

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales



Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

Susceptibilidad de *Tityus carrilloi* (Scorpiones: Buthidae) a *Steinernema rarum* (OLI) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842 (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) en condiciones de laboratorio.

Tesista: Marcela Cecilia Alcalde

Director: Dr. Camilo Iván Mattoni

Co Directora: Dra. María Alejandra Bertolotti

Cátedra de Parasitología y Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución,
(Instituto de Diversidad y Ecología Animal, IDEA, CONICET – UNC), Facultad de
Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

AÑO 2023



Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

Susceptibilidad de *Tityus carrilloi* (Scorpiones: Buthidae) a *Steinernema rarum* (OLI) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842 (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) en condiciones de laboratorio.

Alumna: Marcela Cecilia Alcalde

Director: Dr. Camilo Iván Mattoni

Co Directora: Dra. María Alejandra Bertolotti

Tribunal examinador

- Nombre y apellido: Dr. Alfredo Peretti Firma

- Nombre y apellido: Dra. Susana Cagnolo Firma

- Nombre y apellido: Dra. Gabriela Bruno Firma

- Calificación: 10 (Diez)
- Fecha: 21 de marzo de 2023

A mi hijo Juan Pablo, mi alegría, mi luz, mi motor.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que me han ayudado, estimulado y sostenido en mi calidad de alumna, en el transcurso de todos los años que me llevó llegar a esta instancia, que seguramente algunas me quedarán sin agradecer.

A todos los profesores y profesoras de esta Casa de Estudios, que son docentes con una pasión por sus disciplinas y una entrega de sus conocimientos, dignos de admiración. No puedo nombrar a todos pues son muchos, pero quiero destacar aquí a algunos que dejaron una marca en mi formación: Teresa Sánchez aún presente en mi pensamiento, Adriana Zapata. María Luisa Pignata. Julio Zygodlo. Nilda Dottori, Arnaldo Mangeaud. Claudio González, Marcelo Lascano y Ramiro Desimore, Marina Chiappero, Alejandra Ceballos, Gustavo Baiardi, María Bistoni, Raquel Gleiser. Liliana Argüello, Andrés Vicintín, Ricardo Sahade, Marcos Tatián y Marcelo Carrera.

Un agradecimiento especial a mi Director de Tesina Camilo Mattoni por el tiempo dedicado y su excelente asesoramiento y a mi Co-directora de Tesina Alejandra Bertolotti que me enseñó todos los procedimientos y conocimientos necesarios para el trabajo de laboratorio y me guió con excelencia en el proceso de redacción de este trabajo. Al Profesor Dr. Gerardo Leynaud que generosamente me suministró los escorpiones. A la Profesora Dra. Susana Cagnolo, de la Cátedra de Parasitología por sus aportes y sugerencias. A la Dra Mariela Oviedo que me asesoró en el tratamiento estadístico de los datos. Al Tribunal Evaluador integrado por las Doctoras Susana Cagnolo y Gabriela Bruno y el Doctor Alfredo Peretti. A los miembros de la Comisión de Tesinas por su comprensión al otorgarme la prórroga de plazos para la Presentación y a la Dra. Analía González por sus gestiones para la Resolución Decanal de Excepción de Examen de Reválida. A los biólogos, hoy doctores ya, antes compañeros, que trabajan en el Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución y me apoyaron durante todo el desarrollo del proyecto.

Quiero agradecer también a todos los compañeros y compañeras que me ayudaron con informaciones, apuntes y manejo de tecnología, con la infinita paciencia que los jóvenes tienen con personas de la generación de sus padres.

Finalmente agradezco a mi familia por su apoyo y fe en que llegaría a lograr el sueño de ser Bióloga.

Índice

	Páginas
Resumen	5
Palabras clave	5
<hr/>	
Summary	6
Keywords	6
<hr/>	
Introducción	7-10
<hr/>	
Objetivos	11
<hr/>	
Materiales y Métodos	11-17
<hr/>	
Resultados	17-25
<hr/>	
Discusión	25-27
<hr/>	
Conclusiones	27-28
<hr/>	
Referencias bibliográficas	29-33

Susceptibilidad de *Tityus carrilloi* (Scorpiones: Buthidae) a *Steinernema rarum* (OLI) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842 (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) en condiciones de laboratorio.

Resumen

Los escorpiones de interés toxicológico en medicina humana pertenecen mayoritariamente a la familia Buthidae. *Tityus carrilloi*, es la especie de esta familia que registra más casos de picaduras y muertes por animales ponzoñosos en Argentina. Los nematodos entomopatógenos (NEPs) se emplean en el manejo de plagas. En este trabajo se evaluó la acción de dos aislados autóctonos de NEPs, *Steinernema rarum* (OLI) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842, sobre *T. carrilloi*. Se realizaron dos ensayos: En el primero, para evaluar la mortalidad, se seleccionaron 50 individuos de *T. carrilloi* y se formaron 5 grupos experimentales de 10 ejemplares. Se probaron dos dosis: 3500 JIs y 7000 JIs de cada aislado de nematodo/escorpión y un grupo control. Se evaluó también la infectividad de los JIs producidos a partir de escorpiones en 3 larvas de *Galleria mellonella* y en un individuo de *T. carrilloi*. En el segundo ensayo, para observar el desarrollo de nematodos, se utilizaron 20 escorpiones inoculados con 3500 JIs de *S. rarum* (OLI). Al comparar la supervivencia de los escorpiones se evidenció que *S. rarum* (OLI) fue más letal que *H. bacteriophora* N842. El mayor porcentaje de mortalidad final, 80%, se observó con la dosis baja de *S. rarum* (OLI). Se demostró la infectividad de los JIs emergidos de *T. carrilloi*. En la disección *post mortem* de los escorpiones, se hallaron hembras, con o sin huevos, machos y JIs. Se concluye que *T. carrilloi* es susceptible a *S. rarum* (OLI) y que el nematodo completa su ciclo reproductivo en el escorpión.

Palabras clave: *Tityus carrilloi*, *Steinernema rarum* (OLI), *Heterorhabditis bacteriophora* N842, susceptibilidad.

Summary

Scorpions of toxicological interest in human medicine belong mainly to the family Buthidae. *Tityus carrilloi* is the species of this family with the highest number of cases of stings and deaths by poisonous animals in Argentina. Entomopathogenic nematodes (ENPs) are used in pest management. In this work, the action of two native isolates of ENPs, *Steinernema rarum* (OLI) and *Heterorhabditis bacteriophora* N842, on *T. carrilloi* was evaluated. Two trials were carried out: In the first one, to evaluate mortality, 50 individuals of *T. carrilloi* were selected and 5 experimental groups of 10 specimens were formed. Two doses were tested: 3500 JIs and 7000 JIs of each isolate of nematode/scorpion and a control group. The infectivity of JIs produced from scorpions was also evaluated in 3 larvae of *Galleria mellonella* and 1 individual of *T. carrilloi*. In the second trial, 20 scorpions inoculated with 3500 JIs of *S. rarum* (OLI) were used to observe nematode development. Comparison of scorpion survival showed that *S. rarum* (OLI) was more lethal than *H. bacteriophora* N842. The highest final mortality rate, 80%, was observed with the low dose of *S. rarum* (OLI). The infectivity of the emerged JIs of *T. carrilloi* was demonstrated. In post mortem dissection of the scorpions, females, with or without eggs, males and JIs were found. It is concluded that *T. carrilloi* is susceptible to *S. rarum* (OLI) and that the nematode completes its reproductive cycle in the scorpion.

Keywords: *Tityus carrilloi*, *Steinernema rarum* (OLI), *Heterorhabditis bacteriophora* N842, susceptibility.

1. INTRODUCCIÓN

Los escorpiones de interés toxicológico en medicina humana pertenecen en su mayoría a la familia Buthidae. De las 2743 especies descritas en el mundo, sólo 126 son comprobadamente peligrosas para el ser humano (Chippaux & Goyffon, 2008; Rein, 2017). Se estima que anualmente hay al menos 1.5 millones de casos de envenenamiento por escorpiones con 2600 muertes (Chippaux, 2012). En América, la totalidad de los escorpiones de importancia médica pertenecientes a esta familia corresponden a dos géneros: *Centruroides* Marx 1889 en Centroamérica y Norteamérica, y *Tityus* Koch 1836 en Centroamérica y Sudamérica (Bücherl, 1971; Chippaux & Goyffon, 2008). En Argentina, la familia Buthidae tiene una distribución local restringida al centro y norte del país, registrándose hasta el momento tres géneros: *Zabius* Thorell 1894, *Ananteris* Thorell 1891 y *Tityus*.

El género *Tityus* incluye todas las especies de importancia médica del sur de Sudamérica, siendo responsable de varias muertes cada año en esta región (Ministerio de Salud de la Nación, 2011; de Roodt, 2014; Blanco *et al.*, 2016). Este género ha sido muy estudiado y recientemente, gracias al análisis de colecciones de especímenes de Argentina y Paraguay, se ha redefinido la identidad y posición filogenética de *Tityus trivittatus* Kraepelin 1898. Estos análisis han determinado que la especie identificada como *T. trivittatus*, distribuida en el centro y norte de Argentina, corresponde a la nueva especie, *Tityus carrilloi* Ojanguren-Affilastro, 2021 (Ojanguren- Affilastro *et al.*, 2021). Si bien los análisis moleculares y filogenéticos confirmaron la separación taxonómica, *T. trivittatus* y *T. carrilloi* pueden diferenciarse por características morfológicas como el patrón de pigmentación presente en los terguitos I a VI. Ambas especies además presentan otras diferencias, no tan notables a simple vista, en las carenas, los espiráculos y los pedipalpos de los machos (Ojanguren-Affilastro *et al.*, 2021).

