

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

EFICACIA DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE NEMÁTODOS  
ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *Steinernema* Y EL PIRETROIDE  
LAMBDA-CIHALOTRINA EN EL CONTROL DE *Plutella xylostella* (L.)

**TAMARA MARIÓN NÚÑEZ SALINAS**

SANTIAGO, CHILE  
2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

EFICACIA DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE NEMÁTODOS  
ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *Steinernema* Y EL PIRETROIDE  
LAMBDA-CIHALOTRINA EN EL CONTROL DE *Plutella xylostella* (L.)

EFFICACY OF NATIVE ISOLATES OF ENTOMOPATHOGENIC  
NEMATODES OF THE GENUS *Steinernema* AND THE PYRETHROID  
LAMBDA-CIHALOTRINA IN THE CONTROL OF *Plutella xylostella* (L.)

**TAMARA MARIÓN NÚÑEZ SALINAS**

SANTIAGO, CHILE  
2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

EFICACIA DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE NEMÁTODOS  
ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *Steinernema* Y EL PIRETROIDE  
LAMBDA-CIHALOTRINA EN EL CONTROL DE *Plutella xylostella* (L.)

Memoria para optar al título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo

**TAMARA MARIÓN NÚÑEZ SALINAS**

PROFESORES GUÍAS	CALIFICACIONES
Gabriela Lankin V. Ingeniera Agrónoma, MS., Ph.D.	7,0
Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.	7,0
PROFESORES EVALUADORES	
Tomislav Curkovic S. Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	6,3
Rodrigo Callejas R. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,5

SANTIAGO, CHILE  
2017

## AGRADECIMIENTOS

A mis profesores guías Gabriela Lankin y Erwin Aballay, por ser los creadores intelectuales de esta memoria, por su disposición, ayuda, correcciones, consejos y por estar siempre presentes.

Agradezco a Giselle y Carlos por enseñarme los protocolos y por su ayuda en el desarrollo de este trabajo, y a Bárbara por su ayuda y sobre todo por hacer la dieta de *G. mellonella*.

A mis amigos por su ayuda y por estar siempre presentes.

En especial a mi familia, a mi mamá, papá y hermano, por su apoyo y amor incondicional, por la confianza que han depositado en mí, por sus consejos y sobre todo por estar siempre conmigo en cada meta cumplida. Gracias por alentarme a estudiar esta hermosa carrera.

Gracias mamá y Mario por ayudarme a regar y cuidar de mis "bichos".

Y gracias a todas aquellas personas que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de esta memoria.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
Palabras claves.....	1
ABSTRACT.....	2
Key words.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Hipótesis.....	5
Objetivo.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Obtención y reproducción de <i>Galleria mellonella</i> .....	6
Crianzas de los nemátodos entomopatógenos. ....	8
Obtención y reproducción de <i>Plutella xylostella</i> (L.).....	9
Experimentos .....	10
Análisis estadístico.....	11
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	19

## RESUMEN

La polilla dorso de diamante o polilla del repollo, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), es una de las plagas más importante de los cultivos de brásicas a nivel mundial. La estrategia de control más utilizada ha sido el uso de insecticidas de síntesis química como piretroides, carbamatos, organofosforados y reguladores de crecimiento, sin embargo, se ha comprobado su resistencia a numerosos insecticidas, por lo cual éstos ya no son una opción viable en muchas partes del mundo.

Como una alternativa para su de control, se evaluó la susceptibilidad del segundo (L2) y cuarto (L4) estado larval de *P. xylostella* a los nemátodos entomopatógenos (NEP) nativos *Steinernema* sp., aislamientos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4, y se compararon con la mortalidad causada por el insecticida piretroide Lambda-cihalotrina, en condiciones de laboratorio. Para cada aislamiento se evaluaron cuatro concentraciones de juveniles infectivos (J3) (0, 100, 300, 600 J3/mL) y una dosis de insecticida a una concentración de 0,1 mL/500 cm<sup>3</sup>, incluyéndose también un tratamiento control con 1 mL de agua. Después de la aplicación se evaluó la mortalidad de las larvas cada 24 horas.

En general, en los tres aislamientos y el insecticida se observó muerte de larvas de *P. xylostella* en ambos estadios larvarios, aunque los únicos tratamientos que presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron el aislamiento Chillán 4, en la concentración de 600 J3/mL aplicadas a larvas L4, y el insecticida aplicado a larvas L2.

Las larvas afectadas por los NEP se mostraron poco móviles antes de morir, y luego presentaron cambios de coloración de verde a marrón oscuro, y una vez muertas su cuerpo se presentó flácido. Se observó una relación directa entre el tiempo de exposición a los NEP y el porcentaje de mortalidad de larvas de *P. xylostella*, obteniéndose los mayores porcentajes de mortalidad a las 96 horas después de la aplicación.

Los resultados de este estudio demuestran la eficacia de los NEP nativos *Steinernema* sp. aislamientos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4 sobre la mortalidad de larvas de *P. xylostella* en condiciones de laboratorio. Estudios en condiciones de campo e invernadero permitirán avanzar en el conocimiento para utilizar estos microorganismos como una alternativa para el control de esta plaga.

**Palabras clave:** Control biológico, juveniles infectivos (J3), polilla dorso de diamante, bioinsecticidas.

## ABSTRACT

The diamondback moth or cabbage moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), is one of the most important pests of brassica crops in the world. The most common control strategy has been the use of synthetic insecticides such as pyrethroids, carbamates, organophosphates and growth regulators, however, due to resistance developed by insects, these are no longer a viable option in many parts of the world.

As an alternative control strategy, we evaluated the susceptibility of the second (L2) and fourth (L4) larval instars of *P. xylostella* to the native entomopathogenic nematodes (EPN) *Steinernema sp.*, isolates Licán Ray, Chillán 3 and Chillán 4, and compared it to mortality caused by the pyrethroid insecticide Lambda-cyhalothrin under laboratory conditions. For each isolate, we tested four concentrations of infective juveniles (J3) (0, 100, 300, 600 J3/mL) and the insecticide at a concentration of 0.1 mL/500 cm<sup>3</sup>, including also a control treatment with 1 mL of water. After application, larval mortality was evaluated every 24 hours.

In general, with the three EPN isolates and the synthetic insecticide, death of larval DBM was observed in both larval instars, although the only treatments that were statistically different were the isolate Chillán 4, at a concentration of 600 J3/mL applied to L4, and the insecticide applied to L2.

Before dying, larvae affected by the EPNs showed little mobility followed by changes in colour from green to dark brown, and once dead presented flabby body. A direct relationship between the exposure time to the native EPNs and the mortality of larvae of *P. xylostella* was observed, with the highest average mortality rate at 96 hours after application.

The results of this study demonstrate efficacy of the native EPNs *Steinernema sp.*, isolates Licán Ray, Chillán 3 and Chillán 4 on mortality of larval *P. xylostella* under laboratory conditions. Studies under field and greenhouse conditions will allow advancing in the knowledge of the use of these microorganisms as an alternative for the control of this pest.

**Key words:** Biological control, infective juvenile (J3), diamondback moth, bioinsecticidas

## INTRODUCCIÓN

La polilla dorso de diamante o polilla de la col, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), es una de las plagas más importante de los cultivos de brásicas a nivel mundial (Talekar y Shelton, 1993). En su desarrollo, este insecto pasa por los estados de huevo, 4 estados larvales, pupa y adulto. Cada hembra puede poner más de 200 huevos, principalmente en el envés de las hojas. Después de la eclosión de los huevos, las larvas empiezan a alimentarse inmediatamente; la larva del primer estadio se alimenta del envés de las hojas y suele minar los tejidos del mesófilo esponjoso. En el segundo, tercer y cuarto estadio las larvas se alimentan en superficie y pueden consumir hojas, brotes, tallos verdes, flores, silicuas y también semillas en desarrollo dentro de silicuas mayores. Las larvas de cuarto estadio miden un poco más de 1 cm de longitud y son muy voraces, causando las lesiones más dañinas en comparación a los tres primeros estadios larvales. La pupa, de 0,5 a 0,6 cm de longitud, se adhiere al envés de las hojas y tallos, protegida por un capullo. El adulto mide de 1,2 a 1,5 cm de expansión alar, y de 0,5 a 0,8 cm de longitud, y en este estado tiene un comportamiento nocturno, ya que los adultos en el día descansan en el envés de las hojas y en las noches salen a buscar pareja para la cópula (Talekar y Shelton, 1993; Sarfraz *et al.*, 2005; Bujanos *et al.*, 2013).

