

**Producción semisólida y almacenamiento del
nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis
bacteriophora*: Revisión de Literatura**

Andrea Estefanía Guambi Parra

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Producción semisólida y almacenamiento del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*: Revisión de Literatura

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Andrea Estefanía Guambi Parra

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Producción semisólida y almacenamiento del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*: Revisión de Literatura

Presentado por:

Andrea Estefanía Guambi Parra

Aprobado:



R. Trabanino (Nov 9, 2020 14:22 CST)

Rogelio Trabanino, M.Sc.
Asesor Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Julio López, M.Sc.
Asesor



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano Académico



Mcocom (Nov 11, 2020 13:20 CST)

Miguel Cocom, Ing Agr.
Asesor

Producción semisólida y almacenamiento del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*: Revisión de Literatura

Andrea Estefanía Guambi Parra

Resumen. Los productos comerciales a base de nemátodos entomopatógenos han evolucionado como una alternativa ecológica para el manejo integrado de plagas, debido a que no contaminan el ambiente ni provocan problemas de salud a los humanos. En el laboratorio de control biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; se producen nemátodos entomopatógenos de la especie *Heterorhabditis bacteriophora*. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue describir algunos métodos de producción masiva de *H. bacteriophora* más importantes que puedan ser implementados en la institución para incrementar los rendimientos de producción y mejorar las estrategias de almacenamiento. Se revisó literatura científica para describir procesos, ventajas y desventajas de los métodos de producción *in vivo*, cultivo *in vitro* en medio líquido y cultivo *in vitro* en medio semisólido. *Heterorhabditis bacteriophora* se propaga tradicionalmente en Zamorano, por métodos de producción *in vivo*; sin embargo, en los últimos años se ha tratado de desarrollar protocolos de propagación *in vitro* utilizando medios monoxénicos líquidos y semisólidos, con el objetivo de obtener mayores rendimientos. Este estudio muestra una revisión literaria detallada varios procesos de producción y almacenamiento del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* utilizando un cultivo monoxénico semisólido.

Palabras clave: Bioinsecticidas, producción masiva, cultivo *in vitro*.

Abstract. Commercial products based on entomopathogenic nematodes have evolved as an ecological alternative for integrated pest management, because they do not pollute the environment or cause health problems for humans. Entomopathogenic nematodes of the species *Heterorhabditis bacteriophora* are produced in the biological control laboratory of the Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Therefore, the purpose of this research was to describe some of the most important mass production methods of *H. bacteriophora* that can be implemented in the institution to increase production yields and improve storage strategies. Scientific literature was reviewed to describe processes, advantages and disadvantages of *in vivo* production methods, *in vitro* culture in liquid medium and *in vitro* culture in semi-solid medium. *Heterorhabditis bacteriophora* is traditionally spread in Zamorano, by *in vivo* production methods; however, in recent years an attempt has been made to develop *in vitro* propagation protocols using liquid and semisolid monoxenic media, with the objective of obtaining higher yields. This study shows a detailed literary review of the production and storage process of the entomopathogenic nematode *H. bacteriophora* using a semisolid monoxenic medium.

Key words: Bioinsecticides, mass production, *in vitro* culture.

ÍNDICE GENERAL

Portada.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. CAPÍTULO I: DESCRIPCIÓN DEL NEMÁTODO.....	3
3. CAPÍTULO II: METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE NEP.....	9
4. CAPÍTULO III: FORMULACIÓN Y ALMACENAMIENTO.....	18
5. CAPÍTULO IV: APLICACIÓN EN CAMPO.....	20
6. CONCLUSIONES.....	21
7. RECOMENDACIONES.....	22
8. LITERATURA CITADA	23

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Taxonomía de la bacteria <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	3
2. Taxonomía de la bacteria <i>Photorhabdus luminescens</i>	4
3. Plagas de importancia agrícola y pecuaria controladas con <i>H. bacteriophora</i>	8
4. Medios para la producción de nemátodos entomopatógenos.....	11
5. Efecto de la suplementación con carbohidratos sobre la producción de nemátodos.....	13
6. Rendimiento de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> en el proceso de producción semisólido.....	16
7. Comparación entre los métodos de producción <i>in vivo</i> , cultivo monoxénico semisólido y cultivo monoxénico líquido.....	17
8. Formulaciones importantes con <i>H. bacteriophora</i>	19

Figuras	Página
1. Localización de la bacteria <i>Photorhabdus luminescens</i>	4
2. Modelo para <i>Photorhabdus luminescens</i> cambiando de fases de vida	5
3. Ciclo de vida del nemátodo <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	6
4. Estados de desarrollo de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	7
5. Trampas White empleadas para la producción de nemátodos entomopatógenos <i>in vivo</i>	9
6. Máquina para seleccionar larvas.....	10
7. Efecto de la concentración lipídica (Aceite de canola: oliva) sobre la producción de IJ de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	12
8. Flujograma para la producción de NEP's en cultivos semisólidos	14
9. Cultivo semisólido de nemátodos entomopatógenos.....	15
10. Formulación de nemátodos entomopatógenos.....	18

1. INTRODUCCIÓN

Los pesticidas se han utilizado desde tiempos remotos para el control eficiente de plagas, malezas y enfermedades que afectan el rendimiento de productos agropecuarios. Su uso indiscriminado ha creado preocupaciones con respecto a la contaminación de aguas subterráneas, bioacumulación de metales pesados en la cadena trófica, residualidad de plaguicidas en alimentos y riesgos de trastornos notables en la salud humana. En respuesta a estas controversias han surgido alternativas más seguras para la producción, entre ellas se encuentra el control biológico. Una alternativa ecológica que se define como la introducción artificial de microorganismos antagonistas en un ecosistema determinado para el control de plagas artrópodos (Rubio y Fereres 2011), sin generar contaminación ambiental, molestia animal o intoxicaciones humanas durante la aplicación.

El control biológico busca aprovechar insectos, hongos, bacterias, virus y nemátodos en el manejo integrado de plagas. Los nemátodos son animales de vida libre no segmentados y parásitos de plantas; sin embargo, existe un grupo entomofílico conocido como nemátodos entomopatógenos (NEP's). Este grupo está constituido por siete familias (Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerulariidae, Rhabditidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae). Dentro de éstas las más importantes son: Steinernematidae y Heterorhabditidae (Lacey y Kaya 2007), que se caracterizan por tener alta virulencia debido a su relación simbiótica con las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente (Vashisth *et al.* 2012; Sharma *et al.* 2011).

Los nemátodos entomopatógenos (NEP's) y su bacteria simbiote son altamente demandados en el mercado agrícola puesto que se adaptan fácilmente a condiciones adversas, poseen alta capacidad de mortalidad y combaten plagas artrópodos de los órdenes Coleóptera, Lepidóptera, Díptera e Ixodida (Monteiro *et al.* 2010; Amador *et al.* 2015). Existen cuatro métodos desarrollados para la producción de NEP's: (1) producción *in vivo*, (2) cultivos monoxénicos semisólidos con espumas de poliuretano, (3) cultivos monoxénicos solidificados con agar y (4) cultivos *in vitro* en medio líquido, cada uno con ventajas y desventajas que dependen del costo de producción, conocimientos técnicos, economía de escala y calidad de producto (Shapiro *et al.* 2012). La producción *in vitro* en medio líquido es la tecnología más eficiente y barata para la producción de nemátodos a gran escala. Sin embargo, la falta de información ha restringido su uso en la agricultura.

En vista de lo anterior, el cultivo monoxénico semisólido embebido en espumas de poliuretano constituye el método más prometedor, ya que ocupa el segundo lugar en producción de NEP's a escala industrial. Este método se conoce también como Bedding (1981) en honor a su creador, quien estableció la producción de aproximadamente 30 a 50 millones de infectivos juveniles (IJ) en un frasco de 500 mL con 80 g de medio de vísceras de pollo.

Con respecto a la metodología, Tabassum y Shahina (2004) evaluaron la producción semisólida de cuatro especies de NEP's bajo un mismo proceso y determinaron que los rendimientos dependen de la especie a propagar. En base a lo argumentado, se establece la importancia de investigar y mejorar protocolos de propagación para las especies comerciales: *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema kraussei*, *Steinernema glaseri*, *Steinernema riobrave*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis megidis* (Abate *et al.* 2017).

En el laboratorio de control biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; se producen nemátodos entomopatógenos de la especie *Heterorhabditis bacteriophora*, bajo los lineamientos de producción *in vivo*. Por lo tanto, este estudio busca describir opciones de producción *in vitro* que puedan ser implementadas en la institución para incrementar la producción de nemátodos, al igual que, un método de almacenamiento eficiente durante un periodo prolongado.

Los objetivos de la presente investigación fueron:

- Investigar y describir los procesos de producción *in vivo*, cultivos monoxénicos líquidos y cultivos semisólidos del nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora*.
- Determinar los factores que limitan y potencializan la producción de nemátodos entomopatógenos en cultivos semisólidos *in vitro*.
- Investigar y describir un proceso de almacenamiento que proporcione una vida anaquel prolongada a los nemátodos cosechados.

2. CAPÍTULO I: DESCRIPCIÓN DEL NEMÁTODO

Nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*

Heterorhabditis bacteriophora fue descrito por Poinar en 1975 (Cuadro 1) como un patógeno obligado de la familia Heterorhabditidae. Pertenece al grupo de nemátodos entomopatógenos porque posee reproducción masiva, especificidad, alto rango de hospederos, habilidad para ingresar en el huésped y destreza para liberar a la bacteria simbiote (Merino y France 2009). La reproducción masiva se debe a que durante su ciclo de vida adulto desarrolla dos generaciones: hermafroditas en la primera y anfimícticos diferenciados en la segunda (Han y Ehlers 2000).

