



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**ESTADO DEL ARTE DE LAS INTERACCIONES ENTRE NEMÁTODOS
ENTOMOPATÓGENOS Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL
CONTROL DE INSECTOS PLAGA**

DIEGO IGNACIO BÓRQUEZ CERDA

**Santiago, Chile
2021**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**ESTADO DEL ARTE DE LAS INTERACCIONES ENTRE NEMÁTODOS
ENTOMOPATÓGENOS Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL
CONTROL DE INSECTOS PLAGA**

**STATE OF THE ART IN THE INTERACTIONS BETWEEN
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AND ENTOMOPATHOGENIC FUNGI
FOR THE CONTROL OF INSECT PESTS**

DIEGO IGNACIO BÓRQUEZ CERDA

**Santiago, Chile
2021**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

ESTADO DEL ARTE DE LAS INTERACCIONES ENTRE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA

Memoria para optar al título:
Profesional de Ingeniero Agrónomo.

DIEGO IGNACIO BÓRQUEZ CERDA

PROFESORES GUÍA

Sr. Erwin Aballay E.
Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc. Ph.D.

7,0

Sra. Gabriela Lankin V.
Ingeniera Agrónoma, Mg. Sc., Ph.D.

7,0

PROFESORES EVALUADORES

Sr. Jaime R. Montealegre A.
Ingeniero Agrónomo

7,0

Sra. M. Teresa Varnero M.
Química Farmacéutica

6,4

Santiago, Chile
2021

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
Hongos entomopatógeno (HEPs): Hypocreales	7
Biología & Ecología.....	7
Proceso infectivo de Hypocreales y Barreras a la infección.....	8
Nemátodos entomopatógenos (NEPs): Steinernematidae y Heterorhabditidae	13
Clasificación & Ecología.....	13
Proceso infectivo de Steinernematidae y Heterorhabditidae.....	14
Factores que afectan la eficacia.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Efectos de la aplicación combinada de HEP y NEP sobre insectos plaga	17
Efectos sinérgicos.....	17
Mecanismos claves de los efectos sinérgicos.....	18
Efectos aditivos.....	19
Mecanismos claves de los efectos aditivos.....	20
Efectos antagónicos.....	20
Mecanismos claves de los efectos antagónicos.....	21
Factores y procedimientos estadísticos utilizados en la evaluación de las interacciones entre HEP y NEP	23
Factores.....	23
Agentes de control biológico.....	23
Hospedero.....	24
Dosis de aplicación.....	24

Tiempo de evaluación.....	24
Intervalo de aplicación.....	24
Temperatura.....	25
Procedimientos estadísticos.....	25
Compilación de efectos sobre la mortalidad de insectos plaga.....	26
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40

RESUMEN

Una opción para el manejo sustentable de plagas es la utilización de una combinación de dos tipos de agentes de biocontrol para alcanzar mayor efectividad en el control, reducir los costos mediante menores dosis de aplicación e incrementar la consistencia del control. En este contexto, los hongos y los nemátodos patógenos de insectos (HEP y NEP, respectivamente) poseen muchos atributos positivos como agentes de control biológico de importantes plagas de insectos, y su uso conjunto presenta un gran potencial.

Durante las últimas décadas se han realizado gran cantidad de estudios para tratar de comprender los efectos del uso conjunto de NEP y HEP, y determinar su potencial en el control biológico de plagas, pero no se encuentra disponible material actualizado que recopile y organice la información. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue conocer el estado del arte con relación a las interacciones que HEP y NEP establecen al ser utilizados conjuntamente en el control biológico de insectos.

Los resultados obtenidos del presente trabajo fueron variables, lo cual puede ser explicado por numerosos factores. Sin embargo, generalmente la utilización combinada de ambos organismos produce efectos aditivos o sinérgicos sobre la mortalidad (40,8% y 37,2% del total de efectos recopilados, respectivamente). Por ende, en la mayoría de los casos una aplicación combinada produce efectos (mortalidades) iguales o mayores que la suma de las aplicaciones de HEP y NEP por separado. No obstante, también existe evidencia que HEP y NEP pueden interactuar antagónicamente dadas ciertas condiciones. Cabe destacar, que la utilización de ambos organismos produce efectos nocivos sobre su reproducción en la mayoría de los estudios que fueron evaluados, por lo que es un factor para considerar en dichas aplicaciones.

Por otra parte, de acuerdo con la literatura consultada, los mecanismos que conducen a estos resultados permanecen desconocidos, especialmente para los casos de los efectos aditivos y sinérgicos. Es imprescindible profundizar en estas interrogantes para explicar estas inconsistencias.

Palabras clave: control biológico, Hypocreales, Steinernematidae, Heterorhabditidae, aplicaciones duales.

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes and fungi (EPN and EPF, respectively) have many positive attributes as biological control agents of important insect pests. One approach within the options of sustainable management practices of pest control is the use of a combination of two types of biocontrol agents to improve the effectiveness, reduce costs due to lower application rates, and increase control consistency.

During the last decades, many studies have been carried out to understand the effects of the combinations of EPN and EPF, and to determine their potential role in the biological control of pests, but no updated material is available that gathers and organizes the information. Therefore, the objective of this work was to know about the state of the art of the interactions between EPN and EPF when applied together in the biological control of insects.

The results obtained from the present work were variable, which can be explained by numerous factors. However, generally, the use of both organisms produces additive or synergistic effects on pest mortality (40,8% and 37,2% of total effect, respectively). Therefore, an application of both agents combined would yield results greater than or equal to the sum of both agents applied separately. Nevertheless, there is also evidence that EPF and EPN can interact antagonistically under certain conditions. It should be noted that the use of both organisms produces harmful effects on their reproduction in most of the studies that were evaluated, so it is a factor to consider in such applications.

On the other hand, according to the literature consulted, the mechanisms that lead to these results remain unknown, especially in the case of additive and synergistic effects. It is essential to further investigate these questions in order to explain these inconsistencies.

Keywords: biological control, Hypocreales, Steinernematidae, Heterorhabditidae, dual applications.

INTRODUCCIÓN

En la agricultura existe un gran interés en reducir el uso de insecticidas sintéticos por el riesgo que suponen a la salud humana, al medio ambiente, a la fauna benéfica y al desarrollo de resistencia en plagas. Frente a esta situación, una alternativa que ha sido explorada en las últimas décadas a nivel mundial es el uso de organismos entomopatógenos como agentes de biocontrol, ya que son considerados seguros para el ser humano y su especificidad minimiza el impacto en organismos benéficos y en el medio ambiente (Lacey *et al.*, 2015).

Existe un grupo de hongos referidos como hongos entomopatógenos (HEPs), los cuales son capaces de atacar insectos u otros artrópodos como ácaros y causarles enfermedades y la muerte (Chandler *et al.*, 2000; Chandler, 2017). Muchos HEPs son relativamente comunes, encontrándose asociados a prácticamente todos los órdenes de insectos que habitan diversos ambientes, incluyendo los de agua dulce, suelos y localizaciones aéreas (Hajek y St. Leger, 1994). También son capaces de inducir epizootias, lo que les confiere un rol importante en la regulación de poblaciones de insectos en la naturaleza (Hajek y St. Leger, 1994). Consecuentemente, estos organismos manifiestan un gran potencial y han sido ampliamente estudiados para su uso en el control de una variedad de insectos nocivos para la agricultura (incluyendo horticultura, fruticultura, silvicultura y ganadería) (Lacey *et al.*, 2015). Se estima que existen entre 750 a 1000 especies y más de 100 géneros de HEPs, distribuidos en los grupos taxonómicos Blastocladiomycota, Basidiomycota, Ascomycota, Microsporidia y Entomophthoromycota (ahora conocido como Zoopagomycota) (Vega *et al.*, 2012; Spatafora *et al.*, 2017). Los principales grupos utilizados en el control biológico de plagas y los más abundantes en términos de especies lo constituyen los Hypocreales y los Entomophthoromycota (Chandler, 2017).

Un segundo grupo de organismos son los nemátodos entomopatógenos (NEPs), los cuales corresponden a un linaje único de nemátodos, parásitos letales de insectos, que forman relaciones mutualistas con bacterias, provocando la muerte de sus hospederos dentro de cinco o menos días desde la infección (Dillman *et al.*, 2012). Esta asociación mutualista se basa en una relación, donde la bacteria depende del nemátodo para protegerse del ambiente externo, transportarse entre hospederos, penetrar en el hemocele e inhibir proteínas antimicrobiales del hospedero. A su vez, el nemátodo requiere de la bacteria para matar rápidamente a su hospedero, degradar los tejidos de éste, servir como alimento a nuevas generaciones de NEP y suprimir el desarrollo de organismos competidores mediante la producción de antibióticos para el óptimo crecimiento del nemátodo (Shapiro *et al.*, 2017). Los grupos utilizados en el control biológico corresponden a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Shapiro *et al.*, 2017).

Por otra parte, existe evidencia que el uso combinado de distintos agentes de biocontrol puede aumentar la eficacia del control cuando se produce una interacción sinérgica o un efecto aditivo entre los organismos (Ansari *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 2019). Además, las interacciones sinérgicas podrían reducir los costos de aplicación debido a que cada agente sería usado en dosis menores (Ansari *et al.*, 2006). Una aplicación combinada

puede incrementar la susceptibilidad del insecto hospedero a través de la modulación de su sistema inmune, prolongando las etapas de desarrollo o por la acción de los tratamientos en diferentes componentes de la población plaga (Lacey *et al.*, 2015).

Sin embargo, la interacción puede también conducir a efectos antagónicos (Barbercheck y Kaya, 1990; Shapiro *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2007). Según Shapiro *et al.* (2004), este antagonismo podría deberse a toxinas producidas por los entomopatógenos después de iniciada la infección. En el mismo sentido, Molina *et al.* (2007) observaron antagonismo, como resultado de competencia por la obtención de los nutrientes necesarios para reproducirse exitosamente, siendo el NEP el más virulento de los agentes utilizados, suprimiendo el desarrollo del HEP. Finalmente, el tipo de interacción que se tenga como resultado dependerá de las especies que están siendo combinadas, el insecto hospedero y parámetros de aplicación (Ansari *et al.*, 2004).

Debido a su distribución ubicua en ecosistemas naturales y agrícolas, HEP y NEP a menudo coexisten, lo que se traduce en oportunidades para el desarrollo de interacciones entre ambos organismos. Conocer estas interacciones es fundamental para comprender sus implicancias en el ecosistema y sus potenciales usos en la agricultura (Zhang *et al.*, 2020b).

En la literatura existe una gran cantidad de estudios en los cuales se evalúa la eficacia de control de HEP y NEP de manera combinada, sin embargo, no se encuentra disponible información actualizada que consolide y sistematice esta información de forma clara y precisa. Por lo tanto, el objetivo de esta monografía se orienta a establecer el estado del arte en relación a las interacciones entre NEP y HEP como controladores biológicos, con la finalidad de definir el potencial de control de plagas cuando ambos tipos de microorganismos son utilizados conjuntamente.

Objetivo general

- Establecer el estado del arte en relación con las interacciones que ocurren entre NEP y HEP al ser utilizados conjuntamente para el control de insectos plagas.

Objetivos específicos

- Describir los tipos de interacciones que ocurren entre NEP y HEP en aplicaciones combinadas para el control de insectos plaga.
- Describir los factores que afectan la compatibilidad de las combinaciones entre NEP y HEP y los procedimientos estadísticos comúnmente utilizados para determinar sus efectos.
- Compilar información de la literatura nacional e internacional en relación con las aplicaciones duales de HEP y NEP y sus efectos sobre la mortalidad de insectos plaga.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo durante los meses de septiembre del 2020 y abril del 2021 vía remota. El proceso de recopilación de información se realizó entre los meses de septiembre y diciembre. Posteriormente, se procedió al análisis de la información y a la redacción de la memoria.

Para la recopilación de la información se realizó una búsqueda exhaustiva de literatura científica entre los años 1990 y 2021, priorizando la selección de material lo más actual posible. Para lo anterior, se consultó libros, memorias, tesis y artículos de revistas nacionales e internacionales publicadas en diversos servicios de información científica tales como ISI - Web of Science, Science direct, Wiley, entre otras. Para ello se utilizaron palabras claves en inglés y español como sinergismos, interacciones NEP-HEP y control biológico, entre otras.

En cuanto a los pasos a seguir, en primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica sobre los principales grupos de agentes utilizados en el control biológico de plagas (agroforestales y ornamentales) de HEP (Orden: Hypocreales) y NEP (Familias: Steinernematidae y Heterorhabditidae), enfocándose en aspectos generales como su biología, ecología, clasificación y procesos infectivos. Esto se realizó con la finalidad de entregar antecedentes que ayuden a la organización de la información y la comprensión de los objetivos de la monografía por parte del lector. Además, lo anterior se acompañó de figuras y esquemas para reforzar conceptos y destacar aspectos relevantes.

Posteriormente, se presentó información sobre discusiones y resultados en torno a la temática de los efectos de la combinación entre NEPs y HEPs sobre insectos plaga. Se describieron los tipos de efectos y se elaboró un cuadro resumen basado en una recopilación de 32 estudios de efectos entre HEP/NEP. Para cada estudio, se registró las especies de organismos evaluadas, el/los tipos de efectos presentados, las condiciones experimentales y los tiempos de aplicación.

Finalmente, se presentaron las reflexiones finales con relación a las aplicaciones duales de HEP y NEP para el control de insectos plaga.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Hongos entomopatógenos (HEP): Hypocreales

Biología & Ecología

Los hongos son organismos eucariontes, heterótrofos y como tales su nutrición se basa en la absorción de sustancias elaboradas por otros seres vivos. Los hongos pueden reproducirse vía sexual y/o asexual y en la literatura existen varios términos para describir estos tipos de reproducción como, anamorfo (asexual) o teleomorfo (sexual) (Vega *et al.*, 2012). Típicamente, poseen cuerpos ramificados, compartimentados, de forma tubular, denominados hifas, cuyas células están envueltas en paredes de quitina y glucano. Un conjunto de hifas se conoce como micelio y constituye la parte del crecimiento vegetativo del hongo, aunque existen formas unicelulares de crecimiento como las exhibidas por las levaduras (Vega *et al.*, 2012; Chandler, 2017).

Hypocreales es un orden dentro de la clase Sordariomycetes (phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina) que comprende un diverso grupo de hongos que utilizan recursos animales, vegetales y fúngicos, pudiendo actuar como saprótrofos, endófitos, simbioses como levaduras, patógenos de nemátodos y microinvertebrados, patógenos de plantas, micoparásitos y entomopatógenos (Chandler, 2017). Algunos géneros que destacan dentro de este orden corresponden a *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*, *Nomuraea*, *Aschersonia*, *Isaria* y *Hirsutella* (Wang y Wang, 2017).

Varias especies de HEP dentro de los Hypocreales son habitantes ubicuos de los suelos, encontrándose distribuidos en diversos ecosistemas naturales y agroecosistemas a nivel mundial. *Beauveria bassiana* s.l y *Metarhizium anisopliae* s.l son ejemplos de lo anterior, siendo colectados en una amplia gama de zonas geográficas, climáticas y agroecológicas distintas (Lacey *et al.*, 2015), incluyendo el Ártico y la Antártica (Mahaney *et al.*, 2001; Meyling *et al.*, 2012). La distribución natural depende de varios factores como la disponibilidad y densidad de hospederos, el tipo de hábitat, la presencia de fuentes alternativas de nutrición y las condiciones ambientales (Chandler, 2017). Por otra parte, las poblaciones de estos microorganismos se ven influenciadas por las prácticas agrícolas, incluyendo el tipo de sistema de labranza (convencional vs de conservación) y el uso de plaguicidas (Mietkiewski *et al.*, 1997; Hummel *et al.*, 2002). Existe una marcada relación entre el tipo de hábitat y la ocurrencia del modo reproductivo (sexual o asexual). Las especies teleomorfas del orden Hypocreales son mayoritariamente encontradas en hábitats libres de interferencia humana, especialmente en áreas tropicales y subtropicales del este y sudeste asiático (Sung *et al.*, 2007), mientras que las formas anamorfias se encuentran particularmente en regiones templadas (Chandler *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 2003), pudiendo esta relación estar asociada a las formas de dispersión de las esporas. Los teleomorfos producen ascosporas de descarga activa desde estromas, que pueden permanecer en los cadáveres de hospederos por muchos meses y por ende son más vulnerables a las perturbaciones del ambiente (Boomsma *et al.*, 2014). Por otra parte, los anamorfos producen grandes cantidades de

conidias desde los cadáveres de los insectos, que son dispersadas pasivamente por un tiempo relativamente corto, usualmente unos pocos días (Chandler, 2017).