Tityus carrilloi ocupa la mayor parte del centro y norte de Argentina y la mayoría de los registros corresponden principalmente a poblaciones de hembras sinantrópicas y partenogenéticas. A partir de datos actuales e históricos se supone que el área de distribución original de la especie, en la que se encuentran poblaciones con machos y hembras, estaría restringida a un sector del Chaco húmedo argentino con límite norte en el Río Bermejo. La capacidad invasiva de *T. carrilloi* y su adaptabilidad a ambientes antropizados permitió que la especie llegara a zonas con climas muy diferentes a los de

origen, habiendo extendido su área de distribución un 300% en 70 años (Ojanguren-Affilastro *et al.*, 2021).

En Argentina, las picaduras por escorpiones son el accidente con animales venenosos más comunicado a las autoridades sanitarias (de Roodt, 2014; Blanco *et al.*, 2016). En las últimas décadas se han incrementado considerablemente las notificaciones por alacranismo y los casos de muerte por especies del género *Tityus*, estando principalmente involucrado *T. carrilloi* y en menor medida, *T. confluens* (de Roodt, 2015). En el año 2018 se registraron 5536 casos confirmados de alacranismo en el país y las provincias con mayor número de casos fueron Córdoba, Tucumán, Catamarca y Santiago del Estero (Ministerio de Salud de la Nación, 2020).

El incremento de casos de escorpionismo provocado por *T. carrilloi* ha generado campañas de difusión orientadas al reconocimiento de especies de importancia médica, así como a medidas de prevención de accidentes y pautas de acción en caso de picadura (Ministerio de Salud de la Nación, 2011). Sin embargo, el problema es abordado sólo desde el punto de vista sanitario sin considerar la expansión poblacional que registra *T. carrilloi* desde los grandes centros urbanos (Murúa *et al.*, 2002; Fernández Campón & Lagos Silnik, 2009; Blanco *et al.*, 2012; de Roodt, 2014). Si no se controla el aumento de la densidad poblacional, el problema de escorpionismo provocado por esta especie puede agravarse con el tiempo (Martínez *et al.*, 2017). En Mendiolaza, provincia de Córdoba, en el año 2018, una inusitada abundancia y concentración de *T. carrilloi*, expuso a la sociedad el riesgo de no considerar el crecimiento descontrolado de la población de esta especie y los factores ambientales que lo favorecen (Dellatorre, 2018; Redacción Clarín, 2018).

Para controlar esta especie, habitualmente se recomienda la fumigación con piretroides solos o combinados con carbamatos (Ministerio de Salud de la Nación, 2017). Sin embargo, se conoce que el empleo de productos químicos provoca resistencia en la especie a controlar. Una alternativa al uso de pesticidas en el manejo de especies plaga es la utilización de agentes biológicos, como los nematodos entomopatógenos (NEPs) pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estos organismos se emplean como agentes de control de insectos perjudiciales y tienen ventajas respecto de los productos químicos, ya que no son contaminantes y se reproducen dentro del insecto hospedador, manteniendo así su efecto a largo plazo. Por tales razones el uso de NEPs

representa una alternativa ambientalmente segura para el manejo de plagas (Fimbres Cubillas & Flores-Lara, 2016).

El ciclo de vida de los NEPs se caracteriza por poseer un único estadio de vida libre en el suelo, representado por juveniles infectivos (JIs), que son los encargados de localizar y penetrar en el cuerpo del hospedador. Cuando los JIs de *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. penetran en el insecto, se dirigen al hemocel, donde liberan bacterias simbiotas que llevan en su intestino. Éstas se multiplican rápidamente dando lugar a una septicemia que causa la muerte del hospedador. El desarrollo de los nematodos continúa dentro del insecto hasta alcanzar el estado adulto. En la Familia Steinernematidae, tanto la 1ª como la 2ª generación de nematodos adultos están constituidas por hembras y machos y la reproducción es anfimítica (reproducción sexual en la que los gametos masculinos y femeninos proceden de dos individuos, macho y hembra, respectivamente). En la Familia Heterorhabditidae, en cambio, los machos no están presentes en la 1ª generación y los individuos son hermafroditas, por lo cual ocurre autofecundación. La 2ª generación de adultos es dioica y la reproducción anfimítica, tal como sucede en Steinernematidae. En ambas Familias, a partir de las 2 generaciones de adultos se forman nuevos JIs que abandonan el cadáver del insecto en busca de otro hospedador (Adams & Nguyen, 2002, Lewis & Clarke, 2012).

Las Familias Steinernematidae y Heterorhabditidae han demostrado ser eficientes como agentes de control biológico (Sáenz, 2005; Pérez *et al.*, 2010; Labaude y Griffin, 2018) y varias especies han sido comercializadas para su empleo contra diferentes insectos plaga (Hazir *et al.*, 2003). En la provincia de Córdoba, aún no se han realizado ensayos a campo con estos nematodos, aunque sí se han llevado a cabo numerosas experiencias en laboratorio contra diferentes especies de insectos. A modo de ejemplo, recientemente se ha encontrado que *Steinernema rarum* (OLI) causó mortalidades de 67% y 89% en *Periplaneta americana*, por lo que se plantea como una posible estrategia de control de esta plaga (Aguirre Varela *et al.*, 2021). Otros insectos presentes en la Provincia de Córdoba han demostrado ser susceptibles al parasitismo por distintos aislados de *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) y *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Cagnolo & Almirón, 2010; Cagnolo *et al.*, 2011; Ulvedal *et al.*, 2012; Bertolotti *et al.*, 2013; Gianfelici *et al.*, 2014; Cagnolo & Bertolotti, 2016).

En relación a los escorpiones, se conocen escasos reportes de parasitismo en la naturaleza por nematodos de las familias Mermithidae y Oxyuridae (Poinar & Stockwell, 1988; Baruš & Koubková, 2002). En el caso de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae no existen registros de asociaciones naturales con estos arácnidos y sólo se conoce un estudio en una especie de la familia Buthidae realizado en Estados Unidos en la Universidad de Arizona (Gouge & Snyder, 2005). Los resultados de dicho estudio muestran que *Centruroides exilicauda* Wood 1863, especie de importancia médica en el sur de Estados Unidos y México, es susceptible a *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929), *S. riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994, *Heterorhabditis bacteriophora* y *H. marelatus* Liu & Berry, 1996. En Argentina, aún no se han realizado estudios para evaluar el comportamiento de aislados autóctonos de este grupo de nematodos frente a las especies de escorpiones de interés médico y se desconoce la susceptibilidad de *T. carrilloi* a los mismos.

En razón del desconocimiento acerca de este aspecto, la necesidad de plantear soluciones alternativas al control de plagas tradicional, el crecimiento notorio de la población de *T. carrilloi* en ambientes antrópicos y el incremento de las consultas por hallazgos y/o accidentes provocados por esta especie, en el presente trabajo se propuso evaluar, por primera vez, la acción de dos aislados autóctonos de NEPs, *Steinernema rarum* (OLI) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842, sobre este artrópodo. La utilización de *S. rarum* (OLI) se fundamenta en que es, hasta el presente, el aislado de la provincia de Córdoba más virulento de todos los evaluados oportunamente (Cagnolo *et al.*, 2004). Respecto a *H. bacteriophora* N842, es un aislado que ha sido probado solamente contra una especie de coleóptero, *Botanochara octoplagiata* y con resultados satisfactorios (Echeverría, 2018). Debido al conocimiento previo sobre la virulencia y efectividad de estas especies de NEPs sobre otros artrópodos se espera que *Tityus carrilloi* sea susceptible al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la susceptibilidad de *Tityus carrilloi* a dos aislados de nematodos entomopatógenos *Steinernema rarum* (OLI) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842 de la provincia de Córdoba.

Objetivos específicos:

- Determinar la mortalidad de *T. carrilloi* bajo dos dosis de *S. rarum* (OLI) y *H. bacteriophora* N842.
- Comparar la mortalidad de *T. carrilloi* provocada por cada aislado.
- Observar el desarrollo de *S. rarum* (OLI) y *H. bacteriophora* N842 en *T. carrilloi*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 Procedencia y mantenimiento de escorpiones

Se utilizaron 71 escorpiones (hembras adultas) de la especie *T. carrilloi* (Fig. 1A) provistos por el Centro de Zoología Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Los escorpiones fueron numerados, pesados y mantenidos individualmente en recipientes plásticos de 250 ml con tapa, dentro de los cuales se colocó un algodón húmedo como bebedero. Se alimentaron cada 15 días con grillos *Acheta domesticus* (L.). Hasta el momento de la experiencia, los especímenes se mantuvieron en el Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución (Instituto de Diversidad y Ecología Animal, IDEA, CONICET – UNC), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, en condiciones de temperatura y humedad constantes (Fig. 1B).