Esta plaga ha sido tradicionalmente controlada con insecticidas de síntesis química, como piretroides, carbamatos, organofosforados y reguladores de crecimiento (Rosa *et al.*, 1997; Shelton *et al.*, 2000). Sin embargo, en diversas poblaciones de *P. xylostella* alrededor del mundo se ha verificado el desarrollo de resistencia a numerosos insecticidas, dificultando su manejo por esta vía (Sarfraz *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2015). Esto ha llevado a aumentar los esfuerzos a nivel mundial para el desarrollo de programas de manejo integrado de *P. xylostella*, que buscan la reducción de aplicaciones de insecticidas químicos, el reemplazo de productos tradicionalmente utilizados por nuevos productos sintéticos menos tóxicos y la integración de diferentes métodos de control, entre los que destaca el control biológico (Sarfraz *et al.*, 2005; Salem *et al.*, 2007; Ravensberg, 2011).

Dentro de los insecticidas que se han desarrollado para el control de esta plaga se destacan algunos pertenecientes al grupo de los piretroides, como Lambda-cihalotrina. Este producto posee un amplio espectro de acción, rápido efecto inicial y adecuado efecto residual.

Además, se han propuesto otras estrategias para el control de esta plaga, como el control biológico, el cual se puede realizar con distintos organismos vivos, tales como virus, hongos, bacterias, entre las que destaca *Bacillus thuringiensis* (Da Solidade, *et al.*, 2012), depredadores, parasitoides (Silva-Torres *et al.*, 2010) y nemátodos entomopatógenos (NEP) (FIA, 2011; Badii y Abreu, 2006).

Estos últimos han demostrado gran potencial como agentes de control de insectos plaga, debido a que poseen un amplio rango de insectos hospederos (Merino y France, 2009), alta virulencia, y se pueden multiplicar artificialmente, por lo que pueden ser producidos de manera comercial. Además, son compatibles con la aplicación de varios plaguicidas químicos y biológicos, pueden persistir en el ambiente sin contaminarlo, no afectan plantas ni vertebrados y pueden ser utilizados en diferentes tipos de cultivos (Rodríguez *et al.*, 2009; FIA, 2011).



Los nemátodos son animales invertebrados, no segmentados, de cuerpo cilíndrico y elongado cuyo tamaño varía entre 0,1 mm y varios metros de largo. Poseen un completo sistema digestivo, reproductivo y muscular, un sistema excretor y nervioso simple, y carecen de sistema circulatorio y respiratorio (Koppenhöfer, 2007). Entre los nemátodos, existen 23 familias descritas que establecen interacciones biológicas con insectos, desde forosis hasta parasitismo (Koppenhöfer, 2007). De ellas, siete familias han sido estudiadas como potenciales agentes controladores biológicos de insectos plagas: Mermithidae y Tetradonematidae (Orden: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae y Sphaerulariidae (Orden: Tylenchida); Steinernematidae y Heterorhabditidae (Orden: Rhabditida) (Koppenhöfer, 2007; Morton, 2009).

De todos los NEP estudiados, algunas especies de las familias Steinernematidae (géneros *Steinernema* y *Neosteinerema*) y Heterorhabditidae (género *Heterorhabditis*) han despertado el mayor interés y la información sobre ellos ha aumentado de manera exponencial en los últimos años (Kaya y Glauger, 1993; Adams y Nguyen, 2002).

En condiciones naturales, estos organismos son habitantes del suelo, encontrándose en casi todos los ambientes desde los cuales se ha intentado aislarlos, por lo que son un agente ideal para controlar insectos plaga en este hábitat. Los NEP son parásitos obligados de insectos y establecen una simbiosis con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, presentes en su tracto intestinal. Steinernematidae se asocia con bacterias del género *Xenorhabdus* y Heterorhabditidae con bacterias del género *Photorhabdus* (Kaya y Gaugler, 1993; Forst y Clarke, 2002).

El estado infectivo en los NEP corresponde al tercer estado juvenil (J3), también denominado "dauer", el cual mantiene la cutícula del segundo estado juvenil (J2) como protección. J3 es el único estadio que vive fuera del insecto hospedero sin alimentarse y desarrollarse, y por lo tanto es el que localiza al hospedero de forma activa debido a diversos estímulos físicos y químicos que éste emite, entre los que destacan los gradientes de temperatura, CO<sub>2</sub> y otros productos de excreción de los insectos hospederos (Saenz y Olivares, 2008) y otros volátiles producidos por plantas atacadas por los últimos (Rasmann *et al.*, 2005).

Cuando el J3 encuentra un hospedero adecuado, penetra en él a través de aberturas naturales (boca, ano o espiráculo) o heridas y libera su bacteria simbionte en el hemocele del insecto. La bacteria pasa a la hemolinfa, donde se multiplica rápidamente y causa la muerte del hospedero por septicemia en 24-48 horas. Los NEP se alimentan de las células bacterianas y los tejidos degradados del hospedero, produciendo dos o tres generaciones, y emergen desde el hospedero como J3 para buscar nuevos hospederos (Kaya y Glauger 1993).

Una de las características que distinguen a los NEP es su gran capacidad de buscar activamente al hospedero, utilizando dos estrategias de búsqueda. Los emboscadores o "ambushers", como *Steinernema carpocapsae*, permanecen casi sedentarios a la espera del hospedero y están más adaptados a la superficie del suelo. El otro grupo son los navegantes o "cruisers", como *S. glaseri*, que buscan activamente a su hospedero en el suelo y responden fuertemente a quimioattractantes, estando mejor adaptados a parasitar hospederos sedentarios y subterráneos (Lewis *et al.*, 1992; Glauger *et al.*, 1997). En el suelo, la eficacia de los NEP como controladores de plagas está influenciada por

numerosos factores, tanto bióticos, como abióticos (McCoy *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2009), como la textura del suelo, la temperatura, la humedad, y también por los enemigos naturales de los NEP, tales como hongos y depredadores invertebrados (Glauger *et al.*, 1997; Hazir, 2004).

A pesar de ser habitantes del suelo, los NEP también han demostrado gran potencial como controladores de plagas foliares, y en este caso la baja humedad y la radiación son factores limitantes para la supervivencia de estos agentes, haciéndose necesario mejorar las condiciones que permitan una rápida invasión del NEP al insecto hospedero, de manera que pueda escapar de las condiciones ambientales adversas (Schroer y Ehlers, 2005; Lacey y Georgis, 2012).

En el caso de *P. xylostella*, diversos autores han evaluado exitosamente su control con algunas especies de NEP, tanto de la familia Steinernematidae (Somvanshi *et al.*, 2005; Salem *et al.*, 2007; Niyasani *et al.*, 2008; Zolfagharian *et al.*, 2014), como de Heterorhabditidae (Salem *et al.*, 2007; Niyasani *et al.*, 2008; Saenz, 2012; Rodríguez *et al.*, 2013), lo que sugiere el gran potencial de estos organismos como agentes controladores de esta importante plaga (Niyasani *et al.*, 2008) y algunos autores insisten en la importancia de continuar con evaluaciones de su capacidad patogénica en invernadero y campo (Saenz, 2012).

