

Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite

Importance of entomopathogenic nematodes for the biological control of pests in oil palm

Adriana Sáenz A.¹

Resumen

Varias especies de nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae (*Steinernema*) y Heterorhabditidae (*Heterorhabditis*) han sido producidas comercialmente y usadas como agentes de control biológico para muchos insectos plaga del suelo e insectos de habitats crípticos en diferentes partes del mundo. Estos nematodos tienen una asociación mutualista con bacterias (*Steinernema* con la bacteria *Xenorhabdus* y *Heterorhabditis* con la bacteria *Photorhabdus*). Además, tienen un amplio rango de huéspedes, matan al huésped dentro de las primeras 48 horas, pueden ser fácilmente producidos *in vivo* o *in vitro*, aplicados con equipos estándar de aspersión, seguro para humanos y otros organismos no blancos, no tienen efecto negativo en el ambiente y no requieren registro en muchos países. Con este artículo se dan a conocer la biología, taxonomía y potencial de estos nematodos como agentes de control biológico de plagas que atacan la palma de aceite en Colombia.

Summary

Several species of entomopathogenic nematodes of the *Steinernematidae* (*Steinernema*) and *Heterorhabditidae* (*Heterorhabditis*) families have been produced and used commercially as biological control agents for many soil insect pests and cryptic insects in different parts of the world. There is a mutualistic association between these nematodes and bacteria (*Steinernema* with the bacterium *Xenorhabdus*, and *Heterorhabditis* with the bacterium *Photorhabdus*). Additionally, they have a wide range of hosts, they kill the host within the first 48 hours, they can be produced easily *in vivo* or *in vitro*, they can be applied with standard spraying equipment, they are safe for humans and other organisms, they are environmentally friendly and do not require registration in many countries. This article informs about the biology, taxonomy and potential of these nematodes in the biological control of pests that affect the oil palm in Colombia.

Palabras Clave

Steinernema, *Heterorhabditis*, control biológico, entomopatógeno, insecto plaga, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*.

1 Bióloga, MSc entomología. Investigadora asociada. Zona Occidental-Cenipalma.
E-mail: asaenz@cenipalma.org
Recibido: 29 de abril de 2005. Aprobado: 30 de junio de 2005

Introducción

Los técnicos del sector agropecuario afrontan una seria responsabilidad técnica, económica, ecológica y social dado que en sus manos está la producción de alimentos, fibras y materias primas para los más diversos procesos industriales; en sus manos está también que esa producción sea o no rentable. En sus manos no sólo está la producción de alimentos en cantidad suficiente sino también la calidad de los mismos. No menor es la responsabilidad de los profesionales y los productores del sector agropecuario en los factores de calidad de vida como son entre muchos otros el aire, el agua, el suelo, el paisaje y la calidad del ambiente.

Desde finales de la década de los sesenta se han venido evaluando nuevas alternativas en el manejo de insectos plaga, las cuales constituyen un paquete tecnológico muy diverso y dinámico que se ha llamado «Manejo Integrado de Plagas' (MIP) y que tiene como bases fundamentales el muestreo de las poblaciones de las plagas de importancia económica, la identificación de los niveles económicos de daño (NDE) o de criterios para definir si es necesario el control o no de la plaga y la consideración integral del ecosistema en la programación de las diferentes actividades del hombre en relación con sus cultivos, de tal modo que tenga siempre conciencia del impacto global de cada intervención sobre cualquier componente del sistema. Dentro de los tipos de intervención que se manejan con más frecuencia se encuentran los controles: genético, físico, biológico, cultural, mecánico y químico.

En las últimas décadas se ha observado cómo los controles químicos, a pesar de su alta eficiencia económica y biológica, no han demostrado ser sostenibles pues presentan un alto

impacto sobre el ambiente, por lo que a través del concepto MIP se ha visto la urgente necesidad de reducir su participación dentro del control de plagas, orientando la búsqueda principalmente hacia estrategias de bajo impacto ambiental, tales como los controles culturales y biológicos.

En cuanto al control biológico, no puede esperarse que este prospere si los biorreguladores no disponen de las condiciones ambientales que garanticen su buen desempeño en el campo (alimento, temperatura y humedad relativa adecuada, huéspedes en estados susceptibles, entre otros), por tanto, un buen programa de control biológico, necesariamente debe como mínimo estar atado a un buen programa de control cultural.

El control biológico es definido como la acción de los enemigos naturales. artrópodos depredadores, insectos parasitoides y patógenos microbiales. que mantienen la población de su huésped en niveles bajos, que podrían incrementarse en ausencia de estos enemigos (Ehler. 1990). Está dividido en dos amplias categorías: natural y aplicado. El primero ocurre cuando los enemigos naturales nativos reducen poblaciones de artrópodos nativos. mientras que el segundo involucra la intervención del hombre para incrementar la actividad de los enemigos naturales.

El control biológico aplicado puede ser separado en control biológico clásico, donde enemigos naturales exóticos o foráneos, son introducidos para plagas nativas o exóticas y en control biológico aumentativo, que ocurre con la intervención humana para incrementar la eficiencia de los enemigos naturales presentes en un área a través de la manipulación del ambiente (por ejemplo conservación de los enemigos naturales). El control biológico aumentativo tiene dos amplios enfoques. El primero, libera-

ciones inoculativas, en el cual pocos enemigos naturales de la misma especie son liberados y la progenie de los enemigos son esperados para efecto del control biológico y, el segundo, liberaciones inundativas, en donde grandes números de enemigos naturales son liberados con la expectativa que estos enemigos efectúen control inmediato (por ejemplo, actúen como un biopesticida) (Tanada y Kaya, 1993).

La incorporación de agentes biológicos para la regulación de insectos y otros organismos plaga se hace cada día más urgente como respuesta a las restricciones cada vez más estrictas para el uso de agroquímicos y a las exigencias de calidad en los productos de origen agrícola en mercados nacionales y aun más en los internacionales. No menos importantes son los requerimientos en lo que tiene que ver con la protección del medio ambiente y la biodiversidad dentro de la moderna concepción del desarrollo sostenible.

El uso de hongos, bacterias y virus entomopatógenos ha cobrado mayor importancia durante las dos últimas décadas y el estudio de los nematodos o entomonematodos, es considerado una alternativa promisorio en el control de plagas agrícolas, pecuarias y aún aquellas que afectan instalaciones industriales (Kaya y Gaugler, 1993; Kaya y Stock, 1997; Blaxter *et. al*, 1998; Burnell y Stock, 2000; Boemare, 2002).

Los nematodos entomopatógenos que han mostrado mejores resultados en el control biológico de plagas pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, cuyos miembros están mutualísticamente asociados (tipo de asociación entre dos individuos en que ambos obtienen beneficio) con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*

que ocasionan septicemia (condición mórbida causada por la invasión y multiplicación de microorganismos en la sangre) y otros tipos de afecciones letales en sus huéspedes.

Dentro de las características que hacen de éste un grupo promisorio de controladores biológicos pueden destacarse las siguientes: alta virulencia y rápida acción al matar al huésped, el tercer estado o juvenil infectivo no se alimenta, está morfológica y fisiológicamente adaptado para sobrevivir por largos períodos en el suelo en ausencia de su huésped, tienen alto potencial reproductivo y muestran respuesta numérica con respecto al huésped, pueden criarse en forma masiva en laboratorio, tienen un amplio rango de acción, aunque algunos son muy poco específicos.

De manera adicional, presentan alta resistencia a productos químicos y a condiciones ambientales adversas, tanto los nematodos entomopatógenos como sus bacterias, son inocuos para humanos y animales domésticos, no causan ningún daño a las plantas por ser específicos para insectos, algunas especies se pueden reproducir sin la presencia del macho, están exentos de registro para su comercialización en Europa y Estados Unidos (Klein, 1990; Kaya, 1993; Kaya y Gaugler, 1993; Georgia y Manweiler, 1994).

Dentro de los atributos negativos está incluido su amplio rango de huéspedes (aunque efectos negativos en huéspedes no blanco no han sido observados, este rango amplio de huéspedes puede incluir algunos insectos benéficos): limitada tolerancia a condiciones ambientales (por ejemplo, requerimientos de humedad): tiempo corto de almacenamiento; pobre persistencia en campo y altos costos en comparación con los pesticidas químicos (Kaya, 1993).

