

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y
NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN E INFECTIVIDAD DE UN AISLADO DE
Heterorhabditis bacteriophora (NEMATODA:
HETERORHABDITIDAE) DETECTADO EN LA PROVINCIA DE
CÓRDOBA, ARGENTINA.

Tesinista: Echevarría, Daniela

Directora: Dra. Cagnolo, Susana Raquel

Codirectora: Dra. Bertolotti, María Alejandra

Lugar de realización: Cátedra de Parasitología

RESUMEN

El aislado N842 fue identificado como *Heterorhabditis bacteriophora* en base a caracterización morfométrica y molecular. Los caracteres morfométricos de todos los estadios, ampliaron los rangos conocidos para la especie. La variabilidad de los caracteres morfométricos fue más baja en juveniles infectivos que en adultos. Se realizaron análisis filogenéticos basados en dos marcadores moleculares, ITS y del dominio D2/D3 del gen 28S del DNA ribosómico (DNAr) nuclear. Para el conocimiento de la infectividad de este aislado, se realizaron ensayos contra 4 especies de invertebrados y la mortalidad varió desde 0% en *Deroceras* sp. y *Plagiodontes* sp., a 95,84 y 100% en *Galleria mellonella* y *Botanochara octoplagiata*, respectivamente.

Los resultados obtenidos aportan nuevos datos para el conocimiento de *H. bacteriophora* en Argentina y ponen en evidencia la variabilidad intraespecífica que caracteriza a la especie. Los datos de infectividad del nuevo aislado detectado permiten determinar su aptitud como posible biorregulador de poblaciones de invertebrados dañinos y efectuar comparaciones con otros aislados de la especie ya detectados en Argentina.

Palabras claves: identificación, *Heterorhabditis bacteriophora*, aislado, morfometría, caracterización molecular, parasitismo, Gastropoda, Insecta

INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos son organismos que se encuentran naturalmente en el suelo. Poseen una amplia distribución, ya que se han aislado en todas partes del mundo, en ecosistemas que van desde sub-árticos a áridos y desde templados a tropicales (Hominick, 2002). El género *Heterorhabditis* Poinar, 1976 cuenta con 26 especies (Scott *et al.*, 1994; Stock *et al.*, 1996; Malan *et al.*, 2012; Jagdale, 2013; Yan *et al.*, 2016; Nguyen, 2017; Shahina *et al.*, 2017). Se lo ha encontrado en las regiones Holártica, Australiana y Neotropical (Hominick, 2002). En Argentina, este género fue detectado en diversas regiones fitogeográficas, incluyendo las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa, Mendoza, Río Negro y Neuquén (Stock, 1995; Bertolotti, 2002; Doucet *et al.*, 2006; Giayetto & Cichón, 2006). En Córdoba está presente en departamentos del centro-oeste, este y sur provincial (Doucet *et al.*, 2008; Cagnolo & Bertolotti, 2011). Hasta el momento, sólo una especie de este género, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976, ha sido hallada en el país (Bertolotti *et al.*, 2008; Doucet *et al.*, 2008; Cagnolo *et al.*, 2016).

Los representantes del género *Heterorhabditis* presentan una asociación simbiótica con bacterias entéricas del género *Photorhabdus* (Thomas & Poinar, 1979). El complejo nematodo-bacteria dentro del insecto asegura la muerte de éste en pocas horas (Campos-Herrera *et al.*, 2006). El efecto letal que poseen, junto con el amplio rango de hospedadores que presentan estos nematodos, su fácil reproducción masiva en laboratorio, su inocuidad para el ambiente y su adaptabilidad a nuevos hábitats, hace de estos organismos excelentes agentes para el control biológico de insectos perjudiciales (Poinar, 1990).

El ciclo de vida de *Heterorhabditis* spp. incluye huevo, cuatro estadios juveniles y el estado adulto, representado por hembras hermafroditas, hembras anfimícticas y machos. El tercer estadio juvenil o juvenil infectivo es el único estadio de vida libre y se encuentra en el suelo. Luego de localizar al insecto, ingresa a través de las aberturas naturales (boca, ano, espiráculos) o perforando la cutícula, y se dirige al hemocele donde libera la bacteria simbiote que se reproduce rápidamente, secretando toxinas y enzimas líticas. El insecto muere

por septicemia entre las 24 y 48 horas siguientes (Poinar, 1990; Adams & Nguyen, 2002).

La descripción de las poblaciones en el género *Heterorhabditis*, se basa en caracteres morfométricos como son las medidas elementales (longitudes y anchos) y las medidas derivadas (índices) (Hominick *et al.*, 1997). Existe variabilidad en los caracteres morfométricos, atribuida a la especie en sí misma, a las condiciones en las que el nematodo se desarrolla (temperatura, tamaño del hospedador, número de juveniles que ingresan), a factores fisiológicos y geográficos y a características del ciclo de vida (Doucet *et al.*, 2008; Negrete-García, 2013). Dicha variabilidad morfométrica puede conducir a errores en la identificación de las especies. Por esto, se utilizan técnicas moleculares que aportan información adicional, permitiendo evaluar, además, las relaciones entre las especies (Liu *et al.*, 2000). El secuenciamiento de la región espaciadora interna transcrita (ITS) y del dominio D2/D3 del gen 28S del DNA ribosómico (DNAr) nuclear es la técnica utilizada en la caracterización molecular de los nematodos a nivel de género y especie (Hominick *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 2001; Orozco-Uribe *et al.*, 2008).

La detección de nuevos nematodos y su utilización en el control biológico de plagas, implica conocerlos de manera precisa, lo que involucra su identificación específica y la evaluación de su comportamiento en laboratorio a fin de determinar sus características biológicas, entre ellas, su infectividad, es decir, la capacidad de penetrar y multiplicarse en diferentes hospedadores (Lawrence, 2006).

Muestras llevadas a cabo en la provincia de Córdoba en el año 2011 permitieron detectar un aislado del género *Heterorhabditis*, denominado N842 (Cagnolo & Bertolotti, 2011). En el presente proyecto, se propuso el estudio taxonómico de este aislado y la evaluación de su comportamiento en laboratorio frente a diferentes invertebrados.

Objetivo General

- Caracterizar el aislado N842 de *Heterorhabditis* sp. detectado en el Departamento Ischilín, provincia de Córdoba, y determinar su infectividad en invertebrados perjudiciales.

Objetivos Específicos

- Identificar a nivel específico el aislado N842 perteneciente al género *Heterorhabditis* en base a su morfometría y secuencias de ADN.
- Evaluar la susceptibilidad de *Botanochara octoplagiata*, *Galleria mellonella*, *Deroceras* sp. y *Plagiodontes* sp. al aislado N842 de *Heterorhabditis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Origen del aislado

El aislado N842 de *Heterorhabditis* fue detectado en la Ruta Nacional 60 Km 842, a 6 km de la localidad de Quilino, Departamento Ischilín, Provincia de Córdoba (Cagnolo & Bertolotti, 2011). Para la recolección de la muestra de suelo, se consideró un área de 10 m x 10 m. En dicha superficie, y de los primeros 30 cm, se extrajeron 5 sub-muestras de 100 g cada una, se colocaron juntas en una bolsa y se mezclaron, conformando de este modo una muestra única (Cagnolo, com. pers.). Posteriormente, fue procesada en laboratorio para la detección de nematodos entomopatógenos mediante el método de *trampa de Galleria* (Bedding & Akhurst, 1975).

2. Cría del insecto auxiliar

La detección de los nematodos a partir de la muestra de suelo, la multiplicación en laboratorio para el mantenimiento del aislado, las infecciones para obtener los distintos estadios para la caracterización y las experiencias para evaluar la infectividad, involucran la utilización de larvas de la polilla de la cera, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como hospedador auxiliar. La cría de este lepidóptero se realiza, de manera convencional, en recipientes adecuados provistos de una dieta artificial y a una temperatura de 30 – 32 °C (Cagnolo *et al.*, 2004).

3. Multiplicación, almacenamiento y conservación del aislado

Para la multiplicación de los nematodos, se utilizaron cajas de Petri de 5 cm de diámetro. En el interior de cada caja se colocaron dos discos de papel de filtro. Sobre el disco superior se dispuso una suspensión acuosa de 1 ml con juveniles infectivos del nematodo y luego se agregaron 5 larvas de *G. mellonella*. Las cajas fueron llevadas a estufa a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Transcurridos 6 días desde la fecha de muerte de los insectos, éstos fueron colocados individualmente en trampas White (Kaya & Stock, 1997). Las trampas se dejaron en estufa a 25°C , hasta la emergencia natural de los juveniles infectivos desde los hospedadores. Una vez que los juveniles infectivos migraron al agua, se recogieron con micropipeta y se almacenaron en cajas plásticas. El aislado se mantuvo a una temperatura de 4 a 10°C hasta el momento de su utilización (Molina Acevedo *et al.*, 2006).

4. Caracterización del aislado

4.1. Preparación del inóculo

A fin de obtener los estadios para la caracterización del aislado, las infecciones se realizaron según protocolo estándar (Hominick *et al.*, 1997). Se preparó un inóculo de 200 juveniles infectivos por insecto. Para ello, en primer lugar se extrajo una solución concentrada de nematodos de las cajas de almacenamiento y se agregó agua hervida hasta un volumen final conocido. Luego se extrajo con micropipeta una alícuota de 1 ml y, bajo lupa binocular, se contabilizó el número de nematodos. Esta acción se repitió 5 veces, de manera de obtener un promedio de juveniles infectivos presentes. Finalmente se calculó por regla de tres simple la cantidad de solución necesaria para conformar la dosis.

4.2. Obtención y procesado de los diferentes estadios

Se consideraron los adultos: hembras hermafroditas de 1ª generación, hembras anfimícticas y machos de 2ª generación, y los juveniles infectivos. Los adultos

se recuperaron mediante disecciones periódicas en solución de Ringer de los hospedadores parasitados, y los juveniles infectivos se obtuvieron al final del ciclo parasitario, luego de su emergencia a partir del insecto. Se evaluaron 20 individuos de cada estadio. Los especímenes fueron fijados, deshidratados y transparentados hasta su montaje definitivo. Para esto, en una primera etapa, los nematodos se colocaron en agua a 60 °C. Luego de muertos, se agregó fijador F.A. 4:1 (10 ml de formaldehído 40%, 1 ml de ácido acético glacial y 89 ml de agua destilada), en el que permanecieron durante 12 horas. Posteriormente, fueron transferidos a cápsulas de Siracusa con 0,5 ml de solución I (20 partes de etanol 95%, 1 parte de glicerina y 79 partes de agua destilada). Las cápsulas se colocaron en un recipiente con etanol 95%, a una temperatura de 35 °C durante 12 horas para lograr su deshidratación. Transcurrido ese tiempo, las cápsulas se retiraron del desecador, se eliminó el líquido excedente de cada una y se reemplazó con solución II (5 partes de glicerina y 95 partes de etanol 95%). Luego, se colocaron en cápsula de Petri parcialmente destapada a 40 °C por 3 horas (Hominick *et al.*, 1997). Al cabo de ese tiempo, los nematodos quedaron listos para el montaje en preparaciones permanentes.

4.3. Caracterización morfométrica.

Se consideraron los caracteres morfométricos de adultos de 1^a y 2^a generación y de juveniles infectivos usualmente empleados para nematodos entomopatógenos (Tabla 1) (Hominick *et al.*, 1997). Los caracteres se midieron mediante una escala micrométrica incorporada al ocular de un microscopio óptico Zeiss (modelo Lab. 16), a excepción de la Longitud total que se tomó sobre el plano de dibujo mediante cámara clara.