En Chile el uso de los NEP como método de control es aún poco difundido. El país posee una enorme variedad de ecosistemas y presenta muchos de los tipos de climas del mundo, por lo que existe una rica fauna de NEP (Edgington *et al.*, 2010). El laboratorio de Nematología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile aisló en 2010 los NEP nativos del género *Steinernema*, aislamientos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4 (nombre dado por el lugar de donde fueron aislados). Observaciones preliminares realizadas por este Laboratorio mostraron que larvas de *P. xylostella* son susceptibles al ataque del aislamiento Licán Ray, sin embargo, no se conocen mayores detalles de esta interacción.

### **Hipótesis**

Los NEP nativos *Steinernema* sp., aislamientos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4, causan mortalidad sobre estados larvales de *P. xylostella*.

### **Objetivo**

Evaluar la mortalidad de larvas de *P. xylostella* causada por los NEP nativos *Steinernema* sp., aislamientos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4 y compararlos con la mortalidad causada por el insecticida piretroide Lambda-cihalotrina, bajo condiciones de laboratorio

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Entomología de Cultivos y de Nematología, del Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, La Pintana, Santiago.

### Obtención y reproducción de *Galleria mellonella*

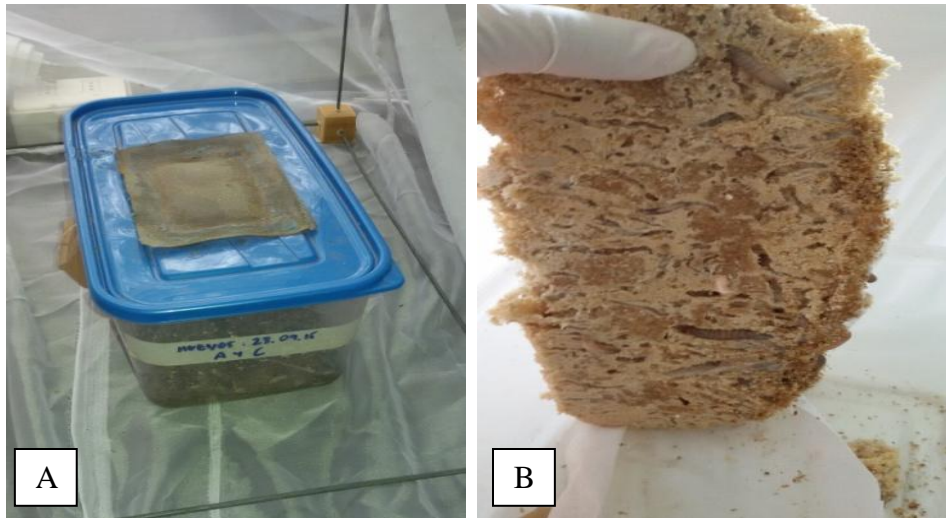
Para iniciar la colonia de larvas de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) se utilizaron huevos obtenidos desde una colonia mantenida en el Laboratorio de Entomología de Cultivos de la Universidad de Chile y se criaron en base a una dieta artificial (Contreras, 2011), detallada en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Ingredientes para aproximadamente 1 kg de dieta para Larvas de *G. mellonella*.

Ingrediente	Cantidad
Nestúm 5 cereales ®	187 g
Nestúm avena y miel®	187 g
Germen de trigo	120 g
Azúcar granulada	148 g
Glicerina líquida	200 mL
Jarabe Pantiban	2 mL
Agua destilada	100 mL

Los ingredientes sólidos se mezclan por separado, y los ingredientes líquidos más el azúcar se calientan en microondas por un minuto, para que el azúcar se disuelva. Una vez disuelta, se unen todos revolviendo, hasta obtener una mezcla homogénea. Los huevos de *G. mellonella* se pusieron dentro de contenedores plásticos de 24x8x5 cm<sup>3</sup>, con tapa con ventilación, que contenían 500 g de dieta aproximadamente (Figura 1A), en cámaras de crianza a 23±2 °C (Realpe *et al.*, 2007) y se revisaron periódicamente para observar el crecimiento de las larvas (Figura 1B).

Al emerger los adultos (después de un mes aproximadamente), éstos se pusieron en frascos de vidrio con tapa, dentro del cual se puso un trozo de papel mantequilla plegado como acordeón como sustrato para la ovoposición (Figura 2). Los frascos con los adultos se mantuvieron a 23±2°C por 24 horas, y los huevos obtenidos fueron colocados en nuevos contenedores con dieta, repitiendo el proceso.



**Figura 1.** (A) Contenedor de plástico con tapa. (B) Larvas de *G mellonella* sobre dieta.

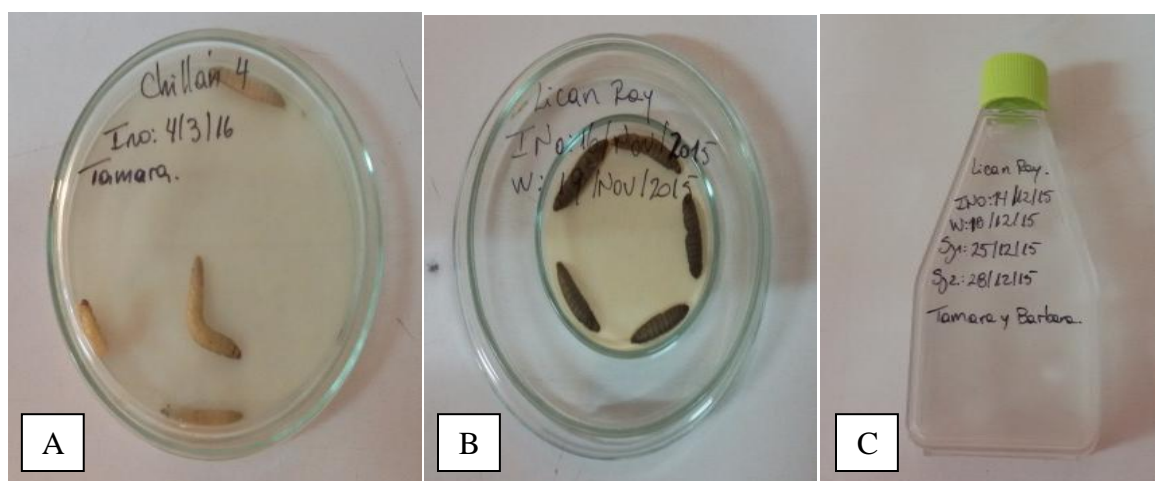


**Figura 2.** Frasco de oviposición con adultos de *G. mellonella*.

### Crianzas de los nemátodos entomopatógenos

Los NEP nativos *Steinernema* sp. aislamientos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4 se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile. Para su reproducción se utilizó el método *in vivo* siguiendo el protocolo descrito por Kaya y Stock (1997), a través de la técnica de la trampa modificada de White (1927). Primero se infectaron las larvas de *G. mellonella* en placas Petri de 10 cm de diámetro con papel filtro en la base, todo esterilizado previamente. Sobre el papel filtro se distribuyeron 100 J3/mL de agua destilada por larva, y se colocaron 5 larvas de último estadio de *G. mellonella* (Figura 3A). Las placas se llevaron a cámaras de cultivos por 3 días y las que presentaron signos de infección (cambio de color, cuerpo flácido) se dispusieron en trampas White (Figura 3B).

Las trampas White consisten en una placa Petri de 5 cm de diámetro con papel filtro estéril en la base, sobre el cual se disponen las larvas de último estadio de *G. mellonella* infectadas. Esta placa se introduce dentro de otra placa de mayor tamaño con agua destilada. Los NEP migran naturalmente desde el cadáver del hospedero hacia el agua destilada en la placa de mayor tamaño. Posteriormente se colectan los NEP desde el agua, se lavan y se guardan en frascos de cultivo (Figura 3C) identificando especie y fecha de colección, a una temperatura aproximada de 5°C hasta su uso (Koppenhöfer, 2007), por no más de un mes.

