



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS BIO-ECOLÓGICAS DE
UN AISLAMIENTO AUTÓCTONO DEL ENTOMONEMÁTODO
Heterorhabditis bacteriophora (NEMATODA:
HETERORHABDITIDAE) Y SU POTENCIALIDAD COMO AGENTE
BIOREGULADOR DE INSECTOS**

Trabajo de investigación para optar por el
título de Doctor en Ciencias Naturales

Licenciada Eliceche, Daiana Pamela

Directoras: Dra. Achinelly, Maria Fernanda
Dra. Camino, Nora Beatriz

2019



A mi papá que no pudo acompañarme en este trayecto, pero fue un motor fundamental en mi desarrollo personal

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia y especialmente a mi mamá, por el acompañamiento y sostenimiento a lo largo de toda mi formación académica.
- A mi directora, Dra. Maria Fernanda Achinelly, por su acompañamiento y apoyo incondicional, tanto a nivel profesional como personal. Rescatando su dedicación y compromiso.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio de Nematodos de vida libre y de importancia agro-económica del CEPAVE: Mati Rosales, Agus y Mati Rusconi. Especialmente a Mati Rosales, quien colaboró con el desarrollo de gran parte de las experiencias realizadas en este estudio, compartiendo extensas jornadas laborales, los viajes al campo y los mates.
- A mis amigos y amigas, por el apoyo incondicional: Lara, Dai, Cata, Marta, Julia, Emilia, Nati, Ro, Dani, Eva, Piqui, Agus, Leo, Fer y Nico.
- Al Dr. Walter Ferrari del laboratorio de Biología molecular del CEPAVE. Por la formación académica recibida, la colaboración brindada en ensayos de microbiología, por la predisposición y la buena onda.
- A mis compañeros/as becarios/as del CEPAVE. Especialmente a Estefania Rizzo que me ayudó con las tareas de campo.
- A mis compañeras/os de la Escuela Secundaria N°4.
- A Graciela Minardi, por su colaboración con los análisis estadísticos.
- A Laura Morote, por el diseño de la portada de este trabajo y láminas.
- A los productores hortícolas Susana, Mariano y Guillermo, por brindarme el espacio para el desarrollo de las experiencias a campo.
- A investigadores de otras instituciones que han colaborado con el desarrollo de análisis genéticos y bioquímicos: Al Dr. Diego Sauka del Instituto de Investigación Microbiología y Zoología Agrícola y al Dr. Leopoldo Palma del Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María.
- A la Dra. Guadalupe Del Rio por la identificación taxonómica de los gorgojos.
- Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), a su directora Dra. Graciela Navone, a su co-directora, Dra. Nancy Greco, y a su ex directora Dra. Alda Gonzalez por haberme permitido la realización de mis tareas de investigación en dicho centro.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mi estudio de posgrado mediante el otorgamiento de la beca, y a la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP-FCNYM) por la formación académica recibida.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	9
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	16
NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS: BIOLOGÍA, TAXONOMÍA Y ECOLOGÍA.	16
LOS NEPs COMO AGENTES DE BIOCONTROL: POTENCIALIDADES, RANGO HOSPEDADOR Y SITUACIÓN EN ARGENTINA	19
PLAGAS Y NEPs EN EL CINTURÓN HORTÍCOLA BONAERENSE	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
CAPÍTULO I: Caracterización de un nuevo aislado del nematodo entomopatógeno, <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> procedente del Cinturón Hortícola Platense.....	37
INTRODUCCIÓN	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL NEMATODO	38
1. ÁREA DE ESTUDIO Y AISLAMIENTO	38
2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	41
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	41
B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE.....	41
1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA	41
2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	42
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	42
TÉCNICA MALDI-TOF	42
ANÁLISIS DEL ADN	42
RESULTADOS	44
A. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> SUP CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR	44
2. MORFOLOGÍA.....	44
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	47
B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE.....	47

1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA	47
2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	48
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	48
DISCUSIÓN.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53
CAPITULO II: Producción de NEPs. Optimización de la cría del nematodo <i>H. bacteriophora</i> SUP.....	58
INTRODUCCIÓN	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
A. PRODUCCIÓN <i>IN VIVO</i> de NEPs.....	59
1. CRÍA DE INSECTOS: <i>Tenebrio molitor</i>	59
2. INOCULACIÓN DE INSECTOS	59
3. COSECHA DE NEMATODOS: TRAMPA WHITE MODIFICADA	59
4. CUANTIFICACIÓN.....	59
5. ALMACENAMIENTO.....	60
B. FACTORES QUE AFECTAN LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	61
1. INFECTIVIDAD Y TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN	61
2. CONCENTRACIÓN Y TIEMPO LETAL 50 Y 90	61
3. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y TIEMPO DE VIDA DE LOS JUVENILES INFECTIVOS (JIs) SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN.....	61
4. SUPERVIVENCIA Y LONGEVIDAD DE JIS ALMACENADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y DENSIDAD.....	62
5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	63
6. EFECTO DE LA SUPERFICIE DE APLICACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	63
7. EXPOSICIÓN DE JIs NO INFECTIVOS A LA BACTERIA SIMBIÓTICA PARA RECUPERACIÓN DE LA PATOGENIA.....	63
C. PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE NEPs.....	64
1. AISLAMIENTO DE <i>Photorhabdus luminescens</i>	64
2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VIABILIDAD DE LA BACTERIA	64
RESULTADOS	65
B. FACTORES QUE AFECTAN LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	65
1. INFECTIVIDAD Y TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN	65
2. CONCENTRACIÓN Y TIEMPO LETAL 50 Y 90	65

3.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y TIEMPO DE VIDA DE LOS JUVENILES INFECTIVOS (JI) SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	66
4.	SUPERVIVENCIA Y LONGEVIDAD DE JIS ALMACENADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y DENSIDAD.....	70
5.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	70
6.	EFFECTO DE LA SUPERFICIE DE APLICACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	70
7.	EXPOSICIÓN DE JIs NO INFECTIVOS A LA BACTERIA SIMBIÓTICA PARA RECUPERACIÓN DE LA PATOGENIA.....	71
C.	PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE NEPs.....	74
	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VIABILIDAD DE LA BACTERIA	74
	DISCUSIÓN.....	76
	BIBLIOGRAFÍA.....	80
	CAPITULO III: Evaluación de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> SUP para el control de <i>Lobiopa insularis</i> (Coleoptera: Nitidulidae) en condiciones de laboratorio y campo	84
	INTRODUCCIÓN	84
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
A.	ENSAYOS DE LABORATORIO	85
1.	COLECTA DE INSECTOS.....	85
2.	CRÍA E IDENTIFICACIÓN DE INSECTOS.....	86
3.	SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE <i>L. insularis</i> A <i>H. bacteriophora</i> SUP.....	86
4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 Y 90.....	87
5.	CONCENTRACIÓN, INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	87
6.	PRUEBAS DE INFECTIVIDAD A PARTIR DE JIS EMERGIDOS DE CADÁVERES DE <i>Lobiopa insularis</i>	87
B.	INTRODUCCIÓN A CAMPO DE <i>H. bacteriophora</i> SUP EN CULTIVOS DE FRUTILLA COMO POTENCIAL AGENTE DE CONTROL DE <i>L.insularis</i>	88
1.	SITIO DE APLICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL CULTIVO.....	88
2.	MONITOREO DE LA PLAGA.....	88
3.	RELEVAMIENTO DE NEPs EN SUELO.....	89
4.	LIBERACIÓN INUNDATIVA DE JIs PARA EL CONTROL DE <i>Lobiopa insularis</i>	89
5.	DISPERSIÓN Y PERSISTENCIA DE LOS NEMATODOS.....	89
	RESULTADOS	90

A. ENSAYOS DE LABORATORIO	90
3. SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE <i>L. insularis</i> A H. <i>bacteriophora</i> SUP.....	90
4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL (CL50 Y CL90).....	90
5. CONCENTRACIÓN, INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN	90
B. ENSAYOS DE CAMPO	93
3. MONITOREO DE LA PLAGA.....	93
4. RELEVAMIENTO DE NEPs EN SUELO.....	94
5. LIBERACIÓN INUNDATIVA DE JIs PARA EL CONTROL DE <i>Lobiopa insularis</i>	94
6. DISPERSIÓN Y PERSISTENCIA DE LOS NEMATODOS	96
DISCUSIÓN.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	100
CAPITULO IV: Evaluación de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> SUP como potencial agente de control de <i>Phyrdenus muriceus</i> (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio y campo	103
INTRODUCCIÓN	103
MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
A. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO	104
1. SITIO DE MUESTREO Y COLECTA DE INSECTOS	104
2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE <i>P.</i> <i>muriceus</i> FRENTE A <i>H. bacteriophora</i>	106
B. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO	106
1. ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA DE LA PLAGA	106
2. LIBERACIÓN DE <i>H. bacteriophora</i> SUP EN CULTIVO DE BERENJENA.....	106
3. PERSISTENCIA Y DISPERSIÓN DE LOS JIS APLICADOS EN BERENJENA.....	108
RESULTADOS	109
A. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO	109
2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE <i>P.</i> <i>muriceus</i> FRENTE A <i>H. bacteriophora</i>	109
B. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO	109
1. ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA DE LA PLAGA	109
2. LIBERACIÓN DE <i>H. bacteriophora</i> SUP EN CULTIVO DE BERENJENA.....	109
3. PERSISTENCIA Y DISPERSIÓN DE LOS JIS APLICADOS EN BERENJENA.....	112
DISCUSIÓN.....	114

BIBLIOGRAFÍA.....	116
CONCLUSIONES GENERALES	120
CONCLUSIÓN FINAL.....	121
PERSPECTIVAS FUTURAS	122

RESUMEN

Algunos nematodos parásitos de insectos tienen relaciones simbióticas con bacterias que son responsables de matar rápidamente a los insectos parasitados. A causa de esta muerte rápida, el término entomopatógenos es utilizado para describir a estos nematodos. Los nematodos entomopatógenos de las familias Heterorhabditidae forman una simbiosis mutualista con bacterias patógenas de insectos de la familia Enterobacteriaceae, específicamente del género *Photorhabdus*. Los juveniles infectivos (JIs) permanecen en el suelo en busca de un insecto hospedador adecuado. Tras la entrada a través de la cutícula o las aberturas naturales del hospedador, los JIs liberan las bacterias simbióticas en el hemocel de los insectos, provocando la muerte del mismo dentro de las 24-48 hs. Los nematodos se alimentan de las bacterias simbióticas, completan 1-3 generaciones en el cadáver del hospedador y, a medida que se agotan los recursos alimenticios, se producen nuevos JIs que se dispersan en busca de nuevos hospedadores.

La variabilidad del complejo nematodo-bacteria, condiciona su virulencia, la cual a su vez se relaciona con el área de procedencia. Las especies nativas son consideradas en programas de control biológico de plagas respecto a especies introducidas, ya que se espera estén adaptadas a las condiciones locales, incluyendo a la propia plaga. El relevamiento de muestras de suelo provenientes de una huerta orgánica del cinturón hortícola platense, reveló la presencia de un nuevo aislado de *Heterorhabditis bacteriophora*, estudios morfológicos y moleculares, mostraron que las características morfológicas fueron cualitativamente similares a la de otras poblaciones de *Heterorhabditis* citadas y los análisis bioinformáticos permitieron determinar que este nematodo fuera un nuevo aislamiento de *H. bacteriophora*, el cual fue designado como *Heterorhabditis bacteriophora* SUP. Esta población representa un nuevo registro para el cinturón hortícola platense. A su vez, mediante estudios de morfología de las colonias, pruebas bioquímicas, biotipificación y análisis moleculares se caracterizó la bacteria endosimbionte asociada a este aislamiento como *Photorhabdus luminescens*. El uso excesivo de agroquímicos y la carencia de productos para control de plagas constituye uno de los principales problemas en el cinturón hortícola bonaerense por lo cual los enemigos naturales (parásitos, patógenos y depredadores) constituyen una alternativa de control de plagas de importancia agroeconómica. La caracterización de los diferentes aislados es necesaria para la búsqueda de nuevas alternativas al uso de agroquímicos para el control de plagas en la región.

El uso y éxito de estos organismos a campo como agentes de biocontrol exige una metodología eficiente de producción que proporcione altas densidades de JIs sin alterar su virulencia. Cuando se aísla un agente de control biológico a partir de un ambiente natural y es criado en el laboratorio, o producido en masa con fines comerciales, sus atributos biológicos pueden alterarse dando lugar a la disminución y pérdida de la patogenicidad y la longevidad durante los procesos de producción, desarrollo y formulación, afectando la viabilidad de los productos comerciales. Varios factores podrían afectar su eficacia, entre ellos, la selección del hospedador para la cría *in vivo*. *Tenebrio molitor* se mostró susceptible a *H. bacteriophora* SUP cuya infectividad resultó ser mayor conforme al aumento de concentración de JIs, obteniéndose menores tiempos letales, sin embargo, la mayor producción de JIs se obtuvo con las menores concentraciones de exposición evaluadas. Dada la susceptibilidad de las larvas de *T. molitor* a la cepa en estudio, el uso de estos insectos como insectos de cría para la

producción *in vivo* de *H. bacteriophora* representa una alternativa viable respecto al uso de *Galleria melonella*, debido a la facilidad para criarlos en el laboratorio y a los bajos costos económicos asociados. En este sentido, para maximizar la producción de este aislamiento deberían utilizarse las concentraciones más bajas. La viabilidad es otro factor a considerar, durante sus condiciones de almacenamiento, la temperatura y la densidad afectaron la supervivencia media de los JIs almacenados, resultando esta menor conforme aumenta la temperatura y a su vez por incremento de la densidad; resultando más adecuadas para su almacenamiento las temperaturas de 4 y 16°C y bajas concentraciones de JIs. A pesar de garantizar una amplia supervivencia, la temperatura de 4°C redujo significativamente la virulencia de los nematodos almacenados sin pasar por un hospedador. En cuanto a la eficacia de los JIs, la infectividad de la cepa en estudio fue mayor a superficies intermedias de exposición, obteniéndose mayores porcentajes de mortalidad con una concentración de 1000 JIs en capsulas de 10 cm respecto a 5 y 25 cm. En concordancia con la zona de origen de este aislamiento, caracterizada por un clima templado a cálido con un promedio anual de temperatura de 17°C, la viabilidad de la cepa, reproducción, actividad, infectividad y supervivencia resultaron óptimas en un rango de temperatura de 16 a 25°C, siendo 16°C la temperatura más adecuada para su mantenimiento en el laboratorio en pos de asegurar una alta longevidad, supervivencia y virulencia sostenida en el tiempo. La infectividad de los JIs podría estar relacionada con la viabilidad de su bacteria endosimbionte, en este sentido, las pruebas de viabilidad en medio líquido para *P. luminescens*, permitieron establecer un rango de temperatura de 16 a 25°C en el cual las bacterias sobrevivieron por más de 20 semanas.

La utilización de enemigos naturales constituye uno de los pilares del manejo integrado de plagas, cuyo objetivo es reducir por debajo del nivel de daño económico la población de una plaga por medio de la utilización de diferentes estrategias de control, entre las que se encuentran el control biológico. En la Provincia de Buenos Aires la horticultura es una de las actividades agrícolas más importantes. Los reportes de plagas emergentes en huertas de producción orgánica, como el coleóptero *Lobiopa insularis* en cultivos de frutilla y *Phyrdenus muriceus* en cultivos de berenjena hace necesaria la búsqueda y evaluación de enemigos naturales para su uso en control biológico.

La susceptibilidad de estos coleópteros al aislamiento caracterizado en este estudio fue probada. El aislamiento nativo *H. bacteriophora* SUP resultó ser infectivo sobre *L. insularis*, registrándose una susceptibilidad decreciente de 77,10; 56,67 y 25,00%, para larvas, pupas y adultos, respectivamente. La mayor susceptibilidad de larvas y pupas, sumado al comportamiento de estos insectos de dirigirse al suelo para empupar, los convierte en un blanco adecuado para el control con nematodos entomopatógenos. *H. bacteriophora* SUP pudo completar el ciclo en todos los estados de desarrollo de *L. insularis*, lo cual mejoraría el establecimiento y la propagación de este aislamiento tras una aplicación en el campo.

Dada la susceptibilidad registrada y la factibilidad de su empleo en el control de los estados del coleóptero, se realizó una evaluación a campo, la cual incluyó la liberación de los JIs en la estación experimental Julio Hirschhorn ubicada en Los Hornos, Provincia de Buenos Aires para evaluar el efecto de control sobre *L. insularis* en cultivos de frutilla. Previo a la liberación se realizó un monitoreo en el cual se registró el número de frutillas presentes en el cultivo, se contabilizaron y clasificaron las frutillas por estado de maduración (verde, roja y fermentada) y se contabilizó el número de coleópteros por fruta examinada. La aplicación se

realizó por medio de suspensiones acuosas de JIs. Se trataron un total de 6 parcelas, utilizando una concentración de 10.000 JIs por planta, y se marcaron otras 6 como controles. Los registros post-aplicación no arrojaron diferencias significativas entre parcelas tratadas y controles. Sin embargo, al comparar los registros pre-aplicación y post-aplicación, se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de frutillas atacadas, 32% para los registros pre-aplicación y 28 y 17% para parcelas control y tratadas post-aplicación, respectivamente. Estas diferencias podrían ser atribuidas a una reducción del número de frutas disponibles como fuentes de alimento, y/o a la dispersión de los JIs desde las parcelas aplicadas hacia los controles. Los resultados indicaron que el 93,14% de los coleópteros se encontraron en las frutillas fermentadas, y que la proporción de frutillas fermentadas atacadas fue mayor a los otros estados. Por otro lado, la infectividad en trampas cebo colocadas en el campo demostró la persistencia de los nematodos durante el periodo evaluado (8 meses) y su dispersión a lo largo del cultivo. A los tres meses de ser aplicado se lo encontró en el 92% de las muestras de suelo colectadas, encontrándolos a lo largo de todos los camellones, incluidos los no tratados. *H. bacteriophora* SUP demostró varios atributos como potencial agente de control de *L. insularis*: se trata de una población adaptada a las condiciones ambientales y climáticas locales, provocó la muerte de los tres estados de la plaga, demostró un amplio poder de dispersión por medio de movimientos activos y/o pasivos, y a su vez pudo persistir en el ambiente. Las pruebas de laboratorio demostraron la susceptibilidad del coleóptero *Phyrdenus muriceus* a *H. bacteriophora* SUP, demostrando mayor virulencia frente a larvas y pupas, probablemente debido a la baja movilidad de estos estados respecto a los adultos. El nematodo pudo completar su ciclo en todos los estados evaluados. Dada la susceptibilidad de la plaga al aislamiento estudiado, la escasez de enemigos naturales y el nivel de daño ocasionado por los coleópteros en el momento de la plantación de los cultivos, pruebas de campo fueron realizadas con el objetivo de evaluar el control sobre *P. muriceus*. La liberación de *H. bacteriophora* SUP se realizó empleando dos metodologías de aplicación. El monitoreo de la plaga se estimó a partir del daño producido en las hojas, contabilizando el número de agujeros (daño) por hoja producidos por los gorgojos al alimentarse de la planta. Las evaluaciones realizadas luego de la primera aplicación, no mostraron un efecto positivo sobre la reducción de las poblaciones de *P. muriceus*. Los registros de daño en hojas no mostraron diferencias significativas entre tratamientos y controles, el rango de daño fue de 5,4- 6,1 agujeros/hoja; mientras que luego de una segunda aplicación de JIs, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, cuyo rango de daño promedio fue de 26,4 -42 agujeros/hoja.

Estas diferencias detectadas sumadas a la colecta de adultos de *P. muriceus* infectados con *H. bacteriophora*, permitieron determinar la eficacia de este nematodo sobre el control de esta plaga. A su vez, muestras de suelo fueron evaluadas mensualmente con el fin de conocer la persistencia y dispersión de los JIs aplicados en este cultivo. A partir de los datos obtenidos, se observó que dos meses después de la aplicación, los JIs se dispersaron a las parcelas asignadas como controles, ubicadas a 3 metros de los puntos de aplicación. Esto pudo deberse en parte al movimiento activo de los NEPs, y a su vez, a los movimientos pasivos, a través de hospedadores infectados, forosis y el agua. A partir de las muestras de suelo procesadas se pudo comprobar que durante siete meses el nematodo pudo persistir en el ambiente, lo cual podría deberse a la tolerancia de la larva dauer a la desecación y/o a la infección de nuevos

hospedadores. Sin embargo, la dispersión fue menor a la registrada en el cultivo de frutilla. Esto podría deberse a una distribución insuficiente de la humedad a lo largo del cultivo dado el tipo de riego utilizado, el cual se realiza por surcos de inundación, cuya eficiencia puede ser tan baja que puede llegar a menos del 40% del cultivo. Los resultados obtenidos indicarían que *H. bacteriophora* SUP, podría ser un potencial agente de control de *P. muriceus*, dada la susceptibilidad demostrada en condiciones de laboratorio, la reducción del daño foliar registrado en el campo en los tratamientos realizados, y la recuperación de ejemplares infectados con el nematodo aplicado.

Heterorhabditis bacteriophora SUP representa el primer registro de un nematodo entomopatógeno asociado a cultivos de tomate en el cinturón hortícola platense, sumándose a la lista de los enemigos naturales presentes en este cultivo, considerándose como un potencial agente de control de coleópteros plaga. Los resultados demostraron su potencialidad como biocontrolador de diferentes plagas agrícolas, debido a la factibilidad de producción en el laboratorio a la capacidad de infección, establecimiento y dispersión en condiciones naturales en dos agroecosistemas distintos.

ABSTRACT

Some insect parasitic nematodes have symbiotic relationships with bacteria that are responsible for rapidly killing parasitized insects. Because of this rapid death, the term entomopathogens is used to describe these nematodes. The entomopathogenic nematodes of the Heterorhabditidae family form a mutualistic symbiosis with insect pathogenic bacteria of the family Enterobacteriaceae, specifically of the genus *Photorhabdus*. Infective juveniles (IJs) remain in the soil in search of a suitable insect host. After entry through the cuticle or natural openings of the host, the IJs release the symbiotic bacteria in the hemocel of the insects, causing its death within 24-48 hours. The nematodes feed on the symbiotic bacteria, complete 1-3 generations in the corpse of the host and, as the food resources are depleted, new IJs are produced. These IJs disperse in search of new hosts.

The variability of the nematode-bacteria complex determines its virulence, which in turn is related to the area of origin. The native species are considered in programs of biological control of pests with respect to introduced species, since they are expected to be adapted to local conditions, including the pest itself. The survey of soil samples from an organic orchard of the Cinturón Hortícola Platense (CHP), revealed the presence of a new isolate of *Heterorhabditis bacteriophora*. Morphological and molecular studies, showed that the morphological characteristics were qualitatively similar to that of other populations of *Heterorhabditis* cited and the bioinformatic analysis allowed to determine that this nematode was a new isolation of *H. bacteriophora*, which was designated as *Heterorhabditis bacteriophora* SUP. This population represents a new record for the Cinturón Hortícola Platense (CHP). At the same time, by means of studies of colony morphology, biochemical tests, biotyping and molecular analysis, the endosymbiotic bacterium associated with this isolation was characterized as *Photorhabdus luminescens*. The excessive use of agrochemicals and the lack of products for pest control are one of the main problems in the Cinturón Hortícola de Buenos Aires, which is why natural enemies (parasites, pathogens and predators) constitute an alternative to control pests of agroeconomic importance. The characterization of

the different isolates is necessary for the search of new alternatives to the use of agrochemicals for the control of pests in the region.

The use and success of these organisms in the field as biocontrol agents requires an efficient production methodology that provides high densities of IJs without altering their virulence. When a biological control agent is isolated from a natural environment and is reared in the laboratory or mass produced for commercial purposes, its biological attributes can be altered resulting in the decrease and loss of pathogenesis and longevity during the processes of production, development and formulation, affecting the commercial product's viability. Several factors could affect its effectiveness, including the selection of the host for in vivo breeding. *Tenebrio molitor* was susceptible to *H. bacteriophora* SUP whose infectivity was higher according to the increase of IJs concentration, obtaining lower lethal times, however, the highest production of IJs was obtained with the lowest (saqué exposure) concentrations evaluated. Given the susceptibility of *T. molitor* larvae to the strain under study, the use of these insects as breeding insects for the in vivo production of *H. bacteriophora* represents a viable alternative to the use of *Galleria melonella*, due to the easy breeding in the laboratory and (saqué at) the associated low economic costs. Therefore, the lowest concentrations should be used to maximize the production of this isolate. Viability is another factor to be considered, during storage conditions, temperature and density affected the average survival of the stored IJs, being lower as the temperature increases and in turn increasing the density; the temperatures of 4 and 16 ° C and low concentrations of IJs are better suited for storage. Despite guaranteeing a broad survival, the temperature of 4 ° C significantly reduced the virulence of stored nematodes without going through a host. Regarding the efficacy of the IJs, the infectivity of the strain under study was higher than intermediate surfaces of exposure, obtaining higher mortality percentages with a concentration of 1000 IJs in 10 cm capsules compared to 5 and 25 cm. In agreement with this isolation origin zone, characterized by a temperate to warm climate with an annual average temperature of 17 ° C, the viability of the strain, reproduction, activity, infectivity and survival were optimal in a temperature range of 16 to 25 ° C, being 16 ° C the most adequate temperature for its maintenance in the laboratory in order to ensure a high longevity, survival and sustained virulence over time. The infectivity of the IJs could be related to the viability of their endosymbiotic bacteria. The viability tests in liquid medium for *P. luminescens*, allowed to establish a temperature range of 16 to 25 ° C in which the bacteria survived for more than 20 weeks.

The use of natural enemies is one of the foundations of integrated pest management, whose objective is to reduce the population of a pest below the level of economic damage through the use of different control strategies, among which are the biological control. In Buenos Aires Province, horticulture is one of the most important agricultural activities. Reports of emerging pests in organic production gardens, such as the Coleoptera *Lobiopa insularis* in strawberry crops and *Phyrdenus muriceus* in eggplant crops, make necessary to search for and evaluate natural enemies for their use in biological control.

The susceptibility of these coleoptera to the isolation characterized in this study was proven. The native isolation *H. bacteriophora* SUP was found to be infective on *L. insularis*, with a decreasing susceptibility of 77.10; 56.67 and 25.00%, for larvae, pupae and adults, respectively. The greater susceptibility of larvae and pupae, added to the behavior of these insects to go to the soil to pupate, make them an adequate target for control with

entomopathogenic nematodes. *H. bacteriophora* SUP was able to complete its life cycle in all stages of development of *L. insularis*, which would improve the establishment and spread of this isolation after application in the field.

Given the registered susceptibility and the feasibility of its use in the control of the coleoptera stages, an on-site evaluation was carried out, which included the release of the IJs in the Julio Hirschhorn experimental station located in Los Hornos, Buenos Aires Province to evaluate the control effect on *L. insularis* in strawberry crops. Prior to the release, a monitoring was carried out in which the number of strawberries present in the crop was recorded, the strawberries were counted and classified by ripening stage (green, red and fermented) and the number of coleoptera was counted per fruit examined. The application was made by means of aqueous suspensions of IJs. A total of 6 plots were treated, using a concentration of 10.000 IJs per plant, and another 6 were marked as controls. The post-application records did not show significant differences between treated plots and controls. However, when comparing pre-application and post-application records, significant differences were detected in the percentage of strawberries attacked, 32% for pre-application records and 17 and 28% for post-application treated plots and control, respectively. These differences could be attributed to a reduction in the number of available fruits as source of food, and / or to the dispersion of the IJs from the plots applied to the controls. The results indicated that 93.14% of the Coleoptera were found in the fermented strawberries, and that the proportion of fermented strawberries attacked was higher than the other states. On the other hand, the infectivity in bait traps placed in the field showed the persistence of the nematodes during the evaluated period (8 months) and their dispersion throughout the crop. Three months after application, it was found in 92% of the collected soil samples, finding them along all the ridges, including the untreated ones. *H. bacteriophora* SUP demonstrated several attributes as a potential control agent of *L. insularis*: it is a population adapted to local environmental and climatic conditions, it caused the death of the three stages of the pest, it demonstrated a high dispersion capacity by means of active and / or passive movements, and in turn could persist in the environment. The laboratory tests demonstrated the susceptibility of the Coleoptera *Phyrdenus muriceus* to *H. bacteriophora* SUP, demonstrating greater virulence against larvae and pupae, probably due to the low mobility of these states with respect to adults. The nematode was able to complete its life cycle in all the evaluated stages. Given the susceptibility of the pest to the studied isolation, the scarcity of natural enemies and the level of damage caused by the coleoptera at the time of planting the crops, field tests were conducted with the objective of evaluating the control of *P. muriceus*. The release of *H. bacteriophora* SUP was done using two application methodologies. The monitoring of the pest was estimated from the damage produced in the leaves, counting the number of holes (damage) per leaf produced by the weevils when feeding on the plant. The evaluations carried out after the first application did not show a positive effect on the reduction of *P. muriceus* populations. Leaf damage records showed no significant differences between treatments and controls, the damage range was 5.4-6.1 holes / sheet; while after a second application of IJs, significant differences were detected among the treatments, whose average damage range was 26.4 -42 holes / sheet.

These detected differences added to the collection of adults of *P. muriceus* infected with *H. bacteriophora*, allowed to determine the effectiveness of this nematode on the control

of this pest. In turn, soil samples were evaluated monthly in order to know the persistence and dispersion of the IJs applied in this crop. From the data obtained, it was observed that two months after the application, the IJs were dispersed to the plots assigned as controls, located 3 meters from the application points. This could be due in part to the active movement of NEPs, and in turn, to passive movements, through infected hosts, forestry and water. From the soil samples processed it was possible to verify that during seven months the nematode could persist in the environment, which could be due to the tolerance of the larvae to the desiccation and / or to the infection of new hosts. However, the dispersion was lower than that registered in the strawberry crop. This could be due to an insufficient distribution of moisture throughout the crop given the type of irrigation used, which is carried out by flooding furrows, whose efficiency can be so low that it can reach less than 40% of the crop. The obtained results would indicate that *H. bacteriophora* SUP, could be a potential control agent of *P. muriceus*, given the susceptibility demonstrated in laboratory conditions, the reduction of the foliar damage registered in the field in the treatments carried out, and the recovery of specimens infected with the applied nematode.

Heterorhabditis bacteriophora SUP represents the first record of an entomopathogenic nematode associated with tomato crops in the Cinturón Hortícola Platense (CHP), adding to the list of natural enemies present in this crop, considering itself as a potential control agent of coleoptera pests. The results showed its potential as a biocontroller of different agricultural pests, due to the feasibility of production in the laboratory to the capacity of infection, establishment and dispersion under natural conditions in two different agroecosystems.

INTRODUCCIÓN

NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS: BIOLOGÍA, TAXONOMÍA Y ECOLOGÍA.

Los nematodos también conocidos como gusanos redondos, comprenden un Phylum con una gran diversidad cuyos miembros explotan hábitat más variados que cualquier otro grupo de animales, a excepción de los artrópodos (Lewis y Clarke, 2012). Muchas especies están asociadas con invertebrados, y estas relaciones pueden abarcar desde fortuitas a antagonistas (Stock y Goodrich Blair, 2012). Los tipos de asociación entre los nematodos y los insectos varían desde una simple foresis hasta un parasitismo facultativo y obligado (Stock y Camino, 1996). Algunos nematodos parásitos de insectos tienen relaciones simbióticas con bacterias que matan a rápidamente a los insectos parasitados. A causa de esta muerte rápida, el termino entomopatógenos es utilizado para describir a estos nematodos (Stock y Goodrich Blair, 2012).

Entre los parásitos de invertebrados hay 30 familias de nematodos que están asociadas con insectos y otros invertebrados (Stock y Goodrich Blair, 2012). Siete de estas familias tienen potencial para ser consideradas como agentes de control biológico: Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae (Stock y Goodrich-Blair, 2012). La mayoría de las especies consideradas como entomopatógenas están clasificadas dentro de los Steinernematidae y Heterorhabditidae, sin embargo recientemente algunos miembros de los Rhabditidae han sido sugeridos como patógenos (Lewis y Clarke, 2012), como *Phasmarhabditis hermafrodita* (Schneider), quien suprime varias especies de babosas, y ha sido recientemente desarrollado como un molusquicida biológico (Stock y Goodrich Blair, 2012).