La incorporación de agentes biológicos para la regulación de insectos y otros organismos plaga se hace cada día más urgente como respuesta a las restricciones para el uso de agroquímicos y a las exigencias de calidad en los productos de origen agrícola en mercados nacionales e internacionales

Biología del complejo nematodo/bacteria

Los steinernematidos y heterorhabditidos son patógenos obligados en la naturaleza (microorganismo causante de enfermedad que requiere de un huésped vivo para crecer y reproducirse); tienen un estado de vida libre que no se alimenta conocido como

juvenil infectivo, juvenil dauer o J3, que infecta los insectos huéspedes en el suelo (Figura 1). El juvenil infectivo es el único estado que se encuentra fuera del insecto huésped y conserva la cutícula del segundo estado para protección en el ambiente, por ejemplo, los steinernematidos la pierden fácilmente (Figura 2a), pero es retenida en los heterorhabditidos, justo antes o después de la infección del huésped (Figura 2b). Además, la asociación nematodo-bacteria es específica. En los juveniles infectivos, las células bacterianas son llevadas en una vesícula en la parte anterior del intestino para los steinernematidos y en el tracto intestinal para heterorhabditidos (Sáenz, 1998).

El juvenil infectivo ingresa al huésped a través de aberturas naturales (boca, espiráculos, ano) o áreas delgadas de la cutícula del huésped (solamente en heterorhabditidos) y penetra dentro del hemocoele del huésped (Kaya y Gaugler, 1993; Sáenz, 1999a, b). Los juveniles infectivos de steinernematidos liberan la bacteria a través del ano (Poinar, 1966) o por la boca como en los heterorhabditidos (Ciche y Ensign, 2003). La bacteria mutualista se propaga y produce sustancias que con rapidez matan al huésped y protegen el cadáver de la colonización de otros microorganismos (Sáenz, 2000). Los nematodos inician su desarrollo, se alimentan de las células bacterianas y los tejidos del huésped son metabolizados por la bacteria y tienen de una a tres generaciones dependiendo del tamaño del mismo. Como los recursos de alimento en el cadáver del huésped son agotados, una nueva generación de juveniles infectivos es producida y emerge desde el cadáver del huésped en el suelo para buscar uno nuevo (Figura 1). (Sáenz, 2000; 2003).

La principal diferencia entre steinernematidos y heterorhabditidos

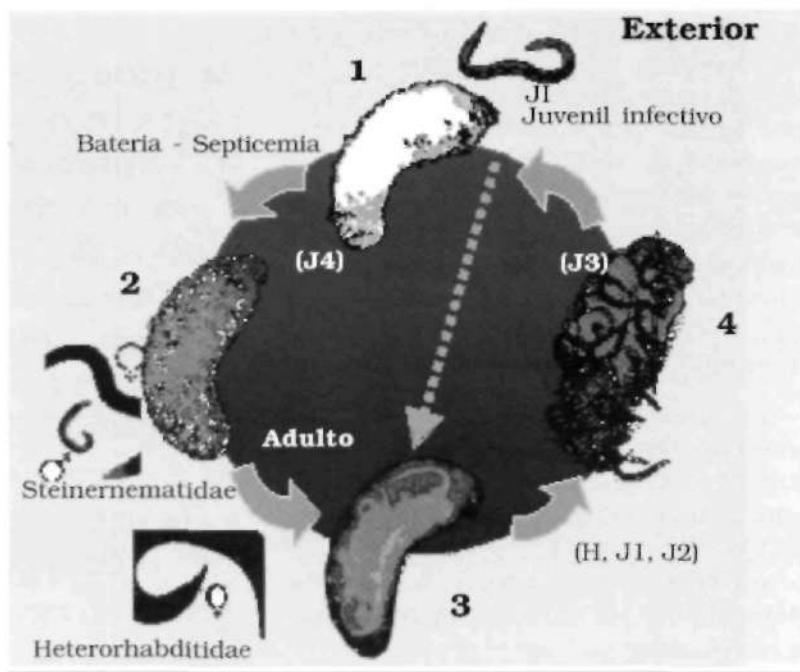


Figura 1 Ciclo de vida de Steinernematidos y Heterorhabditidos en larvas del barrenador de raíces *Sagalassa valida* (Lepidoptera: Glyphipterigidae) (Fotografía de Sáenz, 2005). (Laboratorio de Sanidad Vegetal, Palmeiras, S.A.).



Figura 2 Juveniles infectivos conservando la cutícula del segundo estado (ct) o J2. a. *Steinernema feltiae* (juvenil infectivo del producto comercial Nemaplus); b. *Heterorhabditis bacteriophora* (juvenil infectivo del producto comercial Nematop). (Fotografía de Sáenz, 2005). (Laboratorio de Sanidad Vegetal, Palmeiras, S.A)

consiste en que todas las especies del primer grupo son sexuales, mientras que las especies del segundo grupo son hermafroditas en la primera generación, pero sexuales en la segunda. Por ende, los steinernematidos requieren de un juvenil infectivo hembra y uno macho para invadir un insecto huésped y producir prole, mientras los heterorhabditidos necesitan únicamente un juvenil infectivo para penetrar un huésped y dar como resultado adultos autofecundados (Sáenz. 1999; 2000). Sin embargo, Griffin *et. al* (2001). establece que una especie de *Steinemema* sin describir de Indonesia, tiene individuos hermafroditas con baja frecuencia de machos (1-6% de la población).

Las especies de nematodos están asociadas con una especie específica de bacteria simbiótica, pero las bacterianas pueden estar asociadas con más de una especie de nematodo (Tabla 1). Akhurst y Boemare (1990) establecen que la mejor reproducción de nematodos se presenta con su simbionte natural, pero en algunos casos pueden desarrollarse con otras especies bacteriales. La relación entre los nematodos y la bacteria es mutualista, ya que los nematodos son dependientes de la bacteria dado que matan rápidamente su insecto huésped; crean un ambiente favorable para su desarrollo por producir antibióticos que suprimen la competencia de otros microorganismos; transforman los tejidos del huésped en una fuente de alimento y sirve como recurso alimenticio. La bacteria necesita del nematodo para protegerse del ambiente externo; penetrar el hemocoele del huésped e inhibir las proteínas antibacteriales del mismo (Sáenz. 1999, 2004).

Xenorhabdus y *Photorhabdus* son bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, gran negativas, facultativas, no forman esporas y son anaeróbicas. En el género *Xenorhab-*

Tabla 1 Especies de nematodos entomopatógenos y su bacteriana simbiote

Género de nematodo	Especie de nematodo	Especie simbiote
<i>Steinemema</i>	<i>abbasi</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>affine</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinemema</i>	<i>anatoliense</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>arenarium (anomali)</i> ¹	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinemema</i>	<i>asiaticum</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>bicornutum</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>carpocapsae</i> ²	<i>X. nematophila</i>
<i>Steinemema</i>	<i>caudatum</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>ceratophorum</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>cubanum</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>Steinemema</i>	<i>diaprepesi</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>feltiae (bibionis)</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>Steinemema</i>	<i>glaseri</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>Steinemema</i>	<i>intermedium</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>Steinemema</i>	<i>kari</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>kraussei</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>Steinemema</i>	<i>kushidai</i>	<i>X. japonica</i>
<i>Steinemema</i>	<i>loci</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>longicaudum</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>monticolum</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>neocurtillae</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>oregonense</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>puertoricense</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>rarum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinemema</i>	<i>riobrave</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinemema</i>	<i>ritteri</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinemema</i>	<i>sangi</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>scapterisci</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinemema</i>	<i>scarabaei</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>stankayai</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinemema</i>	<i>tani</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinemema</i>	<i>thanhi</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>thermophilum</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>websteri</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	<i>weseri</i>	Sin describir
<i>Steinemema</i>	sin describir	<i>X. beddingii</i>
Por confirmar	<i>serratum</i>	Sin describir
<i>Neosteinemema</i>	<i>longicurvicauda</i>	Sin describir
	<i>bacteriophora</i>	<i>P. luminescens</i> ⁴ y
<i>Heterorhabditis</i>	<i>(heliothidis, argentinensis)</i>	<i>P. temperata</i> ⁵
<i>Heterorhabditis</i>	<i>baugardi</i>	Sin describir
<i>Heterorhabditis</i>	<i>brevicaudis</i>	<i>P. luminescens</i> ³
<i>Heterorhabditis</i>	<i>downesi</i>	<i>Photorhabdus</i> sp.
<i>Heterorhabditis</i>	<i>indica (hawaitiensis)</i>	<i>P. luminescens</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>marelata (hepiallii)</i>	<i>P. luminescens</i> ⁴
<i>Heterorhabditis</i>	<i>megidis</i>	<i>P. temperata</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>poinarii</i>	<i>Photorhabdus</i> sp.
<i>Heterorhabditis</i>	<i>trajsearae</i>	Sin describir
<i>Heterorhabditis</i>	<i>zealandica</i>	<i>P. temperata</i>

1. En paréntesis nombre usado previamente o sinónimo.

2. La especie «*carpocapsae*» ha sido referenciada como «*feltiae*» en la literatura entre 1983 y 1989. El nombre «*feltiae*» es válido y toma precedente sobre «*bibionis*».

