

INRA

Institut National de la Recherche Agronomique

LES NEMATODES ENTOMOPATHOGENES

Steinernematidae et Heterorhabditidae

H. Mauléon¹, N. Boemare², D. Denon¹, S. Briand¹ et S. Pages²



1. Unité de Recherches en Productions Végétales, INRA Antilles Guyane, Domaine Duclos,
97 170 Petit Bourg, Guadeloupe.

2. "Ecologie microbienne des Insectes et Interaction Hôte-pathogène" UMR EMIP INRA-UMII n°1133,
Université Montpellier II, 34095 Montpellier CEDEX 5.

Interêt des nématodes en Lutte Biologique

Découverts au XVII^{ème} siècle, les nématodes parasites d'insectes (N.P.I.) n'ont suscité un intérêt que depuis une soixantaine d'années, lorsque les chercheurs ont commencé à envisager l'utilisation de ces entomoparasites en lutte biologique. Il faudra encore attendre jusqu'aux années soixante-dix pour que les recherches ne prennent une réelle importance. Les premiers succès ont été obtenus dans les années 1980 avec la lutte contre plusieurs insectes, notamment les Charançons (BEDDING & MILLER, 1981).

Six familles de nématodes entomopathogènes suscitent un intérêt :

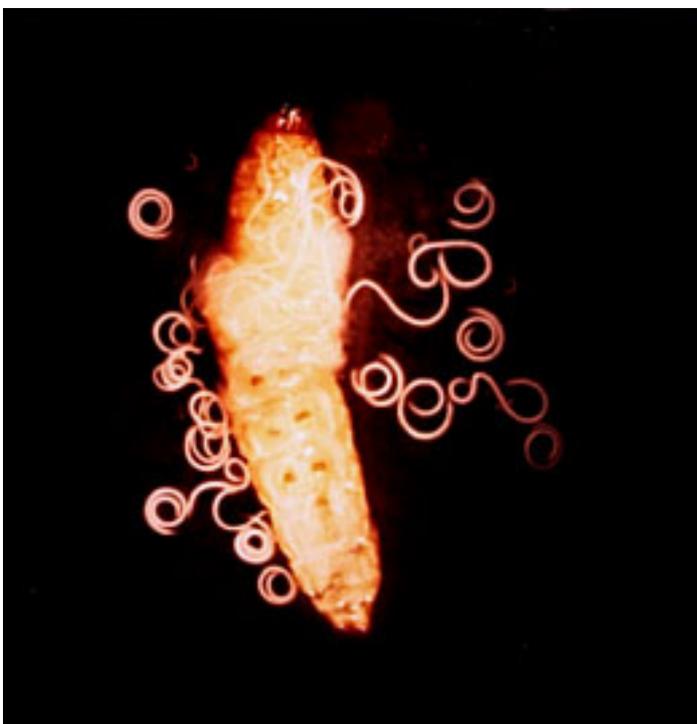
- dans la classe des Adenophorea la famille des Mermithidae
- dans la classe des Secernentea, les familles des Allantonematidae, Sphaerulariidae, Aphelenchoididae Steinernematidae et Heterorhabditidae.

Les nematodes appartenant à la classe des Adenophorea sont libres dans le sol au stade infestant.

Les nématodes appartenant à la classe des Secernentea vivent dans des habitats très variés et peuvent être parasites de plantes, d'invertébrés ou de vertébrés.

Il existe une grande diversité dans la taille des nématodes parasites d'insectes., leur forme, leur hôte ou les relations avec leur hôte. De même, les effets du parasitisme sont très variables, allant de troubles bénins à la mort très rapide de l'insecte. Des effets intermédiaires sont également observés, comme la stérilité, la baisse de fécondité, les perturbations du développement ou encore les aberrations de comportement.

Ce sont les familles des Steinernematidae et des Heterorhabditidae qui paraissent pour l'instant les plus exploitables en lutte biologique. Ces nématodes, qui possèdent une bactérie symbiotique, ont un potentiel d'utilisation remarquable. Ils infestent une très large gamme d'insectes et quelques autres Arthropodes mais ont l'avantage de ne pas s'attaquer ni aux mammifères ni aux végétaux. La mort de l'hôte survient très rapidement , un à deux jours après l'infestation. Enfin, ils peuvent être facilement élevés et sont formulables sous forme de bioinsecticide.



Galleria mellonella parasitée



Larve infestante

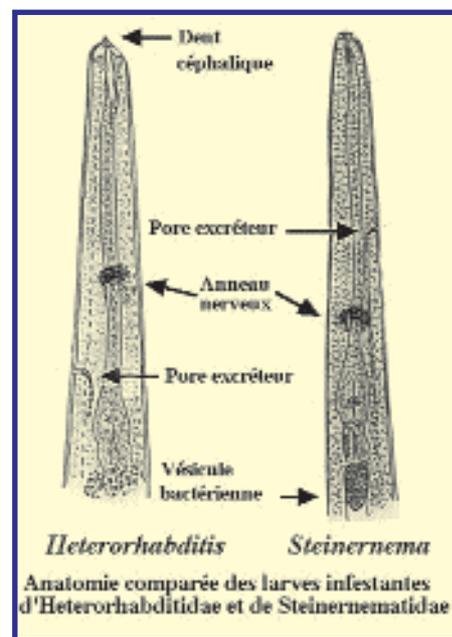
Systematique des Steinernematidae et des Heterorhabditidae

La position systématique, d'après Poinar (1976), Khan (1976) et Wouts (1980) est la suivante :

Phylum : Nematoda Chitwood, 1950
Classe : Secernentea von Linstow, 1905
Ordre : Rhabditida (Oerly, 1880) Chitwood, 1933
Sous-ordre : Rhabditina (Oerly, 1880) Travassos, 1920
Super-famille : Rhabditoïdea (Oerly, 1880) Travassos, 1920
Famille : **Steinernematidae** (Filipjev, 1934) Chitwood et Chitwood, 1937
Heterorhabditidae Poinar, 1976

La distinction entre les larves de troisième stade (L3) de Steinernematidae et celles des Heterorhabditidae est assez aisée, grâce à des caractères morphologiques, comme la position du pore excréteur, antérieur à l'anneau nerveux chez les Heterorhabditidae et postérieur chez les Steinernematidae

ou la présence plus ou moins marquée d'une dent sur la tête des larves d'Heterorhabditidae.



Les deux types de bactéries symbiotiques rencontrées chez les nématodes entomopathogènes provoquent une coloration chez les insectes infestés différente (rouge foncé chez les Heterorhabditidae, brun-jaune chez les Steinernematidae).



L'observation de la présence ou de l'absence des mâles dans un insecte infesté depuis trois ou quatre jours permettra de trancher facilement entre les deux familles. Seule la famille des Heterorhabditidae présente un stade de femelle hermaphrodite.

Méthodes utilisées pour caractériser les nématodes

a) Caractérisation morphologique

Plusieurs clés de détermination peuvent être utilisées pour la caractérisation des *Steinernema*, *Neosteinernema* et *Heterorhabditis*. Ces clés sont basées sur un certains nombres de mensurations réalisées principalement sur les adultes et les larves de nématodes.

MENSURATIONS	MALES	L3
Longueur totale		X
Longueur de l'œsophage		X
Distante tête au pore excréteur	X	X
Longueur de la queue (anus à pointe de la queue)		X
Largeur		X
Largeur au niveau de l'anus		X
Ratio a : longueur totale / largeur		X
Ratio b : longueur totale / distance tête à la base du pharynx		X
Ratio c : longueur totale / longueur de la queue		X
D % : distance tête au pore excréteur / longueur œsophage		X
Longueur spicule	X	
Longueur gubernaculum	X	
E % : distance tête au pore excréteur / longueur de la queue	X	
Distance hemizonide	X	X
Ratio F : largeur / longueur de la queue	X	X

La caractérisation morphologique, n'est pas évidente pour un néophyte. Le degré de ressemblance morphologique des différentes souches d'*Heterorhabditidae* ne permet pas, même aux spécialistes, d'attribuer avec certitude une souche dans une espèce ou dans une autre.

b) Caractérisations moléculaires

Plusieurs approches moléculaires ont été développées :



- Electrophorèse des protéines (utilisée pour différencier des espèces d'un même genre).
- RFLP (espèce et infra espèces)
- RAPD (permet de différencier des sous espèces : populations, souches, isolats)
- Analyse de séquences de nucléotides (dépend du gène et de la région étudiée: taxa et espèces)
- Microsatellites (permet de caractériser des individus)

Espèces et souches actuellement recensées

Actuellement, quarante neuf espèces de Steinernematidae appartenant à deux genres (*Steinernema* et *Neosteinernema*) et onze espèces d'*Heterorhabditis* sont reconnues.