Tabla 1: Caracteres morfométricos de *Heterorhabditis* N842 considerados según el estadio.

CARÁCTER	CÓDIGO	ESTADIO			
		Hembra hermafrodita	Hembra anfimíctica	Macho	Juvenil infectivo
Longitud total	L	+	+	+	+
Longitud desde el extremo anterior al poro excretor	EP	+	+	+	+
Longitud desde el extremo anterior hasta el anillo nervioso	NR	+	+	+	+
Longitud desde el extremo anterior a la base del esófago	ES	+	+	+	+
Longitud de la cola	T	+	+	+	+
Ancho máximo	W	+	+	+	+
Ancho del cuerpo nivel del ano	TW	+	+	+	+
Ancho del cuerpo a nivel del poro excretor	EPW	+	+	+	-
Ancho cuerpo a nivel del anillo nervioso	NRW	+	+	+	-
Ancho del cuerpo a nivel de la base del esófago	ESW	+	+	+	-
Longitud desde el extremo anterior hasta la vulva	VL	+	+	-	-
Longitud de la espícula	SPL	-	-	+	-
Longitud del gubernáculo	GUBL	-	-	+	-
Longitud de la flexión testicular	TFL	-	-	+	-
Longitud de la flexión testicular hasta el ano	TFTL	-	-	+	-

Medidas se tomaron en micras (μ), a excepción de la longitud total del cuerpo (L) que se expresó en milímetros (mm). (+) Carácter considerado. (-) Carácter no considerado. Los códigos corresponden a las abreviaturas de los caracteres morfométricos en inglés.

Tabla 1: Continuación.

ÍNDICES	CÓDIGO	ESTADIO			
		Hembra hermafrodita	Hembra anfimíctica	Macho	Juvenil infectivo
VL/L	V	+	+	-	-
L/W	A	-	-	-	+
L/ES	B	-	-	-	+
L/T	C	-	-	-	+
EP/ES	D	-	-	-	+
EP/T	E	-	-	-	+

Medidas se tomaron en micras (μ), a excepción de la longitud total del cuerpo (L) que se expresó en milímetros (mm). (+) Carácter considerado. (-) Carácter no considerado.

4.4. Caracterización molecular

La extracción y amplificación de ADN y la caracterización molecular fueron llevadas a cabo por personal de la Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (U.N.C.). Se analizaron las secuencias ribosomales de las regiones ITS (secuencia espaciadora transcrita) y dominio D2/D3 del gen 28S. Después de la extracción de ADN a partir de una sola hembra, siguiendo el protocolo I de Bruford *et al.* (1992), ambos genes se amplificaron usando el set de primers 18S-26S (Vrain *et al.*, 1992) para ITS and D2A-D3B (Spiridonov & Guzeeva, 2009) para 28S.

Para ambos genes, las condiciones de amplificación se ajustaron empíricamente a partir de las descritas por Stock *et al.* (2001); la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l que contenía: 2 μ l de ADN, 2.5 μ l de la reacción buffer 10x (500 mM Tris- HCl pH 9.0), 15 mM de MgCl₂ y 150 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, mM de cada d NTP, 0.5 mM de cada primer y 0.75 U de ADN taq polimerasa.

La reacción comenzó con la desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguido por 32 ciclos de 30 segundos a 49°C (ITS) – 53°C (28S), 60 segundos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en ambas direcciones con los mismos primers de MacroGen Inc. (Corea), las secuencias se enviaron a la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Todas las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente. La alineación se realizó usando la configuración predeterminada en Clustal X 2.0 (Thompson *et al.*, 1997).

Las relaciones filogenéticas entre especies de *Heterorhabditis* se estimaron usando una región de ADNr nuclear (que incluye la subunidad 18S 3'-terminal, ITS-1, ITS-2, y 28S 5'-terminal), y el dominio D2-D3 del segmento del gen 28S del ADNr. Para el análisis filogenético se incluyeron secuencias de 10 especies de *Heterorhabditis* obtenidas del GenBank, usadas como referencia para confirmar la clasificación morfológica del espécimen en estudio.

El método de inferencia Bayesiano (BI) fue usado para ambas regiones utilizando MRBAYES 2.01 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). La secuencia de *Caenorhabditis elegans* (X03680) se incluyó como “outgroup” en todos los análisis. Para determinar el modelo más apropiado de sustitución de nucleótidos para cada conjunto de datos, las secuencias se analizaron con MrModeltest 2.3 (Nylander 2004).

El modelo se seleccionó utilizando el criterio Akaike y las correcciones se emplearon para subsecuentes inferencias bayesianas.

Para el análisis de BI, se realizaron simultáneamente dos corridas en el conjunto de datos, cada una usando una cadena de Markov fría y tres quemadas.

El programa se ejecutó hasta que el promedio de desviación estándar de las frecuencias divididas entre las dos ejecuciones independientes fue menor que 0,01.

Después de descartar 0,25 muestras quemadas y evaluar la convergencia, las muestras restantes se conservaron para un análisis más detallado. Se generó un árbol de consenso del 50%; se mostró usando el programa treeView (win 32) (Trimarchi, com. pers.).

5. Ensayos de infectividad

Se utilizaron juveniles infectivos que no superaron los 30 días de almacenamiento desde la fecha de emergencia del insecto auxiliar, por lo que se realizaron infecciones periódicas, tal como ya se indicó en el punto 3. Los hospedadores *Botanochara octoplagiata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Deroceras* sp. (Stylommatophora: Agriolimacidae) y *Plagiodontes* sp. (Stylommatophora: Odontostomidae), se recolectaron directamente desde su hábitat. En el caso de *G. mellonella*, las larvas se obtuvieron de la cría que se mantiene en el laboratorio de la Cátedra de Parasitología.

5.1. Obtención del inóculo

El inóculo se preparó 24 hs. antes de comenzar con los bioensayos. Se evaluó una dosis de 500 juveniles infectivos por hospedador y, en el caso de *B. octoplagiata* y *G. mellonella*, se consideró además, otra dosis de 50 juveniles infectivos por hospedador (Koppenhöfer & Kaya, 1999). Para obtener dichas dosis, se siguió el mismo procedimiento que se detalló en el punto 4.1.

5.2. Contacto invertebrado – nematodo

Las infecciones se llevaron a cabo, según el tamaño del hospedador, en placas multiwell (x 24 celdas, Falcon N° 3047) o en cápsulas de Petri de 5 cm de diámetro (Kaya & Stock, 1997; Koppenhöfer & Kaya, 1999). Como sustrato se colocaron 0.2 g de suelo (tres partes de arena y una de tierra) esterilizado en horno a 180 °C durante 90 min. Se utilizaron al menos 10 individuos de cada especie y un grupo control. Se realizaron dos repeticiones de cada experiencia. El ensayo se llevó a cabo a 26 °C.

5.3. Determinación del parasitismo y estimación del número medio de juveniles infectivos por hospedador

Se verificó la mortalidad de los insectos cada 24 hs., durante 10 días seguidos. Luego de 6 días desde la fecha de su muerte, los insectos fueron colocados en trampas White. Las trampas se observaron durante 10 días para registrar la

emergencia espontánea de los juveniles infectivos y constatar de este modo, que la mortalidad fue debida a los nematodos.

Para estimar el número de juveniles infectivos producidos por hospedador, la solución concentrada de nematodos emergidos de cada uno, fue colocada en una probeta y homogeneizada con una varilla de vidrio. Luego se extrajo con micropipeta una alícuota de 0,5 ml, se colocó en una cámara de recuento y se registró bajo lupa el número de nematodos. Dicha acción se repitió 5 veces y se obtuvo un promedio de los juveniles infectivos presentes. Luego, mediante regla de tres simple se calculó la producción de progenie por individuo contenida en el volumen de la solución inicial.

Transcurridos 10 días en trampa White, aquellos hospedadores en los que no se observó emergencia, fueron diseccionados a fin de registrar la presencia o ausencia de nematodos en su interior. Luego, se calcularon y compararon los porcentajes de parasitismo (muerte debida a los nematodos) para cada especie de hospedador.

6. Análisis estadístico

Para los caracteres morfométricos se calcularon los siguientes parámetros: rango, media y desviación standard. La variabilidad de cada carácter se estimó mediante el coeficiente de variación y se definieron 3 grados: variabilidad baja: $CV < 10$; media: $10 \geq CV < 20$; alta: $CV \geq 20$. Los porcentajes de parasitismo y la producción de juveniles infectivos a partir de cada hospedador fueron analizados mediante Análisis de varianza (ANOVA). Cuando los datos no siguieron una distribución normal, se utilizó la transformación logaritmo natural previo al análisis estadístico. En todos los casos, se empleó el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

RESULTADOS

Caracterización morfométrica y molecular.

El análisis de los caracteres morfométricos indican que el aislado N842 pertenece a la especie *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976.

En cuanto al rango, los caracteres morfométricos que ampliaron su límite, inferior y/o superior respecto de los conocidos, se encuentran indicados en las Tablas 2, 3, 4 y 5.

Tabla 2: Estudio comparativo de caracteres morfométricos (CM) en hembras hermafroditas de *Heterorhabditis bacteriophora* N842 con otros aislados de la especie presentes en Argentina.

CM	N842 (n=20)	RIV (n = 20)	OLI (n = 20)	CVA (n = 15)	CVB (n = 15)
L	3,3±0,3 (2,8-3,7) 8,2	5.01 ± 0.41 (4.2 - 5.6) 8,18	4.86 ± 0.55 (3.9 - 5.8) 11,43	5.54 ± 0.48 (4.35 - 6.2) 8,68	4.96 ± 1 (3.15 - 6.49) 20,18
EP	212,3±6,9 (192-218,9) 3,2	190 ± 13.67 (163 - 225) 6,7	194.38 ± 15.54 (175 - 225) 7,99	207.24 ± 22.2 (153.27 - 231.87) 10,71	211.33 ± 19.93 (165 - 242.5) 9,43
NR	128,1±10,8 (102,8-148,2) 8,4	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	77.95 ± 7.72 (67.5 - 92.5) 9,91	146.15 ± 13.38 (125.76 - 168.99) 9,16	140.67 ± 7.53 (125 - 150) 5,35
ES	192,2±7,9 (174,8-207,1) 4,1	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	183.75 ± 14.06 (162.5 - 207.5) 7,65	205.67 ± 16.78 (176.85 - 227.94) 8,16	191.83 ± 12.8 (170 - 210) 6,67
T	62,9±6,3 (55,1-79,8) 10,1	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	81 ± 7.09 (70 - 95) 8,75	81.06 ± 6.11 (70.74 - 90.39) 7,54	70 ± 7.2 (52.5 - 82.5) 10,28
W	197,3±16,3 (172,9-239,4) 8,2	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	215.75 ± 27.64 (177.5 - 255) 12,81	272.22 ± 36.06 (231.87 - 334.05) 13,25	213.83 ± 41.51 (145 - 280) 19,41
TW	42,3±4,9 (38-49,4) 11,5	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	51.13 ± 5.82 (42.5 - 62.5) 11,38	48.47 ± 6.24 (35.37 - 58.95) 12,88	50.83 ± 6.1 (40 - 60) 12
EPW	119,2±12,5 (95-144,5) 10,5	-	-	139.91 ± 15.98 (113.97 - 172.92) 11,42	127.83 ± 18.29 (100 - 160) 14,31
NRW	85,7±9,8 *(64,6-106,4) 11,4	-	-	107.34 ± 15.32 (85.23 - 133.62) 14,27	100.83 ± 17.85 (75 - 127.5) 17,7
ESW	107±10,2 *(81,7-125,4) 9,5	-	-	132.31 ± 20.02 (102.18 - 168.99) 15,13	119.83 ± 22.63 (87.5 - 150) 18,88
V= LV/L	0,4±0,0 (0,34-0,49) 7,8	40 ± 2.93 (35 - 45) 3,85	41.83 ± 2.01 (36.1 - 45.09) 4,81	43.54 ± 2.63 (38.26 - 47.16) 6,04	43.86 ± 1.25 (42.59 - 46.87) 2,84

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Tabla 2: Continuación.

