

Comportamiento de localización y elección de hospedadores, del nematodo entomopatógeno *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae).

Susana R. Cagnolo¹ y Juan M. Gonzalez¹

¹Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.

Fecha de recepción del manuscrito: 15/09/2016

Fecha de aceptación del manuscrito: 01/12/2016

Fecha de publicación: 15/03/2017

Resumen— El único estadio de vida libre de los nematodos entomopatógenos está constituido por los juveniles infectivos (JIs), quienes presentan diferentes estrategias para localizar a sus hospedadores. En este trabajo se analizó, por primera vez, para un aislado de Argentina, la modalidad de infección y el comportamiento de localización de hospedadores que poseen los JIs de *Steinernema rarum* (OLI). Se dispusieron 8 tratamientos, utilizando un número variable y dos especies diferentes de hospedadores: *Galleria mellonella* (Lepidoptera) y *Tenebrio molitor* (Coleoptera). Los porcentajes de mortalidad de *G. mellonella* y de *T. molitor* fueron del 85% y 62%, respectivamente. Estas muertes se registraron entre el 2do y 4to día posterior al contacto nematodo-lepidóptero y entre el 2do y 9no día para los coleópteros. El número de JIs que parasitó a los insectos en cada tratamiento aumentó a medida que se incrementaron los hospedadores disponibles, aunque el número de JIs en cada insecto disminuyó. Se demostró que los JIs de *S. rarum* (OLI) tienen una estrategia de localización tanto de caza como de emboscada. Conocer el comportamiento de los JIs resulta de fundamental importancia, debido a que éste es uno de los factores que determina la eficiencia de los nematodos como insecticidas biológicos.

Palabras clave— *Steinernema rarum* (OLI), *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, cazadores, emboscada.

Abstract— The only free-living stage entomopathogenic nematodes are infective juvenile (IJs), who have different strategies to locate hosts. This paper analyzed, for the first time to isolate Argentina, the mode of infection and host location behavior possessed by IJs of *Steinernema rarum* (OLI) when they have different hosts simultaneously. Eight treatments were arranged using a variable number and two different species hosts species: *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera). The percentages of mortality of *G. mellonella* and *T. molitor* were 85% and 62%, respectively. These deaths were recorded between the 2nd and 4th days after the nematode-lepidopterans contact and between the 2nd and the 9th days for the coleopterans. It was observed that the number of IJs which were able to parasitize a host in each treatment increases as the available hosts increased, although the number of IJs in each insect decreased. It was shown that IJs of *S. rarum* (OLI) have a localization strategy both ambushers as cruisers. Knowing the behavior of the IJs is of fundamental importance because it is one of the factors that determine the efficiency of nematodes as biological insecticides.

Keywords— *Steinernema rarum* (OLI), *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, ambushers, cruisers.

INTRODUCCIÓN

La utilización de nematodos contra insectos plaga se ofrece como un método alternativo ante el uso indiscriminado de insecticidas, los que provocan la acumulación de residuos tóxicos, la aparición de razas de insectos resistentes y en suma, la degradación del ambiente (Stock et al., 2000).

Los nematodos entomopatógenos presentan una combinación de características intermedias entre los depredadores, los parásitos y los patógenos de insectos. Por

un lado, poseen la capacidad de búsqueda de los depredadores y parásitos, por otro, como patógenos, son altamente virulentos, matando rápidamente a sus hospedadores; además pueden ser producidos fácilmente *in vitro* y poseen un alto potencial reproductivo (Kaya y Gaugler, 1993). Estas características conjuntamente con su extrema virulencia, el amplio rango de hospedadores y la inocuidad para los mamíferos en general y para el resto de la fauna, han suscitado un extraordinario interés por éstos como método de lucha biológica (Glazer y Lewis, 2000).

Con el fin de lograr la selección del mejor agente de control para ser aplicado a una plaga en particular, deben emprenderse estudios de las características biológicas de cada aislado, ya que se ha demostrado que éstas varían aún dentro de cada especie (Bedding et al., 1983; Kondo y Ishibashi, 1986; Doucet et al., 1992; Gouge et al., 1999; Burnell y Stock, 2000; Hazir et al., 2001).

Dirección de contacto:

Susana Raquel Cagnolo, Avenida Vélez Sársfield 299, X5000 CGA. Tel Fax.: +54 351 4332098/4332100 4332098, scagnolo@hotmail.com.

Para mejorar la eficacia de los nematodos como insecticidas biológicos es necesario comprender cómo éstos ubican, identifican y seleccionan a los hospedadores potenciales, es decir, cómo llevan a cabo la infección. Este proceso está específicamente relacionado con los comportamientos de encuentro del hospedador y el de reconocimiento y penetración (Molyneux y Bedding, 1984; Ishibashi y Kondo, 1990; Kaya y Gaugler, 1993).

La localización del hospedador, se ve limitada por barreras ecológicas y de comportamiento, y comienza con la selección del hábitat. La barrera de restricción más importante para la presencia de los nematodos entomopatógenos es la distribución natural del hospedador (Campbell y Gaugler, 1993). Algunos nematodos esperan a los insectos en o cerca de la superficie del suelo, mientras que otros están adaptados a buscarlos a mayor profundidad (Alatorre-Rosas y Kaya, 1990; Kaya y Gaugler, 1993).

Una vez que el hábitat ha sido seleccionado, se cree que los nematodos pueden adoptar una de las dos estrategias de localización, comportándose como cazadores, o emboscando a los insectos (Alatorre-Rosas y Kaya, 1990; Lewis, et al., 1992, 1993; Campbell y Gaugler, 1993).

Los nematodos con estrategia de caza son muy móviles, tienen el comportamiento de buscar al insecto (Lewis et al., 1992), responden activamente a los productos de excreción dejados por sus hospedadores, en particular, los que contienen dióxido de carbono (Lewis et al., 1992, 1993) y están adaptados a parasitar especies subterráneas y sedentarias (Campbell y Gaugler, 1993). Se observó que estos nematodos orientan sus movimientos hacia los hospedadores, en primer lugar, recopilando información de los recursos disponibles, para luego realizar una búsqueda más localizada y restringida (Miller y Strickler, 1984). Se ha demostrado que en presencia de hospedadores o materiales asociados a éstos los nematodos cazadores disminuyen su área de búsqueda y locomoción (Lewis et al., 1992). Un representante con este comportamiento es *Steinernema glaseri* (Kaya, 1990; Lewis et al., 1992).