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) causan enfermedad en insectos por llevar una bacteria patógena que transportan en su intestino e introducen dentro del hemocele del insecto al parasitarlos (Lewis y Clarke, 2012). Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae están incluidas en esta categoría. Estas familias son únicas porque: (1) son los únicos nematodos que desarrollaron la habilidad de llevar e introducir la bacteria simbiótica dentro de la cavidad corporal del insecto, (2) son solo patógenos de insectos con un rango hospedador que incluye la mayoría de los órdenes y familias, (3) pueden ser cultivados a gran escala en medios artificiales, sólidos o líquidos (Gaugler y Kaya, 1990).

Inicialmente Steinernematidos y Heterorhabditidos fueron considerados como géneros cercanamente relacionados dentro de los Rhabditida. Esto se debió principalmente al hecho de que ambos géneros compartían muchas características morfológicas y tenían ciclos de vida muy similares, los cuales implican relaciones simbióticas altamente evolucionadas con géneros de bacterias específicas pero diferentes (Hunt, 2007). Estas dos familias pertenecen a dos líneas evolutivas diferentes dentro del orden Rhabditida. La familia Steinernematidae pertenece a la superfamilia Strongyloidoidea dentro del infraorden Panagrolaimomorpha, mientras que la Familia Heterorhabditidae pertenece a la superfamilia Strongyloidea dentro del infraorden Rhabditomorpha (Abd-Elgawad et al., 2017).

Los NEPs se encuentran asociados a bacterias simbióticas (*Xenorhabdus sp.* para *Steinernema* y *Photorhabdus* para *Heterorhabditis*). Las bacterias matan a los insectos,

proporcionan los nutrientes necesarios y coevolucionan con sus hospedadores nematodos, interviniendo en la interacción nematodo-insecto (Spiridonov, 2017).

FAMILIA STEINERNEMATIDAE. Panagrolaimomorpha: Strongyloidea. Parásitos de insectos y otros artrópodos. Los juveniles infectivos (JIs) no se alimentan, llevan una bacteria simbiótica entomopatógena perteneciente al género *Xenorhabdus*. Primera y segunda generación de adultos anfimíctica. Ovíparos a ovovivíparos (Hunt, 2007).

Caracteres diagnósticos: Estilete ausente; labios fusionados; estoma corto y ancho, esófago compuesto de un corpus cilíndrico, metacorus ligeramente ensanchado y un bulbo basal valvado; ovarios pareados, opuestos; testículos simples, espículas pareadas y separadas; gubernaculo presente, papilas genitales presentes; bursa ausente. Los Juveniles infectivos (JIs) que son los J3 con el poro excretor localizado anterior al anillo nervioso (Chitwood y Chitwood, 1937).

Hay dos géneros incluidos en la familia: *Neosteinerinema* y *Steinerinema*. *Neosteinerinema* contiene una única especie, *N. longicurvicauda* (Lewis y Clarke, 2012) y para *Steinerinema* se han descrito hasta el momento aproximadamente 90 especies según Labaude y Griffin (2018). Nematodos del género *Steinerinema* están asociados con bacterias del género *Xenorhabdus* (Lewis y Clarke, 2012). *Xenorhabdus spp.* parece colonizar una vesícula especializada similar a un ciego del intestino de los juveniles infectivos (Lewis y Clarke, 2012).

Ciclo de vida: El estadio juvenil infectivo (JI) es el único estadio del ciclo de vida que existe fuera del hospedador y es el estadio con capacidad de infectar hospedadores. Al igual que todos los nematodos, tienen seis estados de vida: el huevo, cuatro estadios juveniles, y el adulto (Lewis y Clarke, 2012). El juvenil infectivo es el tercer estadio juvenil, también conocido como larva “dauer”, el cual es particularmente resistente a las condiciones del ambiente. Generalmente conservan la cutícula correspondiente al segundo estadio larval, la cual les confiere resistencia a las condiciones ambientales adversas (Stock y Camino, 1996). Los JIs ingresan al hospedador a través de aberturas naturales, boca, ano y espiráculos. Solo dentro del hemocele del hospedador los juveniles mudan y liberan la bacteria dentro de unas pocas horas. La bacteria mata al hospedador por una combinación de toxinas y septicemia, una condición mórbida causada por la multiplicación de microorganismos en el hemocele (Steinhaus y Martignoni, 1970; Lewis y Clarke, 2012). Los nematodos comienzan su desarrollo y en pocas horas mudan al 4^{to} estadio larval y posteriormente maduran a adultos (Stock & Camino, 1996). Pueden ocurrir varias generaciones de adultos. Cada juvenil se desarrolla en un macho o una hembra y necesitan a un macho para la reproducción (Lewis y Clarke, 2012). Los steinerinematidos completa su ciclo de vida en 10-14 días según la especie (Stock y Camino, 1996).

FAMILIA HETERORHABDITIDE. Rhabditomorpha: Strongyloidea. Parásitos obligados de insectos y otros artrópodos. Los juveniles infectivos no se alimentan, llevan una bacteria simbiótica entomopatógena. Tienen una primera generación de adultos hermafrodita y una segunda generación de adultos anfimícticas. Ovíparos a ovovivíparos (Hunt, 2007).

Caracteres diagnósticos: Estilete ausente; cabeza truncada o ligeramente redondeada. Seis labios diferenciados presentes que podrían estar parcialmente fusionados en la base; cada

labio con una sola papila labial; dos papilas adicionales en la base de cada labio submedial; labios laterales con una sola papila cefálica y una abertura anfidial circular. Queilorhabdion presente como un anillo refractil en la porción anterior del estoma. Porción posterior del estoma colapsado, con pro-, meso- y meta- reducidos. Procorpus del esófago ancho y cilíndrico. Bulbo basal con placas valvales reducidas. Anillo nervioso diferenciado y usualmente localizado cerca del medio del istmo en hembras o del bulbo basal en machos. Hermafroditas con espermatozoides en la parte proximal del ovotestis y vulva funcional. Hembras anfimícticas con ovarios anfidelficos con porciones reflexas que a menudo se extienden más allá de la abertura de la vulva. Vulva no funcional para el pasaje de huevos. Cola punteaguda con una protuberancia postanal o anal. Bursa presente, abierta pelodera o pseudopelodera. Espículas pareadas y separadas. Gubernaculo presente. Nueve pares de papilas genitales. Juveniles infectivos (JIs) con poro excretor localizado posterior al anillo nervioso (Poinar, 1976). Esta familia incluye un único género, *Heterorhabditis* (Lewis y Clarke, 2012) y hasta el momento se han descrito aproximadamente 20 especies según Labaude y Griffin (2018). *Heterorhabditis* no posee una vesícula específica para alojar a la bacteria endosimbionte, sino que parece adherirse a la célula valvular pre intestinal, situada justo debajo de la faringe (Ciche et al., 2008; Lewis y Clarke, 2012).

Ciclo de vida: El ciclo de vida de estos nematodos es esencialmente el mismo que el de los steinernematidos. Al igual que ellos, la entrada en el hospedador se realiza a través de aberturas naturales (Stock y Camino, 1996). Sin embargo, Bedding y Molyneux (1982), observaron que los juveniles poseen, a diferencia de los steinernematidos, un “diente” con el cual penetran activamente a través de la cutícula del insecto en zonas donde la misma es más delgada, como los repliegues intersegmentales (Stock y Camino, 1996). El JI es el tercer estadio. Una vez dentro del hemocele del insecto los juveniles mudan y liberan la bacteria, matando al hospedador. En este punto, los JIs de heterorhabditidos desarrollan a adultos hermafroditas y producen una segunda generación. Esta segunda generación puede generar tanto hermafroditas, hembras y /o machos. Dependiendo del tamaño del hospedador puede haber una o dos generaciones más de adultos antes de formar el JI, en respuesta a señales asociadas con el alimento, la bacteria y la disminución del valor nutritivo dentro del hospedador (Lewis y Clarke, 2012).

Los entomopatógenos utilizan diversos modos de acción sobre los insectos blanco, invadiendo a su hospedador de forma pasiva (virus, bacterias y hongos) o activa. Los virus y bacterias patógenas de insectos actúan a nivel del intestino, matando al hospedador por ingestión. Los hongos, ejercen su acción por contacto con su hospedador y/o por ingestión; y por último los nematodos entomopatógenos, tienen la capacidad de buscar e infectar activamente a sus hospedadores, de acuerdo con Burges & Jones (2012).

Los nematodos entomopatógenos han desarrollado diferentes estrategias de búsqueda del alimento, las cuales según Grewal et al. (1994) se pueden dividir en dos categorías: estrategia de cruceo (buscan a sus hospederos) o estrategia de emboscada (asechan a los hospedadores). Los nematodos con estrategia de cruceo son muy móviles, tienen el comportamiento de buscar al insecto y responden fuertemente a los quimioatrayentes del hospedador (Lewis et al., 1992). Serían los mejores adaptados para parasitar a los

hospedadores subterráneos sedentarios (Kaya y Gaugler, 1993). Campbell y Gaugler (1993) agruparon a *S. glaseri* (Steiner), *Steinernema feltiae* (Filipjev) y *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar dentro de esta categoría. 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). En esta categoría se incluyen a *S. carpocapsae* (Weiser) y *S. scapterisci* Nguyen y Smart según Grewal et al. (1993).

La habilidad del nematodo para alcanzar y penetrar al insecto es una parte importante del proceso patogénico, involucra la velocidad del movimiento, la habilidad de contactarse al insecto y de encontrar los sitios de penetración según Cagnolo y González (2017).

LOS NEPs COMO AGENTES DE BIOCONTROL: POTENCIALIDADES, RANGO HOSPEDADOR Y SITUACIÓN EN ARGENTINA

Los NEPs están ampliamente aceptados como agentes de control biológico, especialmente contra insectos del suelo. Poseen una excelente combinación de atributos deseables como biorreguladores: como su amplia gama de hospedantes y capacidad para provocar altos índices de mortalidad, ser ambientalmente seguros; poder producirse a diferentes escalas mediante métodos *in vivo* e *in vitro*, los estadios infectivos pueden ser formulados y almacenados, son fácilmente aplicables con los equipos estándares y son compatibles con diversos productos químicos y otros agentes biorreguladores (Kaya y Lacey, 2000). Ellos pueden matar a insectos dentro de las 48 hs, formar un estadio infectivo duradero II o larva *dauer*, que puede ser almacenado por largos periodos de tiempo y aplicado por métodos convencionales persistiendo en el ambiente natural (Gaugler y Kaya, 1990).

Los NEPs son capaces de explotar una gama de hospederos que abarca casi todos los órdenes de insectos, un espectro de actividad mucho mayor que el de cualquier otro agente de control microbiano (Kaya y Gaugler, 1993), pero son especialmente eficaces contra insectos en el suelo y hábitats crípticos según Lacey (2001). El rango hospedador de los nematodos se ha derivado de infecciones experimentales en placas de Petri en lugar de infecciones naturales (Kaya y Gaugler, 1993). Al igual que otros agentes de control biológico, los nematodos steinemematidos y heterorhabditidos poseen capacidad de infectar un espectro mucho más amplio de insectos bajo condiciones experimentales de laboratorio, donde el contacto con el hospedador está asegurado, las condiciones ambientales son óptimas y no existen barreras ecológicas o conductuales a la infección (Gaugler, 1981; Gaugler, 1988). Los insectos hallados parasitados naturalmente, pertenecen exclusivamente a los órdenes Lepidóptera y Coleoptera que en algún estado de su ciclo vital permanecen en el suelo (De Doucet, 1986). En Argentina el espectro hospedador de *Heterorhabditis* y *Steinernema* se resumen en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1: Espectro de hospedadores susceptibles infectados de forma natural y experimental por nematodos entomopatógenos (Heterorhabditidae). (Adaptada de Achinelly et al., 2017).

RANGO HOSPEDADOR		NEMATODO	AISLAMIENTO	REFERENCIAS	
ARACHNIDA	TETRANYCHIDAE	<i>Panonichus ulmi</i>	<i>H. bacteriophora</i>	Nq, INTA A-V, INTA 11-12, ROCA	Giayetto y Cichón, 2006
BLATTODEA	BLATTIDAE	<i>Blatta orientalis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
		<i>Periplaneta americana</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
COLEOPTERA	COCCINELIDAE	<i>Hippodamia convergens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	Nq	Giayetto and Cichón, 2006
	CRHYSOMELIDAE	<i>Diabrotica speciosa</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
		<i>Plagioderia erythroptera</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
		<i>Xanthogalleruca luteola</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., Nq, INTA A-V, INTA 11-12, ROCA	Giayetto y Cichón, 2006
	CURCULIONIDAE	<i>Pantomorus leucoloma</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
		<i>Rhigopsidius piercei</i>	<i>H. bacteriophora</i>	ACAB	Doucet et al., 2008
		<i>Naupactus xanthographus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
		<i>Graphognathus leucoloma</i>	<i>H. argentinensis*</i>		Stock, 1993
	MELYRIDAE	<i>Atylus astromaculatus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	NITIDULIDAE	<i>Lobiopa insularis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	VELI	Achinelly et al., 2013
PLATYPODIDAE	<i>Platypus sulcatus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., Nq, INTA A-V, INTA 11-12, ROCA	Giayetto y Cichón, 2006	
SCARABAEIDAE	<i>Diloboderus abderus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	VELI	Camino et al., 2013	
TENEBRIONIDAE	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>H. bacteriophora</i>	VELI	Salas et al., 2013	
DIPTERA	CULICIDAE	<i>Aedes aegypti</i>	<i>H. bacteriophora</i>		Peschiutta et al., 2014
	TEPHRITIDAE	<i>Ceratitis capitata</i>	<i>H. bacteriophora</i>	ACAB	Doucet et al., 2008
HEMIPTERA	CERCOPIDAE	<i>Zulia entreriana</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	CICADELLIDAE	<i>Empoasca sp.</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
		<i>Edwardsiana crataegi</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., INTA A-V, INTA 11-12	Giayetto y Cichón, 2006
	MEMBRACIDAE	<i>Ceresa sp.</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
MARGARODIDAE	<i>Icerya sp.</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008	

(Continúa Tabla 1)

	PENTATOMIDAE	<i>Piezodorus guildini</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	REDUVIIDAE	<i>Triatoma infestans</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
HYMENOPTERA	APIDAE	<i>Apis mellifera</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	FORMICIDAE	<i>Acromyrmex lundii</i>	<i>H. bacteriophora</i>	Biodiv., Nq, INTA A-V, INTA 11-12, ROCA	Giayetto y Cichón, 2006
LEPIDOPTERA	DANAIDAE	<i>Diogas erippus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	NYMPHALIDAE	<i>Agraulis vanillae</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	NOCTUIDAE	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV, N4, N82	Doucet et al., 2008; Gianfelici et al., 2014
		<i>Heliotis sp.</i>	<i>H. bacteriophora*</i>	RIV	De Doucet y Doucet, 1986
		<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV, VELI	Doucet et al., 2008; Camino et al., 2013
		<i>Spodoptera praefica</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	PIERIDAE	<i>Colias lesbia</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
	PYRALIDAE	<i>Galleria mellonella</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., VELI, RIV, OLI, RN, Nq, INTA A-V, INTA 11-12, ROCA	Achinelly et al., 2011; Giayetto y Cichón, 2006
	PSYCHIDAE	<i>Oiketicus kirbyi</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
		<i>O. platensis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., Nq	Giayetto y Cichón, 2006
SATURNIIDAE	<i>Automeris coesus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008	
	<i>Rothschildia jacobaeae</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008	
	<i>Hylesia nigricans</i>	<i>H. bacteriophora</i>	VELI	Camino et al., 2013b	
SPHINGIDAE	<i>Phlegetonthus sextapaphus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008	
TORTRICIDAE	<i>Crociosema aporema</i>	<i>H. bacteriophora</i>	N4, N82	Gianfelici et al., 2014	
	<i>Cydia pomonella</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., RIV, Nq, INTA-AV, INTA 11-12, ROCA	Doucet et al., 2008; Giayetto y Cichón, 2006	
	<i>Grapholita molesta</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., Nq, INTA A-V, INTA 11-12, ROCA	Giayetto y Cichón, 2006	
ORTHOPTERA	ACRIDIDAE	<i>Xyleus modestus</i>	<i>H. bacteriophora</i>	RIV	Doucet et al., 2008
PHTHIRAPTERA	PEDICULIDAE	<i>Pediculus humanus capitis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	OLI	Doucet et al., 2008
THYSANOPTERA	THRIPIDAE	<i>Frankliniella occidentalis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	BIODIV., Nq, INTA 11-12, ROCA	Giayetto y Cichón, 2006

Tabla 2: Espectro de hospedadores susceptibles infectados de forma natural y experimental por nematodos entomopatógenos (Steinernematidae). (Adaptada de Doucet et al., 2008). * Hospedador natural. En *Biocontrol Agents* (p.334), por M.F. Achinelly et al, 2017. United Kingdom, UK. Derechos de autor [2017] por M.F. Achinelly. Reimpresión autorizada.

RANGO HOSPEDADOR		NEMATODO	AI SLAMI ENTO	REFERENCIAS		
COLEOPTERA	COCCINELIDAE	<i>Eriopsis connexa</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
		<i>Hippodamia convergens</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
	CRHYSOMELIDAE	<i>Chrysodina sp.</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
	CURCULIONIDAE	<i>Rhigopsidius piercei</i>	<i>S. rarum</i>	ACAB, NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>Naupactus cinereidorsum</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
	MELOIDAE	<i>Epicauta adspersa</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
<i>S. feltiae</i>			LCHOR	Doucet et al., 2008		
MELYRIDAE	<i>Atylus astromaculatus</i>	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008		
SCARABAEIDAE	<i>Cyclocephalla signaticolis</i>	<i>S. carpocapsae</i> *		Stock, 1995		
		<i>S. feltiae</i> *		Stock, 1995		
	<i>Diloboderus abderus</i>	<i>S. carpocapsae</i> *		Stock, 1995		
		<i>S. feltiae</i> *		Stock, 1995		
TENEBRIONIDAE	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>S. rarum</i>	ACAB, NOE, OLI	Doucet et al., 2008		
		<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008		
DIPTERA	CULICIDAE	<i>Aedes aegypti</i>	<i>S. rarum</i>	OLI	Doucet et al., 2008	
			<i>Culex apicinus</i>	<i>S. rarum</i>	OLI	Cagnolo y Almirón, 2010
			<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>S. rarum</i>	OLI	Doucet et al., 2008
			<i>C. pipiens</i>	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008
	MUSCIDAE	<i>Musca domestica</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
	TEPHRITIDAE	<i>Ceratitidis capitata</i>	<i>S. rarum</i>	ACAB, NOE	Doucet et al., 2008	
		<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008		
HEMIPTERA	APHIDIDAE	<i>Acyrtosiphon kondoi</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
	COREIDAE	<i>Pachylis argentinus</i>	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
	NABIDAE	<i>Nabis sp.</i>	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	

(Continúa Tabla 2)

	COCCIDAE	<i>Ceroplastes grandis</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
	PENTATOMIDAE	<i>Dichelops furcatus</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
		<i>Nezara viridula</i>	<i>S. rarum</i>	OLI	Doucet et al., 2008	
	REDUVIIDAE	<i>Dipetalogaster maximus</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
HYMENOPTERA	APIDAE	<i>Apis mellifera</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
	FORMICIDAE	<i>Acromyrmex lundii</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
ISOPODA	ARMADILLIDIIDAE	<i>Armadillium vulgare</i>	<i>S. rarum</i>	OLI	Doucet et al., 2008	
LEPIDOPTERA	NOCTUIDAE	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
			<i>S. rarum</i>	NOE, OLI	Doucet et al., 2008; Gianfelici et al., 2014	
		<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
			<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. diaprepesi</i>	SRC	Caccia et al., 2014; Del Valle et al., 2014	
		<i>Rachiplusia nu</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	
			<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
		<i>Heliothis sp.</i>	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008	
			<i>S. rarum*</i>	NOE	De Doucet 1986; Doucet et al., 2008	
		<i>Helicoverpa gelotopoeon</i>	<i>S. diaprepesi</i>	SRC	Caccia et al., 2014	
		PIERAUSTIDAE	<i>Laxostege bifidalis</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008
		PIERIDAE	<i>Colias lesbia</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008
<i>S. feltiae</i>	LCHOR			Doucet et al., 2008		
PYRALIDAE	<i>Galleria mellonella</i>	<i>S. rarum</i>	NOE, OLI	Doucet et al., 2008		
		<i>S. carpocapsae</i>	PAMPA,	Stock, 1995		
		<i>S. scapterici</i>	COLON	Stock, 1995		
		<i>S. diaprepesi</i>	SRC	Lax et al., 2011; Del Valle et al., 2014		
		<i>S. ritteri</i>		De Doucet y Doucet, 1990		
		<i>S. feltiae</i>	LCHOR, ISABEL	Doucet et al., 2008; Stock, 1995		
<i>Diatraea sacharalis</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008			
	<i>S. feltiae</i>	LCHOR	Doucet et al., 2008			
TORTRICIDAE	<i>Crociosema aporema</i>	<i>S. rarum</i>	OLI	Gianfelici et al., 2014		
ORTHOPTERA	GRYLLOTALPIDAE	<i>Scapteriscus borellii</i>	<i>S. scapterici*</i>	Stock, 1995		
PHTHIRAPTERA	PEDICULIDAE	<i>Pediculus humanus capitis</i>	<i>S. rarum</i>	NOE	Doucet et al., 2008	

Varios estudios han sido realizados en Argentina con el objetivo de aislar entomonematodos como agentes de control biológico de plagas de interés sanitario y agrícola. Una gran diversidad de especies ha sido reportada como el resultado de investigaciones llevadas a cabo durante los últimos 35 años. Los estudios se centraron principalmente en la descripción de numerosas especies, determinación de ciclos biológicos, ecología de especies patógenas y dinámica en condiciones naturales, principalmente para las familias Mermithidae, Thelastomatidae, Rhabditidae y los NEPs Heterorhabditidae y Steinernematidae (De Doucet, 1986; De Doucet y Bertolotti, 1996; Lax et al., 2011; Achinelly y Micieli, 2013; Del Valle et al., 2013; Camino et al., 2014; Belaich et al., 2015; Di Battista et al., 2015). Sin embargo, la investigación de este grupo de parásitos no fue acorde con su potencial.

En Argentina se han citado y estudiado siete especies del género *Steinernema* y dos de *Heterorhabditis*, con más de 30 aislamientos diferentes. Los NEPs están ampliamente distribuidos en este país (Figura 1), con registros para las provincias de Córdoba, Neuquén, Río Negro, Santa Fe, La Pampa y Buenos Aires (De Doucet, 1986; De Doucet y Bertolotti, 1996; Doucet y Laumond, 1996; De Doucet et al., 1992, 2008; Stock, 1993; Giayetto y Cichón, 2006). En La tabla 3 se resumen los diferentes aislamientos citados para Argentina.



Figura 1: Nematodos entomopatógenos registrados al momento en provincias de la Argentina. En *Biocontrol Agents* (p.334), por M.F. Achinelly et al, 2017. United Kingdom, UK. Derechos de autor [2017] por M.F. Achinelly. Reimpresión autorizada.

1 = Buenos Aires; 2 = Santa Fe; 3 = Córdoba; 4 = La Pampa; 5 = Mendoza; 6 = Neuquén; 7 = Río Negro. H.a = *H. argentinensis*; H.b = *H. bacteriophora*; S.c = *S. carpocapsae*; S.d = *S. diaprepesi*; S.f = *S. feltiae*; S.g = *S. glaseri*; S.ra = *S. rarum*; S.ri = *S. ritteri*; S.s = *S. scapterisci*.

Tabla 3: Aislamientos de NEPs en la Argentina

Nematodo	Aislamiento	Localización	Referencia
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Santa Fe (ex argentinensis)	Santa Fe	Stock, 1993
	City Bell	Buenos Aires	Stock, 1995
	RN	Rio Negro	De Doucet y Bertolotti, 1996
	Nq	Neuquen	
	Biodiversidad, INTA A-V, INTA 11-12 y ROCA	Rio Negro	Giayetto y Cichón, 2006
	OLI y RIV	Córdoba	Doucet, 2008
	Jn y Mo	Santa Fe	Del Valle et al., 2013
	Rama Caída	Mendoza	Del Valle et al., 2013
	VELI	Buenos Aires	Achinelly et al., 2013
	SUP N4, N54, N82, y N116	Buenos Aires Córdoba	Eliceche et al., 2012 Cagnolo et al, 2016
<i>Steinernema ritteri</i>		Cordoba	De Doucet and Doucet, 1990
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Pampa	Buenos Aires y Santa Fe	Stock, 1995
		Cordoba	De Doucet, 1995
<i>Steinernema scapterici</i>	COLON	Buenos Aires	Stock, 1995
<i>Steinernema feltiae</i>	Isabel	Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba	Stock,1993; Stock, 1995
	LCHOR	Córdoba	Doucet <i>et al.</i> , 2008
<i>Steinernema glaseri</i>		Córdoba	Doucet <i>et al.</i> , 2008
<i>Steinernema rarum</i>	ACAB, NOE, OLI	Cordoba	Doucet <i>et al.</i> , 2008
	N105 y N7	Córdoba	Cagnolo et al., 2016
<i>Steinernema diaprepesi</i>	SRC	Santa Fe	Lax et al., 2011

PLAGAS Y NEPs EN EL CINTURÓN HORTÍCOLA BONAERENSE

El cinturón hortícola bonaerense se halla conformado por una serie de partidos situados alrededor de la Ciudad de Buenos Aires (Souza Casadinho y Bocero, 2008), comprende tres regiones o zonas, la zona Sur, constituida por los partidos de: La Plata, Florencio Varela, Esteban Echeverría y Berazategui; la Oeste: Moreno, Luján, General Rodríguez, Marcos Paz y La Matanza; la Norte: Escobar y Pilar (Benencia et al., 2005). En este espacio, la producción de hortalizas se caracteriza básicamente por el cultivo intensivo de productos para el consumo en fresco de la población urbana de la ciudad de Buenos Aires y su periferia, en explotaciones de tipo familiar, llamadas quintas. Unas cuarenta especies de productos hortícolas se envían al mercado a lo largo del año, entre las cuales se destacan, por la mayor proporción dentro del total, las verduras de hoja (lechuga, acelga, espinaca) y los frutos, como el tomate, el pimiento y la frutilla (Benencia et al., 2005). En los distintos ámbitos hortícolas de la Provincia de Buenos Aires es posible identificar la aparición de problemáticas ambientales similares. El uso intensivo de las coberturas plásticas, la aplicación de agroquímicos y el monocultivo son, entre otras, algunas de las causas que promueven externalidades negativas en la región. El empleo de agroquímicos para el control de plagas constituye uno de los problemas socio-ambientales más importantes en la horticultura bonaerense (Benencia y Souza Casadinho, 2009). Dentro del cinturón bonaerense, el Gran Plata presenta el mayor número de quintas y superficie hortícola (Barsky, 2005; García, 2010). Los sistemas productivos de la zona se caracterizan por la producción bajo invernáculo. Las principales hortalizas cultivadas en invernaderos son: (en orden de importancia) tomate, apio, lechuga, pimiento, espinaca y otras menos importantes como pepino, chaucha, frutilla y albahaca (Ferratto et al., 2010). Actualmente el cinturón hortícola presenta diferentes sistemas productivos. Una clasificación refiere a agricultores, fincas o manejos denominados convencionales y orgánicos (Stupino et al., 2012), entendiendo por manejo convencional al caracterizado principalmente por el uso de productos químicos (fertilizantes, pesticidas y herbicidas) (Bengston et al., 2005), y por manejo orgánico según la normativa IFOAM (International Federation Organic Agriculture Movement) "todo sistema de producción sustentable en el tiempo que mediante el manejo racional de los recursos naturales, sin la utilización de productos de síntesis química, brinde alimentos sanos y abundantes, mantenga o incremente la fertilidad del suelo y la diversidad biológica". Stupino et al. (2012), sugieren que las fincas del cinturón hortícola del Gran Plata integran un gradiente de intensidad de manejo que va del convencional al orgánico, donde la producción orgánica se presenta en menor proporción. El exceso de agroquímicos constituye el primer problema en el Cinturón hortícola platense donde el 57,8% de los productores utilizan al menos un producto de las categorías toxicológicas I y II (extremadamente tóxicos y altamente tóxicos respectivamente). Cincuenta agroquímicos diferentes fueron citados como utilizados por los productores de la región: 26 destinados al control de plagas (insecticidas, acaricidas y/o nematocidas). A la fecha solo se han citado en el cinturón hortícola bonaerense, nematodos entomopatógenos para la ciudad de City Bell (Stock, 1995) y La Plata (Achinelly et al., 2017; Eliceche et al., 2017), entre los que se incluye un nuevo aislamiento de *Heterorhabditis bacteriophora* (objeto de estudio de esta tesis doctoral). Varias especies de NEPs son usadas como insecticidas microbianos y

producidas comercialmente por varias compañías alrededor del mundo. Existen en la actualidad más de 90 empresas dedicadas a la producción y comercialización de nematodos entomopatógenos (Lacey et al., 2001).

En la Argentina, la falta de legislación con respecto a los requisitos de regulación y registro de diferentes grupos de bioproductos y el desarrollo de criterios o recomendaciones de política para estudios a campo o liberaciones de nuevos bioproductos, han restringido el crecimiento de este tema. Por estas razones, los estudios se han limitado principalmente a la etapa laboratorio o pequeña escala de campo, dejando el desarrollo de entomonematodos como agentes de control biológico en este país todavía incipiente (Achinelly et al., 2017). La patogenicidad de los diferentes aislamientos de NEPs en la Argentina ha sido evaluada en condiciones de laboratorio, registrándose varios ordenes de insectos susceptibles según Achinelly et al. (2017), incluyendo a larvas del mosquito transmisor del virus del dengue, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (Peschiutta et al., 2014). Además de obtenerse resultados exitosos para control del nematodo fitoparásito *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Tylenchida: Heteroderidae) en condiciones de laboratorio (Del Valle y Doucet, 2014). *Heterorhabditis bacteriophora* resultó ser patogénico sobre plagas de importancia agro-económica en el cinturón hortícola bonaerense. Los aislamientos de esta región, se han probado con éxito en siete órdenes de insectos resultando susceptibles al nematodo (Achinelly et al., 2017).

El Registro Nacional de Terapéutica Vegetal (Resolución ex Sagpya 350/1999) hasta diciembre de 2014, presentaba registrados 4310 ingredientes activos de diferentes marcas de los cuales sólo 24 eran biofitosanitarios, contabilizando 0.55 % del total de productos registrados. Estos incluían bacterias entomopatógenas y fitopatógenas, virus entomopatógenos y extractos botánicos, siendo nulos basados en nematodos según SENASA (2018).

Por lo expuesto, el aislamiento y caracterización de nuevas cepas de nematodos entomopatógenos en el cinturón hortícola es necesario así como también su evaluación sobre insectos de interés agrícola.

HIPÓTESIS

El nuevo aislamiento del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* constituye un enemigo natural autóctono que tiene la capacidad de funcionar como bioregulador de las especies de insectos plaga que son de interés para el Cinturón Hortícola Bonaerense. La evaluación de la actividad parasitaria de *H. bacteriophora*, nos permitirá profundizar el conocimiento de este nuevo aislamiento y determinar su potencial utilización en programas de manejo integrado de plagas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar este nuevo aislamiento y evaluar su potencialidad como agente de biocontrol de insectos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar morfológica, fenotípica y molecularmente al complejo nematodo-bacteria aislado de huertas hortícolas del cinturón hortícola platense.
2. Estudiar la patogenicidad y virulencia de *H. bacteriophora* SUP en larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Curculionidae), a partir de la determinación de la dosis letal (DL50-DL90), tiempo letal (TL50-TL90) y densidad óptima de nematodos por superficie de aplicación.
3. Optimizar la producción del nemátodo *H. bacteriophora* en cultivos “*in vivo*” e “*in vitro*” y evaluar los factores que afectan la supervivencia, infectividad y multiplicación durante el mantenimiento del nematodo en el laboratorio.
4. Evaluar la patogenicidad y virulencia de *H. bacteriophora* SUP en laboratorio y a campo sobre dos coleópteros plaga emergentes del CHB, *Lobiopa insularis* (Nitulidae) y *Phyrdenus muriceus* (Curculionidae) y aportar datos sobre el comportamiento y la biología de estas plagas en condiciones naturales.
5. Evaluar la capacidad de desplazamiento, viabilidad e infectividad (en el suelo) de la forma infectiva (JI) de *H. bacteriophora* a partir de liberaciones inundativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elgawad, M. M., Askary, T. H., & Coupland, J. (Eds.). (2017). *Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes*. Boston, MA. 648 p.
- Achinelly, M. F., Camino, N., Eliceche, D., Salas, A., & Rusconi, M. (2017). Status of Entomopathogenic Nematodes in Integrated Pest Management Strategies in Argentina. p. 327-347. En: Abd-Elgawad, M. M., Askary, T. H., & Coupland, J. (Eds.). *Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes*. CABI. Wallingford, Reino Unido. 348p.
- Achinelly, M.F., & Micieli, M.V. (2013). Host range of the parasite *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Argentina mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* 1, 1–5.
- Alatorre-Rosas, R., & 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.
- Barsky, A. (2005). El periurbano productivo, un espacio en constante transformación. Introducción al estado del debate, con referencias al caso de Buenos Aires. *Scripta Nova* 9(194), 36.
- Bedding, R., & A. Molyneux. (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28, 354–359.
- Belaich, M.N., Buldain, D., Ghiringhelli, P.D., Hyman, B., Micieli, M.V., & Achinelly M.F. (2015). Nucleotide sequence differentiation of argentine isolates of the mosquito parasitic nematode *Strelkovimermis spiculatus* (Nematode: Mermithidae). *Journal of Vector Ecology* 40, 415–418.
- Benencia R. (1994). La horticultura Bonaerense: lógicas productivas y cambios en el mercado de trabajo. *Desarrollo Económico* 34 (133).
- Benencia, R., & Quaranta, G. (2005). Producción, trabajo y nacionalidad: configuraciones territoriales de la producción hortícola del cinturón verde bonaerense. *Revista Interdisciplinaria de Estudios Agrarios* 23, 101-132.
- Benencia, R., & Souza Casadinho, J. (1993). Alimentos y salud: Uso y abuso de pesticidas en la horticultura bonaerense. *Revista Realidad Económica* 114/115, 23-56.
- Bengtsson, J., Ahnstrom J., & Weibull, A.C. (2005). The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. *Journal of Applied Ecology* 42, 261-269.