CM	INTA 11-12 (n = 20)	INTA A-V (n = 20)	ROCA (n = 20)	NEUQUEN (n = 20)	BIODIVER (n = 20)	RNA (n = 15)
L	3.28 ± 0.61 (2.5 - 4.2) 18.5	3.38 ± 0.71 (2.4 - 4.75) 20.92	4.15 ± 0.34 (3.25 - 4.62) 8.2	3.68 ± 0.68 (1.87 - 4.65) 18.57	3.56 ± 0.59 (2.7 - 4.72) 16.63	2.74 ± 0.21 (2.4 - 3.1) 7.62
EP	187.63 ± 23.67 (142.5 - 215) 12.61	170.85 ± 24.12 (115 - 210) 14.12	191.85 ± 16.17 (150 - 210) 8.43	184.55 ± 22.35 (142.5 - 215) 12.11	175.85 ± 27.85 (115 - 215) 15.83	157.33 ± 14.19 (142.5 - 187.5) 9.02
NR	139.88 ± 30.53 (107.5 - 205) 21.82	127.25 ± 18.3 (107.5 - 165) 14.38	135.13 ± 17.65 (107.5 - 167.5) 13.06	136.5 ± 29.03 (102.5 - 205) 21.27	134.13 ± 22.87 (110 - 175) 17.05	123.33 ± 8.8 (107.5 - 145) 7.13
ES	197.75 ± 27.87 (100 - 220) 14.1	190.75 ± 17.99 (160 - 220) 9.43	202.88 ± 12.04 (180 - 220) 5.93	198.63 ± 16.67 (160 - 220) 8.39	193.13 ± 15.51 (167.5 - 220) 8.03	168 ± 7.57 (155 - 1825.5) 4.51
T	69.13 ± 18.2 (45 - 112.5) 26.32	74 ± 17.8 (45 - 112.5) 24.05	65.25 ± 16.18 (40 - 87.5) 24.8	75.88 ± 14.33 (45 - 87.5) 18.89	68 ± 12.37 (55 - 87.5) 18.19	59.5 ± 5.99 (47.5 - 67.5) 10.07
W	186 ± 29.09 (145 - 220) 15.64	182.5 ± 34.25 (145 - 235) 18.77	197.65 ± 33.02 (145 - 238) 16.71	194.53 ± 33.14 (145 - 240) 17.03	192.15 ± 31.93 (145 - 240) 16.62	166.67 ± 4.26 (145 - 187.5) 8.55
TW	42.15 ± 7.28 (30 - 52.5) 17.27	40.38 ± 6.45 (30 - 55) 15.98	40.38 ± 7.18 (30 - 55) 17.77	40.24 ± 6.97 (30 - 55) 17.32	41 ± 5.82 (35 - 55) 14.18	28.5 ± 4.1 (22.5 - 37.5) 14.38
EPW	95.88 ± 15.09 (80 - 125) 15.74	98.5 ± 21.37 (80 - 142.5) 21.7	125.5 ± 27.83 (80 - 160) 22.18	102.13 ± 23.61 (80 - 142.5) 23.12	103.75 ± 25.57 (80 - 142.5) 24.64	95.67 ± 10.28 (77.5 - 115) 10.75
NRW	86.5 ± 11.96 (70 - 110) 13.83	84.63 ± 15.18 (70 - 122.5) 17.94	93.38 ± 13.09 (75 - 122.5) 14.01	85.63 ± 14.93 (70 - 122.5) 17.44	88.88 ± 18.38 (72.5 - 122.5) 20.68	83 ± 7.51 (70 - 95) 9.05
ESW	102.75 ± 22.8 (55 - 145) 22.19	111.25 ± 23.93 (85 - 162.5) 21.51	124.88 ± 25.35 (92.5 - 162.5) 20.3	116.13 ± 22.89 (85 - 162.5) 19.71	112.5 ± 22.4 (90 - 147.5) 19.92	100.83 ± 7.18 (90 - 115) 7.12
V=VL/L	45.48 ± 2.93 (40 - 50) 6.44	44.94 ± 3.05 (40 - 50) 6.78	43.97 ± 3.17 (37.5 - 49) 7.2	43.95 ± 2.42 (40 - 47.5) 5.5	45.29 ± 2.41 (42.5 - 49) 5.33	47.79 ± 2.34 (41.93 - 50.9) 4.89

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Tabla 3: Estudio comparativo de caracteres morfométricos (CM) en hembras anfidicticas de *Heterorhabditis bacteriophora* N842 con otros aislados de la especie presentes en Argentina.

CM	N842 (n=20)	RIV (n = 20)	OLI (n = 20)	CVA (n = 15)	CVB (n = 15)
L	3,3±0,3 (2,8-3,7) 8,2	5.01 ± 0.41 (4.2 - 5.6) 8,18	4.86 ± 0.55 (3.9 - 5.8) 11,43	5.54 ± 0.48 (4.35 - 6.2) 8,68	4.96 ± 1 (3.15 - 6.49) 20,18
EP	212,3±6,9 (192-218,9) 3,2	190 ± 13.67 (163 - 225) 6,7	194.38 ± 15.54 (175 - 225) 7,99	207.24 ± 22.2 (153.27 - 231.87) 10,71	211.33 ± 19.93 (165 - 242.5) 9,43
NR	128,1±10,8 (102,6-148,2) 8,4	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	77.95 ± 7.72 (67.5 - 92.5) 9,91	146.15 ± 13.38 (125.76 - 168.99) 9,16	140.67 ± 7.53 (125 - 150) 5,35
ES	192,2±7,9 (174,8-207,1) 4,1	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	183.75 ± 14.06 (162.5 - 207.5) 7,65	205.67 ± 16.78 (176.85 - 227.94) 8,16	191.83 ± 12.8 (170 - 210) 6,67
T	62,9±6,3 (55,1-79,8) 10,1	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	81 ± 7.09 (70 - 95) 8,75	81.06 ± 6.11 (70.74 - 90.39) 7,54	70 ± 7.2 (52.5 - 82.5) 10,28
W	197,3±16,3 (172,9-239,4) 8,2	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	215.75 ± 27.64 (177.5 - 255) 12,81	272.22 ± 36.06 (231.87 - 334.05) 13,25	213.83 ± 41.51 (145 - 280) 19,41
TW	42,3±4,9 (38-49,4) 11,5	139 ± 8.37 (125 - 152) 5,35	51.13 ± 5.82 (42.5 - 62.5) 11,38	48.47 ± 6.24 (35.37 - 58.95) 12,88	50.83 ± 6.1 (40 - 60) 12
EPW	119,2±12,5 (95-144,5) 10,5	-	-	139.91 ± 15.98 (113.97 - 172.92) 11,42	127.83 ± 18.29 (100 - 160) 14,31
NRW	85,7±9,8 *(64,6-106,4) 11,4	-	-	107.34 ± 15.32 (85.23 - 133.62) 14,27	100.83 ± 17.85 (75 - 127.5) 17,7
ESW	107±10,2 *(81,7-125,4) 9,5	-	-	132.31 ± 20.02 (102.18 - 168.99) 15,13	119.83 ± 22.63 (87.5 - 150) 18,88
V= LV/L	0,4±0,0 (0,34-0,49) 7,8	40 ± 2.93 (35 - 45) 3,85	41.83 ± 2.01 (36.1 - 45.09) 4,81	43.54 ± 2.63 (38.26 - 47.16) 6,04	43.86 ± 1.25 (42.59 - 46.87) 2,84

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Tabla 3: Continuación.

CM	INTA 11-12 (n = 20)	INTA A-V (n = 20)	ROCA (n = 20)	NEUQUEN (n = 20)	BIODIVER (n = 20)	RNA (n = 15)
L	3.28 ± 0.61 (2.5 - 4.2) 18.5	3.38 ± 0.71 (2.4 - 4.75) 20.92	4.15 ± 0.34 (3.25 - 4.62) 8.2	3.68 ± 0.68 (1.87 - 4.65) 18.57	3.56 ± 0.59 (2.7 - 4.72) 16.63	2.74 ± 0.21 (2.4 - 3.1) 7.62
EP	187.63 ± 23.67 (142.5 - 215) 12.61	170.85 ± 24.12 (115 - 210) 14.12	191.85 ± 16.17 (150 - 210) 8.43	184.55 ± 22.35 (142.5 - 215) 12.11	175.85 ± 27.85 (115 - 215) 15.83	157.33 ± 14.19 (142.5 - 187.5) 9.02
NR	139.88 ± 30.53 (107.5 - 205) 21.82	127.25 ± 18.3 (107.5 - 165) 14.38	135.13 ± 17.65 (107.5 - 167.5) 13.06	136.5 ± 29.03 (102.5 - 205) 21.27	134.13 ± 22.87 (110 - 175) 17.05	123.33 ± 8.8 (107.5 - 145) 7.13
ES	197.75 ± 27.87 (100 - 220) 14.1	190.75 ± 17.99 (160 - 220) 9.43	202.88 ± 12.04 (180 - 220) 5.93	198.63 ± 16.67 (160 - 220) 8.39	193.13 ± 15.51 (167.5 - 220) 8.03	168 ± 7.57 (155 - 182.5) 4.51
T	69.13 ± 18.2 (45 - 112.5) 26.32	74 ± 17.8 (45 - 112.5) 24.05	65.25 ± 16.18 (40 - 87.5) 24.8	75.88 ± 14.33 (45 - 87.5) 18.89	68 ± 12.37 (55 - 87.5) 18.19	59.5 ± 5.99 (47.5 - 67.5) 10.07
W	186 ± 29.09 (145 - 220) 15.64	182.5 ± 34.25 (145 - 235) 18.77	197.65 ± 33.02 (145 - 238) 16.71	194.53 ± 33.14 (145 - 240) 17.03	192.15 ± 31.93 (145 - 240) 16.62	166.67 ± 4.26 (145 - 187.5) 8.55
TW	42.15 ± 7.28 (30 - 52.5) 17.27	40.38 ± 6.45 (30 - 55) 15.98	40.38 ± 7.18 (30 - 55) 17.77	40.24 ± 6.97 (30 - 55) 17.32	41 ± 5.82 (35 - 55) 14.18	28.5 ± 4.1 (22.5 - 37.5) 14.38
EPW	95.88 ± 15.09 (80 - 125) 15.74	98.5 ± 21.37 (80 - 142.5) 21.7	125.5 ± 27.83 (80 - 160) 22.18	102.13 ± 23.61 (80 - 142.5) 23.12	103.75 ± 25.57 (80 - 142.5) 24.64	95.67 ± 10.28 (77.5 - 115) 10.75
NRW	86.5 ± 11.96 (70 - 110) 13.83	84.63 ± 15.18 (70 - 122.5) 17.94	93.38 ± 13.09 (75 - 122.5) 14.01	85.63 ± 14.93 (70 - 122.5) 17.44	88.88 ± 18.38 (72.5 - 122.5) 20.68	83 ± 7.51 (70 - 95) 9.05
ESW	102.75 ± 22.8 (55 - 145) 22.19	111.25 ± 23.93 (85 - 162.5) 21.51	124.88 ± 25.35 (92.5 - 162.5) 20.3	116.13 ± 22.89 (85 - 162.5) 19.71	112.5 ± 22.4 (90 - 147.5) 19.92	100.83 ± 7.18 (90 - 115) 7.12
V=VL/L	45.48 ± 2.93 (40 - 50) 6.44	44.94 ± 3.05 (40 - 50) 6.78	43.97 ± 3.17 (37.5 - 49) 7.2	43.95 ± 2.42 (40 - 47.5) 5.5	45.29 ± 2.41 (42.5 - 49) 5.33	47.79 ± 2.34 (41.93 - 50.9) 4.89

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Tabla 4: Estudio comparativo de caracteres morfométricos (CM) en machos de *Heterorhabditis bacteriophora* N842 con otros aislados de la especie presentes en Argentina.