Cuadro 1. Taxonomía de la bacteria *Heterorhabditis bacteriophora*.

Nemátodo	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
Filo	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Rhabditida
Familia	Heterorhabditidae
Género	<i>Heterorhabditis</i>
Especie	<i>bacteriophora</i>

Fuente: Arctos 2018.

El mecanismo de acción de *H. bacteriophora* se basa en la relación simbiótica que posee con *Photorhabdus luminescens*. El nemátodo ingresa al hemocele del insecto y libera la bacteria simbiote que se encarga de emitir toxinas letales para el hospedero y al mismo tiempo, producir subproductos que proveen al nemátodo un ambiente adecuado para su desarrollo (Boemare 2002; Imhoff 2005). Asimismo, los resultados de varios experimentos demostraron que cuando un insecto es atacado por *H. bacteriophora*, los cadáveres cambian a un color rojo ladrillo (Sánchez y Rodríguez 2007), como respuesta a la posible presencia de antraquinonas y estilbenos producidos por la bacteria simbiote (Gutierrez *et al.* 2017).

Bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens*

Photorhabdus luminescens es una bacteria gram negativa bioluminiscente que pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Gerdes *et al.* 2015). Su principal rasgo es la capacidad de generar una relación simbiótica con el nemátodo *H. bacteriophora* y una relación de patogenicidad con el hospedero, que en su mayoría es un insecto en estado de larva. Además, las cepas de *P. luminescens* se caracterizan por ser negativas para la reducción de nitratos, positivas para los pigmentos de tipo antraquinona (Machado *et al.* 2018; Gutierrez *et al.* 2017) y positivo para bioluminiscencia, debido a la presencia del gen de luciferasa (*luxA*) (Wimpee *et al.* 1991).

Cuadro 2. Taxonomía de la bacteria *Photorhabdus luminescens*.

Bacteria	<i>Photorhabdus luminescens</i>
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Photorhabdus</i>
Especie	<i>luminescens</i>

Fuente: ITIS 2018.

Cuando la bacteria simbiote se encuentra en el intestino del nemátodo (Figura 1A) posee fimbrias maternas que interaccionan con las células del epitelio intestinal de *H. bacteriophora*; por lo que se le denomina forma M (mutualista). Sin embargo, en cuanto *P. luminescens* ingresa al hemocele del insecto (Figura 1B), cambia a la forma P (patógena) (Stock y Goodrich 2008). Según Somvanshi *et al.* (2012) la transformación de la bacteria se debe a la trascricpción de un madswitch que diferencia la fase simbiótica y patógena. Además, los autores descubrieron que para encender el interruptor y dar paso a la producción de fimbrias se requiere la invertasa MadO (inhibidora de la invertasa MadR) (Figura 2).

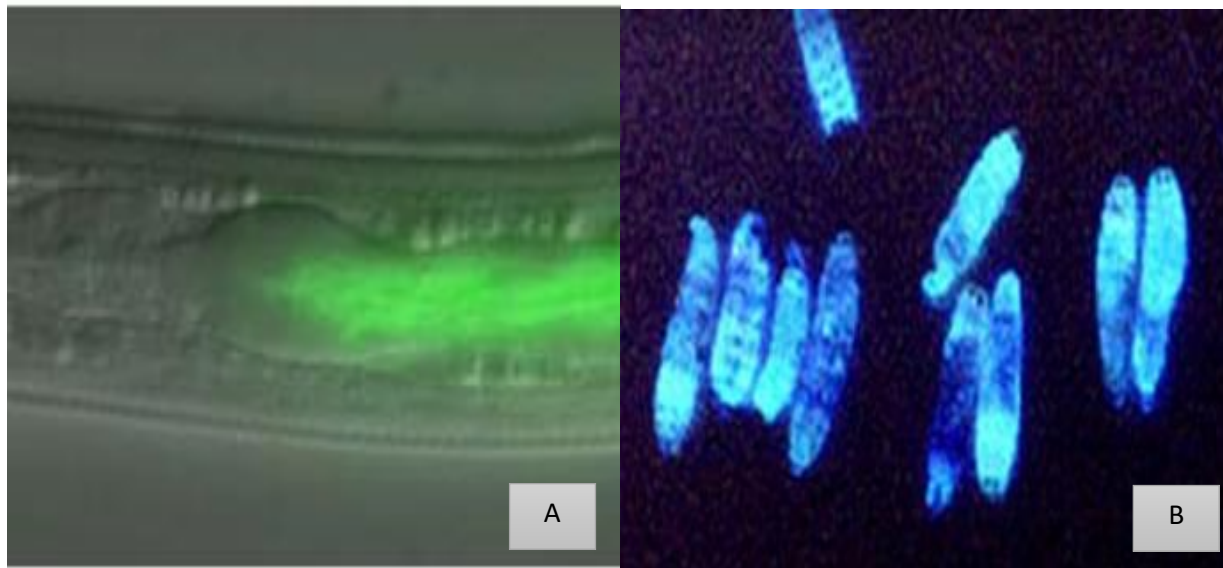


Figura 1. Localización de la bacteria *Photorhabdus luminescens*. A) *P. luminescens* dentro del nemátodo entomopatógeno. B) Cadáveres infectados con *P. luminescens*.

Fuente: Ciche *et al.* 2006.

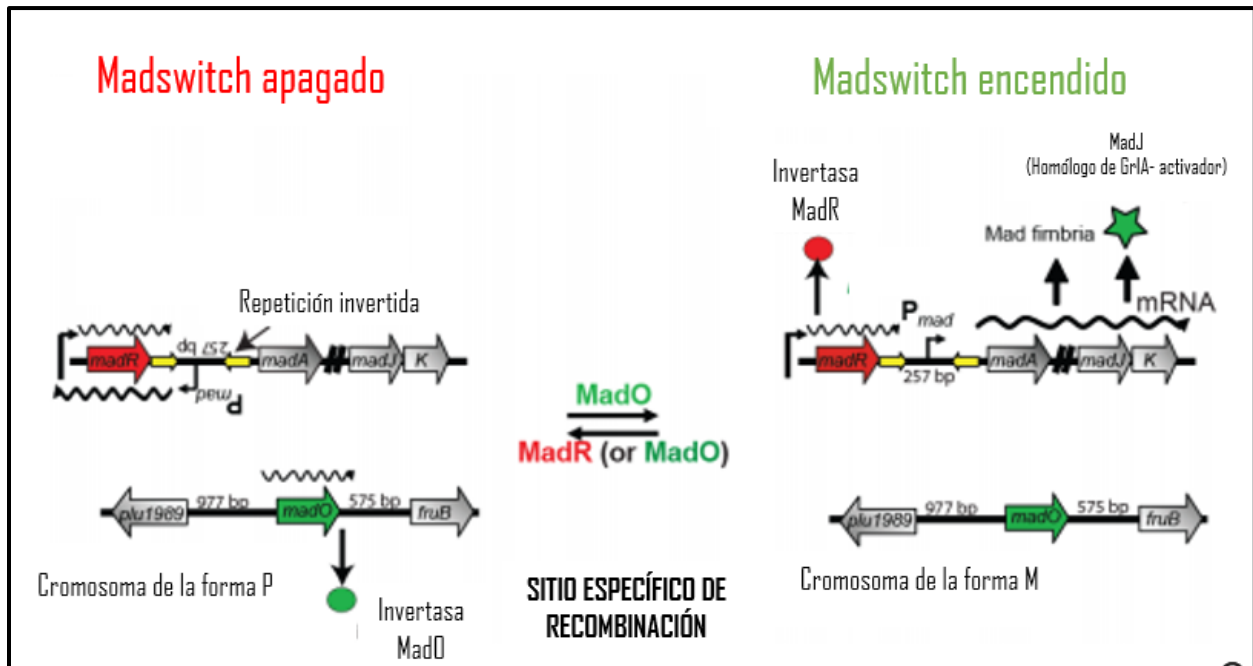


Figura 2. Modelo para *Photobacterium luminescens* cambiando de fases de vida.
Fuente: Somvanshi *et al.* 2012.

Durante la fase patógena, los cromosomas de la bacteria tienen islas patógenas que estimulan la producción de toxinas, enzimas y antibióticos (Rodou *et al.* 2010). Las toxinas secretadas por *P. luminescens* sirven para ejecutar al insecto hospedero; mientras que la síntesis de enzimas ayuda a la transformación del cadáver del insecto en nutrientes o aminoácidos beneficiosos para el desarrollo del nemátodo y la producción de metabolitos antimicrobianos derivados de estilbenos, antraquinonas y bencenos que alejan bacterias competidoras del hospedero (Forst y Clarke 2002; Marokhazi *et al.* 2003; Ullah *et al.* 2015). Las toxinas se clasifican en cuatro grandes grupos: (1) el complejo de toxinas (Tc), (2) las que hacen que las orugas sean flojas (Mcf), (3) *Photobacterium* relacionado con las proteínas del insecto (Pir) y (4) los “cassettes” de virulencia *Photobacterium* y lipasas (Pvc) (Gerdes *et al.* 2015).