Dependiendo del sustrato, las especies entomopatógenas de Hypocreales pueden producir diversos tipos de propágulos infectivos, los cuales difieren en sus propiedades adhesivas y características morfológicas (Holder y Keyhani, 2005). Éstos pueden ser conidias aéreas, conidias sumergidas, blastosporas y microesclerocios (Jackson *et al.*, 2010). Por ejemplo, las conidias aéreas son producidas en sustratos sólidos, líquidos o en el exterior de insectos, las conidias sumergidas son producidas en sustratos líquidos bajo condiciones limitadas en nutrientes y las blastosporas son producidas en el hemocele de insectos o en cultivos líquidos alto en nutrientes (Holder y Keyhani, 2005; Jaronski y Mascarín, 2017). Adicionalmente, algunas especies de HEP pueden producir microesclerocios, estructuras de sobrevivencia formadas por agregados de hifas melanizadas, altamente tolerantes a la desecación y que al rehidratarse producen grandes cantidades de conidias (Jackson y Jaronski, 2009). Los microesclerocios han sido producidos en sustratos líquidos bajo condiciones nutricionales específicas (Jackson y Jaronski, 2009).

El rango de hospederos de los anamorfos varía de acuerdo al género o especie fúngica en particular. Géneros como *Lecanicillium* y *Aschersonia* son especialistas, mientras que géneros como *Metarhizium* representan un continuo y contienen especies especialistas, generalistas o de rangos intermedios (Chandler, 2017). La mayoría de los teleomorfos funcionan como parásitos obligados de artrópodos y tienen preferencias por órdenes, familias, géneros o incluso especies particulares (Kepler *et al.*, 2012). El rango de hospederos usualmente se correlaciona con la virulencia. Especies con rangos estrechos de hospederos son altamente virulentas y obligadas. En contraste, las especies de rangos amplios de hospederos son a menudo considerados de baja virulencia y facultativos (Goettel, 1995), es decir que pueden sobrevivir en base a fuentes de nutrientes no obtenidos del hospedero vivo, sino como saprótrofos en su fase no entomopatógena (Vega *et al.*, 2009).

Algunos HEP funcionan en más de un modo econutricional, utilizando diferentes recursos dependiendo de su disponibilidad (Ownley, 2010). Últimamente, ha cobrado gran notoriedad un subconjunto de HEP que cumplen importantes roles ecológicos actuando como simbioses endófitos de plantas, colonizadores de rizósfera, antagonistas de enfermedades y promotores del crecimiento de plantas (Barelli *et al.*, 2015). Estos roles emergentes potencian el desarrollo de estos hongos en la agricultura sustentable y además de su función típica en la protección de plantas, proveen de múltiples nuevas oportunidades de uso (Jaber y Ownley, 2018).

Proceso infeccioso de Hypocreales y Barreras a la infección

Los mecanismos de infección de HEP tales como *Metarhizium* y *Beauveria* están ampliamente estudiados y comprendidos (Ortiz y Keyhani, 2013; Butt *et al.*, 2016). Los HEP y sus insectos hospederos han coevolucionado en una constante “carrera armamentista”, donde el hongo ha desarrollado múltiples estrategias para evadir o superar las respuestas

defensivas del hospedero (Shuang y Wang, 2018) y los insectos han evolucionado en barreras anatómicas, fisiológicas y mecanismos de defensa inmunes que los protegen contra la invasión de microorganismos. Los mecanismos inmunes innatos abarcan respuestas humorales y celulares. Las primeras consisten en la síntesis de moléculas de defensa. Entre ellas están las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y los péptidos antimicrobianos (Jian *et al.*, 2010). Las segundas respuestas se basan en células de la hemolinfa de los insectos, los hemocitos, los cuales capturan “intrusos” en nódulos o cápsulas, o los engullen en un proceso de fagocitosis (Lavine y Strand, 2002).

Probablemente, la forma más efectiva que poseen los insectos de sortear el dramático impacto de los HEP es la evasión conductual, la cual depende del estado de desarrollo y de la especie del hospedero en particular (Baverstock *et al.*, 2010). Estos comportamientos incluyen el acicalamiento (individual o social) o el consumo de compuestos con efectos antipatogénicos (Ugelvig y Cremer, 2007; Tragust *et al.*, 2013). También eventos, como una rápida ecdisis pueden ser un factor determinante en las aplicaciones de HEP (Kim y Roberts, 2012), debido al desprendimiento de las conidias junto con la cutícula mudada. Los insectos que recién han mudado son particularmente vulnerables debido a que la nueva cutícula es blanda y no completamente esclerotizada (Liu *et al.*, 2014). La susceptibilidad a la infección puede depender fuertemente de la etapa de desarrollo del insecto, siendo los estados pupales más resistentes que los adultos (Butt y Goettel, 2000).

La mayoría de los HEP infectan a sus hospederos mediante penetración mecánica y acción enzimática esencialmente en cualquier sitio de la cutícula, aunque se han detectado sitios preferenciales en algunos insectos (Ortiz y Keyhani, 2013). Lo anterior implica que son los principales patógenos de los insectos succionadores (como áfidos o mosquitos) porque no poseen requerimientos de ingestión a diferencia de bacterias o virus (Wang y Feng, 2014).

La cutícula es la primera y más importante barrera a los HEP (Butt *et al.*, 2016) y está conformada por la epicutícula y procutícula. La epicutícula es una capa delgada (1-5 μm) y externa, que está conformada por una diversa gama de lípidos y otros compuestos (Nelson *et al.*, 1995). Por su parte, la procutícula se divide en las capas exo-, meso- y endo-cuticulares, y está constituida de quitina y proteínas esclerotizadas (Ortiz y Keyhani, 2013).

Dentro de la cutícula existen componentes bioquímicos tales como lípidos tóxicos y fenoles, inhibidores de enzimas, proteínas y otros componentes de defensa que los entomopatógenos deben superar para una virulencia exitosa (Pedrini *et al.*, 2013). Asimismo, los HEP deben lidiar con barreras hidrofóbicas, cargas electrostáticas, baja humedad relativa, bajos niveles de nutrientes, flora endógena microbial, proteínas reticuladas que contribuyen a la rigidez de la cutícula (St. Leger, 1991). Además de los componentes anteriormente señalados, los patógenos deben superar otras barreras biológicas de la epicutícula tales como el grosor de la cutícula, mineralización, esclerotización, melanización, inhibidores de proteasas y péptidos antimicrobiales (Butt *et al.*, 2016).

Los pasos claves del ciclo de vida de un HEP se resumen ordenadamente en: adhesión de las esporas (conidias o blastosporas), la germinación, diferenciación en estructuras de infección (apresorios y ápices de penetración), la penetración cuticular, colonización del hemocele, emergencia del hospedero y finalmente la esporulación (Butt *et al.*, 2016) (Figura 1).

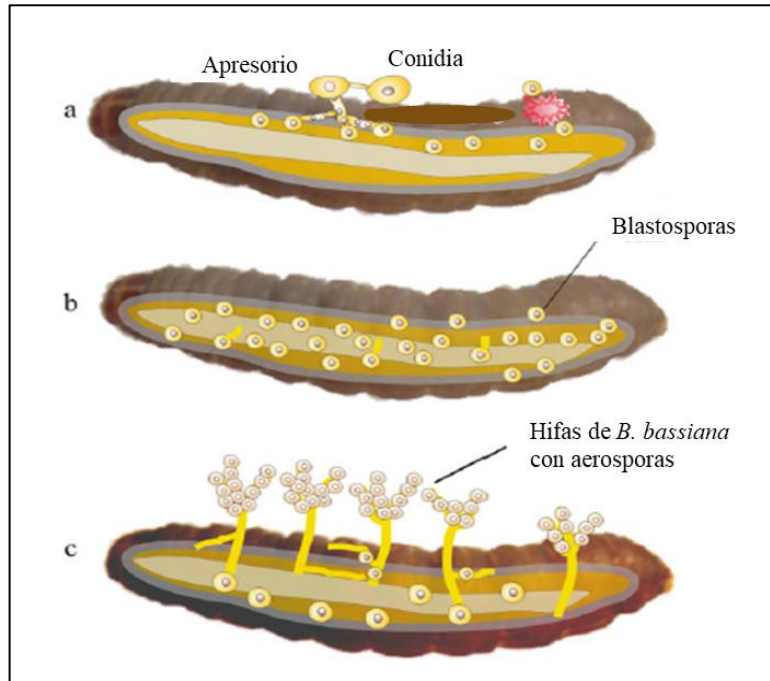


Figura 1. Modelo simplificado que ilustra las rutas de infección del HEP *Beauveria bassiana* en el insecto *Galleria mellonella*. Después de la unión del propágulo fúngico a la cutícula, forma un apresorio y crece a través de la cutícula formando una hifa de penetración. Durante este paso, el hongo secreta enzimas que digieren los tejidos del huésped (a). En la hemolinfa, *B. bassiana* crece en forma de células individuales (b). El cuerpo del hospedero muerto y melanizado está cubierto de hifas de hongo productoras de esporas (c) (adaptado de Wojda, 2017).

La patogénesis inicia con la adhesión e interacción de esporas con la epicutícula del insecto, las cuales germinan dadas ciertas condiciones ambientales. Esta etapa es crítica en el proceso de infección y se ve influenciada por factores tanto intrínsecos del hospedero como ambientales (humedad relativa, radiación solar, la temperatura, microbios antagonistas entre otros) (Butt *et al.*, 2016).

Las esporas (generalmente conidias) entran en contacto con el hospedero primariamente vía corrientes de aire, agua libre y crecimiento saprófito sobre sustrato habitado por insectos (Boucias y Pendland, 1991). Secundariamente, se ha reportado el transporte de conidias por

otros organismos, como insectos (Meyling *et al.*, 2006), colémbolos (Dromph, 2003) y lombrices de tierra (Shapiro-Ilan y Brown, 2013).

Las formas anamorfas requieren un número umbral de conidias, generalmente alto, para causar la infección. Debido a que la mortalidad depende de la dosis, es vital que se adhieran la mayor cantidad de conidias posibles (Butt y Goettel, 2000), ya que múltiples sitios de penetración permiten una rápida colonización, una dominación de los sistemas defensivos del hospedero y la prevención de infecciones por organismos oportunistas (Altre y Vandenberg, 2001).

La adhesión de las conidias a la superficie del hospedero ocurre por medio de mucílagos y proteínas adhesivas (Wang and St Leger, 2007). Esta etapa involucra dos eventos: la adsorción de la espora a la superficie del hospedero y la consolidación de la unión (Ortiz y Keyhani, 2013). Las conidias aéreas de la mayoría de los Hypocreales poseen en su superficie una capa “rodlet” compuesta de proteínas denominadas hidrofobinas, las cuales facilitan la adhesión pasiva a superficies hidrofóbicas y en menor grado a hidrofílicas. Por el contrario, las blastosporas, carecen de dichas proteínas, uniéndose débilmente a superficies hidrofóbicas, pero exhibiendo gran afinidad por sustratos hidrofílicos (Holder y Keyhani, 2005).

A continuación de la adhesión ocurre la germinación de la espora y la diferenciación en estructuras especializadas de infección, es decir apresorios y/o ápices de penetración que permiten la penetración del integumento del hospedero (Ortiz y Keyhani, 2013). Algunas especies de HEP no producen apresorios y pueden penetrar directamente. Tanto la germinación como la diferenciación están influenciados por factores químicos, físicos y nutricionales (Vega *et al.*, 2012). La germinación ocurre en presencia de oxígeno y agua, y se caracteriza por una rápida imbibición por osmosis, seguido por la formación de un tubo germinativo (Chandler, 2017).

La mayoría de las especies de HEP producen apresorios, ya sea directamente desde conidias o lateralmente desde hifas o al final de tubos germinativos (Butt *et al.*, 2016). Cada apresorio produce un estrecho ápice de penetración que ancla el hongo a la cutícula para contrarrestar la presión hacia abajo generada por la hifa. Por el contrario, las blastosporas pueden producir un ápice de penetración a partir de apresorios a lo largo de la longitud o la punta de la blastospora (Schreiter *et al.*, 1994).

De acuerdo a lo anteriormente señalado, los HEP liberan una extensa mezcla de enzimas degradativas y utilizan fuerza mecánica para penetrar el integumento del insecto. El hongo acumula altas concentraciones de glicerol en el ápice de penetración (Vertyporokh *et al.*, 2019), aumentando la presión de turgencia y secreta enzimas, incluyendo lipasas, proteasas, quitinasas, fosfolipasa C y catalasa para degradar la cutícula (Santi *et al.*, 2010; Schrank y Vainstein, 2010). Cuando la epicutícula se rompe, el progreso del ápice de penetración a través de la cutícula puede ser vía penetración directa o extensión lateral del crecimiento de las hifas produciendo placas de penetración (Hajek y St. Leger, 1994).

Una vez alcanzado el hemocele, el hongo se propaga como cuerpos parecidos a levaduras, denominados blastosporas, que le permiten una mejor asimilación de nutrientes y evadir el reconocimiento por parte del hospedero, en virtud de una mayor relación superficie volumen y una menor cantidad de epítopes de carbohidratos en su superficie, respectivamente (Boomsma *et al.*, 2014).

Cuando los nutrientes merman, el hongo induce crecimiento hifal y se produce la esporulación en el exterior del hospedero (Butt *et al.*, 2016). La producción de esporas y el crecimiento externo dependen de condiciones ambientales de temperatura y humedad favorables (Arthurs y Thomas, 2001). Bajo condiciones secas o frescas, los cadáveres permanecen intactos como momias, emergiendo y esporulando una vez que se reanuden las condiciones apropiadas para el crecimiento y conidiación (Goettel y Inglis, 1997).

La muerte del hospedero ocurre entre los 3-20 días desde la inoculación (Chandler, 2017), producto de una combinación de obstrucción física de la circulación de la hemolinfa, invasión de órganos por el crecimiento del hongo, agotamiento de nutrientes y toxicosis (Goettel y Inglis, 1997). En la mayoría de los casos, la muerte del hospedero se produce anterior a la producción de esporas, pero no siempre ocurre así (Hajek y St. Leger, 1994). Finalmente, las esporas son liberadas y deben sobrevivir a hasta entrar en contacto con un nuevo hospedero.

Nemátodos entomopatógenos (NEP): Steinernematidae y Heterorhabditidae

Clasificación & Ecología

Dentro de este grupo, destacan los NEPs de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, los cuales han sido producidos comercialmente para controlar una variedad de insectos plaga de cultivos, principalmente del suelo, pese a que también han sido aplicados foliarmente y en hábitats crípticos (Arthurs *et al.*, 2004). A la fecha se han descrito 101 especies de la familia Steinernematidae, de las cuales 100 corresponden al género *Steinernema* y una al género *Neosteinernema*. La familia Heterorhabditidae, es menos numerosa y solo la constituye el género *Heterorhabditis* con 21 especies descritas a la fecha (Shapiro *et al.*, 2018; Bhat *et al.*, 2020). No obstante, entre los NEPs, solo 8 especies del género *Steinernema* y 5 *Heterorhabditis* sp. han alcanzado desarrollo comercial, aplicación y venta (Lacey *et al.*, 2015).

