

## Poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos presentes en suelos de siete estados de Venezuela

Ligia Carolina Rosales<sup>1\*</sup>, Renato Crozzoli<sup>2</sup>, Ernesto San-Blas<sup>3</sup>, Liliana Puente<sup>1</sup>, Roberto Enrique<sup>4</sup>, Teida Hurtado<sup>5</sup>, Julia Elena Sanoja<sup>6</sup>, Mayra G. Rodríguez H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP). Maracay, Venezuela. <sup>2</sup>Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO), Instituto de Zoología Agrícola. Maracay, Venezuela. <sup>3</sup>Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Estudios Botánicos y Agroforestales. Maracaibo, Zulia, Venezuela. <sup>4</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). San José de las Lajas, Cuba. <sup>5</sup>Asesor Técnico Fitosanitario. Maracay, Venezuela. <sup>6</sup>Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL), Centro de Investigación en Educación Matemática usando Nuevas Tecnologías (CEINEM-NT). Maracay, Venezuela. \*Correo electrónico: carolina.rosalesa@gmail.com

### RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos se encuentran en el suelo y son parásitos de insectos, que en simbiosis con una bacteria pueden causar la muerte de los mismos. Se utilizan como agentes de control biológico de insectos plaga. En la búsqueda de nematodos entomopatógenos nativos, se efectuó una prospección en los estados Amazonas, Aragua, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira y Yaracuy, en Venezuela. Se procesaron 218 muestras de suelo según metodología descrita por Bedding y Akhurst (1975). Se obtuvieron 21 aislamientos de nematodos entomopatógenos, con una Frecuencia de Recuperación de 9,63 % y un Índice de Abundancia de 0,67. De estos, 20 pertenecen al género *Heterorhabditis* Poinar y uno a *Steinernema* Travassos. Con el análisis de la estadística descriptiva se determinó el porcentaje de NEP según género y tipo de suelo, hallándose: *Heterorhabditis indica* (9,52 %); *Heterorhabditis amazonensis* (23,80 %); *Heterorhabditis* spp. (61,90 %) y *Steinernema* sp. (4,76 %). El 86 % de los aislamientos se obtuvieron de suelos cultivados y de las localidades positivas para la presencia de NEP, el 57,14 % corresponden tanto a suelos arenosos como franco arenosos. Con la prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de independencia (Siegel y Catellan, 2009) se determinó que existe asociación estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre la frecuencia de recuperación y el tipo de suelo, así como entre la frecuencia de recuperación y la altitud. El suelo franco arenoso y la altitud 0 - 300 m.s.n.m. fueron las características que resultaron significativas en la detección de los nematodos.

**Palabras Clave:** control biológico, *Heterorhabditis*, *Steinernema*

## Natural populations of entomopathogenic nematodes present in soils of seven Venezuelan States

### ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes are found in the soil and are parasites of insects, which in symbiosis with a bacterium can cause their death. They are used as biological control agents for pest insects. In the search for native entomopathogenic nematodes, a survey was carried out in the states of Amazonas, Aragua, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira and Yaracuy, in Venezuela. 218 soil samples were processed according to the methodology described by Bedding and Akhurst (1975). 21 entomopathogenic nematode were obtained, with a Recovery Frequency of 9.63 % and an Abundance Index of 0.67. Of these, 20 belong to the genus *Heterorhabditis* Poinar and one to *Steinernema* Travassos. With the analysis of descriptive statistics, the percentage of entomopathogenic nematodes according to gender and type of soil was determined, finding: *Heterorhabditis indica* (9.52 %); *Heterorhabditis amazonensis* (23.80 %); *Heterorhabditis* spp. (61.90 %) and *Steinernema* sp. (4.76 %). 86 % of the EPN were obtained from cultivated soils. In the places where EPN presence was positive, 57.14 % correspond to both sandy and sandy loam soils. With the Independence Chi-square test ( $\chi^2$ ) (Siegel and Catellan, 2009) was determined that there is a statistically significant association ( $P < 0.05$ ) between the recovery frequency and the type of soil, as well as between the recovery frequency and altitude. The sandy loam soil and the altitude 0 – 300 m above sea level were the significant characteristics in the detection of nematodes.