Los nematodos que poseen la estrategia de emboscada comportamiento de esperar al insecto, están cerca de la superficie del suelo y su dispersión es limitada (Molyneux y Bedding, 1984; Alatorre-Rosas y Kaya, 1990), poseen una menor respuesta de atracción hacia los diferentes productos de excreción de los hospedadores (Gaugler et al., 1990; Georgis y Gaugler, 1991; Lewis et al., 1993) y están adaptados a parasitar insectos con gran movilidad (Gaugler et al., 1990); un nematodo con esta estrategia de localización es *Steinernema carpocapsae* (Lewis et al., 1992).

Campbell y Gaugler (1993) han encontrado que las especies con estrategia de emboscada tienden a levantar su cuerpo del sustrato (excepto la porción posterior) y lo ondulan moviéndose de lado a lado. Este comportamiento favorecería la unión a los hospedadores, permitiendo al nematodo poder subirse más fácilmente sobre el insecto que pasa (Ishibashi y Kondo, 1990; Campbell y Gaugler, 1993).

Para la localización de sus hospedadores, los nematodos necesitan reconocerlos, y lo hacen mediante quimiorreceptores, los que responden a factores tales como el dióxido de carbono (Gaugler et al., 1991), productos de

excreción (Lewis et al., 1992) y gradientes de temperatura (Pye y Burman, 1981; Byers y Poinar, 1982).

La habilidad del nematodo en alcanzar y penetrar al insecto es una parte importante del proceso patogénico, involucra la velocidad del movimiento, la habilidad de montarse al insecto y de encontrar los sitios de penetración. Los representantes de la familia Steinernematidae penetran en el cuerpo de sus hospedadores a través de aberturas naturales como la boca, el ano y los espiráculos (Burnell y Stock, 2000) y hay una creciente evidencia que para algunas especies de esta familia, estarían involucradas secreciones, que permitirían que éstos penetren al insecto por cualquier parte de su cuerpo (Dowds y Peters, 2002).

En base a estudios realizados respecto al comportamiento de los JIs de *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora*, con relación al número de hospedadores disponibles, se determinó que los nematodos "deciden" infectar a un insecto en particular en respuesta a varios factores endógenos y exógenos que actúan como filtro sobre el número o proporción de la población infectante. Los JIs necesitan balancear la contribución proporcional de cada individuo a las generaciones futuras, como resultado de infectar a un insecto en particular, en un tiempo particular, contra no infectar ese insecto (Campbell et al., 1999). Se observó que los JIs mostraron mayor preferencia por insectos previamente infectados, que por los no infectados, es decir, que el ingreso de JIs a un hospedador aparentemente no es al azar (Grewal et al., 1993; Campbell et al., 1999). Además se demostró que la proporción de JIs que ingresa a los insectos se incrementa, hasta llegar a un punto en el cual los JIs no ingresan más (Campbell et al., 1999).

Estudios realizados sobre el rango de hospedadores, sugieren para un aislado de *S. rorum*, que bajo condiciones de laboratorio, los JIs están extremadamente bien adaptados para infectar larvas de lepidópteros, (destacándose el representante de la familia Pyralidae, la polilla de la cera *Galleria mellonella*, por su alta susceptibilidad) y también larvas de algunos coleópteros (Koppenhöfer y Kaya, 1999). Dentro de este último orden, se encuentra el representante de la familia Tenebrionidae, el gusano de la harina *Tenebrio molitor*, quien demostró ser un hospedador adecuado para *S. rorum* (Koppenhöfer y Kaya, 1999; Doucet et al., 1999).

Existen diversos estudios en Argentina sobre diferentes aislados de *S. rorum*, los que están enfocados principalmente en su caracterización morfológica, morfométrica y molecular. Sin embargo, son escasos los trabajos realizados sobre el comportamiento de búsqueda de los JIs, e inexistentes los realizados sobre la elección de hospedadores.

Debido a que estos aspectos revisten una gran importancia para una futura aplicación de estos nematodos como insecticidas biológicos, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos: 1) Observar el efecto de la densidad de hospedadores en la modalidad de infección de *S. rorum* perteneciente a la localidad de Oliva, Córdoba. 2) Evaluar el comportamiento de los JIs y su desarrollo ante la presencia simultánea de dos hospedadores pertenecientes a especies diferentes. 3) Determinar si los JIs de *S. rorum*, tienen una estrategia para localizar al hospedador, de emboscada o de cazador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del parásito

Los ejemplares de *S. rarum* que se utilizaron en las experiencias proceden de muestras de suelo de la localidad de Oliva, provincia de Córdoba, extraídos mediante la técnica de “trapa de insecto” (Bedding y Akhurst, 1975).

Almacenamiento y conservación de juveniles infectivos

Los JIs se reprodujeron periódicamente en el laboratorio de la Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Con el fin de obtener JIs en condiciones controladas, antes de realizar las experiencias, las infecciones se realizaron con una cantidad de 30 JIs/hospedador. Al término del ciclo parasitario, los nuevos JIs obtenidos fueron almacenados en cajas plásticas de 25 x 12 x 4 cm. Para mantener la humedad y favorecer la oxigenación, a cada caja se le agregaron trozos de goma espuma, humedecidos con agua hervida y se las mantuvo a temperatura ambiente (20 - 22 °C). Las experiencias se realizaron antes de que transcurrieran 30 días de almacenamiento de los JIs, a fin de asegurar que fueran infectivos.

Hospedadores utilizados

Se trabajó con dos hospedadores diferentes, el gusano de la harina *T. molitor* (Fam. Tenebrionidae; Orden Coleoptera) y la polilla de la cera *G. mellonella* (Fam. Pyralidae; Orden Lepidoptera). Para todas las infecciones se utilizaron larvas de estos insectos con un peso entre 0,20 y 0,29 gramos.

Cría de hospedadores

T. molitor: Se criaron en recipientes plásticos de 60 x 50 cm, como alimento se utilizó 50% de salvado de trigo, 25% de harina de avena y 25% de harina de trigo, se suplementó regularmente con comida fresca (papa, zanahoria y hojas de lechuga) y pan seco (Cole, com. pers.).

G. mellonella: Los insectos se criaron en recipientes debidamente acondicionados y alimentados con harina de maíz 15,4 %, harina de trigo 15,4 %, cereales de la marca comercial “Nestum” 15,4 %, leche en polvo 10,68 %, levadura 5,4 %, glicerina 13,5 % y miel 24,3 %. La cría de ambos hospedadores se realizó a un rango de temperatura de 20 a 22 °C (Cagnolo et al., 2004).

Se separaron de los recipientes de cultivo, gradualmente, el número total de hospedadores utilizados en las experiencias (n=473). Al alcanzar un peso de 0,1 gr. Las larvas de *T. molitor* y larvas de *G. mellonella* se colocaron en recipientes plásticos, a una temperatura de 4 a 6 °C y cada semana fueron trasladadas a temperatura ambiente (20 - 22 °C) por 24 horas, para que consuman alimento, hasta el momento de las experiencias. Ambos hospedadores

utilizados tuvieron el mismo peso, a fin de eliminar esta variable de los resultados.