Los NEPs son organismos comunes de los suelos, donde se distribuyen espacial y temporalmente a menudo de forma irregular (Stuart *et al.*, 2015). Han sido aislados en todos los continentes con excepción a la Antártica, y algunas especies parecen ser cosmopolitas (e.g. *Steinernema feltiae* y *Steinernema carpocapsae*) (Hominick *et al.*, 1996). Sin embargo, existe considerable variabilidad en diversidad y distribución entre hábitat, temporada y región geográfica (Stuart *et al.*, 2015). Adicionalmente, la disponibilidad de hospederos, la textura y el contenido de humedad del suelo son importantes factores que afectan las distribuciones locales (Griffin *et al.*, 2005). Los NEPs son capaces de desplazarse activamente en el suelo hasta 90 cm vertical y horizontalmente dentro de 30 días (Kaya, 1990). Por otra parte, pueden dispersarse de forma pasiva a través del agua, viento, actividad humana, hospederos infectados y también mediante foréx, lo que puede explicar su distribución global (Hazir *et al.*, 2003).

El rango de hospedero permanece aún desconocido para muchas especies de NEPs (Shapiro-Ilan *et al.*, 2018), no obstante son capaces de infectar una gran variedad de órdenes de insectos e incluso otros artrópodos (ácaros e isópodos) (Helmberger *et al.*, 2017), especialmente en laboratorio, donde las condiciones ambientales son óptimas, el contacto con el hospedero es seguro, y las barreras ecológicas y de comportamiento son inexistentes (Hazir *et al.*, 2003). Sin embargo, en campo, el rango de hospedero es más limitado, debido a la ecología del nemátodo y de sus potenciales hospederos (Koppenhöfer *et al.*, 2020). Existen también especies de rangos estrechos de hospederos como *Steinernema scarabaei*, específico de Scarabaeidae o *Steinernema scapterisci*, específico de Orthoptera (Shapiro-Ilan *et al.*, 2018).

Un importante factor que afecta el rango de hospederos es el comportamiento de forrajeo de los NEPs que se divide en 2 categorías extremas, pero con la mayoría de las especies situada en algún lugar a lo largo de este espectro, considerándose de comportamientos intermedios (e.g. *Steinernema riobrave* y *S. feltiae*) (Hazir *et al.*, 2003). La primera categoría corresponde a los nemátodos emboscadores o “ambushers” (e.g. *S. carpocapsae* y *S. scapterisci*) que se caracterizan por una baja movilidad en su entorno y tendencia a permanecer cerca de la

superficie del suelo, infectando principalmente hospederos móviles que cruzan su área de ataque. La segunda categoría, se denominan los navegantes o “cruisers” (e.g. *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora*), los cuales poseen alta movilidad y se distribuyen a mayores profundidades en el suelo, siendo más efectivos que los emboscadores en encontrar hospederos sedentarios y aquellos que habitan capas inferiores del suelo (Koppenhöfer *et al.*, 2020).

Proceso infeccioso de Steinernematidae y Heterorhabditidae

El ciclo de vida de un NEP consta del estado huevo, 4 estados juveniles y el adulto. El tercer estado juvenil (J3), conocido como juvenil infeccioso (JI) o dauer, es el único estado de vida libre capaz de infectar a su hospedero en el suelo. Utilizan diversas señales químicas y físicas del ambiente e insectos para localizar y reconocer potenciales hospederos, siendo capaces de responder a exudados de raíces de plantas, CO₂, vibraciones generadas por el movimiento o la alimentación de insectos entre otros, modificando sus comportamientos de forrajeo (Shapiro-Ilan *et al.*, 2018).

El JI entra a través de aberturas naturales (espiráculos, ano, cavidad bucal) o áreas delgadas de la cutícula (e.g. membranas intersegmentales) para reanudar su fase entomopatógena (Koppenhöfer *et al.*, 2020). En el hemocele de su hospedero, liberan bacterias por regurgitación o defecación que almacenan en vesículas especializadas en la parte anterior del intestino (*Steinernema* spp.) o en la válvula pre-intestinal (*Heterorhabditis* spp.) (Koppenhöfer *et al.*, 2020). Cada especie de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, se asocia con una especie bacteriana específica del género *Xenorhabdus* o *Photorhabdus* (ambas Morganellaceae), respectivamente, sin embargo, una especie de bacteria puede estar asociada con múltiples especies de nemátodos (Adeolu *et al.*, 2016; Shapiro-Ilan *et al.*, 2018).

Las bacterias proliferan rápidamente y cooperan con el nemátodo para matar al hospedero, usualmente en menos de 48 horas (Kaya y Gaugler, 1993). El nemátodo se alimenta de los tejidos degradados de su hospedero y de las células bacterianas por 1-3 generaciones, hasta que los recursos se agoten para luego emerger del cadáver en el suelo como JI e infectar nuevos hospederos (Hazir *et al.*, 2003) (Figura 2).

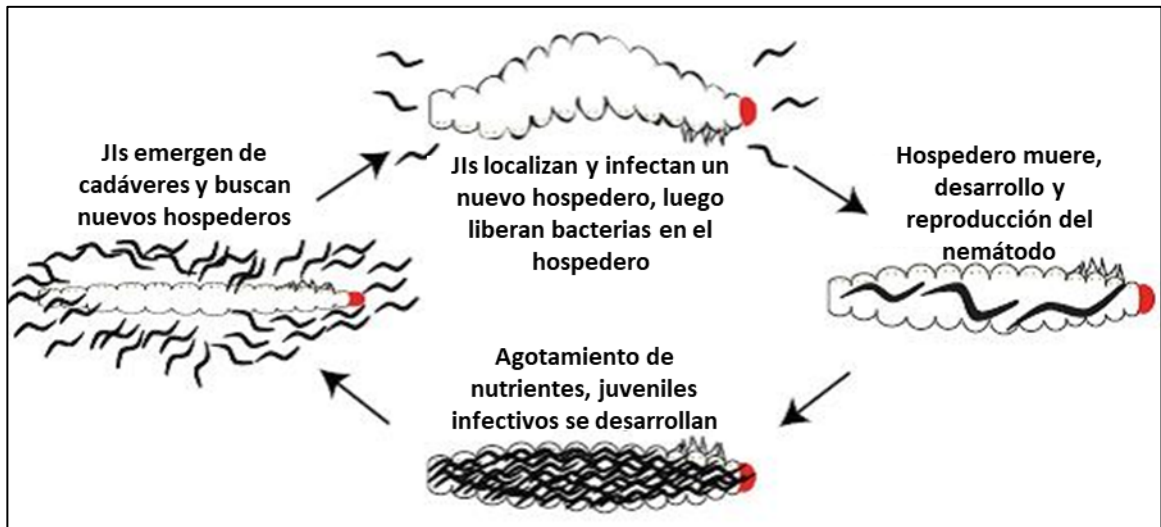


Figura 2. El ciclo infeccioso de los NEPs (Dillman *et al.*, 2012).

La mayoría de las especies de Steinernematidae se reproducen en forma anfimíctica (machos y hembras intervienen), a diferencia de las especies de Heterorhabditidae que son hermafroditas en la primera generación y posteriormente producen individuos macho, hembra y hermafrodita (Hazir *et al.*, 2003). La ovoposición ocurre en el medio del hospedero, pero en algunos casos se produce el fenómeno de endotoquia matricida, el cual consiste en la eclosión de los huevos al interior del progenitor, seguido por el consumo de los tejidos parentales por los juveniles en desarrollo (Griffin, 2012).

Factores que afectan la eficacia

La sobrevivencia y, por ende, el éxito de los programas de control biológico en base a NEPs, están influenciados por factores intrínsecos (genética, características fisiológicas y de comportamiento) y extrínsecos (bióticos y abióticos) (Curran, 1993) que varían de acuerdo a la especie y cepa específica. Dentro de los factores abióticos, es posible señalar la temperatura, radiación UV y los parámetros del suelo (textura, pH, humedad, entre otros). Típicamente los rangos óptimos de temperatura fluctúan entre 5 y 35°C, sin embargo, normalmente el suelo ejerce un efecto amortiguador que evita las temperaturas extremas (Kung *et al.*, 1991). El contenido de humedad del suelo es otro factor preponderante, ya que los NEPs son altamente sensibles a la desecación y requieren de una película de agua para dispersarse a través del suelo (Kung *et al.*, 1991). Las texturas pesadas son menos conducentes para la infección, debido a que el menor tamaño de poros conlleva bajos niveles de oxígeno y restricciones al movimiento de los nemátodos (Shapiro *et al.*, 2000; Koppenhöfer y Fuzy, 2006). El pH afecta el funcionamiento de los NEPs (<4 y >8) (Kung *et al.*, 1990), pero generalmente en niveles fuera de lo que se encontraría en un suelo agrícola común. Además, al ser aplicados al follaje, la radiación UV afecta negativamente a los NEPs, pudiendo matarlos dentro de unos pocos minutos (Gaugler *et al.*, 1992). Con respecto a los factores bióticos, cabe destacar los efectos directos e indirectos de los antagonistas. En este sentido, los NEPs interactúan con otros organismos del suelo, algunos de los cuales pueden

depredarlos, tales como hongos nematófagos, colémbolos, ácaros, tardígrados y nemátodos depredadores o además competir con ellos por recursos (Shapiro-Ilan *et al.*, 2018). La elección de la tasa de aplicación de NEPs es otro factor crítico, requiriendo un mínimo de 25 JIs por cm^2 para compensar las pérdidas de longevidad (Koppenhöfer *et al.*, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se describen los efectos que se producen entre HEPs y NEPs, los factores que influyen en el tipo de interacción y los métodos estadísticos comúnmente utilizados para evaluarlas. Además, se incluye un cuadro resumen en base a distintos trabajos publicados a la fecha, el cual aportará en el conocimiento de las relaciones entre ambos organismos.

Efectos de la aplicación combinada de HEP y NEP sobre insectos plaga

Los organismos pueden interactuar de múltiples maneras, directa o indirectamente y a través de distintos mecanismos. Estas interacciones producen combinaciones de efectos positivos, negativos o neutrales sobre ellos mismos.

Por otra parte, hongos y nemátodos pueden interactuar produciendo enfermedad y muerte en insectos. La combinación de dos agentes de biocontrol puede resultar en efectos antagónicos, sinérgicos o aditivos en la mortalidad y velocidad de muerte de una plaga en particular (Koppenhöfer y Grewal, 2005).

La combinación de ambos agentes permite alcanzar un mayor control de una plaga cuando ambos interactúan de forma aditiva o preferentemente sinérgica sobre la mortalidad de la plaga (Koppenhöfer y Grewal, 2005). Junto con lo anterior, la utilización de agentes de control biológico posee la ventaja de que elimina el uso de los cuestionados insecticidas sintéticos de amplio espectro y también podría aumentar el periodo de control debido a sus habilidades de reproducción bajo condiciones de campo.

Efectos sinérgicos

Las interacciones sinérgicas ocurren cuando la combinación de los agentes produce un efecto mayor que la suma de sus efectos separados. El sinergismo provee la oportunidad de incrementar la eficacia general de la estrategia de control, y al mismo tiempo, reduce los costos asociados al permitir menores dosis de aplicación (Ansari *et al.*, 2008).

Existen varios ejemplos de interacciones sinérgicas, particularmente en condiciones de laboratorio (Ansari *et al.*, 2004; Anbesse *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2016; Wakil *et al.*, 2017; Dlamini *et al.*, 2020). Por ejemplo, en experimentos de Wakil *et al.* (2017) contra larvas de segundo estadio de *Rhynchophorus ferrugineus* O. (Coleoptera: Curculionidae), obtuvieron en la tercera semana después de la aplicación del HEP mortalidades promedio iguales a 20,4%, 17,34% y 29,59% para los HEP *B. bassiana*, *M. anisopliae* y el NEP *H. bacteriophora*, respectivamente. En cambio, las aplicaciones combinadas y secuenciales (intervalos de aplicación de 1 y 2 semanas) produjeron efectos sinérgicos con mortalidades entre 64,94% y 88,65% (tercera semana).

En campo, una combinación de una formulación comercial del NEP *H. bacteriophora* (Nema-green®) y del HEP *M. anisopliae* produjo efectos sinérgicos sobre la mortalidad de larvas de *Hoplia philanthus* F. (Coleoptera: Scarabaeidae) cuando eran aplicados

subsuperficial y secuencialmente (NEP aplicado 3 semanas después de HEP) (Ansari *et al.*, 2006). En el primer ensayo, después de 7 semanas de la aplicación del HEP, el tratamiento HEP+NEP produjo cerca de un 90% de mortalidad y los individuales cerca de un 35% y 40% de mortalidad para NEP y HEP, respectivamente. La combinación de ambos agentes produjo mortalidades estadísticamente iguales a un tratamiento subsuperficial de clorpirifos (Ansari *et al.*, 2006).

Otra ventaja del uso combinado de agentes, es que se produzca un efecto de aceleración en el tiempo de mortalidad (Barbercheck y Kaya, 1990; Molina *et al.*, 2007; Bacca y Lagos, 2014). En experimentos de laboratorio de Molina *et al.* (2007) el NEP *H. bacteriophora* y aislados de mediana o alta virulencia del HEP *M. anisopliae* eran inoculados separados o juntos (secuencial o simultáneamente). La aplicación del NEP por si solo provocó 100% de mortalidad a los 5 días. El aislado de HEP de alta virulencia causó 100% de mortalidad dentro de 7 días, comparado con el aislado de mediana virulencia que solo ocasionó 60% de mortalidad en un periodo de 9 días. La aplicación simultánea del NEP y el aislado de alta virulencia de HEP provocó 100% de mortalidad a los 6 días. En cambio, cuando el NEP era aplicado simultáneamente con el aislado de mediana virulencia, se observó el tiempo de mortalidad más corto (4 días) entre todos los tratamientos.

Mecanismos claves de los efectos sinérgicos

Los mecanismos de las interacciones sinérgicas son poco comprendidos (Ansari *et al.*, 2008). Se piensa que la aplicación inicial de un agente actúa como un estresor que altera el comportamiento (e.g., alimentación o movimiento) del insecto, debilitándolo y por ende haciéndolo más susceptible a la penetración y colonización posterior por el otro agente (Ansari *et al.*, 2008). Además, es posible que insectos estresados emitan mayor cantidad de CO₂, lo que permite que organismos tales como nemátodos puedan localizarlos con mayor facilidad, aumentando la eficacia del control (Ansari *et al.*, 2008). Asimismo, las aplicaciones combinadas pueden hacer al hospedero más susceptible mediante la supresión del sistema inmune, la prolongación de los estados de desarrollo o por la acción de ambos tratamientos en diferentes componentes de la población plaga (Park y Kim, 2011; Wakil *et al.*, 2017; Lacey *et al.*, 2015; Mc Namara *et al.*, 2017).

La posible habilidad de transporte de esporas del HEP por el NEP (o foresis) es otro potencial mecanismo de aumentar la eficacia de control de insectos plaga (Wu, 2013; Simi *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2020; Nermut' *et al.*, 2020). Por ejemplo, Wu (2013), determinó que las conidias de *M. anisopliae* son capaces de germinar formando hifas que se adhieren a la cutícula externa de los JIs, sin causarles daño aparente pero que luego se desprenden junto con la cutícula al momento de la muda.

De acuerdo con los resultados de diversos estudios, son numerosos los factores que afectan la eficacia de diseminación de HEPs por NEPs, tales como el suelo (textura y profundidad), la arena experimental, tipo de esporas fúngicas y las especies de NEPs y HEPs evaluadas (Wu, 2013; Simi *et al.*, 2018; Nermut' *et al.*, 2020).