**Key words:** biologic control, *Heterorhabditis*, *Steinernema*

Recibido: 14/11/2017 - Aprobado: 14/08/2018

## INTRODUCCION

Para el control de las plagas agrícolas en Venezuela se utilizaron, tradicionalmente, numerosos productos químicos, los que produjeron afectaciones al ambiente y la salud de los trabajadores del campo (Miranda-Contreras *et al.* 2013). Los avances tecnológicos permitieron la detección de residuos en los alimentos que antes pasaban desapercibidos, lo que hace presumir, que hoy día, puede estar afectada la salud de muchas personas, por el consumo tanto de frutas y hortalizas frescas como de alimentos procesados. En consecuencia, diversos investigadores enfocan sus esfuerzos en desarrollar insumos alternativos a productos químicos sintéticos para el control de plagas. Entre estas alternativas, el control biológico representa una herramienta emergente para el manejo de plagas en la agricultura sostenible (Patibanda y Ranganathswamy 2018)

Los nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, desarrollan su ciclo de vida en el suelo y necesitan parasitar un insecto para completar el mismo. En asociación mutualista con bacterias simbiotas de los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, causan la muerte del insecto. El infectivo juvenil del nematodo penetra el insecto por los espiráculos, boca o ano y libera la bacteria dentro de su cuerpo. Por esto, los insectos que habitan o parte de su ciclo de vida permanecen en el suelo y otros ambientes protegidos, son los más afectados por los NEP. Estos pueden reproducirse masivamente en diversos sistemas *in vivo* o *in vitro*; son compatibles con diferentes productos químicos y biológicos, así como, seguros para su uso en la agricultura (Shapiro *et al.* 2017).

La búsqueda de los NEP, generalmente, se efectúa en muestras de suelo, de donde se extraen por diversos métodos. Se encuentran distribuidos en todos los ecosistemas, y de alguna manera sus niveles poblacionales se relacionan a la presencia de insectos del suelo. Al efectuar prospecciones, se ha discutido si las posibilidades de encontrarlos están asociadas a algún factor en particular o si hay diferencias entre áreas agrícolas y cultivadas (Sharmila *et al.* 2018).

Shapiro-Ilan *et al.* 2017, explican cómo los ecosistemas difieren en los parámetros que caracterizan el suelo (pH, humedad, textura, entre otros) y las condiciones del microhabitat (presencia de raíces, cubierta vegetal, fauna subterránea). Esto puede afectar la red alimentaria del suelo y a los NEP de una manera impredecible. Al comparar suelos que representan diferentes escenarios ecológicos, se puede vincular la distribución natural de los NEP a factores abióticos y bióticos. Estos conforman los ensamblajes de la red alimentaria del suelo, para definir los factores que determinan la abundancia y actividad de EPN en cada ecosistema.

El estudio de estos organismos se abordó en Venezuela, con el hallazgo de aislamientos en determinadas zonas del país (Rosales y Suárez 1998; San Blas *et al.* 2015a). En años recientes, se encontraron nuevas especies de NEP (San Blas 2015b, 2016). Con esos antecedentes y el planteamiento de que Venezuela es un país megadiverso (Aguilera *et al.* 2003), en zonas sin explorar se podrían encontrar nuevos aislamientos. Esto podría fortalecer el uso del control biológico, incluyendo a los nematodos entomopatógenos como parte del Manejo Integrado de Plagas.

El objetivo de este trabajo fue explorar suelos de siete estados de Venezuela, en la búsqueda de nuevos aislamientos nativos de NEP como un aporte para su estudio, contra plagas agrícolas de importancia en el país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La prospección se realizó en siete estados de Venezuela: Amazonas, Aragua, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira y Yaracuy. Se muestrearon al azar, áreas cultivadas, sin antecedentes de aplicación de NEP, y de vegetación natural. Se registraron los datos de altitud y coordenadas geográficas de cada área, con un GPS Map 76C Sx Garmin. Los datos promedios de lluvias anuales (2000-2010) de los sitios muestreados se obtuvieron de la red de estaciones meteorológicas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y del Instituto Nacional de Hidrología y Meteorología (INAMEH) (Rodríguez *et al.* 2006).

A inicios del período lluvioso de los años 2009 a 2011, las muestras de suelo se tomaron con palines a una profundidad de 10 - 25 cm. Se conformaron muestras compuestas por varias submuestras, tomadas en 10 puntos, en un radio de 8 - 10 m al punto central de muestreo, hasta completar 1 kg de suelo. Se colocaron en bolsas de polietileno para minimizar la deshidratación. Se etiquetaron con la información geográfica correspondiente y almacenaron en un envase con aislamiento térmico.

Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Nematología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), ubicado en la sede administrativa del INIA, Maracay, estado Aragua. Se registraron los datos correspondientes al tipo de vegetación, de cada sitio de muestreo. Los palines se desinfectaron con alcohol (70 %) cada vez que se utilizaron, antes de retirarse del sitio de muestreo.

Las muestras se procesaron en el laboratorio, la misma semana en que se colectaron. Se homogeneizaron y procesaron, según la metodología de Bedding y Atkurst (1975), colocando 300 g de suelo húmedo por contenedor plástico de 12 onzas (dos para cada muestra). En cada contenedor, se utilizaron como cebo, 10 larvas de último instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), procedentes de una cría estandarizada según metodología propia del Laboratorio de Nematología INIA-CENIAP (Rosales *et al.* 2009). Los contenedores se invirtieron e incubaron a temperatura ambiente ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y oscuridad (12 h / 12 h), por 12 días. Durante este tiempo, los contenedores se revisaron diariamente para observar las larvas. Se seleccionaron las que presentaron la sintomatología de parasitismo que causan los NEP, como cambios de coloración y cese de movimientos.