Famille Steinernematidae, genre *Steinernema*

- Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) Travasso, 1927
- S. glaseri* (Steiner, 1929) Wouts, Mracek, Gerding & Bedding, 1982
- S. feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerding & Bedding, 1982
- S. affine* (Bovien 1937) Wouts, Mracek, Gerding & Bedding, 1982
- S. carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerding & Bedding, 1982
- S. arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts, Mracek, Gerding & Bedding, 1982
- S. intermedium* (Poinar, 1985) Mamiya, 1988
- S. rarum* (de Doucet, 1986) Mamiya, 1988
- S. kushidai* Mamiya, 1988
- S. ritteri* de Doucet & Doucet, 1990
- S. scapterisci* Nguyen et Smart, 1990
- S. caudatum* Xu, Wang & Li, 1991
- S. longicaudum* Shen & Wang, 1992
- S. neocurtillae* Nguyen et Smart, 1992
- S. serratum* Liu, 1992
- S. riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994
- S. cubanum* Mracek, Hernandez & Boemare, 1994
- S. puertoricensis* Roman & Figueroa, 1994
- S. bicornutum* Tallosi, Peters & Ehlers, 1995
- S. oregonense* Liu & Berry, 1996
- S. monticolum* Stock, Choo & Kaya, 1997
- S. abbasi* Elawad, Ahmad & Reid, 1997
- S. ceratophorum* Heng, Reid & Hunt, 1997
- S. kari* Waturu, Hunt & Reid, 1997
- S. siamkayai* Stock, Sommsook & Reid, 1998
- S. tami* Van Luc, Nguyen, Reid, Spiridinov, 2000
- S. thermophilum* Ganguly & Singh, 2000
- S. sangi* Phan, Nguyen & Moens, 2001
- S. loci* Phan, Nguyen & Moens, 2001
- S. thanhi* Phan, Nguyen & Moens, 2001
- S. pakistanense* Shahina, Anis, Reid, Rowe & Maqbool, 2001
- S. asiaticum* Anis, Shahina, Reid & Rowe, 2002
- S. diaprepesi* Nguyen & Duncan, 2002
- S. anatoliense* Hazir, Stock & Keskin, 2003
- S. scarabaei* Stock & Koppenhöfer, 2003
- S. websteri* Cutler & Stock, 2003
- S. weiseri* Mracek, Sturhan & Reid, 2003
- S. apuliae* Triggiani, Mracek & Reid, 2004
- S. litorale* Yoshida, 2004

S. guangdongense Qiu, Fang, Zhou, Pang & Nguyen, 2004
S. hermaphroditum Stock, Griffin & Chaenari, 2004
S. jollieti Spiridonov, Krasomil-Osterfeld, & Moens. 2004
S. yirgalomense Nguyen, Tesfamariam, Gozel, Gaugler & Adams, 2004
S. aciari Qiu, Yan, Zhou, Nguyen & Pang, 2005
S. akhursti Qiu, Hu, Zhou, Pang & Nguyen, 2005
S. beddingi Qiu, Hu, Zhou, Pang & Nguyen, 2005
S. robustispiculum Phan, Subbotin, Waeyenberge & Moens, 2005
S. silvaticum Sturhan, Spiridonov & Mracek, 2005

Famille Steinernematidae, genre *Neosteinerema*

Neosteinerema longicurvicauda Nguyen & Smart, 1994

Famille Heterorhabditidae, genre *Heterorhabditis*

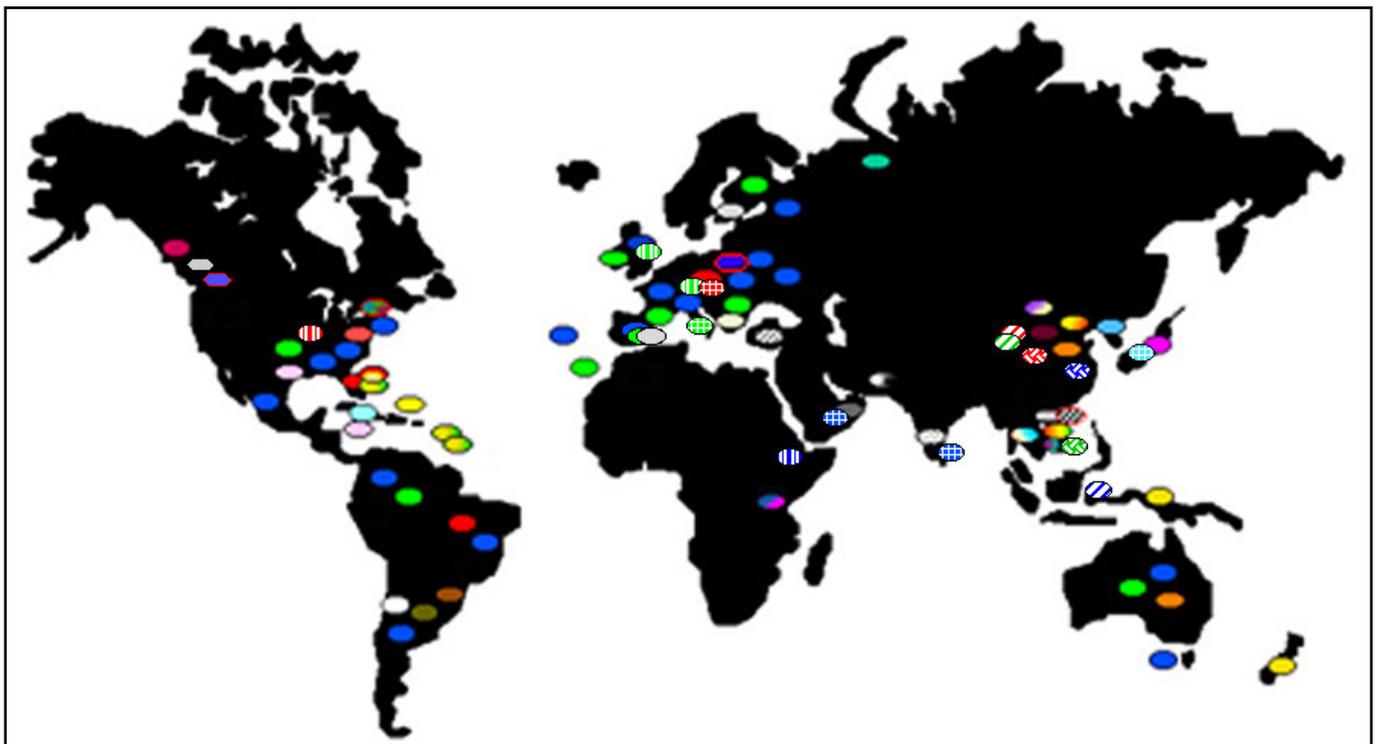
Heterorhabditis bacteriophora Poinar, 1976
synonymes : *Chromonema heliothidis*, *H. heliothidis*, *H. argentinensis*
H. megidis Poinar, Jackson et Klein, 1987
H. zealandica Poinar, 1990
H. indica Poinar, Karunakar & David, 1992
synonyme : *H. hawaiiensis*
H. brevicaudis Liu, 1994
H. marelata Liu & Berry, 1996
synonyme : *H. hepialus*
H. taysearae Shaseldean, Abou El-Sooud, Abd-Elgawad & Saleh, 1996
H. poinari Kakulia & Mikaia, 1997
H. downesi Stock, Griffin & Burnell, 2002
H. baujardi Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003
H. mexicana Nguyen, Shapiro-Ilan, Stuart, James, McCoy & Adams, 2004

On peut ensuite classer les différentes espèces en souches ou écotypes. Ces souches représentent des populations à partir d'un hôte particulier et/ou de la localité d'origine. Elles se croisent entre elles, mais occupent un rang infra spécifique ; elles présentent des différences par rapport à l'hôte choisi, la physiologie ou encore le comportement.

Biogéographie

Distribution mondiale

Steinernematidae



- | | | | | |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>S. cubanum</i> | <i>S. carpocapsae</i> | <i>S. glaseri</i> | <i>S. feltiae</i> | <i>S. affine</i> |
| <i>S. puertoricensae</i> | <i>S. riobravae</i> | <i>S. scapterisci</i> | <i>S. arenarium</i> | |
| <i>S. bicornutum</i> | <i>S. intermedium</i> | <i>S. kushidai</i> | <i>S. longicaudum</i> | <i>S. ritteri</i> |
| <i>S. caudatum</i> | <i>S. rarum</i> | <i>S. monticolum</i> | <i>S. oregonense</i> | <i>S. abbasii</i> |
| <i>S. ceratophorum</i> | <i>S. kari</i> | <i>S. siamkayai</i> | <i>S. diaprepesi</i> | <i>S. neocurtillae</i> |
| <i>S. fami</i> | <i>S. loci</i> | <i>S. pakistanense</i> | <i>S. thermophilum</i> | <i>S. anatoliense</i> |
| <i>S. websteri</i> | <i>S. thashi</i> | <i>S. sangi</i> | <i>S. scarabei</i> | <i>S. kraussei</i> |
| <i>S. asiaticum</i> | <i>S. weiseri</i> | <i>S. apuliae</i> | <i>S. litorale</i> | <i>S. hermaphroditum</i> |
| <i>S. aciari</i> | <i>S. akhursti</i> | <i>S. guangdongense</i> | <i>S. beddingi</i> | <i>S. silvaticum</i> |
| <i>S. robustipolum</i> | <i>S. yirgalomense</i> | <i>S. jolietii</i> | | |

Les espèces les plus ubiquistes sont *S. carpocapsae* et *S. feltiae*.
De nombreuses nouvelles espèces sont en cours de description.