En experimentos de Nermut' *et al.* (2020), el NEP *H. bacteriophora* fue más efectivo que el NEP *S. feltiae* en propagar el HEP *Isaria fumosorosea*, lo cual puede ser explicado, según los autores, por la presencia y persistencia de la cutícula de segundo estado y/o por los diferentes mecanismos de forrajeo de los nemátodos. Además, las blastosporas fueron diseminadas más efectivamente que las conidias, debido probablemente a diferencias en sus propiedades de adherencia. Finalmente, utilizando tres distintos tipos de arenas experimentales y sustrato de arena como barrera al movimiento, observaron una influencia negativa sobre la diseminación del hongo dada por la heterogeneidad de la arena experimental, lo cual podría deberse a la remoción de las esporas de la cutícula del nematodo por el rozamiento con las partículas de arena (Nermut' *et al.*, 2020).

También, las distribuciones de los agentes podrían verse afectadas por los factores de textura y profundidad del suelo. Wu (2013) observó presencia de menor cantidad de conidias a mayores profundidades de suelo y éstas se distribuyeron más uniformemente en suelos arenosos que franco-arenosos debido a las diferencias en el tamaño de poros. El autor también observó que estos factores afectan la movilidad de los nemátodos, puesto que más JIs fueron recuperados a una profundidad menor a 5 cm en suelos franco-arenosos que a 10 cm en suelos arenosos.

Otros trabajos evaluaron la capacidad de los NEPs de asistir en el movimiento vertical de HEPs en diferentes profundidades de suelo (Wu, 2013; Simi *et al.*, 2018). Por ejemplo, el NEP *Steinernema brazilense* fue capaz de transportar conidias del HEP *B. bassiana* hasta 7-10 cm de profundidad, sin embargo, cuando se utilizó el HEP *M. anisopliae* en lugar del HEP *B. bassiana*, las esporas solo alcanzaron los 0-4 cm de profundidad, lo cual puede ser explicado por los diferentes tamaños de esporas (*B. bassiana* poseen menor tamaño que *M. anisopliae*) (Simi *et al.*, 2018).

Efectos aditivos

Los efectos son aditivos cuando los agentes actúan independiente unos de otros, es decir cuando no ocurre interacción (Koppenhöfer y Grewal, 2005). Esto se traduce en que el efecto combinado (% mortalidad) es igual a la suma de los efectos individuales. La mayoría de las interacciones entre HEP y NEP producen efectos aditivos sobre la mortalidad de insectos (Koppenhöfer y Grewal, 2005). Sin embargo, los efectos aditivos no supondrían una reducción en las dosis de aplicación y por ende en los costos, por lo cual no serían de beneficio para los agricultores (Hennessy, 2012).

Efectos aditivos han sido reproducidos en campo sobre la mortalidad de *Conotrachelus humeropictus* F. (Coleoptera: Dryophthoridae) al combinar el HEP *B. bassiana* y el NEP *S. brazilense* (Simi *et al.*, 2018). Todos los tratamientos en base a distintas dosis del NEP (1, 3, 9 y 27 JIs/cm²) y una dosis de HEP (10 kg/ha) produjeron efectos aditivos, pero en la mayoría de los casos no se observaron diferencias significativas comparado con el HEP y NEP por si solos. Los niveles de control de las aplicaciones individuales de NEP en su dosis más alta y HEP fueron respectivamente 60% y 15,6% de mortalidad, mientras que la aplicación

combinada no supero el 65,6% de mortalidad (Simi *et al.*, 2018).

En otro estudio, los HEPs *Isaria javanica* y *Metarhizium brunneum* fueron examinados en un bioensayo de laboratorio que incluyo los NEPs *S. carpocapsae* y *S. riobrave* y pupas de *Rhagoletis pomonella* W. (Diptera: Tephritidae) (Usman *et al.*, 2020). Se detectó efectos aditivos para todas las combinaciones HEP-NEP, sin embargo, la aplicación combinada de *S. riobrave* y *I. javanica* provocó la menor emergencia de adultos de *R. pomonella* (3%) a la cuarta semana y correspondió al único tratamiento que fue significativamente diferente a las aplicaciones individuales de sus agentes respectivos (Usman *et al.*, 2020). Los autores concluyeron que las aplicaciones combinadas de NEP y HEP tienen el potencial de suprimir poblaciones de *R. pomonella*, pero debido a que los efectos son aditivos (en vez de sinérgicos) es posible que aplicaciones a mayores dosis del NEP por sí solo sean igualmente de efectivas en reducir la emergencia. Por lo tanto, la relación costo-beneficio y la demanda del mercado serán factores decisivos al momento de elegir el tipo de enfoque a usar (Usman *et al.*, 2020).

Mecanismos claves de los efectos aditivos

Al igual que los efectos sinérgicos los mecanismos que generan los efectos aditivos son poco comprendidos (Ansari *et al.*, 2008). Sin embargo, aspectos relacionados a sus biología podrían minimizar interacciones en la naturaleza. Existe evidencia que NEPs tienden a preferir hospederos sanos a aquellos infectados con HEPs (Barbercheck y Kaya, 1991b; Bacca y Lagos, 2014). No obstante, también se ha observado que ambos organismos pueden existir en el mismo hospedero (Tarasco *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2016). Además, HEPs y NEPs podrían poseer distintas condiciones ambientales óptimas de crecimiento y desarrollo ocupando distintos nichos ecológicos. Por ende, factores como la temperatura, textura del suelo y potencial hídrico podrían afectar la competencia entre ambos organismos y ser mecanismos que evitan la colonización de un mismo hospedero (Barbercheck y Kaya, 1990; Barbercheck y Kaya, 1991a; Wu *et al.*, 2014).

Efectos antagónicos

El antagonismo se produce cuando la suma de los efectos (% mortalidad) que ejercen los agentes de manera combinada es menor a la suma de sus efectos individuales (Koppenhöfer y Grewal, 2005). Diferentes trabajos evidencian relaciones antagónicas entre HEPs y NEPs (Barbercheck y Kaya, 1990; Shapiro *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2005; Tarasco *et al.*, 2011; Correa *et al.*, 2016).

Por ejemplo, una aplicación de dos aislados del NEP *H. bacteriophora* y un aislado de HEP de *Beauveria pseudobassiana* y *Metarhizium pingshaense* fueron evaluadas en todas las posibles combinaciones de parejas y ordenes de inoculación (73 h de separación entre cada agente) contra *Phyllophaga polyphylla* B. (Coleoptera: Scarabaeidae), una importante plaga de cultivos en México (Martínez *et al.*, 2015). De acuerdo con reportes previos, *P. polyphylla* es una plaga altamente resistente a las infecciones por NEPs y HEPs cuando son aplicados por separado. En el primer experimento, se detectaron interacciones antagónicas entre NEPs y HEPs, no obstante, la mortalidad de la aplicación combinada fue superior (13%) a las

mortalidades de los agentes por separado (8%) (Martínez *et al.*, 2015). En un segundo experimento, se evaluó diferentes órdenes de inoculación, pero se incluyó una separación de 2 semanas entre la inoculación de cada agente para determinar si un intervalo de aplicación más largo podría resultar en una mayor mortalidad. Sin embargo, los efectos fueron antagónicos en todas las combinaciones, excepto cuando *B. pseudobassiana* era inoculado primero, seguido por el aislado HbB de NEP (Martínez *et al.*, 2015).

Un aspecto negativo mencionado frecuentemente en la literatura se refiere a que la combinación de HEPs y NEPs, puede afectar adversamente la producción de juveniles infectivos (JIs) y la esporulación del hongo (Barbercheck y Kaya, 1990; Bacca y Lagos, 2014; Ansari *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2007; Ansari *et al.*, 2008; Tarasco *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). Los resultados de Bacca y Lagos (2014) señalan que una vez establecido el NEP *Steinernema sp.*, éste no es tan susceptible de ser afectado con posteriores aplicaciones del HEP *B. bassiana*, sin embargo, cuando el último está establecido con anterioridad no es posible o es muy difícil la penetración y reproducción del NEP dentro del mismo hospedero. Por el contrario, Shaurub *et al.* (2016) indican que para alcanzar los máximos rendimientos de JIs es mejor exponer larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) a *B. bassiana* primero y después aplicar los nemátodos *S. riobrave* o *H. bacteriophora*. Los resultados de Molina *et al.* (2007), concuerdan con Bacca y Lagos (2014), ya que las producciones de JIs más altas se alcanzaron cuando el nemátodo *H. bacteriophora* era inoculado individualmente o 48 h antes de un hongo de mediana virulencia. En cambio, cuando dicho hongo se aplicaba simultáneamente o 48 antes al nemátodo se reducía significativamente la producción de JIs. Similarmente, Ansari *et al.* (2008) observaron que la infección por *M. anisopliae* influyó la producción de nemátodos después de 2 semanas de incubación, pero la producción no fue afectada cuando los NEP se aplicaron junto con, o una semana después del hongo, lo que sugiere que durante etapas finales de la infección fúngica, el ambiente interno del hospedero no es favorable para el desarrollo de NEPs. Otros trabajos como Ansari *et al.* (2004), vieron inhibida la producción de *Heterorhabditis megidis* por larva solo cuando se utilizaron altas concentraciones de *M. anisopliae* simultáneamente (1×10^8 conidias/g de suelo) en laboratorio. Mientras que al utilizar la menor concentración de HEP en la aplicación dual (1×10^6 conidias/g de suelo), se alcanzaron las mayores producciones de nemátodos por larva, siendo estadísticamente igual al tratamiento de *H. megidis* por sí solo. No obstante, la reproducción de los nemátodos puede verse inhibida, la combinación de los agentes todavía puede inducir efectos sinérgicos sobre la mortalidad de plagas (Shaurub *et al.*, 2016).

Mecanismos claves de los efectos antagónicos

Los modos de acción de las interacciones antagónicas entre microorganismos están basados en el parasitismo, la competencia directa y la antibiosis (Singh y Faull, 1988). Sin embargo, solo se ha reportado estos dos últimos mecanismos para HEPs y NEPs.

En sus estudios, Shapiro *et al.* (2004) sugieren que el antagonismo puede ocurrir como resultado de interacciones antes o durante la infección, o a toxinas producidas por los entomopatógenos después de iniciada la infección. Tanto HEPs como NEPs y sus bacterias

asociadas producen varios tipos de metabolitos secundarios y enzimas (Li *et al.*, 1997; Gulcu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2020a), algunas de las cuales podrían inhibir el desarrollo de otros organismos.

De acuerdo con Barbercheck y Kaya (1990), en individuos de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) infectados por el hongo *B. bassiana* y los nemátodos *S. feltiae* o *H. heliothidis*, usualmente solo uno de los organismos es capaz de desarrollarse y reproducirse. Los nemátodos o sus bacterias inhibieron el crecimiento de *B. bassiana* cuando eran aplicados dentro de 24 horas después de la aplicación del hongo, y el hongo reprimió el desarrollo de los nemátodos cuando fue aplicado más de 48 horas antes (Barbercheck y Kaya, 1990). Adicionalmente, las bacterias simbiotes *X. nematophilus* y *P. luminescens* asociadas a NEPs inhibieron el crecimiento de las blastosporas de *B. bassiana in vitro*. No obstante, extractos de medios de crecimiento líquidos del cultivo de blastosporas de *B. bassiana* no lograron reprimir el crecimiento *in vitro* de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Barbercheck y Kaya, 1990).

En experimentos realizados por Ansari *et al.* (2005) los efectos mutuos entre las bacterias *P. luminescens* y *X. poinarii*, y HEPs fueron investigados *in vitro*. Sus resultados demostraron que solo *P. luminescens* inhibe el crecimiento y la producción de conidias de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii* y *Paecilomyces fumosoroseus*. Al mismo tiempo, los HEPs inhibieron el crecimiento de las bacterias, aunque solo a altas concentraciones (1000 ug/ml). Finalmente, el efecto del extracto crudo de *M. anisopliae* fue evaluado sobre la dispersión de JIs de *S. glaseri* y *H. megidis* pero no se observaron efectos sobre la movilidad de los nemátodos.

En estudios de Correa *et al.* (2016), al combinar los HEPs *B. bassiana* Bb9205 o *M. anisopliae* Ma9236 con la bacteria simbiote *P. luminescens*, encontraron inhibición del crecimiento radial de los HEPs por metabolitos secundarios de la bacteria. No obstante, a diferencia de Ansari *et al.* (2005), *P. luminescens* no fue inhibida por los extractos de los hongos en ninguno de los tratamientos (10, 100, 1000 ug extracto crudo).

Tarasco *et al.* (2011), evaluaron la acción combinada del NEP *S. ichnusae* y del HEP *B. bassiana* en *G. mellonella* bajo distintas concentraciones e intervalos de aplicación. Posteriormente, investigaron los efectos mutuos entre la bacteria simbiótica del NEP *X. bovienii* y *B. bassiana*. Sus resultados indican que existe un claro antagonismo entre el NEP y HEP provocado por competencia de espacio y recursos alimenticios en la hemolinfa del insecto. En concordancia con resultados de Ansari *et al.*, (2005), observaron inhibición del crecimiento del HEP por el simbiote *X. bovienii* en forma proporcional a la dosis utilizada de bacteria. De la misma forma, el crecimiento de *X. bovienii* se vio inhibido por compuestos con efectos antibacteriales producidos por *B. bassiana*. Sin embargo, el tiempo es un factor clave, ya que el efecto inhibitorio depende de alcanzar una concentración de compuestos antibióticos suficiente en la hemolinfa como para afectar el crecimiento bacteriano.

Por último, estudios demuestran que algunos compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por el HEP *Metarhizium brunneum* pueden afectar la sobrevivencia y

comportamiento de los NEPs *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* y *S. feltiae*, siendo la mortalidad dosis dependiente. Al mismo tiempo, estos COVs pueden reducir la infectividad de los NEPs al reducir su número de generaciones dentro del hospedero, pero son incapaces de afectar el crecimiento de la bacteria simbiote, *Photorhabdus kayaii* (Hummadi *et al.*, 2021).

Factores y procedimientos estadísticos utilizados en la evaluación de las interacciones entre HEP y NEP

Las interacciones pueden variar dependiendo de las especies y al mismo tiempo verse afectadas en su magnitud y tipo por factores ambientales (Ragozzino y D'Errico, 2011). Por otra parte, existen métodos para el cálculo expresado en valores numéricos de la toxicidad conjunta de varias mezclas de insecticidas u organismos de control biológico que son utilizadas para diferenciar entre el antagonismo, sinergismo y efectos independientes.

Factores

La interacción entre HEP y NEP depende de las especies o cepas de organismos controladores (Molina *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2020), la especie de hospedero (Wangui, 2019) y los parámetros de aplicación, específicamente la dosis de aplicación (Shapiro *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2008), intervalo de aplicación entre ambos agentes (Ansari *et al.*, 2004; Abdolmaleki *et al.*, 2017) y la temperatura (Barbercheck y Kaya, 1990). Además, el tipo de efecto sobre la mortalidad depende del tiempo de evaluación de los efectos (Ansari *et al.*, 2006; Anbesse *et al.*, 2008).

En algunas instancias los resultados de la combinación HEP/NEP fueron complejos y difíciles de interpretar debido a la variabilidad en resultados. Hennessy (2012) evaluó los efectos de la combinación entre distintos HEPs y NEPs sobre la mortalidad de *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) y *Otiorhynchus sulcatus* F. (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio y campo. En su estudio de las interacciones contra *H. abietis*, los resultados no eran consistentes cuando los experimentos fueron repetidos bajo las mismas condiciones. Además, no logró reproducir los resultados de investigaciones previas realizadas en contextos similares. Estas discrepancias enfatizan que las interacciones dependen fuertemente de los aspectos mencionados antes, especialmente del tiempo de aplicación, y la edad larval (Hennessy, 2012). El autor sugiere que la inconsistencia observada puede ser atribuida a numerosos factores como los diferentes sitios de colecta de los insectos, la edad de los insectos, la manipulación y el almacenaje de los insectos, factores asociados a la calidad de los NEP y HEP, entre otros. También es posible que inconsistencias en los resultados se deba a la sensibilidad de los organismos a la temperatura (Ansari *et al.*, 2010; Wu, 2013).