3. Fisher-Le Saux *et al.* (1989), mostraron que *Photorhabdus* es un grupo heterogéneo. *P. luminescens* está asociado con algunos de *H. indica*, pero no todos los aislados de *H. bacteriophora*. El estatus de bacteria simbiote con *H. argentinensis*, *H. brevicaudis* y *H. marelata* no es claro y se ha mantenido en este caso como la especie bacteriana *P. luminescens*. Esto puede cambiar en el futuro. Así mismo, una especie, *P. asymbiotica*, no está asociada con nematodos y ha sido aislada de casos clínicos humanos.

4. Algunos subgrupos de *H. bacteriophora* están asociados con *P. temperata*

El uso de hongos, bacterias y virus entomopatógenos ha cobrado mayor importancia durante las dos últimas décadas y el estudio de los nematodos, es considerado una alternativa promisorio en el control de plagas agrícolas

us, cinco especies están asociadas con *Steinemema*, mientras en el género *Photorhabdus*, tres lo están asociadas con *Heterorhabditis* (Tabla 1), (Fischer *et al*, 1999; Burnell y Stock, 2000; Boemare, 2002; Hazir *et al*, 2005).

Dentro de las diferencias entre los dos géneros bacteriales, se destaca la luminiscencia en *Photorhabdus* spp. mientras que *Xenorhabdus* spp no son luminiscentes. Ambos géneros bacteriales producen células diferentes conocidas como forma primaria (fase I) y forma secundaria (fase II) (Sáenz, 1998, 1999; Forst y Clarke, 2002). La forma primaria está asociada naturalmente con los juveniles infectivos, mientras la forma secundaria surge espontáneamente cuando los cultivos bacteriales están en estado estacionario de no crecimiento en cultivos *in vitro*. La forma secundaria de *Xenorhabdus* puede cambiar a la forma primaria, pero este fenómeno no ha sido establecido para *Photorhabdus* spp.

Las dos formas bacteriales presentan diferencias, por ejemplo, la primaria produce antibióticos, absorbe ciertos colorantes y desarrolla grandes inclusiones intracelulares compuestas de cristales de proteínas; mientras la secundaria produce semanalmente antibióticos o no produce, no absorbe colorantes y produce de manera ineficiente inclusiones intracelulares. La forma primaria es la que tiene la capacidad de soportar la propagación de nematodos *in vitro* (Lysenko y Weiser, 1974; Ehlers *et al*, 1990; Aguilera *et al*, 1993; Aguilera y Smart, 1993; Jackson *et al*, 1995; Babic *et al*, 2000; Vivas y Goodrich-Blair, 2001; Boemare, 2002; Martens *et al*, 2003).

Especies de nematodos entomopatógenos

En la actualidad, se han reconocido más de 40 especies en el mundo de nematodos entomopatógenos (Tabla

1), en las dos familias, con 35 en *Steinemema*, una en *Neosteinemema* 10 en *Heterorhabditis* (Stock y Hunt, 2004; Sáenz, 2004).

Rango de huéspedes

En el laboratorio, la mayoría de las especies de nematodos entomopatógenos infectan una variedad de insectos cuando existe un contacto seguro, las condiciones ambientales son óptimas y no hay barreras ecológicas o comportamentales para la presencia de la infección (Kayay Gaugler, 1993; Ozer *et al*, 1995; Gaugler *et al*, 1997; Sáenz y Luque, 1998; Sáenz, 1999, 2003; Sáenz y Luque, 1999; Susurluk *et al*, 2001; Hominick, 2002; Hazir *et al*, 2003). En el campo, los nematodos entomopatógenos atacan un limitado rango de huéspedes más que en laboratorio (Akhurst, 1990; Georgis *et al*, 1991; Bathon, 1996; Peters, 1996). No obstante, son seguros como agentes de control biológico.

Además, están adaptados al ambiente suelo, dado que los principales huéspedes son insectos que habitan en el. Los nuevos aislamientos de especies o cepas de nematodos se hacen usando larvas de la polilla mayor de las colmenas *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae) (Sáenz, 1999). Sin embargo, algunas especies de nematodos han sido aisladas de cadáveres de huéspedes hallados en campo y tienen un rango de éstos limitado como *S. kushidai* (Mamiya, 1989) y *S. scarabaei* (Stock y Koppenhofer, 2003) adaptados a larvas de escarabajos.

Interacción bacteria-nematodo con el huésped

Así como la mayoría de especies de nematodos entomopatógenos tienen un amplio rango de huéspedes, su eficacia varía con muchos factores biológicos, incluyendo especies y cepas de nematodos, especies de insectos

tos y su estado de desarrollo (Eidt y Thurston. 1995: Simoes y Rosa, 1996). Uno de los factores que afecta la eficacia de los juveniles infectivos es que la mayoría de los insectos habitantes del suelo han desarrollado comportamientos para reducir su descubrimiento, fijación o penetración de los juveniles infectivos (Sáenz, 1998. 2003).

Algunos de los comportamientos incluyen una alta tasa de defecación que reduce la infección por el ano (larvas de escarabajos) (De Bach. 1964): bajo rendimiento de liberación de CO₂ que minimiza la señal química (pupas de lepidópteros y larvas de escarabajos) (Tanada y Kaya, 1993): formación de cocones impenetrables o celdas de suelo antes de la pupación que sirven como barreras físicas (muchos lepidópteros y escarabajos): comportamiento evasor que reduce el contacto con los juveniles (larvas de escarabajos) (Gaugler *et al*, 1994: Koppenhofer *et al*. 2000).

Los juveniles infectivos pueden penetrar el insecto usando varias rutas, dependiendo de cuál es más accesible (Eidt y Thurston, 1995). En algunos insectos la ruta usual de entrada, como la boca, puede ser inaccesible al estar obstruida por filtros orales o ser angosta (insectos con partes bucales chupadoras o insectos pequeños con partes bucales masticadoras). Así mismo el ano, por ser estrecho debido a la presencia de fibras musculares u otras estructuras y los espiráculos cubiertos con setas (larvas de lepidópteros) o platos filtradores (larvas de escarabajos) o simplemente ser angostos para la entrada de los nematodos (algunos dípteros y lepidópteros). También pueden penetrar a través de la cutícula (incluyendo las tráqueas) o el intestino para entrar al hemocele.

Para ingresar a través de la cutícula, los nematodos emplean la fuerza

física, clavando su cuerpo para romper y atravesar las delgadas tráqueas, como los heterorhabditidos que usan su diente anterior para penetrar directamente el hemocele. Para entrar a través del intestino, usan fuerzas físicas o secreciones proteolíticas para digerir tejidos del intestino medio y acceder al hemocele (Abuhatab *et al*, 1993: Peters y Ehlers, 1994). Además, dentro del hemocele la bacteria y los juveniles infectivos resisten la respuesta inmune del huésped, que involucra la interacción de factores humorales y celulares (Dunphy y Thurston. 1990: Kaya y Gaugler, 1993).