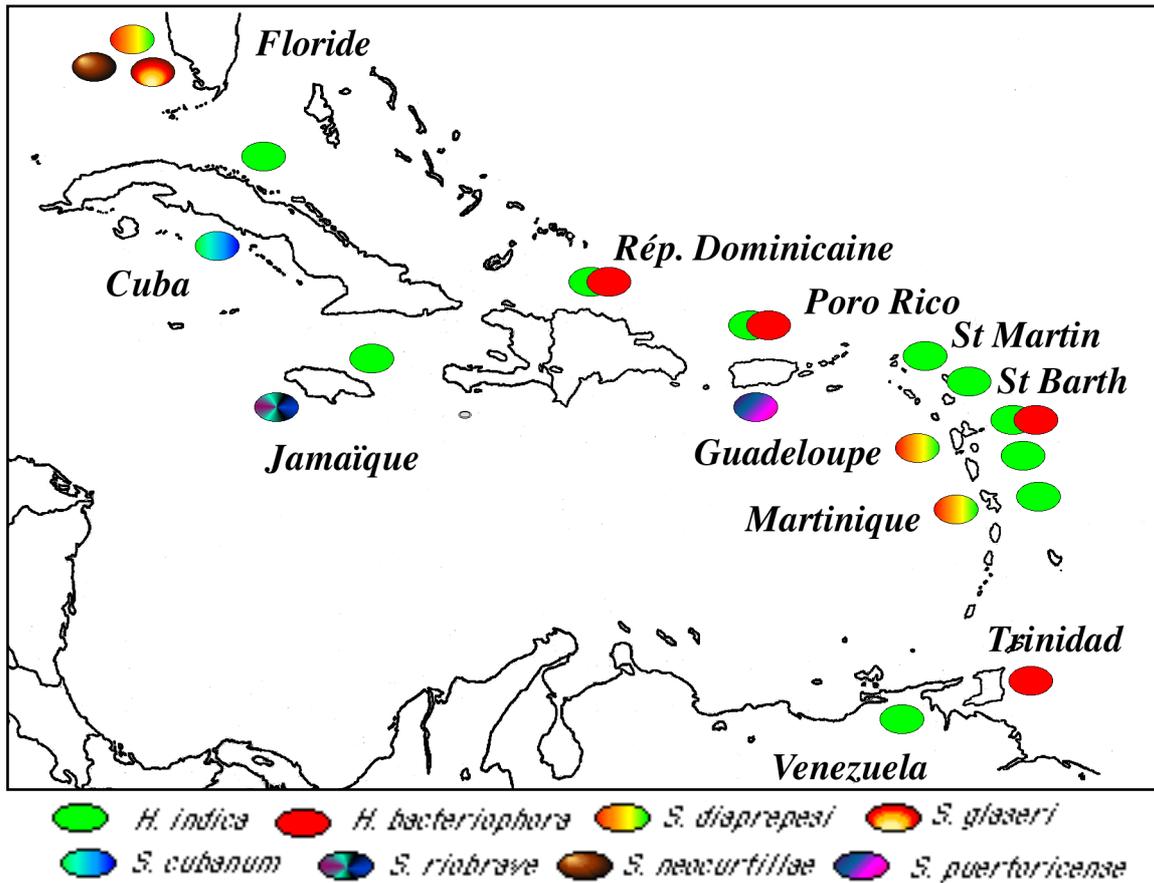
Heterorhabditidae



- | | | | | |
|-------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>H. bacteriophora</i> | <i>H. marelatus</i> | <i>H. indica</i> | <i>H. megidis</i> | <i>H. basjardi</i> |
| <i>H. taylorae</i> | <i>H. downsi</i> | <i>H. poinari</i> | <i>H. zealandica</i> | <i>H. brevicaudis</i> |
| <i>H. mexicana</i> | | | | |

Les espèces les plus ubiquistes sont *H. bacteriophora* et *H. indica*
De nombreuses nouvelles espèces sont en cours de description.

Distribution caraïbe



Espèces

Isolé de

<i>S. diaprepesi</i>	Larve de <i>Diaprepes abbreviatus</i>
<i>S. neocurtillae</i>	<i>Neocurtilla hexadactylla</i>
<i>S. cubanum</i>	Sol
<i>S. riobravae</i>	Sol
<i>S. puertoricense</i>	Sol
<i>H. bacteriophora</i>	Sol
<i>H. indica</i>	Sol

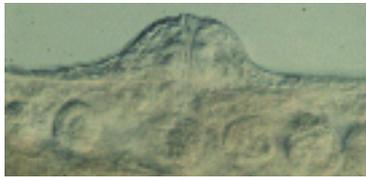
Dans la Caraïbe, les Heterorhabditidae (*H. bacteriophora* et *H. indica*) représentent environ 80% des nématodes recensés. *H. indica* est très largement majoritaire (environ 85% des *Heterorhabditis*)

Biologie

Morphologie des nématodes

Les nématodes sont typiquement anguilliformes, de taille petite à moyenne.

Les femelles des Steinernematidae ont une taille qui varie de 2 à 10 mm. Les gonades se composent de deux ovaires opposés (amphidelphe), d'un utérus volumineux et d'une vulve médiane. Elles sont généralement ovipares, puis deviennent ovovivipares.



Vulve



Femelle de *Steinernema*

Les mâles sont de taille inférieure à la femelle (0,7 mm en moyenne) et de forme arquée. Ils n'ont qu'un seul testicule et un organe copulateur chitinisé (spicules, gubernaculum, papilles caudales...).



Mâle de *Steinernema*

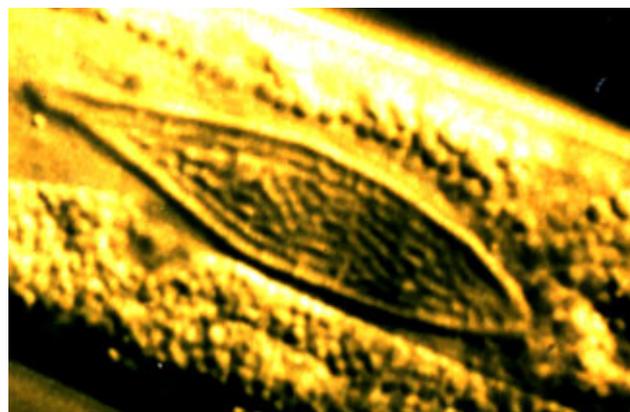


Spicules

Les stades larvaires sont au nombre de quatre. L'oeuf fécondé donne naissance à une L1 (150 µm). Le troisième stade reste à l'intérieur de la mue de la L2, ce qui lui confère une résistance exceptionnelle dans le sol (où il se rencontre librement). Les L3 possèdent un diverticule intestinal post-caudal contenant les bactéries symbiotiques.



Larve infestante



Vésicule bactérienne de *Steinernema*

Les Heterorhabditidae ont une morphologie tout à fait comparable à celle des Steinernematidae. La différence essentielle réside, à la suite du développement des L3, dans l'apparition de femelles hermaphrodites ovipares. Les mâles de deuxième génération possèdent une bourse caudale.

La distinction entre les mâles et les femelles des deux familles est aisée par un net dimorphisme sexuel, lié essentiellement à la taille. La présence d'une première génération de femelles géantes chez les Steinernematidae est aussi un bon critère de reconnaissance.

Cycle biologique

Les Steinernematidae présentent le cycle typique des nématodes : oeufs, quatre stades larvaires et adultes. Chez les Heterorhabditidae, le cycle est tout à fait particulier puisqu'il présente des femelles hermaphrodites.

Le troisième stade larvaire (L3) ou stade infestant est caractéristique des deux familles. Encore appelé "Dauerlarve" par les auteurs allemands ou "infestive stage" dans la littérature anglo-saxonne, c'est le seul stade libre (dans le sol) de tout le cycle. C'est également le seul moment pendant lequel le nématode est résistant aux conditions extérieures.

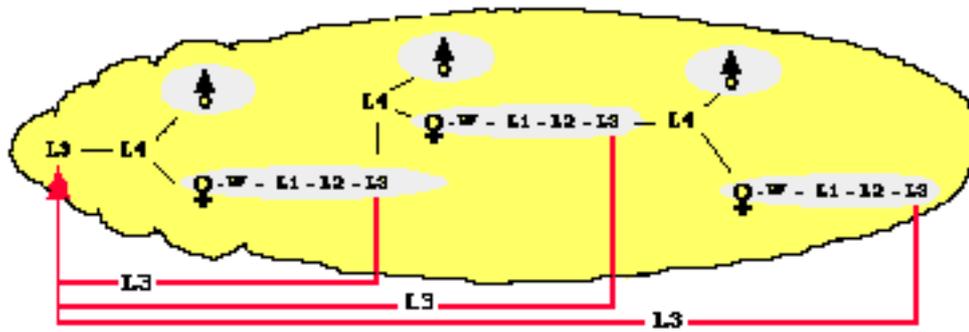
Les individus ne se nourrissent pas, ils contiennent des réserves glucidiques et peuvent survivre pendant de longues périodes, en conditions défavorables, grâce à leur double cuticule et leur physiologie particulière. Rappelons que c'est à ce stade que l'intestin du nématode contient les bactéries symbiotiques.