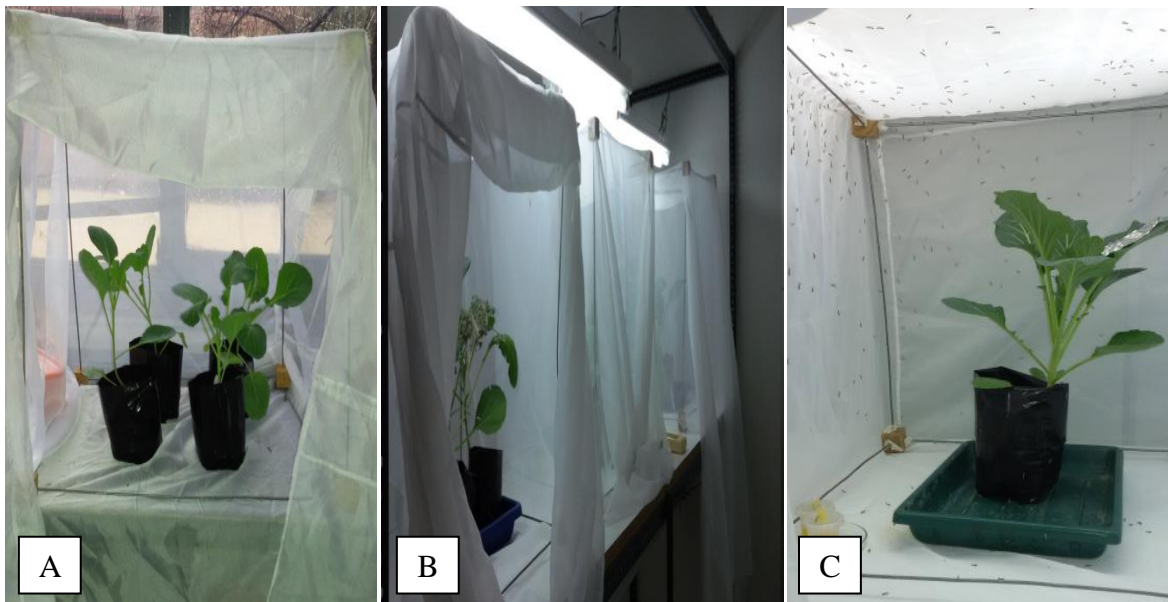


**Figura 3.** (A) Infección de larvas de *G. mellonella*. (B) Trampa White. (C) Frasco de cultivo para almacenar NEP.

### Obtención y reproducción de *Plutella xylostella*

Larvas y pupas de *P. xylostella* se colectaron desde un cultivo de brásicas, ubicado en la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, y se criaron sobre plantas de repollo sin aplicación de plaguicidas, dentro de jaulas de tul de 50x50x50 cm<sup>3</sup> en el Laboratorio de Entomología de Cultivos de la Universidad de Chile (Figura 4A). Luego de comprobar la sanidad de la colonia, se trasladaron las larvas a jaulas de tul, de las mismas dimensiones, situadas en una cámaras a 25±5 °C y fotoperíodo de 10:14 O:L (oscuridad:luz) (Figura 4B). Las plantas se renovaron cuando fue necesario. Dentro de las jaulas se colocó un recipiente con una solución de miel al 10% y colorante amarillo, dispensada con algodón para la alimentación de los adultos.

Luego de que la población de la colonia de *P. xylostella* aumentó significativamente, se capturaron todos los adultos y se llevaron a una nueva jaula de tul para su reproducción, con una planta en su interior como sustrato de oviposición y un recipiente con solución para su alimentación (Figura 4C). La planta fue cambiada cada dos días por una planta nueva. Este procedimiento permitió que los huevos sobre las plantas tuvieran una diferencia máxima de 48 horas, y así obtener una gran cantidad de larvas en igual estado de desarrollo para la realización de los experimentos.



**Figura 4.** (A) Crianza “cuarentena”. (B) Crianza en cámara a 25±5°C y fotoperíodo de 10:14 O:L. (C) Jaula de oviposición

## Experimentos

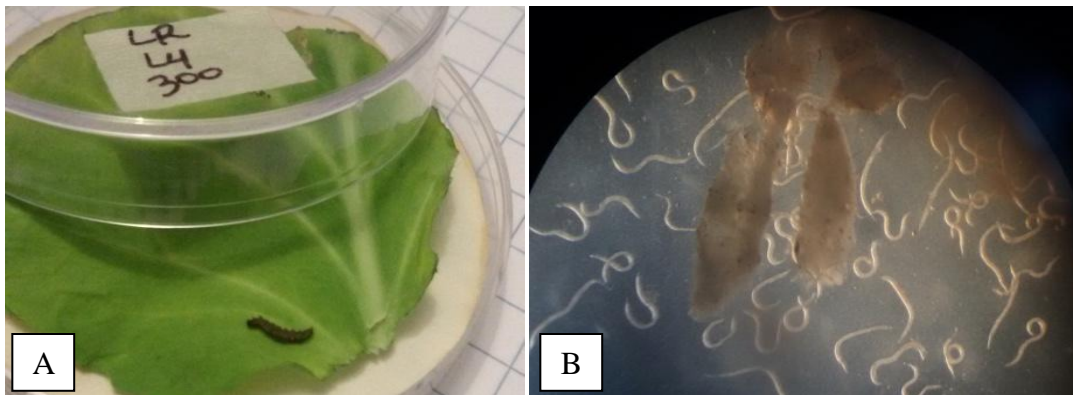
La mortalidad de larvas L2 y L4 de *P. xylostella* causada por los NEP *Steinernema* sp. Aislamientos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4 y el insecticida Lambda-cihalotrina se evaluó de la siguiente manera:

- Unidad experimental y diseño experimental: La unidad experimental correspondió a una Placa Petri de 6 cm de diámetro, con un disco de papel filtro en su base y sobre éste un disco de hoja de repollo, sobre el cual se puso una larva de *P. xylostella*, ya sea en estado L2 ó L4. Se utilizó un diseño en bloques completamente al azar con estructura factorial, con tres factores: aislamiento de NEP (3 niveles), el estado de desarrollo del hospedero (2 niveles) y la concentración de NEP/insecticida (5 niveles). El criterio de bloqueo fue la fecha de inoculación de las placas Petri y se realizó un total de 10 bloques.

- Aplicación de los NEP/insecticida: Sobre el disco de hoja de repollo se aplicó con una pipeta, 1 mL de una suspensión de agua destilada con 0 (concentración testigo), 100, 300 ó 600 J3/mL, o por inmersión, el insecticida Lambda-cihalotrina (nombre comercial: Zero 5EC®) a una concentración de 0,1 mL en 500 cm<sup>3</sup> de agua según etiqueta (200 mL producto en 1000 L de agua). Una hora después de la aplicación de las suspensiones sobre el disco, con un pincel se colocó una larva en estado L2 ó L4 en cada Placa, según el tratamiento.

-Evaluación de la mortalidad de las larvas: En cada tratamiento el número de individuos muertos se contabilizó cada 24 h a partir de la aplicación de los NEP o insecticida.

En el caso de los tratamientos con NEP, para verificar la muerte de las larvas por éstos, aquellas que mostraron signos de muerte por NEP (cambios de coloración de verde a marrón oscuro, cuerpo flácido) (Figura 5A), se les realizaron disecciones para verificar presencia de nemátodos (Figura 5B). Normalmente esto se hace mediante Trampas White pero en este caso, debido a que las larvas de *P. xylostella* evaluadas eran muy pequeñas en comparación con una larva de *G. mellonella*, éstas se deshidrataban y quedaban adheridas al disco de hoja de repollo o al papel filtro, por lo que no se podía extraer la larva sin provocarle algún daño.