Las larvas de *G. mellonella* muertas, se lavaron suavemente con alcohol (70 %) y agua destilada estéril y se colocaron en trampas White, para obtener los juveniles infectivos (JI), por el método de trampas modificado (Woodring y Kaya 1988). Los JI que emergieron de las larvas procedentes de un mismo contenedor, se consideraron un aislamiento. En los casos en que, al revisar los contenedores, no se encontró ninguna larva

parasitada, el proceso se repitió una vez más para confirmar la presencia/ausencia de NEP (Zadji *et al.* 2013).

En primera instancia, la determinación de géneros se efectuó según la coloración que presentaron las larvas al momento del parasitismo. Esta corresponde al color marrón rojizo para el género *Heterorhabditis* y beige crema para *Steinernema* (Poinar 1990). Después de inocular las larvas de *G. mellonella*, al quinto día, se disectaron para identificar la presencia de adultos hermafroditas, en la primera generación, para el género *Heterorhabditis*; de machos y hembras para el género *Steinernema* (Adams y Nguyen 2002). La determinación de especies se realizó por estudios moleculares (secuenciación), en el Laboratorio de Protección Vegetal, del Centro de Estudios Botánicos y Forestales del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC) – Zulia.

Los aislamientos obtenidos se mantuvieron en el cepario del INIA-CENIAP, con ciclos sucesivos de infección-reproducción en *G. mellonella*, según metodología de Dutky *et al.* (1964).

La frecuencia de recuperación (FR) y la abundancia (A) de NEP se calcularon mediante las siguientes fórmulas (Liu y Berry 1995):

$$FR = \left( \frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Número total de muestras}} \right) \times 100$$

$$A = \frac{\text{Número de lugares positivos}}{\text{Número total de lugares muestreados}}$$

Un duplicado de cada muestra de suelo se procesó en el Laboratorio de Suelos del INIA – CENIAP, para determinar pH y textura, con los métodos potenciométrico y Boyoucos, respectivamente (Gilabert *et al.* 1990).

Se empleó la Estadística Descriptiva a través del cálculo de las frecuencias relativas para conocer la distribución de NEP según el género y la presencia de los mimos, según los tipos de suelo. Con la Estadística Inferencial no paramétrica, a través de la prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de independencia (Siegel y Catellan, 2009) se determinó la asociación entre la frecuencia de recuperación y las variables: tipo de suelo, altitud, vegetación asociada y pH, bajo un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 218 muestras procesadas se obtuvieron 21 aislamientos de NEP, lo que representó una Frecuencia de Recuperación (FR) de 9,63 %, valor que se enmarca dentro de los intervalos informados mundialmente (Cagnolo *et al.* 2016). Se encontraron NEP en los siete estados visitados (Cuadro 1).

El porcentaje de recuperación de aislados de NEP varía de una región a otra. Entre 2,8 y 15,7 % son los valores que se reportaron en países de América Latina (López Nuñez *et al.* 2007; Edgintong *et al.* 2010; Myers *et al.* 2015). El valor de FR que se obtuvo en la presente investigación se considera aceptable, tomando en consideración el número de muestras. Para la abundancia (A), el valor que se obtuvo fue bajo (0,10), en comparación con estudios similares que obtuvieron valores de 4,86 (Sánchez 2002) y 16,1 (Giayetto y Cichón 2006).

El hallazgo de muestras positivas en todos los estados evaluados, sugiere la existencia de una amplia distribución de poblaciones de NEP en Venezuela. Esto debe ser objeto de investigaciones futuras. De las poblaciones que se encontraron (Cuadros 2 y 3), 20 pertenecen al género *Heterorhabditis* (95,23 %) y una a *Steinernema* (4,76 %); esta última proveniente del estado Mérida.

En estudios previos en el país, Rosales *et al.* 1998; Fan *et al.* 2000; San Blas *et al.* 2015b, localizaron poblaciones de NEP de ambos géneros.

La presencia de NEP en las muestras se distribuyeron según su género (Cuadro 3): *Heterorhabditis indica* (9,52 %); *Heterorhabditis amazonensis* (23,80 %); *Heterorhabditis* spp. (61,90 %); y *Steinernema* sp. (4,76 %). El 86 % de los aislamientos se obtuvieron en áreas cultivadas.

De acuerdo al tipo de suelo, de las localidades positivas para la presencia de NEP, con igual porcentaje, el 28,57 % corresponde tanto a los suelos arenoso y franco arenoso. Se observó una mayor presencia de *Heterorhabditis* spp. en el suelo arenoso (19,05 %) y en el suelo franco arenoso (14,28 %).