-
- Burges, H. D., & Jones K.A. (1998). Introduction. p. 1-4. In: Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Burges, H.D. (Ed.). Springer Science & Business Media. 412 p.
 - Burnell, A. M., & Stock, S. P. (2000). Heterorhabditis, Steinernema and their bacterial symbionts—lethal pathogens of insects. *Nematology* 2(1), 31-42.
 - Caccia, M.G., Del Valle, E., Doucet, M.E., & Lax, P. (2014). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74, 123–126.
 - Cagnolo, S. R., & González, J. M. (2017). Comportamiento de localización y elección de hospedadores, del nematodo entomopatógeno *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae). *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 4(1), 77.
 - Cagnolo, S. R., Carranza, F., Trimarchi, L., & Bertolotti, M. A. (2016). New findings of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum* (Nematoda: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in Córdoba, Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales* 18 (2), 191-199.
 - Cagnolo, S.R., & Almirón, W.R. (2010). Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69, 141–145.
 - Camino, N.B., Achinelly, M.F., Rusconi, J.M., Eliceche, D., & Salas, A. (2014) Biodiversity of nematodes parasitizing soil pest white grubs (Scarabaeidae) of Buenos Aires, Argentina. *Neotropical Helminthology* 8, 227–233.
 - Campbell, J. F., & Gaugler, R. (1993). Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour* 126(3), 155-169.
 - Chitwood, B. G., & Chitwood, M. B. (1937). An introduction to nematology. Section I, Anatomy. Baltimore, MD, USA, Monumental Printing Co. 213p.
 - Ciche, T. A., Kim, K. S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K. C., & Hall, D. H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8), 2275-2287.

-
- De Doucet, M.M.A. de (1986). A new species of *Neoplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Córdoba, Argentina. *Revue de Nematologie* 9, 317–323.
 - De Doucet, M.M.A., & Doucet, M.E. (1986). Nuevos datos para el conocimiento de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA XXI*, 1–10.
 - De Doucet, M.M.A. & Doucet, M.E. (1990). *Steinernema ritteri* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) with a key to the species of the genus. *Nematologica* 5, 257–265.
 - De Doucet, M.M.A., Doucet, M.E., & Nienstedt, K. (1992). Diferencias inter e intraespecíficas en la capacidad infectiva de poblaciones de *Heterorhabditis* y *Steinernema* aislados en Argentina. *Nematropica* 22, 237–242.
 - De Doucet, M. M. A. (1995). Caracterización de una población de *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) aislada en Córdoba, Argentina. *Nematologia Mediterranea* 23(2), 181-189.
 - De Doucet, M.M.A., & Bertolotti, M.A. (1996). Una nueva población de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 para Argentina. Caracterización y acción sobre el huésped. *Nematologia mediterranea* 24, 169–174.
 - Del Valle, E. E., Lax, P., Rondan Dueñas, J., & Doucet, M. E. (2013). Efecto de insectos cadáveres infectados por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema diaprepesi* sobre el parasitismo de *Meloidogyne incognita* en plantas de pimiento y zapallito redondo de tronco. *Ciencia e Investigación Agraria* 40(1), 109-118.
 - Del Valle, E., & Doucet, M. (2014). Effects of *Galleria mellonella* cadavers infected with *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum*, their macerates and dead infective juveniles on *Meloidogyne javanica* suppression. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 46(1), 205-211.
 - Del Valle, E., Balbi, E., Lax, P., Rondán Dueñas, J., & Doucet, M. (2014). Ecological aspects of an isolate of *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) from Argentina. *Biocontrol Science and Technology* 24, 690–704.
 - Di Battista, C.M., Fischer, S., & Campos, R.E. (2015). Parasitism prevalence and survival time of adult *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) parasitized by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). *Journal of Vector Ecology* 40, 393–397.

-
- Doucet, M. D., & Laumond, C. (1996). Uso de nematodos entomopatógenos a campo. p. 279-292. Lecuona, R. (ed.). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas. Buenos Aires, Argentina. Ed. Sudamericana. 338pp.
 - Doucet, M.E., Bertolotti, M.A., Cagnolo, S., & Lax, P. (2008). Nematodos entomofílicos de la provincia de Córdoba, Argentina. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* LXII, 263–267.
 - Eliceche, D. P., Belaich, M. N., Ghiringhelli, P. D., & Achinelly, M. F. (2017). *Heterorhabditis bacteriophora* pampean-strain VElI (Nematoda): identification and pathogenicity against the strawberry pest *Lobiopa insularis* (Coleoptera: Nitidulidae). *Revista Colombiana de Entomología* 43(2).
 - Eliceche, D., Salas, A., Achinelly, M.F., & Camino, N.B. (2012) Evaluación de la temperatura de almacenamiento de la forma infectiva del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre la supervivencia y parasitismo. *Revista Argentina de Parasitología* 1, 249.
 - Ferrato, J. A., Mondino, M. C., Grasso, R., Ortiz Mackinson, M., Longo, A., Carrancio, L., & Iribarren, M. J. (2010). Buenas prácticas agrícolas para la agricultura familiar. Ferratto J.A., & Rodriguez Fazzone M. (Eds.). Cadena de las principales hortalizas de hojas en Argentina. Roma, Italia. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
 - García, M. 2010. Inicios, consolidación y diferenciación de la horticultura platense. p. 69-85. En: Ada Svetlitzia de Nemirovsky (coord.). Globalización y agricultura periurbana en la Argentina. Escenarios, recorridos y problemas. Editorial FLACSO: Buenos Aires. 181pp.
 - Gaugler, R. (1981). Biological control potential of neoaplectanid nematodes. *Journal of Nematology* 13(3), 241.
 - Gaugler, R. (1988). Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 24(1-3), 351-360.
 - Gaugler, R., & Kaya, H. (1990). Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, Florida. 365pp
 - Gaugler, R., Campbell, J. F., & McGuire, T. (1990). Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54, 363-372.
 - Georgis, R., & Gaugler R. (1991). Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology* 84, 713- 720.

-
- Gianfelici, M., Bertolotti, M.A., & Cagnolo, S.R. (2014). Susceptibilidad de larvas de *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) y *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, a tres aislados de nematodos entomopatógenos. *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 1, 71–76.
 - Giayetto, A.L., De Doucet, M.M.A., & Bertolotti, M.A. (1998). Entomopathogenic nematodes (Rhabditidae: Heterorhabditidae and Steinernematidae) in North Patagonia, Argentina. *Nematropica* 28, 132–133.
 - 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. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias* 35(2).
 - Grewal, P. S., Gaugler, R., Kaya, H. K., & Wusaty, M. (1993). Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 62(1), 22-28.
 - Grewal, P., Lewis, E., Gaugler, R., & Campbell, J. (1994). Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 108(2), 207-215.
 - Hunt, D. (2007). Overview of taxonomy and systematic. p. 27-57. In: Nguyen, K., & Hunt, D. (Eds). Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Leiden, Boston. 811 pp.
 - Kaya, H. K., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual review of entomology* 38(1), 181-206.
 - Kaya, H. K., & Lacey, L. A. (2000). Introduction to microbial control. p. 1-4. In: Kaya, H. K., & Lacey, L. A. (Eds). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Springer, Dordrecht.
 - Labaude, S., & Griffin, C. T. (2018). Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. *Insects* 9(2), 72.
 - Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological control* 21(3), 230-248.
 - Lax, P., Del Valle, E., Rondan Dueñas, J., Caccia, M., Gardenal, C., & Doucet, M.E. (2011). First record of *Steinernema diaprepesi* (Steinernematidae) in Argentina. *Nematropica* 41, 377.

-
- Lewis, E. E., Gaugler, R., & Harrison, R. (1992). Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology* 105(2), 309-315.
 - Lewis, E. E., Gaugler, R. & Harrison, R. (1993). Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology* 71(1), 765–769.
 - Lewis E.E., & Clarke D.J. (2012). Nematode Parasites and Entomopathogens. En: Vega, F. E., & Kaya, H. K. (Eds). Insect pathology. London. UK, Elsevier. 490 pp.
 - Molyneux, A. S. & Bedding, R. A. (1984). Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucila cuprina*. *Nematologica* 30, 358-365.
 - Peschiutta, M., Cagnolo, S., & Almirón, W. (2014). Susceptibility of larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 73 (3-4), 99-108.
 - Poinar, G. O. (1976). Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica* 21(4), 463-470.
 - SENASA (2018). [http://www.senasa.gob.ar/resolucion-9342010-productos agropecuarios](http://www.senasa.gob.ar/resolucion-9342010-productos-agropecuarios).
 - Souza Casadinho, O. J., & Bocero, S. L. (2008). Agrotóxicos: Condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revibec: Revista de la Red Iberoamericana de Economía Ecológica* 9, 087-101.
 - Spiridonov, S. E. (2017). Entomopathogenic Nematodes of the Families Steinernematidae and Heterorhabditidae: Morphology and Taxonomy. p. 45-62. In: *Abd-Elgawad, M. M., Askary, T. H., & Coupland, J. (Eds.). Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes. CABI. Wallingford, Reino Unido. 348pp.*
 - Steinhaus, E.A., & Martignoni M.E. (1970). An abridged glossary of terms used in invertebrate pathology, 2nd edn. USDA Forest Service, PNW Forest and Range Experiment Station, Corvallis.
 - Stock, S.P., & Goodrich-Blair H. (2012). Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. p. 373-426. In: Lacey L.A. (Ed). *Manual of techniques in invertebrate pathology. Yakima, Washington, USA. 484 p.*

- Stock, S. P. (1993). Description of an Argentinian strain of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologia Mediterranea* 21(2), 279-283.
- Stock, S.P. (1995). Natural populations of entomopathogenic nematodes in the Pampean Region of Argentina. *Nematropica* 25, 143–148.
- Stock, S.P., & Camino, N.B. (1996). Nematodos Entomopatogenos. p. 105-118. In: Lecuona, R. E. (Ed.) Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. 338 p.
- Stupino, S. A., Sarandon, S. J., & Frangi, J. (2012). Caracterización de fincas hortícolas según el manejo de los cultivos, La Plata, Argentina. *VII Congreso de Medio Ambiente*.

CAPÍTULO I: Caracterización de un nuevo aislado del nematodo entomopatógeno, *Heterorhabditis bacteriophora* procedente del Cinturón Hortícola Platense

INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae son modelos únicos para el estudio de parasitismo, patogenicidad y simbiosis. La familia Heterorhabditidae forma una simbiosis mutualista con bacterias patógenas de insectos de la familia Enterobacteriaceae, específicamente del género *Photorhabdus* (Sandhu, 2006). Los juveniles infectivos (JIs) o *dauer* (resistentes) persisten en el suelo en busca de un insecto hospedador adecuado (Grewal et al., 1997). Tras la entrada a través de la cutícula o las aberturas naturales del hospedador, los JIs liberan las bacterias simbióticas en el hemocele de los insectos, matándolos rápidamente por lo general dentro de las 24-48 hs (Ciche y Ensign, 2003). Los nematodos se alimentan de las bacterias simbióticas, completan 1-3 generaciones en el cadáver del hospedador y a medida que se agotan los recursos alimenticios, se generan nuevos JIs que se dispersan en busca de nuevos hospedadores (Sandhu, 2006).

El género *Photorhabdus* es un bacilo Gram-negativo bioluminiscente perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Waterfield et al., 2009). Esta bacteria es única, ya que tiene interacciones contrastantes, pero obligadas, con dos hospedadores animales diferentes (Clarke, 2014). Por un lado, es patógena contra una amplia gama de insectos, al tiempo que mantiene una interacción mutualista con los nematodos de la familia Heterorhabditidae (Waterfield et al., 2009). Además de producir una toxina insecticida, las bacterias son necesarias para el crecimiento y la reproducción de los nematodos (Lunau et al., 1993). La relación entre la bacteria y el nematodo constituye una verdadera simbiosis. La bacteria no podrá sobrevivir en el suelo sin la protección del juvenil infectivo y deberá penetrar al insecto con la ayuda del nematodo.

Estas bacterias producen una amplia gama de toxinas y exoenzimas hidrolíticas que son responsables de la muerte y bioconversión de la larva del insecto en una sopa nutritiva que es ideal para el crecimiento y la reproducción de los nematodos. Los nematodos se reproducen hasta que el suministro de nutrientes se vuelve limitante, momento en el que los juveniles infectivos son recolonizados por la bacteria simbiótica (Forst y Clark, 2002). La estrecha relación simbiótica entre el nematodo y sus bacterias simbióticas fue demostrada por la incapacidad del nematodo de reproducirse de manera óptima dentro del insecto en ausencia de su simbionte bacteriano (Chapuis et al., 2009). Las bacterias también protegen los recursos de los cadáveres contra los competidores, debido a la producción de bacteriocinas, compuestos antimicrobianos y otros antibióticos (Akhurst, 1982; Bode, 2009).

Al momento se han descrito cuatro especies del género *Photorhabdus*, *P. luminescens* (Thomas y Poinar, 1979; Boemare et al., 1993), *P. asymbiotica*, *P. temperata* (Fischer-Le Saux et al., 1999) y *P. heterorhabditis* (Ferreira et al., 2014). Además, se han descrito nueve subespecies de *P. luminescens*, tres subespecies de *P. temperata* y dos subespecies de *P. asymbiotica* (Ferreira et al., 2014). Particularmente *Heterorhabditis*, puede asociarse con más

de un simbiote. De acuerdo con Boemare (2002), solos dos especies han sido asociadas a *H. bacteriophora*: *P. temperata* y *P. luminescens*.

La interacción nematodo-bacteria, condiciona su virulencia, la cual a su vez se relaciona con el área de procedencia. De acuerdo con Labaude y Griffin (2018), las especies nativas a menudo se consideran más adecuadas para el biocontrol, ya que se espera que estén adaptadas a las condiciones locales, incluyendo a la propia plaga. La susceptibilidad de los insectos plaga varía según las especies de NEPs. A su vez, los nematodos que pertenecen a la misma especie pero que provienen de diferentes aislados también pueden variar drásticamente en su eficacia (Laznik et al., 2010). Considerando esta variabilidad, encontrar la especie / aislamiento más eficiente es, por lo tanto, particularmente importante (Labaude y Griffin, 2018).

Las razones subyacentes de las diferencias de especies y cepas en la eficacia rara vez se dilucidan. Estas pueden incluir rasgos relacionados con el comportamiento de los nematodos y la virulencia (Griffin, 2012), mientras que el simbiote bacteriano es un determinante importante y a menudo pasado por alto del éxito del complejo nematodo-bacteria (Labaude y Griffin, 2018). En la Argentina, se han reportado más de 15 poblaciones de *H. bacteriophora* (Poinar, 1976) en la región pampeana central, patagonia y en la provincia de Santa Fe (Stock, 1993; 1995; De Doucet y Bertollotti, 1996; Giayetto y Cichón, 2006; Del Valle et al., 2013).

La caracterización de los diferentes aislados principalmente para el cinturón hortícola bonaerense es necesaria para la búsqueda de nuevas alternativas respecto al uso de agroquímicos para el control de plagas en la región. El objetivo de este capítulo fue realizar una caracterización morfológica y molecular de un nematodo entomopatógeno nativo del Cinturón Hortícola Platense (CHP) perteneciente a la familia Heterorhabditidae e identificar su bacteria endosimbiótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL NEMATODO

1. ÁREA DE ESTUDIO Y AISLAMIENTO

Para realizar el aislamiento de los nematodos se recolectaron muestras de suelo en una huerta de producción hortícola ubicada en Melchor Romero, Buenos Aires (34°56'08.7"S 58°06'03.4"O), sometida al cultivo de tomate bajo un manejo agroecológico (Figura 1.1). Esta localidad forma parte del cinturón verde de producción hortícola de la región. De acuerdo al procedimiento descrito por Akhurst y Bedding (1986), cada muestra fue tomada a una profundidad de 15 cm utilizando una pala de jardín, y se colectó en total 1kg de suelo, el cual fue trasladado al laboratorio para su procesamiento. Las muestras de suelo fueron colocadas en recipientes plásticos de 250 ml, a los cuales se les agregaron 10 larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Se mantuvieron a temperatura ambiente (20 ± 3 °C), tal como lo describe Bedding y Akhurst (1975). Las larvas de insectos se examinaron diariamente durante dos semanas. Los insectos muertos que presentaron la coloración rojiza característica (Figura 1.2.A), se enjuagaron en agua destilada y se colocaron en una trampa White modificada (Figura 1.2.B) de acuerdo con los procedimientos descritos por Kaya y Stock (1997) hasta la

aparición de juveniles infectivos (JIs) emergiendo de los coleópteros muertos (generalmente después de 5- 10 días). Los JIs se identificaron por su tiempo de aparición y caracteres morfológicos.

Para confirmar el segundo y tercer postulado de Koch respecto a la patogenicidad siguiendo los procedimientos de Kaya y Stock (1997), se utilizó una suspensión de 1000 JIs del nuevo aislamiento emergidas en las trampas white, la cual se añadió a una placa de Petri revestida con dos papeles de filtro humedecidos (diámetro 9 cm), entre los cuales se colocaron 10 larvas de *T. molitor* y se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 3 ° C. Las larvas muertas se incubaron a dicha temperatura. La primera generación de hermafroditas y la segunda de hembras y machos amfimícticos se obtuvieron disecando larvas de insectos entre 3-4 y 5-7 días después de la infección, respectivamente. El ciclo se resume en la figura 1.3.

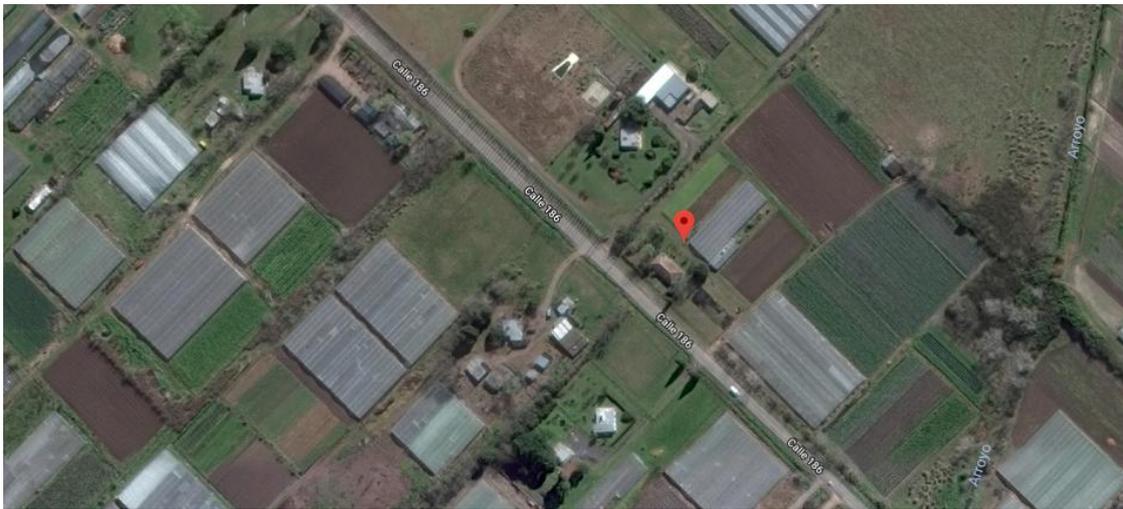


Figura 1.1: Foto satelital del área de estudio, Melchor Romero, Buenos Aires. Imágenes © 2018 DigitalGlobe, Datos del mapa © 2018 Google.



Figura 1.2: Larvas de *Tenebrio molitor* infectadas con *Heterorhabditis bacteriophora*. A) Se observa el gradiente de coloración que adquiere el cadáver del insecto producto de la septicemia provocada por la bacteria; B) Trampa White modificada con cadáveres de insectos infectados.

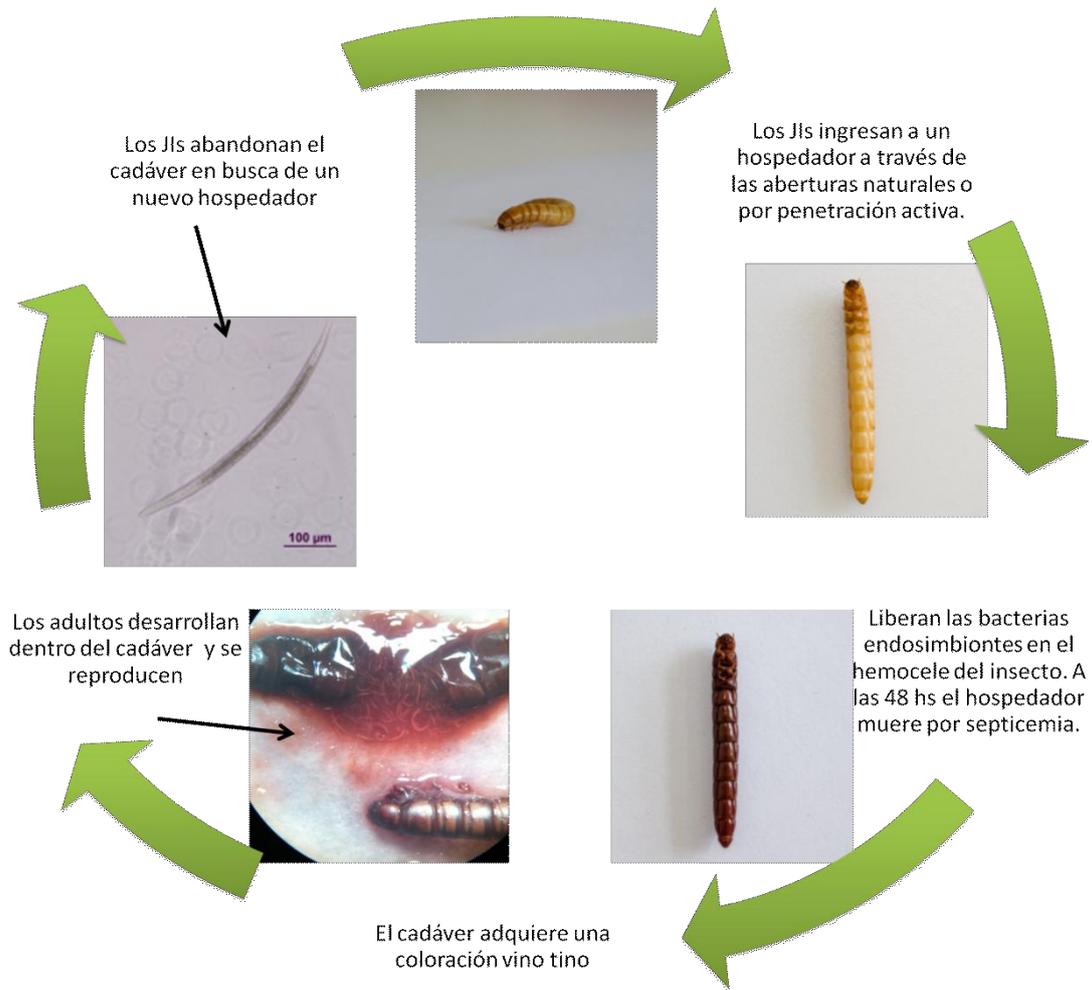


Figura 1.3: Ciclo de vida de *Heterorhabditis* spp. en larvas de *T. molitor*

2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Para los estudios morfológicos, se consideraron hermafroditas de primera generación, adultos de segunda generación (hembras y machos anfimícticos) y los JIs del tercer estadio. Se consideraron un total de 25 especímenes de cada etapa del ciclo de vida para la evaluación de datos cualitativos. De acuerdo con Poinar (1976) y Hunt (2007), los caracteres diagnósticos utilizados fueron la morfología de la cabeza, la vulva y la bursa en los adultos y la presencia de un diente cuticular en el juvenil infectivo.

Los nematodos fueron examinados *in vivo* y / o exterminados por calor a 60 °C en solución de Ringer. Posteriormente se colocaron en fijador de trietanolamina-formalina (Kaya y Stock, 1997) y se procesaron para formar glicerina anhidra según Seinhorst (1959). Las observaciones se realizaron bajo microscopio óptico Leica DM500.

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Para confirmar la identificación de los nematodos, se realizó un análisis molecular. Se aisló ADN genómico a partir de 30 individuos siguiendo el protocolo de Sambrook et al. (1989). Las muestras de ADN obtenidas se usaron en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un locus nuclear que contenía las secuencias: gen del ARN ribosómico 18S (secuencia parcial), ITS 1, ITS 2, 5.8S del gen del ARN ribosomal junto con un fragmento del gen del ARN ribosomal 28S. Los reactivos de PCR (PB-L, Argentina) se usaron en concentraciones estándar y los cebadores [ITS-F (5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3') y ITS-R (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3')] se sintetizaron por medio de un protocolo previamente descrito por Maneesakorn et al. (2011). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis con estándares de peso molecular utilizados como referencia (PB-L, Argentina), se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y los ADN correspondientes aislados con el kit de recuperación de ADN Zymoclean Gel (Zymoresearch) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los amplicones se secuenciaron en Macrogen Inc. (Corea) y se editaron con la plataforma GENEIOUS (<http://www.geneious.com>) (Kearse et al., 2012). Las secuencias de consenso obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a través de uso de la herramienta BLAST.

B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE

1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA

Para el aislamiento de la bacteria endosimbionte se realizó una infección con una dosis de 1000 JIs, en cápsulas Petri de 9 cm, las cuales fueron expuestas a 10 larvas de *Tenebrio molitor*. Los cadáveres infectados que exhibieron la coloración rojiza característica (Figura 1.2.A) fueron desinfectados en solución de hipoclorito de sodio al 1% y posteriormente se realizaron 3 lavados en agua destilada estéril siguiendo los procedimientos de Akhurst (1980). La extracción se realizó bajo cámara de flujo laminar. La técnica utilizada fué por punción. Se

utilizó una aguja hipodérmica con la cual se punzaron los intersegmentos de varias regiones del cuerpo del insecto con el objetivo de obtener la hemolinfa cargada de bacteria. La hemolinfa extraída fue suspendida en 80 µl de solución fisiológica estéril. A partir de esta suspensión se realizó una siembra de superficie en agar NBTA, compuesto por agar nutritivo, 0,0025% azul de bromotimol y 0,004% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio según Akhurst (1980). Las placas fueron incubadas a 29 °C. A las 48 hs, las colonias crecidas fueron repicadas realizando un estriado en agar NBTA con el objetivo de obtener colonias aisladas.

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La caracterización morfológica consistió en la observación de las colonias bacterianas crecidas a las 48 hs, registrando morfología, pigmentación, forma y propiedades de la superficie. Posteriormente en colaboración con el Instituto De Investigación Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) se realizaron las pruebas bioquímicas sugeridas en Boemare y Akhurst (1988) y otras pruebas incluidas en las API 20E, API20, NE y API 50CH (Tabla 1.1) para identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae (API20E®).

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

TÉCNICA MALDI-TOF

Una vez aisladas las colonias se envió el material al CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa, CONICET) donde se realizó la biotipificación microbiana por espectrometría de masa MALDI-TOF. La metodología empleada incluyó el procesamiento de los aislamientos a fin de obtener el extracto proteico. Los espectros de masa fueron obtenidos mediante el software FlexControl 3.3 en un rango de 2-20 KDa -detección de subunidades ribosomales y proteínas *housekeeping* principalmente utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF. La identificación microbiana se llevó a cabo ingresando los espectros de masas en el software MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) provisto de una base de datos de más de 5000 cepas de microorganismos y que emplea un valor de puntuación basado en el grado de coincidencia (relación m/z e intensidad) del espectro problema con un segundo espectro de referencia. De acuerdo con el valor de puntuación la identificación se establece a nivel de especie (2) o de género (1,7 -1,9) (IBBM, s.f.)

ANÁLISIS DEL ADN

EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo NBTA. Utilizando un ansa, bajo cámara de flujo laminar, se tomaron varias colonias de *Photorhabdus* sp. las cuales fueron lavadas 2 veces con una solución 1M de NaCl. Luego, se siguió el protocolo descrito en Walsh et al. (1991), se agregaron 200µl de Resina Chelex, BIO-RAD, con posterior agitación en vortex. Se incubaron a 56°C por 10 min, luego a 100°C y se agitaron nuevamente en vortex. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10.000 rpm

durante 2 min. El sobrenadante se extrajo con micropipeta y se utilizó para las reacciones de amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para el análisis molecular se amplificaron las secuencias recA (recombinasa recA), gyrB (subunidad B de la ADN girasa), ADNn (subunidad beta de la ADN polimerasa III), gltX (glutamil-ARNRNA sintetasa) e infB (factor de iniciación de la traducción IF-2). Se utilizaron estos genes debido a que hasta el momento no se ha confirmado transferencia horizontal brindando seguridad al análisis filogenético (Ferreira et al., 2014). Para amplificar la secuencia gyrB se utilizaron los cebadores gyrB-F(5'GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') y gyrB-R (5'AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT-3'); para la secuencia recA se utilizaron los cebadores recA-F (5'-CCAATGGGCCGTATTGTTGA-3') y recA-R (5'TCATACGGATCTGGTTGATGAA-3'); para la secuencia gltX los cebadores gltX-F (5'GCACCAAGTCCTACTGGCTA-3') y gltX-R (5'-GGCATRCCSACTTTACCCATA-3'); para la secuencia dnaN los cebadores dnaN -F (5'-GAAATTYATCATTGAACGWG-3') y dnaN -R (5'CGCATWGGCATMACRAC-3'); y para la secuencia infB, los cebadores, infB-F (5'CTCGCTGCTGGACTATATTCG-3') e infB- R (5'-CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC-3'). Para una mezcla de reacción para PCR de volumen final de 50 µl, se utilizaron 25µl de Mastermix (*PCR Master Mix Promega*), 2 µl de cebadores F y R, 6 µl ADN y 15µl de agua. Las condiciones de PCR fueron: 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, seguido de una extensión a 72°C por 10 minutos en termociclador Eppendorf Flexlid.

Los productos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa para estimar la cantidad de producto obtenido. Posteriormente las muestras se identificaron por secuenciación automatizada de Sanger mediante el servicio brindado por Macrogen Corea. Los amplicones se editaron con la plataforma GENEIOUS (<http://www.geneious.com>) (Kearse et al., 2012). Las secuencias consenso obtenidas se compararon con aquellas disponibles en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante la utilización de la herramienta BLAST.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El análisis bioinformático se realizó en colaboración con el Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CIT - CONICET- Córdoba) a través del Dr. Leopoldo Palma. Se realizó el concatenado de los cinco genes para obtener mayor precisión en la identificación siguiendo la metodología usada por Ferreira et al. (2014). Cada secuencia de un solo gen, recA, gyrB, ADNn, gltX e infB, fueron concatenados y se alinearon usando el software Muscle (Edgar, 2004). Los árboles de distancia se construyeron utilizando la herramienta de creación de árboles implementada en Geneious R11 (Drummond et al., 2018). Se usó el algoritmo de distancia de unión de vecinos (*Neighbor-Joining*) (Saitou et al. 1987), usando el modelo de distancia genética de Jukes-Cantor para cada gen y las secuencias de genes concatenados.