**Figura 5.** (A) Larva L4 de *P. xylostella* infectada por NEP Licán Ray. (B) Larva disectada con presencia de NEP.



En paralelo a la inoculación de las larvas de *P. xylostella*, se establecieron “larvas centinela” de *G. mellonella*, que se inocularon en forma directa en placas Petri con las mismas soluciones de NEP utilizadas en los tratamientos. Este es un procedimiento utilizado en este tipo de experimentos, y se realiza para verificar la viabilidad de los NEP utilizados y la correcta aplicación de la metodología. El tratamiento centinela no se incluyó en los análisis estadísticos.

### Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con un Modelo Lineal Generalizado de respuesta binomial, dado que la variable a analizar fue vivo/muerto, considerando dos factores: "aislamiento/insecticida" y "tiempo de exposición". “Concentración” no se consideró como un factor dado que el control y el insecticida utilizaron sólo una concentración, mientras que los NEP se aplicaron en tres concentraciones. Al encontrarse diferencias significativas se realizó la prueba de comparación múltiple DGC. Se utilizó el software estadístico Infostat.

Dado que las observaciones se realizaban cada 24 horas a partir de la inoculación de las larvas de *P. xylostella* con los NEP y con el insecticida, para facilitar el análisis de los resultados, se establecieron rangos en relación al tiempo de exposición de las larvas de *P. xylostella* (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Rangos para clasificación de variable “ Tiempo de exposición”.

N° de observación	Nombre rango	Tiempo de exposición (horas)
1 <sup>ra</sup>	H1	0-24
2 <sup>da</sup>	H2	25-48
3 <sup>ra</sup>	H3	49-72
4 <sup>ta</sup>	H4	73-96
5 <sup>ta</sup> (última)	H5	> 96 (larva no muere durante periodo evaluado)



## RESULTADOS

El análisis de los resultados mostró que el factor “tiempo de exposición” es significativamente diferente entre tratamientos, así como el factor “aislamiento/insecticida”. Sin embargo el análisis de la interacción entre ambos factores no fue significativo ( $p > 0,05$ ), por lo que se procedió a analizar los factores Aislamiento/insecticida y tiempo de exposición de manera independiente (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Análisis estadístico de los factores "aislamiento/insecticida", "tiempo de exposición" y la interacción de ambos.

Factores	Chi-square	df	p-value
Tiempo de exposición	319,37	4	<0,0001
Aislamiento/insecticida	164,58	21	<0,0001
Tiempo de exposición * Aislamiento/insecticida	49,72	84	0,9989

El análisis de los resultados mostró que el factor tiempo de exposición H1 es el único que presenta diferencias estadísticamente significativas, con una sobrevivencia de larvas de un 100% (Cuadro 4).

A pesar de que los tiempos de exposición H2, H3, H4 y H5 no presentan diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia a la disminución del porcentaje de sobrevivencia de larvas de *P. xylostella* al incrementar el tiempo de exposición a los diferentes tratamientos. Los menores porcentajes de sobrevivencia se presentan en los tiempos de exposición H4 y H5 con 56% de sobrevivencia cada uno (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Sobrevivencia (% promedio  $\pm$  EE) de larvas L2 y L4 de *P. xylostella* en los diferentes rangos de tiempo de exposición, independiente del tratamiento aplicado de NEP/Insecticida.

Tiempo de exposición	Sobrevivencia (%)	
H 1	100 $\pm$ 1,65	a*
H 2	98 $\pm$ 2,63	b
H 3	85 $\pm$ 3,38	b
H 4	56 $\pm$ 3,27	b
H 5	56 $\pm$ 3,27	b

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Los resultados del análisis del factor aislamiento/insecticida indican que el tratamiento con insecticida Lambda-cihalotrina, aplicado en larvas L2 y el tratamiento con el aislado Chillán 4, concentración 600 J3/mL aplicado en larvas L4, fueron los únicos que presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el resto de los tratamientos, con un porcentaje de sobrevivencia de 34  $\pm$  6,9 % y de 2  $\pm$  7,1 % respectivamente (Cuadro 5).

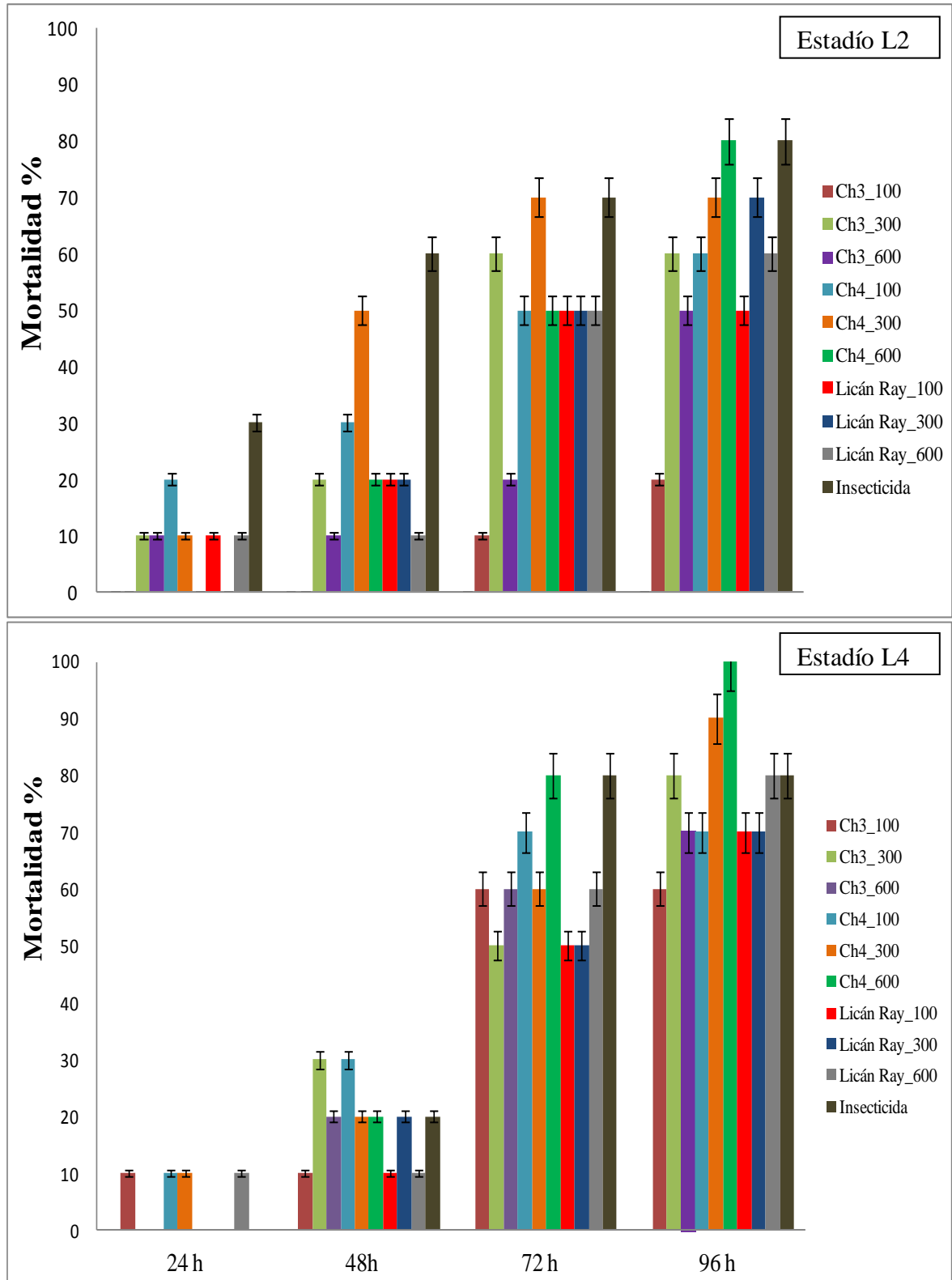
**Cuadro 5.** Supervivencia (% promedio  $\pm$  EE) de larvas L2 y L4 de *P. xylostella* a los NEP nativos *Steinernema* sp., aislamientos Licán Ray, Chillán 3, Chillán 4 en concentración de 100, 300 ó 600 J3/mL y al insecticida piretroide Lambda-cihalotrina en concentración de 0,1 mL/500 cm<sup>3</sup>, independiente del tiempo de exposición a dichos tratamientos.