CM	N 842 (n=20)	RIV (n = 20)	OLI (n = 20)	CVA (n = 15)	CVB (n = 15)
L	952,1±56,5 (839,8-1041,2) 5,9	129 ± 6,07 (113 - 140) 6,61	0,91 ± 0,06 (0,8 - 1,05) 6,49	1,04 ± 0,07 (0,93 - 1,15) 6,31	1,02 ± 0,06 (0,89 - 1,14) 5,54
EP	123,3±6,5 *(102,6-136,1) 5,3	129 ± 6,07 (113 - 140) 3,61	125,5 ± 7,81 (112,5 - 140) 6,22	137,2 ± 9 (122 - 155) 6,56	132,67 ± 8,37 (121 - 150) 6,31
NR	79,8±5,9 (68,4-93,6)* 7,4	77 ± 3,47 (70 - 85) 4,44	51,9 ± 4,45 (45 - 62) 8,57	85,93 ± 3,37 (80 - 92) 3,92	76,6 ± 3,11 (73 - 83) 4,06
ES	104±5,4 (92,3-114,2)* 5,2	102 ± 3,44 (95 - 110) 3,26	101,43 ± 4,76 (92,5 - 108) 4,7	104,13 ± 2,61 (100 - 110) 2,51	100,6 ± 3,33 (95 - 107) 3,31
T	26±2,2 (22,8-29,2) 8,3	24 ± 1,76 (20 - 27) 6,42	28,9 ± 2,27 (24 - 33) 7,85	29,2 ± 2,57 (21 - 32) 8,8	25,8 ± 2,48 (21 - 30) 9,63
W	49,1±6 (43,7-63,2) 12,3	129 ± 6,07 (113 - 140) 6,07	48,05 ± 3,86 (40 - 57) 8,03	49,87 ± 5,73 (40 - 58) 11,49	50,2 ± 5,17 (39 - 57) 10,3
TW	23,2±3,9 (17-31,6)* 16,8	22 ± 1,27 (20 - 25) 5,95	19,93 ± 1,03 (18 - 22) 5,13	19,53 ± 1,36 (16 - 22) 6,94	17,93 ± 1,33 (16 - 20) 7,44
EPW	36,4±7,1 (24,3-51)* 19,6	36,15 ± 2,16 (31 - 39) 5,97	-	41,93 ± 4,53 (34 - 48) 10,8	38,53 ± 4,37 (30 - 48) 11,35
NRW	30,5±3 (26,7-38,9)* 9,9	28,35 ± 1,57 (24 - 30) 5,52	-	29,93 ± 1,49 (28 - 33) 4,97	28,6 ± 2,16 (24 - 32) 7,57
ESW	35,8±3,4 (31,6-43,7)* 9,4	30,7 ± 1,49 (27 - 33) 5,85	-	34,8 ± 3,12 (30 - 41) 8,97	33,4 ± 2,85 (28 - 39) 8,53
SPL	47,8±1,9 (45-53,5)* 3,9	43 ± 2,02 (39 - 47) 5,54	46,8 ± 2,86 (40 - 51) 6,11	47 ± 2,45 (40 - 50) 5,21	45,27 ± 2,66 (39 - 49) 5,87
GUBL	23,9±2 (19,4-26,7) 8,4	21 ± 1,53 (18 - 24) 6,57	22,9 ± 2,22 (19 - 27) 9,7	23,53 ± 2,23 (19 - 27) 9,48	21,8 ± 1,97 (19 - 25) 9,04
TFL	93,3±10,7 (65,6-106,9) 11,5	89 ± 11,5 (75 - 115) 9,48	96,2 ± 31,65 (54 - 210) 32,9	113,2 ± 13,74 (98 - 149) 12,14	76,4 ± 18,7 (53 - 108) 24,48
TFTL	694,4±50,8 (604,2-805,6) 7,3	0,62 ± 0,05 (0,52 - 0,7) 7,5	0,68 ± 0,05 (0,56 - 0,79) 7,62	0,79 ± 0,05 (0,69 - 0,88) 6,77	0,64 ± 0,06 (0,55 - 0,77) 9,74

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Tabla 4: Continuación.

CM	INTA 11-12 (n = 20)	INTA A-V (n = 20)	ROCA (n = 20)	NEUQUEN (n = 20)	BIODIVER (n = 20)	RNA (n = 15)
L	2,08 ± 0,12 (1,8 - 2,2) 5,65	2 ± 0,25 (1,6 - 2,4) 12,32	2,01 ± 0,39 (1,5 - 2,5) 19,41	1,92 ± 0,24 (1,5 - 2,4) 12,36	1,93 ± 0,16 (1,7 - 2,2) 8,53	1.84 ± 0.14 (1.66 - 2.15) 7.45
EP	131,6 ± 9,02 (115 - 150) 6,86	129,08 ± 7,56 (117,5 - 150) 5,85	116,38 ± 21,31 (75 - 130) 18,31	130,65 ± 6,95 (120 - 150) 5,32	134,1 ± 7,64 (120 - 150) 5,69	130.83 ± 9.24 (117.5 - 150) 7.06
NR	95,63 ± 6,63 (85 - 112,5) 6,94	98,83 ± 10,45 (83 - 125) 10,57	95,38 ± 19,66 (62,5 - 125) 20,61	98,75 ± 10,09 (87,5 - 125) 10,22	94,85 ± 6,29 (85 - 105) 6,64	95.83 ± 6.45 (82.5 - 107.5) 6.74
ES	140,75 ± 7,12 (130 - 150) 5,06	141,63 ± 13,75 (120 - 175) 9,71	138,5 ± 23,6 (100 - 175) 17,04	142,13 ± 12,7 (130 - 175) 8,94	137,85 ± 7,28 (125 - 150) 5,28	136.33 ± 6.81 (125 - 150) 4.99
T	82,13 ± 7,1 (70 - 92,5) 8,64	78,65 ± 13,58 (58 - 97,5) 17,27	82,25 ± 15,87 (45 - 97,5) 19,3	74,53 ± 13,77 (58 - 97,5) 18,48	63,1 ± 3,89 (58 - 70) 6,17	68.67 ± 4.71 (62.5 - 77.5) 6.86
W	117,8 ± 8,68 (104 - 135) 7,37	116,28 ± 10,1 (98 - 130) 8,69	128,63 ± 22,16 (100 - 165) 17,23	122,98 ± 18,25 (104 - 165) 14,84	114,1 ± 13,78 (95 - 140) 12,08	111.5 ± 9.34 (95 - 127.5) 8.38
TW	31,2 ± 3,23 (27,5 - 37,5) 10,35	31,95 ± 6,36 (22,5 - 47,5) 19,89	36,75 ± 4,74 (30 - 47,5) 12,89	31,98 ± 5,1 (22,5 - 37,5) 15,93	29,5 ± 3,2 (25 - 35) 10,86	26.33 ± 2.29 (22.5 - 30) 8.69
EPW	76,73 ± 6,63 (65 - 90) 8,29	77,15 ± 13,42 (60 - 100) 17,27	82 ± 18,08 (57,5 - 100) 22,04	76,33 ± 12,83 (59 - 100) 16,81	64,53 ± 4,83 (57 - 75) 7,49	66.17 ± 5.33 (55 - 75) 8.06
NRW	67 ± 4,97 (55 - 75) 7,42	66,75 ± 11,46 (50 - 85) 17,16	70 ± 13,81 (52,5 - 85) 19,73	66,48 ± 10,74 (50 - 85) 16,15	60,98 ± 2,08 (58 - 65) 3,41	55 ± 3.78 (50 - 62.5) 6.87
ESW	78,5 ± 6,15 (70 - 88) 7,84	78 ± 14,32 (60 - 100) 18,36	84 ± 18,47 (60 - 100) 21,99	76,6 ± 13,71 (60 - 100) 17,9	66,13 ± 3,24 (60 - 70) 4,89	69 ± 4.98 (60 - 77.5) 7.22
V= LV/L	46,18 ± 1,09 (44 - 48) 2,36	45,72 ± 2,14 (40 - 48) 4,67	46,05 ± 1,17 (45 - 48) 2,54	45,95 ± 2,24 (40 - 50) 4,88	45,53 ± 3,24 (40 - 50) 7,11	46.35 ± 1.44 (42.8 - 48.9) 3.1

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Tabla5: Estudio comparativo de caracteres morfométricos (CM) en juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* N842 con otros aislados de la especie presentes en Argentina.

CM	N842 (n=20)	RIV (n = 20)	OLI (n = 20)	CVA (n = 15)	CVB (n = 15)
L	615,3±28,6 (551,2-647,9) 4,6	606,1 ± 24 (559 - 645) 4	540 ± 32.4 (490 - 610) 6	652 ± 53.2 (520 - 740) 8,2	660,7 ± 27.4 (590 - 710) 4,1
EP	107,3±4,5 (100-115) 4,2	100 ± 4.2 (93 - 108) 4,2	93,9 ± 3 (87 - 101) 3,2	104,3 ± 6.3 (98 - 118) 6,1	105 ± 3.2 (101 - 112) 3
NR	102,8±4 (95-107,5)* 5,8	83,3 ± 2,8 (80 - 88) 3,4	77,4 ± 2.6 (73 - 84) 3,4	90,7 ± 5,8 (83 - 100) 6,4	87,7 ± 5,4 (77 - 95) 6,2
ES	127,4±5,3 (119-137) 4,1	120,5 ± 5,6 (108 - 130) 4,7	112,05 ± 4,7 (103 - 119) 4,2	124,9 ± 9,04 (115 - 148) 7,2	120,3 ± 3 (115 - 125) 2,5
T	102±2,4 (96-107) 2,4	94,7 ± 4,9 (82 - 105) 5,2	89,6 ± 10,2 (72 - 105) 11,4	85,2 ± 17,6 (56 - 106) 20,7	89,3 ± 6,4 (80 - 100) 7,2
W	24,7±1 (23-27) 4	26,3 ± 1,6 (24 - 29) 6,2	23 ± 1,03 (22 - 25) 4,5	24,1 ± 3,1 (17 - 28) 12,9	24,7 ± 1,2 (23 - 27) 4,8
TW	16,7±0,8 (15,5-18) 4,7	15,9 ± 0,8 (15 - 17) 4,8	14,9 ± 1,8 (11 - 17) 12,1	14,7 ± 3,2 (9 - 18) 21,7	15,8 ± 0,7 (15 - 17) 4,3
A	24,9±1,4 (20,8-27) 5,4	23,1 ± 1,4 (20,5 - 25,2) 5,9	23,4 ± 1 (20,4 - 25) 4,3	27,3 ± 2 (23,6 - 30,6) 7,3	26,8 ± 1,7 (23,6 - 29,6) 6,4
B	4,8±0,2 (4,3-5,1) 4,4	5 ± 0,3 (4,3 - 5,8) 6	4,8 ± 0,2 (4,3 - 5,2) 5,1	5,2 ± 0,3 (4,5 - 5,7) 6,5	5,5 ± 0,2 (5,1 - 5,9) 3,6
C	6±0,2 (5,6±6,4) 4,2	6,4 ± 0,3 (5,9 - 7) 4,1	6,1 ± 0,8 (4,9 - 7,6) 13	7,9 ± 1,3 (6,6 - 10,3) 16,3	7,4 ± 0,5 (6,9 - 8,3) 6,4
D%	80±0 (78-94) 4,9	83,1 ± 3,9 (75,4 - 91,8) 4,7	83,9 ± 1,7 (81,7 - 88,5) 2	83,7 ± 4,5 (71,4 - 89,2) 5,4	87,3 ± 3 (83,1 - 91,6) 2,5
E%	110±0 (100-110) 4,0	105,8 ± 5,8 (95,2 - 117,4) 5,5	106,3 ± 13,6 (87 - 134,7) 12,8	128 ± 30,1 (94,3 - 184,7) 23,5	118,1 ± 8,1 (106,3 - 133,7) 6,8