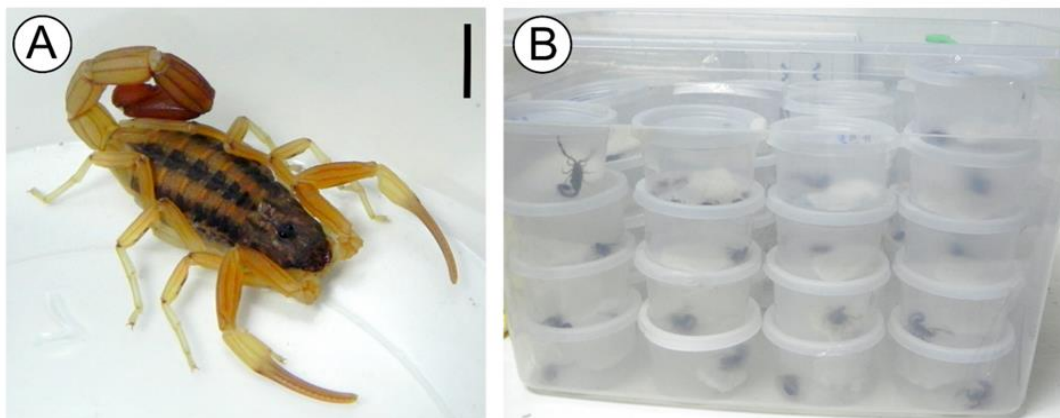


Figura 1. *Tityus carrilloi*. **A:** Hembra adulta. **B:** Almacenamiento de escorpiones.

Escala A = 0.5 cm.

3.2 Procedencia, multiplicación y mantenimiento de nematodos

Los aislados de nematodos usados fueron *Steinernema rarum* (OLI), procedente de la localidad de Oliva (Cagnolo *et al.*, 2004) y *Heterorhabditis bacteriophora* N842, detectado a 6 km de la localidad de Quilino (Cagnolo & Bertolotti, 2011), ambos de la Provincia de Córdoba. Estos aislados son multiplicados en forma periódica y almacenados en el Laboratorio de Parasitología de la FCFyN de la UNC. La multiplicación de los nematodos para obtener los JIs de tercer estadio, destinados a la infección de los escorpiones, se realizó por cultivo *in vivo* sobre larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* L. La cría de este insecto se realizó sobre dieta artificial según técnicas convencionales (Kaya & Stock, 1997).

Para la multiplicación de los aislados se utilizaron cápsulas de Petri de 5 cm de diámetro provistas de dos discos de papel de filtro. Sobre el disco superior se dispuso 1 ml de suspensión acuosa conteniendo JIs del nematodo y luego se agregaron 5 a 7 larvas de *G. mellonella*. Las cápsulas se incubaron a 25 °C durante 6 a 10 días. La recolección de JIs se realizó mediante trampas White (Fig. 2A) (Kaya & Stock, 1997). Se recogió la suspensión de JIs y se renovó el agua en la trampa para una segunda recolección a los 4 días. Los cultivos de nematodos se almacenaron en cajas plásticas de 15x10x3 cm y se mantuvieron en heladera a 10 °C o a temperatura ambiente, según se tratase de *H. bacteriophora* N842 o de *S. rarum* (OLI), respectivamente, ya que bajo dichas condiciones se ha observado una mayor supervivencia de estos aislados (Cagnolo, comunicación personal) (Fig. 2B).

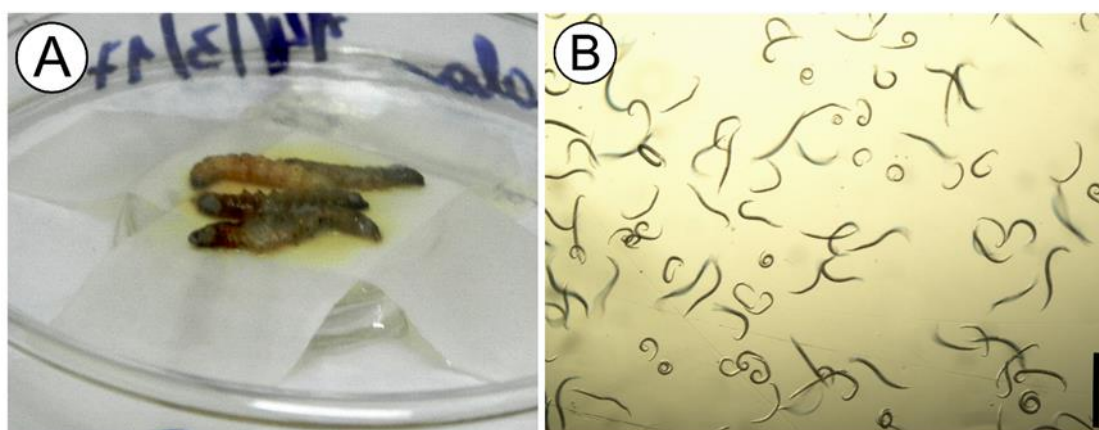


Figura 2. Nematodos entomopatógenos. A: Larvas de *Galleria mellonella* en trampa White. **B:** Juveniles infectivos recolectados a partir de trampa White. Escala B = 0.5 mm.

3.3 Bioensayo (Figs. 3, 4)

Se utilizaron JIs que no superaban los 30 días de emergidos de las larvas de *G. mellonella*. Los inóculos se prepararon 24 horas antes de comenzar con los bioensayos. Se probaron dos dosis (D): baja, con 3500 JIs y alta, con 7000 JIs de cada aislado de nematodos por escorpión y se consideró un grupo control. Estas dosis se determinaron a partir de observaciones y experimentos previos realizados en el laboratorio (Bertolotti, datos no publicados; Aguirre Varela *et al.*, 2021). Para obtener dichas dosis, se extrajo una solución concentrada de JIs de las cajas de almacenamiento y se agregó agua hasta un volumen conocido. De cada solución se tomaron 0.5 ml con micropipeta y se contabilizaron los nematodos bajo lupa binocular. El procedimiento se realizó tres veces. Se promediaron los resultados de los 3 recuentos y se calculó la concentración de JIs por ml para posteriormente estimar, por regla de tres simple la cantidad de solución necesaria para conformar cada dosis.

3.3.1 Primer ensayo para determinar mortalidad (Fig. 3)

Para determinar la mortalidad de *T. carrilloi* a *S. rarum* (OLI) y *H. bacteriophora* N842, se consideró al escorpión como “muerto por nematodos” cuando mostraba inmovilidad, flacidez, ausencia de respuesta al ser estimulado con una aguja, y se corroboraba posteriormente, la presencia de nematodos en las trampas White o en las disecciones.

Protocolo

Para el primer ensayo se seleccionaron 50 individuos. El rango de pesos de los individuos usados fue de 0.35 a 1 g. Los tratamientos se llevaron a cabo en cápsulas de Petri de 90 mm de diámetro. En cada una se dispuso un disco de papel de filtro, en el que previamente se filtró el inóculo conteniendo la dosis establecida, haciéndolo pasar por el papel plegado sobre embudos de vidrio de borosilicato (Kaya & Stock, 1997) (Fig. 4A). Para el grupo control, sólo se filtró un volumen de agua hervida equivalente al que contenía la dosis, sin nematodos. Por último, se colocó un escorpión en el centro de la cápsula. Las cápsulas se taparon y sellaron con cinta adhesiva de papel y fueron mantenidas en estufa a 25 °C con el fin de proporcionar a los escorpiones una temperatura óptima para mantenerlos activos (Fig. 4B). Por cada aislado de nematodo y por cada dosis se evaluaron

10 escorpiones. El grupo control también contó con 10 individuos. Como control positivo de la infectividad de los inóculos utilizados se realizó el mismo procedimiento, sobre larvas de *G. mellonella* (n=5).

Se realizaron observaciones cada 24 horas durante 10 días a fin de registrar cambios cualitativos en el comportamiento o motilidad, coloración, aspecto de las membranas intersegmentales, aparición de pústulas y muerte de los individuos (Gouge & Snyder, 2005). Se registró el día de muerte de los escorpiones y se los mantuvo en sus cápsulas de Petri por un período de entre 5 y 6 días. Luego de este período los escorpiones se enjuagaron con agua destilada para desprender los JIs que pudieran estar adheridos a la superficie de su cuerpo y se colocaron individualmente en trampas White (Fig. 4C). Estas trampas se examinaron cada 24 h por el término de 10 días para esperar la emergencia de JIs. Aquellos escorpiones en los que no se advirtió emergencia de JIs en este período fueron diseccionados con el fin de observar la presencia de nematodos en su interior y constatar así, que la mortalidad fue causada por estos organismos.

Los JIs que emergieron en este período se recolectaron y almacenaron en un recipiente plástico para posteriormente probar su infectividad sobre un individuo de *T. carrilloi* y tres individuos de *G. mellonella*. Para ello, se siguió el protocolo antes explicado, y se registró la mortalidad de los invertebrados.