RESULTADOS

A. *Heterorhabditis bacteriophora* SUP CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR

2. MORFOLOGÍA

La morfología de este aislamiento de *H. bacteriophora* fue cualitativamente similar a la de otras poblaciones de *Heterorhabditis* citadas.

Adultos con cabeza truncada a ligeramente redondeada; seis labios diferentes rodeando la abertura de la boca, cada uno con una papila labial interna. En la base de cada labio sub-dorsal y sub-lateral dos papilas adicionales representando una papila labial externa y una papila cefálica (Fig. 1.4 D). La base de cada labio lateral con una abertura elíptica y una papila labial externa, estoma casi colapsado (Figuras 1.4 C-D).

Las hembras de tamaño variable, con un sistema reproductivo anfidélfico que se refleja más allá de la abertura vulvar. Las hembras dioicas con una vulva no funcional para la oviposición y una cola puntiaguda (Figuras 1.5 A-B).

La hembra hermafrodita delgada y alargada con un extremo anterior truncado, una vulva abierta funcional para la oviposición y la región anal ligeramente sobresaliente (Figuras 1.5 C-D).

Los machos con un único testículo reflejado, espículas emparejadas y separadas, la bursa pelodera sostenida por nueve pares de papilas: un par anterior pequeño, dos pares adyacentes a las espículas y seis pares distales a la abertura anal. Los últimos seis en dos conjuntos de tres (Figuras 1.4 A-B).

Los juveniles infectivos con una cabeza con un diente dorsal (Fig. 1.5F); una cutícula con dos líneas laterales dobles; el cuerpo, con un patrón de tesela (Figura 1.5F), cubierto por la cutícula de la segunda etapa que lo rodea y cola apuntada (Fig. 1.5E).

En las hembras fecundadas se pudo observar la endotoquia matricida, un fenómeno común en los nematodos rhabdítidos y típico para los nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*. En este caso los huevos eclosionan dentro del cuerpo de la hembra y las larvas emergidas se alimentan de ella causándole la muerte (Figuras 1.5A, C).

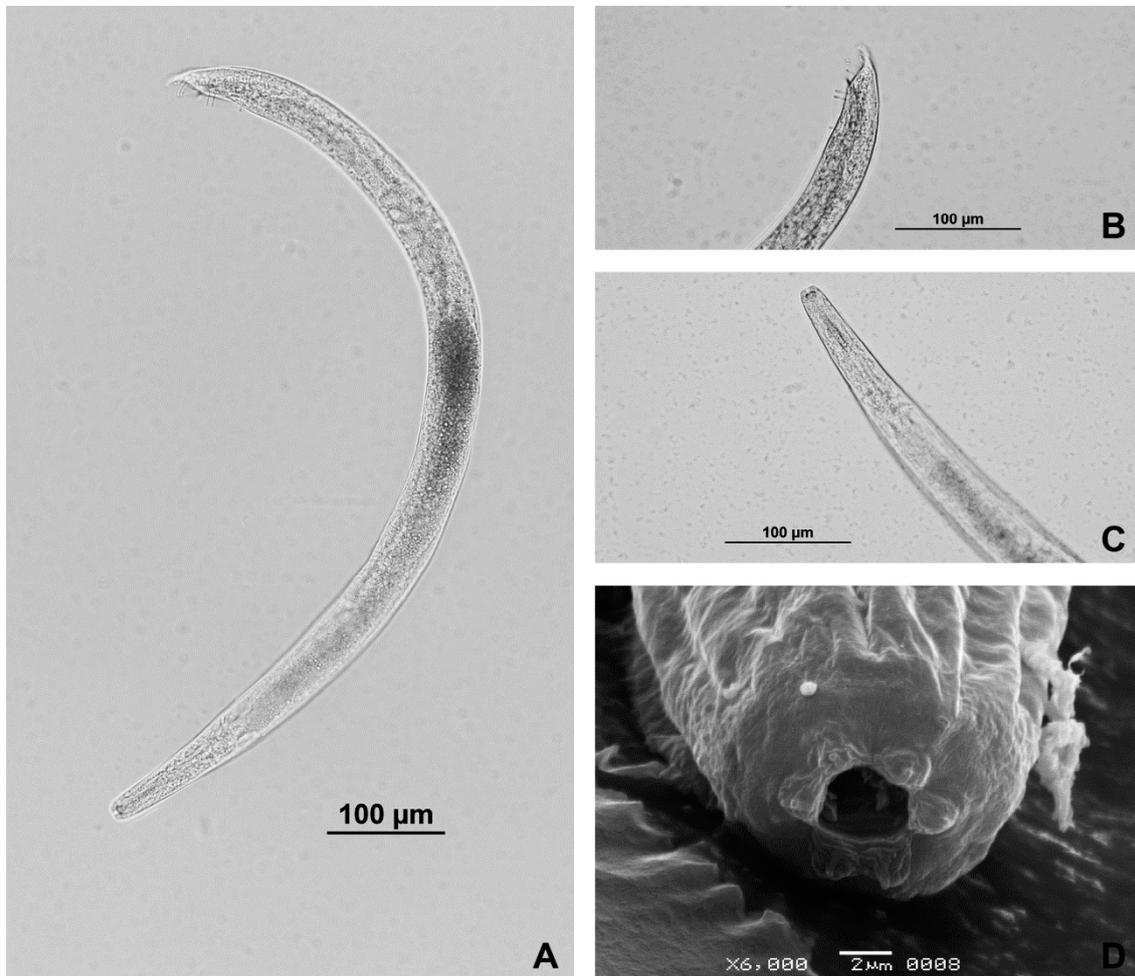


Figura 1.4: Fotografías bajo microscopio óptico y electrónico de barrido de *Heterorhabditis bacteriophora* (ejemplar macho). A. Nematodo vista general. B. Extremo posterior, con papilas bursales, vista lateral, espícula y gubernáculo. C. Extremo anterior. D. Vista frontal que muestra la apertura de anfidios.

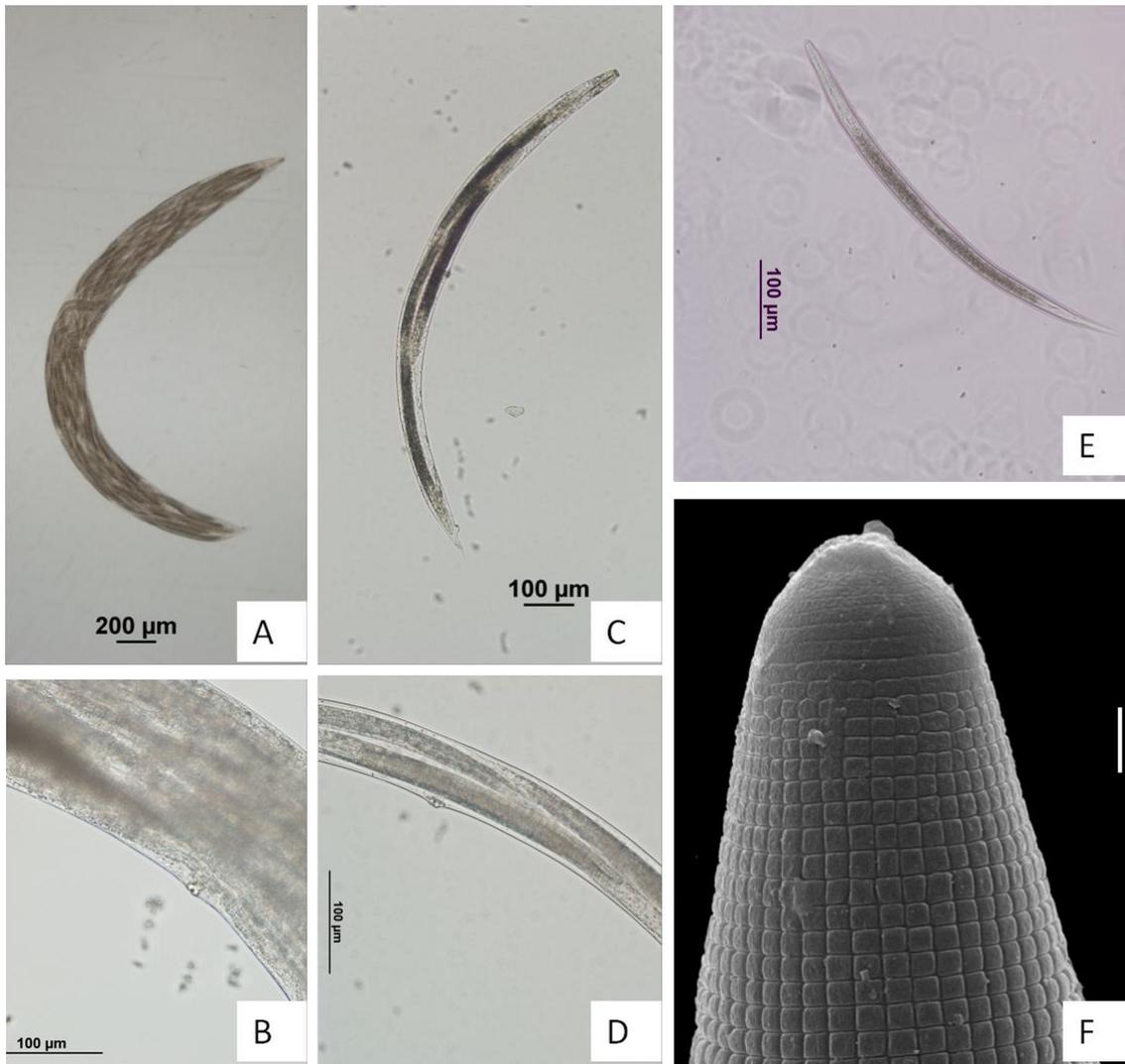


Figura 1.5: Fotografías bajo microscopio óptico y electrónico de barrido de *Heterorhabditis bacteriophora*. Hembra anfimíctica (AB). A) Endotoquia matricida. B) Región de la vulva. Hembra hermafrodita (C-D). C) Endotoquia matricida que muestra la vulva y la región anal ligeramente sobresalientes. D) Región de la vulva. E) Juvenil infectivo vista general. F) Patrón teselados y diente del juvenil infectivo: barra de escala: 2 μm.

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Los análisis bioinformáticos de los fragmentos de ADN genómico secuenciados, parte de los genes 18S, ITS1, 5.8S e ITS2 más parte del locus 28S permitieron determinar que este nematodo fuera un nuevo aislado de *H. bacteriophora*. La secuencia de genes 18S, ITS1, 5.8S e ITS2 más parte del locus 28S fue ingresada al GenBank bajo el número de acceso MH932573.1. La población fue designada como SUP de acuerdo al sitio de origen, huerta hortícola cuya propietaria es Susana Parrillo. *H. bacteriophora* SUP presentó 99 % de similitud y 93% de cobertura con el aislado *H. bacteriophora* N-Arg 18S (HQ225906.1) con un largo de 901 pb y con *H. bacteriophora* VELI (KJ575524.1) también con 901 pb, ambos de Argentina.

B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE

1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA

El extracto de hemolinfa a las 48hs de sembrado en medio NBTA, reveló la presencia de colonias bacterianas de bordes irregulares de coloración verdosa con el centro rojizo, las cuales se corresponden con las descripciones realizadas para *Photorhabdus luminescens* por Mc Mullen y Stock (2014) (Figura 1.6).

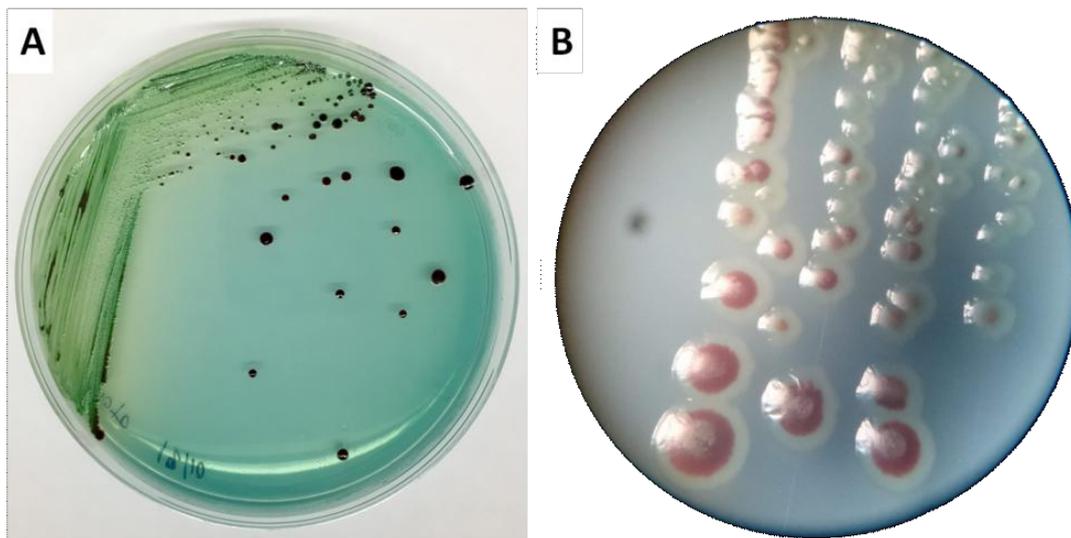


Figura 1.6: Colonias de *P. luminescens* en medio NBTA. A) Fotografía de placa. B) Fotografía de colonias bajo microscopio estereoscópico.

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Los resultados de las pruebas bioquímicas, indican que este aislamiento se corresponde con la bacteria endosimbionte *P. luminescens* (Tabla 1.1) denominada aislamiento CEPAVE. Sin embargo este tipo de caracterización no permitió determinar la subespecie.

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La biotipificación microbiana por espectrometría de masas MALDI-TOF, determinó este aislamiento como *Photorhabdus luminescens subespecie laumondii* con un score de 2,134. Este score representa una valoración de la identificación realizada y se corresponde con una segura identificación de género, y probable identificación de la especie (Tabla 1.2).

PORCENTAJE DE IDENTIDAD

El análisis de secuencia del concatenado de los genes *recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX* e *infB*, indicaron una identidad de 100 % con la cepa DSPV002N de *P. luminescens*, correspondiente a un aislamiento de la provincia de Santa Fe, Argentina (Palma et al., 2016); 99,84 % con *P. luminescens subsp. laumondii TTO1* aislada en Trinidad y Tobago (Duhaud et al., 2003) y 99,05% con *P. luminescens subsp. laumondii E21* cuya procedencia se desconoce. En la figura 1.7 se observa el árbol filogenético resultante del concatenado de los cinco genes. Las cepas que compartieron más del 97% de umbral (identidad de secuencia de nucleótidos) calculadas a partir de secuencias concatenadas de *gyrB*, *recA*, *gltX* y *dnaN* pertenecerían a la misma subespecie. El umbral del 97% de identidad sigue siendo válido cuando se aplica a las cinco secuencias de genes concatenados según Ferreira et al. (2013). Según los resultados del análisis molecular el aislamiento SUP pertenecería a la subespecie *laumondii*, al igual que el aislamiento proveniente de Santa Fe, DSPV002N, que hasta este trabajo no había sido identificado a nivel de subespecie (Palma et al., 2016).

Si bien el análisis molecular determinó este aislamiento como *P. luminescens*, las pruebas bioquímicas dieron resultados contrastantes que no permitieron asegurar la subespecie como *laumondii*. Esto se debió a diferencias en 7 de las pruebas bioquímicas (Tabla 1.1).

UEBA	Reacción / Enzimas	<i>P. luminescens</i> CEPAVE	<i>P. luminescens</i> <i>laumondii</i> TT01
ONPG	beta-galactosidasa	-	-
ADH	arginina deshidrolasa	+	-
LDC	lisina descarboxilasa	-	-
ODC	ornitina descarboxilasa	-	-
CIT	utilización del citrato	-	+
H2S	producción de H ₂ S	-	-
URE	Ureasa	+	+
TDA	triptófano desaminasa	-	+
IND	producción de indol	+	+
VP	producción de acetoina (Voges-Proskauer)	-	-
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	+	+
MAN	fermentación/oxidación de manitol	-	-
INO	fermentación/oxidación de inositol	+	-
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	+	-
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	-	-
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	-	-
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	-	-
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	-	-
OX	citocromo oxidasa	-	-
	movilidad en medio SIM	+	+
	catalasa	+	+
	DNAasa	-	+

Tabla 1.1: Caracterización y diferenciación fenotípica de la cepa *P. luminescens* CEPAVE respecto a la cepa de referencia mediante pruebas bioquímicas API 20E, API20 NE y API 50CH. Los signos (+) y (-) indican pruebas positivas y negativas, respectivamente.

Identificación del aislamiento	SCORE
<i>Photorhabdus luminescens</i> ssp <i>laumondii</i> DSM 15139T	2,134
<i>Photorhabdus asymbiotica</i> ssp <i>asymbiotica</i> DSM 15149T	1,889
<i>Photorhabdus luminescens</i> ssp <i>kayaii</i> DSM 15194T	1,838
<i>Photorhabdus luminescens</i> ssp <i>akhurstii</i> DSM 15138T	1,822
<i>Raoultella planticola</i> DSM 4617	1,651

Tabla 1.2: Biotipificación por espectrometría de masas MALDI-TOF. **Score:** (2.300-3.000) muy probable identificación a nivel de especie; (2.00-2.299) segura identificación de género, probable identificación de especie; (1.700-1.999) probable identificación de género; (0.000-1.699) identificación no confiable.

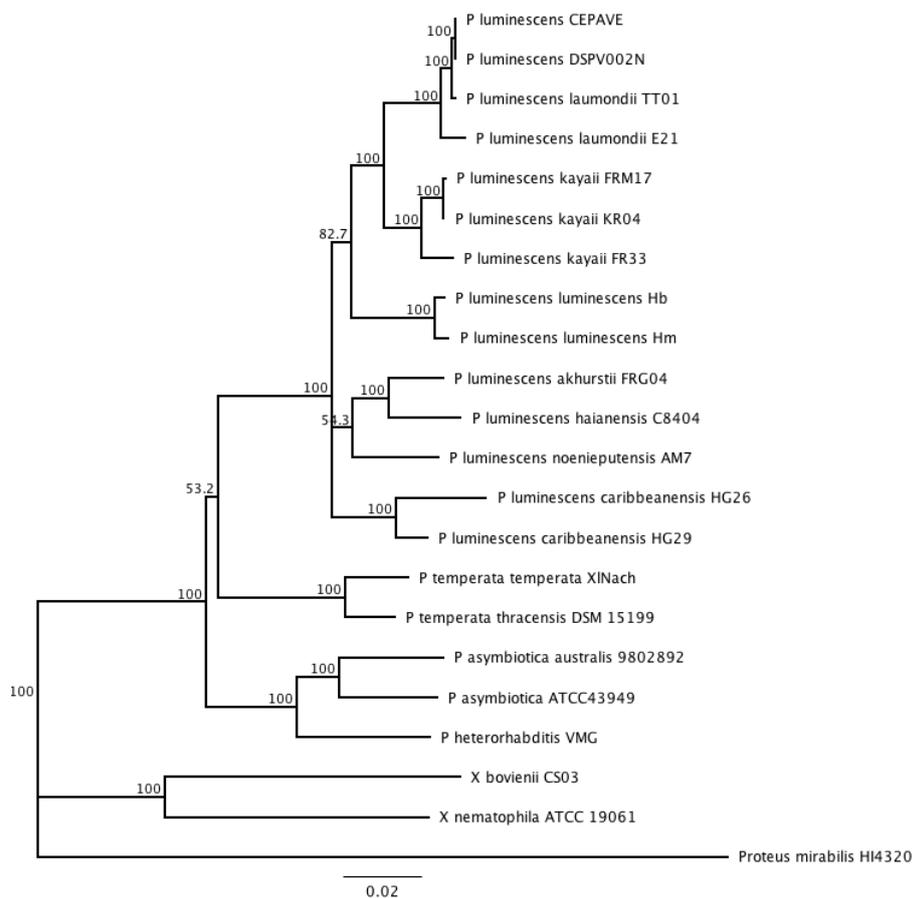


Figura 1.7. Concatenado de cinco genes (*recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX* e *infB*) (Ferreira et al., 2013) que representan 3,800 nucleótidos en total, utilizando el método *Neighbor-Joining* implementado en Geneious R11 (Drummond et al. 2018). Se utilizó un remuestreo de arranque de 1000 y se exhibieron valores de soporte de consenso superiores al 50% en cada nodo.

DISCUSIÓN

Se caracterizó morfológica y molecularmente un aislado nativo del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* procedente del Cinturón Hortícola Platense. De acuerdo con Hunt et al. (2007) la morfología del aislado demostró ser similar a la descrita para otras poblaciones de esta especie. Adultos con cabeza truncada a ligeramente redondeada, seis labios diferentes rodeando la abertura de la boca y estoma casi colapsado.

Las hembras dioicas con una vulva no funcional para la oviposición y una cola puntiaguda. Las hermafroditas con una vulva abierta funcional para la oviposición y la región anal ligeramente sobresaliente. Los machos con un único testículo reflejado, espículas emparejadas y separadas y la bursa sostenida por nueve pares de papilas. Los juveniles infectivos con una cabeza con un diente dorsal.

Con respecto al análisis genético molecular, los fragmentos de ADN genómico secuenciados, parte de los genes 18S, ITS1, 5.8S e ITS2 más parte del locus 28S presentaron un 99 % de similitud con el aislado de *H. bacteriophora* VELI procedente de la localidad de Villa Elisa (Achinelly et al., 2017a) y con *H. bacteriophora* N-Arg 18S, aislado de la Argentina pero se desconoce su procedencia (Maneesakorn et al., 2011). Cabe destacar que, los segmentos analizados constituyen en la actualidad, los marcadores más utilizados para diagnóstico y evaluación de relaciones filogenéticas entre taxones (Stock, 2015). Para el CHP se han citado al momento dos poblaciones de *H. bacteriophora*, una en la localidad de City Bell asociadas a cultivos extensivos de maíz (Stock, 1995) y otra (VELI) asociado a cultivos de repollo (Achinelly et al., 2017a).

El aislado *H. bacteriophora* SUP, representa un nuevo registro para el CHP y el primer registro para la localidad de Melchor Romero. La importancia de este aislado radica en el hecho de haber sido hallado asociado a un cultivo de tomate, que representa el principal cultivo en importancia para la región.

De acuerdo a Ferreira et al. (2014), la bacteria endosimbionte aislada de *H. bacteriophora* SUP se corresponde con la especie ya descrita *Photorhabdus luminescens*, así lo revelan la morfología de las colonias (Mc Mullen y Stock, 2014), las pruebas bioquímicas y el análisis molecular. Sin embargo, no existe congruencia entre las pruebas bioquímicas y moleculares para la determinación de la subespecie. El concatenado de los genes arrojó para el aislamiento *P. luminescens* CEPAVE un mayor porcentaje de identidad nucleotídica con la cepa DSPV002N, aislada de hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* en Santa Fe, Argentina (Palma et al., 2016) y con la cepa de referencia *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1. El porcentaje de identidad nucleotídica entre las tres cepas superó el umbral del 97%, sugiriendo que se tratan de la misma subespecie (Ferreira et al., 2013). Sin embargo, las pruebas bioquímicas detectaron diferencias respecto a la cepa de referencia en al menos seis pruebas bioquímicas, las cuales no pudieron contrastarse con la cepa DSPV002N, dado que no fueron realizadas por Palma et al. (2016).

Este aislamiento representa el primer registro de un nematodo entomopatógeno asociado a cultivos de tomate en el cinturón hortícola platense, sumándose a la lista de los enemigos naturales presentes en este cultivo, considerándose como un potencial agente de control de insectos plaga, aunque se desconoce el hospedador natural. Pruebas de patogenia en

condiciones naturales y de laboratorio serán necesaria para evaluar su uso como biocontrolador.

BIBLIOGRAFÍA

- Achinelly, M. F., Eliceche, D. P., Belaich, M. N., & Ghiringhelli, P. D. (2017a). Variability study of entomopathogenic nematode populations (Heterorhabditidae) from Argentina. *Brazilian Journal of Biology* 77(3), 569-579.
- Achinelly, M. F., Camino, N., Eliceche, D., Salas, A., & Rusconi, M. (2017b). Status of Entomopathogenic Nematodes in Integrated Pest Management Strategies in Argentina. p 327-347. En: Abd-Elgawad, M. M., Askary, T. H., & Coupland, J. (Eds.). *Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes*. CABI. Wallingford, Reino Unido. 348pp.
- Akhurst, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Microbiology* 121(2), 303-309.
- Akhurst, R.J. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology* 128, 3061–3065.
- Akhurst, R. J., & Bedding, R. A. (1986). Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in soil in Australia. *Austral Entomology* 25(3), 241-244.
- Bedding, R. A., & Akhurst, R. J. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21(1), 109-110.
- Bode, H.B. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current opinion in chemical biology* 13, 224–230.
- Boemare, N. E., & Akhurst, R. J. (1988). Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Microbiology* 134(3), 751-761.
- Boemare, N. E., Akhurst, R. J., & Mourant, R. G. (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43(2), 249-255.
- Boemare, N. (2002). Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. p. 35-56. En: *Gaugler, R. (Ed.). Entomopathogenic Nematology*. CABI publishing. Wallingford, Reino Unido. 388 pp.

-
- Campos-Herrera, R., Gomez-Ros, J. M., Escuer, M., Cuadra, L., Barrios, L., & Gutiérrez, C. (2008). Diversity, occurrence, and life characteristics of natural entomopathogenic nematode populations from La Rioja (Northern Spain) under different agricultural management and their relationships with soil factors. *Soil Biology and Biochemistry* 40(6), 1474-1484.
 - Chapuis, E., Emelianoff, V., Paulmier, V., Le Brun, N., Pag`Es, S., Sicard, M., & Ferdy, J. (2009). Manifold aspects of specificity in a nematode–bacterium mutualism. *Journal of evolutionary biology* 22, 2104–2117.
 - Ciche, T. A., & Ensign, J. C. (2003). For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and environmental microbiology* 69(4), 1890-1897.
 - Clarke, D. J. (2014). The genetic basis of the symbiosis between *Photorhabdus* and its invertebrate hosts. p. 1-29. In: Sariaslani, S. & Gadd, G.M. (Eds.). *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. Vol. 88. 226p.
 - De Doucet, M. M. A., Miranda, M. B., Bertolotti, M. A., & Caro, K. A. (1996). Efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (strain OLI) in relation to temperature, concentration and origin of the infective juvenile. *Nematropica* 26(2), 129-133.
 - Del Valle, E. E., Lax, P., Rondan Dueñas, J., & Doucet, M. E. (2013). Effects of insect cadavers infected by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema diaprepesi* on *Meloidogyne incognita* parasitism in pepper and summer squash plants. Pontificia Universidad Católica Chile. *Ciencia E Investigación Agraria* 40 (1), 109-118.
 - Doucet, M. D., & Laumond, C. (1996). Uso de nematodos entomopatógenos a campo. p. 279-292. En: Lecuona, R. (ed.). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas*. Buenos Aires, Argentina. Ed. Sudamericana.
 - Doucet, M.E., Bertolotti, M.A., Cagnolo, S. and Lax, P. (2008) Nematodos entomofílicos de la provincia de Córdoba, Argentina. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* LXII, 263–267.
 - De Doucet, M.M.A. (1986). A new species of *Neoplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Córdoba, Argentina. *Revue de Nematologie* 9, 317–323.
 - De Doucet, M.M.A. and Bertolotti, M.A. (1996). Una nueva población de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 para Argentina. Caracterización y acción sobre el huésped. *Nematologia mediterranea* 24,169–174.
 - Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., et al. (2018). Geneious R11. [On line].

-
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S. & Dassa, E. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature biotechnology* 21(11), 1307.
 - Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5(1), 113.
 - Ferreira, T., Van Reenen, C., Pages, S., Tailliez, P., Malan, A. P., & Dicks, L. M. (2013). *Photorhabdus luminescens* subsp. *noenieputensis* subsp. nov., a symbiotic bacterium associated with a novel *Heterorhabditis* species related to *Heterorhabditis indica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(5), 1853-1858.
 - Ferreira, T., van Reenen, C. A., Endo, A., Tailliez, P., Pagès, S., Spröer, C. & Dicks, L. M. (2014). *Photorhabdus heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(5), 1540-1545.
 - Fischer-Le Saux, M., Viillard, V., Brunel, B., Normand, P., & Boemare, N. E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49(4), 1645-1656.
 - Forst, Steven & Clarke, David. (2002). Bacteria-nematode symbiosis. *Entomopathogenic nematology* 57-77.
 - 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. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias* 35(2), 163-183.
 - Grewal P.S., Lewis E.E., & Gaugler R. (1997). Response of infective stage parasites (Nematoda: Steinernematidae) to volatile cues from infected hosts. *Journal of Chemical Ecology* 23, 503–15.
 - Grewal, P. S., & Peters, A. (2005). Formulation and quality. p. 79-90. In: Grewal, P. S., Ehlers, R. U., & Shapiro-Ilan, D. I. (Eds.). *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing, Wallingford. 505pp.

-
- Griffin, C. T. (2012). Perspectives on the behavior of entomopathogenic nematodes from dispersal to reproduction: traits contributing to nematode fitness and biocontrol efficacy. *Journal of Nematology* 44(2), 177.
 - Hunt, D. (2007). Overview of taxonomy and systematic. p.27-57. In: Nguyen, K., & Hunt, D. (2007). *Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts*. Leiden, Boston. 811 pp.
 - IBBM-Identificación de especies microbianas por espectrometría de masa MALDI-TOF (ST3071). (s.f.). Descargado de: <https://ibbm.conicet.gov.ar/servicios/>
 - Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques in Insect Nematology. p. 281-324. In: Lacey L. (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. 409 pp.
 - Kears, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12), 1647-1649.
 - Labaude, S., & Griffin, C. (2018). Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. *Insects* 9(2), 72.
 - Laznik, Ž., Tóth, T., Lakatos, T., Vidrih, M., & Trdan, S. (2010). The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 8(1), 150-154.
 - Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., & Peters, A. (2006). Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 38(1), 66-79.
 - Lunau, S., S. Stoessel, A. J. Schmidt-Peisker & R.-U. Ehlers. (1993). Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Nematologica* 39, 385-399.
 - Maneesakorn, P., Daneshvar, H., Taylor, K., Bai, X., Adams, B., Grewal, P., & Chandrapatya, A. (2011). Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditis: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59, (2) 271-280.
 - McMullen, J. G., & Stock S.P. (2014). *In vivo* and *in vitro* rearing of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (91), e51677.
 - Palma, L., Del Valle, E. E., Frizzo, L., Berry, C., & Caballero, P. (2016). Draft genome sequence of *Photorhabdus luminescens* strain DSPV002N isolated from Santa Fe, Argentina. *Genome Announcements* 4(4), e00744-16.

-
- Saitou, N., & Nei, M.(1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 426pp.
 - Sandhu, S. K., Jagdale, G. B., Hogenhout, S. A., & Grewal, P. S. (2006). Comparative analysis of the expressed genome of the infective juvenile entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 145(2), 239-244.
 - Seinhorst, J.W. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4, 117-128.
 - Stock, S.P. (2015). Diversity, biology and evolutionary relationship. In: Campos-Herrera, R. (Ed.). Nematode pathogenesis of insects and other pests. Springer International Publishing AG Switzerland. Switzerland. pp. 531.
 - Stock, S. P. (1993). Description of an Argentinian strain of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologia Mediterranea* 21(2), 279-283.
 - Stock, S. P. (1995). Natural populations of entomopathogenic nematodes in the Pampean region of Argentina. *Nematropica* 25(2), 143-148.
 - Thomas, G. M., & Poinar JR, G. O. (1979). *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 29(4), 352-360.
 - Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4), 506-513.
 - Waterfield, N. R., Ciche, T., & Clarke, D. (2009). *Photorhabdus* and a host of hosts. *Annual Review of Microbiology* 63, 557–574.

CAPITULO II: Producción de NEPs. Optimización de la cría del nematodo *H. bacteriophora* SUP

INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos resultan ser fácilmente producidos *in vivo* o *in vitro* para la producción comercial a gran escala, así como para la experimentación en laboratorio o las pruebas a campo (Shapiro-Ilan et al., 2012). El uso y éxito de estos organismos a campo como agentes de biocontrol exige una metodología eficiente de producción que proporcione altas densidades de JIs sin alterar su virulencia. La producción *in vitro* se lleva a cabo en medios sólidos o líquidos, mientras que la producción *in vivo* implica la inoculación masiva de varios hospedadores de insectos, principalmente la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* (Lepidoptera) o el gusano amarillo *Tenebrio molitor* (Coleoptera), y la cosecha a partir de los mismos (Shapiro-Ilan et al., 2012). Cada método tiene ventajas y desventajas en relación con el costo de producción, desembolso de capital, experiencia técnica requerida, economía de escala y la calidad del producto (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002). Para la producción *in vitro*, los factores clave son seleccionar un medio adecuado, monoxénico (solo las bacterias simbióticas presentes) y garantizar el oxígeno adecuado (Ehlers, 2001; Gaugler y Han, 2002).