Obtención de las dosis

Para la experiencia de selección de hospedadores se utilizaron 150 JIs por cápsula de Petri, mientras que para determinar el comportamiento de los nematodos en la localización del hospedador, se necesitaron 250 JIs por caja experimental. Para obtener dichas dosis, se extrajo una solución concentrada de las cajas de almacenamiento de JIs y se agregó agua hasta un volumen final de 100 ml. Posteriormente se extrajo una alícuota de 2 ml, y se la colocó en una cámara de recuento, donde se registró el número de nematodos, bajo lupa estereoscópica (20 x). Dicha acción se repitió 10 veces; se obtuvo el promedio de JIs presentes y se calculó la cantidad de solución con el número de nematodos necesarios para conformar las dosis.

Experiencia para evaluar la selección de hospedadores

La solución conteniendo 150 JIs se pasó por papel de filtro, a éste se lo colocó dentro de una cápsula de Petri de 6 cm de diámetro provista de un papel de filtro seco. A cada cápsula se le colocó una combinación de número y tipo de hospedadores diferentes (Tabla 1). Se realizaron 5 réplicas de cada tratamiento, distribuyendo las infecciones en 2 bloques de 8 tratamientos cada uno. En cada bloque se consideraron grupos controles, los que se realizaron según lo antes descrito, con la diferencia que al pasar la solución por papel de filtro, ésta carecía de nematodos.

Tiempo de muerte

Luego del contacto nematodo-insecto, se registró la muerte de los hospedadores, la que se verificó por su coloración; para ello se realizaron observaciones cada 24 hs durante 10 días.

TABLA 1: NÚMERO Y ESPECIE DE LARVAS HOSPEDADORAS UTILIZADAS EN CADA TRATAMIENTO

Tratamiento	Hospedadores (N° de larvas/cápsula de Petri)	Grupo
G1	1 <i>G. mellonella</i>	I
G2	2 <i>G. mellonella</i>	
G10	10 <i>G. mellonella</i>	
T1	1 <i>T. molitor</i>	II
T2	2 <i>T. molitor</i>	
10	10 <i>T. molitor</i>	
GT1	1 <i>G. mellonella</i> y 1 <i>T. molitor</i>	III
GT5	5 <i>G. mellonella</i> y 5 <i>T. molitor</i>	

Transcurrido el tiempo de observación, se calculó el porcentaje de hospedadores muertos, teniendo en cuenta el número de insectos y la especie.

Conteo del número de nematodos por hospedador

Con el fin de conocer el número de nematodos que ingresó a cada hospedador parasitado, al registrar la muerte de los insectos, cada uno fue separado de la cápsula de infección y se lo colocó en otra cápsula de Petri. Al tercer día de producida la muerte, se los disecó bajo lupa estereoscópica (20 x), separando y contabilizando la cantidad de nematodos adultos (machos y hembras) hallados. En cada uno de los 8 tratamientos se consideraron los hospedadores muertos por nematodos de las cajas 1-3-5.

Se calculó el número promedio de JIs que ingresaron a los insectos en cada una de las seis cápsulas (repeticiones) de cada tratamiento. Estos resultados fueron sometidos a un Modelo Lineal Generalizado Múltiple. Las comparaciones entre medias se realizaron mediante un test a posterior DCG utilizando el Software InfoStat (Di Rienzo et al., 2011).

Para evaluar la eficiencia de penetración de los JIs según cada tratamiento, se utilizó la siguiente fórmula, $(N \times 100 / T)$ (Glazer y Lewis, 2000), en la que N es el número promedio de nematodos que ingresó a cada cadáver, por tratamiento, y T, el número promedio original de JIs.

Por otro lado, con el fin de averiguar si existen diferencias en el número de JIs que ingresó a cada hospedador, se calculó el número promedio de JIs por insecto, en base a cada tratamiento y considerando los insectos muertos por nematodos. Debido a que los datos obtenidos no respondieron a los test de normalidad, éstos fueron analizados mediante el uso de estadísticas no paramétricas aplicando la Prueba de Kruskal Wallis, utilizando el Software InfoStat (Di Rienzo et al., 2011).

Comportamiento de los JIS para la localización del hospedador

Se utilizaron cajas plásticas rectangulares de 19,5 x 10 x 4 cm con tapa, en las que se colocaron 450 gr de arena esterilizada en horno a 180 °C por 90 minutos y humedecida con 11 ml de agua hervida (diámetro de las partículas: entre 0,36 y 1,13 mm). En uno de los extremos se añadieron 5 larvas de *G. mellonella*, a una profundidad de 1 cm. A cada insecto se lo inmovilizó colocándolo dentro de una jaula de tela galvanizada de apertura de malla de 1,2 mm, para impedir el escape de los hospedadores y permitir el paso de los JIs. En la base del otro extremo de la caja (entre 10 y 14 cm de distancia de las larvas) se colocó un papel de filtro con 250 JIs. Lo descrito se realizó en 11 cajas, 10 repeticiones y un control, que se mantuvieron en estufa a 25 °C. Al cabo de 12 días se observó si los JIs fueron capaces de infectar a sus hospedadores, lo que se comprobó retirando las larvas de *G. mellonella* de sus celdas y procediendo a registrar si su muerte fue causada por nematodos, mediante la observación de su color (Poinar et al., 1988). El arena de las cajas fue observada bajo lupa estereoscópica (20 x) con el fin de detectar la presencia de JIs entre las partículas.

RESULTADOS

Selección de hospedadores

Con el fin de observar la modalidad de infección de los JIs de *S. rarum* (OLI) según la especie de hospedador utilizada, se separó a los 8 tratamientos efectuados en 3 grupos, dos de ellos conformados por una de las dos especies de insectos y el tercer grupo por ambas especies combinadas (Tabla 2).

De un total de 130 larvas de *G. mellonella* (grupo I), los JIs de *S. rarum* (OLI) produjeron una mortalidad del 85%. Tal como se observa en la Fig. 1a, la muerte del 30% de dichas larvas se produjo en los 2 días posteriores al contacto, el 67% a los 3 días y el 3% restante a los 4 días. Para el grupo II, de un total de 130 larvas de *T. molitor*, el 62% murió por causa de infección con nematodos. Dichas muertes se produjeron el 2do día (el 4% de las larvas), el 3er día (el 73%), y el 4to día (el 15%). Entre el 5to y 10mo día los JIs continuaron produciendo la muerte de los insectos, excepto en el día 8 y el 10 (Fig. 1b).