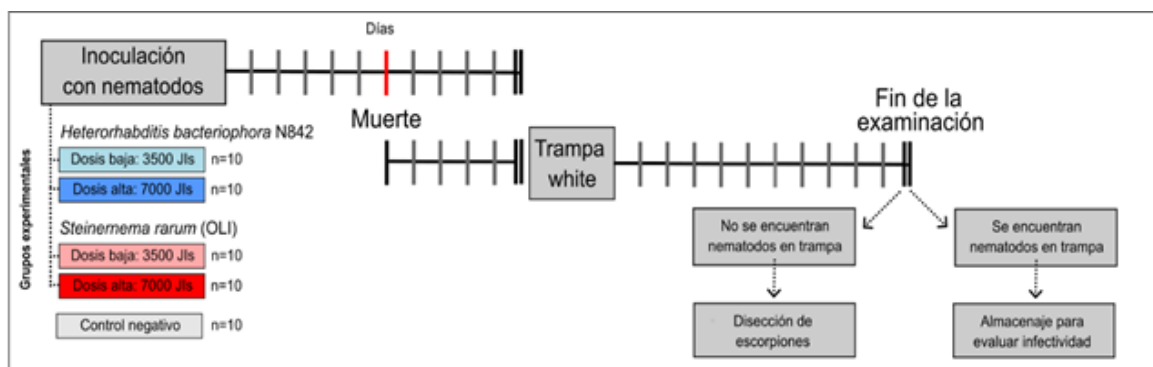


Figura 3. Esquema representando metodología utilizada. A: Primer ensayo para determinar mortalidad de individuos de *Tityus carrilloi* bajo distintos tratamientos con nematodos

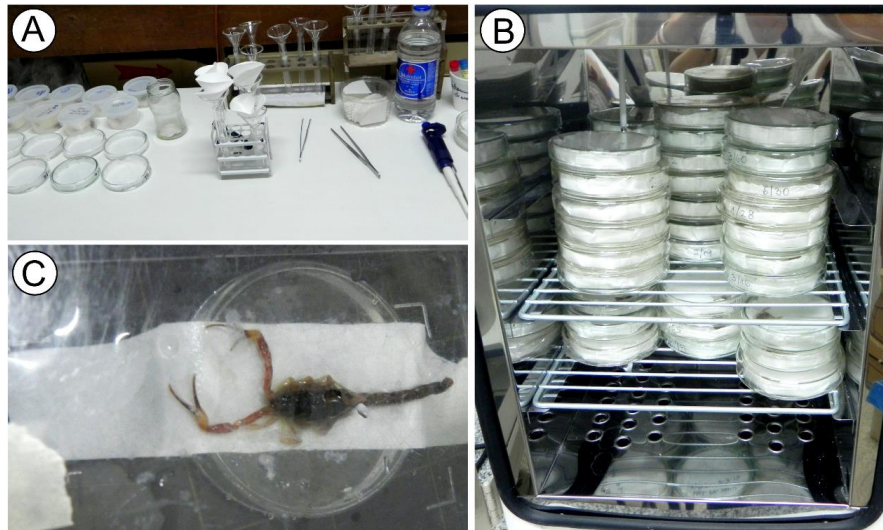


Figura 4. Bioensayo. A: Instrumental para protocolo de infección con nematodos entomopatógenos. **B:** Escorpiones inoculados con nematodos entomopatógenos en estufa a 25 °C. **C:** *Tityus carrilloi* en trampa White.

3.3.2 Segundo ensayo para observar el desarrollo de los nematodos (Fig. 5)

Ante los resultados del primer ensayo, que revelaron una mayor mortalidad de escorpiones con *S. rarum* (OLI) D3500, sólo se usó este tratamiento para observar el desarrollo de los nematodos en los escorpiones. Se seleccionaron 20 ejemplares de *T. carrilloi* con pesos entre 0.30 y 1 g. Se realizó el mismo protocolo descrito previamente para evaluar mortalidad (3.3.1). Sin embargo, en este caso, luego de registrar la fecha de muerte, los individuos fueron diseccionados a diferentes tiempos *post-mortem*. Previo a la disección, cada individuo muerto fue enjuagado con agua destilada para eliminar nematodos de la superficie de su cuerpo, tal como se indicó en el primer ensayo (3.3.1). En las disecciones se examinó la presencia de estadios juveniles y adultos de nematodos y se verificó de este modo su desarrollo dentro de los arácnidos.

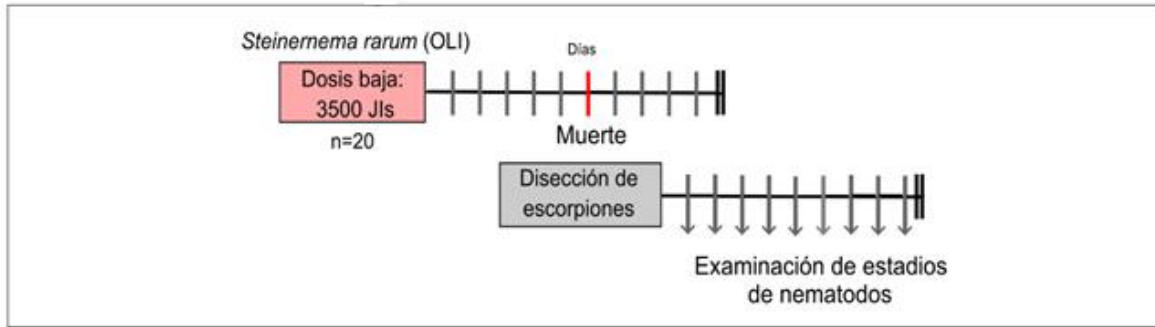


Figura 5. Esquema representando metodología utilizada. Segundo ensayo para observar el desarrollo de los nematodos en individuos de *Tityus carrilloi* inoculados con *Steinernema rarum* (OLI) D 3500. Líneas rojas representan muerte potencial, flechas grises en B representan disecciones en cada uno de los días.

3.4 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados con el software estadístico R versión 3.6.1 (R Core Team, 2018). Se efectuaron exploraciones iniciales de los datos y luego se realizó un modelo generalizado simple (GLM) para comparar la supervivencia entre tratamientos. La variable respuesta fue numérica: “número de días de supervivencia” de cada individuo durante 10 días y se adicionó el tratamiento como efecto fijo, con 5 factores: *H. bacteriophora* D3500, *H. bacteriophora* D7000, *S. rarum* D3500, *S. rarum* D7000, control negativo; y el peso como covariable, así como la interacción entre el peso y el tratamiento. La distribución de esta variable fue analizada previamente para verificar si se cumplían los supuestos de normalidad, homogeneidad de las varianzas y sobre-dispersión de forma gráfica y con el paquete fitdistrplus (Delignette-Muller & Dutang, 2015). Se consideró que la distribución que mejor ajustaba a los datos y con un menor valor de AIC (criterio de información de Akaike) fue la Binomial Negativa, por lo que se utilizó la función “glm.nb” del paquete MASS (Ripley *et al.*, 2013) y “Anova” del paquete car para calcular la significancia estadística (Fox *et al.*, 2007). Para comparaciones *a posteriori* de medias se utilizó el test de Tukey mediante el paquete multcomp (Hothorn *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se realizaron test de proporciones múltiples o pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrado para comparar las proporciones de supervivencia en diferentes días (día 3, día 6, día 9) entre tratamientos y entre días de un mismo tratamiento con la función “prop.test” del paquete stats (Zar, 1999). Para la visualización de los datos y resultados de los residuos de los modelos ajustados se utilizó el paquete ggplot2 (Wickham, 2009).

Se realizaron curvas Kaplan-Meier de supervivencia (Kaplan & Meier, 1958) con el paquete survival y se graficaron con survminer (Therneau & Lumley, 2015). Se asignó el valor 1 a la muerte observada o 0 a la muerte no observada en el período considerado. Se utilizó un modelo de regresión de Cox (Proportional hazards model) para examinar el efecto del tratamiento sobre la supervivencia de los escorpiones. Se calculó la tasa media de muerte para cada tratamiento y las diferencias estadísticas para el tiempo con el 50% de mortalidad entre tratamientos.

4. RESULTADOS

4.1 Primer ensayo para determinar mortalidad

Durante el primer ensayo, y en el lapso de los 10 días de observación, el 28% de los escorpiones tratados presentaron alteraciones en sus patrones comportamentales y locomotores, mostrando signos de irritación (marcha con pinzas abiertas y levantadas) y/o marcha con elevación del cuerpo, evitando el contacto con el sustrato. En relación a las otras variables cualitativas evaluadas, en ningún caso se observó cambio de coloración, expansión de las membranas intersegmentales ni pústulas en la superficie del cuerpo antes de la muerte.

4.1.1 Infección con *Heterorhabditis bacteriophora* N842

En el grupo experimental tratado con la dosis baja sobrevivieron todos los individuos, mientras que con la dosis alta sólo se observó la muerte de un escorpión el día 6, que no fue puesto en trampa White por presentar una descomposición avanzada (Tabla 1; Figs. 6A, 7). Sin embargo, en la disección, se encontraron JIs muertos. Al comparar los porcentajes de sobrevivencia a los 3 y 6 días, con 100% y 90% de supervivencia, respectivamente, no se encontraron diferencias significativas (Tablas 2, 3; Fig. 7).

Tabla 1. Mortalidad de *Tityus carrilloi* por *Heterorhabditis bacteriophora* N842 y *Steinernema rarum* (OLI).

Grupo experimental	N° de individuos	Mortalidad al día 10 %	N° de Trampas White con emergencia de JIs	N° de disecciones con presencia de nematodos
Control	10	0	0	0
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D3500	10	0	0	0
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D7000	10	10	0	1
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D3500	10	80	1	8
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D7000	10	50	4	1

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de *Tityus carrilloi* en tratamientos con *Heterorhabditis bacteriophora* N842 y *Steinernema rarum* (OLI) en un período de 10 días (se reporta estado al día 3, 6 y 9).

Grupo experimental	Supervivencia		
	Día 3	Día 6	Día 9
Control Negativo	100%	100%	100%
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D3500	100%	100%	100%
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D7000	100%	90%	90%
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D3500	70%	20%	20%
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D7000	80%	50%	50%

Tabla 3. Comparación de proporciones de supervivencia entre distintas dosis de tratamientos con nematodos sobre adultos de *Tityus carrilloi*. **A:** Dentro de cada tratamiento entre diferentes días de examinación. **B:** Entre tratamientos en diferentes días de examinación.

