) y en otras plagas de interés.

No obstante, el hecho de haber encontrado nuevos aislados en suelos cubanos sugiere la necesidad de continuar este tipo de estudios en zonas donde no se han aplicado NEP para continuar incrementando las colecciones, que tendrán usos en la producción, la investigación y la docencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Daine Hernández Ochandía y Lidia López Perdomo por su ayuda en el procesamiento de muestras y búsqueda de información, al MSc. Yoerlany Santana Baños por proporcionar la georeferenciación de los sitios muestreados y el apoyo en la toma de muestras. A Dany Maykel por el envío de muestras de suelo, al personal del Laboratorio de Bacteriología y la Dra. Ivette Espinosa por la ayuda. A la Dra. Dayamí Martín del Centro de Investigaciones de la Defensa Civil de Cuba por sus consultas sobre el trabajo con las bacterias. Al Dr. Omar Cartaya y su grupo de trabajo del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas por los análisis químicos-físicos realizados a las muestras de suelo. Los autores utilizaron tiempo y facilidades en el marco del Proyecto de la Unión Europea "Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases" (MUSA, 727624; topic: SFS- 11-2016)

REFERENCIAS

- Maza Estrada NJ, Díaz Galvez A, Morales Romero LM, Rodríguez Morales SJ, Espinosa Cuellar A, García Ruiz AG, *et al.* Cadena productiva de plátanos y bananos en Cuba: herramienta para decisores. Anuario Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. 2023; 14: 284-300. <https://anuarioeco.uo.edu.cu>
- Folgueras MC, Castellón Valdés MC, Morales Romero LM, Dávila Martínez A, González Vázquez RE, Ventura Chávez V, *et al.* Manual Práctico. Manejo Integrado de Plagas en raíces, rizomas y tubérculos tropicales, plátanos y bananos. Editorial INIVIT. Cuba. 2020. 119 pp. ISBN: 978-959-295-013-9.
- Miranda I, García-Perera D, Rodríguez MG. Meta-análisis de las estrategias para el manejo de *Cosmopolitis sordidus* Guermar en *Musa* spp. Rev. Protección Veg. 2019; 34 (2): 1-7. <http://opn.to/a/JeRz8>
- Rodríguez Hernandez 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, Switzerland; Heidelberg, Germany; New York, NY, USA; Dordrecht, The Netherlands; London, UK, 2015; pp. 343-364, https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7_14
- García-Perera D, Enrique R, López L, Hernández-Ochandía D, Miranda I, Calabuche-Gómez G, Pino O, Pupiro L, Rodríguez MG. Susceptibilidad de adultos de *Cosmopolites sordidus* (Germar) a *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* cepa HC1. Rev. Protección Veg. 2019; 34 (3): 7 pp. <https://zenodo.org/record/6338556>
- Márquez ME, Vázquez LL, Rodríguez MG, Ayala Sifontes JL, Fuentes F, Ramos M, *et al.* Biological Control in Cuba. En Van Lenteren JC, Bueno VHP, Luna G, Colmenarez YC (Eds). Biological Control in Latin America and the Caribbean. Its rich history and bright future. Pp 176 - 193. CABI Invasive Series. 2020. ISBN: 9781789242447. Printed in India.

7. Dolinski C, Moino A. Use of native and exotic entomopathogenic nematodes: The risk of introductions. *Nematologia Brasileira*. 2006; 30, 139-149.
8. Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Soler DM, Hernández MA, Castellanos L, Martín D, Enrique R. Desarrollo de una Metodología para la reproducción artificial de nematodos entomopatógenos para el control de plagas en café. PNCT: Desarrollo Sostenible de la Montaña. Código: 0703023. Informe final proyecto- CENSA. 2001. (Metodologías Depositadas en Centro de Derechos de Autor (www.cenda.cult.cu), Cuba, número 09613/2002).
9. Enrique R, Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Valle Z. Dietas alternativas para la cría de *G. mellonella*. Influencia sobre el rendimiento - peso de larvas de *Galleria mellonella* y recobrado de juveniles infectivos. 2006. Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA). Número de depósito CENDA 2874-2006. Ciudad de la Habana, Cuba, 20pp.
10. Hazir S, Kaya H, Touray M, Çimen H, Shapiro Ilan D. Basic laboratory and field manual for conducting research with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*, and their bacterial symbionts. *Turkish Journal of Zoology*. 2022; 46 (4).<https://doi.org/10.55730/1300-0179.3085>. Disponible en: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol46/iss4/1>
11. Paneque VM, Calaña JM, Calderón M, Borges Y, Hernández TC, Caruncho M. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA. [En línea] [Consultado: abril de 2022]. Disponible en: www.ediciones.inca.edu.cu/files/folleto/folleto_suelos.pdf
12. Liu J, Berry RE. Natural distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Oregon soils. *Environmental Entomology*. 1995; 24: 159-216.
13. Poinar GO. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En Gaugler R & Kaya HK (eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. 1990. Boca Raton, FL: CRC Press. p:23-62.
14. Adams BJ, Nguyen KB. Taxonomy and Systematics. En R Gaugler (Ed.). Pp 1-33. *Entomopathogenic Nematology*. CAB International. 2002. ISBN : 978-0-85199-567-0
15. Boemare NE, Akhurst RJ, Mourant RG. DNA Relatedness between 35 *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bact.* 1993; 43(2): 249-255.
16. Boemare N. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. En R Gaugler (Ed.). Pp 35 - 56. *Entomopathogenic Nematology*. CAB International. 2002. ISBN : 978-0-85199-567-0
17. Frazier WC. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *Two plates. J. Infec. Dis.* 1926; 39: 302 -309. <https://doi.org/10.1093/infdis/39.4.302>
18. Lyne P, Grange JM. *Microbiological methods*. 7th Ed. 1995. Butherworth/Heinemann Ltd. Linacre House, Jordan Hill. Oxford OX28. 250 pp.
19. Boemare N, Thaler JO, Lanois A. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. *Symbiosis*. 1997; 22:167-175.
20. Biomerieux. API 20 E. Catálogo analítico. Referencia no. 20190. 3ra Edición. 1993. Biomerieux. S.A. Copyright.
21. Glazer I, Lewis EE. Bioassays for entomopathogenic nematodes. En Navon A & Ascher KRS (Eds.). *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. pp. 229- 247. 2000. Wallingford, UK: CAB International. ISBN: 0 85199 422 9.
22. Duvergel Y, Miranda I. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Rev. Protección Veg.* 2015; 29(3): 231
23. Sánchez L. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. [PhD Tesis]. 2002. 100 pp. La Habana, Cuba. Universidad Agraria de La Habana. (Documento depositado en el Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA) Número 9613- 2002).
24. Pozo E, López D, Martínez Y. Nuevos aislados de nematodos entomopatógenos en la región central de Cuba. *Centro Agrícola*. 2003; 30(4), 94-95.
25. Lazarova S, Coyne D, Rodríguez MG, Peteira B, Ciancio A. functional diversity of soil nematodes in relation to the impact of agriculture - A Review. *Diversity*. 2021; 13 (64): 22pp. <https://doi.org/10.3390/d13020064>
26. Stuart R J, Barbercheck ME, Grewal PS. Entomopathogenic nematodes in the soil environment: Distributions, interactions and the influence of biotic and abiotic factors. En Campos-Herrera R (ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Sustainability in Plant and Crop Protection 1*. Springer International Publishing Switzerland 2015. Pp 97- 137. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7>