Para contrarrestar las células bacteriales, los insectos pueden usar proteínas antibacteriales, seguido de la formación de nódulos e inactivar los nematodos. Los insectos pueden encapsular el juvenil infectivo. En algunos casos, el tercer estado del nematodo puede superar las defensas del insecto, tal es el caso de la especie *S. glaseri*, la cual inicialmente es encapsulada por larvas del escarabajo japonés *Popillia japonica*, pero ésta escapa de la cápsula e infecta con éxito al huésped, ya que la superficie de los nematodos tiene proteínas que suprimen la respuesta inmune de su huésped y destruye las células antibacteriales del insecto (Wang *et al*, 1995; Wang y Gaugler, 1998).

Sin embargo, la invasión de los nematodos puede producir factores inmuno-inhibitorios que destruyen los factores antibacteriales producidos por el insecto y permite que la bacteria mutualista produzca toxinas insecticidas que rápidamente matan al huésped (Bowen *et al*, 1998). Los nematodos pueden también producir exotoxinas paralizantes y enzimas extracelulares proteolíticas y citotóxicas. Las reacciones anteriores son dependientes en el insecto huésped,

en el complejo nematodo-bacteria y contribuyen a la variabilidad en la eficacia de los nematodos entomopatógenos en contra de diferentes especies de insectos (Dowds y Peters. 2002).

Comportamiento

Uno de los factores limitantes del rango de huéspedes de los nematodos entomopatógenos es el comportamiento de forrajeo de los juveniles infectivos (el término forrajeo se aplica en ecología y etología a todas las actividades que realiza un J3 en relación con la búsqueda de su huésped). Estos nematodos emplean estrategias para localizar e infectar al huésped, dentro de éstos están los emboscadores (esperan a su huésped) o cruceros (buscan activamente a su huésped). (Campbell y Lewis. 2002; Lewis. 2002).

La mayoría de las especies de nematodos están situadas dentro de estos dos comportamientos; sin embargo, algunas tienen comportamientos intermedios dentro de estos dos, como *S. riobrave* o *S. feltiae*

(Campbell y Gaugler, 1997; Campbell y Kaya, 1999). Estas estrategias intermedias están adaptadas para infectar insectos que permanecen bajo la superficie del suelo, tales como las prepupas de lepidópteros, hormigas o larvas de escarabajos. Los juveniles infectivos emboscadores (*S. carpocapsae* y *S. scapterisci*) se caracterizan por la baja movilidad y una tendencia a permanecer cerca de la superficie del suelo. Además, no responden a las señales de contacto del huésped al menos que presente una apropiada secuencia y eficiente movilidad de las especies hospederas tales como mariposas, saltamontes o gusanos cortadores cerca de la superficie del suelo. Los juveniles infectivos cruceros (*S. glaseri* y *H. bacteriophora*) se caracterizan por la alta movilidad y están distribuidos a través del perfil del suelo: los juveniles se orientan por sustancias volátiles del huésped y lo localizan; infectan huéspedes sedentarios como prepupas y pupas de escarabajos y lepidópteros.

Otro comportamiento de los juveniles infectivos es su típico ondeamiento corporal o nictación (Figura 3), donde del 30 al 95% de su cuerpo es levantado del sustrato por unos pocos segundos. La mayoría de especies de nematodos que tienen una estrategia de forrajeo emboscador o intermedio pueden ondear su cuerpo y levantarlo en 95% del sustrato, parándose en su cola y tomando una postura recta o alternando períodos sin movimiento y activo ordeamiento (Campbell y Kaya. 1999 a,b). Los juveniles cruceros pueden ondear su cuerpo, pero no pueden pararse en su cola. Los juveniles que pueden pararse en su cola y ondear su cuerpo, pueden saltar también. Este comportamiento de salto puede ser utilizado para atacar al huésped o como mecanismo de dispersión.

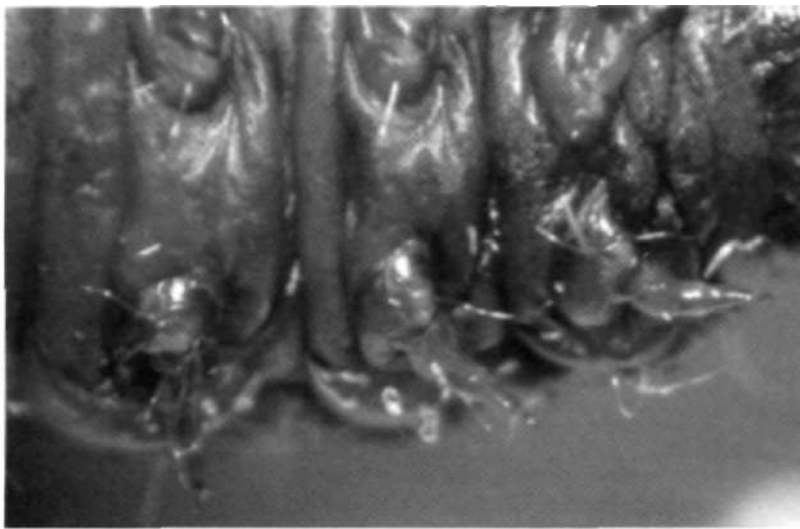


Figura 3 Las flechas indican el comportamiento de nictación de juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* en un cadáver de *Galleria mellonella*. (Fotografía de Sáenz, 2005). (Laboratorio de Sanidad Vegetal, Palmeiras, S.A).

Producción en masa, formulación y comercialización

Producción en masa

Los nématodos entomopatógenos son fácilmente cultivados *in vivo* o *in vitro* para pruebas de laboratorio o producción comercial (Friedman, 1990). La polilla mayor de las colmenas *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae), es el insecto utilizado para producción *in vivo*, por que éste es producido comercialmente en grandes cantidades en varios países como cebos de pesca, aves y alimento para lagartijas; además de ser susceptible a la mayoría de especies de nématodos.

El método básico para producción a pequeña escala es descrito en Kaya y Stock (1997), mientras un método a gran escala para producir nématodos es descrito por Gaugler *et al* (2002). La producción *in vivo* es una labor intensa, utilizada para pequeños bioensayos y costosa, sin embargo, es simple y produce una alta calidad de juveniles infectivos (Sáenz, 2000; Shapiro, 2003) (Figura. 4). La producción *in vivo* a escala industrial puede ser aplicada en países desarrollados y algunas industrias utilizan esta tecnología.

La producción a gran escala en métodos *in vitro*, utiliza medios sólidos dimensionales o métodos de fermentación líquida (Ehlers, 1996; Grewal y Georgia, 1998). El método de medio sólido tridimensional fue descrito primero por Bedding (1984) usando espuma de poliuretano poliéster con un medio nutritivo e inoculando primero la bacteria simbionte y después los nématodos. Con este método se produjeron 65 millones de juveniles infectivos en 500 ml/frasco ó 2 billones de juveniles por área de bolsa plástica autoclavada (Bedding, 1984). Las ventajas del método de medio sólido son los bajos costos y la logística de producción.

El método de fermentación líquida presenta economías de escala, dado que la proporción de la labor y los costos decrecen con el incremento de los costos operativos. Esta tecnología tiene los más bajos costos de producción y es el método escogido por grandes compañías, con múltiples productos en países industrializados. El éxito de cultivos líquidos está en proveer el medio apropiado, con la bacteria asociada del juvenil infectivo únicamente y con adecuada oxigenación (Ehlers, 2001; Gaugler y Han, 2002). Los componentes típicos de un medio