El complejo de toxinas (Tc) agrupa las unidades TcA, TcB y TcC; sin embargo, Lang *et al.* (2010) en su artículo manifestaron que la actividad biológica se encuentra en los componentes TccC3 y TccC5, puesto que son los encargados de inhibir las reacciones de defensa o fagocitosis en las células de insectos. Por otra parte, estudios realizados por Dowling *et al.* (2004) revelaron que las toxinas Mcf hacen que las células se enfrenten a un patrón morfológico, llamado apoptosis. Este patrón ocurre entre 6 a 12 horas después de la infección y es estimulado por el desprendimiento del epitelio del intestino medio del insecto, junto con la formación de ampollas destructivas en los hemocitos (Gerdes *et al.* 2015; Dowling *et al.* 2004). Un dato interesante es que las toxinas Pir codificadas para PirA y PirB, son proteínas binarias con compuestos similares a las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que perforan el tracto digestivo (Rodou *et al.* 2010). Finalmente, Forst y Clarke (2002) determinaron que las toxinas Pvc se refieren a loci destructores de hemocitos; además, descubrieron que la clonación secundaria del gen lipasa lip-1 en *P. luminescens* secreta una forma inactiva con capacidad entomotóxica Enterobacteriacea (Gerdes *et al.* 2015).

Biología de la familia Heterorhabditidae

El ciclo de vida de *H. bacteriophora* se divide en cuatro etapas (Figura 3). Dentro de ellas se describen siete estados de desarrollo: huevo, cuatro estados juveniles separados por mudas (J1, J2, J3, J4), adultos hermafroditas y adultos anfimícticos (Figura 2) (Sáenz y López 2011).

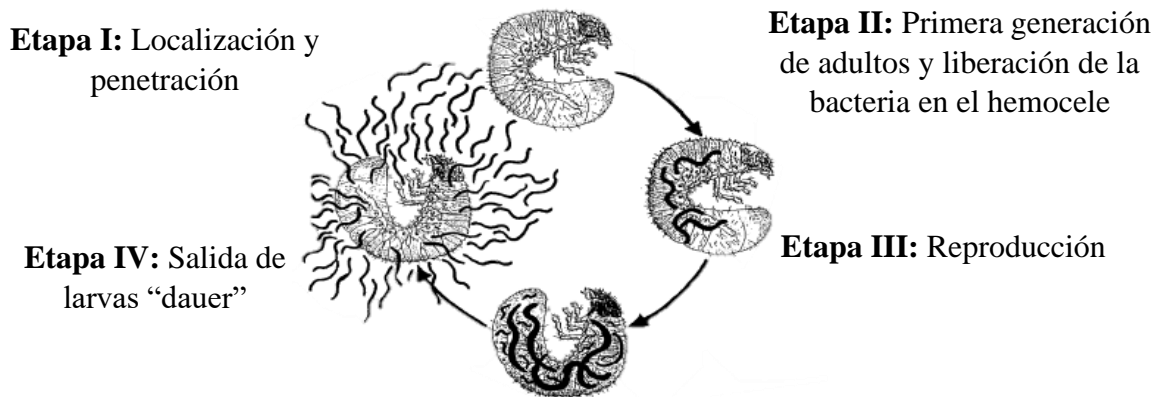


Figura 3. Ciclo de vida del nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora*
Fuente: Ehlers 2001.

Huevos. *Heterorhabditis bacteriophora* se llena de huevos transparentes y ovaes que descienden dentro del útero para ser fertilizados por el esperma del receptaculum seminis. Después de 4 días los huevos fertilizados alcanzan la madurez y son desplazados a aberturas cercanas de la vulva, para su emergencia en la hemolinfa (Sáenz y López 2011).

Etapas juveniles. La mayoría de nemátodos del primer estado juvenil (J1) son depositados en el hemocele del insecto, pero algunos se desarrollan dentro de los adultos hermafroditas por un fenómeno denominado endotoquia matricial (Lordello 1951). Viven aproximadamente 10 horas (Johnigk y Ehlers, 1999) y después del tiempo establecido mudan al segundo estado juvenil (J2); caracterizado por cuerpos delgados y un anillo muy poco distinguido en la región cefálica de la cutícula (García 1994).

Después de 6 días los J2 se convierten en larvas dauer (J3). La larva dauer se diferencia de los otros estados porque tiene anillado todo el cuerpo y conserva en la parte cefálica una estructura cuticular en forma de diente (García 1994). En una investigación Forst y Clarke (2002) manifestaron que los nemátodos J3 desactivan el complejo boca-ano (probablemente para evitar la pérdida de bacterias simbiotas y agua) y salen del hospedero en busca de otro insecto (Forst y Clarke 2002; García 2006; Merino y France 2009). Varios autores indican que existen dos ciclos de vida para *Heterorhabditis bacteriophora*. El primero es el ciclo de vida corto y corresponde a los nemátodos que salen del insecto a los 6 días; mientras que algunos permanecen en el huésped y continúan con el ciclo de vida largo, para salir a las 278 horas (Sáenz y López 2011; Sáenz y Luque 2000; Ciche *et al.* 2006). Las larvas en estado J3 pueden sobrevivir largos periodos en el suelo; sin embargo, en la hemolinfa del insecto encuentran condiciones óptimas para su

reproducción (Merino y France 2009; Han y Ehlers 2000). Por esta razón, al ingresar al huésped expulsan las bacterias simbiotas y continúan con el desarrollo de la cuarta etapa juvenil, que dura alrededor de 3 días (Johnigk y Ehlers 1999).

Adultos. *Heterorhabditis bacteriophora* desarrolla dos generaciones en el insecto: hermafroditas en la primera y anfimícticos en la segunda. Los nemátodos anfimícticos son adultos machos y hembras bien diferenciados que se producen en el ciclo de vida largo. Los J4 mudan a la primera generación de adultos hermafroditas jóvenes y después de 22 horas maduran. Los adultos hermafroditas se caracterizan por tener una vulva con forma de hendidura en la parte media del cuerpo, junto con ovotestículos anfídélicos. A diferencia de las hembras anfimícticas que son pequeñas, poseen ovarios opuestos y una vulva ineficaz para guardar huevos (Sáenz y López 2011). Por otro lado, los machos anfimícticos presentan un testículo retroflexo, espículas pares y una bursa abierta con nueve pares de costillas (Figura 4) (García 1994).



Figura 4. Estados de desarrollo de *Heterorhabditis bacteriophora*. A) Desplazamiento del huevo al útero, B) Maduración del huevo, C) Estado juvenil J1, D) Estado juvenil J2, E) Estado juvenil J3 o Larva Dauer, F) Estado juvenil J4, G) Adulto hembra, H) Adulto macho.

Fuente: Sáenz y López 2011.

Asociación mutualista nemátodo-bacteria

El rol más importante durante la asociación mutualista de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Photorhabdus luminescens*, es el desempeño de la larva dauer como vector de la bacteria. Al principio los nemátodos digieren activamente a las bacterias simbioses como fuente de alimento y las almacenan en el lumen del intestino hasta que son liberadas en el hemocele de un insecto huésped mediante un proceso de regurgitación. Estudios realizados por Ciche y Ensign (2003) revelaron que la reacción de regurgitación se basa principalmente en la presencia de compuestos aniónicos de bajo peso molecular en la hemolinfa de los artrópodos.

Las bacterias liberan un complejo de cuatro toxinas que actúan directamente en el epitelio intestinal del hospedero, interrumpiendo la alimentación y provocando su muerte entre las 24-48 horas. Al mismo tiempo, producen estilbenos que debilitan al insecto e inhiben la producción de fenoloxidasas; el cual es un sistema de defensa que melaniza microorganismos invasores y tejidos dañados (Joyce *et al.* 2008).

Una vez muerto el huésped inicia la liberación de enzimas y proteínas de inclusión cristalinas (Cips) ricas en aminoácidos esenciales que actúan como señales químicas y son importantes para el crecimiento y reproducción de los nemátodos (Somvanshi *et al.* 2012). Varios autores mencionan que la producción de antibióticos por parte de la bacteria simbiote impide el ingreso de microorganismos saprófitos al cadáver (Forst y Clarke 2002). Además, Fenton (2010) señala que una de las principales ventajas en esta relación mutualista es la coloración rojo ladrillo inducida al hospedero, porque genera aversión de consumo en los depredadores. La relación mutualista muestra gran potencial como agente de control biológico debido que *Photorhabdus luminescens* es altamente patógena a varias especies (Cuadro 3).

Cuadro 3. Plagas de importancia agrícola y pecuaria controladas con la familia de nemátodos *Heterorhabditis bacteriophora*.

Nombre común	Nombre científico
Gallina ciega y otros gusanos blancos comunes	<i>Phyllophaga</i> spp, <i>Phyllopertha horticola</i> , <i>Amphimallon solstitialis</i> , <i>Hoplia philanthus</i> .
Picudo del banano	<i>Cosmopolites sordidus</i>
Gusano blanco de dunas	<i>Anomala dubia</i>
Larvas jóvenes de los coleópteros	<i>Melolontha melolonta</i> , <i>Amphimallon</i> <i>aestivus</i> , <i>Anoxia villosa</i>
Escarabajos peloteros	<i>Aphodius</i> spp
Mosca blanca	<i>Bemisia tabaci</i>
Garrapatas	<i>Boophilus microplus</i>

Fuente: Monteiro *et al.* 2010; Amador *et al.* 2015.

3. CAPÍTULO II: METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE NEP'S

Los métodos de producción masiva de nemátodos entomopatógenos (NEP's) se pueden clasificar en tres grandes grupos: producción *in vivo*, cultivos monoxénicos semisólidos y cultivos monoxénicos líquidos. Considerando que el término monoxénico se refiere a la producción de *H. bacteriophora* en presencia de *P. luminescens*.

Producción *in vivo*

El método de producción *in vivo* es la única herramienta biotecnológica que maneja insectos vivos como medio nutritivo para la reproducción de nemátodos entomopatógenos. El insecto comúnmente utilizado en laboratorios es *Galleria mellonella*; no obstante, algunas larvas alternativas son *Tenebrio molitor* y *Spodoptera litura* (Prabowo *et al.* 2019).