27. Sumeet K, Khurma U, Brodie G, Hazir S. Natural occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in Viti Levu, Fiji Islands. *Jour. Nematol.* 2020; 52. 17 pp. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-017>
28. Ávila-López MB, García-Maldonado JQ, Estrada-Medina H, Hernández-Mena DI, Cerqueda-García D, Vidal Martínez VM. First record of entomopathogenic nematodes from Yucatán State, México and their infectivity capacity against *Aedes aegypti*. *Peer J.* 2021; 9: e11633. 10 pp. <https://doi.org/10.7717/peerj.11633>
29. Alumai A, Grewal PS, Hoy CW, Willoughby DA. Factors affecting the natural occurrence of entomopathogenic nematodes in turfgrass. *Biological Control.* 2006; 36(3):368-374 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.08.008>.
30. Stock SP. Diversity, Biology and Evolutionary Relationships. En Campos-Herrera R (ed.). pp 3- 27. *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Sustainability in Plant and Crop Protection 1.* Springer International Publishing Switzerland 2015, https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7_1
31. Poinar GO. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En Gaugler R & Kaya HK (Eds). *Entomopathogenic nematodes in biological control.* 1990. Boca Raton, FL. CRC Press. p:23-62.
32. Martín D. Identificación, caracterización y reproducción masiva del simbiote bacteriano de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HC1. 2007. [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas]. La Habana, Cuba: Universidad de La Habana. 80 pp.
33. Boemare NE, Akhurst RJ. Biochemical and physiological of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) *J. Gen. Microbiol.* 1988; 134: 751-761.
34. Ravensberg WJ. A Roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropod. *Progress in Biological Control* 10, Springer Science+Business Media B.V. 2011.https://doi.org/10.1007/978-94-007-0437-4_2
35. Grewal P, Georgis R. Entomopathogenic nematodes. En Hall FRJ , Menn J (Eds.). *Methods in Biotechnology, Vol 5. Bioinsecticides. Use and delivery.* Chapter 15. Part II. 1998. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. pp 271-299.
36. Milstead JE, Poinar GO. A new entomogenous nematode for pest management systems. *Calif. Agric.* 1978; 32(3): 12-14.
37. Flanders KL, Miller JM, Shields EJ. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* "Oswego" (Rhabditida: Heteroderidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *J. Econ. Entomol.* 1996; 89(2): 373- 380.
38. Yang H, Jian H, Zhang G, Zhang S. A simple method of measuring the infectivity of *Steinernema carpocapsae*. En *Biological Pest Control in Systems of Integrated Pest Management. Proc. Int. Symp. on "The use of biological control agents under integrated pest management". Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. Taipei, Taiwan (FFTC).* 1996. Serie 47: 40-43.
39. Miller RW. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes. *J. Nematol.* 1989; 21: 574.
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.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran no poseer conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Dairys García-Perera: **Investigación, Escritura - borrador original.** Roberto Enrique Regalado: **Investigación.** Lilian Sánchez: **Investigación, Supervisión.** Belkis Peteira Delgado-Oramas: **Administración de Proyecto, Supervisión, Escritura - borrador original, Redacción: revisión y edición.** Ileana Miranda Cabrera: **Análisis formal.** Giselle Calabuche-Gómez: **Investigación.** Mayra G. Rodríguez Hernández: **Conceptualización, Supervisión, Redacción: revisión y edición**

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/)