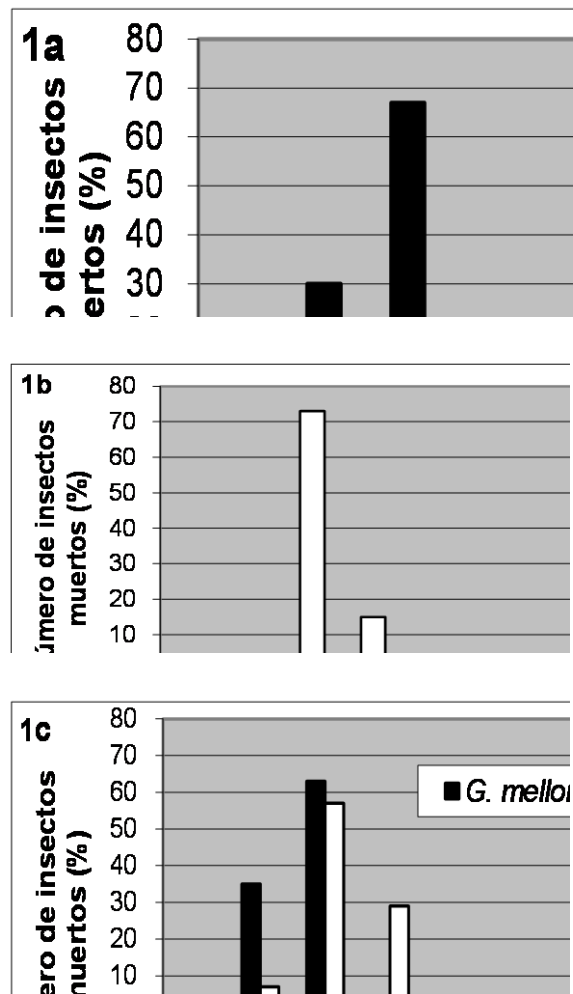


Fig. 1: Mortalidad de las larvas hospedadores por JIs de *S. rarum* (OLI), en los 10 días posteriores al contacto nematodo-insecto a: grupo I; b: Grupo II; c: Grupo III.

Para el grupo III de un n=120 (60 larvas de *G. mellonella* y 60 de *T. molitor*) se obtuvo una mortalidad para *G. mellonella* del 72% y para *T. molitor* del 47%. Los tiempos de muerte para este grupo fueron similares a los de los grupos I y II (Fig. 1c), con la diferencia que para *T. molitor* el último día en que se registró una muerte fue el día 6 y no el día 9. En el tratamiento control, los valores de mortalidad fueron inferiores al 5 %.

La mortalidad total (número de hospedadores expuestos en cada tratamiento) varió en un rango de 55 al 100% (Tabla II). Los mayores porcentajes fueron obtenidos en aquellos tratamientos efectuados sobre larvas de *G. mellonella*. Respecto a la densidad de hospedadores, se observó que a mayor número de insectos, menor mortalidad, tanto para los tratamientos con larvas de *T. molitor*, como en los tratamientos en los que se combinaron ambas especies. Por el contrario, esta tendencia no se manifestó en la mortalidad de larvas de *G. mellonella*.

En la Tabla II, se muestra además, el número medio de insectos infectados por cápsula de Petri, observándose que éste aumenta a medida que se incrementa el número de hospedadores, tanto para las cápsulas donde se encontraban las larvas con una sola especie como en las que se encontraban de manera conjunta.

TABLA II: PORCENTAJE PROMEDIO DE MORTALIDAD TOTAL Y NÚMERO MEDIO DE INSECTOS MUERTOS POR CÁPSULA DE PETRI, CON SUS CORRESPONDIENTES DESVÍOS ESTÁNDAR, CALCULADOS PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

Tratamiento	N	Mortalidad total (%) Media a ± desvío estándar	Hospedadores muertos por cápsulas de Petri Media b ± desvío estándar
G1	10	70% ± 42	0,7 ± 0,48
G2	20	100% ± 0	2 ± 0
G10	100	84% ± 11	8,4 ± 1,6
T1	10	80% ± 0	0,8 ± 0,42
T2	20	70% ± 14	1,5 ± 0,7
T10	100	58% ± 11	5,8 ± 1,6
GT1	20	80% ± 14	1,6 ± 0,51
GT5	100	55% ± 3	5,5 ± 1,9

N: Número total de hospedadores por tratamiento en los dos bloques.

a. Media calculada sobre los porcentajes de mortalidad de los hospedadores expuestos en ambos bloques dividido el número de bloques.

b. Media calculada sobre el número total de hospedadores muertos por tratamiento dividido el número de cápsulas de Petri utilizadas en cada tratamiento.

Nematodos encontrados en el interior de los hospedadores

1) Establecimiento de JIs por tratamiento

Considerando los hospedadores muertos por nematodos, se observó que el número promedio de JIs que ingresó a los distintos insectos en cada tratamiento, presentó diferencias significativas (P=0,0014).

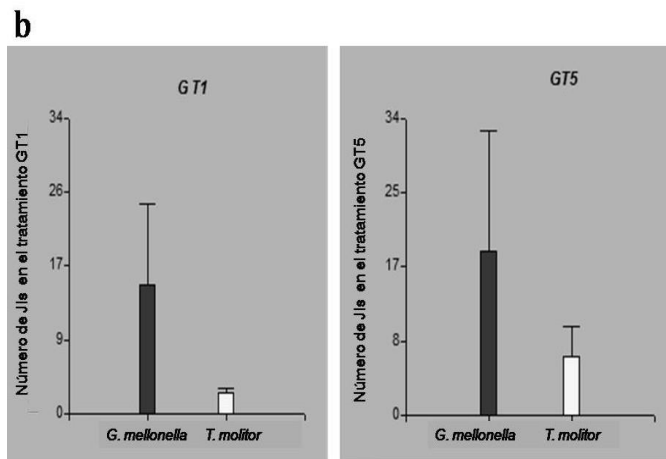
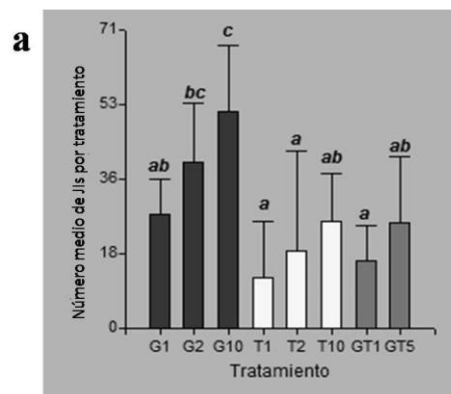


Fig. 2: a- Número medio de JIs que ingresaron a los hospedadores por cada tratamiento. b- Número medio de JIs que ingresaron a los hospedadores de los tratamientos GT1 y GT5 diferenciando en las dos especies hospedadoras.