Por lo general, para la producción de *Heterorhabditis bacteriophora* se emplean cámaras de inoculación donde larvas de *Galleria mellonella* se infectan con una solución madre de nemátodos, siguiendo la técnica de inmersión o pipeteo. Estudios realizados por Shapiro *et al.* (2002) revelaron que la inmersión es cuatro veces más eficiente que el pipeteo en tiempo, pero no detectaron un efecto de la concentración del inóculo sobre el rendimiento. Después de la inoculación, los platos se almacenan en un cuarto oscuro a 24 °C y 80% de humedad relativa (Yoo *et al.* 2000; Ulug *et al.* 2015). Transcurridos 9 días, las larvas se desinfectan y se transfieren a trampas White modificadas, que según algunas referencias (con alguna variación) consisten en instalar platos Petri de vidrio con papel absorbente, dentro de una bandeja plástica con 100 mL de agua destilada estéril. El objetivo de estas trampas es producir la migración de los infectivos hacia el agua, para poder cosecharlos y almacenarlos en frascos semiabiertos a 12 °C (Gaugler *et al.* 2002).



Figura 5. Trampas White empleadas para la producción de nemátodos entomopatógenos *in vivo*. Fuente: Shapiro *et al.* 2016.

Un estudio realizado por Gaugler *et al.* (2002) reveló que la producción *in vivo* con larvas de *Tenebrio molitor* genera bajos niveles de producción, debido que la mayoría de infectivos juveniles mueren dentro de las larvas infectadas. Por esta razón, es importante emplear regímenes de acondicionamiento para asegurar el desarrollo completo de estadios infecciosos y nebulización durante la cosecha.

Los rendimientos de producción *in vivo* dependen de la calidad del hospedero. Esto se argumenta con el estudio realizado por Flanders *et al.* (1996), que tiene por objetivo analizar la producción total de nemátodos en relación con la tasa del inóculo y tamaño del huésped. Los resultados indicaron que cuando *G. mellonella* creció a 23.8 °C las larvas grandes produjeron 567.000 juveniles infecciosos por huésped, a partir de una tasa de inoculación de 1000; lo cual significó el doble de las producidas en larvas pequeñas. Además, concluyeron que el tiempo de emergencia fue de 17 días para larvas chicas y quince para larvas grandes.

Este aporte permitió el desarrollo de dietas mejoradas y aparatos de selección larval. Para *Tenebrio molitor*, se estableció una máquina constituida por un distribuidor vibratorio que separa a la larva según su peso (liviano, mediano y grande), un transportador y tres tubos repartidores (Shapiro *et al.* 2016).

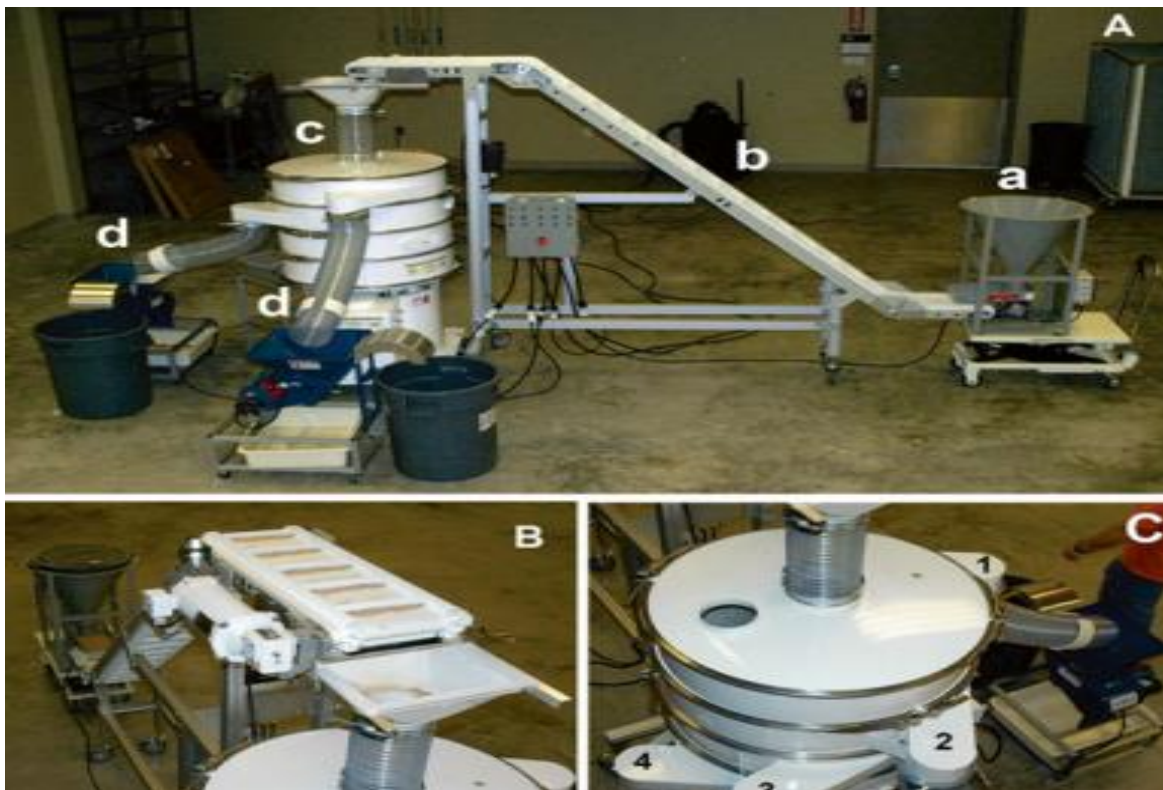


Figura 6. Máquina para seleccionar larvas. A) Distribuidor vibratorio, B) Transportador y C) Distribuidor de larvas.

Fuente: Shapiro *et al.* 2016.

Según Shapiro *et al.* (2016) las ventajas del método de producción *in vivo* es que no requiere conocimientos técnicos y produce infectivos juveniles de calidad. Por el contrario, varios autores mencionan que solo se utiliza con fines de investigación, ensayos de pequeña escala o producción comercial en microempresas, debido que su aplicación a escala industrial generaría costos extremadamente altos.

Cultivos monoxénicos líquidos

La producción de nemátodos entomopatógenos a través de este método inicia con el aislamiento de *H. bacteriophora* y *P. luminescens*, como describe Yoo *et al.* (2000). Para ello propagar el nemátodo en larvas de *Galleria mellonella* del quinto estadio (200 µL de IJ/larva), almacenar en un cuarto oscuro durante 9 días a 24 °C con 80% de humedad relativa (Ulug *et al.* 2015) y recolectar los IJ con trampas White modificadas, igual al proceso de producción *in vivo* ya mencionado.

Para aislar a la bacteria realizar una nueva infección de *G. mellonella* con 1 mL de solución madre de *H. bacteriophora*. Después de 7 días extraer a *P. luminescens* empleando la técnica del hemocele; con la ayuda de una aguja en forma de L trasladar la hemolinfa a 15 mL de medio NBTA (Nutrient bromothymol blue agar) e incubar a 28 °C durante 48 horas. Finalmente, colocar el inóculo bacterial en caldo de soya triptico, agregar glicerol y congelar alícuotas de 1 mL a -20 °C (Ulug *et al.* 2015; Yoo *et al.* 2000; Gil *et al.* 2002). Preparar el medio líquido (Cuadro 4), llevarlo a un pH de 7.0 y auto clavarlo por 25 minutos a 121 °C (Gil *et al.* 2002).

Cuadro 4. Medios para la producción de nemátodos entomopatógenos.

Medio I	Medio II	Medio III
Harina de soya en polvo (25 g), extracto de levadura (5 g), hidrolizado de lactoalbúmina (10 g), aceite de canola (25 g), colesterol (0.2 g), extracto de hígado (0.1 g), NaCl (4 g), CaCl ₂ (0.3 g), MgSO ₄ (0.2 g), KCl (0.3 g), agua destilada (1,000 mL)	Harina de soya (20 g), extracto de levadura (15 g), aceite de oliva (36 mL), NaCl (4 g), CaCl ₂ (0.15 g), MgSO ₄ (0.1 g), KCl (0.35 g), agua destilada (1,000 mL)	Aceite de maíz (40 g), extracto de levadura (23 g), yema de huevo (12.5 g), NaCl (5 g), agua destilada (1,000 mL)

Fuente: Yoo *et al.* 2000; Gil *et al.* 2002; Dunn *et al.* 2009; Leite *et al.* 2016.

El siguiente paso es preparar el inóculo de la bacteria. Preparar 40 mL del medio líquido TSB (Caldo soya tripticasa) e inocular la cepa crío conservada, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Incubar el matraz durante 24 horas a 25 °C y 200 rpm en una incubadora con agitación. Posteriormente, colocar 2 mL del inóculo de la bacteria en matraces de 250 mL que contienen el medio de producción preparado, luego incubar nuevamente por 48 horas bajo las mismas condiciones. Finalmente inocular una suspensión de nemátodos que contenga 4,000 – 6,000 IJ/mL de medio previamente desinfectado e incubar a 25 °C y 200 rpm por 168 horas (Yoo *et al.* 2000; Gil *et al.* 2002).

Yoo *et al.* (2000) analizaron el rendimiento de *H. bacteriophora* al utilizar varias fuentes de carbono en el cultivo líquido. Los autores concluyeron que los ácidos grasos mono- insaturados en altos niveles incrementan el rendimiento de los nemátodos (Figura 7), pero no influyen en la masa de células bacterianas. Sin embargo, Gil *et al.* (2002) determinaron que al utilizar un medio de cultivo basado en aceite de canola y glucosa se producen buenos resultados en cuanto al rendimiento de infectivos juveniles y densidad bacteriana (Cuadro 5).