Agentes de control biológico

Los resultados de estudios realizados por Molina *et al.* (2007), determinaron que la elección del aislado fúngico es importante al momento de obtener efectos aditivos en aplicaciones

duales de HEP y NEP. Asimismo, en experimentos de Ruiz *et al.* (2020), cuando *M. anisopliae* y *S. glaseri* eran inoculados en combinación, las interacciones eran aditivas, mientras que en la aplicación combinada de *M. anisopliae* y *S. carpocapsae*, la interacción fue antagónica y la mortalidad disminuyó.

Hospedero

La especie de hospedero puede incidir sobre el tipo de efecto sobre la mortalidad plagas. En estudios de interacciones entre *M. anisopliae* y NEPs sobre larvas de hospederos, *G. mellonella* era dos veces más susceptible a NEP y HEP que *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Mientras tanto, *Tipula paludosa* L. (Diptera: Tipulidae) requirió la mayor concentración de patógeno para que ocurriera la mortalidad (Wangui, 2019). La mayor mortalidad de larvas de *G. mellonella* puede relacionarse a su suave cutícula, mayor área de superficie y espiráculos desprotegidos. Por otro lado, larvas de *T. molitor* y *T. paludosa* poseen cutículas más resistentes y difíciles de penetrar por los nemátodos (Wangui, 2019).

Dosis de aplicación

El resultado de la interacción entre *S. carpocapsae* y *B. bassiana* o *M. anisopliae* dependió de las dosis de aplicación. Cuando *B. bassiana* y *S. carpocapsae* eran aplicados a razón de 0,5x (4×10^4 conidias viables/cm² y 20 JIs/cm²) la interacción era antagónica pero cuando eran aplicados al doble de dicha dosis los efectos eran aditivos. Por el contrario, cuando *M. anisopliae* y *S. carpocapsae* fueron aplicados a 0,5x los efectos eran aditivos, pero cuando los organismos eran aplicados al doble los efectos eran antagónicos (Shapiro *et al.*, 2004).

Tiempo de evaluación

En ensayos en campo entre *M. anisopliae* y *H. bacteriophora* contra *H. philanthus* se observó sinergismo cuando el tiempo de evaluación del efecto era 7 semanas después de la aplicación del hongo, sin embargo, el efecto era aditivo cuando se realizó una segunda observación un año después de iniciado los ensayos (Ansari *et al.*, 2006). La razón pudo haber sido que después de un año, los tratamientos individuales ya habrían causado una mortalidad alta debido a la producción de progenie del HEP y NEP, lo que no permitió que el sinergismo se expresara (Ansari *et al.*, 2006).

Intervalo de aplicación

Varios estudios evalúan aplicaciones simultáneas o secuenciales a diferentes intervalos de tiempo entre ambos tipos de biocontroladores, siendo el HEP aplicado generalmente primero que el NEP (Ansari *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2008; Anbesse *et al.*, 2008; Abdolmaleki *et al.*, 2017; Correa *et al.*, 2016; Hussein *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2019; Shaurub *et al.*, 2016; Wakil *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2014).

Se puede observar una consistencia entre el tipo de interacción y el intervalo de tiempo de aplicación entre ambos agentes. Generalmente, cuando ambos agentes son aplicados

simultáneamente o a menores intervalos de tiempo, los efectos aditivos o antagónicos son predominantes, mientras que los sinergismos aumentan con un periodo de aplicación entre agentes más prolongado (Ansari *et al.*, 2004; Anbesse *et al.*, 2008; Abdolmaleki *et al.*, 2017; Correa *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2019; Wakil *et al.*, 2017). Por ejemplo, Wakil *et al.* (2017), observaron interacciones aditivas al aplicar simultáneamente *B. bassiana* o *M. anisopliae* y *H. bacteriophora*, mientras tanto, registraron interacciones sinérgicas cuando los nemátodos se aplicaron 1 ó 2 semanas después de la aplicación de esporas fúngicas. En cambio, Ansari *et al.* (2004) y Anbesse *et al.* (2008) determinaron que para obtener efectos sinérgicos más fuertes, las larvas debían ser expuestas al hongo por al menos 3 ó 4 semanas antes de la introducción de los nemátodos. Por otro lado, es posible obtener sinergismos en aplicaciones simultáneas (Ansari *et al.*, 2008; Shaurub *et al.*, 2016; Wakil *et al.*, 2017) o a intervalos cortos (Abdolmaleki *et al.*, 2017; Reda *et al.*, 2018). Shaurub *et al.* (2016) evaluaron la infección dual entre *S. riobrave* o *H. bacteriophora* y *B. bassiana* en aplicaciones simultáneas o secuenciales, obteniendo como resultado interacciones sinérgicas en todas las parejas de entomopatógenos independiente del momento de aplicación. Por su parte, Abdolmaleki *et al.* (2017) obtuvieron interacciones antagónicas cuando los NEPs eran aplicados simultáneamente con *B. bassiana*, sin embargo, las aplicaciones de NEPs 24 h después de los tratamientos con el hongo produjo efectos aditivos o sinérgicos.

Temperatura

La temperatura es un factor que afecta las habilidades competitivas relativas entre NEP y HEP (Barbercheck y Kaya, 1990). En experimentos de infecciones duales, los nemátodos se desarrollaron y produjeron progenie casi siempre excluyendo al hongo cuando estos eran aplicados al mismo tiempo a 15°, 22° y 30 °C de temperatura. En las aplicaciones secuenciales, la temperatura influyó en el resultado del patógeno con mayores probabilidades de desarrollarse en el hospedero con infección dual. En los primeros tratamientos secuenciales, el hongo se desarrolló con mayores probabilidades excluyendo a los nemátodos a los 15°C, mientras que era más probable que los nemátodos se desarrollaran en estos tratamientos a 22° y 30 °C (Barbercheck y Kaya, 1990).

Procedimientos estadísticos

La determinación del tipo de interacción se basa en pruebas estadísticas, a menos que los mecanismos de la interacción sean conocidos de antemano (Koppenhöfer y Grewal, 2005). Para ello se determinan si los efectos observados se deben a diferencias estadísticamente significativas en relación a un efecto aditivo. Al respecto, varios procedimientos han sido utilizados (Finney, 1964; Mansour *et al.*, 1966; McVay *et al.*, 1977; Nishimatsu y Jackson, 1998). Por ejemplo, el método de Finney (1964), modificado por McVay *et al.* (1977) consiste en la determinación de la mortalidad proporcional aditiva esperada (ME) para la combinación NEP/HEP, dado por la ecuación

$$ME = MNema + MFung (1 - MNema)$$

donde $MNema$ y $MFung$ corresponden a las mortalidades proporcionales observadas causadas

por el nemátodo y hongo por separado, respectivamente. Luego, se realiza una prueba chi-cuadrado

$$\chi^2 = (M_{\text{NemaFung}} - ME)^2 / ME$$

donde M_{NemaFung} es la tasa de mortalidad observada para la combinación nemátodo-hongo. El valor obtenido de la prueba chi-cuadrado es comparado con el valor tabla de chi-cuadrado para 1 grado de libertad ($p < 0,05$). Si los valores calculados son mayores que el valor tabla, hay razón para sospechar que los efectos no son aditivos (sinérgicos o antagonicos). Si la diferencia $M_{\text{NemaFung}} - ME = D$ tiene un valor positivo, la interacción es considerada sinérgica, en cambio si el valor es negativo es antagonica.

Compilación de efectos sobre la mortalidad de insectos plaga

En el cuadro 1, se exponen 32 trabajos acerca de los efectos de la combinación entre HEPs y NEPs sobre la mortalidad de plagas agroforestales y de ornamentales.

Para su elaboración, se utilizaron todos los trabajos a pesar de no cumplir con la premisa indicada por algunos autores, entre ellos Koppenhöfer y Grewal (2005) y Hennessy (2012). Dicha premisa consiste en que para determinar interacciones y particularmente sinergismos, la mortalidad causada por los agentes individuales debe ser lo suficientemente baja como para permitir mejoras estadísticamente significativas (Koppenhöfer y Grewal, 2005). Hennessy (2012) menciona que para detectar sinergismos es preferible que la concentración de cada agente por separado produzca mortalidades menores al 50%. Asimismo, tampoco se desestimaron trabajos de acuerdo con el tipo de procedimiento estadístico utilizado para calcular los efectos.

En algunos trabajos los tipos de efectos no fueron calculados por los autores y en el presente trabajo tampoco fue posible determinarlos debido a la falta o inexactitud de los datos entregados, sin embargo, esto no fue motivo para no incluirlos en el cuadro 1. Por ejemplo, en los experimentos de Choo *et al.* (2002), no se incluyeron tratamientos de aplicaciones individuales del NEP *S. carpocapsae*, lo que no permitió determinar el tipo de efecto entre esta especie y el HEP *B. brongniartii* sobre la mortalidad de *Exomala orientalis* W. (Coleoptera: Scarabaeidae).

En la misma línea de lo anterior, algunos trabajos no explicitan los valores de mortalidad producidos por los biocontroladores en las aplicaciones individuales y solo hacen alusión a la utilización de una dosis letal, la que usualmente correspondió a la dosis letal media (LD50) (Ansari *et al.*, 2004; Anbesse *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2019).

Se desprende del cuadro 1 que entre las combinaciones de HEP y NEP, los efectos aditivos son mayoritarios en todas las condiciones experimentales con aproximadamente un 40,8% del total de los efectos sobre la mortalidad. Lo anterior es concordante con los resultados en Koppenhöfer y Grewal (2005), los cuales también obtuvieron efectos aditivos en la mayoría de las combinaciones NEP-HEP. Esto podría suponer que en general el uso conjunto de

ambos organismos no conllevaría una real ventaja, al no existir un efecto de potenciación del nivel de control que permita una mayor eficacia junto con menores dosis de aplicación. Sin embargo, las interacciones sinérgicas son en segundo lugar las más abundantes, con un aproximado del 37,2% del total de efectos entre todas las condiciones experimentales. El último lugar, lo ocupan las interacciones antagonicas con un 21,9% de efectos. Cabe destacar que el cuadro es un resumen que concentra diversos ensayos y tratamientos y que por ende los porcentajes anteriormente señalados solo son aproximaciones a la realidad.

Se puede observar que los experimentos desarrollados en laboratorio son los más abundantes entre todas las condiciones experimentales y que si bien la cantidad de trabajos que realizan evaluaciones en campo son menores, los resultados obtenidos en dichas condiciones son aditivos en su mayoría (nueve son aditivos, uno es sinérgico y uno es sin información).

Con respecto a los agentes evaluados, es posible notar que existe una escasa diversidad en cuanto a especies, principalmente de hongos. Las especies de hongos utilizadas con mayor frecuencia corresponden a diversas cepas/aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, mientras que entre los NEPs, *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* son los más comunes. La mayor utilización de estas especies se relaciona probablemente a su disponibilidad comercial (Faria y Wraight, 2007; Koppenhöfer *et al*, 2020). Se destaca que los hospederos de insectos más utilizados pertenecen a los órdenes Lepidoptera y Coleoptera con solo dos hospederos pertenecientes al orden Diptera.

A continuación, se expone el cuadro resumen anteriormente mencionado.

Los NEPs presentados son: *Ha: Heterorhabditis amazonensis*. *Hb: Heterorhabditis bacteriophora*. *Hd: Heterorhabditis downesi*. *Hi: Heterorhabditis indica*. *Hm: Heterorhabditis megidis*. *Hs: Heterorhabditis zealandica*. *Sb: Steinernema brazilense*. *Sc: Steinernema carpocapsae*. *Sf: Steinernema feltiae*. *Sg: Steinernema glaseri*. *Si: Steinernema ichnusae*. *Sk: Steinernema kraussei*. *Sr: Steinernema riobrave*. *Ssp: Steinernema sp.* *Sy: Steinernema yirgalemense*.

Los HEPs son: *Bb: Beauveria bassiana*. *Bbr: Beauveria brongniartii*. *Bc: Beauveria caledonica*. *Bp: Beauveria pseudobassiana*. *If: Isaria fumosorosea* (ex *Paecilomyces fumosoroseus*). *Ij: Isaria javanica*. *Ma: Metarhizium anisopliae*. *Mb: Metarhizium brunneum*. *Mp: Metarhizium pingshaense*. *Pf: Paecilomyces fumosoroseus*.

Y los hospederos son: *Cca: Curculio carye* H. (Coleoptera: Curculionidae). *Cn: Curculio nucum* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Ccu: Coptognathus curtipennis* F. (Coleoptera: Dynastidae). *Ch: Conotrachelus humeropictus* F. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Cl: Cyclocephala lurida* B. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Eo: Exomala orientalis* W. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Gm: Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Hab: Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Hh: Hypothenemus hampei* F. (Coleoptera: Scolytidae). *Hp: Hoplia philanthus* F. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Ld: Leptinotarsa decemlineata* S. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Os: Otiorynchus sulcatus* F. (Coleoptera: Curculionidae). *Pb: Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Pc: Phlyctinus callosus* S. (Coleoptera: Curculionidae). *Pp: Phyllophaga polyphylla* B. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Pr: Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Pv: Phyllophaga vetula* H. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Px: Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Rf: Rhynchophorus ferrugineus* O. (Coleoptera: Curculionidae). *Rp: Rhagoletis pomonella* W. (Diptera: Tephritidae). *Se: Spodoptera exigua* H. (Lepidoptera: Noctuidae). *Sl: Spodoptera littoralis* B. (Lepidoptera: Noctuidae). *Tm: Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Tp: Tipula paludosa* L. (Diptera: Tipulidae).

Cuadro 1. Efectos de las aplicaciones duales de nemátodos entomopatógenos (NEPs) y hongos entomopatógenos (HEPs), donde se indican aplicaciones simultáneas o aplicaciones secuenciales (HEP y luego NEP o viceversa). Se indica también el tiempo transcurrido entre ambas aplicaciones (TA), el efecto (Ef.) sobre la mortalidad observada (%) del hospedero evaluado (Hosp.) y la condición experimental (C. ex) correspondiente a laboratorio (L), campo (C) o invernadero (I).