A			
Grupo experimental	Día 3 vs Día 6	Día 3 vs Día 9	Día 6 vs Día 9
Control Negativo	-	-	-
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D3500	-	-	-
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D7000	$\chi^2=1.053$ p-valor=0.305	$\chi^2=1.053$ p valor=0.305	-
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D3500	$\chi^2=5.051$ p-valor=0.025	$\chi^2=5.051$ p-valor=0.025	-
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D7000	$\chi^2=1.978$ p-valor=0.159	$\chi^2=1.978$ p-valor=0.159	-
B			
Grupo experimental	Día 3	Día 6	Día 9
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D3500 vs <i>Steinernema rarum</i> (OLI) D3500	$\chi^2=3.529$ <i>p-valor=0.060</i>	$\chi^2=13.333$ p-valor<0.005	$\chi^2=13.333$ p-valor<0.005
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D7000 vs <i>Steinernema rarum</i> (OLI) D7000	$\chi^2=2.222$ p-valor=0.136	$\chi^2 = 3.809$ <i>p-valor= 0.051</i>	$\chi^2= 3.8095$ <i>p-valor = 0.051</i>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D3500 vs <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D7000	-	$\chi^2=1.053$ p-valor= 0.305	$\chi^2=1.053$ p-valor= 0.305
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D3500 vs <i>Steinernema rarum</i> (OLI) D7000	$\chi^2= 0.267$ p-valor= 0.606	$\chi^2=0.267$ p-valor= 0.159	$\chi^2=0.267$ p-valor= 0.159
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D3500 vs Control Negativo	$\chi^2=3.529$ <i>p-valor=0.060</i>	$\chi^2=13.333$ p-valor<0.005	$\chi^2=13.333$ p-valor<0.005
<i>Steinernema rarum</i> (OLI) D7000 vs Control Negativo	$\chi^2=2.222$ p-valor=0.136	$\chi^2=6.667$ p-valor=0.009	$\chi^2=6.667$ p-valor=0.009
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D3500 vs Control Negativo	-	-	-
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> N842 D7000 vs Control Negativo	-	$\chi^2=1.053$ p-valor=0.305	$\chi^2=1.053$ p-valor=0.305

Se presenta estadístico y p-valor, tipografía en negrita indica diferencias estadísticamente significativas (p-valor<0.05) y tipografía en itálica, diferencias marginalmente significativas entre proporciones (0.05<p-valor<0.1). Celdas sin valor indican comparaciones entre proporciones iguales (no existen diferencias significativas entre las mismas).

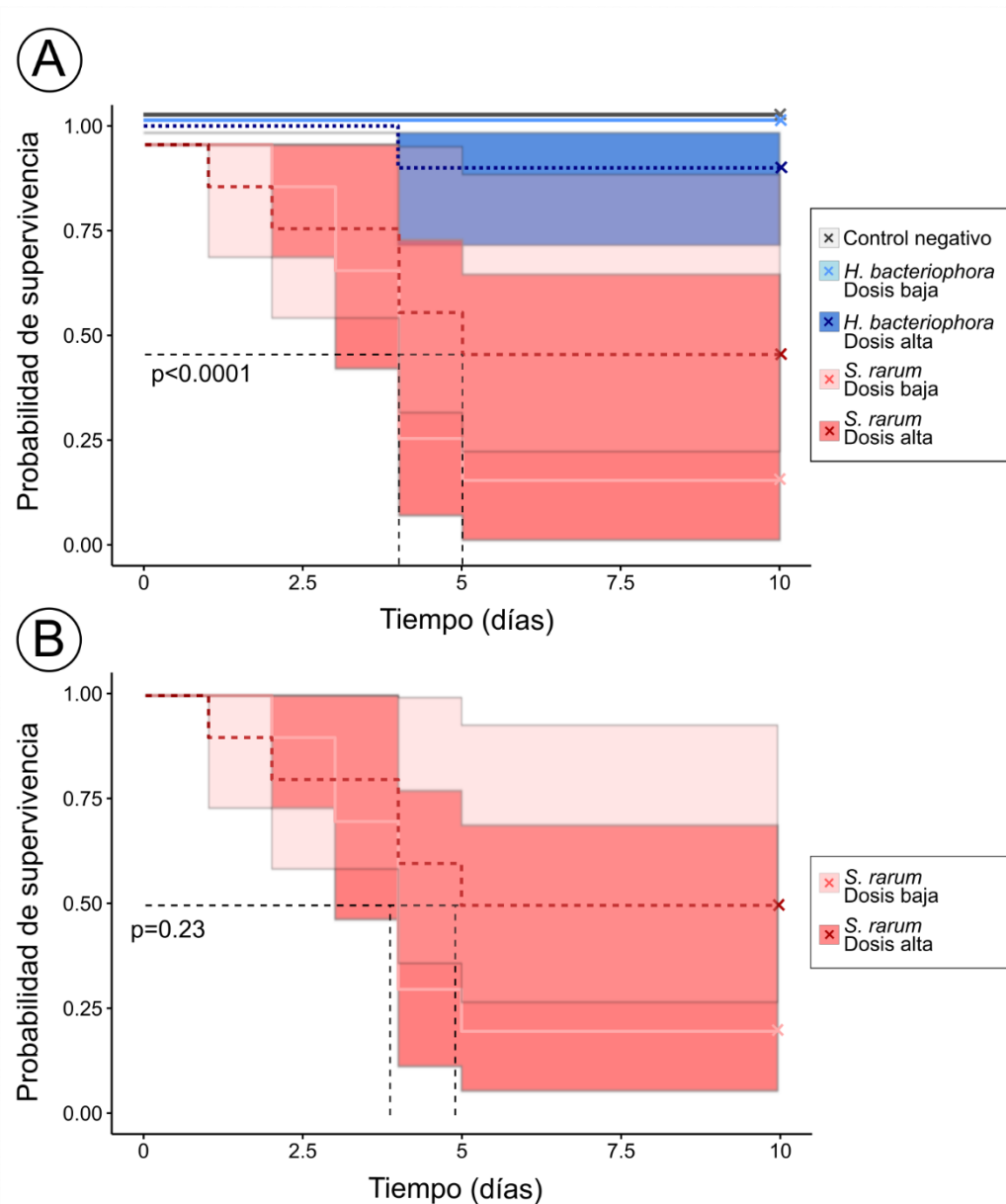


Figura 6. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia de *Tityus carrilloi* en función del tiempo con distintos tratamientos de exposición a nematodos entomopatógenos. A: Probabilidad de supervivencia bajo dosis alta y baja con *Heterorhabditis bacteriophora* N842 y *Steinernema rarum* (OLI) y control negativo. **B:** Probabilidad de supervivencia bajo dosis alta y baja con *Steinernema rarum* (OLI). Se indican referencias a la derecha, intervalos de confianza (95%) y significancia estadística (p-valor) entre tratamientos para el 50% de supervivencia.

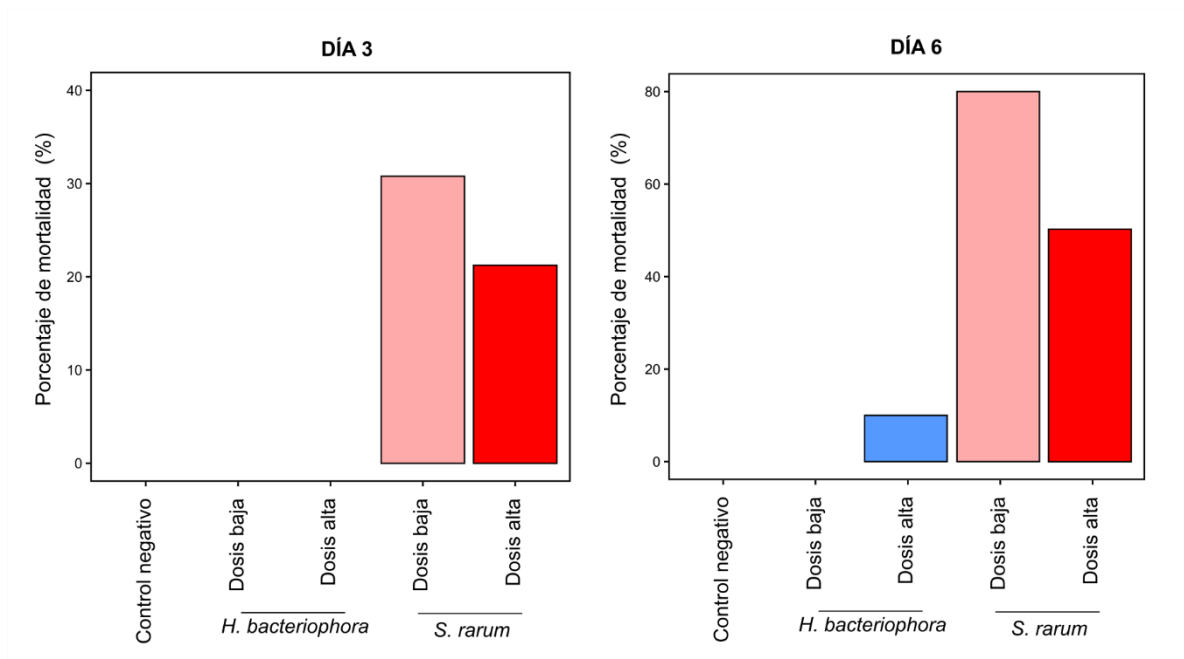


Figura 7. Porcentaje de mortalidad al día 3 y al día 6 de *Tityus carrilloi* bajo cada tratamiento con nematodos entomopatógenos.