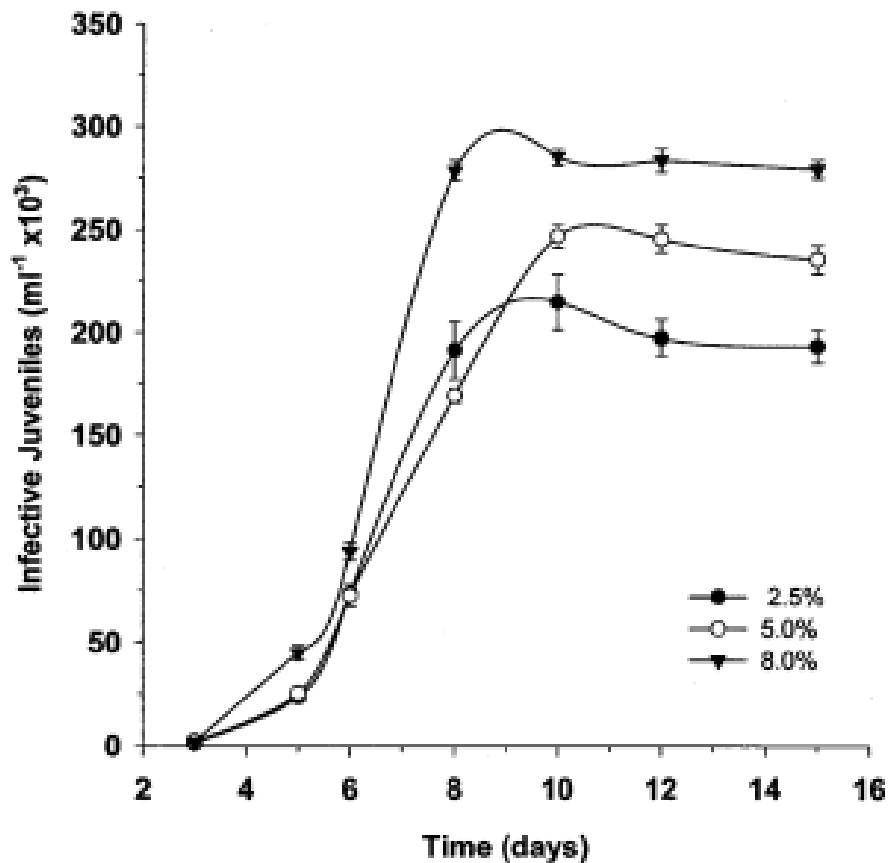


Figura 7. Efecto de la concentración lipídica (Aceite de canola: oliva) sobre la producción de IJ de *Heterorhabditis bacteriophora*.

Fuente: Yoo *et al.* 2000.

Cuadro 5. Efecto de la suplementación con carbohidratos sobre la producción de nemátodos.

Fuente de Carbono	Densidad de células bacterianas (mg mL ⁻¹)	Fase de crecimiento del nemátodo	
		Recuperación (%)	Infectivos juveniles (mL ⁻¹ .10 ¹)
Aceite de canola	6.3 ± 0.5 a	60.9 ± 8.3 b	252.7 ± 15.0 b
AC + glucosa	8.2 ± 0.3 c	54.9 ± 9.4 ab	362.3 ± 16.2 d
AC + fructosa	8.0 ± 0.4 bc	47.5 ± 6.4 a	221.3 ± 9.5 a
AC + maltosa	7.3 ± 0.5 b	58.5 ± 8.1 ab	303.7 ± 8.5 c
AC + sacarosa	7.5 ± 0.4 b	61.6 ± 7.3 b	289.7 ± 13.5 c

Fuente: Gil *et al.* 2002.

La alta virulencia y longevidad son rasgos que pueden reducirse o perderse a causa del cruzamiento genético, selección no intencional y deriva (Anbesse *et al.* 2012); salvo que el producto biológico se almacene por crio preservación o se utilicen líneas endogámicas homocigóticas para la producción (Dolgin *et al.* 2007). Los nemátodos producidos en medios de cultivo líquido se reproducen por autofecundación y dan como resultado líneas endogámicas homocigotas, por lo tanto, se ha establecido que el mejor método para la producción de *Heterorhabditis bacteriophora* es la producción líquida *in vitro* (Johnigk *et al.* 2002).

Las ventajas de los medios líquidos es que se producen infectivos juveniles de calidad y los costos de producción disminuyen a USD 17.00 (*Heterorhabditis bacteriophora*) por mil millones de infectivos juveniles; sin embargo, requiere una inversión alta en equipos de esterilización, así como experiencia técnica y conocimientos específicos en cuanto a niveles de temperatura, humedad relativa, cantidad de oxígeno y tiempo de agitación (Gaugler y Han 2002).

Cultivos monoxénicos semisólidos embebidos en espumas de poliuretano

La producción *in vitro* en medios sólidos avanzó considerablemente con la invención del método Bedding; un sistema de cría tridimensional que se basa en la propagación de nemátodos entomopatógenos con espuma de poliuretano desmenuzado (Bedding 1981). En el diagrama de flujo (Figura 8) se describe la secuencia básica de los eventos generados durante el proceso de producción de *H. bacteriophora* con este método. Los primeros pasos son la crianza masiva del nemátodo y la extracción de bacterias simbiotes. Estos eventos son relevantes porque proveen al productor las suspensiones madre de nemátodos y bacterias, necesarias para el inóculo del cultivo monoxénico semisólido.

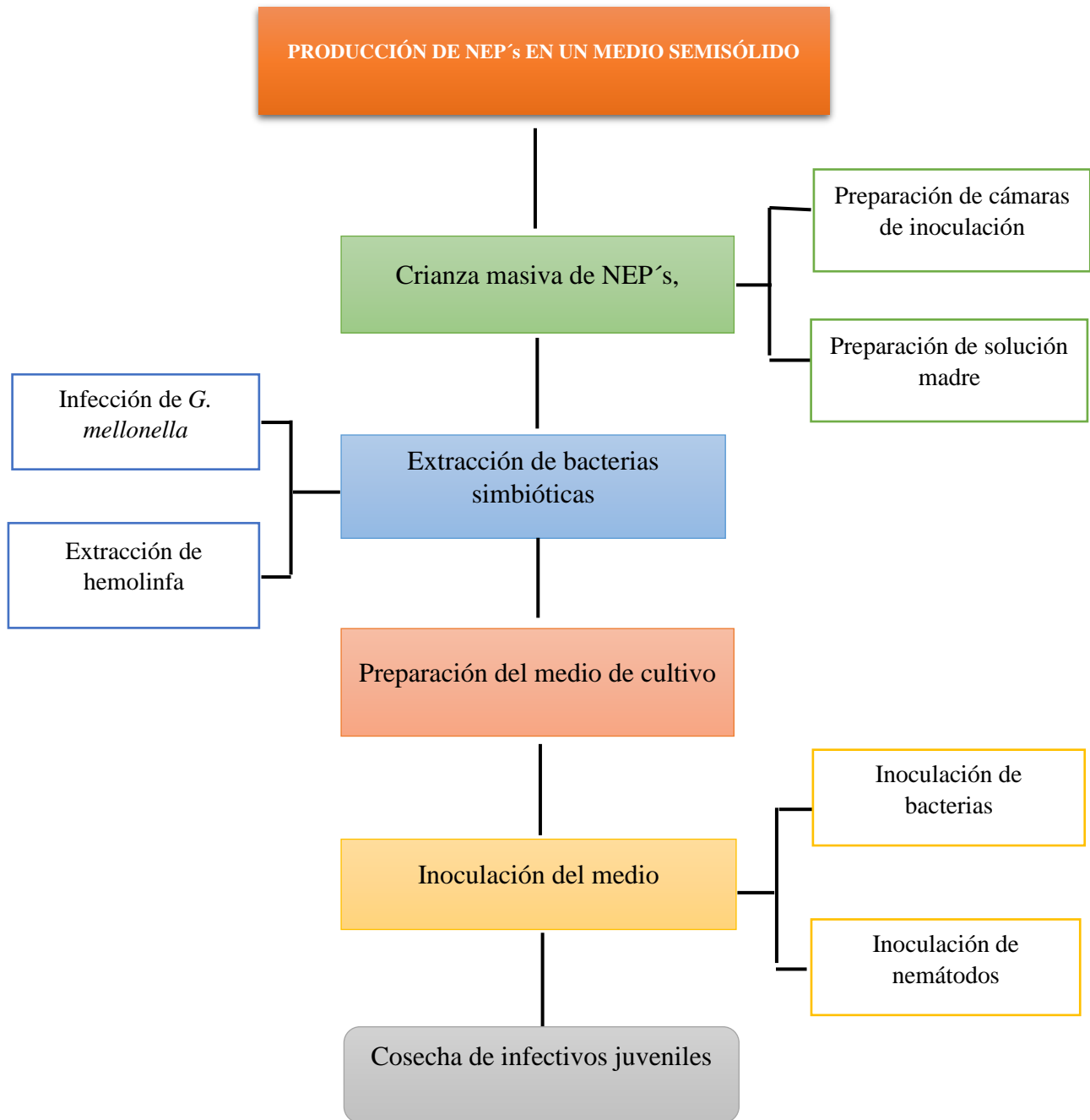


Figura 8. Flujograma para la producción de NEP's en cultivos semisólidos.