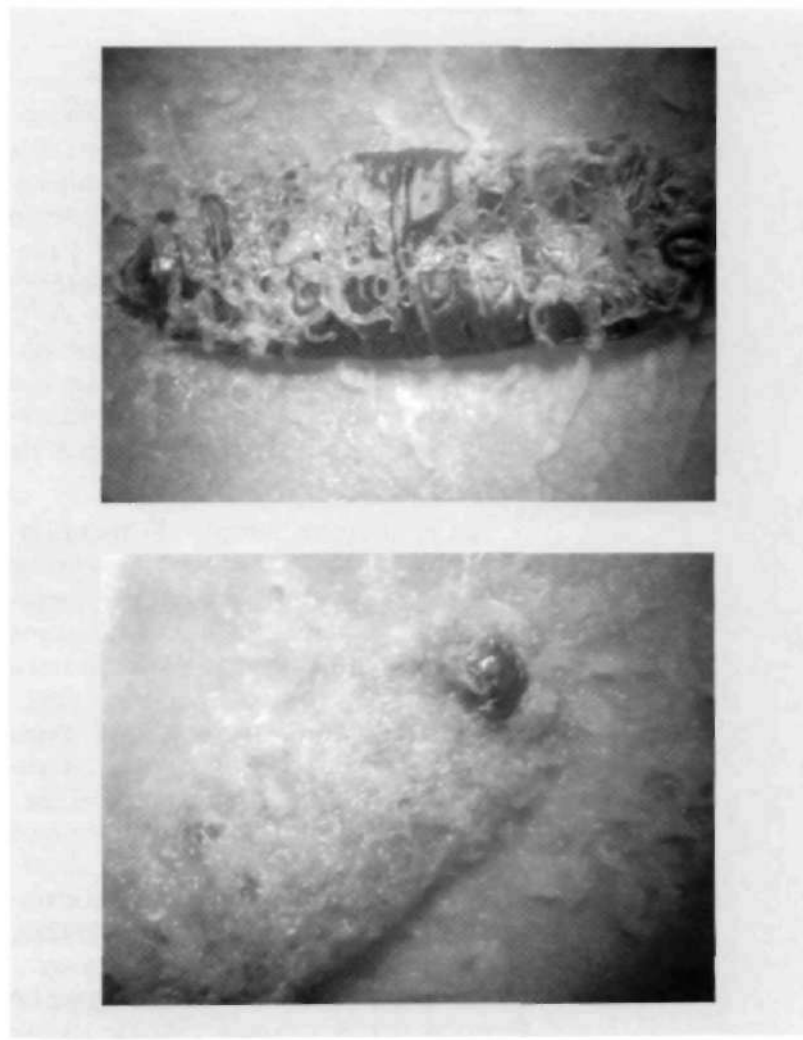


Figura 4 Juveniles infectivos producidos por método *in vivo* en larvas de *Galleria mellonella* (Fotografía de Sáenz, 2005). (Laboratorio de Sanidad Vegetal, Palmeiras, S.A.)

son: extracto de levadura como fuente de nitrógeno; una fuente de carbohidratos tales como harina de soya, glucosa o glicerol; lípidos de origen animal o vegetal y sales. Con este método de producción se ha alcanzado un número significativo de especies con éxito en los biorreactores, obteniendo de 7.500 a 80.000 millones de juveniles por litro de especies como *S. carpocapsae*, *S. riobrave*, *S. kushidai*, *S. scapterisci*, *H. bacteriophora* y *H. megidis* con capacidad de producción de 250.000 J3/ml dependiendo de la especie de nematodo (Ehlers *et al*, 1998; Strauchy Ehlers, 1998).

Formulación y almacenamiento

Después de la producción en masa, los juveniles infectivos pueden ser almacenados en tanques aireados y refrigerados entre uno y seis meses o formulados de inmediato. Los juveniles infectivos pueden ser almacenados en suspensiones acuosas a 4 °C (dependiendo de la especie de nematodo), sin perder su actividad por 6 ó 12 meses para especies de *Steinernema* y 3 a 6 meses para especies de *Heterorhabditis* (Sáenz, 2000).

En el método simple de formulación, los nematodos son mezclados con un substrato húmedo (por ejemplo, esponja). Estas formulaciones requieren continua refrigeración para conservar la calidad de los nematodos por períodos prolongados. Para mantenerlos vivos y resistentes a temperaturas extremas, se reduce el metabolismo de los juveniles infectivos por inmovilización parcial o desecación. Estas formulaciones contienen alginato, vcrmiculita, arcillas, carbón activado, policriamida y gránulos dispersantes de agua (Grewal y Georgia, 1998; Georgisy Kaya, 1998).

No obstante, es difícil de obtener una formulación óptima para todas las especies de nematodos por tener

requerimientos específicos de humedad y oxígeno. Una de las mejores formulaciones es la de gránulos dispersables de agua que ha sido desarrollado para steinernematidos (por ejemplo, *S. carpocapsae* y *S. felliae*), ésta combina grandes cantidades de nematodos vivos sin refrigeración y son fáciles de transportar. Esta formulación en el momento de la aplicación se mezcla con agua y los juveniles infectivos se van rehidratando en el ambiente húmedo del suelo durante tres días (Baur *et al*, 1997 a,b). Además, los juveniles infectivos contenidos en esta formulación y almacenados a 25 °C, sobreviven de cinco a seis meses para la especie *S. carpocapsae*, dos meses para *S. Jeltiaey* un mes para *S. riobrave* (Grewal, 2000).

Control de calidad

Antes y después de la formulación, la calidad de los nematodos debe ser medida, en especial, su viabilidad e infectividad. El análisis utilizando muchos nematodos (superior a 500 juveniles) es considerado inapropiado. por las propuestas de control de calidad debido a la interacción huésped-parásito. Grewal (2002) defiende el uso de uno a uno (un nematodo por una larva de *G. mellonella*) en ensayos de paredes de arena como una herramienta estándar de control de calidad. El ensayo uno a uno trabaja bien para steinernematidos y el ensayo cinco a uno para heterorhabditidos (Gaugler *et al*, 2000). Además, los parámetros de control de calidad incluyen reservas de energía (peso seco o contenido de lípidos totales) como un pronóstico de longevidad.

Comercialización

La primera etapa en el desarrollo de un producto comercial es la selección de cepas. Las propiedades claves de una cepa comercial son la alta virulencia en contra de insectos plaga

blanco y la facilidad del cultivo. También, son convenientes la sobrevivencia y efectividad de múltiples insectos plaga. No obstante, todas las pruebas deben ser encaminadas con la misma cepa. Por ejemplo, aunque *S. glaseri* es efectiva contra larvas de coleóptera, los problemas de formulación y almacenamiento son factores negativos para su mercado (Gaugler y Han, 2002).

También, se han considerado las regulaciones en el uso de nematodos entomopatógenos para el control de insectos y varían entre países (Richardson, 1996; Bedding et al., 1996; Rizvi et al., 1996). Los nematodos nativos están exentos de registro en muchos países europeos, Australia y Estados Unidos, mientras en otros países, están sujetos a registros similares como los pesticidas químicos. La importación y uso de especies de nematodos trasgénicos y no nativos, está sujeto a estrictas regulaciones en la mayoría de los países. No obstante, algunos países, también incluyen las cepas de especies endémicas, lo cual es un obstáculo para la comercialización de estos nematodos entomopatógenos y su utilización en programas de manejo integrado de plagas en diferentes cultivos del mundo.

Eficacia

Plagas blanco

Los nematodos entomopatógenos han sido probados en contra de un gran número de especies de insectos plaga con resultados que varían desde poco a excelente control (Tabla 2) (Koppenhofer, 2000). Muchos factores pueden influir en el uso exitoso de nematodos como agentes de control biológico, pero tanto la biología como la ecología de los nematodos y la plaga blanco, son cruciales para el éxito de la aplicación. Se ha considerado que el comportamiento de forrajeo y los

requerimientos de temperatura para una especie de nematodo y la accesibilidad y susceptibilidad de la plaga a los nematodos, es importante para la infección.

Los nematodos entomopatógenos han sido más eficientes en hábitats que proporcionan protección a condiciones extremas ambientales, especialmente en suelo que es su hábitat natural y en crípticos (insectos que cumplen parte de su ciclo de vida dentro de estructuras de las plantas). Excelentes controles han sido registrados en contra de insectos barrenadores de plantas, dado su hábitat críptico que es favorable para la sobrevivencia e infectividad de los nematodos (por ejemplo, enemigos naturales y adecuada humedad). El control de insectos acuáticos ha sido poco evaluado, porque los nematodos no están adaptados a movilidades dirigidas (descubrimiento del huésped) en estos ambientes. En follaje y otros hábitats expuestos, las difíciles condiciones pueden ser remediadas únicamente con coadyudantes.