4.1.2 Infección con *Steinernema rarum* (OLI)

El grupo experimental tratado con la dosis baja registró una mortalidad del 80%, siendo el tratamiento que causó el mayor número de muertes (Tabla 1; Fig. 7). De los escorpiones muertos el 50% fueron puestos en trampa White y sólo en una de ellas se observó emergencia de JIs (n=396). En la disección posterior de todos los individuos se encontraron nematodos (Tabla 1). Bajo este tratamiento, entre el día 11 y 14, murieron los escorpiones restantes y en las disecciones se hallaron JIs vivos en uno de ellos y machos y hembras en el otro. Dado que estas muertes se produjeron pasados los diez días de observación previstos, no se indicaron en la Tabla 1 y tampoco se tuvieron en cuenta para el análisis de datos. La supervivencia fue de un 70% hacia el día 3 disminuyendo significativamente hasta un 20% hacia el día 6 y manteniéndose en este valor hasta el final de la prueba (Tablas 2, 3).

En el grupo experimental tratado con la dosis alta, se registró una mortalidad del 50% (Tabla 1; Fig. 7). Los escorpiones muertos fueron puestos en trampa White y se observó emergencia de JIs en 4 de ellas. En la disección posterior de los escorpiones muertos restantes, en los que no hubo emergencia de JIs, se hallaron nematodos muertos

en el interior de uno de ellos (Tabla 1). Para este tratamiento la supervivencia fue de un 80% para el tercer día, pasando al 50% para el día 6 y 9, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa (Tablas 2, 3).

El registro de muertes de los escorpiones con los dos aislados de nematodos, mostró que las mismas ocurrieron entre el 1º y el 5º día a partir del inicio del tratamiento (Fig. 6A, B).

4.1.3 Controles

En el grupo control no se produjo ninguna muerte durante el período en el que se extendió el ensayo (Tablas 2, 3; Figs. 6A, 7). Por el contrario, en las larvas de *G. mellonella*, grupo control positivo de infectividad, la mortalidad fue del 100%.

La prueba de infectividad en nuevos organismos se llevó a cabo sólo con los JIs de *S. rorum* (OLI). Se usaron los que emergieron a partir de un escorpión inoculado con D3500. Estos JIs resultaron infectivos para las tres larvas de *G. mellonella* y el individuo *T. carrilloi* evaluados. Los hospedadores murieron pasados los 3 días desde la puesta en contacto con los nematodos, y en las disecciones posteriores, realizadas a los 6 días a partir de la muerte, se encontraron JIs.

4.1.4. Comparación entre tratamientos

Se encontraron diferencias estadísticas entre el número de días que sobrevivieron los individuos en los diferentes tratamientos ($\chi^2=39.975$, Df=4, p-valor<0.005) (Fig. 8). Los tratamientos con *H. bacteriophora* N842 no fueron significativamente diferentes entre sí ni con el control negativo. El tratamiento con la dosis baja de *S. rorum* (OLI) fue significativamente diferente a los tratamientos con *H. bacteriophora* N842 y al control negativo, mientras que la dosis alta, no mostró diferencias significativas de los tratamientos con *H. bacteriophora* N842 y con el control negativo. Al comparar los tratamientos con *S. rorum* (OLI) se hallaron diferencias marginalmente significativas entre las dosis alta y baja, presentando el de la dosis baja una tendencia a tener menos días de supervivencia promedio que el de la dosis alta. No se encontró efecto del peso de los individuos sobre los días de supervivencia ni interacción entre el peso y el tratamiento.

Estos resultados son coincidentes al comparar las proporciones de supervivencia (% de individuos vivos respecto del total) entre tratamientos a lo largo de diferentes días

(Tabla 3). Al comparar las dosis bajas (D3500) de los distintos aislados de nematodos se encontró que para el día 3 ambos tratamientos muestran una igual proporción de supervivencia, aunque *S. rarum* (OLI) tiene una tendencia marginal a ser menor. Ya para el día 6 y 9 esta tendencia se afirma, y el tratamiento con la dosis baja de *S. rarum* (OLI) presenta una mayor efectividad para producir la muerte de los individuos. En la comparación de las dosis altas (D7000) no se encontraron diferencias entre *S. rarum* (OLI) y *H. bacteriophora* N842 en el tercer día, aunque para el día 6 y 9 se observó una tendencia marginalmente significativa de mayor mortalidad con el tratamiento de *S. rarum* (OLI) (Tabla 3).

Los tratamientos con dosis alta y baja de *S. rarum* (OLI) no mostraron diferencias significativas en la proporción de supervivencia a lo largo de los días. Los tratamientos con dosis alta y baja de *H. bacteriophora* N842 tampoco mostraron diferencias en la proporción de supervivencia a lo largo de los días (Tabla 3).

El tratamiento con dosis baja de *S. rarum* (OLI) fue siempre significativamente diferente al control negativo, mientras que el tratamiento con dosis alta de *S. rarum* (OLI) fue diferente al control solo en el día 6 y 9, no presentando diferencias con el control para el día 3. En cambio, los tratamientos con *H. bacteriophora* N842 no se diferenciaron estadísticamente del control negativo en ninguno de los días evaluados (Tabla 3).

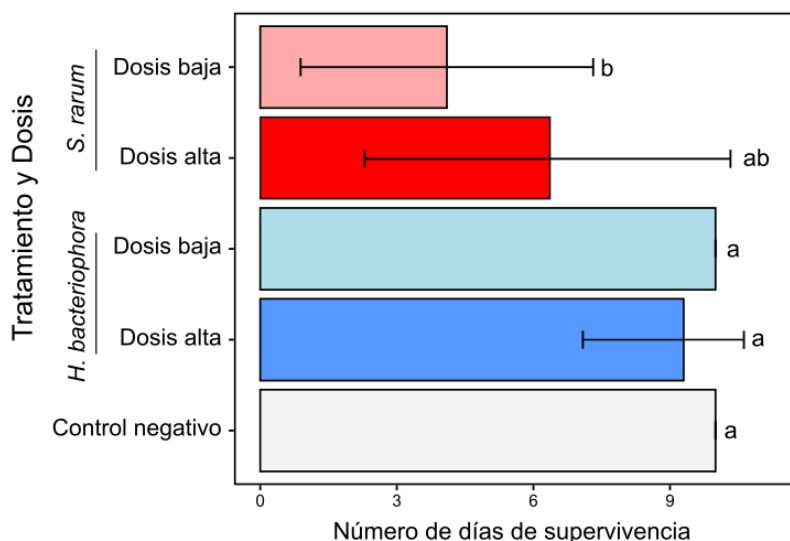


Figura 8. Número medio y desvío standard de los días de supervivencia de *Tityus carrilloi* bajo cada tratamiento con nematodos entomopatógenos. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p-valor<0.05).

4.2 Segundo ensayo para observar el desarrollo de los nematodos

Durante el segundo ensayo, tampoco se observaron cambios en las membranas intersegmentales ni pústulas en la superficie del cuerpo de los escorpiones. La mortalidad hasta el día 10 a partir de la infección fue del 90% y en las disecciones de los escorpiones se encontraron nematodos en distintos estadios de desarrollo (Tabla 4). En las disecciones se encontraron hembras de 1^a y 2^a generación, algunas con huevos (Fig. 9A), machos (Fig. 9B) y JIs vivos y/o muertos.

Tabla 4. Estadios de desarrollo de *Steinernema rarum* (OLI) observados en las disecciones de *Tityus carrilloi*.

Días <i>post mortem</i>	Cantidad de disecciones	Estadios de desarrollo observados
1	2	Hembras, machos y juveniles
2	2	Hembras, hembras con huevos y machos
3, 4, 5, 6	7	Juveniles vivos y muertos, una Larva 4 y un macho
8	2	Hembras 1 ^a y 2 ^a generación, un macho
9, 10, 11, 12	5	Hembras muertas, machos muertos y JIs muertos

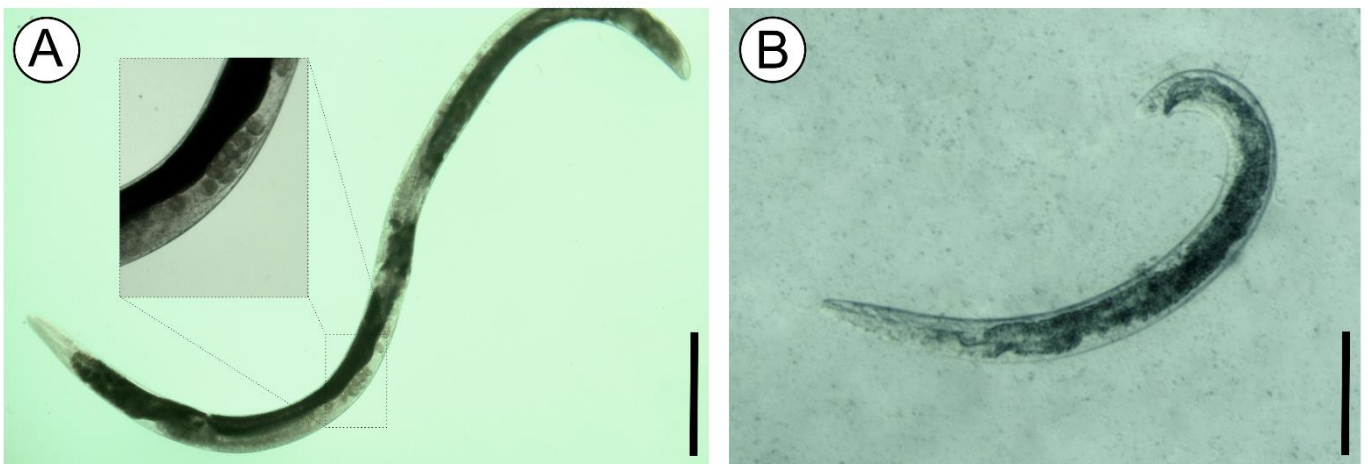


Fig. 9. Adultos de *Steinernema rarum* (OLI) observados en disecciones de *Tityus carrilloi*.