Crianza masiva de NEP's. Este evento se subdivide en: preparación de cámaras de inoculación y elaboración de una solución madre de nemátodos (Yoo *et al.* 2000; Ulug *et al.* 2015). Los pasos por seguir son los mismos que el método de producción *in vivo* de *Heterorhabditis bacteriophora*, mencionado al inicio de este capítulo.

Extracción de la bacteria simbiótica. Para extraer la bacteria *P. luminescens* se debe emplear la técnica del hemocele, siguiendo este procedimiento: Infeccionar larvas de *Galleria mellonella* en el quinto estadio con 500 IJ de *Heterorhabditis bacteriophora* en 100 μ L de agua destilada estéril. Después de 2 días de la inoculación seleccionar las larvas muertas y sumergirlas en alcohol por treinta segundos para esterilizarlas (Kalita *et al.* 2019).

Extraer y transferir la hemolinfa a placas de agar nutritivo (NBTA) con la ayuda de una aguja en forma de L y posteriormente, incubar a 28 °C durante 72 horas (Ulug *et al.* 2015). Después del tiempo establecido, trasladar las colonias características a un tubo de ensayo con 100 mL de caldo nutritivo y dejarlas durante 48 horas a 27 °C y 100 rpm (Tabassum y Shahina 2004; Kalita *et al.* 2019).

Preparación del medio de cultivo. Homogenizar los ingredientes del medio seleccionado en agua destilada estéril (Cuadro 7) y distribuir uniformemente 30 g de cada medio sobre 1 g de cubos de esponja (de 0.5 cm² cada uno) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Limpiar el cuello del matraz y tapar con algodón. A continuación, envolver con papel aluminio y esterilizarlo en la autoclave durante 15 minutos a 121 °C (Kalita *et al.* 2019; Tabassum y Shahina 2004).

Inoculación de bacterias y nemátodos. El orden de inoculación es importante, por ello se debe: Dejar enfriar el medio líquido estéril hasta llegar a una temperatura de 25 °C. Inocular 2 mL de caldo bacteriano de *P. luminiscens* en cada matraz, mantener en agitación a 200 rpm y 27 °C por 48 a 72 horas. A continuación, añadir al medio 1000 nemátodos IJ/matraz y almacenar a 26–30 °C por 30 días (Kalita *et al.* 2019). Los infectivos juveniles que han completado su ciclo de producción se mueven a la parte inferior del matraz, tal y como muestra la Figura 9 (Shapiro y Gaugler 2002).



Figura 9. Cultivo semisólido de nemátodos entomopatógenos.
Fuente: Shapiro y Gaugler 2002.

Cosecha de nemátodos entomopatógenos. Después de 30 días recolectar los nemátodos siguiendo las instrucciones de Bedding (1984). Primero, colocar las esponjas en un tamiz de malla (0.6 mm), mover el tamiz a una bandeja cubierta con agua del grifo (15 – 20 °C) durante 48 horas y recolectar los nemátodos que migraron al agua.

Tomando como base el protocolo mencionado, se han obtenido varios rendimientos (Cuadro 6). La producción varía según la especie y medio utilizado, actualmente la información de *Heterorhabditis bacteriophora* continua en proceso de investigación.

Cuadro 6. Rendimiento de *Heterorhabditis bacteriophora* en el proceso de producción semisólido utilizando varios medios de cultivo.

Medio	Control de producción (IJ /g)
Caldo nutritivo (0.44 g), extracto de levadura (0.16 g), harina greemgram (7.2 g), aceite de coco (5.2 mL), esponja (1,0 g), agua destilada estéril (27 mL)	326 400
Caldo nutritivo (0.44 g), extracto de levadura (0.16 g), harina greemgram (7.2 g), aceite de soya (5.2 mL), esponja (1,0 g), agua destilada estéril (27 mL)	317 333
Caldo nutritivo (0.44 g), extracto de levadura (0.16 g), harina de trigo (7.2 g), aceite de soya (5.2 mL), esponja (1,0 g), agua destilada estéril (27 mL).	17 300

N/R= No reportado.

Fuente: Kalita *et al.* 2019.

Las ventajas de los cultivos semisólidos son: escasa inversión en equipos y personal con experiencia limitada; no obstante, para producciones a gran escala los medios líquidos siguen siendo la mejor alternativa (Ehlers 2001). En el Cuadro 7 se hace una comparación entre los tres métodos de producción detallados en este documento.

Cuadro 7. Comparación entre los métodos de producción *in vivo*, cultivo monoxénico semisólido y cultivo monoxénico líquido.

Factor	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i> - semisólido	<i>In vitro</i> - líquido
Inversión inicial	Baja	Media	Alta
Experiencia técnica	Básica	Media	Alta
Producción a escala industrial	Costosa	Media	Barata
Labor requerida a escala industrial	Alta	Media	Baja

4. CAPÍTULO III: FORMULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

La formulación se define como la mezcla de un ingrediente activo con uno o más aditivos. Los ingredientes activos se refieren a los infectivos juveniles producidos en el laboratorio; mientras que los aditivos pueden ser adsorbentes, estabilizadores de NEP, preservantes o antifúngicos (Urtubia 2017). Según Tanzini *et al.* (2001) el objetivo de las formulaciones es facilitar el manejo, transporte y la aplicación de los NEP's en el campo. Al igual que, generar mayor sobrevivencia de infectivos juveniles con respecto al tiempo, sin deteriorar su porcentaje de viabilidad. Posteriormente, se presentan los tipos de formulaciones:

Esponjas sintéticas. La formulación en esponjas de poliuretano mantiene viables a los infectivos juveniles por 8 meses; sin embargo, genera altos costos de refrigeración ya que se almacenan a temperaturas de entre 4 a 15 °C (Figura 10A) (Hazir *et al.* 2004; Grewal 2002).

Arcillas. La mezcla arcillosa logra almacenar infectivos juveniles a 23 °C durante ocho semanas; no obstante, los productores han dejado de utilizarla con frecuencia debido a que sella los filtros de los sistemas de riego (Figura 10B) (Grewal 2002).

Cadáveres de insectos. El cadáver infectivo se considera el método más efectivo para la distribución de *Heterorhabditis bacteriophora*; sin embargo, las larvas pueden romperse cuando se almacenan y transportan (Figura 10C).

Geles cápsulas de alginato. El gel hidrosoluble mantiene con vida a los infectivos juveniles por un periodo de 4 meses a temperaturas de 15-18 °C (Figura 10D) (Urtubia 2017); mientras que las formulaciones del tipo granular o cápsulas de alginato conservan los infectivos juveniles por 6 meses y poseen un grado óptimo de humedad que asegura la salida de los nemátodos cuando se aplican en campo. Sin embargo, requieren una elevada cantidad de tiempo y dinero para su elaboración (Figura 10E). Actualmente, se han realizado estudios para la producción de cápsulas fagoestimulantes y germinales. Las cápsulas fagoestimulantes son gránulos de alginato de calcio cubiertos por membranas lipídicas que atraen al insecto en estado larval e inducen el consumo de la cápsula para liberar a los NEP's (Kaya y Nelsen 1985); mientras que, las cápsulas germinales son gránulos de alginato de sodio que contienen NEP's y una semilla en el centro, cuando la semilla entra en contacto con la humedad germina, destruye la estructura del gránulo y salen los infectivos juveniles (Kaya *et al.* 1987).



Figura 10. Formulación de nemátodos entomopatógenos A) Suspensión acuosa, B) Esponja, C) Gel, D) Gránulos de alginato, E) Arcilla.

Fuente: Gulzar *et al.* 2020; Bogantes *et al.* 2017; García 2006.

A continuación, en el Cuadro 8 se presentan tres resultados importantes de investigaciones realizadas sobre formulaciones en *H. bacteriophora*.

Cuadro 8: Viabilidad de *H. bacteriophora* en tres tipos de formulaciones.

Formulación	Metodología	Resultados
Arcilla	Mezclar uniformemente 40 mL de arena de río, 40 mL de barro y 20 mL de caolín en un frasco de 4 L. Distribuir la masa y realizar orificios de 10 mm de diámetro con 5 mm de profundidad, para colocar 0.2 mL de IJ. Tapar con la misma masa y colocar los gránulos dentro de un cristizador. Inmediatamente colocar 3 gránulos en un tubo de ensayo de 1.5 mL y almacenar en la oscuridad a 23 °C y 60% de HR.	El 87.8% de los infectivos juveniles se mantuvieron viables durante 3 meses.
Cápsulas de alginato	Verter 5 mL de una suspensión de nemátodos con 5 mL de la concentración 2x (m/v) del alginato. Gotear la mezcla con cloruro de calcio al 4.4% hasta obtener la preparación: Alginato-Ca 2%. Esta mezcla dará lugar a la formación de un hidrogel como resultado del contacto de una solución de cationes divalentes con alginatos.	Se observó alta viabilidad de infectivos juveniles en el encapsulamiento, durante un periodo de 28 días.
Esponjas	Cortar una esponja de 10 × 6 × 2 cm hecha a base de poliuretano y colocarla sobre una suspensión acuosa de 200 mL (10,000 IJ/mL). Empacar individualmente en una bolsa de plástico hermética de 20 x 25 cm y almacenar a 10 °C.	Los IJ mantuvieron más del 55-77% de supervivencia después de 8 meses.

Fuente: García 2006; Bogantes *et al.* 2017; Touray *et al.* 2020.