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Tabla5: Continuación

CM	INTA 11-12 (n = 20)	INTA A-V (n = 20)	ROCA (n = 20)	NEUQUEN (n = 20)	BIODIVER (n = 20)	RNA (n = 15)
L	603 ± 30,45 (540 - 640) 5,05	596,5 ± 25,19 (570 - 650) 4,22	629,5 ± 37,2 (560 - 700) 5,91	613,5 ± 34,07 (560 - 720) 5,55	59,5 ± 13,95 (580 - 620) 2,34	603.33 ± 17.59 (580 - 640) 2.92
EP	95,5 ± 3,37 (90 - 102) 3,53	111,5 ± 2,86 (105 - 115) 2,56	100 ± 6,28 (90 - 105) 6,28	100,88 ± 10,83 (90 - 120,5) 10,74	97,35 ± 6,98 (90 - 110) 7,17	97.73 ± 5.22 (90 - 112) 5.34
NR	86,48 ± 2,76 (82 - 90) 3,19	104,25 ± 3,05 (97,5 - 107,5) 2,92	85,63 ± 1,73 (82,5 - 87) 2,02	91,5 ± 5,58 (85 - 100) 6,1	82,5 ± 1,99 (80 - 85) 2,41	80.4 ± 3.7 (73 - 85) 4.6
ES	120,38 ± 4,61 (112,5 - 127,5) 3,83	135,75 ± 2,82 (130 - 140) 2,08	117,38 ± 3,58 (110 - 122,5) 3,05	122,5 ± 9,46 (110 - 132,5) 7,72	115,63 ± 3,76 (108 - 120) 3,25	116.13 ± 4.31 (108 - 121) 3.71
T	9,13 ± 2,22 (87,5 - 95) 2,46	95,75 ± 3,25 90 - 100) 3,4	91,38 ± 3,19 (85 - 95) 3,49	91,25 ± 6,56 (77,5 - 100) 7,19	99,38 ± 6,47 (90 - 112) 6,52	100.8 ± 6.58 (90 - 113) 6.53
W	22,5 ± 2,29 (20 - 25) 10,2	26 ± 1,7 22,5 - 27,5) 6,54	25,63 ± 2,42 (22,5 - 32,5) 9,43	24,5 ± 1,54 (22,5 - 27,5) 6,28	23,4 ± 1,27 (22 - 26) 5,44	23.2 ± 0.86 (22 - 25) 3.72
TW	16 ± 2,35 (12,5 - 20) 14,69	17,5 ± 1,62 (15 - 20) 9,27	17 ± 1,74 (15 - 20) 10,23	16,63 ± 1,22 (15 - 17,5) 7,36	16,03 ± 1,44 (13 - 17,5) 8,97	15.6 ± 1.18 (14 - 17) 7.58
A	26.93 ± 2.95 (22.8 - 32) 10.94	23.03 ± 1.66 (20.73 - 26.67) 7.2	24.77 ± 2.76 (19.08 - 31.11) 11.12	25.11 ± 1.67 (21.09 - 28) 6.63	25.51 ± 1.38 (23.2 - 28.18) 5.43	26.03 ± 1.11 (24.4 - 27.82) 4.28
B	6.32 ± 0.37 (5.4 - 6.91) 5.9	5.35 ± 0.27 (4.96 - 5.91) 5.08	6.32 ± 0.55 (5.33 - 7.22) 8.75	6.13 ± 0.56 (5.33 - 7) 9.18	6.14 ± 0.42 (5.27 - 6.89) 6.86	5.19 ± 0.16 (4.95 - 5.46) 3.13
C	5.9 ± 0.39 (5.25 - 6.5) 6.58	5.82 ± 0.35 (5.25 - 6.3) 6.07	5.85 ± 0.41 (5.25 - 6.55) 7.03	5.88 ± 0.33 (5.25 - 6.3) 5.69	5.79 ± 0.32 (5.25 - 6.2) 5.47	6 ± 0.42 (5.22 - 6.66) 7.01
D%	79 ± 3.26 (72 - 84) 4.13	82.16 ± 2.48 (76.36 - 86.54) 3.01	85.28 ± 6.01 (75 - 95.45) 7.05	82.53 ± 8.02 (67.92-93.75) 9.71	84.23 ± 5.89 (76.6 - 97.78) 6.99	83.8 ± 3.57 (80 - 94) 4.26
E%	100.5 ± 13.76 (80 - 120) 13.69	102.25 ± 14.82 (80 - 120) 14.5	99.25 ± 13.31 (80 - 120) 13.41	100.75 ± 14.98 (80 - 120) 14.87	102.55 ± 13.74 (80 - 120) 13.4	97 ± 8.35 (83 - 110) 8.61

(-) Sin datos.

(*) Nuevos límites: * a la izquierda: se amplía límite inferior; * a la derecha se amplía límite superior.

Análisis de la variabilidad

La variabilidad de los caracteres morfométricos se observó a través de los valores de los C.V.

Hembras hermafroditas (Fig. 1).

El 63,67% de los caracteres morfométricos evaluados presentaron C.V. bajo, mientras que, para el 36,33% se obtuvieron C.V. medio.

El valor mínimo de C.V. correspondió a la **longitud del cuerpo desde el extremo anterior al poro excretor** y el valor máximo al **ancho del cuerpo a nivel del ano**.

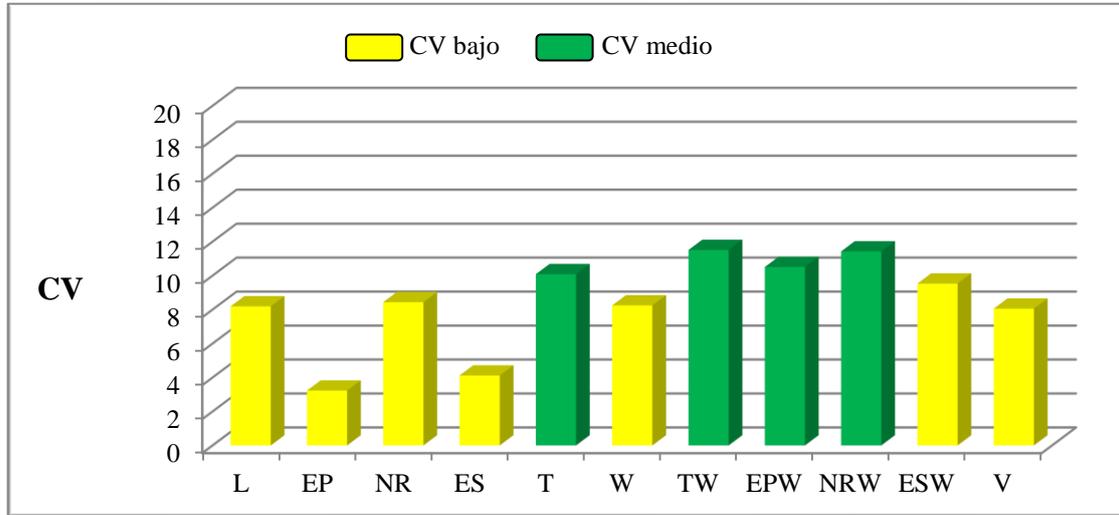


Figura 1: Variabilidad de los caracteres morfométricos en hembras hermafroditas de *Heterorhabditis bacteriophora* N842.

Hembras anfimícticas (Fig. 2).

Igual que en hembras hermafroditas, el 63,67% de los caracteres mostraron un C.V. bajo y el 36,33% presentaron un C.V. medio.

El **ancho del cuerpo a nivel del bulbo basal** fue el carácter con el menor C.V. y el **ancho del cuerpo a nivel del ano** fue el de mayor valor.

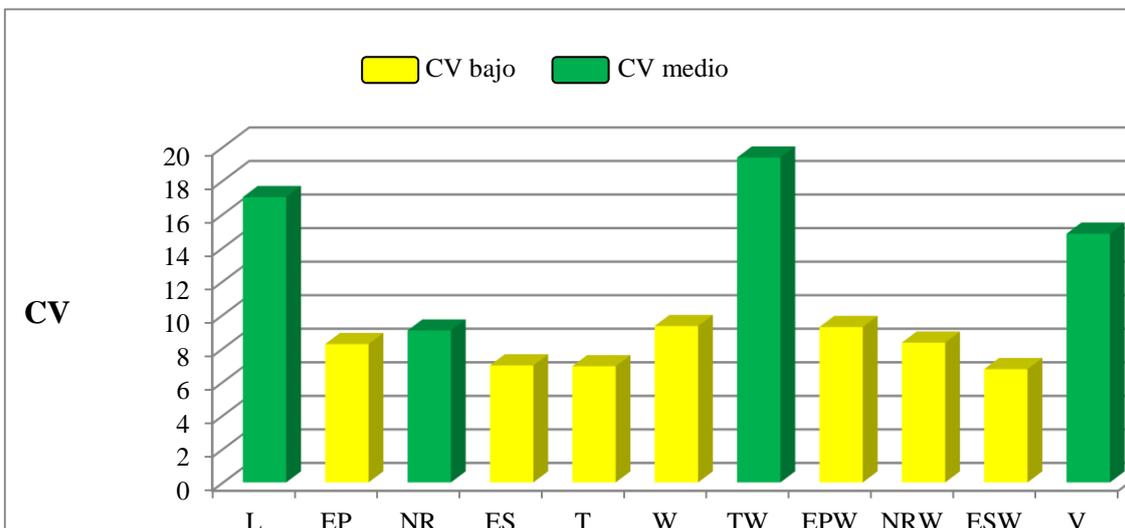


Figura 2: Variabilidad de los caracteres morfométricos en hembras anfimícticas de *Heterorhabditis bacteriophora* N842

Machos (Fig. 3).

La mayoría de los caracteres morfométricos (71,43%) presentaron un C.V. bajo, excepto en: **ancho máximo, ancho del cuerpo a nivel del ano, ancho del cuerpo a nivel del poro excretor y longitud del testículo desde el origen**

hasta la flexión, los cuales mostraron valores medios. El valor mínimo de C.V. correspondió a la **longitud de la espícula** y el valor máximo al **ancho del cuerpo a nivel del poro excretor**.