A: Hembra con huevos (detalle en recuadro superior izquierdo). B: Macho. Escala A = 1 mm, B = 0.1 mm

5. DISCUSIÓN

Como se señaló previamente, respecto al parasitismo de escorpiones por nematodos solo existen pocos reportes (Poinar & Stockwell, 1988; Baruš & Koubková, 2002; Gouge & Snyder, 2005). Este trabajo evalúa por primera vez la susceptibilidad en laboratorio de *T. carrilloi* a NEPs autóctonos de la Provincia de Córdoba, siendo una nueva contribución al conocimiento de la biología de ambos invertebrados en Argentina y en Sudamérica. Se destaca el efecto marcado de uno de los aislados evaluados, *S. rarum* (OLI) en dosis baja, en la disminución de la sobrevivencia de los escorpiones, provocando un 80% de mortalidad en un período de 10 días.

Los cambios comportamentales y locomotores observados en los individuos de *T. carrilloi* infectados, como la irritación y elevación del cuerpo respecto al sustrato, pueden ser interpretados como respuesta a la detección de nematodos e intento de evitar el contacto con los mismos (Gouge & Snyder, 2005). A diferencia de lo que se observó con *C. exilicauda* (Gouge & Snyder, 2005), en este estudio no se observaron ni expansión de las membranas intersegmentales, indicativas del aumento corporal, ni pústulas en la superficie del cuerpo, provocadas por expulsión de hemolinfa septicémica en ninguno de los grupos experimentales.

El cambio de coloración de los hospedadores, causado por la bacteria simbiote, no fue observado en los escorpiones muertos por nematodos. Esto podría deberse a que el color que naturalmente presentan estos arácnidos, haya encubierto dicho cambio, tal como ha sido sugerido que ocurre en *P. americana* (Aguirre Varela *et al.*, 2021).

Al comparar la supervivencia de escorpiones bajo los distintos tratamientos se evidenció que las dosis, alta y baja de *S. rarum* (OLI) fueron más efectivas en producir la muerte de individuos que las mismas dosis de *H. bacteriophora* N842 y que el control negativo. Estos resultados corroboran una vez más la mayor virulencia del aislado (OLI) de *S. rarum* (Cagnolo *et al.*, 2004), tal como ha sido demostrado en numerosas pruebas de infectividad contra diferentes especies de invertebrados (Cagnolo & Almirón, 2010; Cagnolo *et al.*, 2011; Ulvedal *et al.*, 2012; Bertolotti *et al.*, 2013; Gianfelici *et al.*, 2014; Cagnolo & Bertolotti, 2016; Aguirre Varela *et al.*, 2021). El comportamiento de búsqueda del hospedador que presenta *S. rarum* (OLI), combinando estrategias de caza y de

emboscada (Cagnolo & Gonzalez, 2017), podrían estar relacionadas con la mayor eficiencia de este aislado.

Aunque la dosis menor de *S. rarum* produjo una mortalidad final mayor que la dosis alta, no se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia, pero la tendencia en el número de días de sobrevivida fue menor con la dosis baja. Futuros estudios deberán realizarse para confirmar estas tendencias aumentando el tamaño muestral. Con la dosis baja de *S. rarum* (OLI) la mortalidad aumentó significativamente desde el tercero al sexto día, pasando de 30% a 80%, es decir, que produjo una acción más rápida, situación que no se observó con la dosis alta de este nematodo, en donde la mortalidad aumentó de 20% a 50%, desde el día 3 al día 6. El mayor efecto en la sobrevivida de los escorpiones con la dosis más baja de *S. rarum* (OLI), fue similar a lo observado en *C. exilicauda* con la especie *Steinernema glaseri*, que provocó una mortalidad de aproximadamente el 80% en 12 días (Gouge & Snyder, 2005).

En relación a *H. bacteriophora* N842, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, con sólo una muerte en el tiempo de exposición examinado, en el trabajo de Gouge & Snyder (2005) se observó una mayor mortalidad con *H. bacteriophora* e incluso con dosis más bajas (200, 400 y 800 JIs). Estas diferencias pueden deberse a variaciones en la susceptibilidad interespecífica que puedan presentar los escorpiones por presiones selectivas diferentes en los ambientes particulares de cada especie, o al grado de infectividad intraespecífica de este nematodo, tal como ha sido señalado en un estudio contra plagas hortícolas (Campos-Herrera *et al.*, 2021). Ensayos futuros deberían examinar la susceptibilidad de *T. carrilloi* a otros aislados de *H. bacteriophora* de la Provincia de Córdoba.

En cuanto al tiempo de exposición, si bien los resultados se tuvieron en cuenta hasta el día 10, la observación de muertes posteriores a este período registradas con la dosis menor de *S. rarum* (OLI) sugieren que los nematodos enfrentaron en esos individuos una mayor resistencia al parasitismo, que podría relacionarse con comportamientos defensivos de los escorpiones, tal como fue observado en *C. exilicauda* (Gouge & Snyder, 2005). Estas observaciones permiten sugerir que estudios futuros consideren períodos de observación más prolongados para abarcar muertes posteriores a 10 días y evaluar de forma precisa la efectividad de cada tratamiento.

Los resultados del segundo ensayo también confirmaron un porcentaje de mortalidad alto, 90%, de *T. carrilloi* inoculado con una dosis baja de *S. rarum* (OLI). Este ensayo, si bien no se orientó a determinar de manera precisa el ciclo de vida de los nematodos, permitió conocer que continuaron con su desarrollo dentro del escorpión. El hallazgo de hembras de 1ª y 2ª generación, con o sin huevos y/o machos en casi la mitad de los individuos disecados en el segundo ensayo y los JIs recolectados en las trampas White del primer ensayo, indican que este aislado de *S. rarum* puede completar el ciclo reproductivo en *T. carrilloi*, tal como se conoce que ocurre en *G. mellonella* y en otros invertebrados (Cagnolo *et al.*, 2004; Bertolotti *et al.*, 2011; Aguirre Varela *et al.*, 2021).

La cantidad de JIs de *S. rarum* (OLI) que se produjeron a partir de *T. carrilloi* fue bastante inferior a la que se ha registrado en *P. americana* (Aguirre Varela *et al.*, 2021) y *Anticarsia gemmatalis* (Gianfelici *et al.*, 2014), aunque similar a la obtenida a partir de *B. octoplagiata* (Cagnolo & Bertolotti, 2016). Sin embargo, se pudo comprobar que lograron infectar a larvas de *G. mellonella* y a otro escorpión, corroborando así la infectividad de estos JIs. Este es un dato importante desde un punto de vista aplicado, ya que permite la planificación de estrategias de control con nematodos, que además de matar, podrían reciclarse dentro del hospedador, y de este modo, infectar a otros escorpiones que estén en las proximidades, sin necesidad de nuevas aplicaciones. Los resultados del presente trabajo constituyen una base para futuros estudios que permitirán conocer de manera precisa las distintas variables bio-ecológicas que pueden afectar la infectividad de los nematodos. Sólo así, será posible determinar el potencial real de los NEPs autóctonos como alternativa al control sanitario químico de *T. carrilloi* en la región.

6. CONCLUSIONES

- *Tityus carrilloi* es susceptible a nematodos entomopatógenos de la especie *Steinernema rarum* (OLI) y sus JIs provocan la muerte de los escorpiones. La dosis baja (3500/1) fue igual de letal que la dosis alta (7000/1), aunque la primera parece tener una acción más rápida que la segunda.
- Los JIs se desarrollan, en el interior de los escorpiones a los que matan, hasta el estado adulto, generando nuevos JIs en condiciones de laboratorio.
- El hallazgo de JIs muertos en la disección del único escorpión muerto con D7000 de *H. bacteriophora* demuestra que el nematodo fue capaz de ingresar y matar a *T.*

carrilloi aunque este dato puntual no es significativo y es necesario hacer más pruebas para determinar el grado de susceptibilidad de *Tityus carrilloi* a este aislado.

- Los resultados logrados alientan a continuar con nuevos estudios que permitan definir el potencial de estos nematodos como agentes de control biológico de esta especie de escorpión.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, B.J. & Nguyen, K.B. 2002. Taxonomy and systematics. En: *Entomopathogenic Nematology*. Gaugler, R. (ed.). CAB International, pp. 1-33.

Aguirre Varela, A.D.A., Bertolotti, M.A., Cagnolo, S.R. 2021. Susceptibilidad de *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) a dos aislados de *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) de la provincia de Córdoba, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 80(1): 40-47. <https://doi.org/10.25085/rsea.800105>

Bertolotti, M.A., Cagnolo, S.R. & Almirón, W.R. 2011. Rango de hospedadores de un aislado de *Steinernema rarum* (Nematoda: Steinernematidae) de Córdoba, Argentina. 2º Congreso Argentino de Fitopatología. Mar del Plata. p. 357.