Estadio larval	Aislamiento/ Insecticida	Concentración	Supervivencia	
L4	Control	0	100 $\pm$ 0	a*
L2	Control	0	100 $\pm$ 0	a
L2	Chillán 3	100	100 $\pm$ 4,3	a
L2	Chillán 3	300	64 $\pm$ 7	a
L2	Chillán 3	600	77 $\pm$ 6,4	a
L4	Chillán 3	100	66 $\pm$ 7	a
L4	Chillán 3	300	97 $\pm$ 7,1	a
L4	Chillán 3	600	98 $\pm$ 7,1	a
L2	Licán Ray	100	68 $\pm$ 6,9	a
L2	Licán Ray	300	97 $\pm$ 7,1	a
L2	Licán Ray	600	68 $\pm$ 6,9	a
L4	Licán Ray	100	98 $\pm$ 7	a
L4	Licán Ray	300	98 $\pm$ 7,1	a
L4	Licán Ray	600	56 $\pm$ 7,1	a
L2	Chillán 4	100	57 $\pm$ 7,1	a
L2	Chillán 4	300	50 $\pm$ 7,1	a
L2	Chillán 4	600	97 $\pm$ 7,1	a
L4	Chillán 4	100	53 $\pm$ 7,1	a
L4	Chillán 4	300	50 $\pm$ 7,1	a
L4	Chillán 4	600	2 $\pm$ 7,1	b
L2	Lambda-cihalotrina	0,1	34 $\pm$ 6,9	b
L4	Lambda-cihalotrina	0,1	97 $\pm$ 7,1	a

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Al comparar los aislamientos de NEP utilizados en este experimento, las larvas tratadas con Chillán 4 fueron las que presentaron los menores porcentajes de supervivencia, seguido del aislamiento Licán Ray. En la mayoría de los casos las concentraciones de 300 y 600 J3/mL de NEP presentaron los menores porcentajes de supervivencia (Cuadro 5).

En la Figura 6 se presentan los resultados de mortalidad durante los 4 días de evaluación posteriores a la aplicación de los tratamientos. En el tratamiento control (que consistió en 1 mL de agua destilada), no se observó muerte de larvas durante el periodo evaluado, por lo que estos resultados no fueron incluidos en la figura. Se observó una mayor mortalidad en larvas de *P. xylostella* L4 que en las L2. También se observó que en L2 la mortalidad comenzó más rápido, a las 24 horas después de la inoculación, pero en larvas L4 se presentaron los mayores porcentajes de mortalidad con el NEP nativo Chillán 4, luego le siguió Licán Ray y la menor mortalidad se presentó en tratamientos con los NEP nativos Chillán 3. Esto fue más evidente a las 96 horas después de aplicado el tratamiento (Figura 6)



**Figura 6.** Mortalidad (% promedio  $\pm$  EE) de larvas de *P. xylostella* en estadío L2 y L4 expuestas a los tres aislamientos nativos de NEP y al insecticida, en los diferentes tiempos de exposición.

## DISCUSIÓN

Los tres aislamientos nativos de NEP evaluados en este estudio causaron mortalidad en las larvas de *P. xylostella*, lo que implica que los nemátodos fueron capaces de penetrar en las larvas y que las bacterias simbióticas asociadas con estos NEP son letales para éstas (Niyasani *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios que también han reportado la eficacia de diferentes NEP de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* contra larvas de *P. xylostella* (Somvanshi y Ganguly, 2007; Saenz, 2012; Vashisth *et al.*, 2017).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, al aumentar el tiempo de exposición de las larvas de *P. xylostella* a los tres aislamientos nativos de NEP, la sobrevivencia de éstas disminuye llegando a un 56% a partir de las 73 horas. Otros autores han observado resultados similares, como Nyasani *et al.* (2008), al evaluar cinco aislamientos de NEP sobre *P. xylostella* (*Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis sp.*, *Steinernema kari*, *S. wesieri*, *Steinernema sp.*). Los autores observaron un aumento lineal de la mortalidad de las larvas al aumentar el tiempo de exposición a los NEP, donde a las 24 h el porcentaje de mortalidad de las larvas de *P. xylostella* era más bajo, alcanzando los mayores valores a las 72 h para todos los aislamientos de NEP.

Por su parte, Zolfagharian *et al.* (2014), también observaron que el NEP *S. carpocapsae* causó 88 % de mortalidad sobre larvas de estadio L3 de *P. xylostella* a las 24 h y 100% a las 48 y 72 h, concluyendo que al aumentar el tiempo de exposición a este NEP, la mortalidad de larvas de *P. xylostella* se incrementa.

Tolera *et al.* (2016), evaluaron tres aislamientos de *Steinernema* y dos de *Heterorhabditis* sobre este lepidóptero y todos causaron infección y mortalidad sobre larvas L3 a las 24 horas y el mayor porcentaje de mortalidad fue registrado a las 72 horas después de aplicado el tratamiento en todos los aislamientos. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los aislados de NEP en relación al porcentaje de mortalidad y el tiempo necesario para matar a las larvas.

Vashisth *et al.* (2017), indican que además de la cualidades intrínsecas de los NEP, la eficacia de éstos está muy influenciada por la concentración aplicada. En su estudio evaluaron un total de cuatro especies/aislamientos pertenecientes al género *Heterorhabditis*, en concentraciones de 10, 20, 30 y 40 J3/mL, y la mortalidad se evaluó después de 24, 48, 72 y 96 horas de inoculación. Concluyeron que existe una correlación positiva entre la concentración de NEP y la mortalidad del huésped para todos los aislamientos analizados, siendo la concentración de 40 J3/larva la que presenta la mayor mortalidad a las 96 horas después de la inoculación.

Asimismo, Tolera *et al.* (2016), evaluaron dos aislados, *Steinernema sp.* y *Heterorhabditis sp.* bajo condiciones de invernadero a cuatro concentraciones 0, 300, 400 y 500 J3/mL, produciéndose los niveles de mortalidad más altos a la concentración mayor de NEP en los tres horarios de evaluación, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación del tratamiento.

También en un estudio realizado por Somvanchi et al. (2005), donde utilizaron el NEP *Steinernema thermophilum* en tres concentraciones (1000, 2000 ó 3000 J3/mL), el insecticida Lambda Cyahalothrin a 0,0025% y un tratamiento control con sólo agua, observaron que *S. thermophilum* en concentraciones de 3000 J3/mL causó mortalidad sobre larvas de *P. xylostella* de 46%, mientras que la concentración de 2000 J3/ml y el tratamiento insecticida causaron 40,5 y 40% de mortalidad, respectivamente. Sin embargo, la diferencia entre los tratamientos no fue significativa. La mortalidad en los tratamientos mostró un ligero aumento con el incremento de las temperaturas, y la infectividad de los J3 sobre las larvas de *P. xylostella* incrementó con el aumento de la concentración de éstos.