Estrategias de aplicación

Los nematodos entomopatógenos se han aplicado de manera exclusiva usando métodos inundativos, donde altos números de juveniles infectivos son liberados en una distribución uniforme y el control de poblaciones plaga es rápido y eficaz. Este método es factible para cultivos como ornamentales y vegetales bajo invernadero, cítricos, frambuesa y pastos. Sin embargo, la aplicación de nematodos no es apropiada por métodos inundativos en muchos sistemas de cultivo (cultivos de bajo valor o amplio espacio cultivable), por su limitada sobrevivencia, susceptibilidad a las condiciones extremas ambientales, altos costos. Por tanto, las liberaciones inoculativas, conservación y manejo de especies de nematodos endémicos

Los nematodos entomopatógenos que han mostrado mejores resultados en el control biológico de plagas pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae.

Tabla 2 Plagas blanco manejadas con nematodos entomopatógenos (Georgis *et al.*, 1995). L: Larva; P: Pupa; A: Adulto. Sc: *Steinernema carpocapsae*; Sf: *Steinernema feltiae*; Sr: *Steinernema riobrave*; Ss: *Steinernema scapterisci*; Hb: *Heterorhabditis bacteriophora*; Hm: *Heterorhabditis megidis*

Grupo plaga Orden: familia	Nombre común	Estado de vida	Sitio de aplicación	Producto de interés	Especie de nematodo
Coleóptera					
Chrysomelidae	Escarabajo pulga	L	Suelo	Menta, papa, batata, remolacha, vegetales	Sc
Chrysomelidae	Gusano de la raíz	L	Suelo	Maíz, maní, vegetales	Sc, Sr
Curculionidae	Gorgojo	L	Césped	Pastos	Sc, Hb
Curculionidae	Gorgojo de la raíz	L	Suelo	Frutos de baya, cítricos,	Sc, Hb, Hm, Sr
Scarabeidae	Gusanos blanco	L	Suelo, Césped	Haba, ornamentales, pastos	Sg, Hb, Hm
Dipera					
Agromyzidae	Minadores de hoja	L	Follaje	Ornamentales, vegetales	Sc
Ephydriidae	Moscas borde	L	Suelo	Ornamentales, vegetales	Sf
Sciaridae	Moscas sciaridas	L	Suelo	Ornamentales, vegetales, setas	Sf
Muscidae	Mosca común	A	Cebo	Criaderos de animales	Sc, Sf, Hb
Tipulidae	Moscas sifón	L	Suelo, Césped	Ornamentales, césped	Sc, Hm
Lepidóptera					
Carposinidae	Mariposa barrenadota de melón	L	Suelo	Manzana	Sc
Tortricidae	Mariposa manzana	PP	Folículo	Manzana, pera	Sc
Noctuidae	Gusanos cortadores	L/P	Suelo, turba	Ornamentales, vegetales, césped, maíz, maní	Sc
Cossidae	Mariposas Leopardo	L	Folículo	Ornamentales, pera, manzana, arbustos	Sc
Sesiidae	Barrenadores de tallo	L	Folículo	Haba	Sc
		L		Ornamentales, árboles frutales	
Pyrilidae	Gusanos tela	L	Suelo, Césped	Frambuesa, Ornamentales, césped	Sc
Orthoptera					
Gryllotalpidae	Grillos	A/N	Césped, suelo	Vegetales, césped	Ss, Sr
Siphonaptera					
Pulicidae	Pulgas	L/P	Suelo, Césped	Mascotas	Sc

necesita ser explorada, promisorio y factible para el manejo de muchas plagas.

Las liberaciones inoculativas de nematodos entomopatógenos tienden a establecer nuevas poblaciones o incrementan poblaciones bajas por supresión de plagas, esto se ha probado en pocas ocasiones y poco se conoce sobre las condiciones óptimas para esto (Parkman y Smart, 1996). Por

ejemplo. Gaugler *et al.* (1997). establece que la eliminación del simbionte bacteriano por el uso de antimicrobianos en los procedimientos de cría *in vitro* de la especie *S. glaseri* posiblemente, la pobre adaptación climática de esta especie neotropical, limita su éxito en este programa de manejo.

Así mismo, estas liberaciones dependen de la sobrevivencia multigeneracional y renovación de las po-

blaciones de juveniles infectivos. En otras palabras, se pueden incluir varias condiciones como: i) La presencia de insectos huéspedes susceptibles a través de los años, ii) Un nivel de daño económico no manejable del insecto plaga, iii) condiciones favorables del suelo para la sobrevivencia de los nematodos (Kaya, 1990). Liberaciones aumentativas dentro del establecimiento de poblaciones de nematodos y manejo de la susceptibilidad de las poblaciones plaga/huéspedes, son dos aproximaciones que pueden ser usadas para fomentar o establecer el manejo de poblaciones de nematodos y requieren más atención (Koppenhofer, 2000; Koppenhofer *et al*, 2000).

Métodos de aplicación

La mayoría de los métodos de aplicación de nematodos entomopatógenos emplea los mismos equipos de aplicación utilizados para pesticidas químicos. Los juveniles infectivos resisten presiones superiores a 1068 kPa y pasan a través de filtros de 100 µm de diámetro. No obstante, los filtros pueden ser removidos de las boquillas para evitar el daño a los nematodos.

También se han aplicado los nematodos por sistemas de irrigación incluyendo goteo, microinyección y aspersión (Georgis *et al*, 1995; Cabanillas y Raulston, 1995). La irrigación pre y postaplicación, y la continua humedad del suelo son esenciales para la permanencia de los nematodos. Si el agua es limitada, la inyección de nematodos directamente dentro de la entrada de la galería o bloqueando la entrada con esponjas impregnadas con suspensiones de nematodos para insectos barrenadores de plantas, son métodos de liberación eficiente (Baur *et al*, 1997; Klein, 1993; YangeíaZ., 1993).

Efectos de agroquímicos y agentes de control biológico

Los nematodos entomopatógenos son aplicados en sistemas/sustratos que son regularmente tratados con otros agentes, incluyendo químicos o biológicos y fertilizantes. Según los agentes, sincronización de la aplicación y caracteres físico-químicos del sistema, los nematodos pueden o no interactuar con estos agentes. En adición a estos agentes, la depredación entre parasitoides y nematodos puede presentarse (Rosenheim *et al*, 1995). No obstante, Sher *et al*. (2000) y Lacey *et al*. (2003) han demostrado que algunos parasitoides son compatibles con *S. carpocapsae*.

Al parecer los nematodos entomopatógenos son compatibles con la mayoría de los herbicidas, fungicidas, acaricidas, insecticidas, nematocidas (Rovesti y Deseo, 1990; Ishibashi, 1993; Georgis y Kaya, 1998). No obstante, en vista de la diversidad de químicos disponibles e insecticidas biológicos, no se ha probado una generalización en la compatibilidad de nematodos-pesticidas. Por tanto, la compatibilidad de cada pesticida y especie de nematodo, debe ser evaluada en cada caso (Nishimatsu y Jackson, 1998; Koppenhofer *et al*, 2000).

Consideraciones finales para el control biológico de plagas en palma de aceite

Los nematodos entomopatógenos se han producido comercialmente y se han vendido en Norte América, este de Europa, Asia y Australia, entre otros. Muchos otros países, incluido Colombia, están explorando el uso de nematodos entomopatógenos para el control biológico de varios insectos plaga. Sin embargo, sus altos costos en comparación con otros agentes de control, hace que se restrinjan a

cultivos de alto interés comercial en países en desarrollo. Por ende, la oportunidad de usar nematodos entomopatógenos en palma de aceite contra insectos plaga en el suelo, fruto o hábitats crípticos entre otros, como *Sagassia valida* (barrenador de raíces de palma de aceite), *Strategus aloeus* (torito), *Imatidium neivai* (raspador de frutos), *Rhynchophorus palmarum* (gusano de los cogollos), hace de este enemigo natural, un posible agente de control para incluir dentro de los programas de manejo integrado de plagas en las plantaciones del país.

Los desafíos en palma de aceite son muchos, éstos incluyen aislar los nematodos nativos en las cuatro zonas productoras del país; caracte-

rización de las especies y su bacteria simbionte: evaluar los diferentes insectos plaga de la palma: determinar los mejores métodos de aplicación (por ejemplo, liberaciones inoculativas versus inundativas); y establecer el complejo más apropiado de nematodo-bacterio para producción comercial adecuada y económica de los nematodos a ser usados por los productores. Además, aunque los nematodos pueden ser producidos y formulados, ellos serían entregados a los productores, agrónomos, técnicos o supervisores del programa de sanidad vegetal de las plantaciones, quienes los evaluarían para que los nematodos sean usados con eficiencia en contra de las plagas blancas en palma de aceite.