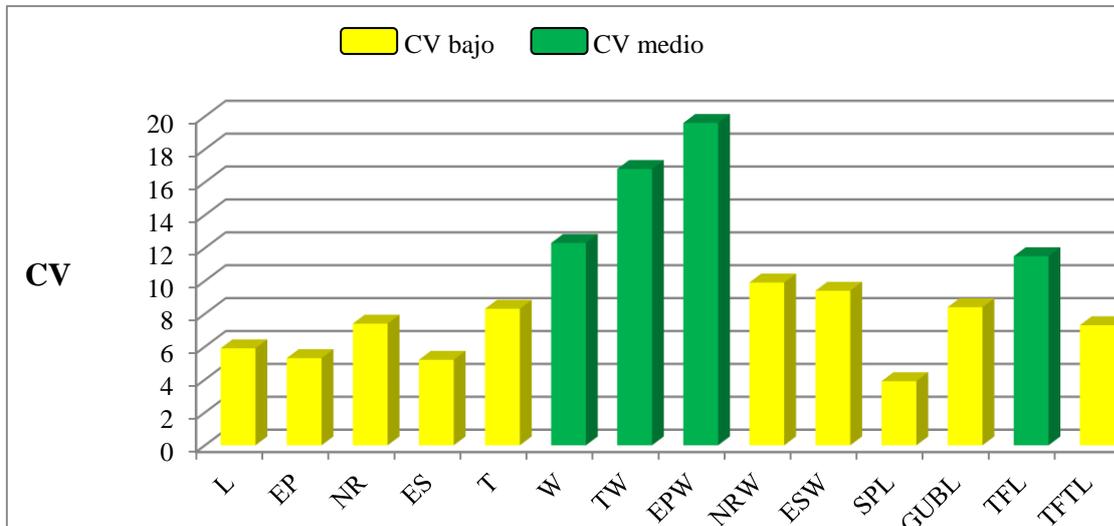


Figura 3: Variabilidad de los caracteres morfométricos en machos de *Heterorhabditis bacteriophora* N842.

Juveniles infectivos (Fig. 4).

En el 100% de los caracteres analizados el C.V. fue bajo, siendo la **longitud de la cola**, el menos variable.

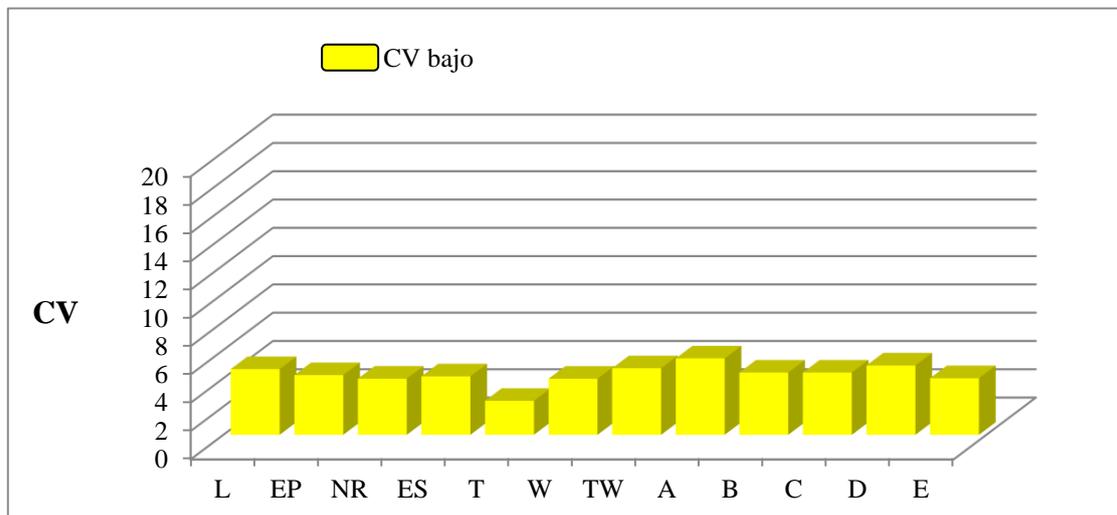


Figura 4: Variabilidad de los caracteres morfométricos en juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* N842.

Los análisis filogenéticos basados en la región ITS, y en la secuencia parcial del D2D3 de la subunidad 28S, confirmaron la identificación basada en los caracteres morfométricos con un 100% de similitud en sus secuencias para ambos genes. La longitud de la región ITS fue de 1080 pb, la de 28S fue de 593 pb y 1681 pb para los fragmentos combinados 28S+ITS.

El análisis bayesiano (BI) de los fragmentos combinados 28S + ITS coloca a este nematodo con *H. bacteriophora* (Fig. 5). Este patrón fue muy bien soportado por el remuestreo de bootstrap y las probabilidades posteriores, proporcionando evidencia adicional para su identificación específica. El árbol BI de los fragmentos combinados 28S +ITS muestra a *H. georgiana* como un grupo hermano de *H. bacteriophora*.

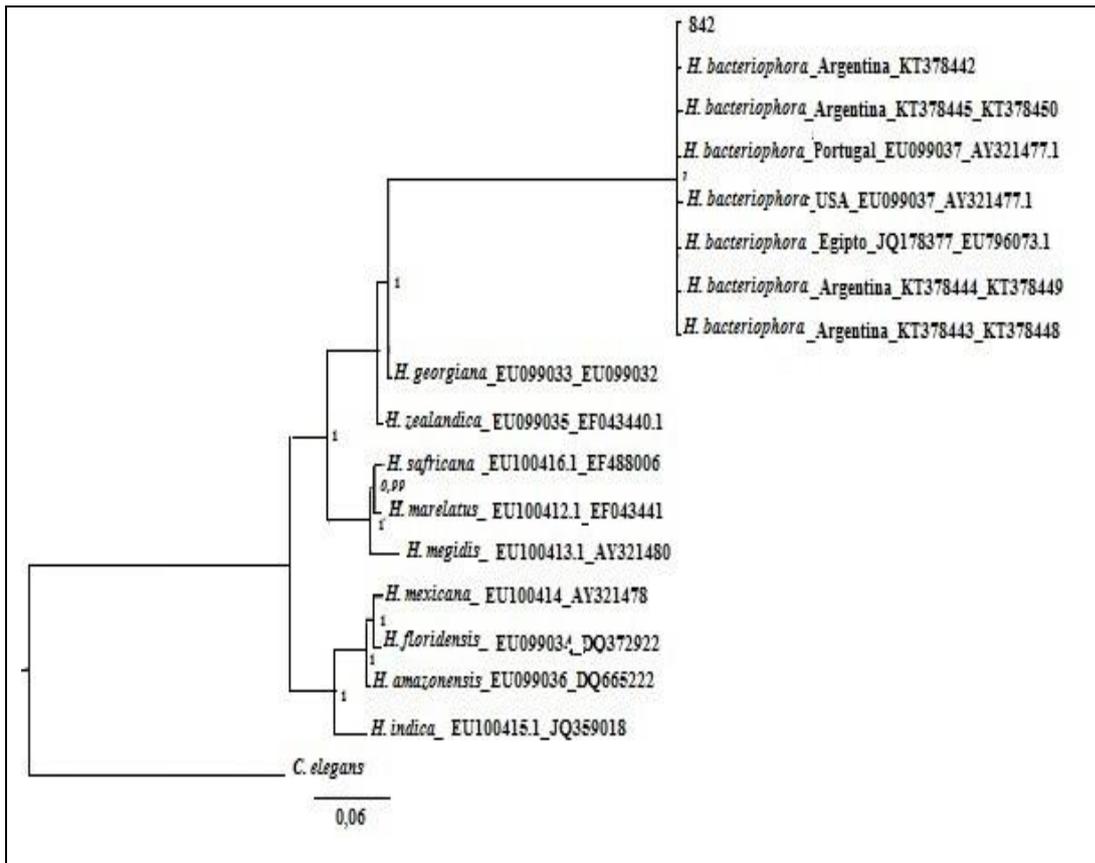


Figura 5: Árbol de consenso Bayesiano de las secuencias combinadas 28S+ITS de ADNr, mostrando las relaciones filogenéticas de *Heterorhabditis bacteriophora*.

Ensayos de infectividad.

Los valores de mortalidad obtenidos con las diferentes dosis para las especies de invertebrados utilizados fueron las siguientes:

En *B. octoplagiata* se observó que la dosis más alta provocó la muerte del 100% de los hospedadores entre las 48 y 144 horas, mientras que, con la dosis de 50 juveniles infectivos por insecto, la mortalidad fue del 16,67% y ocurrió entre las 48 y 96 horas después de la infección (Fig. 6).

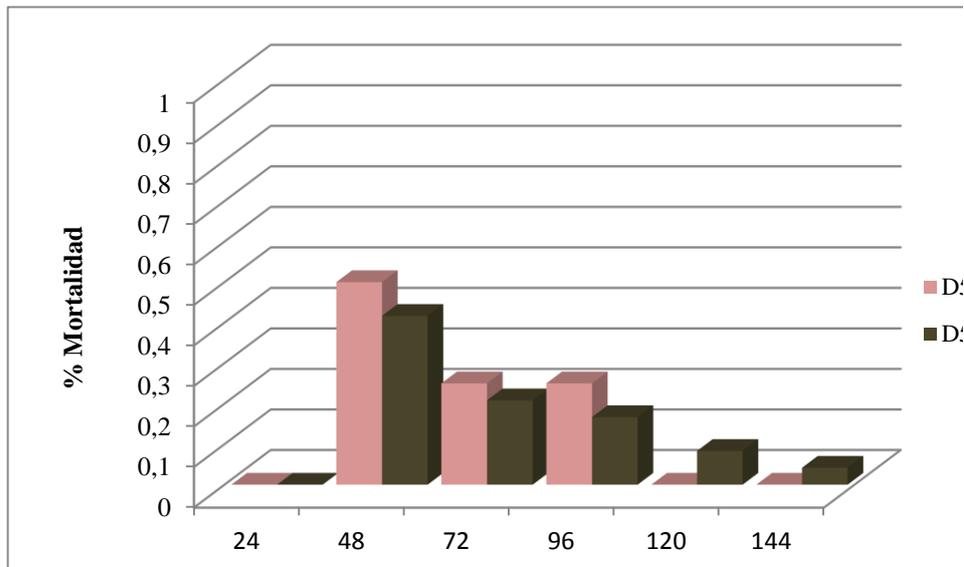


Figura 6: Porcentaje de mortalidad de *Botanochara octoplagiata* en relación al tiempo de evaluación.

No se registró emergencia de JIs desde los especímenes muertos de *B. octoplagiata* al culminar el ciclo parasitario con ninguna de las dos dosis utilizadas.

Las disecciones presentaron la coloración característica provocada por la bacteria endosimbionte (Fig. 7).