El número de JIs que ingresó a éstos, aumentó a medida que se incrementó el número de hospedadores en cada tratamiento (Fig. 2a). La comparación de los valores medios de JIs establecidos por insecto, por tratamiento, arrojó diferencias significativas para los tratamientos G10, T1, T2 y GT1 (P ≤ 0,05).

En cuanto a la eficiencia de penetración, pudo observarse que, si bien la cantidad de JIs colocados en cada cápsula de Petri fue el mismo, el número de JIs que ingresó a los hospedadores aumentó a mayor disponibilidad de insectos (Tabla III).

Considerando la especie de hospedador, el número de nematodos hallados fue siempre mayor dentro de las larvas de *G. mellonella* con respecto a las larvas de *T. molitor*, tanto al ser expuestas ambas especies de manera conjunta como por separado (Fig. 2 b).

2) Establecimiento de JIs por cada insecto

El número medio de JIs que ingresó a cada insecto, según cada tratamiento presentó diferencias significativas (Kruskal wallis, H=35.58; P ≤ 0,05). Se observó además que a medida que aumentó el número de hospedadores por cápsula de Petri, menor fue el número de nematodos que ingresó a cada insecto (Fig. 3a). La comparación de los valores medios de JIs establecidos por insecto arrojó diferencias significativas para los tratamientos G1, G2 y GT5 (P ≤ 0,05).

TABLA III: EFICIENCIA DE PENETRACIÓN, CONSIDERANDO CADA TRATAMIENTO.

Tratamiento	Eficiencia de penetración
G1	18%
G2	30%
G10	35%
T1	8%
T2	12%
10	17%
GT1	11%
<i>G. mellonella</i>	10%
<i>T. molitor</i>	1%
GT5	17%
<i>G. mellonella</i>	12%
<i>T. molitor</i>	5%

Considerando el número de JIs de *S. rorum* (OLI) que ingresaron a los insectos cuando disponían de las dos especies de hospedadores, se observó de igual manera, un mayor número de JIs en *G. mellonella* respecto a *T. molitor* y que al aumentar el número de hospedadores (independientemente de su especie) disminuyó el número de JIs por insecto (Fig. 3b).

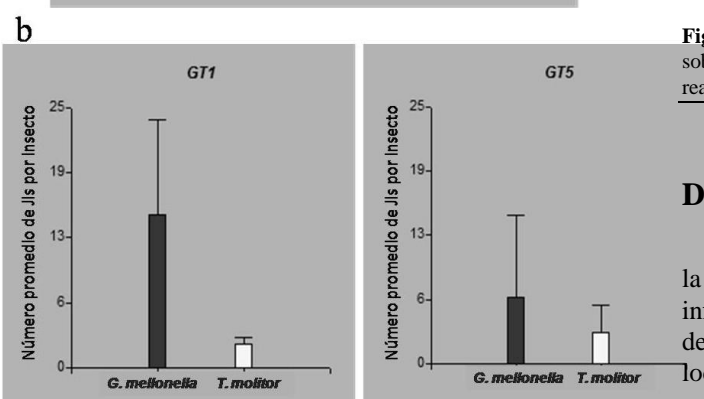
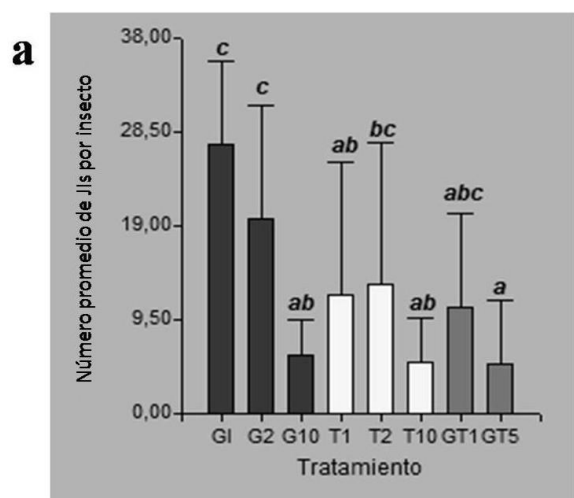


Fig. 3: a- Número promedio de JIs de *S. rorum* (OLI) que ingresaron a cada huésped. b- Número promedio de JIs que ingresó a cada insecto en los tratamientos en los que se combinaron a ambos hospedadores (GT1, GT5), diferenciándolos según especie.

Proporción de nematodos machos y hembras que ingresaron a los insectos

Con respecto al sexo de los nematodos que se desarrollaron tanto en el interior de las larvas de *G. mellonella* como en las de *T. molitor*, se pudo observar que la cantidad de individuos machos fue inferior a la de las hembras, 30 y 70% respectivamente. Esta proporción fue la misma para ambos hospedadores, aún cuando la cantidad de JIs que ingresaron a dichos insectos fue diferente (629 y 304 JIs respectivamente).

Al analizar los tratamientos en los que se combinaron a ambos tipos de hospedadores, se pudo observar también, una proporción de hembras superior a la de los machos (66 y 34% respectivamente).

Comportamiento de los JIs para la localización del hospedador

De las 50 larvas de *G. mellonella* con las que se realizó la experiencia, solo un 30% fue parasitada por los JIs de *S. rorum* (OLI), mientras que el 14 % no fue infectada por nematodos y el 56% restante sobrevivió. Para la caja control a lo largo de los 12 días se observó la mortalidad del 20% de los hospedadores.

Dado que las larvas de *G. mellonella* se encontraban inmovilizadas, a una distancia de entre 10 y 14 cm de los JIs, el hecho que se hayan encontrado hospedadores infectados, demostraría que los JIs de *S. rorum* (OLI) pueden desplazarse, teniendo de esta manera un comportamiento de búsqueda del huésped. Además se observó bajo lupa estereoscópica a los JIs apoyar la parte posterior de su cuerpo sobre las partículas de arena y realizar un movimiento pendular de la parte anterior (Fig. 4). *S. rorum* (OLI) describió el comportamiento de un nematodo con ambas estrategias, de caza y de emboscada.

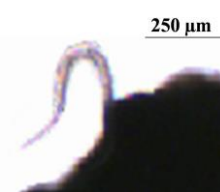


Fig. 4: a- Juveniles infectivos de *S. rorum* (OLI) esperando al hospedador sobre una partícula de arena, apoyado sobre la región posterior y realizando movimientos pendulares de la parte anterior del cuerpo.

DISCUSIÓN

En este trabajo se observó, por primera vez, el efecto de la densidad y de la especie huésped en la modalidad de infección de un aislado de *S. rorum* de Argentina, y se determinó la estrategia utilizada por este nematodo en la localización de los insectos.