Esto concuerda con los resultados de este estudio, que indican que, si bien no hubo diferencias significativas entre la mayoría de las concentraciones de NEP utilizadas, las concentraciones de 300 y 600 J3/mL fueron las que tuvieron los menores porcentajes de sobrevivencia, siendo el tratamiento con el aislado Chillán 4, concentraciones 600 J3/mL aplicado en larvas de estadio L4, el único que presentó diferencias estadísticas con un 2% de sobrevivencia, bastante menor que los porcentajes presentados por el insecticida Lambda-cihalotrina en ambos estadios larvales de *P. xylostella*. Probablemente entre mayor sea la densidad de NEP sobre el papel filtro en la placa Petri, hay una mayor posibilidad de que éstos entre en contacto con la larva o sobrepasen sus mecanismos de defensa (Rodríguez *et al.*, 2009).

En el caso de los aislamientos evaluados, se observó que en general el NEP Chillán 4 fue el que presentó los mayores porcentajes de mortalidad, seguido del NEP Licán Ray. Esto también se observó en un estudio en macetas donde el NEP Chillán 4 causó mayor mortalidad sobre *Agrotis bilitura* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae), que el aislamiento nativo Licán Ray, y además se pudo apreciar una mayor velocidad del aislado Chillán 4 en causar la muerte del hospedero (Burgos, 2017).

En la presente investigación las larvas L4 fueron más susceptibles que las larvas L2. Diversas causas podrían explicar las diferencias en el grado de susceptibilidad a NEP, asociada a los estados de desarrollo del hospedero, una de ellas es el tamaño de los orificios naturales de las larvas (espiráculos, ano y boca), que son la principal puerta de entrada de los NEP (Melo-Molina *et al.*, 2007). Por lo tanto, los NEP poseen una mayor eficacia cuando el hospedero es más grande, ya que pueden penetrar con mayor facilidad por espiráculos, ano y boca.

Schroer y Ehlers (2005), observaron que la búsqueda y la invasión del hospedero por los NEP parecen ser un factor importante en el control de *P. xylostella*. La invasión de NEP es un proceso activo, y no de ingestión en larvas de esta especie, ya que este insecto puede detectar NEP en su dieta y levantar la cabeza para evitar la penetración. A través de exámenes visuales probaron que los NEP no son ingeridos por larvas de *P. xylostella*. La invasión del NEP *Steinernema carpocapsae* es un proceso activo por el ano debido a que los espiráculos son simplemente demasiado pequeños para la penetración del NEP. Los autores sugieren esto a partir de los resultados que observaron sobre mortalidad de *P. xylostella* por NEP al comparar la aplicación de los NEP en papel filtro y en discos de hojas de repollo. Consideraron que *P. xylostella* ingeriría J3, por lo que la mortalidad

causada por NEP sería mayor en los discos de hoja de repollo que en los discos de papel filtro. Sin embargo, registraron lo contrario, lo que sugiere que la estructura porosa del papel filtro puede apoyar la invasión del NEP en las larvas incluso mejor que la hoja de repollo.

Ratnasingue y Hague (1998) observaron que *Steinernema carpocapsae* fue más efectivo en hospederos más grandes, ya que en hospederos pequeños sólo se desarrolló una generación del NEP comparado con las 2-3 generaciones en hospederos más grandes como *G. mellonella*. También Navon et al. (2002), informaron que los insectos más pequeños, tales como *P. xylostella*, sufrieron menores tasas de mortalidad debido a la exposición a NEP que *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) o *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). En otros insectos como *Simulium vittatum* (Zetterstedt, 1838) (Diptera: Simuliidae) se ha reportado que en sus estados iniciales son menos susceptibles a NEP (58%) que los más desarrollados (97%).

Así mismo, en un estudio que evaluó el uso de NEP para el control de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard, 1850) (Coleoptera: Melolonthidae) y *Anomala inconstans* (Burmeister, 1844) (Coleoptera: Melolonthidae) se mencionan diversas características de tipo morfológico, fisiológico y hasta genético que estarían influyendo en su control, como el diámetro menor de los espiráculos en larvas jóvenes, las placas sobre éstos que impiden la penetración del patógeno, la frecuente defecación, en la que se expulsa a los NEP, comportamientos defensivos y evasivos de las larvas, una fuerte respuesta inmune asociada a la edad, donde estados más desarrollados pueden eliminar patógenos invasores, los estados iniciales juveniles poseen una respuesta de anticuerpos más baja que los estados más desarrollados; la menor producción de CO<sub>2</sub> y kairomonas en L1 y L2, lo que dificulta que los NEP encuentren a su hospedero y la cutícula en L3, la cual es difícil de penetrar por su grosor (Melo-Molina *et al.*, 2007)

Rodríguez et al. (2009), también señala que la virulencia podría estar relacionada con la interacción entre el nematodo, la bacteria y la larva, más que a una característica general específica como tamaño del cuerpo o aberturas naturales. Además, indica que a la fecha no se pueden hacer generalizaciones sobre el efecto de los nematodos en el ciclo de vida del insecto y en la susceptibilidad de diferentes insectos, ya que los mecanismos de interacción larva-NEP-bacteria varían de un estadio a otro y de una especie a otra.

El conocimiento de la capacidad infectiva de los NEP sobre los diferentes estadios del insecto tiene implicaciones prácticas, ya que permitiría realizar las aplicaciones en el momento adecuado, limitando el ataque a las plantas al aplicar los NEP en el estadio más susceptible de la plaga, cuando ésta es más propensa a un control efectivo (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en este experimento sugieren que los aislamientos nativos de NEP *Steinernema* sp., Chillán 3, Chillán 4 y Licán Ray tienen potencial para ser utilizados como agentes de control biológico de *P. xylostella*, llegando a niveles de mortalidad equivalentes o mayores que los logrados con un insecticida sintético, por lo que se sugiere continuar con más estudios para el control de esta plaga bajo condiciones de invernadero y campo.

## CONCLUSIONES

- En condiciones de laboratorio, los NEP nativos Licán Ray, Chillán 3 y Chillán 4 causan mortalidad sobre larvas de estadio L2 y L4 de *P. xylostella* y en algunos casos, con niveles similares a los causados por el insecticida Lambda-cihalotrina bajo las mismas condiciones.
- La sobrevivencia de larvas de estadio L2 y L4 de *P. xylostella* tiende a disminuir con el aumento del tiempo de exposición a los NEP nativos. Los menores porcentajes de sobrevivencia se observan a partir de las 73 horas después de la inoculación, y corresponde a un 56%.
- En general, la mortalidad de las larvas de *P. xylostella* se incrementó al aumentar las concentraciones de J3 de los tres aislamientos de NEP, siendo 300 y 600 J3/mL, las más efectivas.

En términos generales, Chillán 4 y Chillan 3 son los aislamientos que causaron mayor y menor porcentaje de mortalidad, respectivamente, sobre larvas de *P. xylostella*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A. and K. Nguyen. 2002. Taxonomy and systematics. pp. 1-33. *In*: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 388 p.
- Badii, M. y J. Abreu. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Daena: International Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89.
- Burgos, E. 2017. Efecto del ataque de nematodos entomopatógenos nativos del género *Steinernema* sobre el gusano cortador de la papa (*Agrotis bilitura* Guenée) en condiciones de laboratorio. Tesis de Magister en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.
- Bujanos, R.; A. Marín; L. Díaz; A. Gámez; M. Ávila; R. Herrera et al. 2013, dic. Manejo integrado de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L.) en la región del Bajío, México (Inf. Téc. N° 27), Centro de Investigación Regional Centro, Campo Experimental Bajío Celaya, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Bajío, México: INIFAP. 40p.
- Contreras, L. 2011. Utilización de un extracto alcohólico de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) para el control de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Memoria Ingeniero Agrónomo. Valdivia, Chile: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 54h.
- Da Solidade, L.; V Wanderley-Teixeira; F. Magliano; A. Coelho and H. Abreu. 2012. Immunological response of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2): 208-214.
- Edgington, S.; A. Buddie; D. Moore; A. France; L. Merino; L. Tymo et al. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Nematology*, 12(6): 915-928.
- Fan, X.; A. Maggiorani and S. Gudiño. 2000. Uso de nemátodos entomopatógenos como una alternativa de control de polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanun tuberosum*). *Revista Forestal Venezolana*, 44(1): 115-118.
- FIA (Fundación para la innovación agraria), Chile. 2011. Resultados y lecciones en biocontrol del cabrito de los Frutales con nemátodos entomopatógenos: proyecto de innovación en Regiones del Biobío, de La Araucanía, de Los Ríos y de Los Lagos, valorización a mayo de 2011. [Santiago, Chile]: FIA. 30 p. (Serie Experiencias de Innovación para el emprendimiento agrario).
- Forst, S. and D. Clarke. 2002. Bacteria–Nematode Symbiosis. pp. 57- 78. *In*: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 388 p.