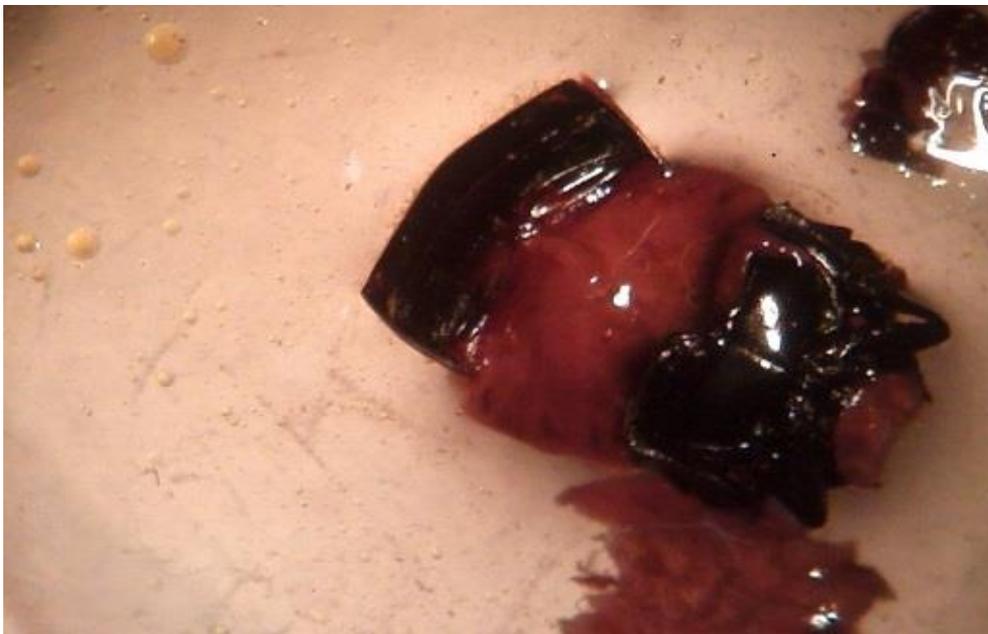


Fig.7: Disección de un adulto de *Botanochara octoplagiata*.

En los insectos diseccionados, se encontraron nematodos muertos en el interior de los hospedadores y, para el caso de la dosis más alta, se observaron además nematodos vivos en el interior de los insectos (Fig. 8: A y B).

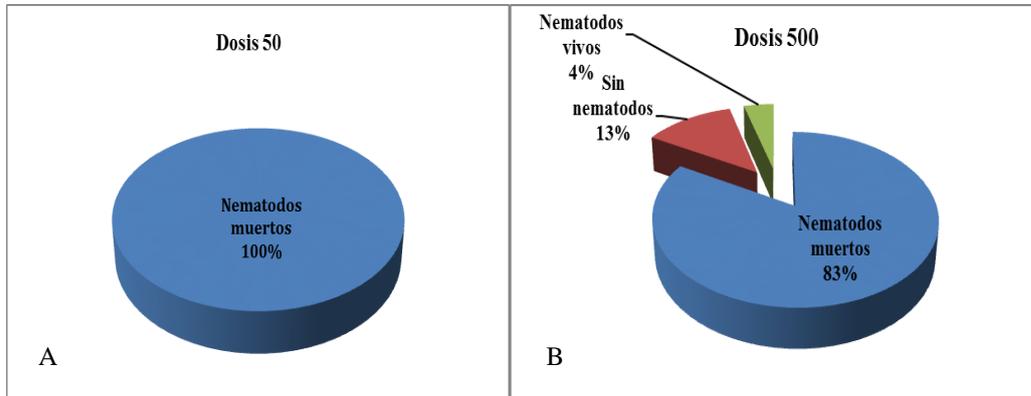


Fig. 8: Disección de *Botanochara octoplagiata*. A y B: nematodos hallados en el interior de los hospedadores.

No se registró mortalidad por el nematodo en *Deroceras* sp. ni en *Plagiodontes* sp.

En *G. mellonella*, la mortalidad con la dosis más alta fue del 95,84% y se produjo entre las 48 a 72 horas; con la dosis de 50 JIs/insecto la mortalidad fue del 45,83% y ocurrió entre las 48 y 168 horas luego de la infección (Fig. 9).

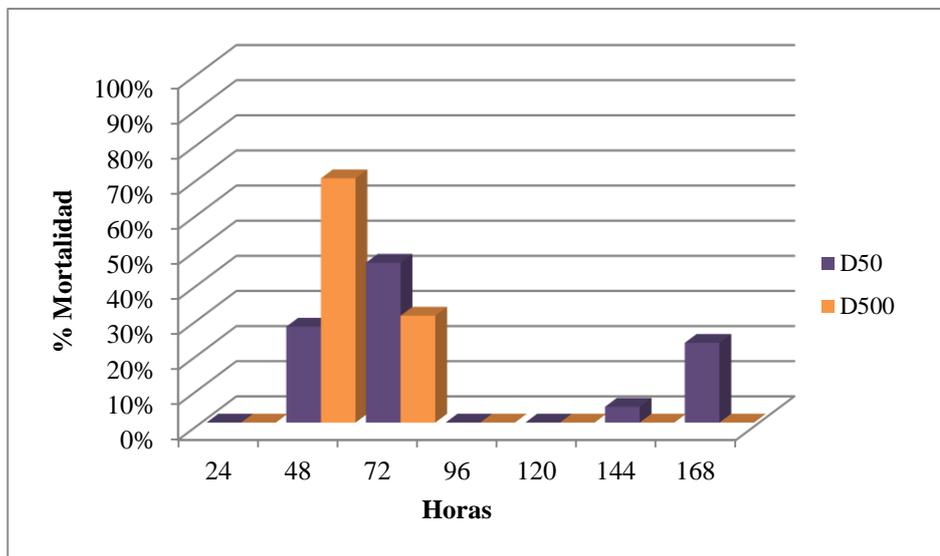


Figura 9: Porcentaje de mortalidad de *Galleria mellonella* en relación al tiempo de evaluación.

El número de juveniles infectivos que emergieron de cada larva de *G. mellonella* fue de $122.190 \pm 52.489,1$ con la dosis de 500 JIs; mientras que, con la dosis más baja, el valor fue de $84.797,2 \pm 56.378,8$. La emergencia de juveniles

infectivos (Fig. 10) mostró diferencias significativas entre las dosis (ANAVA, $p \leq 0,01$).



Figura 10: Emergencia de juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* N842 a partir de una larva de *Galleria mellonella*.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Caracterización morfométrica y molecular.

Los estudios morfométricos y moleculares permitieron identificar al aislado N842 como *H. bacteriophora* y los resultados alcanzados permiten ampliar la distribución de esta especie en Córdoba y en Argentina.

El análisis de los caracteres morfométricos mostró que se amplían los límites conocidos para la especie, estableciendo nuevos rangos en todos los estadios considerados. En relación con la variabilidad de los caracteres morfométricos, se definieron grupos de media y baja variabilidad, coincidiendo con observaciones realizadas en otras investigaciones en las que se demostró que, en especímenes adultos los caracteres son más variables que en los estadios infectantes (Poinar, 1990). Los adultos, a diferencia de lo que ocurre en juveniles, pueden estar influenciados por factores relacionados con las condiciones de desarrollo tales como el tamaño y el estado nutricional del hospedador, además de la cantidad de nematodos que ingresa a cada hospedador (Doucet *et al.*, 1991).

Los caracteres **longitud desde el extremo anterior al bulbo basal y longitud desde el extremo anterior al anillo nervioso**, presentaron un C.V. bajo en todos los estadios, indicando que estos caracteres, tal como ocurre en aislados de la misma especie, son efectivos para ser utilizados en la diagnosis (Hominick *et al.*, 1997).

En los machos, el carácter **longitud del testículo desde el origen hasta la flexión** presentó una variabilidad media, pudiendo atribuirse esto, al distinto grado de maduración de este órgano en los individuos (Doucet *et al.*, 1991). Respecto a los caracteres **longitud de la espícula y longitud del gubernáculo**, mostraron un C.V. bajo debido a que son estructuras esclerotizadas y que alcanzan un tamaño más o menos estable (Turco *et al.*, 1971).

En las hembras, el **índice V** presentó una variabilidad media, a diferencia de lo observado hasta el momento para las poblaciones de *H. bacteriophora* descritas para Argentina, que muestran una variabilidad baja para este carácter.

En la caracterización molecular la topología del árbol obtenido en base a 10 secuencias fue altamente soportado. El *bacteriophora*-group actualmente engloba a *H. georgiana* y a *H. bacteriophora* (Hatting *et al.*, 2009). Se destaca la similitud de las secuencias para ambos genes a nivel intraespecífico, a pesar de tener diferentes orígenes geográficos.

Ensayos de infectividad.

Las diferencias en los porcentajes de mortalidad podrían estar relacionadas con la susceptibilidad de los hospedadores (Koppenhöfer & Fuzy, 2003). A partir de observaciones realizadas en otros estudios y sobre diferentes especies de insectos, se ha podido inferir que existen hospedadores más favorables que otros. Como se ha señalado en distintos trabajos, el tamaño del hospedador, junto a un conjunto de variables tales como la susceptibilidad, la especie de nematodo y el número de JIs que ingresan, determinarían que un nematodo pueda o no completar su ciclo evolutivo dentro de un insecto y también el número de JIs producidos al final del ciclo parasitario (Unlu & Ozer, 2003; Argotti *et al.*, 2010). Hay que señalar además, que estas son las primeras experiencias de infectividad realizadas con este aislado. Por este motivo, uno de los hospedadores utilizados fue *G. mellonella*, un insecto altamente susceptible para

todos los aislados de nematodos entomopatógenos y que representa un control positivo cuando se evalúa el rango de hospedadores de un aislado nuevo. La mortalidad de *B. octoplagiata* fue alta, aunque los nematodos en su mayoría no pudieron continuar el ciclo de vida en su interior. Con las dos dosis utilizadas, se pudo observar un patrón de mortalidad similar, teniendo en cuenta los días transcurridos desde el contacto hasta la muerte. Con la dosis de 50 juveniles infectivos, los hospedadores se murieron más rápido, mientras que, con la dosis más alta la muerte se prolongó por varios días. Este hecho podría ser atribuido a que con la dosis más baja la competencia intraespecífica para ingresar al hospedador es menor (Sepúlveda-Cano *et al.*, 2008). La existencia de este tipo de competencia ha sido comprobada por Kaya & Koppenhöfer (1996).

Los resultados obtenidos al realizar las disecciones en los adultos de *B. octoplagiata*, concuerdan con las observaciones que realizaron Cagnolo & Bertolotti (2016) sobre este insecto infectado con otros aislados de *H. bacteriophora*, en las que, se produjo la muerte del insecto por la penetración del juvenil infectivo y la liberación de la bacteria endosimbionte, pero el nematodo no pudo completar su desarrollo dentro del hospedador. Esto demuestra que *B. octoplagiata* es susceptible a la infección por *H. bacteriophora* N842, aunque el nematodo no logró completar su ciclo evolutivo en el hospedador, por haber sido atacado por el sistema inmune del insecto.

Desde una perspectiva práctica, en lo que se refiere al posible empleo de estos patógenos como controladores de insectos plaga, la no producción de progenie a partir del insecto, representa una desventaja, ya que, al ser liberados al ambiente, no podrían persistir en el tiempo necesitando de nuevas aplicaciones.

Se comprobó que *Deroceras* sp. y *Plagiodontes* sp. no son susceptibles al aislado N842 de *H. bacteriophora*. Esto coincide con lo observado por Picca & Cagnolo (2008) en otros gastrópodos (caracoles) que tampoco resultaron parasitados. Esto podría ser causado por el moco que secretan, el cual actuaría como una barrera fisicoquímica impidiendo el ingreso de los nematodos (Cruz, 2012).