Respecto a la producción *in vivo*, la selección de un hospedador adecuado, debe tener en cuenta varios parámetros con el fin de obtener un producto de calidad, entre ellos, la susceptibilidad del hospedador, la disponibilidad, la facilidad, el costo de criarlo y la calidad de los nematodos producidos (Van Zyl y Malan, 2015). También es necesario considerar factores ambientales tales como temperatura, aireación y humedad ya que pueden afectar el rendimiento. Generalmente la temperatura óptima de mantenimiento está relacionada con las condiciones climáticas del sitio de origen de los nematodos (Lewis & Clarke 2012).

Una preocupación tanto para la producción *in vivo* como *in vitro* es el deterioro de la cepa. Cuando se aísla un agente de control biológico de la naturaleza y es criado en el laboratorio, o es producido en masa con fines comerciales, puede perder rasgos beneficiosos debido a procesos que incluyen deriva, endogamia o selección inadvertida (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).

Por estos motivos, con el fin de conocer y mejorar la viabilidad de *H. bacteriophora* cepa SUP, un aislamiento nativo adaptado a las condiciones del cinturón hortícola platense, durante su producción y mantenimiento en el laboratorio, se propuso estudiar la longevidad, supervivencia y patogenicidad de la misma bajo diferentes condiciones de almacenamiento, así también las condiciones de reproducción y desarrollo de su bacteria endosimbionte.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. PRODUCCIÓN *IN VIVO* de NEPs

1. CRÍA DE INSECTOS: *Tenebrio molitor*

La cría de *T. molitor* se estableció a partir de la adquisición de ejemplares en tiendas que comercializan alimentos para mascotas. Las mismas fueron colocadas en recipientes plásticos de 20 cm de diámetro y 35 de alto, cubiertos por la parte superior con una tela *voile*. La dieta utilizada consistió en una mezcla de salvado de trigo, avena, levadura y restos de pan, y se complementó con trozos de manzana para brindarle un sustrato húmedo pero en baja proporción. Los diferentes estados del ciclo de estos escarabajos se mantuvieron en recipientes separados en condiciones de temperatura (25°C) y humedad relativa (80%) controladas.

2. INOCULACIÓN DE INSECTOS

El método utilizado en este estudio basado en Stock y Goodrich-Blair (2012) consistió en la inoculación de una suspensión acuosa de juveniles infectivos utilizando pipetas sobre un disco de papel de filtro colocado dentro de cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro. Sobre este disco se agregaron 10 larvas de *T. molitor* y se colocó la tapa de la capsula. Estas “trampas de infección” se mantuvieron a una temperatura de 25°C ± 2. Cada 24 hs se registró la mortalidad de las larvas expuestas, las cuales exhibieron la coloración rojiza característica por la infección por estos nematodos. Una alternativa a esta técnica utilizada fue el uso de tierra estéril como sustrato para la aplicación del inóculo.

3. COSECHA DE NEMATODOS: TRAMPA WHITE MODIFICADA

Los insectos muertos se transfirieron a otra capsula de Petri durante 5 días y luego se colocaron en trampas White modificadas (Kaya y Stock, 1997). Esta trampa, consistió en una capsula de Petri de 9 cm de diámetro, a la cual se le agregó dentro la tapa de una capsula Petri de 5 cm, sobre esta se colocó un disco de papel de filtro de 5 cm de diámetro con los cadáveres de insectos infectados. El espacio libre de la capsula más grande se completó con agua. Una vez incorporados todos los componentes mencionados se colocó la tapa y se almacenó a 25°C ± y 80 % HR. En un período de 5-10 días se registró la emergencia de los juveniles, los cuales migraron al agua. Los juveniles fueron retirados utilizando una pipeta Pasteur y colocados en frascos de cultivo celular para su posterior recuento.

4. CUANTIFICACIÓN

Los nematodos se cuantificaron por recuento directo o por dilución, a partir del día de la primera emergencia hasta su finalización. El recuento directo es utilizado solo para un pequeño número de nematodos, usualmente no más de 50 individuos (Stock y Goodrich-Blair, 2012). Los nematodos se transfirieron a una cámara de recuento pequeña o *Nematode Counting Slide*. Esta cámara de recuento contiene un volumen conocido y proporciona cuadrículas para ayudar a contar. El recuento por dilución se utiliza para suspensiones cuya

concentración es mayor a 50 individuos. Para ello se debe homogeneizar la suspensión inicial, se toma 1 ml y se re suspende en X ml de agua. Es nuevamente homogeneizada y posteriormente, se toma con pipeta una cantidad suficiente, se coloca en la cámara de recuento para nematodos y se procede al recuento bajo microscopio estereoscópico. Este conteo debe realizarse de 3 a 5 veces. Para determinar la concentración de nematodos en la suspensión original, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{N \times 1 (X+1)}{M} = S$$

N = promedio de nematodos por muestra contada

M = numero de ml por muestra contada

S = concentración inicial de la suspensión (nematodos/ml)

X + 1 = dilución

5. ALMACENAMIENTO

Los NEPs pueden ser almacenados en agua destilada en frascos de cultivo celular (Figura 2.1). Para ello se siguió el protocolo descrito por Stock (2012), los JIs colectados en la trampa White son examinados con el objetivo de determinar su actividad, y son colocados en frascos de cultivo almacenados en posición horizontal. Usualmente 1500-3000 JIs/ml es un buen numero para almacenar en los frascos (Stock y Goodrich-Blair, 2012).



Figura 2.1: Frascos de cultivo celular para el almacenamiento de JIs. Los JIs que emergen de cadáveres de insectos infectados en las trampas White son almacenados en suspensiones acuosas en frascos de cultivo celular para su posterior utilización.

B. FACTORES QUE AFECTAN LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

1. INFECTIVIDAD Y TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN

El objetivo de este bioensayo fue evaluar la eficacia del nematodo bajo diferentes condiciones de temperatura. Se utilizó una concentración de 1500 JIs/ml y 30 larvas de *T. molitor* por ensayo. Cada ensayo se incubó a diferentes temperaturas 4, 11, 16 y 25°C (Tabla 2.1). A su vez, para cada temperatura se calculó el tiempo letal mediante un análisis Probit, producción de JIs y tiempo de emergencia, tal como se describió para bioensayos previos.

2. CONCENTRACIÓN Y TIEMPO LETAL 50 Y 90

En este bioensayo se determinó la concentración necesaria para que los NEPs mataran el 50% y el 90% de las larvas de *T. molitor* (CL50 y CL90). El ensayo se llevó a cabo a una temperatura de 25°C de acuerdo con Stock y Goodrich (2012). Las larvas se añadieron a cápsulas Petri de 10 cm de diámetro (n = 10), las cuales contenían un disco de papel de filtro embebido con una suspensión de nematodos. Sobre las larvas se colocó otro disco de papel humedecido. Las concentraciones evaluadas fueron de 0, 250, 500, 1000, 1500 y 4000 JIs por cápsula. Solo se realizó la prueba de patogenicidad en larvas dado que es el estado más susceptible. El número de individuos evaluados se muestra en la tabla 2.2. La mortalidad se registró cada 24 hs en un periodo de 5 días, los cadáveres que adquirieron la coloración característica se colocaron en trampas White modificadas para registrar la emergencia de los JIs, evidenciando que el nematodo ha completado el ciclo. En los casos en que no se observó emergencia, se realizó la disección de los cadáveres. Se consideró infección positiva a aquella en la cual se registró la emergencia de JIs o se observó la presencia de nematodos en el interior del cadáver al realizarse la disección de los mismos.

Para cada una de las concentraciones evaluadas se calculó el TL50 y 90 en las larvas de *T. molitor*. El número de individuos evaluados se muestra en la tabla 2.2. La mortalidad se registró cada 24 hs en un periodo mínimo de 5 días, los cadáveres que adquirieron la coloración característica fueron disecados para corroborar la infección.

Análisis estadístico: Para calcular la concentración y tiempos letales se utilizó un modelo probit. Para el cálculo de dicho modelo se utilizó la librería Ecotoxicology (v 1.0.1), implementada en R, con la función ProbitEPA que simula la estimación probit de la EPA *Ecological Exposure Research Division* (EERD) (Finney, 1964).

3. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y TIEMPO DE VIDA DE LOS JUVENILES INFECTIVOS (JIs) SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

Se realizaron bioensayos utilizando suspensiones de JIs almacenadas en frascos de cultivo celular. Estos frascos se colocaron en incubadora bajo tres condiciones de temperatura 4, 16 y 25°C, y se evaluó la patogenicidad de las mismas en larvas de *T. molitor* (n=10), luego de un cierto tiempo de estar almacenados en cada una de las temperaturas mencionadas. Se consideró a este tiempo como tiempo de vida de los JIs, es decir, el tiempo comprendido entre

la fecha de emergencia de los cadáveres infectados, hasta el tiempo transcurrido al momento de su uso sin pasar por un hospedador. Los tiempos de vida considerados fueron de 30, 60, 90 y 120 días para cada una de las temperaturas mencionadas. La concentración de JIs utilizada fue de 1000 JIs/ml, para asegurar una alta mortalidad. Para cada bioensayo se registró infectividad, porcentaje de emergencia, tiempo de emergencia, producción por cadáver y tiempo letal 50 y 90 (Tabla 2.3).

Análisis estadístico: La metodología estadística empleada para realizar las diferentes comparaciones incluyó un test de exacto de Fisher para comparar los datos de Infectividad para cada tiempo y temperatura. Un error global tipo I de (p -valor: 0,05) se ajustó a p -valor: 0,00093 por la tasa de error experimental, debido al número de comparaciones realizadas (Lyman Ott y Longnecker, 2010). Para comparar la producción de JIs se planteó el análisis como un ANOVA de dos factores con interacción. Todos los análisis fueron realizados utilizando software R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.).

4. SUPERVIVENCIA Y LONGEVIDAD DE JIS ALMACENADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y DENSIDAD

Para evaluar el efecto de la densidad y la temperatura sobre la supervivencia y longevidad se realizó un ensayo en el cual los JIs emergidos de cadáveres infectados con una semana de vida se almacenaron en frascos de cultivo celular de 50 ml con agua destilada bajo diferentes condiciones (Figura 2.1). Cada frasco contó con un volumen de suspensión de 20 ml y se utilizaron concentraciones de 2500, 5000 y 7500 JIs/ml las cuales fueron calculadas por el método de dilución. Estas suspensiones se almacenaron en incubadoras a tres temperaturas, 4, 16 y 25°C. Cada concentración fue evaluada por triplicado y se repitió dos veces en el tiempo por temperatura. Semanalmente se registró la supervivencia a partir del recuento de JIs vivos, durante el tiempo en que se evidenció la viabilidad de los mismos por observación de actividad bajo microscopio estereoscópico. Las suspensiones almacenadas a 4°C se aclimataron durante 4 hs antes de realizar el recuento debido a la reducción de su actividad a esta temperatura.

Para determinar la condición óptima de almacenamiento, es decir, aquella densidad y temperatura que asegure una mayor longevidad y supervivencia en el tiempo, se creó una variable llamada “**diferencia media semanal**”, que fue el resultado de la diferencia entre el N° de individuos vivos en la primera y última semana sobre el total de semanas en que se registró la supervivencia de los JIs, para cada una de las condiciones evaluadas.

Análisis estadístico: Se planteó el análisis como un ANOVA de dos factores (temperatura y densidad) con interacción. Debido a la diferencia en la cantidad de réplicas en cada combinación se usó sumas de cuadrados de tipo III. En los casos en que se encontraron diferencias significativas (p -valor<0,05) se realizaron comparaciones múltiples con el método HSD de Tukey. Todos los análisis fueron realizados utilizando software R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.).

5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

Este bioensayo fue diseñado con el fin de evaluar la relación entre una concentración determinada de JIs, la proporción de hospedadores expuestos al patógeno que se infectan (infectividad) y la producción de JIs registrada a partir del día de la emergencia. Las concentraciones utilizadas y condiciones de exposición fueron las evaluadas en los bioensayos de CL50 y CL90. Se registró la infectividad, como el número de hospedadores que resultaron infectados sobre el total de hospedadores expuestos (Tabla 2.5). Los cadáveres que exhibieron la coloración característica fueron colocados en trampas White modificadas, se registró la fecha de emergencia y se realizó un recuento semanal de JIs emergidos a partir de dicha fecha.

Análisis estadístico: La metodología estadística empleada para realizar las diferentes comparaciones incluyó un test exacto de Fisher para comparar los datos de Infectividad para cada tiempo y temperatura. Un error global tipo I (p-valor: 0,05) fue considerado el cual fue ajustado a (p-valor: 0,0051) por la tasa de error experimental, debido al número de comparaciones realizadas (Lyman Ott y Longnecker, 2010). Para las comparaciones de producción y tiempos de emergencia se utilizó un análisis ANOVA y las comparaciones fueron realizadas usando un pairwise test de t. El ajuste del p-valor para comparaciones múltiples se realizó por el método de Benjamini y Hochberg (BH).

6. EFECTO DE LA SUPERFICIE DE APLICACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

Se realizaron bioensayos para evaluar la infectividad de JIs bajo diferentes superficies de exposición. Se utilizaron capsulas de Petri de 5, 10 y 20 cm de diámetro y una dosis de 1000:10 (JIs/larva de insecto). Se agregaron larvas de *T. molitor* (n=10) sobre un papel de filtro embebido con la suspensión de nematodos. Se registró infectividad, producción por cadáver, porcentaje de emergencia y días de emergencia para cada una de las superficies de exposición evaluadas. El número de individuos evaluados para cada superficie se muestra en la tabla 2.6.

Análisis estadístico: Los datos de infectividad se analizaron por un test exacto de Fisher. Un error global tipo I (p-valor: 0,05) fue considerado, el cual fue ajustado a (p-valor: 0,01695) por la tasa de error experimental. Para los datos de producción y tiempo de emergencia se realizó un ANOVA, y para las comparaciones múltiples pairwise test de t. El ajuste del p-valor para comparaciones múltiples se realizó por el método de Benjamini y Hochberg (BH).

7. EXPOSICIÓN DE JIs NO INFECTIVOS A LA BACTERIA SIMBIÓTICA PARA RECUPERACIÓN DE LA PATOGENIA

Los juveniles infectivos conservados a 4°C luego de 5 meses sin pasar por un hospedador, que registraron pérdida de la patogenia en el ensayo descrito en el apartado B.3., se expusieron a un cultivo de *Photorhabdus luminescens*, con el fin de determinar si la pérdida de patogenia fue debida a la capacidad de los JIs de invadir a un hospedador o a la viabilidad de la bacteria endosimbionte. La bacteria fue sembrada en un medio NBTA, luego de 48 hs se agregó a este medio una suspensión 10.000 JIs. A los 13 días de haber expuesto los JIs al

cultivo se agregó solución fisiológica a la placa, y con ayuda de una pipeta se recogieron los JIs suspendidos en la solución. Se realizaron varios lavados con solución fisiológica, seguidos de centrifugación y descarte del sobrenadante, con el objetivo de eliminar los remanentes de bacterias. La suspensión fue contabilizada por el método de dilución ya descrito previamente. Se realizaron bioensayos exponiendo larvas de *T. molitor* (n=10) a una concentración de 1000 JIs/ml. Se realizaron un total de tres réplicas exponiendo las larvas a JIs tratados con *Photorhabdus luminescens*, no tratados y un control con larvas de *T. molitor* expuestas solo con agua, libres de nematodos. Se determinó la infectividad y mortalidad en cada caso.

C. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE NEPs

1. AISLAMIENTO DE *Photorhabdus luminescens*

Para el aislamiento de la bacteria endosimbionte se realizó una infección con una concentración de 100 JIs, en capsulas Petri de 9 cm, las cuales fueron expuestas a 10 larvas de *T. molitor*. Los cadáveres infectados que exhibieron la coloración rojiza característica fueron desinfectados en solución de hipoclorito de sodio al 1% y posteriormente se realizaron 3 lavados en agua destilada estéril, siguiendo los procedimientos de Akhurst (1980). La extracción y aislamiento de la bacteria se realizó bajo cámara de flujo laminar. La técnica utilizada fue por punción. Se utilizó una aguja hipodérmica con la cual se punzaron los intersegmentos de varias regiones del cuerpo del insecto con el objetivo de obtener la hemolinfa cargada de bacterias. La hemolinfa extraída fue suspendida en 80 µl de solución fisiológica estéril. A partir de esta suspensión se realizó una siembra de superficie en agar NBTA, mencionado para la caracterización de la bacteria según Akhurst (1980). Las placas fueron incubadas a 29°C.

2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VIABILIDAD DE LA BACTERIA

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para la curva de supervivencia se realizó un preinóculo en erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de caldo nutritivo previamente esterilizado en autoclave (a 1 atmósfera de presión y 121°C de temperatura durante 25 minutos). Se tomaron con un ansa estéril colonias del medio de cultivo crecido en el apartado anterior y se dispersaron en el caldo nutritivo. Este preinóculo se conservó en agitación en shaker rotatorio a 250 rpm en cámara de incubación a 30°C durante 72 hs. Este cultivo se usó para inocular los medios para comenzar con igual número de unidades formadoras de colonias (UFC). Una vez alcanzada la fase estacionaria se tomaron 200 µl del preinóculo para inocular los medios de cultivo y se dispersaron en 3 erlenmeyer con 100 ml de caldo nutritivo fresco cada uno. Se incubaron en agitación en bioterio a 30°C hasta alcanzar la fase estacionaria. Una vez alcanzada esta fase se incubó cada uno de los inóculos bajo diferentes temperaturas 4, 16 y 25°C, respectivamente. Previamente las células viables se estimaron mediante el recuento de UFC. Semanalmente se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias para registrar la viabilidad de las bacterias en cada una de las condiciones de incubación.

RECuento DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Siguiendo los procedimientos desarrollados por Fisher y Garczynski (2012) para bacterias entomopatógenas, se transfirió asépticamente 1 ml de cada medio crecido a un tubo eppendorf. Luego se realizó una dilución seriada 1:10. Se tomaron 100 μ l de las suspensiones originales y se resuspendieron en 900 μ l de solución fisiológica. Posteriormente se continuó la dilución en serie hasta 10^{-8} . A continuación se tomaron 10 μ l de cada dilución y se sembraron en placa, un total de 4 muestras por dilución fueron sembradas. El medio utilizado para el recuento fue agar nutritivo. A las 48 hs se contaron las unidades formadoras de colonias. Este procedimiento se repitió semanalmente para registrar la viabilidad de la bacteria en el tiempo bajo las tres condiciones de temperatura. Para el cálculo de UFC se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml: (N}^\circ \text{ de colonias * inversa del factor de dilución) /volumen de siembra}$$

Para comparar la viabilidad de la bacteria entre las temperaturas evaluadas se determinó la diferencia media semanal, como el resultado de la diferencia entre el número de células viables en la primera y última semana sobre el total de semanas en que se registró dicha viabilidad, para cada una de las temperaturas evaluadas. Se realizó un análisis ANOVA para comparar la variable utilizada entre las tres temperaturas, y para las comparaciones múltiples se utilizó la función pairwise test de t en R. El ajuste del p -valor para comparaciones múltiples se realizó por el método de Benjamini y Hochberg (BH).

RESULTADOS

B. FACTORES QUE AFECTAN LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

1. INFECTIVIDAD Y TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN

La infectividad resultó significativamente diferente entre las temperaturas de 16 °C- 25 °C; 16 °C- 4 °C; 16 °C-11 °C; 25 °C-11 °C y 25 °C-4 °C, de acuerdo al test exacto de Fisher realizado, con un p-valor ajustado de = 0,0085 (Tabla 2.1). Esta infectividad resultó ser mayor a 25°C respecto de 16°C mientras que para las temperaturas de exposición de 4 y 11°C no se ha registrado mortalidad (Tabla 2.1).

Los datos de producción y tiempos de emergencia analizados por Kruskal-Wallis, no arrojaron diferencias significativas para las tres temperaturas.

Los tiempos letales 50 y 90 obtenidos del análisis probit para la temperatura de exposición 16°C fueron de 5,33 y 7,95 días respectivamente, mientras que para 25°C fueron de 2,6 y 4,16 días, resultando éstos últimos menores a los tiempos registrados para 16°C.

Los resultados sugieren que la temperatura de exposición tuvo un efecto sobre la infectividad, resultando ser esta menor a bajas temperaturas (16 °C) y sobre el tiempo letal, resultando este menor a temperaturas de 25°C.

2. CONCENTRACIÓN Y TIEMPO LETAL 50 Y 90

La concentración letal requerida para matar 50 y 90% de las larvas (CL50 y CL90) durante 5 días fue de 8,47 y 104,42 JIs/insecto (Fig. 2.2 A-B). El tiempo transcurrido para matar

el 50% de las larvas para las concentraciones de 250, 500, 1000, 1500 y 4000 JIs/recipiente fue de 3,94; 3,87; 3,18; 3,1 y 1,88 días respectivamente; mientras que el tiempo requerido para matar el 90% fue de 6,51; 6,38; 5,13; 4,91 y 3,14 (Tabla 2.2).

3. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y TIEMPO DE VIDA DE LOS JUVENILES INFECTIVOS (JI) SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

Los resultados de este bioensayo se resumen en la tabla 2.3. El test exacto de Fisher realizado para comparar los datos de infectividad arrojó diferencias significativas en los tiempos de vida agrupados con las diferentes temperaturas, con un p-valor ajustado de 0,00093. De un total de 55 comparaciones 8 resultaron significativamente diferentes, y estas se corresponden con la temperatura de 4°C y 120 días de vida (Figura 2.3). Los tiempos letales obtenidos del análisis probit realizado en R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.) se resumen en la tabla 2.3. El tiempo letal fue menor a 25°C, en todos los tiempos de vida evaluados. Mientras que los mayores tiempos letales fueron registrados a 4°C y tiempos de vida mayores a 60 días.

Temp. Exp.	N	Infectividad %	Producción JIs/larva	Tiempo de emergencia (días)	LT 50			LT 90		
					Días	LCI	LCS	Días	LCI	LCS
4°C	100	0 ^a	0	0	-	-	-	-	-	-
11°C	60	0 ^a	0	0	-	-	-	-	-	-
16°C	120	82,22 ± 10,9 ^b	41971 - 148133	13,8 ± 3,78	5,33	4,45	6,35	7,95	6,79	10,59
25°C	90	96,67 ± 5 ^c	30667 - 84088	15,08 ± 2,32	2,60	1,02	3,84	4,16	3,20	9,41

Tabla 2.1: Efecto de la temperatura de exposición sobre la infectividad, producción, emergencia media y tiempo letal de *H. bacteriophora* en larvas de *T. molitor*. Valores de tiempo letal 50 y 90 para cada una de las temperaturas con sus respectivos intervalos de confianza en R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.). LCI: límite de confianza inferior; LCS: límite de confianza superior; Temp. Exp.: temperatura de exposición; N: número de larvas evaluadas; Producción: producción media por larva; Tiempo de emergencia: tiempo de emergencia medio.

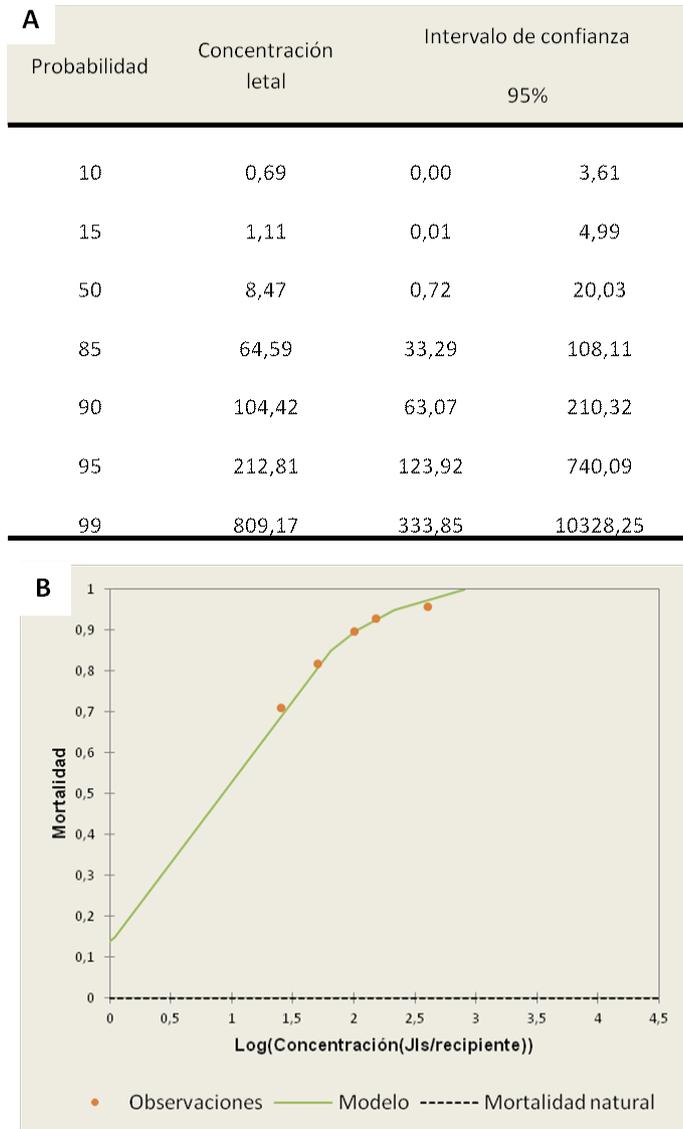


Figura 2.2: Porcentaje de mortalidad y concentraciones letales (CL50 y CL90) en larvas de *T. molitor* expuestas a JIs de *H. bacteriophora*. A) Valores de concentración letal y límites de confianza en R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.); B) Gráfico Probit.

Dosis (JIs/placa)	N° de larvas evaluadas	TL 50			TL 90		
		Días	LCI	LCS	Días	LCI	LCS
0	100	-	-	-	-	-	-
250	90	3,94	3,02	6,05	6,51	5,02	13,96
500	50	3,87	2,90	6,09	6,38	4,90	14,49
1000	60	3,18	2,26	4,21	5,13	4,13	8,60
1500	100	3,10	2,11	4,13	4,91	3,95	8,39
4000	80	1,88	1,61	2,16	3,14	2,86	3,41

Tabla 2.2: Tiempo letal 50 y 90 en larvas de *T. molitor* expuestas a *H. bacteriophora* SUP, para cada una de las concentraciones de JIs evaluadas, con sus respectivos límites de confianza en R. LCI: límite de confianza inferior; LCS: límite de confianza superior. (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.).

Temp. (C°)	Tiempo de vida (días)	Infectividad (%)	Producción Media (JIs/larva)	TL 50			TL 90		
				Días	LCI	LCS	Días	LCI	LCS
4	30	72 ± 13,04 ^a	117258,3	3,03	2,02	4,07	4,91	3,93	8,51
	60	72,5 ± 12,58 ^a	131263,5	3,82	3,59	4,06	5,41	5,04	5,95
	90	25 ± 7,07 ^{ab}	60930	8,84	7,17	14,06	14,35	10,85	26,17
	120	15 ± 8,16 ^b	190310	7,76	6,42	9,10	9,99	8,07	11,91
16	30	83,8 ± 13,3 ^a	66251,33	3,21	2,02	4,09	6,34	5,26	8,67
	60	73,3 ± 15,27 ^a	96000	3,66	1,16	5,97	7,42	5,39	25,20
	90	-	-	-	-	-	-	-	-
	120	85 ± 7,07 ^a	112048,9	3,43	1,45	4,71	6,92	5,43	11,66
25	30	94 ± 13,42 ^a	111178,4	2,03	1,64	2,42	3,54	3,15	3,93
	60	95 ± 7,07 ^a	78745	1,80	1,19	2,41	3,24	2,62	3,85
	90	67,5 ± 12,58 ^a	81849,82	2,77	2,10	3,45	5,62	4,94	6,31
	120	62,5 ± 17,08 ^a	94979,4	3,14	2,46	3,82	6,03	5,33	6,72

Tabla 2.3: Infectividad de JIs de *H. bacteriophora* con diferentes tiempos de vida sobre larvas de *T. molitor*. En la tabla se muestran el porcentaje de infectividad, número de JIs producidos por larva y tiempo letal 50 y 90 (con sus respectivos intervalos de confianza) para cada temperatura y tiempo de vida evaluados. Las letras en superíndice diferentes indican diferencias significativas.

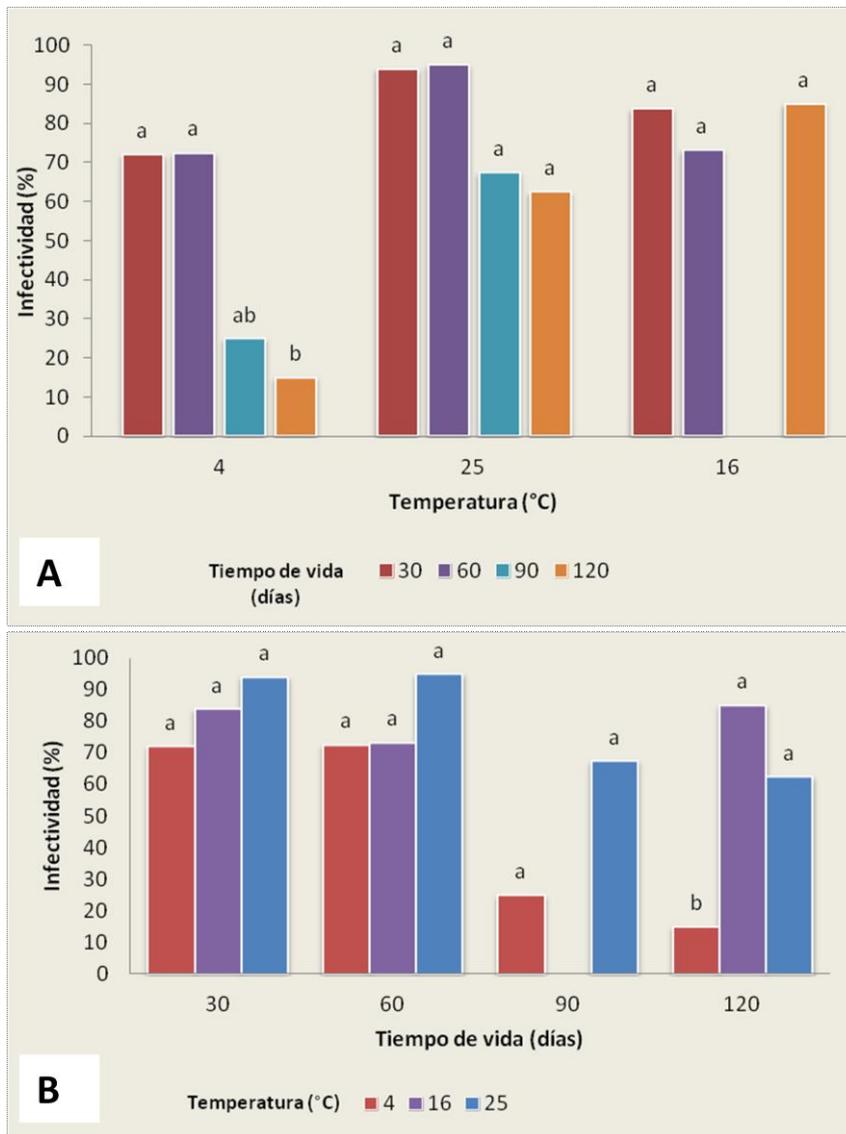


Figura 2.3: Infectividad y tiempo de vida de los JIs bajo diferentes condiciones de temperatura de almacenamiento. A) Se observa el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la infectividad bajo una temperatura de almacenamiento determinada; B) Se compara el efecto de la temperatura de almacenamiento para cada tiempo de vida evaluado. Las letras en superíndice diferentes indican diferencias significativas.

4. SUPERVIVENCIA Y LONGEVIDAD DE JIS ALMACENADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y DENSIDAD.

Los resultados de la diferencia media semanal para cada densidad y temperatura se resumen en la Tabla 2.4. El análisis ANOVA arrojó diferencias significativas entre las diferentes densidades y temperaturas evaluadas. Tanto la densidad como la temperatura tuvieron un efecto independiente sobre la supervivencia media semanal, descartando que el resultado sea producto de la interacción entre estos factores. Las comparaciones realizadas por HSD Tukey indicaron diferencias significativas entre las densidades 2500 y 5000 (p-valor: 0,00233); 2500 y 7500 (p-valor: < 0,001); y entre las temperaturas 4 y 25 (p-valor < 0,0001); y 16 y 25 °C (p-valor < 0,0001) (Tabla 2.4).