- Gaugler, R.; E. Lewis and R. Stuart. 1997. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109(4): 483-489
- Hazir, S.; H. Kaya; S Stock and N. Keskün. 2004. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27(4): 181-202.
- Jiang, T.; S. Wu; T. Yang; C. Zhu and C. Gao. 2015. Monitoring field populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) for resistance to eight insecticides in China. *Florida Entomologist*, 98(1): 65-73.
- Kaya, H. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Reviews Entomology*, 38: 181-206.
- Kaya, H. and P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology (cap. 6, pp. 281-314). In: Lacey, L. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. San Diego, EE.UU: Academic Press. 395p.
- Koppenhöfer, A. 2007. Nematodes. (cap. 5, pp. 249-264). In: Lacey, L. and Kaya, H. (Eds.). Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pest. 2<sup>nd</sup> ed. [s.l.]: Springer Netherlands. 868p.
- Lacey, L. and R Georgis. 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2): 218-225.
- Lewis, E.; R. Gaugler and R. Harrison. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105(2): 309-315.
- McCoy, C.; R. Stuart; L. Duncan and K. Nguyen. 2002. Field efficacy of two commercial preparations of entomopathogenic nematodes against larvae of *Diaprepes abbreviatus* (coleoptera: Curculionidae) in alfisol type soil. *Florida Entomologist*, 85(4): 537-544.
- Melo-Molina, E.; C. Ortega -Ojeda y A. Gaigl. 2007. Efecto de nematodos sobre larvas de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 33(1): 21-26.
- Merino, L. y A. France. 2009, may.-jun. Nemátodos entomopatógenos: Control biológico de insectos de importancia económica. *INIA Tierra Adentro*, 84: 24-25.
- Morton, A. 2009. Los nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Tesis Doctoral. Barcelona, España: Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. 179h.

Navon, A.; V. Nagalakshmi; L. Shlomit; L. Salame and I. Glazer. 2002. Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopterous pests. *Biocontrol Sci. Technol.*, 12: 737–746.

Nyasani, J.; F. Kimenju; F. Olubayo; S. Shibairo and G. Mutua. 2008. Occurrence of entomopathogenic nematodes and their potential in the management of Diamond back moth in Kale. *Asian Journal of Plant Science*, 7(3): 314-318.

Rasmann, S.; T. Köllner; J. Degenhardt; I. Hiltbold; S. Toepfer; U. Kuhlmann et al. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434: 732-737

Ratnasinghe, G. and N. Hague. 1998. The invasion, development and reproduction of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) in the diamondback, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Nematropica*, 28:1-6.

Ravensberg, W. 2011. Mass Production and Product Development of a Microbial Pest Control Agent. pp. 86-155. In: A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. Springer Netherlands. 10(1): 410 p. (Progress in Biological Control)

Realpe, A.; P. Bustillo y J. López. 2007. Optimización de la cría de *Galleria Mellonella* (L.) para la producción de nemátodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafe*. 58(2): 142-157.

Rodríguez, D.; M. Torres; L. Uribe1 y L. Flores. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 33(2): 171-182.

Rodríguez, M.; R. Enrique; L. Gómez; D. Hernández-Ochandía; I. Miranda; A. Hernández et. al. 2013. Impact of entomopathogenic nematode applications on diamond back moth population. *Revista Protección Vegetal*, 28(2): 158-160.

Rosa, M.; J. Araya; M. Gerrero y L. Lamborot. 1997. Niveles de resistencia de *Plutella xylostella* (L.) a tres insecticidas en varias localidades de la zona central de Chile. *Sanidad Vegetal Plagas*, 23: 571-581.

Sáenz, A. 2003. Eficacia de invasión de *Tecia solanivora* y *Clavipalpus ursinus* por el nematodo *Steinernema feltiae*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 67: 35-43.

Sáenz, A. 2012. Susceptibilidad de *Plutella xylostella* a *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 38 (1): 94-96.

Sáenz, A. y W. Olivares. 2008. Capacidad de búsqueda del nemátodo entomopatógeno *Steinernema* sp. SNIO 198 (Rhabditida: Steinematidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 34(1): 51-56.

- Salem, S.; H. Abdel-Rahman; C. Zebitz and M. Saleh. 2007. Evaluation of entomopathogenic nematodes in controlling some cabbage pests. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(4): 323-328.
- Santos, V.; H. Siqueira; J. Da Silva and M. Farias. 2011 .Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. *Neotropical Entomology*, 40(2): 264-270.
- Sarfraz, M.; A. Keddie and L. Dossall. 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Biocontrol Science and Technology*, 15(8): 763-789.
- Sarfraz, M.; L. Dossall and B. Keddie. 2007. Resistance of Some Cultivated Brassicaceae to Infestations by *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(1): 215-224.
- Schroer, S. and R. Ehlers. 2005. Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Biological Control*, 33: 81–86.
- Shapiro-Ilan, D.; D. Gouge; S. Piggott and J. Patterson. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38:124–133.
- Shelton, A.; F. Sances; J. Hawley; J. Tang; M. Boune; D. Jungers et. al. 2000. Assessment of insecticide resistance after the outbreak of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) in California in 1997. *Journal of Economic Entomology*, 93(3): 931-936.
- Silva-Torres, C.; I. Pontes; J. Torres and R. Barros. 2010. New Records of Natural Enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. *Neotropical. Entomology*, 39(5): 835-838 p.
- Somvanshi, V.; S. Ganguly and A. Paul. 2005. Field efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh (Rhabditida: Steinernematidae) against diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) infesting cabbage. *Biological Control*, 37: 9–15.
- Somvanshi, V. and S. Ganguly. 2007. Efficacy of foliar applications of entomopathogenic nematodes against the crucifer diamondback moth, *Plutella xylostella*- a review. *Nematologia Mediterranea*, 35: 5-14.
- Talekar, N. and A. Shelton. 1993. Biology, Ecology and Management of the Diamondback Moth. *Annual Reviews Entomology*, 38: 275-301.
- Tolera, G.; T. Hailu; M. Dawd; M. Negeri and T. Selvaraj. 2016. Evaluation of entomopathogenic nematodes against Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on Cabbage under Laboratory and Glasshouse Conditions. *Journal of Agricultural Technology*, 12(5): 879-891.

Vashisth, S.; Y. Chandel; R. Chandel and P. Sharma. 2017. Pathogenicity of *Heterorhabditis* nematodes isolated from north-western Himalaya against the larvae of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). pp 204-210. *In: Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*. International journal of entomology. 53(3): 373 p.

White, G. 1927. A method for obtaining infective nematodes larvae from cultures. *Science*, 66: 302-303.

Zolfagharian, M.; A. Saedizadeh; H. Abbasipour; A. Joyandeh and A Yazdi. 2014 Efficacy of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) in laboratory conditions. pp 393-399. *In: Phytopathology and Plant Protection* 48(5):458 p.