Diversos estudios de prospecciones de NEP en otros países, han reportado la ocurrencia de ambos géneros. Se señala que, la familia Heterorhabditidae es endémica, de climas calientes, y la familia Steinernematidae de climas templados. En las zonas tropicales y subtropicales es de esperar una predominancia de *Heterorhabditis*, aunque este planteamiento difiere entre autores, porque otros indican la predominancia de *Steinernema* en otras áreas geográficas (López-Núñez *et al.* 2007, Edgintong *et al.* 2010, Cagnolo *et al.* 2016).

Cuadro 1. Distribución geográfica de las muestras de suelo colectadas, número de aislamientos de nematodos entomopatógenos encontrados, frecuencia de recuperación y abundancia.

Estado	Muestras colectadas	Aislamientos identificados	Frecuencia de Recuperación (%)		Abundancia ***
			(Total)*	(Estado)**	
Amazonas	10	2	0,92	20,00	0,20
Aragua	47	5	2,29	10,64	0,11
Mérida	36	3	1,38	8,33	0,08
Miranda	25	2	0,92	8,00	0,08
Táchira	22	2	0,92	9,09	0,09
Sucre	38	5	2,29	13,15	0,13
Yaracuy	40	2	0,92	5	0,05
Total	218	21	9,63	n/a	0,10

\* (muestras positivas / total de muestras) x 100; \*\* (muestras positivas / total de muestras para cada estado) x 100;

\*\*\* sitios positivos / sitios totales muestreados; n/a: No aplica.

Cuadro 2. Ubicación geográfica, vegetación asociada, tipo de suelo y características climáticas de las localidades donde se obtuvieron nematodos entomopatógenos.

Código de la muestra	Localidad	Vegetación asociada	Altitud (m.s.n.m.)	Tipo de suelo	pH del suelo	Precipitación media anual (mm)	NEP
INIA-1	Finca Porras, Colonia Tovar, municipio Tovar, Aragua. 10.4106845, -67.2854661	Durazno ( <i>Prunus persica</i> L.)	1.620	Franco arenoso	5,4	1.172	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>
INIA-2	Finca Mucumba, Timotes, municipio Miranda, Mérida 8.9966086, -70.7508375	Ajo ( <i>Allium sativa</i> L.)	3.000	Franco arcillo-limoso	6,6	1.300	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-3	Finca Era, Santo Domingo, municipio Cardenal Quintero, Mérida 8.8553901, -70.7013988,	Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	2.230	Franco arenoso	5,7	1.257	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-4	Estación Experimental Mucuchíes, INIA, municipio Rangel, Mérida 8.7603323, -70.9013066,16	Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	2.893	Franco arcilloso	7,3	823	<i>Steinernema</i> sp.
INIA-5	Estación Experimental Bramón INIA, Hacienda El Trompillo, municipio Acevedo, Táchira 7,650000, -72,383333	Cafeto ( <i>Coffea arabica</i> L.)	1.105	Franco limoso	5,8	1.350	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-6	Estación Local Pueblo Hondo INIA, municipio Jáuregui, San Cristóbal, Táchira 8.2516667, -71.9286206	Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	2.379	Franco arcilloso	5,9	1.745	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-7	Sector Corral de Piedras, río El Corozo, El Limón, municipio Mario Briceño Iragorry, Aragua 10.3155251, - 67.6396106	<i>Heliconia</i> spp.	465	Franco limoso	7,2	974	<i>Heterorhabditis indica</i>
INIA-8	Núcleo de desarrollo endógeno José Félix Ribas, El Hondón, municipio Revenga, Aragua 10.2463269, -67.2523436,16	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	950	Franco arenoso	6,4	1.019	<i>Heterorhabditis indica</i>
INIA-9	Núcleo de desarrollo endógeno José Félix Ribas, El Hondón, municipio Revenga, Aragua 10.2463269, -67.2523436,16	Pimentón ( <i>Capsicum annum</i> L.)	950	Franco arenoso	6,3	1,019	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>
INIA-10	Campo Experimental Padrón, sector Tapipa, municipio Acevedo, Miranda. 10.131400, -66.17788	Cítricos ( <i>Citrus</i> spp.)	41	Arenoso	5,3	313,7	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>

Cuadro 2. cont...