La mortalidad causada por los JIs de *S. rorum* (OLI) en larvas de *G. mellonella* respecto a las larvas de *T. molitor*, fue siempre superior, tanto al exponer ambas especies hospedadores de manera conjunta como por separado. La

mayor mortalidad de lepidópteros respecto a la de coleópteros fue también corroborada (aunque expuestos ambos hospedadores por separado) para otros aislados de *S. rarum* de Córdoba -Sargento Cabral y Noetinger- (Doucet et al., 1999; Koppenhofer y Kaya, 1999).

La muerte de los insectos debido a septicemia se produce en un lapso de 3 días, ya que poseen una asociación simbiótica con bacterias del género *Xenorhabdus* (Thomas y Poinar, 1979; Koppenhöfer y Fuzi, 2003). A *S. rarum* (OLI) le tomó 2 a 4 días matar al total de larvas de *G. mellonella* que parasitaron, mientras que la muerte de las larvas de *T. molitor*, se produjo a partir del 2do día y continuó durante los siete días posteriores. Los mayores porcentajes de mortalidad, para ambos tipos de hospedadores se registraron al tercer día luego de producido el contacto. Cuando se combinó a ambas especies de hospedadores, los tiempos de mortalidad fueron similares a los registrados para los hospedadores por separado.

Si comparamos con la velocidad a la cual otras especies de nematodos matan a sus hospedadores, tomando como modelo el tiempo en que muere por septicemia la polilla de la cera u otra larva de lepidóptero (Grewal et al., 1994; Koppenhöfer y Kaya, 1999; Koppenhöfer et al., 2000a), se observó que *S. rarum* (OLI) mata a las larvas de *G. mellonella* en los tiempos estipulados. Con respecto a larvas de coleópteros, el lapso de tiempo en el que los JIs de *S. rarum* (OLI) produjeron la muerte de larvas de *T. molitor* resultó ser similar que el tiempo registrado en experiencias en las que se utilizaron otras especies de nematodos y larvas de coleópteros como huésped. A título de ejemplo, JIs de *Steinernema kushidai* provocaron la muerte a larvas de *Cyclocephala hirta*, en un lapso de 6 días; JIs de *S. glaseri*, en un lapso de 9 días (Koppenhöfer et al., 2000b) y a JIs de *S. kushidai* les tomó entre 4-8 días causarle la muerte a larvas de *Anomala cuprea* (Ogura, 1993).

La demora en la mortalidad de larvas de coleópteros respecto a larvas de lepidópteros, así como la preferencia por éstas últimas, puede estar basada en la coevolución de los coleópteros contra los patógenos de suelo, entre ellos, los nematodos parásitos de insectos. Se cree que los coleópteros han desarrollado, por mecanismos evolutivos, una serie de barreras de comportamiento, morfológicas y fisiológicas contra la infección de nematodos (Koppenhöfer y Fuzi, 2003). Se conoce que el establecimiento y crecimiento de los parásitos en un huésped, requiere superar barreras abióticas (dependientes de las condiciones fisiológicas) y barreras bióticas (relacionadas con el estado inmunitario del hospedador (Atías, 1997).

En cuanto al comportamiento de los insectos utilizados en las experiencias, puede señalarse que las larvas de *T. molitor* fueron menos móviles que las de *G. mellonella*, lo que implicaría que, independientemente de la estrategia de localización del huésped, los JIs de *S. rarum* (OLI), tuvieron mayor posibilidad de parasitar a los lepidópteros. Por otro lado, se conoce que los representantes de la familia Steinernematidae penetran en el cuerpo de sus hospedadores a través de aberturas naturales (Burnell & Stock, 2000), aunque se ha detectado que algunas especies de esta familia penetran por cualquier parte del cuerpo del insecto, mediante la utilización de secreciones histolíticas (Dowds y Peters, 2002). Hasta el momento no se conoce

cuál es el mecanismo de penetración utilizado por los JIs de *S. rarum* (OLI); de poseer tal vía de infección, el tegumento de las larvas de *T. molitor* con mayor cantidad de quitina respecto al de *G. mellonella*, constituiría una barrera morfológica. Otro factor a considerar son las diferentes calidades nutritivas de los insectos utilizados en las experiencias. Ambos hospedadores difieren principalmente en el contenido de grasa, calcio y vitamina C (Cole, com. pers.). Las dietas suministradas a los mismos, acentuarían las diferencias entre ellos.

Los resultados obtenidos evidenciarían una marcada preferencia de los JIs de *S. rarum* (OLI) por larvas de lepidópteros. Ésta, podría ser atribuida a que, tal como ha sido señalada para otros aislados, estarían extremadamente bien adaptados para infectar larvas de lepidópteros y menos adaptados para infectar algunas larvas de coleópteros (Koppenhofer y Kaya, 1999; Doucet et al., 1999).

Usualmente la mortalidad de los insectos está significativamente influenciada por las diferentes dosis o el tamaño del inóculo de los nematodos (Selvan et al., 1993). Sin embargo, poco se conoce sobre el nivel de mortalidad causado por una dosis constante de JIs y una cantidad variable de hospedadores. Un trabajo en el que se aborda el tema de esta manera es el realizado por Mráček et al. (1999), en el que se mide la infectividad de *Steinernema kraussei* a una densidad variable de larvas de *G. mellonella* (2, 4, 6, 8 y 16). Con una dosis de 200 JIs, obtuvo como resultado, que a menor número de larvas (n=2) menor es la mortalidad causada por *S. kraussei* (70 %) y la máxima mortalidad (95%) fue obtenida con una densidad de hospedadores intermedia (n=8). En el presente trabajo, con una dosis de 150 JIs de *S. rarum* (OLI), a medida que se incrementó el número de insectos (de ambas especies), los porcentajes de mortalidad fueron disminuyendo. Cabe aclarar que en el tratamiento con una larva de *G. mellonella* se obtuvo una mortalidad del 70%, posiblemente debido a que tres de dichos hospedadores murieron tempranamente por microorganismos no simbiosis de nematodos.

Ante la exposición simultánea de ambas especies de hospedadores el patrón de mortalidad fue similar al obtenido al considerar a las especies de manera individual.

Si bien se observó una menor mortalidad a mayor número de hospedadores utilizados, el número promedio de hospedadores muertos por cápsula de Petri, en cada tratamiento, aumentó al aumentar su disponibilidad.