Los resultados arrojaron que la supervivencia media de los JIs fue mayor a bajas densidades de almacenamiento, para las tres temperaturas evaluadas (Fig 2.4 A) y disminuyó conforme se incrementaba la densidad de la suspensión. Por otro lado, disminuyó también al incrementarse la temperatura. En la figura 2.4 B se muestra la relación del número promedio de JIs muertos por semana y la densidad a la cual fueron almacenados bajo cada una de las temperaturas evaluadas. Una mayor mortalidad fue registrada a 25°C respecto a las temperaturas de 4 y 16°C evaluadas.

5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

Una infectividad de 66-100% fue causada por *H. bacteriophora* SUP en larvas de *T. molitor* para las diferentes concentraciones evaluadas. La mortalidad más alta se obtuvo a una concentración de 4000 JIs/ placa (Tabla 2.5). Los cadáveres presentaron la coloración rojiza característica.

El test exacto de Fisher utilizado para realizar las comparaciones arrojó diferencias significativas (p-valor < 0,0051), en los pares de concentraciones 250-1500; 250-4000; 500-1500; 500-4000 y 1000-4000. El ANOVA realizado para comparar los datos de producción arrojó diferencias significativas (F: 4,544 p-valor: 0,006171), estas diferencias fueron detectadas por el pairwise test de t, resultando los pares de concentraciones 1500-250; 1500-500; 4000-250; y 4000-500 significativamente diferentes (p valor: 0,05). El ANOVA de los tiempos de emergencia también arrojó diferencias significativas (F: 4,491; p valor: 0,00654) que fueron detectadas por el test de comparaciones múltiples en los pares de concentraciones 1500-250; 1500-500 y 1500-4000 (p-valor < 0,05).

6. EFECTO DE LA SUPERFICIE DE APLICACIÓN SOBRE LA INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

La infectividad resultó significativamente diferente entre los pares de superficies 5-10 y 20-10 de acuerdo al test de exacto de Fisher realizado con un p-valor ajustado de 0,017, siendo mayor para la superficie de 10 cm (Tabla 2.6).

El ANOVA realizado para los datos de producción arrojó diferencias significativas (F: 4,572; p-valor: 0,0474), y el test de comparaciones múltiples detectó las diferencias en la

producción entre las superficies 10-5 y 10-20. La producción de juveniles fue mayor en las infecciones realizadas en cápsulas de 10 cm de diámetro, con un intervalo de producción de 110.173 a 176.300 JIs/larva. El ANOVA de los tiempos de emergencia no arrojó diferencias significativas (F: 3,985; p-valor: 0,063). Los tiempos letales resultaron ser menores a una superficie intermedia.

7. EXPOSICIÓN DE JIs NO INFECTIVOS A LA BACTERIA SIMBIÓTICA PARA RECUPERACIÓN DE LA PATOGENIA

La infectividad en larvas de *T. molitor* almacenadas durante 5 meses a 4°C expuestas a *P. luminescens*, fue mayor a la obtenida para las larvas que no fueron expuestas a los cultivos de *Photorhabdus* en los controles, obteniéndose un 100 y 20% de mortalidad para los JIs tratados y no tratados, respectivamente. No se registró mortalidad en los controles sin JIs. Esto indicaría la recuperación de la infectividad por parte los nematodos.

Temperatura (°C)	densidad	Dif. media	Sd	n
4 ^a	2500 ^a	1521,4	797,91	6
	5000 ^b	3176,4	1453,29	6
	7500 ^b	4703,7	1643,49	6
16 ^a	2500 ^a	2190,5	1129,34	5
	5000 ^b	3301,5	1852,44	5
	7500 ^b	5642,8	3184,71	5
25 ^b	2500 ^a	5390,8	676,54	4
	5000 ^b	9959,0	1243,66	4
	7500 ^b	9485,8	1517,12	5

Tabla 2.4: Supervivencia y longevidad de JIs de *H. bacteriophora* almacenados bajo diferentes densidades y temperaturas. Resumen de diferencia media semanal. Las letras de los superíndices diferentes indican diferencias significativas.

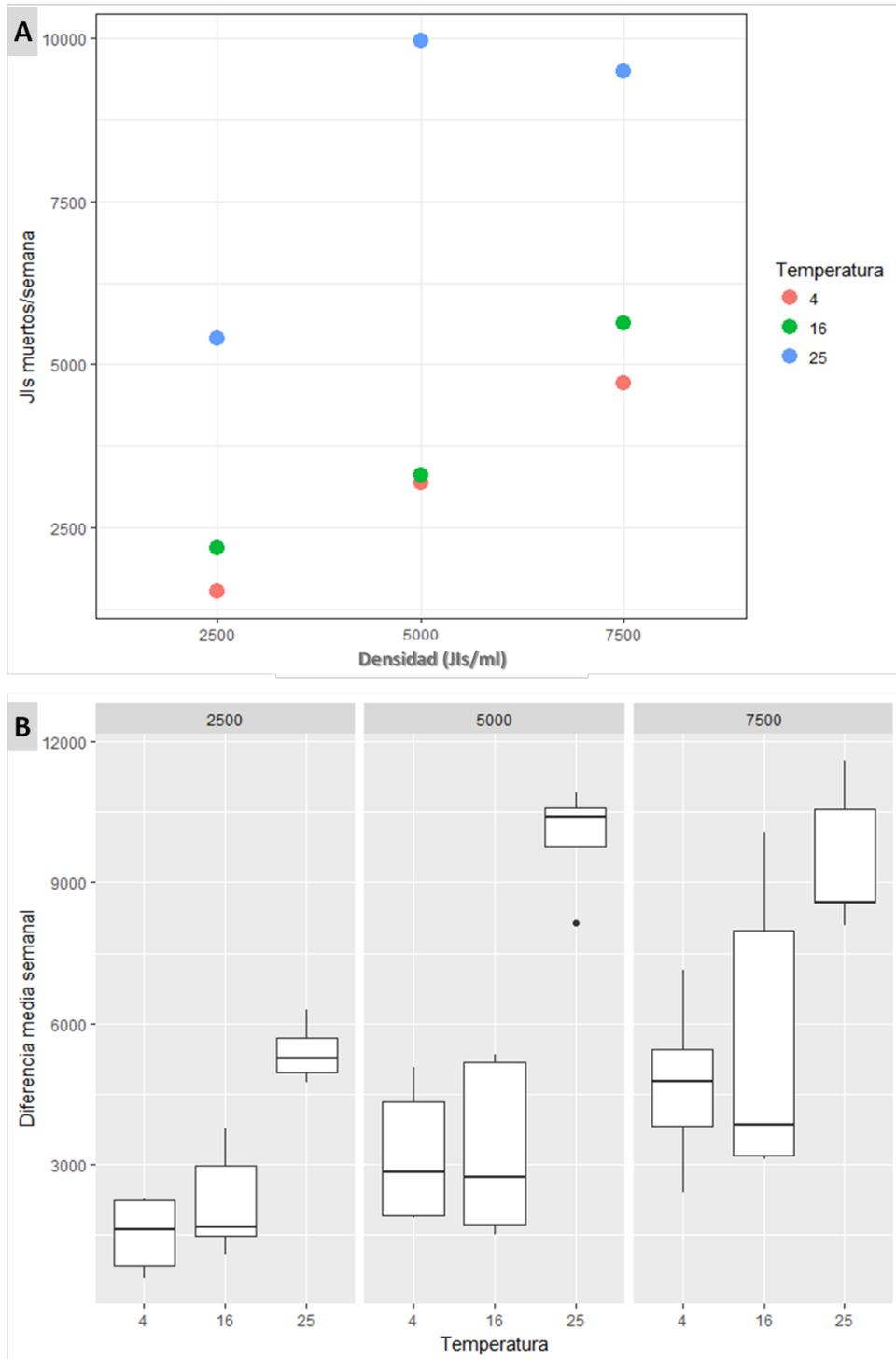


Figura 2.4: Supervivencia y longevidad del JI en suspensiones acuosas bajo diferentes temperaturas de exposición. A) Muestra la relación entre el promedio de JIs muertos por semana y la densidad de almacenamiento para cada temperatura evaluada. Los puntos indican las diferentes temperaturas. B) Gráfico que relaciona la diferencia media semanal con la temperatura y densidad de almacenamiento. R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.)

Concentración (JI/placa)	n	Infectividad (%)	Producción media (JI/larva)	Tiempo de emergencia medio (días)
0	100	0	-	-
250	90	68,29 ± 17,64 ^a	121028,87 ± 52195 ^a	11,22 ^a
500	50	66,00 ± 21,61 ^a	116130,14 ± 24954 ^a	9,40 ^a
1000	60	83,33 ± 12,11 ^{ab}	82386,71 ± 44548 ^{ab}	12,19 ^{ab}
1500	100	91,00 ± 12,87 ^{bc}	62340,61 ± 20279 ^b	14,60 ^b
4000	80	100,00 ± 0,00 ^c	36902,98 ± 16514 ^b	9,00 ^a

Tabla 2.5: Concentración, infectividad y producción de JIs en larvas de *T. molitor* bajo diferentes concentraciones de exposición. Las letras diferentes de los superíndices indican diferencias significativas.

Cápsula	N	Infectividad %	Producción JIs/larva	T' de emerg. (días)	LT 50			LT 90		
					Días	LCI	LCS	Días	LCI	LCS
5 cm	50	50 ± 14,14 ^a	46666 - 135333 ^a	11,9 ± 0,74 ^a	4,63	3,49	13,04	7,72	5,54	35,26
10 cm	30	80 ± 10 ^b	110173 - 176300 ^b	9,69 ± 2,35 ^a	3,75	3,36	4,24	6,32	5,54	7,69
20 cm	50	50 ± 10 ^a	33200 - 86400 ^a	13,44 ± 1,83 ^a	5,23	4,83	5,91	6,99	6,21	8,54

Tabla 2.6: Efecto de la superficie de exposición sobre la infectividad, producción, emergencia media y tiempo letal. Valores calculados en R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.). Las letras de los superíndices diferentes indican diferencias significativas. LCI: límite de confianza inferior; LCS: límite de confianza superior; T: temperatura de exposición; N: número de larvas evaluadas; Producción: producción media por larva; T' de emergencia: tiempo de emergencia medio.

C. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE NEPS

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VIABILIDAD DE LA BACTERIA

Los recuentos, valores de diferencia media y longevidad semanal se resumen en la tabla 2.7. La diferencia media semanal fue mayor a la temperatura de 4°C respecto a las de 25 y 16°C, debido a la gran mortalidad registrada en un periodo de tiempo relativamente corto. El análisis ANOVA arrojó diferencias significativas en la viabilidad de las bacterias entre las temperaturas de incubación evaluadas ($F=5.717$ p-valor: 0,025). Estas diferencias fueron analizadas por un test de comparaciones múltiples el cual mostró que la temperatura de 4°C fue significativamente menor de 16 y 25°C con un p-valor de 0,028, demostrando la mayor mortalidad a esta T °C. La relación entre la diferencia media semanal y las temperaturas de incubación se muestra en la figura 2.5.

Temperatura	Recuento inicial (UFC)	Recuento final (UFC)	Cantidad de semanas	Diferencia media semanal
4	35,0	0,0	2,0	17,5
16	62,5	12,5	24,75	2,02
25	72,5	15,0	22,0	6,61

Tabla 2.7: Supervivencia media semanal de *Photorhabdus luminescens* bajo diferentes temperaturas de incubación.

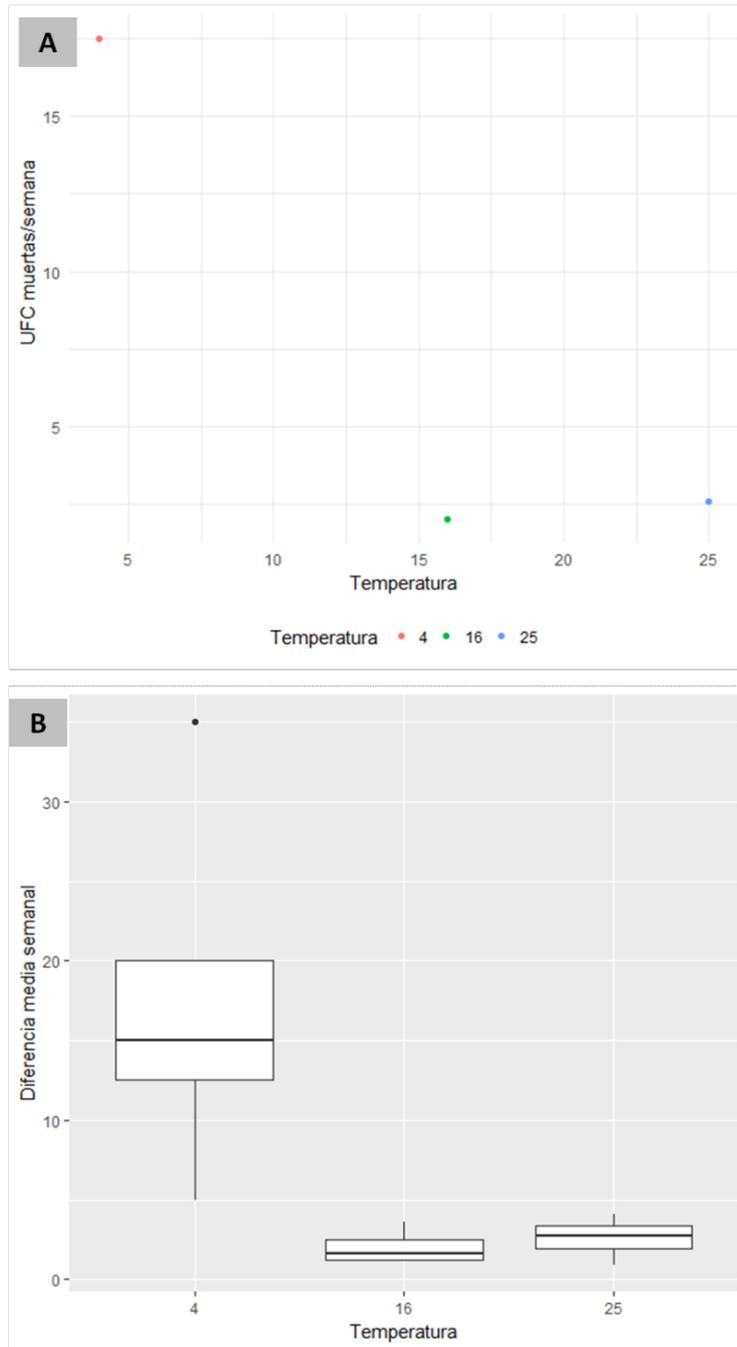


Figura 2.5: Viabilidad de la bacteria endosimbionte en cultivo líquido bajo diferentes temperaturas de incubación. Graficos obtenidos en R. A) Muestra la relación entre el promedio de bacterias muertas semanalmente y la temperatura de incubación. Los puntos indican el promedio de muerte por temperatura. B) Gráfico que relaciona la diferencia media semanal con la temperatura de incubación. R (Versión 1.0.143 © 2009-2016 RStudio, Inc.)

DISCUSIÓN

Los requisitos ecológicos son específicos para cada cepa y región y requieren una investigación meticulosa que será diferente para cada aislamiento (Grewal et al., 1994). El uso y éxito de estos organismos a campo como agentes de biocontrol exige una metodología eficiente de producción que proporcione altas densidades de JIs sin alterar su virulencia. Entre los parámetros de calidad a considerar para la producción *in vivo* se encuentra la susceptibilidad del hospedador (Van Zyl y Malan, 2015). *Tenebrio molitor* se mostró susceptible a *H. bacteriophora* cepa SUP con un rango de infectividad de 68,9 a 100%, resultando ser mayor conforme al aumento de la concentración de JIs. A concentraciones más altas (4000 JIs/placa) se registraron porcentajes de mortalidad del 100% matando más rápidamente a los insectos expuestos. Esto sugiere una mayor eficiencia en cuanto a la infectividad y los tiempos letales conforme aumenta la concentración del inóculo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Canhilal (2012), Blinova e Ivanova (1987), Flanders et al. (1996), y Shapiro et al. (1999). La virulencia del aislamiento SUP en larvas de *T. molitor* resultó ser menor a otros aislamientos de *H. bacteriophora* estudiados por Canhilal (2012), obteniendo para este aislamiento un menor porcentaje de mortalidad y mayores tiempos letales.

En cuanto a la producción de JIs, los resultados coinciden con Boff et al. (2000) y Shapiro et al. (2012) quienes sugieren que las mayores producciones se obtienen con bajas concentraciones de exposición. Para el aislamiento SUP a la menor concentración evaluada (250 JIs/placa) se obtuvo una producción de 121.028,87 JIs/insecto, significativamente mayor a las producciones obtenidas con concentraciones más altas. Según Selvan et al. (1993), altas concentraciones de JIs aseguran un mayor número de nematodos que invaden el hospedador, pero generan bajos rendimientos de producción, debido a competencia con invasores secundarios (Woodring y Kaya, 1998) y/o competencia intraespecífica por el agotamiento de los recursos nutricionales dentro del hospedador o bien por el espacio, esto explicaría las bajas producciones obtenidas con las concentraciones más altas. Un insecto infectado representa un caldo de nutrientes en el cual los nematodos se alimentan, es un recurso en constante disminución y la tasa de disminución es una función del número de nematodos infectantes. En consecuencia, altas densidades de inóculo conllevan a una inadecuada nutrición de los nematodos y la reducción de la fecundidad (Selvan et al., 1993). A partir de los resultados obtenidos en este estudio se determinó que las concentraciones más bajas pueden utilizarse para maximizar el rendimiento durante la producción en el laboratorio del aislamiento *H. bacteriophora* SUP.

Para optimizar la cría *in vivo* del nematodo es necesario seleccionar en base a los parámetros evaluados aquella concentración que asegure una alta mortalidad y altos rendimientos de producción. Según Shapiro-Ilan y Gaugler (2002) para una producción en masa se requieren porcentajes de mortalidad del 90% o más, los cuales fueron alcanzados por la cepa en estudio, sin embargo, no coinciden con las concentraciones más productivas. En este sentido, concentraciones de 25 y 50 juveniles por insecto serían las más adecuadas para la cría *in vivo* de la población SUP, que si bien no superó el 70% de la mortalidad generó un rendimiento de más de 100.000 juveniles por insecto. Por otro lado, para su empleo en un programa de control inundativo, la concentración a utilizar será aquella que registre los

mayores porcentajes de mortalidad y menores tiempos letales, correspondiéndose con las concentraciones más altas. Otro factor a considerar para la producción *in vivo* es la temperatura. La temperatura, afecta todos los procesos vitales (Molyneux, 1984), tales como la producción, la duración del ciclo de vida (tiempo hasta la emergencia) (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002), la patogenicidad (Molyneux, 1984), la supervivencia (Kung y Gaugler, 1991) y la búsqueda del hospedador (Byers y Poinar, 1982). La temperatura óptima para actividades de reproducción, patogenicidad y viabilidad reflejan las condiciones climáticas de su localidad original (Grewal et al., 1994). La viabilidad es un parámetro fundamental en la evaluación de la calidad de los nemátodos entomopatógenos durante sus condiciones de almacenamiento, que permite maximizar la eficacia de los nemátodos en el proceso de formulación (Koppenhöfer et al. 2013). El JI es el único estadio de vida que puede sobrevivir fuera del insecto y su rol es la dispersión en el suelo e infección de nuevos hospedadores. Éste no se alimenta y depende únicamente de las reservas de energía para la supervivencia y la infectividad (Grewal, 2002). Por esta razón, es el estadio utilizado para almacenamiento en el laboratorio y la base de las formulaciones de productos insecticidas. Minimizar la mortalidad de los JIs durante el almacenamiento prolonga la vida útil (Grewal, 2002). En concordancia con otros autores (Grewal, 2002; Kaya y Stock, 1997) los resultados sugieren que la temperatura afectó la supervivencia media de los JIs de *H. bacteriophora* SUP almacenados, resultando esta menor conforme aumenta la temperatura. Esto puede deberse a varias causas, entre ellas, el agotamiento de las reservas de lípidos dada la mayor actividad de los JIs (Andaló et al., 2011) y/o el crecimiento de microorganismos que compiten por el oxígeno disponible (Strauch et al., 2000). Por otra parte la densidad de almacenamiento también afectó la supervivencia media, resultando esta menor a altas densidades (7500 JI/ml) probablemente por un incremento de la competencia por el oxígeno disponible, fenómeno que se acentúa con el incremento de la temperatura. Según Stock (2012) una concentración de 1500 a 3000 JIs/ml es un buen número para almacenar en frascos de cultivo celular, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para el aislamiento SUP donde valores de 2500 JIs/ml resultaron ser los óptimos para el mantenimiento en el laboratorio.

Las temperaturas óptimas para un funcionamiento eficiente de los NEPs varían según las especies y las cepas dependiendo de su adaptación al ambiente. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la supervivencia media semanal fue mayor a las temperaturas de 4°C y 16°C, sin embargo, a 4°C se registró un descenso de la infectividad conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento en esta condición, mientras que a 16°C la infectividad fue del 85% luego de 120 días de estar almacenadas en el laboratorio. En este sentido se ha registrado infectividad hasta más de 300 días de almacenamiento (datos no publicados) a dicha temperatura. Se ha demostrado ampliamente que la infectividad de los JIs disminuye con la edad, especialmente cuando se agotan las reservas almacenadas (Lewis et al., 2006).

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo la temperatura óptima de almacenamiento para el aislamiento SUP es de 16°C, la cual asegura una alta producción, longevidad, alta supervivencia media semanal e infectividad sostenida en el tiempo sin pasar por un hospedador, lo cual contribuiría a la viabilidad del nematodo en un producto formulado, al menos durante el periodo de almacenamiento evaluado.

La patogenicidad se vió también afectada por la temperatura. En este sentido, los resultados indicaron que la infectividad fue mayor a 25°C respecto a las restantes temperaturas evaluadas, siendo nula a 4°C y 11°C. La eficacia comparativamente menor a 16°C respecto a 25°C en concordancia con Ebssa et al. (2004) podría deberse no a una menor capacidad para parasitar al hospedador, sino a su movimiento limitado a temperaturas más bajas. Los tiempos letales obtenidos a 16°C sugieren que la cepa SUP es efectiva a esta temperatura aunque el tiempo requerido para matar a la población hospedadora es mayor respecto a temperaturas de 25°C. A temperaturas inferiores a 16°C el aislamiento SUP demostró no ser activo, a pesar de prolongar el tiempo de exposición. El rango de temperatura para matar a *T. molitor* podría establecerse entre 16 y 25°C, un rango similar al obtenido por De Doucet et al. (1996) para el aislamiento OLI de *H. bacteriophora* proveniente también de una región templada evaluado en *Galleria mellonella*.

El aumento de mortalidad y disminución de tiempos letales conforme al incremento de temperatura, coincide con otros aislamientos de la misma especie, tales como el HP88 (Grewal et al., 1994), pero el aislamiento SUP difirió en el rango de mortalidad. Mientras que SUP mató a insectos en un rango de 16-25°C similar a OLI (De Doucet et al., 1996); el aislamiento HP88 lo hizo en un rango de 1-32°C. Estas diferencias pudieron deberse a que la población HP88 fue aislada de una zona cuya temperatura media máxima es de 16°C (Grewal et al., 2002) y probablemente esté adaptada a condiciones más frías; mientras que la población SUP fue aislada en la ciudad de La Plata, Buenos Aires, una región con un clima templado a cálido, que ha registrado temperaturas medias máximas y mínimas para los últimos años de 22.5 y 11.4°C, respectivamente, condición climática similar al aislamiento OLI (Servicio Meteorológico Nacional).

Para un entomopatógeno dado, puede existir una densidad máxima de insectos hospedadores, a la cual el patógeno alcanza una eficiencia óptima (Bellows y Hassell, 1999). En los ensayos realizados la variación de superficie hizo variar la densidad tanto del hospedador como del nematodo. En este sentido los resultados indican que la infectividad de la cepa en estudio fue mayor a superficies intermedias de exposición (cápsulas de 10 cm), resultando a su vez mayor la producción de JIs, y menores los tiempos letales, respecto a superficies menores y mayores. Esta superficie se correspondió con una densidad intermedia tanto de hospedadores como de JIs. En general, el número de hospedadores que exhiben signos patentes de infección por nematodos aumenta con la concentración de JIs, pero disminuye con la densidad del hospedador por unidad de superficie (Shapiro-Ilan et al., 2002) esto concuerda con los resultados obtenidos para este aislamiento para la menor superficie evaluada (cápsula de 5 cm). La baja mortalidad en este caso podría deberse al hacinamiento de los hospedadores que puede conducir a la falta de oxígeno o la acumulación de amoníaco (Shapiro Ilan et al., 2002), o bien a un incremento en la densidad de JIs lo cual favorece interacciones intraespecíficas que pueden afectar negativamente el comportamiento de los nemátodos para encontrar al hospedador (Lewis et al., 1996). La baja mortalidad registrada en la superficie 20 cm² podría estar relacionada con el tiempo de búsqueda del hospedador, el incremento en la superficie del sustrato podría aumentar la distancia que el JI debería recorrer para encontrar el hospedador, lo cual concuerda con los tiempos letales obtenidos que fueron mucho mayores a los registrados para superficies intermedias. Es necesario utilizar una densidad óptima tanto del hospedador como de los JIs para maximizar el rendimiento.

Con respecto al tiempo para que se produzca la primera emergencia de JIs, a diferencia de Flanders et al. (1996) que registró una disminución del mismo al aumentar la concentración para el aislamiento "oswego", en este estudio no se observó una relación entre las concentraciones de JIs evaluadas y los tiempos registrados.

Los resultados previamente expuestos aportaron información para optimizar la cría *in vivo* de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa SUP en larvas de *T. molitor*. En concordancia con la zona de origen de este aislamiento caracterizada por un clima templado a cálido con un promedio anual de temperatura de 17°C, la viabilidad de la cepa, reproducción, actividad, infectividad y supervivencia resultaron óptimas en un rango de temperatura de 16 a 25°C, siendo 16°C la temperatura más adecuada para su mantenimiento en el laboratorio con el objeto de asegurar una alta longevidad, supervivencia y virulencia sostenida en el tiempo, mientras que 25°C resultó ser óptima para la infectividad. Por debajo de los 11°C los JIs están inactivos. Estos resultados coinciden con datos tomados en el campo, durante los meses de menor temperatura donde los JIs de *H. bacteriophora* SUP no infectaron los insectos de las trampas cebo, mientras que sí lo hacían al llevar muestras de suelo al laboratorio y ser expuestas a temperaturas que superaban los 16 °C.

Las condiciones de almacenamiento de los JIs deberán ajustarse a su vez a las condiciones óptimas de mantenimiento de la bacteria endosimbionte. En este estudio, la infectividad de los JIs se relacionó con la viabilidad de su bacteria. Las pruebas de supervivencia en medio líquido bajo diferentes temperaturas de incubación, mostraron que las bacterias sobreviven por más de 20 semanas a 25 y 16°C, mientras que a 4°C la mortalidad se detectó a las dos semanas. Teniendo en cuenta que la bacteria es esencial para que los nematodos puedan matar a un insecto y producir descendencia fértil (Han y Ehlers, 2000), la capacidad de la bacteria simbiótica para establecerse y crecer en determinadas condiciones de temperatura es de crucial importancia para el complejo (Ehlers et al., 2005). Cualquier cambio en las bacterias durante el cultivo puede afectar la eficacia del nematodo (Wang et al., 2007). Las condiciones de almacenamiento de los JIs podrían incidir sobre la calidad de la bacteria endosimbionte, si bien no hubo diferencias significativas en la supervivencia de JIs almacenados a 4 y 16°C, si se ha registrado una reducción de la infectividad conforme al incremento del tiempo de almacenamiento a temperaturas de 4°C. De acuerdo con Griffin (2015), las condiciones de producción y almacenamiento de los JIs infectivos, afectan el número de bacterias que conservan, en este sentido, podría explicarse la reducción de la infectividad durante el almacenamiento a 4°C por una reducción del número de bacterias vivas dentro de los JIs lo cual fue testado en este estudio.

Dada la susceptibilidad de las larvas de *T. molitor* a la cepa SUP, el uso de estos insectos como insecto de cría para la producción *in vivo* de *Heterorhabditis bacteriophora* representa una alternativa viable respecto al uso de *Galleria*, debido a que los costos asociados con la cría son a menudo más bajos (Blinova e Ivanova, 1987); son fáciles de criar y se encuentran ampliamente disponibles en la Argentina dado que se comercializan como alimento para mascotas. Es conocido que la susceptibilidad de estos insectos a los NEPs y los rendimientos de producción son menores a los obtenidos en *Galleria mellonella* (Blinova e Ivanova, 1987; Woodring y Kaya, 1998), sin embargo, la elección de las especies hospedadoras para la producción *in vivo* debe descansar en última instancia en el costo de producción de los nematodos por insecto y la susceptibilidad del hospedador hacia el nematodo (Shapiro-Ilan y

Gaugler, 2002). Los resultados de este estudio aportaron información indispensable para la optimización de la cría de este aislado en el laboratorio con el objeto de conservar su calidad en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhurst R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology* 121, 303–309.
- Andaló, V., Moino, A., Maximiniano, C., Campos, V. P., & Mendonca, L. A. (2011). Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomología* 37(2), 203-209.
- Bellows, T. S., & Hassell, M. P. (1999). Theories and mechanisms of natural population regulation. In: T.S. Bellows, T.W. Fisher (Eds.). *Handbook of biological control*. Academic Press. San Diego. USA. pp. 17-44.
- Blinova, S. L., & Ivanova, E. S. (1987). Culturing the nematode-bacterial complex of *Neoaplectana carpocapsae* in insects. 22-26. In: Sonin, M.D. (Ed.). *Helminths of insects*. Netherlands.
- Boff, M. I., Wiegers, G. L., Gerritsen, L. J., & Smits, P. H. (2000). Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. *Nematology* 2(3), 303-308.
- Byers J.A., & Poinar G.O. (1982). Location of insect hosts by the nematode, *Neoaplectana carpocapsae*, in response to temperature. *Behaviour* 79, 1–10.
- Canhilal, R. (2012). Comparison of efficacy of nine new heterorhabditid isolates (Rhabditida: Heterorhabditidae) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Microbiology Research* 6(7), 1597-1602.
- Canhilal, R. (2012). Comparison of efficacy of nine new heterorhabditid isolates (Rhabditida: Heterorhabditidae) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Microbiology Research* 6(7), 1597-1602.
- De Doucet, M. M. A., Miranda, M. B., Bertolotti, M. A., & Caro, K. A. (1996). Efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (strain OLI) in relation to temperature, concentration and origin of the infective juvenile. *Nematropica* 26(2), 129-133.
- Ebssa, L., Borgemeister, C., & Poehling, H. M. (2004). Effectiveness of different species/strains of entomopathogenic nematodes for control of western flower thrips

- (*Frankliniella occidentalis*) at various concentrations, host densities, and temperatures. *Biological Control* 29(1), 145-154.
- Ehlers R-U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 523-633.
 - Ehlers, R. U., Oestergaard, J., Hollmer, S., Wingen, M., & Strauch, O. (2005). Genetic selection for heat tolerance and low temperature activity of the entomopathogenic nematode–bacterium complex *Heterorhabditis bacteriophora*–*Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol* 50(5), 699-716.
 - Finney D. J. (1964). Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University Press.
 - Fisher T.W., & Garczynski S.F. (2012). Isolation, culture, preservation, and identification of entomopathogenic bacteria of the Bacilli. p. 76-99. En Lacey, L. A. (Ed.). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press. Washington, USA. pp. 484.
 - Flanders, K. L., Miller, J. M., & Shields, E. J. (1996). In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology* 89(2), 373-380.
 - Gaugler R., & Han R. (2002). Production technology. In: Gaugler R. ed. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing. Wallingford. UK. pp. 289-320.
 - Grewal, P. S., Selvan, S. E. N., & Gaugler, R. (1994). Nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology* 19(4), 245-253.
 - Grewal, P. S., Wang, X., & Taylor, R. A. J. (2002). Dauer juvenile longevity and stress tolerance in natural populations of entomopathogenic nematodes: is there a relationship? *International Journal for Parasitology* 32(6), 717-725.
 - Griffin, C. T. (2015). Behaviour and population dynamics of entomopathogenic nematodes following application. p. 57-95. In: Campos-Herrera, Raquel (Ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. Springer. Cham. pp.531.
 - Han, R., & Ehlers, R. U. (2000). Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *Journal of invertebrate pathology*, 75(1), 55-58.
 - Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques of insect nematology. pp. 281-324. In: *Manual of techniques in insect pathology*. Lawrence Lacey (Eds.). Biological Techniques Series. Academic Press. Estados Unidos. pp.484.