INIA-11	Estación Experimental Amazonas INIA Puerto Ayacucho, municipio Atures, Amazonas 5.6164782, -67.6046211	Sin cultivar (Gramíneas silvestres)	139	Arenoso	5,8	2.233	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-12	Farriar, municipio Veroes, Yaracuy 10.4976568, -68.571915,21	Ají dulce ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	107	Franco arenoso	6,8	1.900	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-13	Estación Experimental Yaritagua, Km. 3 vía El Rodeo, municipio Peña, Yaracuy 10.0444368, -69.0883358	Caña de Azúcar ( <i>Saccharum</i> <i>officinarum</i> L.)	308	Franco arcilloso	5,7	874	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-14	Finca Misle, El Jarillo, municipio Guaicaipuro, Miranda. 10.3558226, -67.1810874	Tomate de árbol ( <i>Cyphomandra</i> <i>betacea</i> (Cav.) Sendtn)	1.670	Franco limoso	6,4	1.154	<i>Heterorhabditis</i> <i>amazonensis</i>
INIA-15	Finca Infante, municipio Ature, Amazonas. 5.641599, -67.5856667	Túpiro ( <i>Solanum</i> <i>sessiliflorum</i> Dunal)	140	Arenoso	5,4	2.233	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-16	Centro Formación Socialista Agro- pecuario Tunapuy, Sector Tunapuy, municipio Libertador, Sucre. 10.5817227, -63.0453999,14	Lechosa ( <i>Carica papaya</i> L.)	53	Arcillo limoso	4,7	1.353	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-17	Morahal, Parroquia Chacopata, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre. 10.680950, -63.819756	Musáceas ( <i>Musa</i> spp)	20	Arenoso limoso	4,7	243,8	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-18	Playa Paraíso, salida de Güiria vía Macuro, Cocal, municipio Valdéz, Sucre 10.5827014, -62.2915042	Sin cultivar (Arena de playa)	10	Arenoso	5,2	1.108	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-19	La Ensenada de Playa Grande, municipio Bermúdez, estado Sucre 10.6666488, -63.2756717	Uva de playa ( <i>Coccoloba uvifera</i> (L.) L.)	3	Arenoso	4,9	855	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-20	Campo Experimental Irapa, municipio Mariño, Sucre 10.594944, -62.554752	Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.)	49	Franco arenoso	5,7	1.600	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-21	Orilla del río La Trilla, municipio Costa de Oro, Aragua 10.4485764, -67.7702796	<i>Heliconias</i> spp.	127	Arenoso	4,5	1.120	<i>Heterorhabditis</i> <i>amazonensis</i>

Cuadro 3. Distribución de los NEP según el tipo de suelo.

Identificación del NEP	Tipo de Suelo							Total
	Arenoso	Arenoso limoso	Franco arenoso	Franco arcilloso	Franco limoso	Franco arcilloso limoso	Arcilloso limoso	
<i>Heterorhabditis indica</i>	f			1		1		2
	Fr			4,76 %		4,76 %		9,52 %
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	f	2		2		1		5
	Fr	9,52 %		9,52 %		4,76 %		23,80 %
<i>Heterorhabditis</i> spp.	f	4	1	3	2	1	1	13
	Fr	19,05 %	4,76 %	14,28 %	9,52 %	4,76 %	4,76 %	61,9 %
<i>Steinernema</i> sp.	f				1			1
	Fr				4,76 %			4,76 %
Total	f	6	1	6	3	3	1	21
	Fr	28,57 %	4,76 %	28,57 %	14,28 %	14,28 %	4,76 %	100

f = Aislamientos hallados; Fr = Proporción de aislamientos hallados

Con relación a la altitud, la población de *Steinernema* se halló a 2.893 m.s.n.m. Varios autores refieren la afinidad del género *Steinernema* por las zonas de clima frío y de mayor altitud (Argotti *et al.* 2010; Campos-Herrera *et al.* 2007). Contrario a esto, en Venezuela se colectó *Steinernema papillatum* y *Steinernema goweni* n. sp. (San Blas *et al.* 2015a, 2016) ambas en una zona que no supera los 10 m.s.n.m. Esto permite señalar que, para nuestro país, el rango de altitud donde se puede ubicar este género de NEP es amplio y sin limitación de la altura para su distribución. Los aislamientos de *Heterorhabditis* se hallaron desde 20 hasta 3.000 m.s.n.m, lo que evidencia el amplio rango de adaptabilidad que posee este género con relación a la altura. Esto coincide con Edgington *et al.* (2010), quienes señalaron la presencia de estos NEP en un rango desde 0 hasta 4.200 m de altitud.

Un estudio previo hecho en Venezuela, obtuvo un agrupamiento para los nematodos relacionado con la altitud sobre el nivel del mar. El dendrograma resultante del análisis de las distancias genéticas para los NEP mostró la formación de

dos grupos donde en el grupo I se localizaron los aislamientos colectados entre los 20-950 m.s.n.m. y en el grupo II se ubican los aislados colectados a 1.105-3.000 m.s.n.m (Peteira *et al.* 2014).

Los factores que determinan la presencia de NEP en zonas específicas son diversos. La distribución de estos a escala global está probablemente, influenciada por el clima y por eventos de dispersión que incluyen los asociados a la actividad humana. La distribución local, estaría influida por la textura del suelo, vegetación y disponibilidad de hospedantes (Valadas *et al.* 2014). Sin embargo, Campos-Herrera *et al.* (2016) establecieron que más que la vegetación, son las propiedades edáficas, principalmente las que afectan la humedad, las que pueden asociarse a los patrones espaciales de los NEP. Conocer esta información podría mejorar la detección de los mismos.