La première partie du cycle est commune aux deux familles. Le nématode envahit l'insecte par ses ouvertures naturelles. Chez les *Heterorhabditis*, les individus ont une sorte de dent céphalique sclérotinisée qui leur permet de pénétrer dans l'insecte au niveau de la cuticule intersegmentaire. Le nématode pénètre mécaniquement dans l'hémocoel, perd sa cuticule surnuméraire et reprend immédiatement son développement. Les cellules bactériennes sont relarguées par l'anus, par un mécanisme qui n'est pas encore très bien compris. On sait néanmoins qu'une toxine, émise par la bactérie, joue un rôle essentiel dans le mécanisme parasitaire.

Ces bactéries se multiplient rapidement aux dépens de l'hôte. La mort de l'insecte est provoquée par septicémie en 24 à 48 heures. Les composés antibiotiques produits par les bactéries empêchent la putréfaction du cadavre et inhibent le développement ou la contamination par d'autres agents microbiens à l'intérieur du corps de l'insecte. Les nématodes poursuivent leur développement en se nourrissant des nutriments fournis par les bactéries et les tissus de l'hôte. La poursuite du cycle s'opère alors de manière différente pour l'une ou l'autre famille.

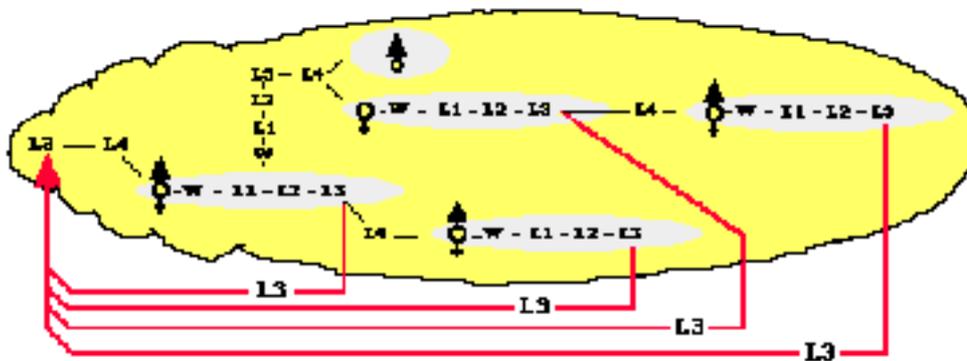
Les individus L3 de Steinernematidae se développent en L4, puis en adultes mâles et femelles qui s'accouplent et produisent, par amphimixie, plusieurs générations. Les adultes qui se développent dans ces générations successives sont souvent plus petits que ceux de la première génération, peut-être à cause de la diminution de réserves de nourriture constituée par le cadavre. Puis, les premiers et deuxièmes stades larvaires conduisent au stade infestant.

Au laboratoire, le cycle dure de 7 à 10 jours, à 25°C, dans des larves de *Galleria mellonella*, ou teigne des ruches, lépidoptère généralement utilisé en expérimentation. Le nombre de générations varie de 1 à 4.



Cycle biologique des *Steinernema*

Chez les Heterorhabditidae, le développement est de type hétérogonique. Les individus L3 se développent en femelles hermaphrodites, qui donnent naissance à une génération sexuée. Celle-ci se développe en 2 à 3 jours en adultes qui s'accouplent. Puis, les stades L1 et L2 se développent en se nourrissant du corps de leur mère par endotoxine matricide. Le stade L3 apparaît enfin. La durée du cycle est de 10 à 12 jours chez *G. mellonella*, à 25°C, mais là aussi, le nombre de générations est variable.



Cycle biologique des *Heterorhabditis*

Dans les familles, à chaque génération, dès que la population de larves infestantes apparaît, celle-ci évolue selon deux modalités :

- une partie reste dans l'insecte pour donner une autre génération
- l'autre partie sort dans le milieu extérieur (le sol) pour se disperser et rechercher un nouvel hôte.

Les bactéries symbiotiques

Les Steinernematidae ont la particularité de transporter dans la partie antérieure dans leur intestin des bactéries du genre *Xenorhabdus* (THOMAS & POINAR, 1979) et les Heterorhabditidae du genre *Photorhabdus*. Chaque espèce de nématode est associée à une espèce de bactérie. Elles ne présentent ni forme sporulante, ni forme de résistance et ont été trouvées seulement dans les nématodes-vecteurs ou dans les insectes-hôtes. Elles sont de taille assez grande (0,8 à 2 μm sur 4 à 10 μm), gram négatif, filiformes, mobiles ou pas, à flagelles péritriches et à anaérobiose facultative.

Les espèces de *Xenorhabdus* sont associées aux Steinernematidae. Ces bactéries se situent dans la partie ventriculaire des L3 (POINAR & LUTENEGGER, 1968). Les colonies sont lisses, humides et un peu granuleuses.

Chaque espèce de Steinernematidae est associée à l'une ou l'autre des quatre sous-espèces de *X.enorhabdus* :

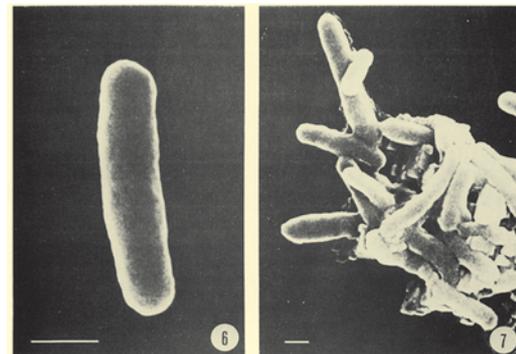
- *X. nematophilus* (*Steinernema carpocapsae*)
- *X. bovienii* (*S. kraussei*, *S. feltiae*; *S. affinis*; *S. intermedia*)
- *X. poinarii* (*S. glaseri*)
- *X. beddingii* (certaines souches australiennes).

Ces différentes sous-espèces ont pu être séparées selon leur phénotype et les études d'hybridation d'A.D.N.(AKHURST & BOEMARE, 1990; BOEMARE et al, 1993).

Les espèces de *Photorhabdus* (THOMAS & POINAR, 1979) sont associées aux Heterorhabditidae. La bactérie est caractérisée par des colonies molles, muqueuses aux bords irréguliers, de couleur jaune pâle et après évolution jaune orangée à rouge. On peut facilement la distinguer de *X. nematophilus* en culture car elle est fluorescente. De plus, lorsque l'on infeste des *G. mellonella*, celles-ci prennent une couleur rouge sombre au bout de deux à trois jours.

Les espèces de *Xenorhabdus* et de *Photorhabdus* peuvent présenter deux formes, différentes par la morphologie de la colonie et par ses qualités d'adsorption sur divers colorants. La forme primaire peut être isolée de larves infestantes ou d'insectes récemment infectés. Dans les conditions de laboratoire, et jamais dans la nature, cette forme évolue ensuite en forme secondaire, qui n'a pas la même capacité pour fournir des nutriments aux nématodes. Cette forme ne parvient pas à tuer l'hôte. Elle n'est donc pas souhaitée dans l'optique d'une lutte biologique.

En conditions normales, la première forme existe et elle est stable si la bactérie est repiquée tous les mois. Mais des cultures âgées présentent régulièrement la phase secondaire. On pense que cette deuxième forme pourrait être la bactérie symbiotique originelle, à partir de laquelle s'est développée une autre forme qui s'est mieux adaptée aux exigences du nématode et qui a acquis un avantage sélectif en étant retenue par le stade infestant (AKHURST, 1980)..



Aspect externe des bacilles au microscope à balayage



Coloration mettant en évidence la ciliature péritriche



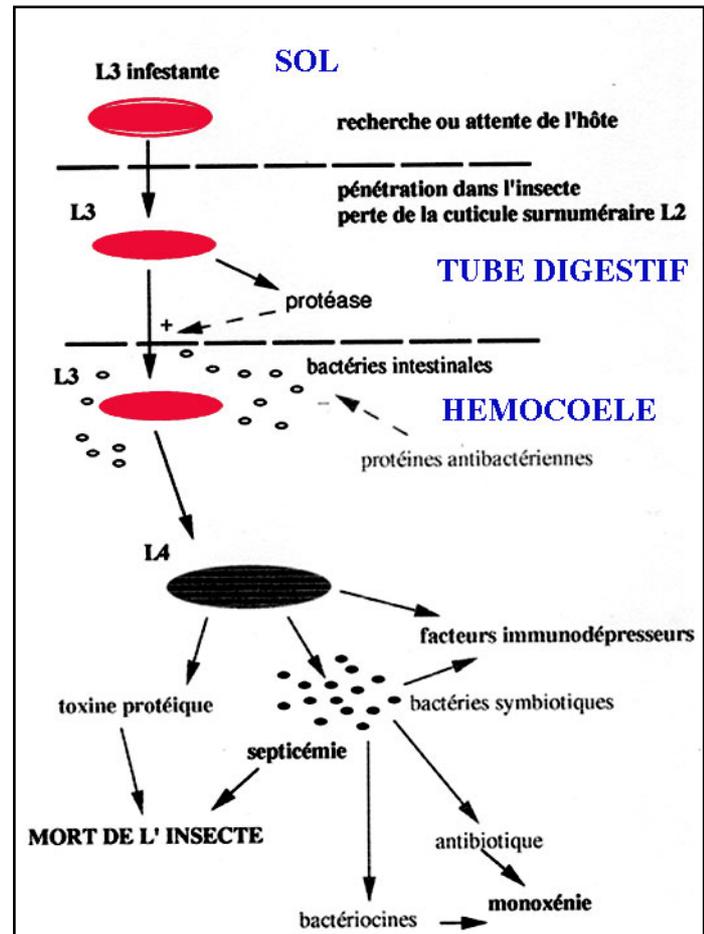
Mécanisme de pathogénicité : action commune des nématodes et des bactéries.