-
- Koppenhöfer, A. M., Ebssa, L., & Fuzy, E. M. (2013). Storage temperature and duration affect *Steinernema scarabaei* dispersal and attraction, virulence, and infectivity to a white grub host. *Journal of invertebrate pathology* 112(2), 129-137.
 - Lewis, E. E., Ricci, M., & Gaugler, R. (1996). Host recognition behaviour predicts host suitability in the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Parasitology* 113(6), 573-579.
 - Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., & Peters, A. (2006). Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological control* 38(1), 66-79.
 - Lewis E.E., & Clarke D.J. (2012). Nematode Parasites and Entomopathogens. p.395-424. In: Vega, F. E., & Kaya, H. K. (2012). Insect pathology. London. UK, Elsevier. pp.508.
 - Lyman Ott, R., & Longnecker, M. (2010). An introduction to statistical methods and data analysis. Sixth edition. Brooks/Cole CENAGE Learning. Belmont. USA. pp.571.
 - Molyneux, A.S. and R.A. Bedding. (1984). Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica* 30, 358–365.
 - Selvan, S., Campbell, J. F., & Gaugler, R. (1993). Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 62(3), 278-284.
 - Shapiro, D. I., Cate, J. R., Pena, J., Hunsberger, A., & McCoy, C. W. (1999). Effects of temperature and host age on suppression of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) by entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology* 92(5), 1086-1092.
 - Shapiro-Ilan, D. I., & Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28(3), 137-146.
 - Shapiro-Ilan, D. I., Gaugler, R., Tedders, W. L., Brown, I., & Lewis, E. E. (2002). Optimization of inoculation for in vivo production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 34(4), 343.]
 - Shapiro-Ilan, D. I., Han, R., & Dolinski, C. (2012). Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology* 44(2), 206.
 - Stock, S.P., & Goodrich-Blair, H. (2012). Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. p. 373-426. In: Lacey,

-
- L. A. (Ed.). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press. Washington, USA. pp. 484.
- Strauch, O., Niemann, I., Neumann, A., Schmidt, A. J., Peters, A., & Ehlers, R. U. (2000). Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. *BioControl* 45(4), 483-500.
 - Van Zyl, C., & Malan, A. P. (2015). Cost-effective culturing of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* and entomopathogenic nematode production in various hosts. *African Entomology* 23(2), 361-375.
 - Wang, Y., Bilgrami, A. L., Shapiro-Ilan, D., & Gaugler, R. (2007). Stability of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*, during *in vitro* culture. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 34(1), 73-81.
 - Woodring, J., & Kaya, H. (1998). Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. 1-30. Southern Cooperative Series Bulletin No. 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR.

CAPITULO III: Evaluación de *Heterorhabditis bacteriophora* SUP para el control de *Lobiopa insularis* (Coleoptera: Nitidulidae) en condiciones de laboratorio y campo

INTRODUCCIÓN

En la Argentina se cultivan aproximadamente unas 1.300 ha de frutillas y se producen cerca de 45.500 toneladas, durante todo el año. Las principales regiones productoras de frutillas se concentran en las provincias de Santa Fe, Tucumán y Buenos Aires, representando aproximadamente el 70% de la producción total del país. Alrededor del 60% de la fruta se consume fresca y el 40% procesada. Solo una pequeña fracción de la fruta producida en la Argentina, 1.030 toneladas se exportan, principalmente a los EE. UU. (Kirschbaum et al., 2016).

En el cinturón hortícola platense, se ha reportado una plaga emergente para el cultivo de frutilla, el escarabajo de la savia *Lobiopa insularis* (Coleoptera: Nitidulidae) (Castelnaud, 1840; Greco et al., 2017), un herbívoro generalista cuyas larvas y adultos se alimentan de los frutos maduros (Cluigt et al., 2007). Es una de las plagas económicamente más importantes de los cultivos comerciales de frutilla (Fornari et al., 2013; Potter et al., 2013), cuyos daños en nuestro país alcanzan hasta el 46% (frutas afectadas) en el área hortícola de La Plata, provincia de Buenos Aires. El ciclo de vida de este insecto incluye los estados de huevo, larva, pupa y adulto. Las larvas y los adultos se alimentan de fruta madura causando un daño importante a la fruta fresca. Las hembras ovipositan en el suelo y las larvas empupan dentro de los primeros 10 cm (Cluigt et al., 2007). La larga vida de los adultos (hasta siete meses) y el alto rendimiento reproductivo explican la presencia de varias generaciones superpuestas (Bortoli et al., 2014; Greco et al., 2017). Estos insectos son herbívoros generalistas que atacan no solo a las frutillas sino también a los cultivos de tomate, durazno, guayaba, manzana, naranja y melón, entre otros; aumentando su población cuando un recurso dado es abundante. Están fuertemente influenciados por los compuestos volátiles de las plantas durante la maduración o la descomposición de la fruta (Lin y Phelan, 1991). Además del daño directo, *L. insularis* también sirve como agente de dispersión de hongos fitopatógenos, lo que aumenta las pérdidas de rendimiento (Dowd et al., 1995; Guimaraes et al., 2009).

Los actuales métodos de control comprenden prácticas culturales y el uso de insecticidas químicos. El control de plagas en los sistemas de producción hortícola de la provincia de Buenos Aires se realiza principalmente mediante el empleo de plaguicidas químicos, particularmente de amplio espectro, de acuerdo con Polack (2008). El uso indiscriminado de estos plaguicidas tiene consecuencias sociales y ecológicas desfavorables. Entre los efectos negativos más importantes, además del impacto sobre la salud de productores y consumidores, pueden mencionarse la reducción de la diversidad de especies benéficas en los agroecosistemas hortícolas, la resistencia de las plagas, la aparición de plagas secundarias, el disturbio de las interacciones ya existentes entre enemigos naturales y plagas y la contaminación de alimentos, que en su mayor parte se consumen frescos (Nuñez, 2014). Las prácticas culturales incluyen la cosecha de frutillas en el campo antes de alcanzar la maduración y la eliminación de frutos dañados, enfermos o demasiado maduros.

En la Argentina, no se han registrado enemigos naturales para *L. insularis*. Si bien *Zeteticontus insularis* (Howard) (Hymenoptera: Encyrtidae) fue citado por De Santis (1964) como parasitoide de *L. insularis*, nunca ha sido observado en los cultivos de frutilla en la Argentina. Ante la ausencia de enemigos naturales y la falta de productos biológicos registrados para el control del coleóptero en la Argentina, se requiere buscar nuevas alternativas a los pesticidas químicos. En este sentido los NEPs podrían representar buenos candidatos como agentes para el control biológico de estos insectos cuando sus densidades poblacionales superan el nivel de daño económico. Los NEPs, presentan una combinación de atributos deseables como biorreguladores, tales como, su amplio rango de hospedadores, la capacidad de causar altas mortalidades en insectos y su compatibilidad con el medio ambiente (Shapiro-Ilán y Dolinski, 2012).

Si bien las condiciones ambientales pueden reducir la eficacia de los nematodos en el control de plagas, se esperaría que las especies nativas adaptadas a las condiciones climáticas locales tengan más probabilidades de sobrevivir después de la liberación en un área determinada (Shapiro-Ilán et al., 1999; Campos-Herrera et al., 2008). En este sentido, el aislamiento nativo de *Heterorhabditis bacteriophora* SUP podría ser un buen candidato para el control de *L. insularis* en el cinturón hortícola platense. Por este motivo en el presente capítulo se evaluó la susceptibilidad de *L. insularis* a esta población nativa del nematodo en condiciones de laboratorio, como así también su comportamiento una vez introducidos en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. ENSAYOS DE LABORATORIO

1. COLECTA DE INSECTOS

Los insectos se recolectaron en cultivos de frutilla en una huerta de producción hortícola ubicada en Melchor Romero, Buenos Aires 34°56'08.7"S 58°06'03.4"W (Fig. 3.1. A-B). Para la colecta de los insectos se prospectaron frutos y se colocaron trampas de caída en diferentes puntos del cultivo durante el periodo de fructificación. Las trampas de caída consistieron en un embudo plástico de 0.5 L, colocado dentro de un vaso de plástico, este último enterrado en el suelo dentro de los camellones del cultivo. Los insectos recolectados se utilizaron para establecer la cría en el laboratorio.



Figura 3.1: Imágenes del sitio de colecta de *L. insularis*. A) Foto satelital del sitio de muestreo (Melchor Romero, Buenos Aires 34°56'08.7"S 58°06'03.4"O). Imágenes © 2018 DigitalGlobe, Datos del mapa © 2018 Google. B) Foto del cultivo de frutilla, pudiéndose observar la diversificación del mismo.

2. CRÍA E IDENTIFICACIÓN DE INSECTOS

Los insectos capturados fueron posteriormente criados en el laboratorio de acuerdo con Blumberg et al. (1985) sobre la dieta artificial utilizada para *Drosophila* spp. (Glazer et al., 2007) y se mantuvieron a 28 ± 2 °C a una humedad relativa del 70%. La dieta artificial se colocó en recipientes plásticos de 50 ml, cuya parte superior fue cubierta por una tela *voile*. Se agregaron a esta dieta los huevos colocados por los adultos. Una vez eclosionados las larvas fueron mantenidas en este medio hasta alcanzar el estado pre-pupa, y fueron transferidas a un recipiente con tierra. La identificación taxonómica de los escarabajos fue realizada por Andrew R. Cline del Departamento de Alimentos y Agricultura, Plant Pest Diagnostics Branch, California, Sacramento, CA, EE. UU.

3. SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE *L. insularis* A H. *bacteriophora* SUP

La susceptibilidad de cada estado de *L. insularis* se probó exponiendo por separado larvas, pupas y adultos ($n = 10$) a los NEPs. Los insectos se colocaron en un recipiente de plástico (50 ml) al cual se le agregó tierra esterilizada en estufa (180°C durante 20') con una altura de 2 cm. Sobre la superficie de la tierra se agregaron los diferentes estados y el recipiente se cubrió con una tela de *voile*. La concentración de JIs utilizada fue de 10.000 JIs por recipiente. Se realizaron como mínimo 3 réplicas por cada estado y se repitieron al menos dos veces en el tiempo. El número de individuos evaluados se muestra en la tabla 3.1. Se incluyó un grupo control sin nematodos en cada ensayo.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 Y 90

Se determinó la concentración necesaria para que los NEPs mataran el 50% y el 90% de las larvas de *L. insularis* (CL50 y CL90). Las larvas se añadieron a recipientes de plástico de 50 ml ($n = 10$) con tierra estéril junto con concentraciones de 0; 1.000; 5.000 y 10.000 JIs por recipiente. En base a los resultados obtenidos en el ensayo de susceptibilidad descrito en el apartado A.3., solo las larvas de *L. insularis* fueron consideradas. Este estado representa el blanco más adecuado de control utilizando NEPs, dado el comportamiento en el campo de este estado, de caer e introducirse en el suelo para empupar (Kelts, 2005). El número de individuos evaluados se muestra en la tabla 3.2. Se realizaron como mínimo 3 réplicas por cada concentración y se repitieron al menos dos veces en el tiempo. La mortalidad se registró cada 24 hs en un periodo de 10 días, los cadáveres que adquirieron la coloración característica fueron disectados para corroborar la infección.

5. CONCENTRACIÓN, INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

Diez días después de la exposición de los escarabajos a los JIs, los cadáveres provenientes de los bioensayos previamente descritos, se colocaron individualmente en trampas White modificadas para determinar la infectividad, tiempo de emergencia de los nematodos y producción para cada estado y concentración (ver tabla 3.2). Se consideró como tiempo de emergencia el número de días desde la mortalidad registrada en los insectos hasta la primera aparición de JIs. La producción total se determinó mediante observación de los JIs en trampas White cinco días después de la emergencia de los nematodos mediante el método de dilución.

6. PRUEBAS DE INFECTIVIDAD A PARTIR DE JIS EMERGIDOS DE CADÁVERES DE *Lobiopa insularis*

El objetivo de esta experiencia fue determinar si los JIs son capaces de reinfectar una vez que cumplieron su ciclo en *L. insularis*. Las pruebas se realizaron en placas de Petri de 10 cm con papel de filtro con 10 larvas de *Tenebrio molitor* como hospedador susceptible y 1.000 JIs. La mortalidad se determinó cada 24 horas y los insectos muertos se colocaron en trampas White para corroborar la emergencia de los nematodos. Se realizaron seis réplicas con sus correspondientes controles.

Todos los ensayos descritos se realizaron a 25°C y a una humedad relativa del 70%.

ANÁLISIS DE DATOS

Para calcular la concentración letal se utilizó un modelo probit que relaciona \log_{10} (concentración) con el probit. Para el cálculo de dicho modelo se utilizó la librería Ecotoxicology (v 1.0.1), implementada en R, con la función ProbitEPA que simula la estimación probit de la EPA Ecological Exposure Research Division (EERD). La infectividad de *H. bacteriophora* por concentración y estado se analizó mediante prueba binomial de proporciones. Un error global tipo I de 0,05 se ajustó a 0,0169 por la tasa de error experimental, debido al número de comparaciones (3) realizadas (Lyman Ott y Longnecker,

2010). Para comparar la producción, los datos se normalizaron mediante la aplicación de logaritmo natural, su normalidad fue analizada por el test de Levene y luego un análisis de varianza (ANOVA) fue utilizado. Para buscar diferencias entre las medianas de los tiempos de emergencia se utilizó Kruskal-Wallis. Las diferencias en la emergencia media entre concentraciones fueron detectadas por la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon (Hollander et al., 2014).

B. INTRODUCCIÓN A CAMPO DE *H. bacteriophora* SUP EN CULTIVOS DE FRUTILLA COMO POTENCIAL AGENTE DE CONTROL DE *L.insularis*

1. SITIO DE APLICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL CULTIVO

La liberación de los JIs se realizó en la estación experimental Julio Hirschhorn ubicada en Los Hornos, Provincia de Buenos Aires ($34^{\circ}59'05.8''S$ $57^{\circ}59'49.6''W$) sobre un cultivo de frutilla durante el año 2014 (Figura 3.2). El cultivo se encontraba organizado en 7 camellones, de dos hileras de plantas, los cuales estaban irrigados por un sistema de riego por goteo, y cubiertos por un mulch plástico. Estos camellones fueron divididos en parcelas de 2 metros de longitud, conteniendo un total de 12 plantas cada una.



Figura 3.2: Imagen satelital del sitio de liberación, Estación Experimental Julio Hirschhorn (FCAYF - UNLP), Los Hornos, Provincia de Buenos Aires. Imágenes © 2018 DigitalGlobe, Datos del mapa © 2018 Google.

2. MONITOREO DE LA PLAGA

Para determinar la densidad de la plaga previa a la aplicación del nematodo, se revisaron 9 parcelas pre-tratamiento y otras 9 parcelas a los 20 días post-aplicación de los nematodos. En cada parcela se revisaron un total de 12 plantas. Se registró: 1) número de frutillas presentes en el cultivo, contabilizando el número de frutillas verdes (inmaduras), rojas (maduras) y fermentadas (maduración avanzada); 2) el número de frutillas con coleópteros por cada estado de maduración con el fin de establecer preferencias de alimentación; 3) el porcentaje de frutas atacadas y 4) el promedio de coleópteros por tratamiento.

3. RELEVAMIENTO DE NEPs EN SUELO

Se tomaron 10 muestras de tierra a 10 cm de profundidad en diferentes puntos definidos al azar. Cada muestra contenía 500g de tierra que fueron revisadas previamente para hacer un relevamiento de la fauna acompañante. Luego se colocaron en recipientes plásticos de 500 cm³ a los que se agregaron 10 larvas de *T. molitor* para descartar la presencia de nematodos entomopatógenos previa a la introducción del aislamiento *H. bacteriophora* SUP.

4. LIBERACIÓN INUNDATIVA DE JIs PARA EL CONTROL DE *Lobiopa insularis*

La aplicación de los JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* SUP se realizó en 5 de los 7 camellones, las parcelas aplicadas se definieron al azar. La concentración de JIs fue de 10,000 por planta, que representan 75 JIs/cm², los cuales se aplicaron suspendidos en agua. Se trataron un total de 6 parcelas y se marcaron otras 6 como controles (Figura 3.3). La aplicación se realizó en el mes de febrero del año 2014.

5. DISPERSIÓN Y PERSISTENCIA DE LOS NEMATODOS

La persistencia y establecimiento de los NEPs en el campo generalmente se monitorea exponiendo insectos en trampas cebo en el suelo (Campos-Herrera, 2013). Para determinar la capacidad de dispersión de los nematodos post-aplicación, mensualmente se tomó una muestra de suelo de 500 gr de parcelas definidas al azar, así como también de los puntos de aplicación, para registrar la presencia de *H. bacteriophora* SUP. Estas muestras se colocaron en recipientes plásticos a los cuales se agregaron larvas de *Tenebrio molitor*. Las larvas que mostraron signos de infección se colocaron en trampas White para registrar emergencia y en su defecto se disecaron.

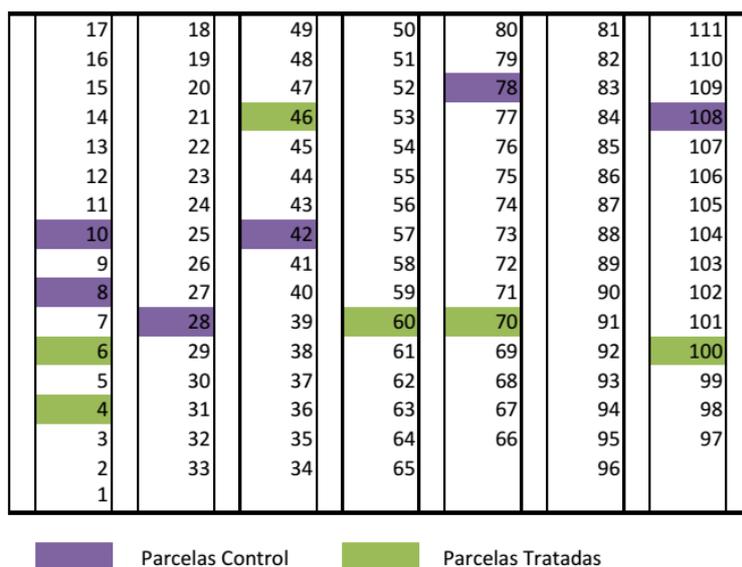


Figura 3.3: Disposición del cultivo de frutilla, sitios de aplicación y controles.

RESULTADOS

A. ENSAYOS DE LABORATORIO

3. SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE *L. insularis* A H. *bacteriophora* SUP

La infectividad en los tres estados fue significativamente diferente ($p < 0,0169$) (Tabla 3.1) y resultó ser mayor en larvas y pupas ($77 \pm 17\%$ y $64 \pm 25\%$, respectivamente) que en adultos ($2,2 \pm 1,1\%$). Los cadáveres presentaron el color rojizo característico por la presencia de bacterias del género *Photorhabdus* (Figuras 3.5.A-F).

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL (CL50 Y CL90)

Una mortalidad de 25-77% fue causada por *H. bacteriophora* SUP en larvas de 3er estadio de *L. insularis* en las tres concentraciones evaluadas. La mortalidad más alta se obtuvo a una concentración de 10.000 JIs por recipiente. Las tres comparaciones mostraron un nivel de significancia menor que el p-valor ajustado (0,0169), por lo tanto, la infectividad fue diferente en cada concentración (Tabla 3.2). La concentración letal requerida para matar 50 y 90% de las larvas (CL50 y CL90) durante 10 días fue de 2.840 JIs/recipiente y 23.743 JIs/recipiente, respectivamente (Figura 3.4.A-B). Los cadáveres se observaron con la coloración rojiza característica.

5. CONCENTRACIÓN, INFECTIVIDAD Y PRODUCCIÓN

La producción total de JIs obtenidos de cadáveres de diferentes estados y concentraciones de *L. insularis* varió entre 840 y 9.247 individuos, alcanzando valores máximos en larvas a una concentración de 1.000 JIs por recipiente (Tablas 3.1, 3.2). Sin embargo, el análisis de varianza no indicó diferencias significativas tanto para las concentraciones evaluadas en larvas ($F = 0,4381$, $df = (2, 12)$, $P = 0,6552$) como para los diferentes estados ($F = 0,1559$ $df = (2, 10)$, $P = 0,8577$).

El tiempo de emergencia de JIs a partir de los insectos muertos fue entre 11-22 días después de la exposición para las larvas, entre 20-30 días para las pupas, y 21-25 días para los adultos (Tabla 3.1). En larvas, el tiempo de emergencia de JIs fue menor al registrado para pupas o adultos (Tabla 3.2) resultando este mayor a una concentración de 10.000 JIs por recipiente en relación a los tiempos registrados para concentraciones más bajas (11-22 días, Tabla 3.2). La prueba de Kruskal - Wallis determinó diferencias significativas entre las medianas de los tiempos de emergencia ($\chi^2 = 6,33$; $df = 2$; $P = 0,04$). Las comparaciones se realizaron con Mann - Whitney - prueba de Wilcoxon con una significancia ajustada de 0,0169, registrándose solo diferencias significativas entre la concentración de 5.000 y 10.000 ($P = 0,01322$). Los JI emergidos de *L. insularis* conservaron la capacidad de infectar a larvas de *T. molitor* con un valor medio de $70 \pm 16\%$ produciendo nuevas generaciones de JIs.

Estado	N evaluados	N muertos	N infectados	Producción de JIs/individuo	Infectividad (%)	Tiempo de emergencia (días)
Larvas	240	185	185	840-7.600	77,0 ± 16,70	11-22
Pupas	270	173	173	1.200-5.000	64,10 ± 25,41	20-30
Adultos	180	3	3	1.360-4.400	1,7 ± 4,1	21-25

Tabla 3.1 Mortalidad e infectividad de larvas, pupas y adultos de *Lobiopa insularis* expuestos a una concentración de 10.000 juveniles infectivos del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* SUP por recipiente.

Concentración (JIs/ recipiente)	N evaluados	N muertos	N infectados	Producción de JIs/larva	Infectividad (%)	Tiempo de emergencia (días)
1.000	40	10	10	1.090-9.247	25,00 ± 12,91	7-14
5.000	30	17	17	891-7.190	56,67 ± 11,55	7-9
10.000	240	185	185	840-7.600	77,10 ± 16,70	11-22

Tabla 3.2. Mortalidad, infectividad, producción y tiempo de emergencia en larvas de *Lobiopa insularis* expuestas a diferentes concentraciones del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* SUP.

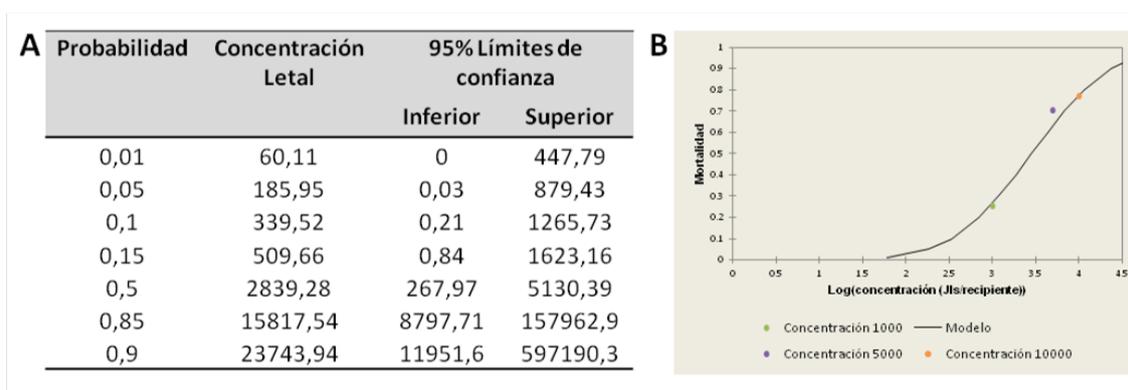


Figura 3.4: Concentración letal de *H. bacteriophora* SUP en larvas de *L. insularis* en R (Versión 1.0.143 - © 2009-2016 RStudio, Inc.). A) Valores de concentración letal y límites de confianza. B) Porcentaje de mortalidad en larvas de *Lobiopa insularis*. Concentración letal 50 y 90 después de diez días de exposición a *H. bacteriophora* SUP (JIs).

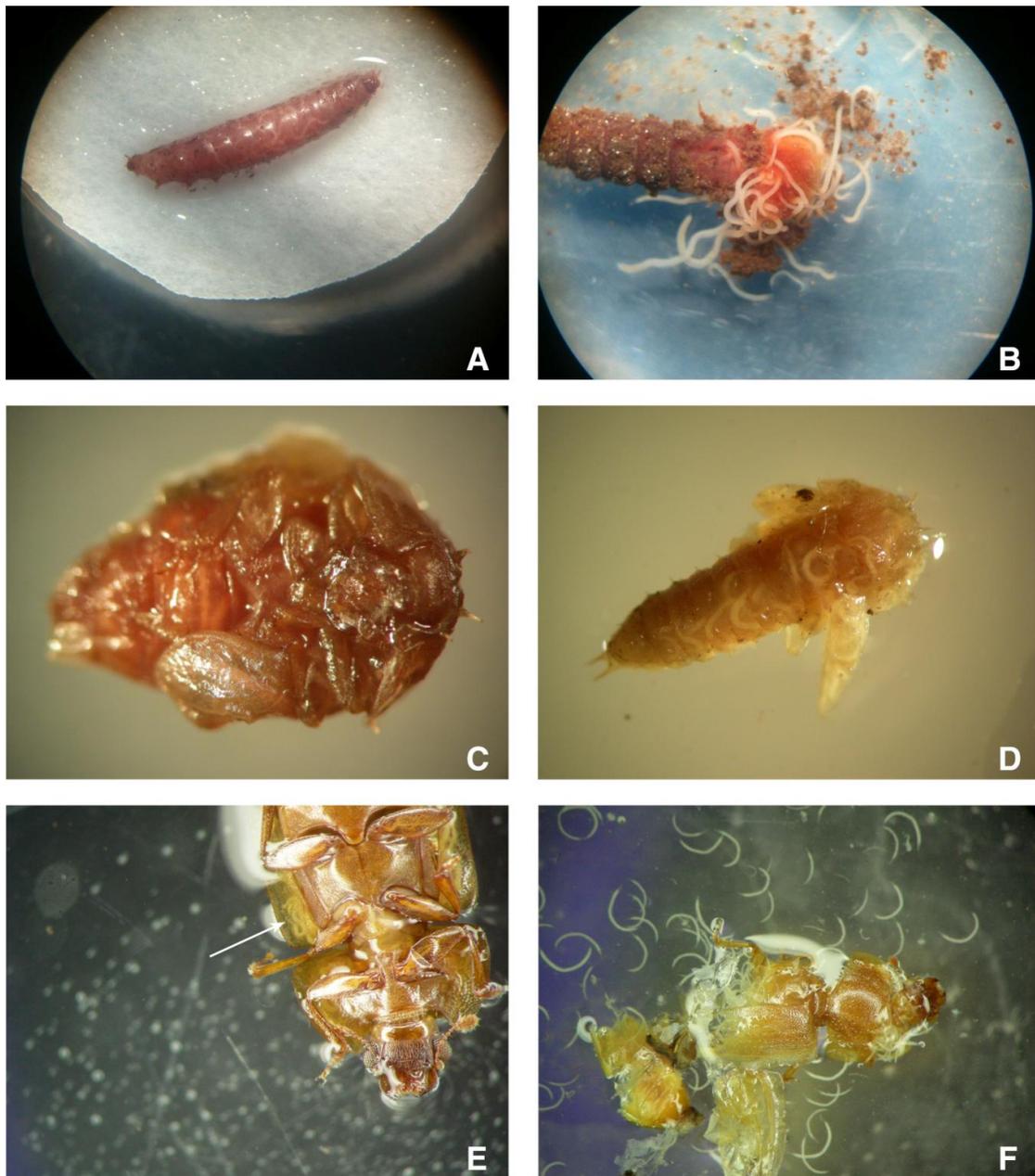


Figura 3.5: *Lobiopa insularis* infectada por *Heterorhabditis bacteriophora* SUP en sus diferentes estados de desarrollo. Se observa la coloración característica producida por la septicemia de bacterias del género *Photorhabdus* sp. A-B. Larvas. C-D. Pupas. E-F. Adultos. En A, D y E, se pueden observar los nematodos por transparencia dentro de la cavidad del insecto. En B y F, se observan ejemplares adultos de nematodos fuera del cadáver del insecto.

B. ENSAYOS DE CAMPO

3. MONITOREO DE LA PLAGA

Los registros de *L. insularis* en frutillas obtenidas del campo se resumen en la tabla 3.3.A-B. El 93,14% de los coleópteros se encontraron en frutillas fermentadas, un 6,86% en frutillas rojas, y no se han registrado en las frutillas verdes (Figura 3.6.B). Los porcentajes de frutillas atacadas por estado de maduración fueron de 59,60; 17,11 y 0 % para frutillas fermentadas, rojas y verdes, respectivamente (Figura 3.6.A). La proporción de frutillas atacadas y de coleópteros encontrados por cada estado de maduración analizados por un test exacto de Fisher, arrojaron diferencias significativas para ambas proporciones entre frutillas verdes y fermentadas ($p\text{-valor}<0,0169$), y entre rojas y fermentadas ($p\text{-valor}<0,0169$) sugiriendo una mayor preferencia de los coleópteros por frutos maduros, seguida por las frutas rojas. No se obtuvieron diferencias significativas entre frutillas rojas y verdes.

A)	Estado de la fruta	n	Coleópteros por fruta	Total de coleópteros
	fermentada	9	190	204
	roja	9	14	204
	verde	9	0	204
B)	Estado de la fruta	n	Frutas por estado	Frutas atacadas
	fermentada	9	151	90
	roja	9	76	13
	verde	9	93	0

Tabla 3.3: Registro de *Lobiopa insularis* en frutillas obtenidas del campo. A) Número de coleópteros encontrados en frutillas en diferentes estados de maduración. B) Número de frutillas atacadas en relación a su estado de maduración.

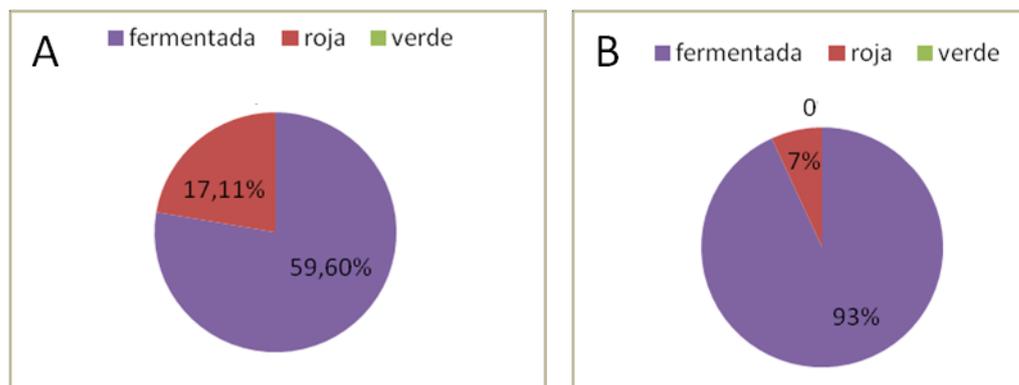


Figura 3.6: Registro de *Lobiopa insularis* en frutillas obtenidas del campo. A) Porcentaje de frutillas atacadas en relación a su estado de maduración. B) Porcentaje de coleópteros encontrados en frutillas en diferentes estados de maduración.

4. RELEVAMIENTO DE NEPs EN SUELO

Las larvas de *T. molitor* expuestas a las muestras de suelo colectadas antes de colocar el cultivo y previo a la aplicación de *H. bacteriophora* SUP no mostraron signos de infección por NEPs, lo cual sugiere que en la zona en la cual se realizó el ensayo no había nematodos entomopatógenos.