El mayor número de poblaciones de NEP que se hallaron en este estudio, provino de las muestras de suelo tomadas de zonas agrícolas cultivadas (76 %). El resultado coincidió con Zepeda-Jazo *et al.* (2014), quienes indican que hay alta prevalencia

de NEP en suelos cultivados. Esto puede guardar relación con la presencia de siembras con alta incidencia de plagas, como lo refirió Yan *et al.* (2016).

Los autores encontraron *Heterorhabditis* y *Steinernema*, en 35 % de las muestras de suelo provenientes de los agroecosistemas. Montores-Ramírez *et al.* (2016) reportaron que el mayor número de muestras positivas a NEP fue en sitios cultivados, y se pudiera asociar a la presencia de alto contenido de materia orgánica, con humedad continua y uso de fertilización orgánica. Esto podría favorecer el establecimiento de poblaciones de NEP.

Se infiere que hay una alta probabilidad de encontrar NEP en las áreas agrícolas por la confluencia de los factores antes mencionados. Sharmila *et al.* (2018), señalan que, en cultivos intensivos, la preparación del suelo expone los nematodos a la desecación, por lo que disminuyen sus poblaciones; sin embargo, agroecosistemas más estables como café, pastos y cultivos perennes, favorecen la presencia de los mismos. Jaffuel *et al.* 2018, compararon NEP provenientes de zonas agrícolas, bosques y praderas y los valores de abundancia, riqueza y diversidad no variaron entre los tres ecosistemas. Pero los NEP provenientes de las praderas tuvieron mayor capacidad de matar insectos. Esto resaltó la importancia de evaluar conjuntamente los factores abióticos y bióticos.

En referencia al tipo de suelo, el mayor grupo de aislamientos de NEP se recuperó de suelos arenosos y franco arenosos, ambos con (28,57 %), seguido de franco-limosos y franco arcillosos ambos con (14,28 %); y arenoso-arcilloso, arenoso- limoso y franco-arcillo-limoso, cada tipo con 4,76 % de las muestras. Argotti *et al.* (2010) consiguieron *Heterorhabditis* en suelos francos y franco-arenosos y *Steinernema* en franco-limosos. Habitualmente, en suelos orgánicos de texturas arenosas y franco arenosas, la supervivencia y el desplazamiento son mayores que en suelos arcillosos (Melo *et al.* 2009)

Los NEP se encuentran dispersos en el ambiente y para su uso, necesitan ser ubicados mediante muestres masivos. La habilidad de los JI para

distribuirse en el suelo y localizar al hospedante es esencial para la sobrevivencia de las poblaciones naturales de nematodos. El movimiento de los JI en el suelo se realiza principalmente sobre la película de agua. De allí, la importancia de la humedad del suelo, que tiene una relación estrecha con la textura y el contenido de materia orgánica del mismo. El tamaño de los poros del suelo, en combinación con una mayor humedad, limita los niveles de oxígeno y, como consecuencia, la actividad y la supervivencia de los JI (Shapiro-Ilan *et al.* 2017). Por consiguiente, la sobrevivencia de los JI y las posibilidades de encontrarlos en un muestreo, pudiera disminuir en suelos de textura fina, lo cual coincide con nuestros resultados.

En general, los NEP tiene preferencia por los suelos arenosos, aunque no es limitante. Estos han sido reportados en una amplia variedad de hábitats y tipos de suelo, abarcando todas las combinaciones texturales conocidas (Shapiro-Ilan *et al.* 2014)

Los NEP se encontraron en suelos con un rango entre 4,7 y 7,3 de pH del suelo. Esto coincide con resultados de otros países donde han encontrado estos organismos en suelos con pH desde 4,76 hasta 9,2 (Devi *et al.* 2016). Está demostrado el gran rango de adaptabilidad al pH del suelo que tienen los NEP; su distribución no se asocia a un rango de pH en particular. El pH del suelo, no parece ser una limitante para el desarrollo y presencia de estos nematodos. La mayoría de los agroecosistemas poseen un pH que varía de 4-8, lo que facilita su utilización como controladores biológicos de plagas en cultivos.

Con relación a las dos especies encontradas *H. amazonensis* y *H. indica* ambas destacan por su uso en otros países para el control de plagas (Campos-Herrera *et al.* 2016). En Venezuela, resta realizar los correspondientes estudios de patogenicidad sobre los insectos plagas de los cultivos y hacer los ajustes para su aplicación.

Con la prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) se encontró significancia estadística ( $P < 0,05$ ) entre la frecuencia de recuperación y el tipo de suelo, así como entre la frecuencia de recuperación y la altitud (Cuadro 4). El mayor valor de la frecuencia de

Cuadro 4. Valores de Ji-cuadrado ( $\chi^2$ ) y probabilidad asociada (P) de la frecuencia de recuperación y las variables: tipo de suelo, altitud, tipo de vegetación y pH del suelo.