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸	
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP		
Aplicaciones simultáneas o aplicaciones del HEP y posteriormente del NEP										
Abdolmaleki <i>et al.</i> (2017)	<i>Bb</i>	<i>Sf</i>	<i>Pb</i>	L	Simultánea	5 - 18 ^a	50 ^a	33,33 - 40	-	
					12 h			26,67 - 37,78	-	
					24 h			51,11	+	
					24 h			51,11 - 60	+	
	<i>Bb</i>	<i>Hb</i>				Simultánea	48 - 55 ^a	22,22 - 40	-	
						12 h		51,11	+	
						24 h		22,22 - 42,22	-	
						24 h		53,33 - 64,44	+	
Anbesse <i>et al.</i> (2008)	<i>Ma</i> (MM)	<i>Hb</i>	<i>Ccu</i>	L	Simultánea	s/i	s/i	21,3 - 54,7	+	
					2 semanas			56,9	*	
					3 semanas			16,3	+	
					3 semanas			44,7 - 72,2	*	
	Ansari <i>et al.</i> (2004)	<i>Ma</i> (CLO 53)	<i>Hm</i> (VBM 30)		L	Simultánea	s/i	s/i	13,3 - 57,1	+
						2 semanas			53,6 - 58,9	*
						3 semanas			26,7	+
						4 semanas			35	+
<i>Sg</i> (NC)					L	I	13,8 - 28 ^b	15 - 23,2 ^b	53,6 - 62,5	*
						4 semanas			73,2 - 82,1	*
						4 semanas			55,4 - 100	*
						4 semanas			39,2 - 88 ^b	*
<i>Sg</i> (NC)				L	Simultánea	s/i	s/i	23,3 - 56,7	+	
					2 semanas			58,9 - 69,6	*	
					3 semanas			18,3 - 46,7	+	
					4 semanas			73,2 - 76,8	*	
<i>Sg</i> (NC)				L	3 semanas			36,7	+	
					4 semanas			73,2 - 83,9	*	
								44,6 - 100	*	

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸				
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP					
Ansari <i>et al.</i> (2006)	<i>Ma</i> (CLO 53)	<i>Hb</i>	<i>Hp</i>	I	4 semanas	13,8 - 28 ^b	21 - 43,2 ^b	49 - 100 ^b	*				
				C	4 semanas	37 - 42 ^a	33 - 55 ^a	90 - 98 ^a	*				
					4 semanas	65 - 75 ^a	75 - 82 ^a	100 ^a	+				
					Simultánea			80 ^b	+				
					1 semana			93,3 ^b	*				
					2 semanas			100 ^b	*				
					Simultánea			100 ^b	*				
				L	1 semana	s/i	s/i	63,3 ^b	+				
					2 semanas			66,2 ^b	+				
					Simultánea			86,7 ^b	*				
Ansari <i>et al.</i> (2008)	<i>Ma</i> (V275)	<i>Hb</i> (UWS1)	<i>Os</i>	L	1 semana	s/i	s/i	63,3 ^b	+				
					2 semanas			66,2 ^b	+				
					Simultánea			86,7 ^b	*				
					1 semana			93,3 ^b	*				
					2 semanas			100 ^b	*				
				I	2 semanas	40 - 50 ^b	37,5 - 40 ^b	97,5 - 100 ^b	*				
					2 semanas		30 - 35 ^b	62,5 - 77,5 ^b	+				
					2 semanas	50 ^b	30 ^b	85 ^b	*				
				Ansari <i>et al.</i> (2010)	<i>Ma</i> (V275)	<i>Sk</i>	<i>Os</i>	I	Simultánea	50	60	100	*
									Simultánea	88	69		+
	Simultánea							15 - 100 ^a	s/i				
Bacca y Lagos (2014)	<i>Bb</i>	<i>Ssp</i>	<i>Gm</i>	L	3 días	0 - 100 ^a	0 - 100 ^a	0 - 100 ^a	s/i				
Barbercheck y Kaya (1991a)	<i>Bb</i> (ARSEF 252)	<i>Sc</i> (All)	<i>Se</i>	L	2 días	40 - 65 ^a	40 - 80 ^a	70 - 100 ^a	s/i				
		<i>Hb</i> (NC)			2 días		25 - 60 ^a	65 - 90 ^a	s/i				
Batalla <i>et al.</i> (2013)	<i>Ma</i> (34)	<i>Sc</i> (B14)	<i>Cn</i>	L	Simultánea	80 ^a	58 ^a	78	s/i ⁱ				
		<i>Sf</i> (D114)			Simultánea	80 ^a	57 ^a	80	s/i ⁱ				
		<i>Ssp</i> (D122)			Simultánea	80 ^a	77 ^a	78	s/i ⁱ				
		<i>Hb</i> (DG46)			Simultánea	80 ^a	58 ^a	80	s/i ⁱ				

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP	
Choo <i>et al.</i> (2002)	<i>Bbr</i>	<i>Sc</i> (All)	<i>Eo</i>	C	Simultánea	63 ^a	s/i	88 ^a	s/i
Correa <i>et al.</i> (2016)	<i>Bb</i> (Bb9205)	<i>Hb</i> (HNI0100)	<i>Px</i>	L	Simultánea	60		3	-
					2 días		15	-	
					4 días	68		35	-
	6 días					70	85	*	
	Simultánea						2	-	
	2 días				58		10	-	
	4 días						25	-	
<i>Ma</i> (Ma9236)			6 días			70	*		
Dlamini <i>et al.</i> (2020)	<i>Bb</i> (PPRI 5339 y R444)	<i>Sy</i>	<i>Pc</i>	L	Simultánea			74,4 - 100	+
					1 semana			90,5 - 100	+
					1 semana	56,7 - 89,4 ^b		100	*
					2 semanas			100	*
	2 semanas					66,5 - 68,5 ^b	96,8 - 100	+	
	Simultánea						77,5 - 89,7	+	
	1 semana				51,7 - 57,5 ^b		84,2 - 88,6	*	
	1 semana						94,2 - 96,6	+	
	2 semanas						92,5 - 100	*	
	<i>Ma</i> (ICIPE 69)						2 semanas	51,7 ^b	68,5 ^b
Hennessy (2012)	<i>Bb</i> (BUEXP 1504)	<i>Sc</i>	<i>Hab</i>	L	Simultánea	43 ^a	43 ^a	67	-
		<i>Hb</i>			Simultánea	43 ^a	57 ^a	78	+
	<i>Ma</i> (BUEXP 1503)	<i>Sc</i>			Simultánea	11 ^a	43 ^a	67	+
	<i>Hb</i>	Simultánea			11 ^a	57 ^a	100	*	
	<i>Hb</i>	Simultánea			25 ^a	60 ^a	70	-	

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸		
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP			
<i>Bb</i> (BUEXP 1504)					1 semana	25 ^a	18 ^a	40	-		
		<i>Hb</i>			Simultánea	0 ^a	18 - 25 ^a	15 - 35	*		
					Simultánea	10 ^a	18 - 25 ^a	0 - 20	-		
<i>Bb</i> (BUEXP 1694)		<i>Sc</i>			Simultánea	s/i ^g	50 ^a	75	*		
					Simultáneo	s/i ^g	35 - 50 ^a	44	+		
					Simultáneo	s/i ^g	35 ^a	13	-		
					1 semana	s/i ^g	25 - 40 ^a	25 - 44	+		
					1 semana	s/i ^g	40 ^a	69	*		
					Simultánea	20 ^a	30 ^a	17	-		
<i>Ma</i> (F52)		<i>Hd</i> (K122)			Simultánea	20 ^a	20 ^a	22	+		
					Simultánea	15 ^a	30 ^a	61	*		
<i>Bb</i> (BUEXP 1694)				C	Simultánea	15 - 16	56 - 62	58	+		
					Simultánea	45 ^a	0 ^a	44	*		
					1 semana	45 ^a	35 ^a	25	-		
					2 semanas	45 ^a	5 ^a	50	+		
					Simultánea		35 ^a	20	-		
					1 semana		10 ^a	50	*		
					2 semanas		20 ^a	35	+		
					Simultánea	20 ^a	70 ^a	20	-		
					1 semana		75 ^a	80	+		
					2 semanas		50 ^a	65	+		
					Simultánea		35 ^a	26	-		
	<i>Ma</i> (F52)		<i>Hb</i>	<i>Os</i>	L	1 semana		75 ^a	80	+	
							2 semanas		50 ^a	65	+
							Simultánea		35 ^a	26	-
							1 semana		25 ^a	58	*
							2 semanas		10 ^a	42	*
							Simultánea	30 ^a	80 ^a	100	+
		<i>Hb</i>			1 semana		40 ^a	89	*		
					2 semanas		47 ^a	47	+		

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP	
Hussein <i>et al.</i> (2016)	<i>If</i> (CCM 8367)	<i>Sf</i> (Ustinov)	<i>Ld</i>	L	Simultánea	s/i	s/i	98	s/i
					24 h			74	s/i
					48 h			66	s/i
					72 h			76	s/i
Ibrahim <i>et al.</i> (2019)	<i>Bb</i> (AUMC 3873)	<i>Hx</i>	<i>Gm</i>	L	Simultánea	s/i	s/i	88	*
					2 días			100	*
					4 días			84	*
					6 días			52	*
Ibrahim <i>et al.</i> (2019b)	<i>Bb</i> (AUMC 3873)	<i>Sr</i>	<i>Gm</i>	L	Simultánea	s/i	s/i	56 ^b	*
					2 días			60 ^b	*
					4 días			76 ^b	*
					6 días			60 ^b	*
Martínez <i>et al.</i> (2015)	<i>Bp</i> (GC03)	<i>Hb</i> (HbB y HbCP)	<i>Pp</i>	L	Simultánea	10 ^b	9 - 12 ^b	10,7 ^b	-
	72 h				10,7 ^b			-	
	<i>Mp</i> (GC01)	Simultánea			11 ^b	9,9 - 10,7 ^b		-	
	72 h	9,1 - 10,7 ^b				-			
<i>Bp</i> (GC03)	<i>Hb</i> (HbB)	Simultánea	8 ^b	16 ^b	9 ^b	-			
2 semanas	22 ^b	+							
Mc Namara <i>et al.</i> (2018)	<i>Mb</i>	<i>Sc</i> (EN03)	<i>Hab</i>	C	Simultánea	43 ^c	40 ^c	58 ^c	+
	<i>Bc</i>	<i>Hd</i>			Simultánea	38 ^c	83 ^c	86 ^c	+
	<i>Mb</i>	(K122)			Simultánea	17,5 ^c	83 ^c	93 ^c	+
Moreira <i>et al.</i> (2020)	<i>Bb</i> (UFU01)	<i>Ha</i> (MC01)	<i>Hh</i> <i>Tm</i>	L	Simultánea	28,16 - 86,6 ^b	27,97 - 92,3 ^b	0,76 - 98 ^b	s/i
					96 ^b	88 ^b	96 ^b	s/i	
Reda <i>et al.</i> (2018)	<i>Bb</i>	<i>Sc</i>	<i>Pr</i>	L	Simultánea	20 - 52 ^a	17 - 57 ^a	8 - 38 ^a	-
					12 h	s/i	s/i	s/i	+
					12 h	s/i	s/i	s/i	*
Ruiz <i>et al.</i> (2020)	<i>Ma</i> (M1cog)	<i>Sc</i> (All)	<i>Pv</i>	L	4 días	0	80 ^b	27 - 47 ^b	-
		<i>Sg</i> (NJ-43)			4 días	0	40 ^b	47 - 80 ^b	+

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP	
Saleh <i>et al.</i> (2004)	<i>Bb</i> (BSA3)	<i>Sc</i> (S2)	<i>Rf</i> <i>Gm</i>	L ^j	Simultánea	0 - 66,7	6,25 - 100	0 - 100	s/i
					Simultánea	75 - 100	68,8 - 100	93,3 - 100	s/i
Shapiro-Ilan <i>et al.</i> (2004)	<i>Bb</i> (BbGA2)	<i>Hi</i> (Hom1)	<i>Cca</i>	L	Simultánea	18 ^a	20 ^a	16,7 - 31,7	-
	<i>Ma</i> (MaLA4)	<i>Hi</i> (Hom1)			Simultánea	23 - 30 ^a	20 ^a	41,7 - 43,3	+
	<i>Bb</i> (BbGA2)	<i>Sc</i> (All)			Simultánea	25 ^a	60 ^a	75	+
	<i>Ma</i> (MaLA4)	<i>Sc</i> (All)			Simultánea	25 ^a	50 ^a	46,7	-
					Simultánea	35 ^a	60 ^a	61,7	-
					Simultánea	23 ^a	50 ^a	60	+
	<i>Pf</i> (ARSEF 3581)	<i>Hi</i> (Hom1)			Simultánea	25 - 45 ^a	23 - 28 ^a	28,3	-
		<i>Sc</i> (All)			Simultánea	25 - 45 ^a	58 - 65 ^a	48,3 - 53,3	-
Shaurub <i>et al.</i> (2016)	<i>Bb</i> (Bb2)	<i>Sr</i> (ML 29)	<i>Sl</i>	L	Simultánea			90 ^a	*
					2 días	s/i	s/i	88 ^a	*
		<i>Hb</i> (HP88)			Simultánea			73 ^a	*
					2 días			93 ^a	*
Simi <i>et al.</i> (2018)	<i>Bb</i> (IBCB 276)	<i>Sb</i>	<i>Ch</i>	C	Simultánea	15,6	33,3 - 60	34,4 - 65,6	+
					Simultánea	23 - 34 ^b	50 - 55 ^b	16 - 22 ^b	s/i
Tarasco <i>et al.</i> (2011)	<i>Bb</i> (ItBb- SAR22)	<i>Si</i> (ItSi-SAR16)	<i>Gm</i>	L	6 h	34 - 57 ^b	27 - 55 ^b	11 - 16 ^b	s/i
					12 h	45 - 50 ^b	50 - 55 ^b	0 ^b	s/i
					18 h	33 - 38 ^b	6 - 23 ^b	44 - 56 ^b	s/i
					24 h	40 - 49 ^b	17 - 33 ^b	27 - 34 ^b	s/i
					30 h	38 - 50 ^b	18 - 38 ^b	12 - 44 ^b	s/i
					36 h	38 - 44 ^b	22 - 35 ^b	27 - 34 ^b	s/i
					42 h	39 - 44 ^b	0 - 6 ^b	50 - 61 ^b	s/i
					48 h	50 - 56 ^b	0 - 12 ^b	38 - 44 ^b	s/i
						<i>Sc</i> (All)	<i>Rp</i>	L	Simultánea

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸				
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP					
Usman <i>et al.</i> (2020)	<i>Mb</i> (F52)	<i>Sr</i> (355)			Simultánea		80 - 90 ^{a, c}	87,5 - 94,11 ^c	+				
	<i>Ij</i> (wfG A17)	<i>Sc</i> (All)			Simultánea		70 - 90 ^{a, c}	68,75 - 88,23 ^c	+				
		<i>Sr</i> (355)			Simultánea	60 - 85 ^{a, c}	80 - 90 ^{a, c}	96,36 - 100 ^c	+				
Wakil <i>et al.</i> (2017)	<i>Bb</i> (WG-11)	<i>Hb</i>	<i>Rf</i>	L	Simultánea	7,14 - 14,28	9,18 - 21,42	17,34 - 43,87	+				
					Simultánea	13,26 - 20,4	18,36 - 29,59	42,85 - 61,22	*				
					1 semana	7,14 - 11,22	9,18 - 17,34	21,64 - 43,29	+				
					1 semana	13,26 - 20,4	18,36 - 29,59	50,51 - 73,19	*				
					2 semanas	7,14 - 13,26	9,18 - 18,36	34,02 - 71,13	+				
	<i>Ma</i> (WG-02)	<i>Hb</i>	<i>Rf</i>	L	2 semanas	11,22 - 20,4	14,28 - 29,59	51,54 - 88,65	*				
					Simultánea	4,081 - 17,34	9,18 - 29,59	13,4 - 48,45	+				
					1 semana	4,081 - 12,24	9,18 - 21,42	17,52 - 45,36	+				
					1 semana	14,28 - 17,34	23,46 - 29,59	55,67 - 64,94	*				
					2 semanas	4,081 - 11,22	9,18 - 18,36	28,86 - 61,85	+				
					2 semanas	12,24 - 17,34	21,42 - 29,59	64,94 - 75,25	*				
Wangui (2019)	<i>Ma</i>	<i>Hb</i>	<i>Gm</i>	L	2 días			28,6 - 56,2 ^b	*				
					3 días			25 ^b	+				
					3 días			40,8 ^b	*				
					4 días			21,7 ^b	+				
					2 días			35,8 - 55,8 ^b	*				
					3 días			29,2 ^b	+				
					3 días			42,3 - 43,3 ^b	-				
					3 días			33,3 ^b	*				
					4 días			24 ^b	+				
					4 días			35,8 ^b	-				
					2 días			32,957 - 67,920 ^b	*				
					3 días	<i>Sc</i>	<i>Tm</i>					34,423 ^b	+
					3 días						55,774 ^b	*	
					2 días	<i>Hb</i>						30,486 - 66,671 ^b	*