5. CAPÍTULO IV: APLICACIÓN EN CAMPO

Las formulaciones de nemátodos entomopatógenos se aplican directamente en el suelo o mediante una disolución. Los geles y arcillas se disuelven; mientras que las esponjas sintéticas se sumergen en un bol con agua para liberar a los infectos juveniles. Generalmente, el producto se diluye en 5 litros de H₂O a una temperatura de 12-20 °C y se distribuye con la ayuda de un contenedor, bomba de mochila o sistema de aspersores mecánicos, calibrados a una presión máxima de 21 kg/cm² (Lara y López. 2005; Grewal 1998). La desventaja es que se debe agitar constantemente la solución, porque los nemátodos descienden a la parte baja del tanque (Shapiro *et al.* 2010). Además, antes de preparar la solución bioplaguicida es necesario determinar la dosis dependiendo de la plaga a controlar y llevar los suelos a capacidad de campo (CC) para facilitar la movilidad del nemátodo (Shapiro *et al.* 2010). Las formulaciones de cadáveres infectados y granulares son de aplicación directa en el campo; la segunda a veces requiere equipos de pulverización para su distribución.

Una recomendación para elaborar la solución bioplaguicida es proteger a los nemátodos entomopatógenos de la radiación solar, puesto que más del 50% pueden sufrir desecaciones (Tortosa 2019). Por otra parte, Shapiro *et al.* (2010) menciona que combinar los nematodos entomopatógenos con fungicidas, herbicidas o fertilizantes, reducirá los costos de aplicación; sin embargo, este es un tema que debe ser analizado a profundidad.

Ozdemir *et al.* (2020) estudiaron la compatibilidad de *H. bacteriophora* con pesticidas (Imidacloprid, Cyfometofen, Spinosad, Spiromesiten, Fluxapiryroxad+difenoconazole, Amertoctradin+dimethomorph) bajo condiciones de laboratorio. Se diluyeron los plaguicidas en agua destilada estéril hasta obtener una concentración final correspondiente a la dosis de campo (DC), la mitad de la dosis de campo (DC/2) y el doble de la dosis de campo (2DC). Expusieron 100 IJ a las diluciones y se incubaron durante 24 y 48 horas a 25 °C con 150 rpm de agitación. Los resultados indicaron que las interacciones varían según el compuesto químico y las dosis a aplicar. En general no se observó un efecto letal significativo; aunque la mortalidad más alta se alcanzó con fluxapyrosad+difenoconazol a las 48 horas con DC y 2DC. De acuerdo con los resultados de este y otros estudios (Alumai y Grewal 2003), se puede afirmar que el imidacloprid y cymufletofen son los pesticidas más compatibles. En tal sentido, no es recomendable combinar estos productos sin que antes hayan pasado por estudios de laboratorio que analicen el impacto de los químicos sobre la mortalidad de los nemátodos.

6. CONCLUSIONES

- El cultivo monoxénico semisólido embebido en esponjas de poliuretano es considerado un método de producción alternativo a la producción *in vivo* para el nemátodo *H. bacteriophora*. Este método resulta rentable, puesto que la producción masiva del nemátodo entomopatógeno alcanza un máximo de 326 400 IJ/g dentro de aproximadamente 30 días; sin la necesidad de personal especializado o altas inversiones en equipos.
- El método de producción semisólido de *H. bacteriophora* se ve limitado por la falta de información sobre un medio de cultivo que logre extender los rendimientos de producción a escala industrial. Por otro lado, es impulsado por la baja inversión en equipos y la experiencia técnica básica que requiere.
- La formulación más eficiente para *Heterorhabditis bacteriophora* se alcanza con mezclas arcillosas, debido a que el 88% de infectivos juveniles se mantienen viables durante 4 meses.

7. RECOMENDACIONES

- Considerando que esta monografía se basa en información primaria; se recomienda realizar un estudio comparativo entre varios medios monoxénicos semisólidos para determinar los rendimientos de producción y patogenicidad del IJ (*Heterorhabditis bacteriophora*).
- Ejecutar el protocolo de producción semisólido propuesto en esta monografía y compararlo con los rendimientos del método de producción *in vivo* empleado en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Mejorar la formulación en esponjas de poliuretano, para alcanzar un porcentaje de supervivencia superior a 88%.
- Investigar el porcentaje de supervivencia e infectividad de los infectivos juveniles al liberar cadáveres infectados de *Heterorhabditis bacteriophora* en campo y al utilizar gránulos de alginato fago estimulantes y germinales.

8. LITERATURA CITADA

- Abate A, Wingfield M, Slippers B, Hurley B. 2017. Commercialization of entomopathogenic nematodes: should import regulations be revised?. *Biocontrol Science and Technology*. 27(2):149–68. doi:10.1080/09583157.2016.1278200
- Alumai A, Grewal P. 2003. Tank-mix compatibility of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Sterinermas caspocapsae*, with select chemical pesticides used in turfgrass. *Biocontrol Science and Technology*. 14: 725-730. doi: 10.1080/09583150410001724334
- Amador M, Molina D, Guillen C, Parajeles E, Jiménez K, Uribe L, 2015. Utilización del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones *in vitro*. *Agron. Costarricense*. 39. ISSN: 0377-9424
- Anbesse S, Sumaya N, Dorfler A, Strauch O, Ehlers R. 2012. Selective breeding for desiccation tolerance in liquid culture provides genetically stable inbred lines of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:731–739. doi: 10.1007/s00253-012-4227-5
- Arctos 2018. Clasificación taxonómica del nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora*; [actualizado el 02 de jun. de 2020; consultado el 22 de ago. de 2020]. <https://arctos.database.museum/name/Heterorhabditis%20bacteriophora>
- Bedding RA. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*. 27:109-114. doi: 10.1163/187529281X00115
- Bedding RA. 1984. Large scale production, storage and transport the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Annual Applied Biology*. 104:117-120. doi: 10.1111/j.1744-7348.1984.tb05593.x
- Bedding RA, Clark SD, Lacey MJ, Butler KL. 2000. Method and apparatus for the storage of entomopathogenic nematodes WIPO Patent No. WO 00/18887.
- Boemare N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, Entomopathogenic Nematology. CABI publishing. 35-56. doi: 10.1079/9780851995670.0035
- Bogantes D, Flores L, Castellón E, Uribe L. 2018. Encapsulamiento de nemátodos Entomopatógenos en materiales basados en biopolímeros y su efecto en *Galleria mellonella*. *Agronomía Costaricensis*. 42(2). doi:10.15517/rac.v42i2.33774
- Ciche TA, Darby C, Ehlers R, Forst S, Goodrich H, 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biol Control*. 38:22–46. doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.11.016
- Ciche TA, Ensign JC. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out?. *Appl. Environ. Microbiol*. 69:1890–1897. doi: 10.1128/aem.69.4.1890-1897.2003.

- Dolgin S, Charlesworth B, Baird E, Cutter D. 2007. Inbreeding and outbreeding depression in *Caenorhabditis* nematodes. *Evolution*. 61:1339–1352. doi: 10.2307/4621380
- Dowling A, Daborn P, Waterfield N, Wang P, Streuli C, Ffrench R. 2004. The insecticidal toxins makescaterpillars floppy (MCF) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cell microbiol*. 4: 345-53. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00357.x
- Dunn M, Belur P, Malan A. 2020. *In vitro* liquid culture and optimization of *Sternernema jeffreyense* using shake flasks. *Biocontrol*. 65:223-233. doi: 10.1007/s10526-019-09977-7
- Ehlers R. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 56: 623-633. doi: 10.1007/s002530100711
- Fendon A, Magoolagan L, Kennedy Z, Spencer K. 2010. Parasite induced warning coloration: a novel form of host manipulation. *Animal behavior*. 81(2): 417-422. doi: 10.1093/beheco/ary202
- Flanders K, Miller J, Shields E. 1996. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* ‘Oswego’ (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insect in temperate regions. *Journal of Economic Entomology*. 89(2):373-380. doi: 10.1093/jee/89.2.373
- Forst S, Clarke D. 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. En Gaugler, editor. *Entomopathogenic Nematology*, CABI publ. p. 57-77.
- García A. 2006. Formulación de bioinsecticidas a base de nematodos entomopatógenos. [Tesis]. México: Universidad autónoma Estado de Hidalgo. 58 p; [consultado el 20 de jul. de 2020]. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1684/Formulaci%F3n%20de%20bioinsecticidas%20a%20base%20de%20nematodos%20entomopatogenos.pdf?sequence=1>
- García P. 1994. Los NEP’s (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. [Tesis] Universidad Autónoma de Barcelona-España. 102 p.
- Gaugler R, Brown I, Shapiro D, Atwa A. 2002. Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*. 24(2): 199–206. doi: 10.1016/S1049-9644(02)00015-4
- Gaugler R, Han R. 2002. Production technology. En Gaugler R, editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI publ. p. 289-310
- Gerdes E, Upadhyay D, Mandjiny S, Bullard DR, Storms M, Menefee M, Holmes L. 2015. *Photorhabdus Luminescens*: Virulent Properties and Agricultural Applications. *American Journal of Agriculture and Forestry*. 3:171-177. doi: 10.11648/j.ajaf.20150305.12
- Grewal P. 1998. Formulations of entomopathogenic nematodes for storage and application. *Japanese Journal of Nematology*. 28: 68–74. doi: 10.17221/35/2016-PPS
- Grewal P. 2002. Formulation and application technology. En Gaugler R editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI publ. p. 265–287