La mort de l'hôte intervient rapidement. Elle est due à un enchaînement de trois phénomènes essentiels (LAUMOND et al, 1989; AKHURST et BOEMARE, 1990) :

- une action toxique (BOEMARE et al, 1982) et immuno-dépressive (AKHURST ET BOEMARE, 1990) des larves de troisième stade sur le système immunitaire de l'insecte (GOTZ et al, 1981). Ce phénomène a été notamment mis en évidence lors d'infestations de larves du Lépidoptère *Hyalophora cecropia* par *Steinernema carpocapsae* (GOTZ et al., 1981) .

- L'émission d'une toxine de nature protéique par la larve infestante (L3) dans l'hémocoèle a été mise en évidence chez *S. carpocapsae* lors d'une infestation de *Galleria mellonella* (BOEMARE et al., 1982).

Quand les défenses immunitaires de l'insecte sont affaiblies, les bactéries *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* viennent à bout du mécanisme de défense de l'hôte, mécanisme qui se manifeste par une rapide prolifération de phagocytes et d'hématocytes libres. Vingt-quatre heures suffisent à la bactérie pour faire des dommages à l'ensemble des organes internes majeurs de l'hôte. Les phagocytes sont vaincus et la mort survient après quarante-huit heures



On peut noter une différence dans les symptômes observés sur des larves de *G.mellonella* infestées par les nématodes selon les deux familles. D'une manière générale, les Steinernematidae et leurs bactéries associées détruisent peu à peu la cuticule de l'insecte jusqu'à sa rupture qui se produit environ deux jours avant le développement des larves L3. Ainsi, le contenu s'écoule en une masse liquide visqueuse chargée en bactéries et nématodes.

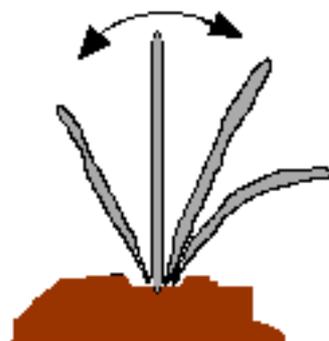
Le phénomène est différent chez les Heterorhabditidae : la cuticule n'est toujours pas détruite au moment où le stade infestant apparaît. Les antibiotiques se dispersent alors et les autres microorganismes envahissent et décomposent l'hôte. Le type de relation mutualiste entre nématodes et bactéries est particulier aux Steinernematidae et Heterorhabditidae. Les nématodes sont utiles aux bactéries car ils introduisent celles-ci dans l'hémocoèle, afin qu'elles puissent entreprendre leur multiplication.

Les bactéries sont utiles aux nématodes en leur fournissant des conditions de nutrition favorable à leur reproduction à partir de la biomasse de l'hôte.

Recherche de l'hôte et survie des larves infestantes

Stratégies de recherche de l'hôte

Les nématodes adoptent différentes stratégies pour localiser et infester les insectes. Certains appelés «ambushers» se tiennent à l'affût et, prenant appui sur leur queue, soulèvent leur corps et effectuent un mouvement de balancier pour attraper les insectes qui passent à la surface du sol (exemple : *S. carpocapsae* et *S. scapterisci*).



D'autres appelés «cruisers», se déplacent activement pour aller chercher l'hôte (exemple : *S. glaseri* et *H. bacteriophora*). Les «cruisers» se retrouvent à différentes profondeurs dans le sol, alors que les ambushers restent près de la surface.

Mais la plupart des nématodes ont des stratégies intermédiaires (exemple : *S. riobravae* et *S. feltiae*).

Effets des conditions environnementales sur la survie des larves infestantes

Facteurs abiotiques

Sol

Le type de sol et ses caractéristiques physique, chimique et biologique influencent la survie et la mobilité du nématode (BANH, 1990). Les nématodes sont attirés par certains ions, comme les ions sodium, magnésium, calcium ou chlorure (PYE & BURMAN, 1981b, BANH, 1990).

Les nématodes sont très sensibles à la texture du sol. Ils affectionnent particulièrement les sols à pH neutre ou légèrement alcalin, aérés et bien drainés. Leur survie est de courte durée dans les sols argileux, dans les sols saturés en eau et dans les sols riches en matières organiques. La salinité n'affecte ni la survie, ni le développement de certains nématodes.

La porosité des sols joue également un rôle important sur l'aptitude des nématodes à la dispersion.

Température et humidité

Les nématodes survivent à différentes températures en fonction des espèces ou souches considérées. Toutefois leur optimum thermique de développement se situe entre 18 et 30°C. En général, les Steinernematidae (seuils les plus bas de 4 à 14°C) restent actifs à des températures plus basses que les Heterorhabditidae (seuils les plus bas de 10 à 16 °C) (MOLYNEUX, 1984, 1986). D'une manière générale, on peut placer les Steinernematidae dans un groupe de nématodes adaptés aux pays tempérés et les Heterorhabditidae aux pays tropicaux, même si certaines souches font exception à la règle (*Heterorhabditis megidis* au Canada ou *Heterorhabditis zealandica* en Nouvelle Zelande).

Pour le stockage des larves infestantes, les températures les plus appropriées sont 10 ou 15°C suivant l'origine des espèces ou souches (tempérées ou tropicales).

L'humidité ou la teneur en eau du sol jouent un rôle primordial pour la mobilité des larves infestantes et donc leur aptitude à rechercher et infester un hôte. Toutefois, leur survie peut atteindre plusieurs mois dans des sols secs.

Radiations solaires

Les radiations solaires sont néfastes à la plupart des nématodes entomopathogènes, mais ceux-ci sont en général protégés de la lumière brutale du soleil car ils vivent dans le sol ou dans un insecte. Le soleil peut baisser le pouvoir pathogène jusqu'à 95%. L'ombre et l'eau sont donc favorables au parasite

Les UV tuent les nématodes en quelques minutes. L'exposition directe aux UV peut être minimiser en appliquant les larves infestantes tard le soir ou très tôt le matin.

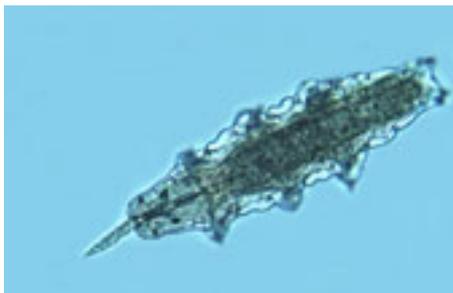
Facteurs biotiques

La capacité des nématodes à infester un insecte va dépendre pour partie du contact hôte-parasite. Les insectes n'ont pas de défense naturelle contre l'invasion et le parasitisme mais il existe cependant des barrières morphologiques et immunologiques qui prémunissent plus ou moins bien l'insecte contre l'infestation par les nématodes.

Les insectes peuvent répondre à l'invasion par l'augmentation du nombre et de l'activité des phagocytes, qui peuvent emprisonner les cellules de *Xenorhabdus* (SERYCZYNSKA & KAMIONEK, 1972). Les nématodes eux-mêmes peuvent être encapsulés par les phagocytes qui se mélanisent et s'agglutinent (JAKSON, 1985).

Les nématodes peuvent se déplacer verticalement ou horizontalement dans le sol pour rechercher un hôte (MOYLE et KAYA, 1981 ; GEORGIS et HAGUE, 1981). La plupart des nématodes se déplacent davantage quand un hôte est présent, ce qui indique une réponse à certaines informations émises par l'insecte. Le CO₂ dégagé par les mouvements d'hôtes infestés peut aussi influencer sur la dispersion des nématodes dans leur environnement (GAUGLER et al., 1980, TIMPER, 1987).

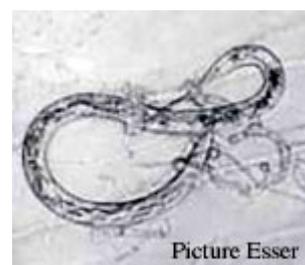
Enfin, il existe des antagonistes biotiques (prédateurs, agents pathogènes ou compétiteurs). En effet, on a remarqué l'existence de maladies chez les nématodes (POINAR et JANSON, 1986), et de champignons ou acariens nématophages (MANKAU, 1980), mais aussi de collemboles, de tardigrades et même de nématodes prédateurs.