Bertolotti, M.A., Cagnolo, S.R., Edelstein, J.D. & Oviedo, N.S. 2013. Infectivity of *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae) in larvae of *Diatraea saccharalis* (Insecta: Lepidoptera). *Biocell* 37(3): 121.

Blanco, G., Laskowicz, R.D., Scarlatto, E.E., Casas, N., Costa de Oliveira, V., Lanari, L.C., Lago, N.R. & de Roodt, A.R. 2012. Increased incidence of *Tityus trivittatus* envenoming in the City of Buenos Aires. *Toxicon*, 2(60): 188. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.181>

Blanco, G., Laskowicz, R.D., Lanari, L.C., Scarlato, E.E., Damin, C., de Titto, E.H., de Roodt, A.R., 2016. Distribución de los hallazgos de escorpiones en la Ciudad de Buenos Aires en el período 2001-2012 y sus implicancias sanitarias. *Arch. Argent. Pediatr.*, 114(1): 77-83.

Bücherl, W. 1971. Classification, biology and venom extraction of scorpions. En: *Venomous Animals and their Venoms. Venomous Invertebrates*, vol. III. Bücherl, W., Buckley, E. (Eds.). Academic Press, pp. 317-347.

Cagnolo, S.R. & Almirón, W.R. 2010. Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(1-2): 141-145.

Cagnolo, S.R. & Bertolotti, M.A. 2011. Detection of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae) in Two Departments of Córdoba. *Biocell*, 35(3): 238.

Cagnolo, S.R. & Bertolotti, M.A. 2016. Parasitism by entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in *Botanochara octoplagiata* (Spaeth, 1909) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biocell*, 40 (Supl. 4): Abstract 69.

Cagnolo, S.R. & Gonzalez, J.M. 2017. Comportamiento de localización y elección de hospedadores, del nematodo entomopatógeno *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 4(1): 77-85.

Cagnolo, S.R., Donari, Y.M. & Di Rienzo, J.A. 2004. Existence of infective juveniles in the offspring of first- and second-generation adults of *Steinernema rarum* (OLI strain): evaluation of their virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(1): 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.008>.

Cagnolo, S.R., Peschiutta, M.L. & Bertolotti, M.A. 2011. Susceptibility of adults of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) Mamiya, 1988 (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. *Nematology*, 13(3): 373-376.

Campos-Herrera, R., Vicente-Díez, I., Galeano, M., Chelkha, M., González-Trujillo, M., Puelles, M., Labarga, D., Pou, A., Calvo, J. & Belda, J.E. 2021. Intraspecific virulence of entomopathogenic nematodes against the pests *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) and *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Nematology*, 53(1): 1-14.

Chippaux, J.P., 2012. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des Devel Ther.*, 6: 165-173. doi: 10.2147/DDDT.S24754.

Chippaux, J.P. & Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.*, 107(2): 71-79.

de Roodt, A.R. 2014. Comments on environmental and sanitary aspects of the scorpionism by *Tityus trivittatus* in Buenos Aires City, Argentina. *Toxins*. 6(4): 1434-1452. <https://doi.org/10.3390/toxins6041434>.

de Roodt, A.R. 2015. Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1): 55-71.

Delignette-Muller, M. L., & Dutang, C. 2015. fitdistrplus: An R package for fitting distributions. *Journal of statistical software*, 64(4): 1-34.

Dellatorre, D. 2018. *Mendiolaza: preocupa la gran cantidad de escorpiones venenosos.* https://eldoce.tv/sociedad/mendiolaza-preocupa-la-gran-cantidad-de-escorpiones-venenosos-el-talar-video-luz-ultravioleta_62176

Echeverría, D., 2018. Caracterización e infectividad de un aislado de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) detectado en la Provincia de Córdoba, Argentina. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 35 pp.

Fernández Campón, F. & Lagos Silnik, S. 2009. Primer registro de *Tityus trivittatus* (Scorpiones: Buthidae) en la provincia de Mendoza (Argentina). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 68 (1-2): 219-221.

Fimbres Cubillas, G. & Flores-Lara, Y. 2016. Potencialidad y Retos del Uso de Nematodos Entomopatógenos para el Control Biológico de Plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica NEP-Bacteria. *Invurnus*, 11(1): 27-36.

Fox, J., Friendly, G.G., Graves, S., Heiberger, R., Monette, G., Nilsson, H., Ripley, B., Weisberg, S., Fox, M.J. and Suggests, M.A.S.S., 2007. The car package. R Foundation for Statistical Computing.

Gianfelici, M. de L., Bertolotti, M.A., & Cagnolo, S. R. 2014. Susceptibilidad de larvas de *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) y *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, a tres aislados de nematodos entomopatógenos. *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 1(2): 71-76.

Gouge, D.H. & Snyder, J.L. 2005. Parasitism of bark scorpion *Centruroides exilicauda* (Scorpiones: Buthidae) by entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae). *Journal of Economic Entomology*, 98(5): 1486-1493. <https://doi.org/10.1093/jee/98.5.1486>.

Hazir, S., Kaya, H.K., Stock, S.P. & Keskin, N. 2003. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turkish Journal of Biology*, 27(4): 181-202.

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R. M., Schuetzenmeister, A., Scheibe, S., & Hothorn, M. T. 2016. *Package 'Multcomp', Simultaneous Inference in General Parametric Models.* Project for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Kaplan, E. L., & Meier, P. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282): 457-481.

Kaya, H.K & Stock S.P. 1997. Techniques in Insect Pathology. En: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lacey, L.A. (Ed.). Academic Press. pp. 281-320.

Labaude, S. & Griffin, C. 2018. Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. *Insects*, 9(2): 72, <https://10.3390/insects9020072>.

Lewis, E.E. & Clarke, D.J. 2012. Nematode Parasites and Entomopathogens. En: *Insect Pathology (Second Edition)*. Vega, F.E. & Kaya, H.K (Eds.). Academic Press. pp. 400-402.

Martínez, P., Andrade, M.A. & Bidau, C.J. 2017. Potential effects of climate change on the risk of accidents with poisonous species of the genus *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) in Argentina. *PeerJ Preprints*, 5:e2829v1. <https://10.7287/peerj.preprints.2829v1>.

Ministerio de Salud de la Nación. 2011. Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica del Envenenamiento por Escorpiones. http://www.msal.gov.ar/zoonosis/images/stories/info-equipos-de-salud/pdf/2012-07-11_anim-ponzoniosos-guia-escorpiones.pdf.

Ministerio de Salud de la Nación. 2017. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud. Instituto Nacional de Producción de Biológicos. Escorpionismo en Argentina. <http://www.anlis.gov.ar/wp-content/uploads/2017/01/Triptico-Tityus.pdf>.

Ministerio de Salud de la Nación. 2020. Boletín integrado de vigilancia. https://www.argentina.gov.ar/sites/default/files/biv_481_edicion_ampliada.pdf.

Murúa F., Acosta, L.E., Acosta, J.C. & Coria, C. 2002. Primeros registros de *Tityus trivittatus* Kraepelin (Scorpiones, Buthidae) en el oeste argentino. *Multequina*, 11: 75-78.

Ojanguren-Affilastro, A.A., Kochalka, J., Guerrero-Orellana, D., Garcete-Barrett, B., de Roodt, A.R., Borges, A. & Ceccarelli, F.S. 2021. Redefinition of the identity and phylogenetic position of *Tityus trivittatus* Kraepelin 1898, and description of *Tityus carrilloi* n. sp. (Scorpiones; Buthidae), the most medically important scorpion of southern South America. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales nueva serie*, 23(1): 27-55.

Pérez, N., Infante, C., Rosquete, C., Ramos, A. & González, C. 2010. Disminuyendo la relevancia de los plaguicidas. Alternativas a su uso. *Agroecología*, 5: 79-87.

Poinar, G. O. & Stockwell, S. A. 1988. A new record of a nematode parasite (Mermithidae) of a scorpion. *Rev. Nematol.*, 11(3): 361-364.

R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>.

Redacción Clarín. 2018. Temor en una ciudad de Córdoba: hay una invasión de alacranes venenosos. Clarín Ciudades. https://www.clarin.com/ciudades/temor-ciudad-cordoba-invasion-alacranes-venenosos_0_r1sXVSLoG.html

Rein, J. O. 2017. The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. [Accedida 3.02.2023]. Disponible en <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>

Ripley, B., Venables, B., Bates, D. M., Hornik, K., Gebhardt, A., Firth, D. & Ripley, M. B. 2013. Package 'MASS', CRAN Repository. <http://cran.r-project.org/web/packages/MASS/MASS.pdf> 'mass'.

Sáenz, A. 2005. Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas*. 26 (2): 41-57.

Therneau, T. M., & Lumley, T. 2015. Package 'survival'. *R Top Doc*, 128(10): 28-33.

Ulvedal, C., Cagnolo, S.R., Bertolotti, M.A., Grech, M. & Almirón, W.R. 2012. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* Say al parasitismo por *Heterorhabditis bacteriophora* (aislado 4) y *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Rhabditida), en condiciones de laboratorio. 3er Encuentro Internacional sobre Enfermedades Olvidadas y XV Simposio sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 25-26 de Octubre. pág. 144.

Wickham, H. 2009. *ggplot2. Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag. New York. 213 pp.

Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. IV edición. Pearson Education Singapore Pte. Ltd (Indian Branch). New Delhi, India. 663 pp.