- Gil G, Choo H, Gaugler R. 2002. Enhancement of entomopathogenic nematode production in *in vitro* liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58 (6): 751- 755. doi: 10.1007/s00253-002-0956-1
- Gulzar S, Usman M, Wakil W, Gulcu B, Hazir C, Karagoz M, Hazir S, Shapiro D. 2020. Environmental tolerance of entomopathogenic nematodes differs among nematodes arising from host cadavers versus aqueous suspension. *Journal of invertebrate pathology*. 175. doi: 10.1016/j.jip.2020.107452
- Han R, Ehlers R. 2000. Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *J Invertebr Pathol*. 75(1):55–58. doi: 10.1006/jipa.1999.4900
- Hazir S, Kaya HK, Stock SP, Keskin N. 2004. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*; [consultado el 20 de ago. de 2020]. 27 (2003): 181–202. <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-03-27-4/biy-27-4-1-0401-1.pdf>
- Imhoff J. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1st ed. / edited by Garrity, Brenner G, Krieg, D, Staley N, James R. Boston: Springer US.
- ITIS, Integrated Taxonomic Information System. 2018. Clasificación taxonómica de la bacteria *Photorhabdus luminescens*; [consultado el 18 de ago. de 2020]. <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null>
- Johnigk A, Ehlers R. 1999. Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology*. 1:251–260. doi: 10.1163/156854199508234
- Johnigk S, Hollmer S, Strauch O, Wyss U, Ehlers R. 2002. Heritability of the liquid culture mass production potential of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biocont Sci Technol*. 12:267–276. doi: 10.1080/09583150120124504
- Joyce S, Brachmann A, Glazer I, Lango L, Schwar G, Clarke D, Bode H. 2008. Bacteria Biosynthesis of a *multipotent* stibeline. *Angew Chem Int Ed Engl*. 47(10):1942-5 doi: 10.1002/anie.200705148
- Kalita M, George J, Khataniar L, Bhattacharyya G. 2019. Mass multiplication entomopathogenic nematodes in artificial media. *Journal of entomology and zoology studies*7(5): 215-129. ISSN: 2320-7078
- Kaya HK, Mannion CM, Burlando TM, Nelsen C.E. 1987. Escape of *Steinernema feltiae* from alginate capsules containing tomato seeds. *Journal of Nematology*; [consultado el 19 de ago. de 2020]. 19: 287–291. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618656/>
- Kaya HK, Nelsen CE. 1985. Encapsulation of Steinernematidae and Heterorhabditida nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology*. 14: 572–574.
- Lacey L, Kaya H. 2007. *Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. 2^a ed. Dordrecht: Springer: 249–264. ISBN: 978-1-4020-5933-9

- Lang A, Schmidt G, Schlosser A, Het T, Larrinua A, Sheets J, Mannherz H, Aktories K. 2010. *Photorhabdus luminescens* toxins adp-ribosylate actin and Rhoa to force actin clustering. *Science*. 327(5969):1139-42. doi: 10.1126/science.1184557
- Lara J, López J. 2005. Evaluación de diferentes equipos de aspersión para la aplicación de nemátodos entomopatógenos. *Rev. Colomb. Entomol.* 31 (1). ISSN 2665-4385
- Leite L, Shapiro D, Hazir S, Jazckson M. 2016. The effects of nutrient concentration, addition of thickeners and agitation speed on liquid fermentation of *Steinernema feltiae*. *Journal of nematology*. 48(2):126-133. doi: 10.21307/jofnem-2017-018
- Lordello L. 1951. Endotokia matricida em Rhabditis sp. (Nematoda, Rhabditidae). *Anais Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros de Sao Paulo*. 3: 111-114. doi: 10.1590/S007112761951000100007
- Machado RA, Wuthrich D, Kuhnert P, Arce C, Thonen L, Ruiz C, Zhang X, Robert C, Karrimi J, Kamali S, Ma J, Bruggmann R, Erb M. Whole genome bases revisit of *Photorhabdus* phylogeny: proposal for the elevation of most *Photorhabdus* subspecies to the species level and description of one novel species *Photohabdus bodei* sp. nov. and on novel subspecies *Photorhabdus laumondii* subsp. *clarkei* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 28: 2664-2681. doi: 10.1099/ijsem.0.002820
- Marokhazi J, Waterfield N, Legoff G, Feil E, Stabler R, Hinds J, Fodor A, Ffrench RH. 2003. Using a DNA microarray to investigate the distribution of insect virulence factors in strains of *Photorhabdus* bacteria. *Journal of Microbiology*. 185(15): 4648-4656. doi: 10.1128/JB.185.15.4648-4656.2003
- Merino L, France A. 2009. Nemátodos entomopatógenos: Control biológico de insectos plaga de importancia económica. *INIA Tierra adentro, plagas y enfermedades*: 24-25
- Monteiro CM, Furlong J, Azevedo MC, Soares AE, Paula ES, Dolinski C. 2010. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari Ixodidae) 170 (3): 355-358. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.021
- Moreno C. 2017. Evaluación de parámetros para la producción del nemátodo entomopatógenos *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en fermentación líquida. [Tesis]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia: 101 p; [consultado el 03 de ago. de 2020]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/56844/1/MorenoC.A.2017.pdf>
- Ozdemir E, Inak E, Evlice E, Laznik Z. 2020. Compatibility of entomopathogenic nematodes with pesticides registered in vegetable crops under laboratory conditions. *Journal of plant diseases and protection* 127: 529-535. doi: 10.1007/s41348-020-00337-7
- Poinar GO. 1975. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid *Heterorhabditis bacteriophora* new genus, new species rhabditida heterorhabditidae and new family. *Nematologica*. 23: 97-102.
- Prabowo H, Adikadarchi S, Damaiyani J. 2019. Mass production of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* on *Tenebrio molitor* and *Spodoptera litura*. *Biodiversitas*. 20 (5): 1344-1349. doi: 10.13057/biodiv/d200525

- Rodou A, Ankrah DO, Stathopoulos C. 2010. Toxins and Secretion Systems of *Photorhabdus luminescens*. *Toxins*. 2: 1250-1264. doi: 10.3390/toxins2061250
- Rubio V, Fereres A. 2011. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. Centro de ciencias medioambientales. Madrid. [Consultado el 19 de junio 2020]. URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/36025273.pdf>
- Sáenz A, López J. 2011. Ciclo de vida y patogenicidad de aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. SL 0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Colombiana de Entomología* 37 (1): 43-47. ISSN: 0120-0488
- Sáenz A, Luque J. 2000. Ciclo de vida del entomonemátodo nativo. *Agronomía Colombiana*; [consultado el 20 de julio de 2020]. 17 (1): 17-24. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21540/22544>
- Shapiro D, Cottrell T, Mizell R, Horton D, Behle B, Dunlap C. 2010. Efficacy of *Steinernema carpocapsae* for control of the lesser peachtree borer, *Synanthedon pictipes*: Improved aboveground suppression with a novel gel application. *Biological Control*. 54:23-28. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.11.009
- Shapiro D, Gaugler R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*. 28: 137-146. doi: 10.1038/sj/jim/7000230
- Shapiro D, Han R, Dolinski C. 2012. Entomopathogenic nematode production and application technology. *The Journal of Nematology*. [consultado el 20 de ago. de 2020]. 44(2): 206-217. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578468/>
- Shapiro D, Morales J, Rojas M. 2016. *In Vivo* Production of Entomopathogenic Nematodes. In *Microbial-Based Biopesticides. Methods in Molecular Biology*. 1477: 137-158. doi: 10.1007/978-1-4939-6367-6_11
- Somvanshi V, Rudolph E, Crawford J, Martin A, Heidt A, Kim K, Clardy J, Ciche T. 2012. A single promoter inversion switches *Photorhabdus* between pathogenic and mutualistic states. *Science*. 337(6090):88-93. doi: 10.1126/science.1216641
- Stock S, Goodrich B. 2008. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. The inside out of a mutualistic association. *Symbiosis*. 46(2): 65–75.
- Strauch O, Niemann I, Neumann A, Schmidt J, Peters A, Ehlers U. 2000. Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. *Bio Control*. 45:483-500. doi: 10.1023/A:1026528727365
- Tabassum KA, Shahina F. 2004. *In vitro* mass rearing of different species of entomopathogenic nematodes in monoxenic solid culture. *Pak. J. Nematol.* 22: 167-175.
- Tanzini MR, Bastista S, Setten A, Toschi N. 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica*; [consultado el 19 de jun. de 2020]. 59:15 – 18. <http://hdl.handle.net/11554/5917>
- Touray M, Gulcu B, Ulug D. 2020. Evaluation of different sponge types on the survival and infectivity of stored entomopathogenic nematodes. *Journal of invertebrate pathology*. 171. doi: 10.1016/j.jip.2020.107332

- Ullah I, Khan AL, Ali L, Khan AR, Waqas M, Hussain J, Lee IJ, Shin JH, 2015. Benzaldehyde as an insecticidal, antimicrobial, and antioxidant compound produced by *Photorhabdus temperata* M1021. J Microbiol. 53(2):127-33. doi: 10.1007/s12275-015-4632-4
- Ulug D, Hazir C, Hazir S. 2015. A new and simple technique for the isolation of symbiotic bacteria associated entomopathogenic nematodes. Turkish Journal of Zoology 39: 365-367.
- Urtubia I. 2017. Formulación de nemátodos entomopatógenos. Investigaciones agropecuarias INIA, Quilamapu. Boletín INIA 260. ISSN 0717-4829.
- Vashisth S, Chandel Y, Sharma P. 2012. Entomopathogenic nematodes. Agri. 34(3): 163-175. doi: 10.5958/j.0976-0741.34.3.001
- Wimpee C, Nadeau T, Neelson K. 1991. Development of species-specific hybridization probes for marine luminous bacteria by using *in vitro* DNA amplification. Appl. Environ. Microbiol; [consultado el 28 de ago. de 2020]. 57:1319–1324. <https://aem.asm.org/content/57/5/1319>
- Yoo K, Brown I, Gaucher R. 2000. Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. App. Microbiol Biotechnol. 54: 759-763. doi: 10.1007/s002530000478