Tardigrade et Monochide ingérant un nématode



Collembole



Champignon nématophage

Collecte de nématodes

Il est très rare de trouver sur le terrain des insectes parasités, car très rapidement les cadavres d'insectes parasités se lisent sous la pression parasitaire,

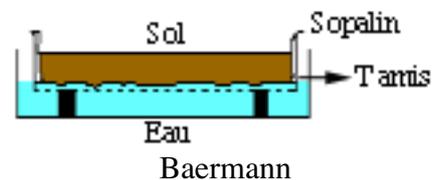
Trois méthodes sont donc utilisées pour rechercher les larves de Steinernematidae et d'Heterorhabditidae dans les sols :

- La première est basée sur l'extraction mécanique des larves infestantes contenue dans un échantillon en utilisant la différence de densité entre nématode et substrat (flotaison, élutriation). Ces techniques, souvent lourdes à mettre en oeuvre, ont l'avantage de sortir tous les nématodes présents dans un sol. Toutefois elles ne sont guères fiables et nécessitent un oeil expert pour différencier les larves de *Steinernema* et d'*Heterorhabditis* des autres nématodes du sol.



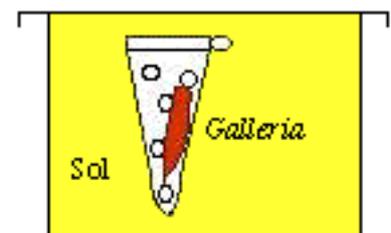
Elutriateur de Steinhorst

- La seconde est basée sur la mobilité des larves infestantes (Baermann). L'échantillon de sol est alors placé sur un tamis dont le fond est recouvert d'une feuille de Sopalin. Le tout est déposé dans une coupelle contenant de l'eau. L'eau doit effleurer le bas du tamis. Les nématodes attirés par l'humidité vont traverser le Sopalin et seront récupérés dans l'eau. Cette technique présente les mêmes inconvénients que la première.



Baermann

- La troisième, dite «insecte-trap», permet de collecter des nématodes par l'intermédiaire d'un insecte qui se fera naturellement parasiter. Cette technique peut être utilisée sur des échantillons de sol ramenés au laboratoire ou directement sur le terrain : «insecte-trap» in situ. L'insecte le plus souvent utilisé est *Galleria mellonella*. Cette technique facile à mettre en oeuvre ne permet hélas que d'isoler les larves infestantes pathogènes au moment de la mise en place du dispositif mais ne reflète pas l'intégralité de la population.



Galleria-trap

Production des nematodes

Les nématodes entomopathogènes peuvent être multipliés *in vivo* dans un insecte-hôte ou *in vitro*, soit en milieu semi-solide, soit en fermenteur liquide. Le laboratoire des Nématodes Entomopathogènes a besoin de quantités de nématodes assez faibles : un élevage *in vivo* est donc suffisant. Par ailleurs, la technique d'élevage *in vitro* sur milieu semi-liquide est assez lourde. Néanmoins, le laboratoire y a recours parfois, lorsqu'il doit faire des essais sur le terrain, qui exigent un nombre très élevé de larves infestantes. La production en fermenteurs n'a jamais été expérimentée dans le laboratoire, nous n'en parlerons donc pas.



Fermenteurs

Méthode de production *in vivo*

Bien que les Steinernematidae et les Heterorhabditidae infestent et se reproduisent sur un large variété d'insectes, ces nématodes sont facilement cultivés *in vivo* au laboratoire. Le meilleur insecte-hôte qui ait été trouvé est la chenille d'un petit Lépidoptère, la teigne des rûches, *Galleria mellonella*. Facilement élevé, d'une très bonne sensibilité aux nématodes, c'est un hôte excellent pour leur multiplication. A titre d'exemple, jusqu'à 200 000 larves de *S. feltiae* (DUTKY et al., 1964) et 350 000 larves de *H. bacteriophora* (MILSTEAD et POINAR, 1978) ont été récoltées à partir d'une seule chenille de dernier stade de *Galleria mellonella*.

Il se déroule en plusieurs étapes. L'infestation des *G. mellonella* est la première phase. Avant de prélever les larves infestantes de nématodes, l'examen de ces dernières sous la loupe binoculaire permet de vérifier le taux de mortalité. Les nématodes morts ont généralement un habitus caractéristique : ils sont tout raides.

Les vivants sont plus ou moins actifs. La concentration de la solution de nématodes est d'environ 10 000 nématodes.ml⁻¹

Ensuite, 1 ou 0,5 ml (suivant la taille des boîtes) de la suspension est également réparti sur un papier-filtre Whatman, au fond d'une boîte de Petri en plastique de 90 ou 55 mm de diamètre. Dix à vingt chenilles de *G. mellonella* sont déposées sur le papier-filtre et les boîtes de Petri sont scellées au ruban adhésif (à cause des risques d'infestation par certains champignons et acariens), puis placées à l'étuve, à 26°C.

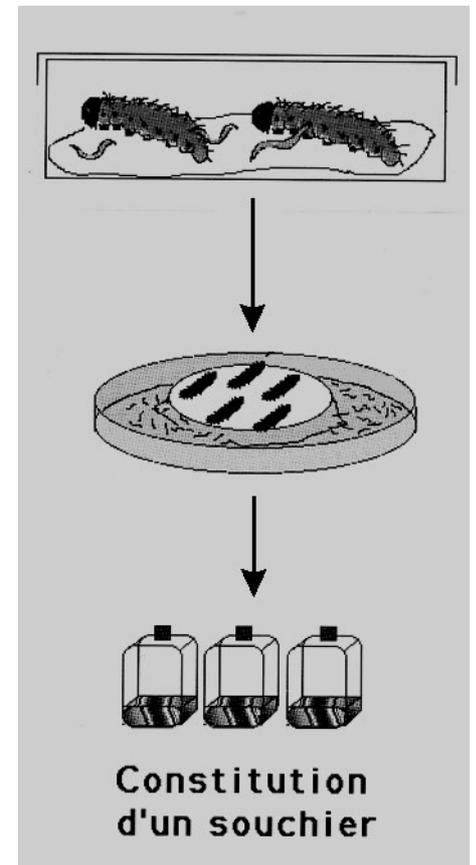
Les chenilles meurent en 24 à 48 heures. Celles infestées par les Steinernematidae deviennent jaune-brun et molles, tandis que l'infestation par les Heterorhabditidae provoque une coloration rouge et une consistance également molle. Il est facile de reconnaître les insectes morts d'autres causes à leur couleur noirâtre et leur odeur putride.



Chenille de *Galleria*

La deuxième étape consiste à récolter les nématodes, juste avant la sortie des L3, c'est-à-dire environ 6 jours pour les Steinernematidae. Le Petri est recouvert d'un tissu en papier humide et le tout est déposé au fond d'un bac de récolte assez large (dispositif de DUTKY). De la solution de Ringer est versée dans le bac de façon à ce que les bords du papier soient en contact avec la solution. Chaque larve infestée est transférée sur le papier en tissu humide. L'ensemble est refermé, étiqueté, scellé et placé à l'étuve à 26 °C.

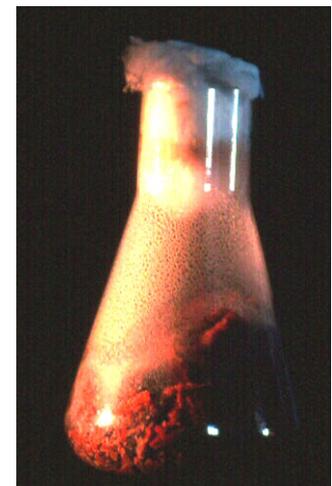
Les nématodes (larves infestantes) vont alors sortir du cadavre des larves d'insectes, attirées par le milieu externe plus humide. Les L3 migrent vers le tissu en papier et nagent jusque dans la solution de Ringer. Chaque jour, et ce pendant trois à quatre semaines, les L3 qui sortent régulièrement, seront récupérées. La solution contenant les nématodes est filtrée afin d'éliminer les débris ou les autres stades. Puis, les nématodes sont examinés afin de s'assurer que ce sont bien des individus L3 qui ont été récupérés. Les larves sont concentrées à 10 000 par ml dans des flacons pour la conservation. De la solution de Ringer est ajoutée au dispositif de DUTKY qui est replacé à l'étuve.



Méthode de production *in vitro* sur milieu semi-liquide

La production de nématodes sur milieu se réalise en 7 étapes (BONIFASSI, 1987) :

- préparation du milieu tridimensionnel.
- isolement et production massive de la bactérie symbiotique *Xenorhabdus* ou *Photorhabdus*.
- ensemencement de la bactérie..
- désinfection des larves (L3) de nématodes.
- inoculation des nématodes désinfectés.
- récolte.
- comptage et stockage.



Production de nématodes en milieu semi-liquide

Préparation du milieu tridimensionnel

La production de nématodes in vitro nécessite 2 à 3 semaines pour les *Heterorhabditis* et environ cinq semaines pour les *Steinernema* et est réalisée dans des flacons (Erlenmeyer de 500 ml).

Pour 1 litre de milieu de culture il faut :

- 600 g de rognon de porc
- 200ml d'eau
- 200 ml d'huile de germe de blé ou de gras de boeuf
- 80 g d'éponge (polyuréthane) (la quantité varie en fonction de la qualité de la mousse utilisée).

Le rognon de porc est mixé dans 200ml, d'eau bouillante jusqu'à obtention d'une pâte homogène. L'huile de germe de blé est additionné au mélange. Une bonne homogénéisation est nécessaire. L'incorporation du milieu à la mousse est réalisée dans un seau, puis le mélange est réparti dans des Erlenmeyer de 500 ml à raison de 65 g de milieu par flacon. Les flacons sont bouchés avec du coton, recouvert de papier aluminium et autoclavés à 120° C pendant 30 minutes. A la sortie de l'autoclave il est nécessaire d'agiter les flacons pour décoller les particules d'éponge.