Bibliografía

- AbuHatab, MA; Selvan, S; Gaugler, R. 1993. Role of proteases in penetration of insect gut by the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 66: 125-130.
- Aguillera, MM; Hodge, NC; Stall, RE. 1993. Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 68-72.
- Aguillera, MM; Smart, GC. 1993. Development, reproduction and pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in monoxenic culture with different species of bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 289-294.
- Akhurst, RJ. 1990. Safety to no target invertebrates of nematodes of economically important pest. In: Laird, M; Lacey, L; Davidson, E. Eds. Safety of Microbial Insecticides. CRC Press. Boca Raton. FL: 233-240.
- Akhurst, RJ; Boemare, NE. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. in: Gaugler, R; Kaya, HK. Eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press. Boca Raton. FL: 75-90.
- Babic, 1; Fischer-Le, SM; Giraud, E. 2000. Occurrence of natural dioxin associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. In tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematode: Rhabditida). *Microbiology.* 146:709-718.
- Bathon, H. 1996. Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. *Biocontrol Sci. Technol.* 6:421-434.
- Baur, ME; Kaya, HK; Gaugler, R. 1997a. Effects of adjuvant on entomopathogenic nematode persistence and efficacy against *Plutella xylostella*. *Biocontrol Sci. Technol.* 7: 513-525.
- Baur, ME; Kaya, HK; Tabashnik, B. 1997b. Efficacy of a dehydrated steinernematid nematode against black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) and diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1200-1206.
- Bedding, RA. 1984. Large scale production storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neosapientia* spp and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* 104: 117-120.
- Bedding, RA; Tyler, S; Rochester, N. 1996. Legislation on the introduction of exotic entomopathogenic nematodes into Australia and New Zealand. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 465-475.
- Blaxter, ML; De Ley, P; Garey, JR. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematode. *Nature.* 392:71-78.
- Boemare, N. 2002. Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. Ed. Entomopathogenic Nematology. Cabipublishing. Wallingford. UK: 35-56.
- Bowen, D; Rocheleau, TA; Blackburn, M. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science.* 80: 2129-2132.
- Burnell, AM; Stock, SP. 2000. *Heterorhabditis*. *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. *Nematology.* 2: 1-12.
- Cabanillas, HE; Raulston, JR. 1996. Effects of furrow irrigation on the distribution and infectivity of *Steinernema riobrave* against corn earworm in corn. *Fundam. Appl. Nematol.* 19:273-281.

- Campbell, JF; Gaugler, R. 1997. Intra-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum?. *Fundam. Appl. Nematol.* 20: 393-398.
- Campbell, JF; Kaya, HK. 1999a. How and why a parasitic nematode jumps? *Nature*. 397: 485-486.
- Campbell, JF; Kaya, HK. 1999b. Mechanism, kinematics performance and fitness consequences of jumping behavior in entomopathogenic nematodes [*Steternema* sp.]. *Can. J. Zool.* 77: 1-9.
- Campbell, JF; Lewis, EE. 2002. Entomopathogenic nematode host-search strategies. In: Lewis, EE; Campbell, JF; Sukhdeo, MV. Eds. The Behavioural Ecology of Parasites. *Cabi Publishing*. Wallingford, UK: 13-38.
- Ciche, TA; Ensign, JC. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1890-1897.
- DeBach, O. 1964. Biológica! Control of insect Pests and Weeds. *Reinhold Publishing Corp.* New York.
- Dowds, BC; Peters, A. 2002. Virulence mechanism. In: Gaugler, R. Ed. Entomopathogenic Nematology. *Cabi Publishing*. Wallingford, UK: 79-98.
- Dunphy, CB; Thurston, GS. 1990. Insect immunity. In: Gaugler, R; Kaya, HK. Eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. *CRC Press*. Boca Raton, FL: 301-323.
- Ehlers, RU. 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Sci. Technol.* 6:303-316.
- Ehlers, RU; Lunau, S; Krasomil, K. 1998. Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium complex *Heterorhynchus megidis/Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol*. 43: 77-86.
- Eidt, DC; Thurston, GS. 1995. Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wire worms (Coleoptera: Elateridae) and other soil insects. *Can. Entomol.* 127:423-429.
- Fischer, LE; Saux, M; Viallard, V; Borne, B. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. tumescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhursii* subsp. nov., *P. tumescens* subsp. *laionondii* subsp. nov., *P. temperatasp.* nov., *P. temperate* subsp. *temperate* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1645-1656.
- Forst, S; Clarke, D. 2002. Bacteria nematode symbiosis. In: Gaugler, R. Ed. Entomopathogenic Nematology. *Cabi Publishing*. Wallingford, UK: 57-77.
- Friedman, MJ. 1990. Commercial production and development. In: Gaugler, R; Kaya, HK. Eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. *CRC Press* Boca Raton, FL: 153-172.
- Gaugler, R; Brown, I; Shapiro-Ilan, D. 2002. Automated technology for in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. *Biol. Control* 24: 199-206.
- Gaugler, R; Grewal, P; Kaya, HK. 2000. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. *Biol. Control*. 17: 100-109.
- Gaugler, R; Han, R. 2002. Production technology. In Gaugler, R. Ed. Entomopathogenic Nematology. *Cabi Publishing*. Wallingford, UK: 289-320.
- Gaugler, R; Lewis, E; Stuart, RJ. 1997. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*. 109: 483-489.
- Gaugler, R; Wang, Y; Campbell, JF. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. *J. Invertebr. Pathol* 64: 193-199.
- Georgia, R; Manweiler, SS. 1994. Entomopathogenic Nematodes: a developing biological control technology. *Agri. Zool. Rev.* 6:63-94.
- Georgis, R; Kaya, HK. 1998. Formulation of entomopathogenic nematodes. In: Burges, H.D. Ed. Formulation of microbial Biopesticides. Beneficial Microorganisms. Nematodes and Seed Treatments. *Kluwer*. Dordrecht. *The Netherlands*: 289-308.
- Georgis, R; Kaya, HK; Gaugler, R. 1991. Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and heterorhabditidae) on non-target arthropods. *Environ. Entomol.* 20:815-822.
- Georgis, R; Dunlop, DB; Grewal, PS. 1995. Formulation of entomopathogenic nematodes. In: Hall, FR; Barry, JW. Eds. Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. Washington, D.C; ACS Symposium Series No 595. *American Chemical Society*: 197-205.
- Grewal, PS. 2000. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Internat. J. Parasitol.* 30: 995-1000.
- Grewal, PS. 2002. Formulation and application technology. In: Gaugler, R. Ed. Entomopathogenic Nematology. *Cabi Publishing*. Wallingford, UK: 265-287.
- Grewal, PS; Georgis, R. 1998. Entomopathogenic nematodes. In: Hall, FR; Men, J. Eds. Methods in Biotechnology. Vol 5 Biopesticides: Use and delivery. *Humana Press*. Totowa, N.J: 271-299.
- Griffin, CT; O'Callaghan, KM; Drx, I. 2001. A self-fertile species of *Paratrichodius* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes. *Parasitology*. 122: 181-186.
- Hazir, S; Keskin, N; Stock, SP. 2003a. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae

- and Heterorhabditidae) in Turkey. *Biodiversity Conseu.* 12: 375-386.
- Hazir, S; Stackebrandt, E; Lang, E. 2005. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus Iwninescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus Iwninescens* subsp. *thraciensis* subsp. nov. *Appl. Syst. Microbio* 40: 895-910.
- Hominick, WM. 2002. Biogeography. In: Gaugler, R. Ed. *Entomopathogenic Nematology*. Cabi Publishing. Wallingford, UK: 115-143.
- Ishibashi, N. 1993. Integrated control of insect pests by *Steinemema carpocapsae*. In: Bedding, R; Akhurst, R; Kaya, HK. Eds. *Nematodes and the Biological Control of Insects*. CSRIO Publications. East Melbourne (Australia): 105-113.
- Jackson, TJ; Wang, H; Nugent, MT. 1995. Isolation of insect pathogenic bacteria. *Providencia rettgeri* from *Heterorhabditis* spp. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 237-244.
- Kaya, HK. 1990. Soil ecology. In: Gaugler, R; Kaya, HK. Eds. *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton, FL: 93-115.
- Kaya, HK. 1993. Entomogenous and entomopathogenic nematodes in biological control. In: Evans, K. Trudgill, DL; Wester, JM, Eds. *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. CAB International Wallingford. UK: 565-591.
- Kaya, HK; Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Ann. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Kaya, HK; Stock, SP. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L. Ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, CA: 281-324.
- Klein, MG. 1990. Efficacy against soli-inhabiting insect pests. In: Gaugler, R; Kaya, HK. Ed. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton, FL: 195-214.
- Klein, MG. 1993. Biological control of scarabs with entomopathogenic nematodes. In: Bedding, R; Akhurst, R; Kaya, HK. Eds. *Nematodes and the Biological Control of insects*. CSRIO Publications. East Melbourne (Australia): 49-57.
- Koppenhofer, AM. 2000. Nematodes. In: Lacey, LA; Kaya, HK. Eds. *Field Manual of Techniques in invertebrate Pathology*. Kluwer. Dordrecht. *The Netherlands*: 283-301.
- Koppenhofer, AM; Brown, IM; Gaugler, R. 2000a. Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes: greenhouse and field evaluation. *Biol. Control* 19: 245-251.
- Koppenhofer, AM; Grewal, PS; Kaya, HK. 2000b. Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: the mechanism. *Entomol. Exp. Appl.* 94: 283-293.
- Lacey, LA; Unruth, TR; Headrick, HL. 2003. Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 83: 230-239.
- Lewis, EE. 2002. Behavioural ecology. In: Gaugler, R. Ed. *Entomopathogenic Nematology*. Cabi Publishing. Wallingford. UK: 205-223.
- Lysenko, O; Weiser, J. 1974. Bacteria associated with the nematode *Neoaplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *J. invertebr. Pathol.* 24: 332-336.
- Mamiya, Y. 1989. Comparison of infectivity of *Steinernema kushidai* (nematode: Steinernematidae) and other stinernematid and heterorhabditid nematodes for three different insects. *Appl. Entomol. Zool.* 24: 302-308.
- Martens, EC; Heungens, K; Goodrich, BH. 2003. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinemema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *J. Bacteriol* 185: 3147-3154.
- Nishimatsu, T; Jackson, J. 1998. Interaction of insecticides entomopathogenic nematodes and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol* 91: 410-418.
- Ozer, N; Keskin, N; Kirbas, Z. 1995. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey. *Nematologica*. 41: 639-640.
- Peters, A. 1996. The natural host range of *Steinemema* and *Heterorhabditis* spp and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol* 6: 389-402.
- Peters, A; Ehlers, RU. 1994. Susceptibility of leatherjackets [*Tipula paludosa* and *T. oleracea*: Tipulidae: Nematocera] to the entomopathogenic nematode *Steinemema feltiae*. *J. Invertebr. Pathol* 63: 163-171.
- Poinar, GO. 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica*. 12: 105-108.
- Richardson, PN. 1996. British and European legislation regulating rhabditid nematodes. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 449-463.
- Rizvi, SA.; Hennessey, R; Knott, D. 1996. Legislation on the introduction of exotic nematodes in the US. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 477-480.
- Rosenheim, JA; Kaya, HK; Ehler, LE. 1995. Intragut predation among biological-control agents: theory and practice. *Biol. Control.* 5: 303-335.
- Rovesti, L; Deseo, KV. 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes. *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S.feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*. 36: 237-245.

- Sáenz, A. 1998. *Biología y patogenicidad de Steinernema feltiae cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae)*. Memorias seminario Perspectivas sobre Nematodos Fitopatógenos y Eniromopatógenos en Colombia. Comité Regional de Cundinamarca de la Sociedad Colombiana de Entomología. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. Junio 12 de 1998.
- Sáenz, A. 1999a. *Actualidad y perspectivas de Steinernema feltiae en el altiplano cundiboyasense*. Memorias seminario Nematodos Entomopatógenos. Línea de investigación en nematodos entomopatógenos. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. Septiembre 25: 19-21.
- Sáenz, A. 1999b. Evaluación de procedimientos para el aislamiento y almacenamiento del entomoneemátodo nativo *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 25(3-4):209-215.
- Sáenz, A. 1999c. *Introducción al estudio de nematodos entomopatógenos. Manual I* Curso nematodos entomopatógenos. Línea de investigación en nematodos entomopatógenos. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. Septiembre 20-25: 120.
- Sáenz, A. 1999d. *Los nematodos entomopatógenos: una alternativa del control biológico*. Memorias: Los insectos patrimonio natural y cultural de Colombia. XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Socolen. Santa Fe de Bogotá, DC. 28-30 julio: 82-97.
- Sáenz, AA. 2000a. Ciclo de vida del nematodo entomopatógeno nativo *Steinernema feltiae*. *Agronomía Colombiana*. 21 (1-2): 48-53
- Sáenz, AA. 2000b. Cultivo *in vivo* y almacenamiento de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Agronomía Colombiana*. 21 (1-2): 59-64.
- Sáenz, AA. 2003. Eficacia de invasión del nematodo nativo *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Revista del CATIE (Costa Rica). Manejo de plagas y agroecología*. (67): 2003.
- Sáenz, AA. 2004. *El mundo taxonómico de los nematodos entomopatógenos*. Simposio de nematodos entomopatógenos. Memorias XXXI Congreso nacional de entomología. Sociedad Colombiana de Entomología: 197-201.
- Sáenz, A; Luque, J. 1998. *Uso de Steinernematidae sobre Tecia solanivora (Povolny)*. Conclusiones y memorias del Taller Planeación estratégica para el manejo de *Tecia solanivora* en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Instituto de Biotecnología. Fedepapa. Iica. Julio 22-24: 45.
- Sáenz, A; Luque, J. 1999. *Cuantificación invasiva de Steinernema feltiae cepa Villapinzón en Tecia solanivora y Clavipalpus ursinus*. Resúmenes: Los insectos patrimonio natural y cultural de Colombia. XXVI Congreso nacional de entomología. Socolen. Julio 28-30: 152.
- Shapiro-Ilan, D; Lewis, EE; Tedders, WL. 2003. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. *J. Invertebr. Pathol.* 83: 270-272.
- Sher, RB; Parrella, MP; Kaya, HK. 2000. Biological control of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Burgess): Implications for Intraguild predation between *Diglyphus begini* Ashmead and *Steinernema carpocapsae* Weiser. *Biol. Control*. 17: 155-163.
- Simoes, N; Rosa, JS. 1996. Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci Technol* 6: 403-411.
- Stock, SP; Koppenhofer, AM. 2003. *Steinernema scarabaeirx*, sp (Rhabditida: Steinernematidae). A natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) from New Jersey. *Nematology*. 5: 191-204.
- Stock, SP; Iijima, DJ. 2004. Nematode morphology and systematics. In: Grewal, P; Ehlers, R; Shapiro-Ilan. Eds. Nematodes as Biocontrol Agents. *Cabi Publishing*. Wallingford. UK.
- Strauch, O; Ehlers, RU. 1998. Food signal production of *Phorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 369-374.
- Susurluk, A; Dix, I; Stackebrandt, E. 2001. Identification and ecological characterization of three entomopathogenic nematode-bacterium complexes from Turkey. *Nematology*. 3: 833-841.
- Tanada, Y; Kaya, HK. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego. CA: 45-68
- Vivas, EL; Goodrich-Blair, H. 2001. *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host-bacterium interactions: is necessary for mutualism with nematodes. *J. Bacteriol.* 183:4687-4693.
- Wang, Y; Campbell, JF; Gaugler, R. 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 66: 178-184.
- Wang, Y; Gaugler, R. 1998. *Steinernema glaseri* surface coat protein suppresses the immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Biol. Control*. 14: 45-50.
- Yang, H; Zhang, G; Zhang, S. 1993. Biological control of tree bores (Lepidoptera: Cossidae) in China with the nematode *Steinernema carpocapsae*. In: Badding, R; Akhurst, R; Kaya, HK. Eds. Nematodes and the Biological Control of insects. *CSIRO Publications*. East Melbourne (Australia): 33-40.