Respecto al total de nematodos que ingresaron a los insectos, por cápsula de Petri, se observó que al aumentar el número de hospedadores (para las dos especies), aumentó la cantidad de JIs que ingresaron, aunque dicho aumento no se produjo de manera proporcional. Estudios efectuados sobre la capacidad infectiva de los nematodos, demostraron que, de la población total de JIs que se ponen en contacto con insectos susceptibles, sólo una pequeña proporción (inferior al 40%) es capaz de ingresar (Hominick y Reid, 1990). Ensayos efectuados sobre *Steinernema* spp. y diferentes densidades de hospedadores, indican que la proporción de JIs capaz de infectar sigue una curva sigmoideal, es decir, cuando hay una cantidad alta o baja de hospedadores disponibles, la cantidad de JIs hallados es independiente de la densidad de insectos y a densidades intermedias, los JIs

que ingresan aumenta considerablemente (Campbell et al., 1999).

De la proporción de JIs que no penetran en los hospedadores, se distinguen individuos permanentemente no infecciosos y otros temporariamente no infecciosos. El incremento de hospedadores, produce un aumento en la tasa de encuentro y en la concentración de señales que éstos emiten; en consecuencia, la cantidad de JIs temporariamente no infectantes disminuye, por lo tanto, la infección depende de la densidad de hospedadores (Campbell et al., 1999).

Por otro lado, diferentes estudios revelan que los JIs muestran una mayor preferencia por insectos previamente infectados que por insectos no infectados, es decir, que el ingreso de JIs no es al azar, sino que tienden a parasitar a un hospedador ya colonizado (Grewal et al., 1993; Campbell et al., 1999). Sin embargo, el ingreso de JIs en cada insecto no ocurre indefinidamente, sino que se produce sólo hasta llegar cierto punto (Campbell et al., 1999). Colonizar un insecto no infectado puede tener un gran riesgo de mortalidad para el nematodo o dificultar el encuentro de sexos, lo que implicaría una reducción de su eficacia biológica (Campbell et al., 1999).

En este estudio, el número de JIs que ingresaron a cada insecto disminuyó al aumentar la cantidad de hospedadores disponible. Por otro lado, se registró para todos los tratamientos, un número mayor de JIs en el interior de larvas de *G. mellonella*.

Los resultados alcanzados estarían indicando que la proporción de JIs de *S. rarum* (OLI) capaces de infectar no aumentó considerablemente por más que dispusieran de una mayor cantidad de hospedadores. Al mismo tiempo, la población infectante se distribuyó uniformemente entre los hospedadores parasitados.

En cuanto al desarrollo de los nematodos encontrados en el interior de los hospedadores, se observó una marcada diferencia en cuanto a la proporción de hembras de *S. rarum* (OLI), respecto a la de machos, tanto en *G. mellonella* como en *T. molitor*. Este predominio de hembras respecto a machos ha sido encontrado en trabajos previos. Grewal et al., (1993), encontró para diferentes especies del género *Steinernema* que se desarrollaron sobre larvas de *G. mellonella*, una proporción de hembras de entre 58-62%. Similar proporción de hembras (54%) fue encontrada por Gaugler et al., 1990 en varios aislados de *S. carpocapsae* y por Bednarek et al., 1986, en un aislado polaco de *S. carpocapsae* (57%). La maduración de los JIs del género *Steinernema* en adultos hembras o machos estaría aparentemente determinada genéticamente -XX / XO- (Burnell, y Stock, 2000). Esto explicaría que en nuestra experiencia la proporción macho-hembra se haya mantenido independiente de la especie, el número de hospedadores y de la cantidad de JIs que ingresaron a los mismos.

Por otro lado, Grewal et al., 1993, encontró que los JIs que se diferencian en machos, migran y penetran a los hospedadores antes que las hembras. Las hembras luego buscarían e ingresarían a los insectos donde ya hay machos, esto significaría un aumento en la probabilidad de encuentro de ambos sexos en un hospedador (Downs y Griffin, 1996).

Al observar el comportamiento de los JIs de *S. rarum* (OLI) en la localización de hospedadores, se encontró a

insectos infectados, aún cuando éstos estaban inmobilizados y a una distancia considerable respecto a los nematodos. Estos datos nos permiten afirmar que los JIs de *S. rarum* (OLI) poseen un comportamiento de buscar al hospedador (estrategia de los nematodos cazadores). Por otro lado el hecho que se haya observado a JIs de *S. rarum* (OLI) ubicados sobre partículas de arena y moviendo la región anterior de su cuerpo, en una posición de espera de un hospedador, podemos afirmar que poseen además la estrategia de emboscada (Campbell y Gaugler, 1993). El comportamiento descrito para *S. rarum* (OLI), es similar al observado por Koppenhöfer y Kaya, 1999, para *S. rarum* Sargento Cabral.

En base a que los JIs de *S. rarum* (OLI), poseen los dos comportamientos de localización (por momentos buscador y por momentos de espera) se estarían asegurando el parasitismo, es decir, se adaptarían a las características particulares de los insectos y del ambiente en donde se encuentren, ampliando el rango de hospedadores que podrían infectar, manifestándose como un nematodo ideal para ser aplicado a campo.

Uno de los factores que restringe el uso de los nematodos entomopatógenos en el control de plagas es la estrategia de localización de hospedadores (Koppenhöfer y Kaya, 1999). Por ésta razón se hizo inminente conocer el comportamiento de *S. rarum* (OLI) para aplicar a este aislado en un futuro como un insecticida biológico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de la Secretaría de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. Proyecto: 05/I676.

REFERENCIAS

- [1] Alatorre-Rosas, R. y Kaya, H. K. (1990), "Interspecific Competition between Entomopathogenic Nematodes in the Genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an Insect Host in Sand". *Journal of Invertebrate Pathology* 55:179-188.
- [2] Atias, A. (1997). "El Hospedero. La Relación Hospedero-Parasito". En *Parasitología Médica*, pp. 49 - 54. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago de Chile, Chile.
- [3] Bedding, R. A. y Akhurst R. J. (1975). "A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil". *Nematologica* 21(1): 109-110.
- [4] Bedding, R. A., Molineux, A. S. y Akhurst, R. J. (1983), "*Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp. and *Steinernema kraussei*: Interspecific and Intraspecific Differences in Infectivity for Insects". *Experimental Parasitology* 55(2): 249-257.
- [5] Bednarek, A., Nowicki, T. y Wojcik, W.F. (1986), "Sex structure in populations of *Steinernema feltiae*". *Zesz. Probl. Postepow Nauk Roln* 325: 213-223.
- [6] Burnell, A. M. y Stock, S. P. (2000), "*Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects". *Nematology* 2(1): 31-42.
- [7] Byers, J. A. y Poinar, G. O. Jr. (1982), "Location of insect hosts by the nematode *Neoplectana carpocapsae* in response to temperature". *Behavior* 79: 1-10.
- [8] Cagnolo, S., Donari, Y. y Di Rienzo, J., 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.
- [9] Campbell, J. F. y Gaugler, R. (1993), "Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of

- entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae)". *Behavior* 126: 155-169.
- [10] Campbell, J. F., Koppenhöfer, A. M., Kaya, H. K. y Chinnasri, B. (1999), "Are there temporarily non-infectious dauer stages in entomopathogenic nematode populations: a test of the phased infectivity hypothesis?". *Parasitology* 118: 499-508.
- [11] Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W., (2011), *InfoStat versión 2011*. Argentina, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- [12] Doucet, M. M. Agüera de, Doucet, M. E. y Nienstedt, K. (1992), "Diferencias inter e intra específicas en la capacidad infectiva de poblaciones de *Heterorhabditis* y *Steinernema* aislados en Argentina". *Nematropica* 22: 237-242.
- [13] Doucet, M. M. Agüera de, Bertolotti, M. A., Giayetto, A. L. y Miranda, M. B. (1999), "Host Range, Specificity and Virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum* and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina". *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 237-242.
- [14] Downs, M. J. y Griffin, C. T. (1996), "Dispersal Behavior and Transmission Strategies of the Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema*". *Biocontrol Science and Technology* 6: 347-356.
- [15] Dowds, B. C. A. y Peters, A. (2002), "Virulence mechanisms". En *Entomopathogenic Nematology*. pp. 79-93. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA.
- [16] Gaugler, R., Campbell, J. F. y McGuire, T. (1990), "Selection for host finding in *Steinernema feltiae*". *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 363-372.
- [17] Gaugler, R., Campbell, J. F. y Gupta, P. (1991), "Characterization and basis of enhanced host-finding in a genetically improved strain of *Steinernema carpocapsae*". *Journal of Invertebrate Pathology* 57(2): 234-241.
- [18] Georgis, R. y Gaugler R. (1991), "Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes". *Journal of Economic Entomology* 84: 713-720.
- [19] Glazer, I. y Lewis, E. E. (2000), Bioassays of entomopathogenic nematodes. En *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Bet Dagan, Israel, pp.229-247, CABI Publishing, Wallingford, UK.
- [20] Gouge, D. H., Lee, L. L. y Henneberry, T. J. (1999), Effect of temperature and lepidopteran host species on entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) infection. *Environmental Entomology* 28, [Abstr.]
- [21] Grewal, P. S., Selvan S, Lewis, E. E. y Gaugler R. (1993), "Male insect-parasitic nematodes: a colonizing sex". *Experimenta* 49: 605 - 608.
- [22] Grewal, P. S., Selvan S. y Gaugler R. (1994), "Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breath for infection, establishment, and reproduction". *Journal of Thermal Biology* 19: 245-253.
- [23] Hazir, S. P., Kaya H. K., Koppenhöfer, A. M. y Keskin, N. (2001). Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 77, [Abstr.]
- [24] Hominick, W. M. y Reid, A. P. (1990). Perspectives on entomopathogenic nematology. En *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* pp. 327-345. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [25] Ishibashi, N. y Kondo, E. (1990). Behavior of Infective Juveniles. En *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. pp. 139-153. CRC Press Boca Raton, Florida.
- [26] Kaya, H. K. (1990). Soil ecology. En *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. pp. 93-147. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [27] Kaya, H. K. y Gaugler, R. (1993), "Entomopathogenic nematodes". *Annual Review of Entomology* 38: 181-206.
- [28] Kondo, E., Ishibashi, N. (1986). Nictating behavior an infectivity of the entomogenous nematode *Steinernema* spp. to the larvae of common cutworm *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), on the soil surface. *Japanese Journal of Applied of Entomology and Zoology* 21: 553-560.
- [29] Koppenhöfer, A. M. y Kaya, H. K. (1999). "Ecological characterization of *Steinernema rarum*". *Journal of Invertebrate Pathology* 73(1): 120-128.
- [30] Koppenhöfer, A. M., Grewal, P. S. y Kaya, H. (2000a). "Ecological characterization of *Steinernema monticolum*, a cold adapted entomopathogenic nematode from Korea". *Nematology* 2: 407-416
- [31] Koppenhöfer, A. M., Grewal, P. S. y Kaya, H. K. (2000b). "Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: The mechanism". *Entomological of Experimental* 94: 283-293.
- [32] Koppenhöfer, A. M. y Fuzy, E. M. (2003). "Ecological characterization of *Steinernema scarabei*, a scarab-adapted entomopathogenic nematode from New Jersey". *Journal of Invertebrate Pathology* 83(2): 139-148.
- [33] Lewis, E. E., Gaugler, R. y Harrison, R. (1992), "Entomopathogenic nematode host finding: relevance of host contact cues to cruise and ambush foragers". *Parasitology* 105: 309-315.
- [34] Lewis, E. E., Gaugler, R. y Harrison, R. (1993), "Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues". *Canadian Journal of Zoology* 71: 765-769.
- [35] Miller, J. R. y Strickler, K. L. (1984). Finding and accepting host plants. En Bell, W. y Cardé, R. (Ed.). *Chemical Ecology of Insects*, London, pp. 127-57
- [36] Molyneux, A. S. y Bedding, R. A.(1984), "Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*". *Nematologica* 30: 358-365.
- [37] Montgomey, D. C. (1991), Design and analysis of experiments. John Wiley and Sons Eds., Singapur, pp. 668.
- [38] Mráček, Z., Běčvář, S., Kindlmann, P. y Webster, J. M. (1999), "Factors Influencing the Infectivity of Canadian Isolate of *Steinernema kraussei* (Nematoda: Steinernematidae) at low temperature". *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 243-247.
- [39] Ogura, N. (1993), "Control of scarabacid grubs with an entomopathogenic nematode *Steinernema kushidai*". *Japanese Agriculture Res.* 27: 49-54.
- [40] Poinar, G. O. Jr., Mráček, Z. y Doucet, M. M. Agüera de (1988), "A re- examination of *Neoplectana rara* Doucet, 1986 (Steinernematidae: Rhabditida)". *Revue. Nématol.* 11, 447-449.
- [41] Pye, A. E. y Burman, M. (1981), "*Neoplectana carpocapsae*: Nematode accumulations on chemical an bacterial gradients". *Experimental parasitology* 51:13-20.
- [42] Selvan, S., Campbell, J. F. y Gaugler, R. (1993), "Density dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host". *Journal of Invertebrate Pathology* 62, 278-284.
- [43] Stock S. P., Mráček Z., y Webster J. M. (2000), "Morphological variation between allopatric populations of *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) (Rhabditida: Steinernematidae)". *Nematology* 2(2): 143-152.
- [44] Thomas, G. M. y Poinar, G. O. Jr. (1979), "*Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic and nematophilic of the family Enterobacteriaceae". *International Journal of Sistematic Bacteriology* 29: 352-360.