Ensemencement bactérien et production massive de bactéries

Obtention des bactéries : Technique de la goutte pendante.

Les bactéries (*Xenorhabdus* ou *Photorhabdus*) sont obtenus à partir de larves infestantes en utilisant la technique de la goutte pendante (POINAR,1966).

Les nématodes au stade infestant sont placés dans une goutte d'hémolymphe de *Galleria mellonella* ou elles rejettent leurs bactéries. Les bactéries se développent électivement dans l'hémolymphe et peuvent donc être isolées. Le dispositif est composé d'une boîte Petri en verre (diam 90mm) dont le fond est recouvert d'une rondelle de papier filtre, d'un verre de montre et d'une lamelle couvre-objet (22x22mm).

Ce dispositif est préalablement stérilisé (au four Pasteur : 1heure à 180°C) Les solutions utilisées sont autoclavées (1 heure à 120°C). Les diverses manipulations sont effectuées stérilement sous hotte à flux laminaire.

Le papier filtre est humidifié avec de l'eau stérile.

Cinq à huit L3 préalablement désinfectées (10mn dans eau de javel à 10% suivi de 3 rinçage à l'eau stérile) sont déposées dans une goutte de Ringer sur la lame . Une *Galleria* au stade prénymphal est désinfecté (avec un mélange à part égal ether-alcool à 97°) à l'aide d'un pinceau. Une incision est pratiquée à la base d'une fausse patte.

La goutte d'hémolymphe qui apparait est rapidement déposée sur la goutte de solution de Ringer contenant les L3. La lamelle est retournée délicatement avec une pince fine préalablement flambée sur le verre de montre. La boîte de Petri est fermée pour éviter tout dessechement.

Isolement et purification

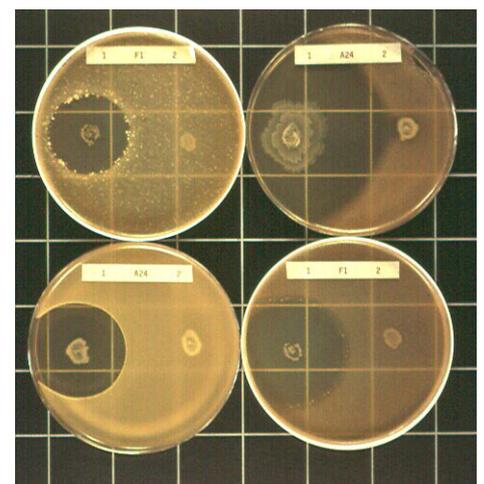
L'hémolymphe de *Galleria* est un bon milieu sélectif pour isoler le symbionte. Il a été observé que *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* ont une action inhibitrice sur de nombreuses bactéries gram+ et sur quelques bactéries gram- , ainsi que sur des levures et des champignons (AKHURST, 1982; GRIMONT et al., 1984). Ceci est un avantage pour l'isolement des phases 1. Les phase 1 de ces bactéries sont reconnaissable car elles adsorbent les colorants de certains milieux bactériologiques appropriés. Pour ce faire on utilise le milieu de Mac Conkey sur lequel les *Xenorhabdus* ou *Photorhabdus* en phase 1 adsorbent le rouge neutre incorporé au milieu et donnent des colonies brunes entourées d'un halo. Après préparation le milieu de Mac Conkey est fondu au bain marie et coulé en boîte Petri (25ml/boîte). Après refroidissement, les bactéries présentes dans l'hémolymphe sont inoculées en utilisant la méthodes des cadrans. Les boîtes sont gardées à 25-28°C, à l'obscurité et les colonies sont bien individualisées après 2 à 5 jours.



Vérification de la production d'antibiotique

Vingt cinq millilitres de milieu nutritif T.S.A. modifié est coulé en boîte de Petri. Une fraction de bouillon nutritif contenant la culture bactérienne est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur. Deux gouttes à chaque fois sont disposées en trois points sur le milieu. La boîte ensemencée est gardée entr'ouverte sous la hotte jusqu'à assèchement complet des gouttes déposées, puis retournée et mise à incuber à l'obscurité à 25-28°C. Les bactéries en phase 1 diffusent, après 48h, la substance antibiotique dans la gélose. Ce phénomène peut être vérifié comme suit :

- les bactéries sont tuées en retournant la boîte de Petri pendant 2h sur une coupelle remplie de 8 à 15 ml de chloroforme.
- la boîte est ventilée pendant 1h sous la hotte pour éliminer les vapeurs toxiques de chloroforme.
- une souche de bactéries sensible aux antibiotique de *Xenorhabdus* et de *Photorhabdus* (*Micrococcus luteus*) est ensemencée dans une gélose nutritive maintenue en surfusion au bain marie à 40°C puis coulée dans la boîte pour recouvrir entièrement toute sa surface.
- Après refroidissement, la boîte est refermée et mise à incuber à 25-28°C. Deux jours ps tard la lecture est réalisée. Si les *Xenorhabdus* ou les *Photorhabdus* sont en phase 1, l'antibiotique a diffusé dans la gélose autour des 3 points d'ensemencement et la souche test s'est développée au dessus sur toute la surface de la boîte, sauf dans les 3 zones visibles par transparence sous forme de cercles clairs.



Production massive de bactéries en phase I

Après les avoir purifié et contrôlé la phase, les bactéries sont ensemencées sur gélose nutritive inclinée. Il est possible de les conserver sous cette forme 2 à 3 semaines période après laquelle il sera indispensable de procéder à un repiquage sous peine de voir apparaître une dérive de la culture en phase 2 et d'être obligé d'avoir recours à un nouvel isolement à partir d'une goutte pendante. Il est donc indispensable de les repiquer et de les conserver à une température de 14°C. La production de nématodes en milieu tridimensionnel nécessite une grande quantité de bactéries. Celles-ci sont multipliées sur bouillon nutritif en culture agitée.

Ensemencement bactérien.

Dans les tubes contenant 10ml de bouillon nutritif 3 à 4 colonies de bactéries sont ensemencées. Une bonne homogénéisation est obtenue par passage au VORTEX. Cinq à six gouttes de cette solution sont utilisées pour ensemencer d'autres tubes contenant 10 ml de bouillon. Ces tubes seront mis en agitation durant 18h à 27°C. Après ce laps de temps, chaque tube servira à ensemencer un Erlenmeyer contenant le milieu tridimensionnel. Il est important de bien agiter les flacons afin de répartir l'inoculum bactérien.

Désinfection des larves de nématodes (L3)

Les larves infestantes sont vectrices d'une micro flore externe qui si elle se multiplie peut diminuer le développement des nématodes. Il est donc primordial de désinfecter les nématodes avant de les mettre dans le milieu.

Cette désinfection est réalisée avec de l'hypochlorite de sodium (dose de 250ml à 48°C) à 10%. Les nématodes sont immergés dans cette solution pendant 10 minutes puis rincés dans 3 bains successifs de Ringer stérile.

Inoculation des nématodes désinfectés.

Les nématodes désinfectés (5 à 1000 L3 / Flacon) sont introduits dans les flacons contenant le milieu nutritif. Cette opération doit se faire sous hotte à flux laminaire. Les flacons ou les Erlenmeyer sont ensuite mis à incuber à 27°C. Neuf jours après l'inoculation les morceaux d'éponges contiennent des nématodes à tous les stades. Un morceau de cette éponge peut servir d'inoculum pour préparer de nouveaux flacons.



Récolte des nématodes

Après 2 à 3 semaines pour les *Heterorhabditis* et environ 5 semaines pour les *Steinernema* la mousse est extraite des flacons, et pressée sous un courant d'eau. La solution contenant les nématodes est récupérée dans un seau, décantée et filtrée.



Comptage et conservation des nématodes

Les nématodes doivent être stockés à une concentration de 10 000 L3 / ml. Le comptage se fait en utilisant la lame de Peter. Une moyenne de 3 à 5 dénombrement est nécessaire.

Les nématodes, très sensibles à la lumière, sont stockés à l'obscurité dans des flacons de cultures de 250 ml, dans une solution de Ringer à 2,5% .

Les Steinernematidae sont conservés à 10°C pendant plusieurs mois. Les Heterorhabditidae se conservent moins bien, de l'ordre de quelques semaines. La température de conservation varie selon les souches, certaines se conservent à 10°C d'autres à 15°C.



La cryoconservation des Steinernematidae et des Heterorhabditidae n'est envisageable que pour certaines souches, mais n'est pas un mode de conservation utilisé dans le laboratoire.

Formulation et Application

Les nématodes entomopathogènes peuvent être simplement en suspension dans l'eau, incorporé dans une éponge, un gel ou dans des granulés dispersibles dans l'eau, dans de la vermiculite ou certaines argiles.