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP	
Williams <i>et al.</i> (2013)	<i>Ma</i> (105)	<i>Sf</i>	<i>Tp</i>	C	3 días			24,223 - 56,186 ^b	*
					1 semana			16,67 - 24,55 ^b	+
					1 semana			34,27 - 46,2 ^b	*
	<i>Bb</i> (1694)	<i>Hd</i> (K122)	<i>Hab</i>	C	Simultánea	11 - 13,8 ^{b, f}	35,4 - 36,7 ^{b, f}	33,1 - 53,2 ^{b, f}	+
					Simultánea	11 ^{b, f}	49,3 ^{b, f}	51,3 ^{b, f}	+
					Simultánea	12,9 ^{b, f}	35,4 ^{b, f}	23,9 ^{b, f}	+
	<i>Ma</i> (F-52)	<i>Hb</i>	<i>Cl</i>	L	Simultánea ³	2,9 - 28,8 ^d	53,7 - 68,5 ^d	51,2 - 82,5 ^d	+
					Simultánea ³	3,3 ^d	63,3 ^d	83,3 ^d	*
					2 semanas ³	2,9 - 28,8 ^d	62,5 - 68,5 ^d	45,7 - 73,3 ^d	+
					4 semanas ³	3,3 - 28,8 ^d	62,5 - 63,3 ^d	13,3 - 37,5 ^d	-
Simultánea ³					2,9 - 28,8 ^d	25 - 40 ^d	37,5 - 40 ^d	+	
2 semanas ³					2,9 ^d	40 ^d	31,4 ^d	+	
2 semanas ³					3,3 - 28,8 ^d	25 - 33,3 ^d	25 - 26,7 ^d	-	
4 semanas ³					3,3 ^d	33,3 ^d	26,7 ^d	+	
4 semanas ³					28,8 ^d	25 ^d	12,5 ^d	-	
<i>Ma</i> (F-52)					<i>Hb</i>	<i>Cl</i>	L	Simultánea ⁴	6,7 - 19,5 ^d
	2 semanas ⁴	6,8 - 19,5 ^d	38,6 - 48,8 ^d	29,3 - 36,6 ^d				+	
	4 semanas ⁴	19,5 ^d	48,8 ^d	39 ^d				+	
	4 semanas ⁴	9,8 ^d	41,5 ^d	31,7 ^d				*	
<i>Bb</i> (GHA)	<i>Hb</i>	<i>Cl</i>	L	Simultánea ⁴	2,2 - 22 ^d	33,3 - 48,8 ^d	42,2 - 51,2 ^d	+	
				2 semanas ⁴	2,3 - 22 ^d	38,6 - 48,8 ^d	4,4 - 31,7 ^d	+	
				4 semanas ⁴	12,2 - 22 ^d	41,5 - 48,8 ^d	2,2 - 26,8 ^d	+	
<i>Ma</i> (F-52)	<i>Hb</i>	<i>Cl</i>	L	Simultánea ⁵	0 - 7 ^{a, d, e}	17 - 40 ^{a, d, e}	15 - 42 ^{a, d, e}	+	
				Simultánea ⁵	42 ^d	90 ^d	78 ^d	-	
<i>Bb</i> (GHA)	<i>Hb</i>	<i>Cl</i>	I	Simultánea ⁶	13,2 ^d	7,5 ^d	9,4 ^d	-	
				Simultánea ⁶	0 ^d	7,5 ^d	13,2 ^d	*	
				4 semanas ⁷	22,5 ^d	30,6 ^d	30,6 ^d	-	

Referencia	Agente ¹		Hosp.	C. ex	TA	Mortalidad observada (%) ²			Ef. ⁸
	HEP	NEP				HEP	NEP	HEP/NEP	
Zayed <i>et al.</i> (2003)	<i>Ma</i> (F-52)		<i>Gm</i>	L	4 semanas ⁷	12,2 ^d	30,6 ^d	49 ^d	+
					Simultánea ⁶	0 ^d	7,5 ^d	20,8 - 41,5 ^d	*
	<i>Bb</i> (Bb2)	<i>Hb</i> (EBN10K)	<i>Gm</i>	L	4 semanas ⁷	2 ^d	30,6 ^d	38,8 ^d	+
					Simultánea	6		84 - 85	s/i ^h
					1 día	6	70 - 100	81 - 89	s/i ^h
					3 días	8		61 - 96	s/i ^h
		<i>Ssp</i> (EGBS)	<i>Gm</i>	L	5 días	14		81,8 - 95	s/i ^h
					Simultánea	6		95 - 96	s/i ^h
					1 día	6	75 - 85	41 - 50	s/i ^h
					3 días	8		33 - 57	s/i ^h
				5 días	14		92 - 96	s/i ^h	
Aplicaciones del NEP y posteriormente del HEP									
Bacca y Lagos (2014)	<i>Bb</i>	<i>Ssp</i>	<i>Gm</i>	L	3 días	0 - 100 ^a	0 - 100 ^a	15 - 100 ^a	s/i
Martínez <i>et al.</i> (2015)	<i>Bp</i> (GC03)	<i>Hb</i> (HbB y HbCP)	<i>Pp</i>	L	72 h	10 ^b	9 - 12 ^b	9,1 - 9,9 ^b	-
	<i>Mp</i> (GC01)				72 h	11 ^b		9,9 - 11,5 ^b	-
	<i>Bp</i> (GC03)	<i>Hb</i> (HbB)			2 semanas	8 ^b	16 ^b	8 ^b	-
Shaurub <i>et al.</i> (2016)	<i>Bb</i> (Bb2)	<i>Sr</i> (ML 29)	<i>Sl</i>	L	2 días	s/i	s/i	90 ^a	*
		<i>Hb</i> (HP88)						77 ^a	*

- ¹= entre paréntesis el aislado/cepa reportados.
²= valores en rangos agrupan múltiples tratamientos.
³= Corresponde al experimento n°3 de la fuente original.
⁴= Corresponde al experimento n°4 de la fuente original.
⁵= Corresponde al experimento n°5 de la fuente original.
⁶= Corresponde al experimento n°6 de la fuente original.
⁷= Corresponde al experimento n°7 de la fuente original.
⁸+ = aditivo; - = antagónico; * = sinérgico.
^a= valores estimados a partir de gráficos.
^b= valores no incluyen el error estándar indicado en la fuente original.
^c= valores corresponden a porcentaje de reducción de emergencia del insecto.
^d= valores de mortalidad son aquellos corregidos por la mortalidad del control.
^e= valores solo corresponden a la observación de la cuarta semana.
^f= valores medidos como porcentaje de infección del hospedero.
^g= fuente original contiene errores que no permiten asegurar la validez de los valores entregados.
^h= según fuente original efectos son sinérgicos y antagónicos, pero no presentan evidencia que sostenga dicha afirmación.
ⁱ= fuente original señala que efectos son “non additive” (no aditivos) pero no especifica a cuál corresponde.
^j= experimento realizado en campo y laboratorio.
s/i = sin información.

CONCLUSIONES

De acuerdo a la información recopilada y analizada se puede considerar que al combinar NEPs y HEPs en el control biológico se producen múltiples efectos sobre la mortalidad de insectos, resultando en la mayoría de los casos en efectos aditivos y sinérgicos (40,8% y 37,2% del total de efectos, respectivamente) sobre la mortalidad de las plagas. Mientras que los efectos antagónicos ocuparon los últimos lugares (21,9% de efectos). Adicionalmente, utilizar una mezcla de HEP y NEP puede conllevar una reducción en el periodo de mortalidad de la plaga, pero también puede incidir adversamente en la reproducción de los nemátodos y hongos, lo que podría afectar su potencial de reciclaje en campo.

Los estudios en condiciones de laboratorio son más abundantes, variables y a menudo poseen resultados contrastantes entre sí. En cambio, en campo, la información es más escasa y los resultados son en su gran mayoría aditivos.

Las diferencias en la variabilidad de resultados observada en los estudios enfatizan que, para obtener la interacción adecuada, se debe cumplir con criterios específicos para cada caso, relacionados a los parámetros de aplicación y la elección de agentes biocontroladores.

Por otra parte, de acuerdo a la literatura consultada los mecanismos de los tipos de efectos entre HEP y NEP no están bien comprendidos, particularmente para el caso de los sinergismos.

Por lo señalado anteriormente, es necesario aumentar la cantidad y profundidad de estudios para mejorar la comprensión de las interacciones entre HEPs y NEPs. Por lo tanto, se debe evaluar bajo diversas condiciones ambientales corroborando en campo e invernadero los resultados antes de las recomendaciones finales. También es importante determinar por medios estadísticos el tipo de efecto resultante con la finalidad de permitir comparaciones entre distintas investigaciones. En la práctica, lo que determina si una estrategia de control biológico será utilizada dependerá de la eficacia, su costo y ventajas en relación a los insecticidas sintéticos. Adicionalmente, la combinación debe ser de menor costo que la utilización de cualquier componente por si solo bajo el mismo nivel de eficacia.

Finalmente, además de su utilidad en control biológico de plagas, este trabajo puede ayudar a comprender las interacciones entre ambos organismos en la naturaleza. Ambos organismos son ubicuos en los ecosistemas terrestres y cumplen importantes roles ecológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdolmaleki, A.; H. Rafiee; Z. Tanha and B. Naseri. 2017. Virulence of two entomopathogenic nematodes through their interaction with *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* against *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae). *Journal of Crop Protection*, 6(2): 287-299.
- Adelou, M.; S. Alnajjar; S. Naushad and R. Gupta. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 5575-5599.
- Altre, J. and J. Vandenberg. 2001. Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against Lepidopteran larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 81-86.
- Anbesse, S.; B. Adge and W. Gebru. 2008. Laboratory screening for virulent entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema yirgalemense*) and fungi (*Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*) and assessment of possible synergistic effects of combined use against grubs of the barley chafer *Coptognathus curtipennis*. *Nematology*, 10(5): 701-709.
- Ansari, M.; L. Tirry and M. Moens. 2004. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philanthus*. *Biological Control*, 31(2): 172-180.
- Ansari, M.; L. Tirry and M. Moens. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *BioControl*, 50: 465-475.
- Ansari, M.; F. Shah; L. Tirry and M. Moens. 2006. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control*, 39: 453-459.
- Ansari, M.; F. Shah and T. Butt. 2008. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus*, control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129: 340-347.
- Ansari, M.; F. Shah and T. Butt. 2010. The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus*, in strawberry growbags. *Biocontrol*

Science and Technology, 20(1): 99-105.

Arthurs, S. and M. Thomas. 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. Journal of Invertebrate Pathology, 78: 59–65.

Arthurs, S.; K. Heinz and J. Prasifka. 2004. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. Bulletin of Entomological Research, 94: 297-306.

Bacca, T. and T. Lagos. 2014. Effect of *Beauveria bassiana* and entomopathogenic nematode *Steinernema* sp. on *Galleria mellonella* larvae. Boletín Científico del Centro de Museos, 18(1): 247-258.

Barbercheck, M. and H. Kaya. 1990. Interactions between *Beauveria-bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema-feltiae* and *Heterorhabditis-heliothidis*. Journal of Invertebrate Pathology, 55(2): 225-234.

Barbercheck, M. and H. Kaya. 1991a. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology, 20: 707-712.

Barbercheck, M. and H. Kaya. 1991b. Effect of Host Condition and Soil texture on Host Finding by the Entomogenous Nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). Environmental Entomology, 20(2): 582-589.

Barelli, L.; M. Soumya; S. Behie and M. Bidochka. 2015. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. Plant Molecular Biology, 90.

Batalla, L.; A. Morton; S. Santamaria and F. García. Isolation and virulence of entomopathogenic fungi against larvae of hazelnut weevil *Curculio nucum* (Coleoptera, Curculionidae) and the effects of combining *Metarhizium anisopliae* with entomopathogenic nematodes in the laboratory. Biocontrol Science and Technology, 23(1): 101-125.

Baverstock, J.; H. Roy and J. Pell. 2010. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors (pp. 89-102). In: The ecology of fungal entomopathogens. Springer. Netherlands.

Bhat, A.; A. Chaubey and T. Askary. 2020. Global distribution of entomopathogenic nematode, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30.

- Boomsma, J.; A. Jensen; N. Meyling and J. Eilenberg. 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology*, 59: 467-485.
- Boucias, D. and J. Pedland. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial events of mycoses in arthropod hosts. (pp. 101-127) En: Cole, G. and H. Hoch. (Eds). *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plant and Animals*. 1era edición. Springer. Boston, MA, USA.
- Butt, T.; C. Coates; I. Dubovskiy and N. Ratcliffe. 2016. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. (v. 94, pp. 307-364). In: Lovett, B. and R. St. Leger. (Eds.). *Advances in Genetics*. 1era edición. Elsevier. Cambridge, MA, USA.
- Butt, T and M. Goettel. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. (pp. 141-195). In: Navon, A. and K. Ascher. (Eds.). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*.
- Chandler, D.; D. Hay and A. Reid. 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Applied Soil Ecology*, 5: 133-141.
- Chandler, D.; G. Davidson; J. Pell; B. Ball; K. Shaw and K. Sunderland. 2000. Fungal Biocontrol of Acari. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 357-384.
- Chandler, D. 2017. Basic and applied research on entomopathogenic fungi. (ch. 5, pp. 42-60). In: Lacey, L. (Ed.). *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Academic Press. Londres, Reino Unido.
- Choo, H.; H. Kaya; J. Huh; D. Lee; H. Kim; S. Lee et al. 2002. Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*) and a fungus *Beauveria brongniartii* for biological control of the white grubs, *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. *Biocontrol*, 47: 177-192.
- Correa, J.; A. Saenz and M. Rodriguez. 2016. *In vitro* interaction of *Metarhizium anisopliae* Ma 9236 and *Beauveria bassiana* Bb 9205 with *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100 for the control of *Plutella xylostella*. *Springer Plus*, 5: 2068.
- Curran, J. 1993. Post application biology of entomopathogenic nematodes in soil (pp. 67-77). In: Bedding, R.; R. Ackhurst and H. Kaya. (Eds.). *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. CSIRO, East Melbourne, Australia.
- Dillman, A.; J. Chaston; B. Adams; T. Ciche; H. Goodrich-Blair; P. Stock et al. 2012. An entomopathogenic nematode by any other name. *PlosPathogens*, 8(3).

- Dlamini, B.; A. Malan and P. Addison. 2020. Combined effect of entomopathogenic fungi and *Steinernema yirgalemense* against the banded fruit weevil, *Phlyctinus callosus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 30(11): 1169-1179.
- Dromph, K. 2003. Collembolans as vectors of entomopathogenic fungi. *Pedobiologia*, 47: 245–256.
- Faria, M. and S. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biology Control*, 43: 237–256.
- Finney, D. 1964. Probit Analysis: Statistical treatment of the sigmoid curve. Cambridge University Press, London.
- Gaugler, R.; A. Bednarek and J. Campbell. 1992. Ultraviolet inactivation of heterorhabditid and steinernematid nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59: 155–160.
- Goettel, M. 1995. The utility of bioassays in the risk assessment of entomopathogenic fungi. Biotechnology Risk Assessment: USEPA/ USDA/Environment Canada/Agriculture and Agri-Food Canada. Risk Assessment Methodologies (pp. 2-8). College Park: University of Maryland Biotechnology. Proceedings of the Biotechnology Risk Assessment Symposium, June 6e8, 1995. Pensacola, FL.
- Goettel, M. and G. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. (pp. 213-249). In: Lacey, L. (Ed.) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. New York, USA.
- Griffin, C.; N. Boemare and E. Lewis. 2005. Biology and Behaviour. (ch. 2, pp. 47-59). In: Grewal, P.; R. Ehlers and D. Shapiro-Ilan. (Eds.). Nematodes as Biocontrol Agents. CABI. Massachusetts, USA.
- Griffin, C. 2012. Perspectives on the Behavior of Entomopathogenic Nematodes from Dispersal to Reproduction: Traits Contributing to Nematode Fitness and Biocontrol Efficacy. *Journal of Nematology*, 44(2): 177-184.
- Gulcu, B.; S. Hazir and H. Kaya. 2012. Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 326-333.
- Hajek, A. and R. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39: 293-322.
- Hazir, S.; H. Kaya; P. Stock and N. Keskin. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27: 181-202.