En *G. mellonella*, la producción promedio de nematodos por larva con ambas dosis coincide con trabajos realizados por Flanders (1996), quien afirma que el

rendimiento de *H. bacteriophora* puede alcanzar valores desde 50.000 a 400.000 nematodos por larva. De la misma manera, en estudios realizados por Kaya (2003) y Hernández (2006), se confirmó que este nematodo se multiplica en *G. mellonella* sin necesitar de requerimientos especiales.

Los cadáveres de las larvas de *G. mellonella* y los adultos de *B. octoplagiata*, no presentaron olor desagradable ni signos de putrefacción, lo que está relacionado con una de las funciones de la bacteria endosimbionte, la de segregar sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos competidores (Medina *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos aportan nuevos datos para el conocimiento de *H. bacteriophora* y ponen en evidencia una vez más la variabilidad intraespecífica que caracteriza a la especie (Doucet *et al.*, 1990; 1991; 1996; Doucet & Bertolotti, 1996).

Hay que señalar la importancia de realizar evaluaciones en laboratorio a fin de conocer el rango de hospedadores de los distintos aislados de *Heterorhabditis bacteriophora* y así determinar su aptitud como biorreguladores de las poblaciones de invertebrados dañinos sin afectar a las especies benéficas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMS, B.J. & NGUYEN, K.B. 2002. Taxonomy and Systematics. En: *Entomopathogenic Nematology*. (ed. R. Gaugler). CAB International. pp 311-326.

ARGOTTI, E.E.V., GALLEGOS, P., ALCAZAR, J & KAYA, H. 2010. Caracterización cronológica de los nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* aislados de *Tercia solanivora*. Boletín técnico 9. Serie zoológica 6: 173-184.

BEDDING, R.A. & AKHURST, R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 2: 109-110.

BERTOLOTTI, M.A. 2002. Caracterización de nematodos entomopatógenos (Steinernematidae Chitwood & Witwood, 1937 y heterorhabditidae Poinar 1976) de Córdoba Argentina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. UNC. 146 pp.

BERTOLOTTI, M.A., CAGNOLO, S.R. & CARRANZA, F. 2008. Diversidad de nematodos entomoparásitos de las Familias Mermithidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae en la Provincia de Córdoba. *III Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad*. Ciudad de Buenos Aires. 11-14 de Agosto de 2008. pp 84.

BRUFORD, M.W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J.F.Y. AND BURKE, T. 1992. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoezel CAR (ed) *Molecular Genetics Analysis of populations: A practical approach*. Oxford University Press. New York. pp 225-269.

CAGNOLO, S.R & BERTOLOTTI, M.A. 2011. Detección de nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae en los Departamentos de Ischilín y Totoral, Provincia de Córdoba. *Segunda Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina*. San Juan. 17-19 de Agosto de 2011. pp 103.

CAGNOLO, S.R & BERTOLOTTI, M.A. 2016. Parasitismo por nematodos entomopatógenos (Steinernematidae, Heterorhabditidae) en *Botanochara octoplagiata* (Spaeth, 1909) (Coleóptera: Chrysomelidae). *XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual*. Rosario. 5 y 6 de Diciembre de 2016. pp 65.

CAGNOLO, S.R, CARRANZA, F., TRIMARCHI, L. & BERTOLOTTI, M.A. 2016. New finding of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum* (Nematoda: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in Córdoba, Argentina. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.*, n.s. 18(2): 191-199.

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* 85:33-39.

- CAMPOS-HERRERA, R., ESCUER, M., LABRADOR, S. & GUTIERREZ, C. 2006. Aislamiento, Identificación y Caracterización Ecológica de Nematodos Entomopatógenos de la Rioja. *Zubia* 23-24:27-58.
- CRUZ, M.C. 2012. A secretion of the mollusc *Cryptomphalus aspersa* promotes proliferation, migration and survival of keratinocytes and dermal fibroblast in vitro. *International Journal of Cosmetic Science*. 34: 183-189.
- DI RIENZO, J.A., CASANOVES, F., BALZARINI M.G., GONZALEZ, L., TABLADA, M. & ROBLEDO, C.W. 2011. InfoStat, Versión 2011. Grupo InfoStat. FCA, UNC, Córdoba, Argentina.
- DOUCET, M.M.A. DE, DOUCET, M.E. & BERTOLOTTI, M.A. 1991. Efecto de la temperatura de cría e intensidad de infestación sobre los caracteres morfométricos de *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematropica* 21: 37-49.
- DOUCET, M.M.A. DE & BERTOLOTTI, M.A. 1996. Una nueva población de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 (Heterorhabditidae) de Río Negro, Argentina. *Nematología mediterranea* 24: 169-174.
- DOUCET, M.E., BERTOLOTTI, M.A., GIAYETTO, A.L. & CAGNOLO, S.R. 2006. Nematodos Entomopatógenos de las Familias Heterorhabditidae y Steinernematidae en Argentina. *XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas*. Catamarca. 28-30 de Junio de 2006. pp 164.
- DOUCET, M.E., BERTOLOTTI, M.A., CAGNOLO, S.R. & LAX, P. 2008. Nematodos Entomofílicos de la Provincia de Córdoba, Argentina. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* LXII: 263-297.
- FLANDERS, K.L., MILLER, J.M. & SHIELD, E.J. 1996. In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabdita: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology* 89: 373-380.
- GIAYETTO, A.L. & CICHÓN, L.I. 2006. Distribución, gama de huéspedes y especificidad de cinco poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* (NEMATODA: HETERORHABDITIDAE) del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 35:163-183.

- HATTING, J., STOCK, S.P. & SELÇUK, H. 2009. Diversity and distribution of the entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in South Africa. *Journal of Invertebrate Pathology* 102:120-128.
- HERNÁNDEZ, M., ALCAZAR, J. GARCÉS, P. & GALLEJO. 2006. Prospección de nematodos entomopatógenos para el control del gusano blanco (*Premnotrypes vorax* Hustache) (Coleoptera: Cucurlionidae) en Ecuador. CIP/INIAP. Disponible en: <http://bibliotecasdelecuador.com>. Acceso: Diciembre 2017.
- HOMINICK, W.M. 2002. Biogeography. En: *Entomopathogenic Nematology*. (ed. R. Gaugler). CAB International. pp 115-143.
- HOMINICK, W.M., BRISCOE, B.R., DEL PINO, F.G., HENG J., HUNT, D.J., KOZODOY, E., MACREK, Z., NGUYEN, K.B., REID, A.P., SPIRIDOV, S., STOCK, P., STURHAN, D., WATURU, C. & YOSHIDA, M., 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology* 71:271–298.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8): 754-775.
- JAGDALE, G.B. 2013. Described *Heterorhabditis* species and their symbiotic bacteria. Disponible en: <http://blog.bugsforgrowers.com>. Acceso: 14 Enero de 2013.
- KAYA, H.K. & STOCK, S.P. 1997. Techniques in Insect Nematology. En: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. (ed. L.A. Lacey). Academic Press. 281-324.
- KOPPENHÖFER, A.M. & FUZY, E. 2003. *Steinernema scarabei* for the control of white grubs. *Biological Control* v 28 (1). 47-59.
- KOPPENHÖFER, A.M. & KAYA, H.K. 1999. Ecological Characterization of *Steinernema rarum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 73:120-128.

LAWRENCE, A.L. 2006. The role of basic and operational research in the development of entomopathogenic nematodes for control of insect pests. *Bio-control Matters. Association of Natural Bio-control Producers* 7:6.

LIU, J., POINAR, G.O. & BERRY, R.E. 2000. Control of Insect Pest with Entomopathogenic Nematodes: The Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction. *Annual Reviews Entomology* 45:287-306.

MALAN, A.P., KNOETZE, R., & TIELD, L. 2012. *Heterorhabditis noeniputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Journal of Helminthology* 1-13.

MOLINA ACEVEDO, J.P., MOLINO, J.R., CAVALANTI SOUSA, R., ANDALÓ, V. & MENDONÇA, L.A. 2006. Efecto de temperatura, concentración y tiempo de almacenamiento en la supervivencia de nematodos entomopatógenos. *Revista Colombiana de Entomología* 32:24-30.

NEGRETE-GARCÍA, R. 2013. Nematodos Entomopatógenos procedentes de la rizósfera de suelos maiceros infestados con la gallina ciega *Phyllofaga polyphylla* Bates. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México. 104 pp.

NGUYEN, K.B. 2017. Species of *Heterorhabditis*. Disponible en: <http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morf/kbntein.htm>

NYLANDER, J.A.A. 2004. Mr Model test V2. Program distributed by the autor, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. <https://github.com/nylander/MrModeltest2>.

OROZCO-URIBE, M.C., HUESO-GUERRERO, E.J., FALLAD-CHÁVEZ, J., AQUINO-BOLAÑOS, T., VARGAS-AMADO, G. & VILLALOBOS-ARÁMBULA, A.R. 2008. Obtención de Secuencias de DNAr ITS y LSU para la Identificación de un Aislado de Nematodo Entomopatógeno Nativo (Rhabditida: Steinernematidae). En: *Avances de la investigación científica en el CUCBA*. (ed. S. Carvajal, E. Pimienta Barrios). TAGIT. pp 155-160.

PICCA, S. & CAGNOLO, S.R. 2008. Evaluación de *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) Mamiya, 1988 como bioinsecticida de diez especies de invertebrados que habitan jardines domiciliarios de Córdoba, Argentina. *VII Congreso Argentino de Entomología*. p 371.

POINAR, G.O. Jr. 1990. Taxonomy and Biology En: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. (ed. R. Gaugler). CAB International. pp 23-61

SHAHINA, F., TABASSUM, K., SALMA, J., MEHREEN, G., & KNOETZE, R. (2017). *Heterorhabditis pakistanense* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) a new entomopathogenic nematode from Pakistan. *Journal of Helminthology*, 91(2), 222-235.

SCOTT, L., STOCK, P. & KAYA, H.K. 1994. A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian Island. *Journal Parasitology*. 80(1): 100-106.

STOCK, S.P. 1995. Natural populations of entomopathogenic nematodes in the Pampean region of Argentina. *Nematotropica* 25: 143-148.

STOCK, S.P., CAMPBELL, J.F. & NADLER, S.A. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* 87:877-889.

STOCK, S.P., STRONG, D.L. & GARDNER, S.L. 1996. Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the Ghost Moth *Hepialis californica* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Reserve. *Fudam. Appl. Nematol.* 19 (6): 585-592.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINGS, D.G. 1997. CLUSTAL-X Windows interfase: Flexible strategies for multible- sequence alignment aided by quality análisis tools. *Nucleic Acids. Research*, 25: 4876-4882.

UNLU, I.O. & OZEN, N. 2003. Evaluation of the reproductive potential and competition between two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae*, (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Turkish Journal of Biology* 27 (3): 149-155.

YAN, X., WAWERU, B., QIU, X., HATEGEKIMANA, A., KAJUGA, J., LI, H., EDGINGTON, S., UMULISA, C., HAN, R. & S TOEPFER, S. (2016). New entomopathogenic nematodes from semi-natural and small-holder farming habitats of Rwanda. *Biocontrol Science and Technology*, 26(6): 820-834.

Agradecimientos.

Quisiera agradecer en lo académico a la Dra. Cagnolo y a la Dra. Bertolotti por brindarme sus conocimientos y el espacio para desarrollar este trabajo.

En lo personal le quiero dedicar este trabajo final a mi madre que es mi guía. Gracias por el apoyo incondicional y por enseñarme que nunca hay que rendirse. Y también a mis otros dos pilares, mi hija Lucia y mi compañero de la vida, Ginés, que me apoyaron y dieron ánimos en todo este proceso.