Ils peuvent être appliqués comme la majorité des produits phytosanitaires

Arrosoir



Pulvérisateurs portés ou tractés



Goutte à goutte



Asperseur



Appât



Brumisateur



Piège attractif avec phéromone



Potentiel d'utilisation dans la Caraïbe

Cultures fruitières

Agrume
Banane
Café
Palmier

Diaprepes spp., *Pachneus litus*, *Litostylus*
Cosmopolites sordidus
Hypothenemus hampei
Rhyncophorus palmarum

Grande cultures

Canne à sucre
Coton
Maïs
Riz

Diaprepes, *Phyllophaga*, *Metamasius*
Pectinophora gossypiella
Spodoptera, *Heliothis*
Chilo spp.

Cultures vivrières

Igname
Patate douce / Pomme patate
Pomme de terre

Diaprepes, *Phyllophaga*, *Lygirus*
Cylas formicarius, *Euscepes postfaciatus*
Leptinotarsa decemlineata

Culture Maraîchères

Diaphania, *Spodoptera* spp., *Liriomyza*
Phthia picta
Xanthopastis timais
Diabrotica, *Brevicoryne*, *Plutella*, *Urbanus*

Prairie, gazon,

Phyllophaga, *Cyclocephala*, *Mocis*
Gryllotalpa, *Gryllus*, *Hygronemobius* sp.
Neocurtilla hexadactyla, *Turpilia rugulosa*



Traitement des pépinières d'agrumes au CIRAD
Flhor en Martinique avec *H. bacteriophora*

ANNEXES

MILIEUX NECESSAIRES A LA PRODUCTION DE NEMATODES

Composition en g/l

1 - Solution de Ringer

Chlorure de Sodium (NaCl)	6,50
Chlorure de Potassium (KCl)	0,25
Bicarbonate de Calcium (HNa Co ₃)	0,20
Chlorure de Calcium (Ca Cl)	0,50

2 - Milieu de Mac Conkey

Sels biliaries	1,5
Chlorure de sodium	5
Lactose	10
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,001
Peptone bactériologique	20
Agar	15

3 - TSA

Hydrolysate tryptique de caseine	15
Peptone de soja	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15

4 - TSA modifié

La gélose Trypto-Caseïne -Soja, commercialisée par l'Institut Pasteur, est présentée sous forme de poudre déshydratée prête à l'emploi. Mélanger 40g de TSA à 1 l d'eau et porter à ébullition avec agitation jusqu'à dissolution complète. Ajouter ensuite 10g d'extrait de levure (Difco) et homogénéiser. ce milieu est ensuite réparti par 25 ml dans des tubes de 50 ml et autoclavé à 110°C pendant 30 minutes.

5 - Bouillon nutritif

Idem à gélose nutritive, mais sans agar. Milieu commercialisé par Institut Pasteur sous forme de poudre déshydratée. 13g de poudre sont mélangés à 1 litre d'eau distillée puis stérilisé à 120°C, 15 minutes.

MATERIEL NECESSAIRE A LA PRODUCTION DE NEMATODES

Gros équipement :

loupe binoculaire (stereoscopie)
incubateur 28° C
chambre froide 8-10° C.
chambre froide 14-16° C

Petit matériel :

pincés fines (Modèle Suisse)
pincés fines et longues
ciseaux fins
tamis 20, 40 et 100 μm
pipettes plastique 1 ml, 5 ml, 10 ml
pissettes de 200 à 500 ml
lame de Peters

Verrerie :

boîte de Petri verre 90 mm de diam
lamelle de verre 22 X 22 mm

Divers :

papier aluminium
papier filtre
coton hydrophile
alcool
ether
chloroforme
eau de javel (Hypochlorite de Na)
solution de Ringer (sels divers)
eau distillée stérile

Matériel vivant:

Souche de nématodes entomopathogènes en élevage ou dans l'eau (L3).
Elevage de *Galleria mellonella* (Teigne des ruches)
Cire d'abeilles
Pollen de fleurs
Boîtes d'élevage (Beurriers)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKHURST R.J., 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121, 303-309.
- AKHURST R.J. & BOEMARE N.E., 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In Entomopathogenic nematodes in biological control, Gaugler R and Kaya H.K. Eds, CRC Press, Boca Raton, FL, 75-90.
- BANH B.P., 1990. Influence de deux sols tropicaux sur la survie et le potentiel infectieux des nématodes entomoparasites. Mémoire ENSFA. 34 pp.
- BEDDING R.A. & MILLER L.A., 1981. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus*, in potted plants. *Ann. Appl. Biol.* 99, 211-216.
- BOEMARE N., LAUMOND C. & LUCIANI J., 1982. Pathologie animale. Mise en évidence d'une toxicogénèse provoquée par le nématode axénique entomophage *Neoaplectana carpocapsae*, Weiser chez l'insecte axénique *Galleria mellonella* L. C.R. Acad. Sci., Ser. III, 295, 543-546.
- BOEMARE N., AKHURST R.J., MOURANT R.G., 1993. Desoxyribonucleic acid relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, with a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. . *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 249-255
- BONIFASSI E., 1987. Contribution à l'étude du nématode entomopathogène *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda Steinernematidae) et à la mise au point d'une méthode biotechnologique de production de masse pour une utilisation en lutte biologique. Thèse Ec. Prat. des Hautes Etudes. III Montpellier, 180 pp.
- DOUCET M.M. & DOUCET M.E., 1990. *Steinernema ritteri* n.sp. (Nematoda : Steinernematidae) with a key to the species of the genus. *Nematologica*, 36, 257-265.
- DUTKY S.R., THOMPSON J.V. & CANTWELL G.E., 1964. A technique for the mass propagation of DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.* 6, 417-422.
- GAUGLER R., LEBECK B., NAKAGAKI B. & BOUSH G. M., 1980. Orientation of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* to carbon dioxide. *Environ. Entomol.* 9, 649-652.
- GEORGIS R. & HAGUE N.G.M., 1981. A neoaplectanid nematode in the larch sawfly *Cephalcia lariciphila* (Hymenoptera Pamphiliidae). *Ann. Appl. Biol.* 99, 171-177.
- GOTZ P., BOMAN A. & BOMAN H.G., 1981. Interactions between insect immunity and insect pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. Roy. Soc. London*, 212, 333-350.
- JACKSON J.J., 1985. Parasitism of the Western corn rootworm with the nematode *Steinernema feltiae*. Ph. D. Thesis. Univ. of Minnesota. 88 pp.
- AYA H.K. & REARDON R.C., 1982. Evaluation of *Neoaplectana carpocapsae* for biological control of the western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* ineffectiveness and persistence of tank mixes. *J. Nematol.* 14, 595-597.

- KHAN A., BROOKS W.M. & HIRSCHMANN H., 1976. *Chromonema heliothidis* n. gen., n. sp. (Steinernematidae Nematoda), a parasite of *Heliothidis zea* (Noctuidae Lepidoptera) and other insects. *J. Nematol.* 8, 159-168.
- LAUMOND C., SIMOES N. & BOEMARE N., 1989. Toxines de nématodes entomoparasites. Pathogénicité de *Steinernema carpocapsae*. Perspectives d'application en génie génétique. C.R. Acad. Agric. Fr 75, 135-138.
- MANKAU R., 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18, 415-440.
- MILSTEAD J.E. & POINAR G.O. Jr., 1978. A new entomophagous nematode for pest management systems. *Calif. Agric.* 32 12.
- MOLYNEUX A.S., 1984. The influence of temperature on the infectivity of heterorhabditid and steinernematid nematodes for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. Proc 4th Aust. Appl. Entomol. Res. Conf., Adelaide, 4, 344-351.
- MOLYNEUX A.S., 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (= *Neoaplectana*) spp. temperature, and aspects of behavior and infectivity. *Exp. Parasitol.* 62, 169-180.
- MOYLE P.L. & KAYA H.K., 1981. Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida Steinernematidae) in sand. *J. Nematol.* 13, 295-300.
- POINAR G.O. Jr., 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae, Nematoda). *Nematologica*, 12, 105-108.
- POINAR G. O. Jr., 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In Entomopathogenic nematodes in biological control, Gaugler R and Kaya H.K. Eds, CRC Press, Boca Raton, FL, 23-61.
- POINAR G.O. Jr., KARUNAKAR G.K. & DAVID H. 1992. *Heterorhabditis indicus* n.sp. (Rhabditida ; Nematoda) from India : separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundam. applid. Nematol.* 15, 467-472.
- POINAR G.O. Jr & JANSSON H.B., 1986. Infection of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* with the predatory fungi, *Monacrosporium ellipso sporum* and *Arthrobotrys oligospora* (Moniliales Deuteromycètes). *Rev. Nématol.* 9, 241-244.
- POINAR G.O. Jr. & LEUTENEGGER R., 1968. Anatomy of the infective and normal third stage juveniles of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae Nematoda). *J. Parasitol.* 54, 340-350.
- PYE A.E. & BURMAN M., 1981. *Neoaplectana carpocapsae* nematode accumulations on chemical and bacterial gradients. *Exp. Parasitol.* 51, 13-20.
- SERYCZYNSKA H. & KAMIONEK M., 1972. Defense reactions of *Galleria mellonella* L. caterpillars under the influence of parasite nematodes *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 20, 739-742.

TIMPER P., 1987. Dispersal of entomogenous nematodes by infected adult *Spodoptera exigua*. M. sc. dissertation of California at Davis. 35 pp.

THOMAS G.M. & POINAR G.O. Jr., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29, 352-360.