Helmberger, M.; E. Shields and K. Wickings. 2017. Ecology of belowground biological control: Entomopathogenic nematode interactions with soil biota. *Applied Soil Ecology*, 121: 201-213.

Hennessy, R. 2012. Effects of a dual application of entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi against a forest pest, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) and a horticultural pest, *Otiorhynchus sulcatus* F. (Coleoptera: Curculionidae). Master of Science thesis. Maynooth, Ireland: Biology Department, Maynooth University. 89h.

Holder, D. and N. Keyhani. 2005. Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to Substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5260-5266.

Hominick, W.; A. Reid; D. Bohan and B. Briscoe. 1996. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 317-331.

Hummadi, E.; A. Dearden; T. Generalovic; B. Clunie; A. Harrott; Y. Cetin et al. 2021. Volatile Organic compounds of *Metarhizium brunneum* influence the efficacy of entomopathogenic nematodes in insect control. *Biological Control*, 155(2).

Hummel, R.; J. Walgenbach; M. Barbercheck; G. Kennedy; G. Hoyt and C. Arellano, C. 2002. Effects of production practices on soil-borne entomopathogens in western North Carolina vegetable systems. *Environmental Entomology*, 31: 84–91.

Hussein, H.; O. Skoková; V. Puža and R. Zemek. 2016. Laboratory Evaluation of *Isaria fumosorosea* CCM 8367 and *Steinernema feltiae* Ustinov against Immature Stages of the Colorado Potato Beetle. *PLoS One*, 11(3).

Ibrahim, S.; H. Salem and M. Taha. 2019. Dual application of entomopathogenic nematodes and fungi on immune and antioxidant enzymes of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L.. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29.

Ibrahim, S.; M. Taha and H. Salem. 2019b. Initial fungal infection reduce the penetration and reproduction rate of *Steinernema riobrave* in *Galleria mellonella*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 12(1): 101-109.

Jaber, L. and B. Ownley. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. *Biological Control*, 116: 36-45.

Jackson, M.; C. Dunlap and S. Jaronski. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55: 129-145.

Jackson, M. and S. Jaronski. 2009. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113: 842-850.

Jaronski, S. and G. Mascarin. 2017. Mass production of fungal entomopathogens. (ch. 9, pp. 141-155). In: Lacey, L. (Ed.). *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Academic Press. Londres, Reino Unido.

Jiang, H.; A. Vilcinskas and M. Kanost. 2010. Immunity in lepidopteran insects. (v. 708, pp. 181-204). In: Soderhall, K. (Ed.). *Invertebrate Immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer. USA.

Kaya, H. 1990. Soil Ecology. (ch. 5, pp. 93-115). In: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Florida, USA.: CRC Press. 363p.

Kaya, H. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.

Keller, S., P. Kessler and C. Schweizer. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *BioControl*, 48: 307–319.

Kepler, R.; G. Sung; S. Ban; A. Nakagiri; M. Chen; B. Huang et al. 2012. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. *Mycologia*, 104: 182–197.

Kim, J. and D. Roberts. 2012. The relationship between conidial dose, moulting and insect developmental stage on the susceptibility of cotton aphid, *Aphis gossypii*, to conidia of *Lecanicillium attenuatum*, an entomopathogenic fungus. *Biocontrol Science and Technology*, 22: 319-331.

Koppenhöfer, A. and P. Grewal. 2005. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. (ch. 20, pp. 363-381). In: Grewal, P.; R. Ehlers and D. Shapiro-Ilan. (Eds.). *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI. Massachusetts, USA.

Koppenhöfer, A.; D. Shapiro-Ilan and I. Hiltbold. 2020. Entomopathogenic nematodes in sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Production Systems*, 4(125): 1-14.

Koppenhöfer, A. and E. Fuzy. 2006. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 11–

22.

Kung, S.; R. Gaugler and H. Kaya. 1990. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. *Journal of Nematology*, 22(4): 440–445.

Kung, S.; R. Gaugler and H. Kaya. 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 242–249.

Lacey, L.; D. Grzywacz; D. Shapiro-Ilan; R. Frutos; M. Brownbridge and M. Goettel. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1-41.

Lavine, M. and M. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295–1309.

Li, J.; G. Chen and J. Webster. 1997. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 43(8): 770-773.

Liu, W.; Y. Xie; J. Dong; J. Xue; Y. Zhang; Y. Lu et al. 2014. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi to *Matsucoccus matsumurae*. *PLoS One*, 9(7).

Mahaney, W.; J. Dohm; V. Baker; H. Newsom. D. Malloch; R. Hancock et al. 2001. Morphogenesis of Antarctic paleosols: Martian analogue. *Icarus*, 154: 113-130

Mansour, N.; M. Eldefrawi; A. Tappozada and M. Zeid. 1966. Toxicological studies on the Egyptian cotton leafworm *Prodenia litura* F. VII. Potentiation and antagonism of organophosphorus and carbamates. *Journal of Economic Entomology*, 59(2): 307-311.

Martínez, A.; R. Alatorre; A. Guzmán and E. Rodríguez. 2015. Effect of dual inoculation with nematodes and fungal pathogens on the survival of *Phyllophaga polyphylla* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*, 25: 1221–1232.

Mc Namara, L.; A. Kapranas; C. Williams; P. O'Tuama; K. Kavanagh and C. Griffin. 2018. Efficacy of entomopathogenic fungi against large pine weevil, *Hylobius abietis*, and their additive effects when combined with entomopathogenic nematodes. *Journal of Pest Science*, 91: 1407–1419.

Mc Namara, L.; J. Carolan; C. Griffin; D. Fitzpatrick and K. Kavanagh. 2017. The effect of entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 100: 82-92.

- McVay, J.; R. Gudauskas and J. Harper. 1977. Effects of *Bacillus thuringiensis* Nuclear-Polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 29: 367-372.
- Meyling, N.; J. Pell and J. Eilenberg. 2006. Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. *Journal of Invertebrate pathology*, 93: 121-126.
- Meyling, N.; N. Schmidt and J. Eilenberg. 2012. Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland. *Polar Biology*, 35: 1439-1445.
- Mietkiewski, R.; J. Pell and S. Clark. 1997. Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: field and laboratory comparisons. *Biocontrol Sciences and Technology*, 7: 565–575.
- Molina, J.; R. Samuels; I. Machado and C. Dolinski. 2007. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 87-1.
- Moreira, I.; V. Andaló; G. Assis; L. Faria; F. Carvalho and R. Zampiroli. 2020. Association of *Heterorhabditis amazonensis* and *Beauveria bassiana* aiming the control of *Hypothenemus hampei*. *Coffee Science*.
- Nelson, D. and G. Blomquist. 1995. Insect waxes. (pp. 1-90). In *Waxes: Chemistry, Molecular Biology, and Functions*; Hamilton, R. (Ed). The Oily Press, LTD. Dundee, Scotland, Reino Unido.
- Nermut, J.; J. Konopická; R. Zemek; M. Kopačka; A. Bohatá and V. Půža. 2020. Dissemination of *Isaria fumosorosea* Spores by *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Fungi*, 6(4): 359.
- Nishimatsu, T. and J. Jackson. 1998. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 91(2): 410-418.
- Ortiz, A. and N. Keyhani. 2013. Action on the surface: Entomopathogenic Fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4: 357-374.
- Ownley, B.; K. Gwinn and F. Vega. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55: 113–128.
- Park, J. and Y. Kim. 2011. Benzylideneacetone suppresses both cellular and humoral immune responses of *Spodoptera exigua* and enhances fungal pathogenicity. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14: 423-427.

- Pedrini, N.; A. Ortiz; C. Huarte; S. Zhang and N. Keyhani. 2013. Targeting insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4: 1-18.
- Ragozzino, A. and G. D'Errico. 2011. Interactions between nematodes and fungi: a concise review. *Redia*, 94: 123-125.
- Reda, E.; A. Sallam; H. Ibrahim and S. Eid. 2018. Efficacy of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* and its interaction with *Beauveria bassiana* against *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Journal of Plant Protection and Pathology*, 9(12): 795-798.
- Ruiz, J.; C. Cortés; T. Aquino; P. Matadamas; C. García and J. Navarro. 2020. Mortality of *Phyllophaga vetula* larvae by the separate and combined application of *Metarhizium anisopliae*, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema glaseri*. *Journal of Nematology*, 52: 1-8.
- Saleh, M.; G. Hegazy; M. Salem; S. Hanounik; O. Mohanna and M. Alheji. 2004. Persistence of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in Soil around Date Palm Trunks and their Effects on Adults of *Rhynchophorus ferrugineus*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 14(1): 141-145.
- Santi, L.; W. da Silva; M. Berger; M. Guimaraes; A. Schrank and M. Vainstein. 2010. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4): 874-880.
- Schreiter, G., T. Butt; A. Beckett; G. Moritz and S. Vestergaard. 1994. Invasion and development of *Verticillium lecanii* in the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Mycological Research*, 98: 1025-1034.
- Schrank, A. and M. Vainstein. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7): 1267-1274.
- Shapiro, D.; C. McCoy; A. Fares; T. Obreza and H. Dou. 2000. Effects of soil type on virulence and persistence of entomopathogenic nematodes in relation to control of *Diaprepes abbreviatus*. *Environmental Entomology*, 29(5): 1083-1087.
- Shapiro-Ilan, D. and I. Brown. 2013. Earthworms as phoretic hosts for *Steinernema carpocapsae* and *Beauveria bassiana*: Implications for enhanced biological control. *Biological Control*, 66: 41-48.
- Shapiro-Ilan, D.; I. Hiltbold and E. Lewis. 2018. Nematodes (ch. 11, pp. 415-440). In: Hajek,

A. and D. Shapiro-Ilan. (Eds.). Ecology of Invertebrate Diseases. Wiley, Hoboken, New Jersey, USA.

Shapiro-Ilan, D.; M. Jackson; C. Reilly and M. Hotchkiss. 2004. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control*, 30(1): 119-126.

Shapiro-Ilan, D.; S. Hazir and I. Glazer. 2017. Basic and Applied Research: Entomopathogenic Nematodes (ch. 6, pp. 91-105). In: Lacey, L. (Ed). Microbial Agents for Control of Insect Pests: From Theory to Practice. Academic Press, San Diego, California, USA.

Shaurub, E.; N. Reyad; H. Abdel-Wahab and S. Ahmed. 2016. Mortality and nematode production in *Spodoptera littoralis* larvae in relation to dual infection with *Steinernema riobrave*, *Heterorhabditis bacteriophora*, and *Beauveria bassiana*, and the host plant. *Biological Control*, 103: 86-94.

Shuang, Q. and S. Wang. 2018. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 83: 96-103.

Simi, L.; L. Garrigós; O. Trevisan; J. Medeiros; L. Ezequiel; F. Silber et al. 2018. Mortality of *Conotrachelus humeropictus* in response to combined application of the nematode *Steinernema brazilense* and the fungus *Beauveria bassiana*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 85: 1-9.

Singh J. and J. Faull. 1988. Antagonism and Biological Control. (pp. 167-177). In: Mukerji, K. and K. Garg. (Eds.). Biocontrol of Plant Disease. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Spatafora, J.; M. Aime; I. Grigoriev; F. Martin; J. Stajich and M. Blackwell. 2017. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiology Spectrum*, 5(5).

Stuart, R.; M. Barbercheck and P. Grewal. 2015. Entomopathogenic nematodes in the soil environment: distributions, interactions and the influence of biotic and abiotic factors. (pp. 97-137). In: Campos, R. (Ed.). Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Springer. Dordrecht, Países Bajos.

Sung, G.; N. Hywel; J. Sung; J. Luangsa-ard; B. Shrestha and J. Spatafora. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57: 5-59.

St. Leger, R. 1991. Integument as a Barrier to Microbial Infections. (pp. 284-306). In: Physiology of the Insect Epidermis. Binnington, K. and A. Retnakaran. (Eds.). CSIRO Publications. Melbourne, Australia.

- Tarasco, E.; C. Alvarez; O. Triggian and E. Quesada. 2011. Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. *Biocontrol Science and Technology*, 21(6): 693-704.
- Tragust, S.; B. Mitteregger; V. Barone; M. Konrad; L. Ugelvig and S. Cremer. 2013. Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. *Current Biology*, 23, 76-82.
- Ugelvig, L. and S. Cremer. 2007. Social prophylaxis: group interaction promotes collective immunity in ant colonies. *Current Biology*, 17: 1967-1971.
- Usman, M.; S. Gulzar; W. Wakil; S. Wu; J. Piñero; T. Leskey et al. 2020. Virulence of Entomopathogenic Fungi to *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) and Interactions With Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Economic Entomology*, 113(6): 2627-2633.
- Vega, F.; M. Goettel; M. Blackwell; D. Chandler; M. Jackson; S. Keller et al. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2: 149-159.
- Vega, F.; N. Meyling; J. Luangsa-Ard and M. Blackwell. 2012. Fungal entomopathogens. (pp. 171-220). In: Vega, F. and H. Kaya. (Eds.). *Insect pathology*. Elsevier, Londres, Reino Unido.
- Vertyporokh, L.; M. Hulas-Stasiak and I. Wojda. 2019. Host-pathogen interaction after infection of *Galleria mellonella* with the filamentous fungus *Beauveria bassiana*. *Insect Science*, 00: 1-11.
- Wakil, W; Y. Muhammad and D. Shapiro-Ilan. 2017. Effects of single and combined applications of entomopathogenic fungi and nematodes against *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Scientific Reports*, (7): 5971.
- Wang, C. and R. St. Leger. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*, 6: 808-816.
- Wang, C. and M. Feng. 2014. Advances in fundamental and applied studies in China of fungal biocontrol agents for use against arthropod pests. *Biological Control*, 68: 129-135.
- Wang, C. and S. Wang. 2017. Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. *Annual Review of Entomology*, 62(1): 73-90.
- Wangui, B. 2019. Interaction between entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* in host and non-host insects. Ghent University. 46p.
- Williams, C.; A. Dillon; C. Harvey; R. Hennessy; L. Mc Namara and C. Griffin. 2013. Control of a major pest of forestry, *Hylobius abietis*, with entomopathogenic nematodes and

fungi using eradicator and prophylactic strategies. *Forest Ecology and Management*, 305: 212-222.

Wojda, I. 2017. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 24: 342-357.

Wu, S. 2013. Efficacy of entomopathogenic Nematodes and Entomopathogenic Fungi against Masked Chafer White Grubs, *Cyclocephala* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae). Doctoral thesis. Blacksburg, USA: Virginia Polytechnic Institute and State University. 151p.

Wu, S.; R. Youngman; L. Kok; C. Laub and D. Pfeiffer. 2014. Interaction between entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi applied to third instar southern masked chafer white grubs, *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: Scarabaeidae), under laboratory and greenhouse conditions. *Biological Control*, 76: 65-73.

Zayed, A.; M. Shamseldean; K. Abd El Aleem and Y. Fergany. 2003. Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* sp. In vivo effects on host preference of the nematode and on pathogen progeny production in the greater wax moth *Galleria mellonella* L. *Efflatounia*, 3: 15-24.

Zhang, L.; O. Fasoyin; I. Molnár and Y. Xu. 2020a. Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: novel bioactive compounds. *Royal Society of Chemistry*, 37(9): 1181-1206.

Zhang, Y.; S. Li; H. Li; R. Wang; K. Zhang and J. Xu. 2020b. Fungi–Nematode Interactions: Diversity, Ecology, and Biocontrol Prospects in Agriculture. *Journal of Fungi*, 6(4): 206.