Pruebas de la frecuencia de recuperación	Variables			
	Tipo de suelo	Altitud m.s.n.m.	Vegetación asociada	pH del suelo
$\chi^2$	18,36	15,7	5,44	5,83
P	0,04*	0,04*	0,07	0,21

recuperación (28,57 %) se registró en las áreas con predominio de los suelos franco arenoso y arenoso, así como, en una altitud de alto predominio de 0 - 300 m.

La generación de información relacionada a los NEP es muy valiosa para nuestro país, ya que va conformando una base de conocimiento para un área que está presta a ser desarrollada, como un componente importante de la implementación del control biológico de insectos plaga.

### CONCLUSIONES

Se encontraron NEP en todos los estados del país muestreados, lo que evidenció la potencialidad que tiene Venezuela como fuente de estos organismos.

La mayor cantidad de NEP se detectó en suelos cultivados y con un alto contenido de arena.

Se deben incrementar los muestreos para explorar otras localidades del país, que con seguridad revelarán nuevas cepas con las características requeridas para diferentes situaciones de plaga – cultivo.

### AGRADECIMIENTO

Convenio Cuba Venezuela, Proyecto "Producción de nematodos entomopatógenos para el control de plagas agrícolas". A los Ingenieros Agrónomos Guillermo Briceño, Johangel García y al técnico Edward Espín por su colaboración en el trabajo de campo y laboratorio.

### LITERATURA CITADA

- Adams, B; Nguyen, K. 2002. Taxonomy and Sistematics. In: Entomopathogenic Nematology. Edited by R. Gaugler. CAB International. p:1-34
- Aguilera, M; Azocar, A; González, E. 2003. Venezuela un país megadiverso. En: Biodiversidad en Venezuela. Tomo II. Editado por Fundación Polar. p:61-81
- Argotti, E; Gallegos, P; Alcázar, J; Kaya, H. 2010. Patogenicidad de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre larvas de *Tecia solanivora* en Ecuador. Boletín Técnico 9. Serie Zoológica 6:162-17.
- Bedding, RA; Akhurst, RJ.1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21:109-110.
- Cagnolo, S; Carranza, F; Trimarchi, L; Bertolotti, M. 2016. New findings of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum* (Nematoda: Heterorhabditidae, Steinemematidae) in Córdoba, Argentina. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales, n.s. 18(2):191-199.
- Campos-Herrera, R; Escuera, M; Labrador, S. Robertson, L; Barrios, L; Gutiérrez, C. 2007. Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). Journal of invertebrate Pathology 95 (2): 125-139.
- Campos-Herrera, R; El Borai, F; Rodríguez, J; Duncan, L. 2016. Entomopathogenic nematode food web assemblages in Florida natural areas. Soil Biology and Biochemistry 93:105–114.

- Devi, G; Mishra, H; Brattacharyya, B; Nath, DJ. 2016. Occurrence of entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabtidae, Steinernematidae) in whitegrubs infested areas of Majuli, Assam. *Indian Journal of Biopesticides* 9(2):148 -156.
- Dutky, SR; Thompson, JV; Cantwell, GE. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology* 6:417-422.
- Edgington, S; Buddie, A; Moore, D; France, A; Merino, L; Tymo, L; Hunt, DJ. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Nematology* 12:915-928.
- Fan, X; Maggiorani, A; Gudiño, S. 2000. Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa en el control de la polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). Mérida. Venezuela. *Revista Forestal Venezolana* 44(1):115-118
- Giayetto, A; Cichón, L. 2006. Distribución, gama de huéspedes y especificidad de cinco poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 35:163-183.
- Gilabert de B, J; López de R, Y; Pérez de R, Y. 1990. Manual de métodos y procedimientos de referencia. Análisis de suelos para diagnóstico de fertilidad. Fonaiap- Ceniap. Serie D. N°28. 164 p.
- Jaffuel, G; Blanco-Pérez, R; Hugc, AS; Chiribogaa, X; Meulic, RG; Mascherd, F; Turlingsa, T; Campos-Herrera, R. 2018. The evaluation of entomopathogenic nematode soil food web assemblages across Switzerland reveals major differences among agricultural, grassland and forest ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 262: 48–57.
- Liu, J; Berry, RE. 1995. Natural distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Oregon soils. *Environmental Entomology* 24:159-216.
- López-Nuñez, JC; Cano, L; Gongora, C; Stock, SP. 2007. Diversity and evolutionary relationship of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. *Nematology* 9: 333 – 341.
- Melo, EL; Ortega, CA; Susurluk, A; Gaigl, A; Bellotti, A. 2009. Poblaciones nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) en cuatro departamentos de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 35:28-33.
- Miranda-Contreras, I; Gómez-Pérez, R; Rojas, G; Cruz, I; Berrueta, L; Salmen, S; Colmenares, M; Barreto, S; Balza, A; Zavala, L; Yasmin, Y; Osuna, J. 2013. Occupational Exposure to Organophosphate and Carbamate Pesticides Affects Sperm Chromatin Integrity and Reproductive Hormone Levels among Venezuelan Farm Workers. *Journal of Occupational Health* 55: 195–203.
- Montores-Ramírez, J; Cortés-Madriral, H; Zepeda-Jazo, I. 2016. Presencia de nematodos entomopatógenos *Steinernema* Travassos, 1927 y *Heterorhabditis* Poinar, 1976, en la Ciénaga de Chapala, Michoacán, México. *Entomología mexicana* 3:262-268.
- Myers, RY; Sipes, BS; Matsumoto, TK; Mello, CL; Mello, JS. 2015. Occurrence and distribution of Heterorhabditid populations in the Hawaiian Islands. *Nematropica* 45:198-207.
- Patibanda, AK; Ranganathswamy, M. 2018. Effect of Agrichemicals on Biocontrol Agents of Plant Disease Control. In: *Microorganisms for Sustainability. Volume 2: Microbes for Sustainable Agro-ecosystem*. Panpatte, DG; Jhala, YK; Shelat, HN; Rajababu, V. (Editors). Springer Nature Singapore Pte Ltd. p:1- 21.
- Peteira, B; Rodríguez, MG; Rosales, LC; Maselli, A; Casado, R; Castro, L; Salazar, E; Enrique, R; Miranda, I. 2014. Variabilidad molecular de aislamientos venezolanos de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbioses. *Revista Protección Vegetal* 29 (2):112-121.
- Poinar, GO. 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds.

- Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press. p:23–62.
- Rodríguez, MF; Cortéz, A; Nuñez, MC; Ovalles, F; Rey, JC. 2006. Distribución espacial de las redes meteorológicas en Venezuela. *INIA Divulga* 8:23-30.
- Rosales, LC; Rodríguez, MG; Enrique, R; Puente, L; García, J. 2009. Cría masiva de nematodos entomopatógenos para el control de plagas. *INIA Divulga* 12:19–22.
- Rosales, LC; Suárez H, Z. 1998. Evaluación de nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control biológico contra *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Revista de Entomología Venezolana* 13:122-140.
- San-Blas, E; Rosales C; Torres, Á. 2015a. Entomopathogenic Nematodes in Tropical Agriculture: Current Uses and Their Future in Venezuela. In: Campos-Herrera R. (eds) *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Ecology and applied technologies for Sustainable in Plant and Crop Protection*. Springer, Cham. p:365-389.
- San-Blas, E; Portillo, E; Nnermut, J; Ppuža, V; Morales, P. 2015b. *Steinernema papillatum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Venezuela. *Nematology*. 17:1081-1097.
- San-Blas, E; Morales-Montero, P; Portillo, E; Nnermut, J; Puza, W. 2016. *Steinernema goweni* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Zulia State, Venezuela. *Zootaxa* 4067 (2): 200–214
- Sánchez, L. 2002. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH, La Habana, Cuba. 100 p.
- Siegel, S; Catellan, NJ. 2009. Estadística no paramétrica. México: Trillas. 435 p.
- Shapiro-Ilan, I; Brown, I; Lewis, E. 2014. Freezing and Desiccation Tolerance in Entomopathogenic Nematodes: Diversity and Correlation of Traits. *Journal of Nematology* 46(1):27–34.
- Shapiro-Ilan, I; Hazir, S; Glazer, I. 2017. Basic and Applied Research: Entomopathogenic Nematodes. Chapter 6. In: *Microbial Control of Insect and Mite Pests from Theory to Practice*. Edited by Lawrence A. Lacey. Elsevier Inc. p:91-105.
- Sharmila, R; Shanmuga P, R; Subramanian, S; Poornima, K; Pandiyan, M. 2018. Review on ecology of entomopathogenic nematodes. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 64:1086-1093.
- Valadas, V; Laranjo, M; Mota, M; Oliveira, S. 2014. A survey of entomopathogenic nematode species in continental Portugal. *Journal of Helminthology* 88(3):327-41. DOI: 10.1017/S0022149X13000217.
- Woodring, JL; Kaya, HK. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR. 123 p.
- Yan, X; Waweru, B; Qiu, X; Hategekimana, A; Kajuga, J; Li, H; Edgington, S; Umulisa, C; Han, R; Toepfer, S. 2016. New entomopathogenic nematodes from semi-natural and smallholder farming habitats of Rwanda, *Biocontrol Science and Technology*. 26(6):820-834, DOI: 10.1080/09583157.2016.1159658
- Zadji, L; Hugues, B; Baimey, L; Afouda, L; Houssou, FG; Waeyenberge, L; de Sutter, N; Moens, M; Decraemer, W. 2013. First record on the distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Southern Benin. *Russian Journal of Nematology* 21(2):117-130.
- Zepeda-Jazo, I; Molina-Ochoa, J; Lezama-Gutierrez, R; Skoda, S. 2014. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in Colima, México. *International Journal of Tropical Insects Science* 34:53-57.