5. LIBERACIÓN INUNDATIVA DE JIs PARA EL CONTROL DE *Lobiopa insularis*

En la tabla 3.4, se resumen los datos registrados en el campo. El promedio de coleópteros encontrados fue de 22,7 para los registros pre-aplicación y 2,5 y 1,4 para los controles y tratados post-aplicación, respectivamente (Figura 3.7.B). El porcentaje de frutillas atacadas en los registros pre-aplicación fue del 32%, y los correspondientes a los registros post-aplicación fueron de 28 y 17% para parcelas control y tratadas, respectivamente (Figura 3.8.A). El test exacto de Fisher realizado con un nivel de significancia del 98% para comparar la proporción de frutillas atacadas sobre el total de examinadas arrojó diferencias significativas entre los registros pre-aplicación y control post-aplicación y entre pre-aplicación y tratados post-aplicación con un p-valor de 0,0167 y 0,0017, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles post-aplicación (p-valor de 0,669). En la figura 3.8 se muestra el número de frutillas fermentadas antes y después de la aplicación.

Registro	n	Frutillas evaluadas	Numero coleópteros	Coleopteros/ frutilla
Pre-aplicación	9	320	204	0,64
Control-Postaplicación	4	25	10	0,40
Tratados-postaplicación	5	30	7	0,23

Tabla 3.4: Registro de datos procedentes de un cultivo de frutilla tratado con *H. bacteriophora* SUP para el control de *L. insularis*.

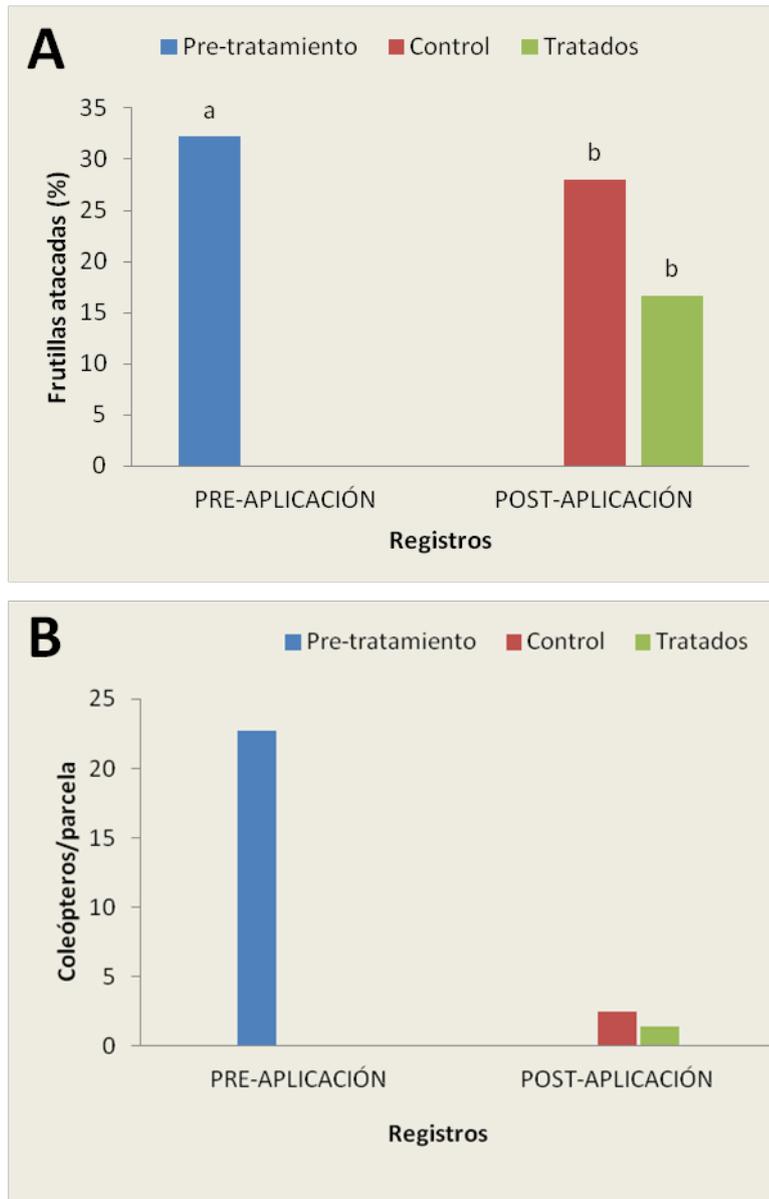


Figura 3.7: Efecto del control de *L. insularis* en un cultivo de frutilla tratado con *H. bacteriophora* SUP. A) Muestra el porcentaje de frutillas atacadas por el coleóptero antes y después de la aplicación de JIs en el cultivo; B) Muestra el número de coleópteros registrados por parcela. Las letras en superíndice diferentes indican diferencias significativas.

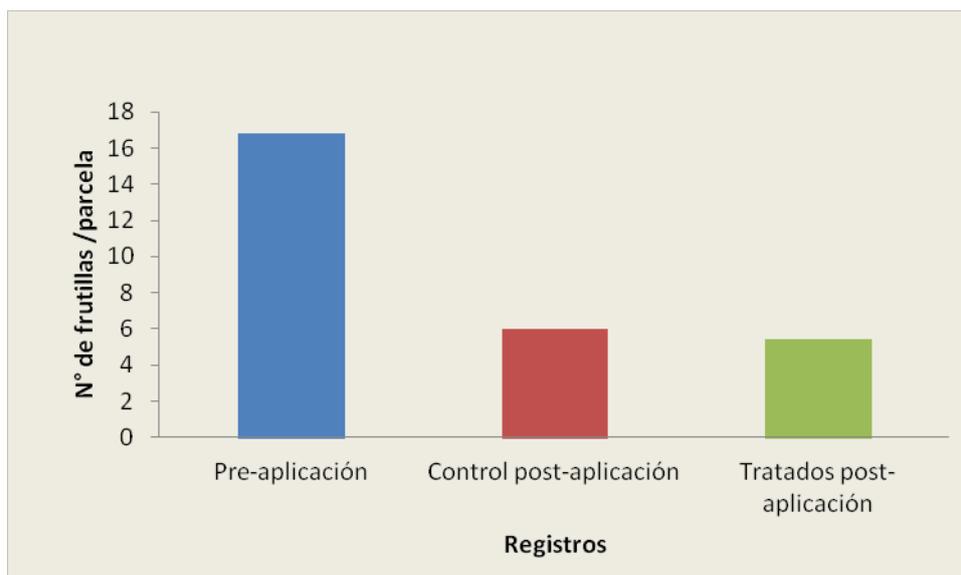


Figura 3.8: Registro de frutillas fermentadas en el campo antes y después de la aplicación de los JIs de *H. bacteriophora* para el control de *L. insularis*.

6. DISPERSIÓN Y PERSISTENCIA DE LOS NEMATODOS

Las larvas de *T. molitor* expuestas a las muestras de suelo tomadas en los puntos de aplicación luego del tratamiento mostraron signos de infección por *H. bacteriophora* indicando así la viabilidad de los JIs aplicados. A su vez, las larvas expuestas a muestras de suelo, tomadas en diferentes puntos del cultivo en los meses posteriores a la aplicación, también mostraron signos de infección por *H. bacteriophora*, lo cual demostró la persistencia de los nematodos durante el periodo evaluado (8 meses) y su dispersión a lo largo del cultivo. En la figura 3.9 se observa el incremento de las parcelas positivas, es decir, muestras de suelo en las cuales se registraron larvas de *T. molitor* con signos de infección por *H. bacteriophora* SUP en el periodo de tiempo evaluado. Los resultados obtenidos sugieren que los nematodos fueron capaces de dispersarse a lo largo del camellón y a su vez, entre camellones, dado que se encontraron parcelas positivas en camellones que no fueron tratados (Figura 3.9).

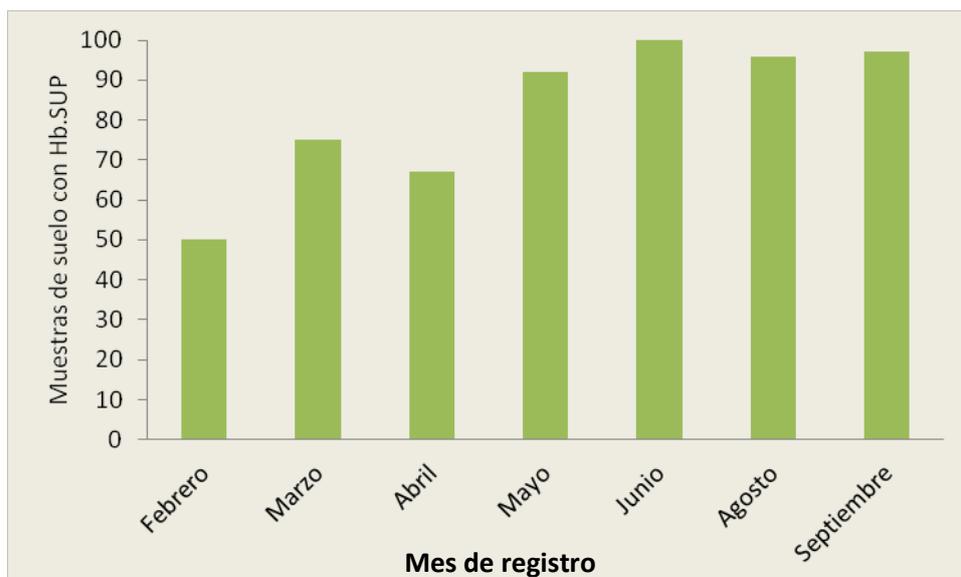


Figura 3.9: Persistencia de *Heterorhabditis bacteriophora* SUP aplicado en cultivo de frutilla infestado con *L. insularis*.

DISCUSIÓN

La utilización de enemigos naturales constituye uno de los pilares del manejo integrado de plagas, cuyo objetivo es reducir por debajo del nivel de daño económico la población de una plaga por medio de la utilización de diferentes estrategias de control, entre las que se encuentran el control biológico. El aislamiento nativo *Heterorhabditis bacteriophora* SUP resultó ser infectivo sobre *L. insularis*, registrándose una susceptibilidad decreciente en larvas, pupas y adultos. La mayor susceptibilidad de larvas y pupas, sumado al comportamiento de estos insectos de dirigirse al suelo para empupar, los convierte en un blanco adecuado para el control con nematodos entomopatógenos. *H. bacteriophora* SUP pudo completar el ciclo en todos los estados de desarrollo de *L. insularis*, lo cual mejoraría el establecimiento y la propagación de este aislamiento tras una aplicación en el campo. Teniendo en cuenta que los JIs de *H. bacteriophora* son muy móviles, tienen el comportamiento de buscar al insecto, y responder fuertemente a los quimio-atrayentes del hospedador (Lewis et al., 1992), su modo de acción los convierte en eficaces agentes de biocontrol para parasitar a hospedadores subterráneos sedentarios (Kaya y Gaugler, 1993).

En concordancia con los resultados obtenidos para el insecto de cría *T. molitor* la infectividad en larvas de *L. insularis* incrementó conforme al aumento de las concentraciones de JIs utilizadas, lo cual a su vez concuerda con varios aislamientos de *H. bacteriophora* evaluados por Glazer et al. (2007) sobre el coleóptero nitidulido *Carpophilus humeralis*. Según Selvan et al. (1993) altas concentraciones de JIs aseguran un mayor número de nematodos que invaden el hospedador, esto explicaría el incremento de la infectividad. Sin embargo la producción fue decreciente, esto podría deberse a una inadecuada nutrición de los NEPs y la consecuente reducción de la fecundidad debido a competencias intraespecíficas por los recursos a altas densidades de inóculo de acuerdo con Selvan et al. (1993).

En todos los experimentos, se observó un cambio en la coloración del cuerpo del hospedador (rojo oscuro a rojiza) causado por las bacterias simbióticas, lo cual confirma la infección.

La variación en la infectividad, el tiempo de emergencia y el número total de JIs producidos en los distintos estados de *L. insularis* también puede deberse a diferencias en el tiempo de desarrollo de los NEPs y susceptibilidad diferencial de los mismos, como se observó para otros insectos (Koppenhofer y Fuzy, 2004). Se han dado una variedad de razones para explicar tales diferencias observadas, incluyendo el tamaño, la dureza de la cutícula, la respuesta inmune, el comportamiento y la condición nutricional del hospedador, así como el tipo de nutrientes producidos por las bacterias simbióticas (Shapiro et al., 1999). En general, el rendimiento de los nematodos es proporcional al tamaño del hospedador y la susceptibilidad a la infección es a menudo inversamente proporcional al tamaño o la edad del hospedador (Shapiro-Ilian y Gaugler, 2002). Esto explicaría la mayor susceptibilidad y producción de JIs en larvas respecto a pupas y adultos.

Las estrategias frecuentemente empleadas para controlar los escarabajos de la savia son las prácticas culturales y la aplicación de insecticidas químicos. Las prácticas culturales, tales como, la cosecha de frutillas en el campo antes de alcanzar la maduración y la eliminación de frutos dañados, enfermos o demasiado maduros resultan efectivas para el control de la plaga, pero por tratarse de un cultivo que no continúa su maduración luego de ser cosechado según Kader (1999), la cosecha temprana podría generar efectos negativos sobre la calidad de la fruta. En este sentido, el monitoreo de la plaga, sumado a prácticas culturales que impliquen la eliminación de frutos dañados y el empleo de nematodos entomopatógenos u otros enemigos naturales en aquellos momentos en que las densidades poblacionales superen los niveles de daño económico podría representar una estrategia de control integrado de plagas alternativa al empleo de agroquímicos, asegurando la producción de una fruta de calidad libre de residuos químicos.

Los resultados de la evaluación realizada a campo sugieren que hubo una reducción significativa de los porcentajes de frutillas atacadas antes y después de la aplicación, aunque no se han detectado diferencias significativas entre parcelas asignadas como controles y tratadas, por tanto no podría atribuirse esta reducción como un efecto del control. Esto podría deberse en parte a la contaminación de los controles, ya que se observó reducción de la plaga y del daño ocasionado postaplicación tanto en tratados como control y en ambos fue positiva la presencia del nematodo, como así también al desplazamiento y comportamiento del insecto, que generalmente se mueve en función de la disponibilidad del alimento. En este sentido, la reducción del número de frutas disponibles como fuentes de alimento, tal como lo indica el promedio de frutillas registradas en los registros post-aplicación, podría haber favorecido el desplazamiento de los coleópteros hacia otros cultivos, lo cual se vió reflejado en la reducción del número de coleópteros encontrados. A su vez, los ejemplares de coleópteros recolectados no mostraron signos de infección por NEPs.

Los datos obtenidos en el laboratorio (datos no presentados) indican que los JIs se desplazan a través del suelo unos 30 cm aproximadamente al cabo de una semana, lo cual coincide con Shields (2015). En condiciones de campo, los JIs se dispersaron a lo largo de todos los camellones, incluidos los no tratados, en concordancia con resultados obtenidos por Shanks y Agudelo-Silva (1990). A los tres meses de ser aplicados se los encontró en el 92% de

las muestras de suelo recolectadas. Esta dispersión podría explicarse en parte por el movimiento activo de los NEPs, y a su vez, por medio de movimientos pasivos, a través de hospedadores infectados, forosis, el agua, lo cual favorece la dispersión a distancias mucho mayores y puede explicar su amplia distribución (Koppenhöfer, 2007). En el sistema estudiado esta amplia dispersión pudo ser favorecida por el sistema de riego, debido a que la humedad es esencial para el movimiento y la supervivencia de los nematodos (Griffin, 2015). Los registros mensuales de las muestras de suelo indican que los JI lograron persistir en el ambiente al menos en el periodo comprendido entre los meses de febrero hasta septiembre del mismo año. Los datos obtenidos, sin embargo, no permitieron discriminar si la infectividad registrada en las trampas cebo correspondió a los JIs aplicados originalmente o JIs que se hayan reciclado en el ambiente. Es necesario ampliar el seguimiento con el fin de conocer la persistencia en el ambiente por un plazo mayor de tiempo.

Para el éxito en un programa de control en condiciones de campo, es fundamental el conocimiento sobre la biología de la plaga, un correcto diseño experimental y la selección de un agente adecuado. *H. bacteriophora* SUP demostró varios atributos como potencial agente de control de *L. insularis*: se trata de una población adaptada a las condiciones ambientales y climáticas locales, mató los tres estados de la plaga, demostró un amplio poder de dispersión por medio de movimientos activos y/o pasivos, y a su vez pudo persistir en el ambiente. Este estudio aporta conocimientos sobre el comportamiento de un aislamiento nativo en condiciones naturales luego de su aplicación, ofreciendo estrategias alternativas de control, constituyendo el primer estudio de aplicación a campo de NEPs en el cinturón hortícola platense y en la Provincia de Buenos Aires. Los resultados obtenidos son alentadores y convierten al aislamiento SUP en un factible agente de biocontrol por lo cual futuros estudios deberán ser realizados para ajustar las estrategias de control en el campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Blumberg, D., Doron, S., & Bitton, S. (1985). Effect of triflumuron on two species of nitidulid beetles, *Carpophilus hemipterus* and *Urophoru shumeralis*. *Phytoparasitica* 13, 9-19.
- Bortoli, L. C. Machota Junior, R., & Botton, M. (2014). Biología e tabela de vida de fertilidade da brocado-morangueiro criada em dieta artificial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 49 (2), 144-147.
- Campos-Herrera, R., Pathak, E., El-Borai, F. E., Schumann, A., Abd-Elgawad, M. M. M., & Duncan, L. W. (2013). New citriculture system suppresses native and augmented entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 66(3), 183-194.
- Campos-Herrera, R.; Gomez-Ros, M.; Escuer, M.; Luis Cuadra, M.; Barrios, L., & Gutierrez, C. (2008). Diversity, occurrence, and life characteristics of natural entomopathogenic nematode populations from La Rioja (Northern Spain) under different agricultural management and their relationships with soil factors. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1474-1484.
- Cluigt, N., Greco, N., & Liljeström, G. (2007). Características de la historia de vida de *Lobiopa insularis* (Coleoptera: Nitidulidae) en frutilla. En resumen de 30° Congreso Argentino de Horticultura. Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO). La Plata 2007.
- De Santis, L. (1964). Encirtidos de la República Argentina (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Anales de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires* 4, 9-422.
- Dowd, P., Moore, D., Vega, F., Mcguire, M., Barlet, R., Nelson, T., & Miller, D. (1995). Occurrence of a mermithid nematode parasite of *Carpophilus lugubris* (Coleoptera: Nitidulidae) in Central Illinois. *Journal of Environmental Entomology* 24, 1245-1251.
- Fornari, R., Machota, R., Bernardi, D., Botton, M., & Luiz Pastori, P. (2013). Evaluation of damage, food attractants and population dynamics of strawberry sap beetle. *Horticultura Brasileira* 31, 380-385.
- Glazer, I., Eliyau, M., Salame, L., Nakash, Y., & Blumberg, D. (2007). Evaluation of the efficacy of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* sp. against sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae). *Biocontrol* 52, 259-270.
- Greco, N., Cluigt, N., Cline, A., & Liljeström, G. (2017). Life history traits and life table analysis of *Lobiopainsularis* (Coleoptera: Nitidulidae) fed on strawberry. *PLoS ONE* 12 (7), e0180093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180093>.

-
- Griffin, C. T. (2015). Behaviour and population dynamics of entomopathogenic nematodes following application. p. 57-95. In: Campos-Herrera, Raquel (Ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. Springer. Cham. pp.531.
 - Guimarães, J., Michereff Filho, M., Ribeiro, M., & Liz R., Guedes, I. (2009). Ocorrência e manejo da broca do morangueiro no Distrito Federal. Comunicado Técnico. Embrapa, Brasília, 5 p.
 - Hollander, M., Wolfe, D., & Chicken, E. (2014). Nonparametric statistical methods. John Wiley and Sons, New Jersey. 809 p.
 - Kelts, C. A. (2005). *Evaluation of attractants and monitoring for sap beetle control in strawberries* (Doctoral dissertation, University of Florida).
 - Kader, A.A. (1999). Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Horticulturae* 485. International Symposium Effect of Pre- & Postharvest factors in Fruit Storage, 203-208.
 - Kaya, H. K., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual review of entomology* 38(1), 181-206.
 - Kirschbaum, D. S., Vicente, C. E., Cano-Torres, M. A., Gambardella, M., Veizaga-Pinto, F. K., & Antunes, L. E. C. (2016). Strawberry in South America: from the Caribbean to Patagonia. VIII International Strawberry Symposium 1156. 947-956 pp.
 - Koppenhöfer, A. M. (2007). Nematodes. p. 249-264. In: Lacey, L. A., & Kaya, H. K. (Eds.). *Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. Springer, Dordrecht.
 - Koppenhofer, A., & Fuzy, E. (2004). Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology* 97 (6), 1842-1849.
 - Lewis, E. E., Gaugler, R., & Harrison, R. (1992). Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology* 105(2), 309-315.
 - Lin, H., & Phelan, P. (1991). Identification of food volatiles attractive to *Glischrochilus quadrisignatus* and *Glischrochilus fasciatus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Chemical Ecology* 17 (12), 2469-2480.
 - Lyman Ott, R., & Longnecker, M. (2010). An introduction to statistical methods and data analysis. Sixth edition. Brooks/Cole CENAGE Learning, Belmont, USA. 571 pp.
 - Nuñez Naranjo, D.E. (2014). Control biológico de trips en el cultivo de frutilla del noreste de Buenos Aires: tasa de depredación de *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) y su

- interacción con *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) (Master's thesis, Buenos Aires/Universidad de Buenos Aires/2014).
- Polack, A., Del Pino M., Silvestre C., & Olariaga, I. (2008). Control biológico de plagas en pimiento bajo invernáculo ¿realidad o fantasía? XXXI Cong. de Horticultura. Mar del Plata.
 - Potter, M., Price, J., Habeck, D., Schuster, D., & Mccord, E. Jr. (2013). A survey of sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) in strawberry fields in West Central Florida. *Florida Entomologist* 96 (3), 1188-1189.
 - Selvan, S., Campbell, J. F., & Gaugler, R. (1993). Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 62(3), 278-284.
 - Shanks Jr, C. H., & Agudelo-Silva, F. (1990). Field pathogenicity and persistence of heterorhabditid and steinernematid nematodes (Nematoda) infecting black vine weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in cranberry bogs. *Journal of Economic Entomology* 83(1), 107-110.
 - Shapiro, D. I., Cate, J. R., Pena, J., Hunsberger, A., & McCoy, C. W. (1999). Effects of temperature and host age on suppression of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) by entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology* 92(5), 1086-1092.
 - Shapiro-Ilán, D., & Dolinski, C. (2012). Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology* 44 (2), 206-217.
 - Shields, E. J. (2015). Utilizing persistent entomopathogenic nematodes in conservation or a more classical biological control approach. p. 165-184. In: Campos-Herrera, R. (Ed.). Nematode pathogenesis of insects and other pests. Springer International Publishing AG Switzerland. Switzerland. pp. 531.

CAPITULO IV: Evaluación de *Heterorhabditis bacteriophora* SUP como potencial agente de control de *Phyrdenus muriceus* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio y campo

INTRODUCCIÓN

En la Provincia de Buenos Aires la horticultura es una de las actividades agrícolas más importantes. La producción se caracteriza básicamente por el cultivo intensivo de productos para el consumo en fresco de la población urbana en explotaciones de tipo familiar, llamadas quintas o huertas (Benencia, 1994; 2009). En la actualidad, la berenjena se considera el tercer cultivo en importancia del país dentro de las Solanáceas, luego de la papa y el tomate (Sekara et al., 2007). El cultivo se realiza a campo o en invernáculos, concentrándose en los cinturones hortícolas de diferentes zonas, donde se destina al mercado interno para su consumo en fresco (Mangione y Sanchez, 1999).

La producción de solanáceas se ve severamente afectada por numerosos problemas sanitarios, entre los que merece especial atención el “gorgojo del tomate”, pues incide de manera preponderante sobre la calidad y los rendimientos de las cosechas. *Phyrdenus muriceus* Germar (Coleoptera: Curculionidae), conocido como el “gorgojo del tomate”, ha perjudicado a varias especies de las familias de las solanáceas, principalmente berenjena, papa y tomate (Espul y Magistretti, 1969). El ciclo de vida del coleóptero incluye, los estados de huevo, larva, pupa y adulto. La hembra deposita los huevos entre los grumos de tierra, próximos al tallo, cercanos al nivel del suelo. Las larvas construyen una celdilla pupal de tierra, donde se desarrolla la pupa (Espul y Magistretti, 1969). Esta plaga ataca tanto la parte aérea de la planta como la subterránea (Novo et al. 2002). Los adultos perforan el follaje y el cuello de los plantines, las larvas son de hábito subterráneo y se alimentan del sistema radicular, provocando la muerte en plantas jóvenes y el retraso del crecimiento en plantas ya desarrolladas (Espul y Magistretti, 1969). Hay registros de aparición de esta plaga en varias provincias de la Argentina, tales como lo sugieren Lieberman (1930) en Jujuy, Hayward (1942) en Tucumán, Espul y Magistretti (1969) en Mendoza, Novo (2002) en Córdoba, Vasquez et al. (2013) en Rio Negro, y Eliceche y Rusconi (com. pers.)(2014), para la provincia de Buenos Aires. Los registros de enemigos naturales en esta plaga son escasos para la Argentina. Los NEPs pueden considerarse buenos candidatos para el manejo integrado de plagas y la agricultura sostenible debido a una variedad de atributos ya mencionados en capítulos anteriores, tales como, la formación de un estadio de resistencia (juvenil infectivo o JI), la búsqueda activa o por emboscada, un amplio rango hospedador, pueden ser producidos en masa, pueden aplicarse con equipos convencionales y no tienen efectos sobre organismos no blanco. El ciclo de vida generalizado de los nematodos entomopatógenos (NEPs), incluye un estadio larval de resistencia, conocido como juvenil infectivo (JI) o *dauer*. Estos JIs persisten en el suelo en busca de un insecto hospedador adecuado (Grewal et al., 1997). Tras la entrada a través de la cutícula o las aberturas naturales del hospedador, los JIs liberan las bacterias simbióticas en el hemocele de los insectos, los cuales mueren producto de la septicemia producida por las

bacterias. Los JIs se alimentan de los tejidos del insecto, se desarrollan a adultos y dan lugar a varias generaciones sucesivas hasta que los recursos escasean. Los nuevos JIs producidos, emergen del cadáver, dispersándose en búsqueda de nuevos hospedadores para infectar (Labaude y Griffin, 2018)

Estos NEPs son ampliamente utilizados en programas de control biológico de plagas de tipo inundativo (Griffin, 2015). Este tipo de método, implica la liberación de un gran número de agentes de control biológico producidos en masa para reducir una población de plagas sin necesariamente buscar un impacto o establecimiento continuo o a largo plazo en el ambiente, ofreciendo un control rápido, donde los enemigos naturales deben ser introducidos regularmente y en gran número (Van Lenteren et al., 2003).

Según Beirne (1980) y Van Lenteren (1986), en cualquier programa de control biológico la secuencia teórica de procedimientos incluye en primer lugar, la búsqueda y colección de enemigos naturales en un área; evaluación, selección, y propagación en masa; y por último la liberación, colonización y evaluación de consecuencias en el área objetivo.

En el cinturón hortícola bonaerense, se registraron tres poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora*, como resultado de la búsqueda de nematodos entomopatógenos en esta región: una en la localidad de City Bell (Stock, 1995), el aislamiento VELI en Villa Elisa (Achinelly et al., 2017a), y el aislamiento SUP caracterizado en este estudio. Los dos últimos aislamientos fueron los únicos que se multiplicaron *in vivo* y se evaluó la susceptibilidad contra diversas plagas de importancia agroeconómica, tales como *Anurogryllus muticus* (De Geer) (Orthoptera: Gryllidae) (Rusconi, 2017), *Hylesia nigricans* (Cramer) (Lepidoptera: Saaturniidae) (Camino et al., 2013) y *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Achinelly et al., 2017b) demostrando su potencial como biocontroladores.

Algunas especies pueden reciclarse y persistir en el ambiente; pueden tener efectos directos y/o indirectos en las poblaciones de nematodos parásitos y patógenos de plantas; pueden desempeñar un papel indirecto en la mejora de la calidad del suelo; y son compatibles con una amplia gama de pesticidas químicos y biológicos utilizados en los programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Lacey y Georgis, 2012). El mejoramiento de las predicciones del rendimiento en el campo y el riesgo ambiental del empleo de NEPs es importante e implica una mayor comprensión de los parámetros ecológicos (Ehlers y Hokkanen, 1996; Gaugler et al., 1997). Dentro de este marco, el objetivo de este capítulo incluye el estudio de la biología y la evaluación en condiciones de laboratorio y a campo del aislamiento *H. bacteriophora* SUP como potencial agente de biocontrol de la plaga de las solanáceas *P. muriceus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO

1. SITIO DE MUESTREO Y COLECTA DE INSECTOS

Los coleópteros se recolectaron en cultivos de berenjena en una huerta de producción hortícola ubicada en la localidad de Hudson, Partido de Berazategui, Buenos Aires (Figura 4.1.A). Esta localidad forma parte del cinturón verde bonaerense. El sitio de muestreo comprendió una huerta de producción hortícola con un manejo agroecológico, bajo el cual se

cultiva una amplia variedad de especies vegetales, se realizan rotaciones de cultivo, se conserva la vegetación natural y no se utilizan insumos químicos. La colecta de los coleópteros adultos se realizó en forma manual, revisando el cuello de las plantas de berenjena en el campo (Figura 4.1.B-C). Para su mantenimiento en el laboratorio se siguió el procedimiento desarrollado por Espul y Magistretti (1969). Los adultos se colocaron en recipientes plásticos de 50 ml, en cuya base se colocó un disco de papel de filtro y un disco de tela absorbente que presentaba una pequeña proyección, la cual tomaba contacto con el exterior del recipiente atravesando un orificio en la base del mismo. Dentro del recipiente se utilizó como sustrato tierra esterilizada en estufa 20 minutos a 180°C, y un tubérculo de papa como fuente de alimentación. Este recipiente se colocó dentro de una capsula de Petri, en la cual se agregó agua que se encontraba en contacto con el paño absorbente para mantener la humedad del sustrato (Figura 4.2. A-C). Cada 10 días los adultos se transfirieron a nuevos recipientes. La identificación taxonómica de los coleópteros adultos de *P. muriceus* capturados fue realizada por la Dra. Guadalupe del Rio de la División de Entomología, Sección Coleoptera del Museo de La Plata.

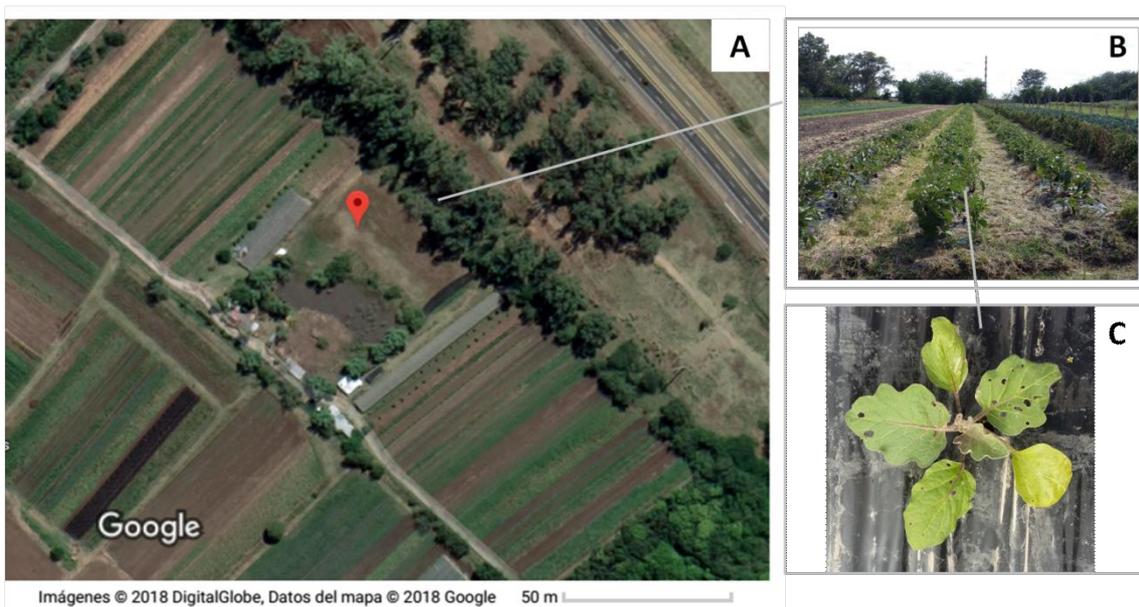


Figura 4.1: Fotos del sitio de estudio, huerta de producción hortícola ubicada en la localidad de Hudson ($34^{\circ}48'17.6''S$ $58^{\circ}07'29.7''O$), Partido de Berazategui, Buenos Aires. A) Foto satelital del sitio de estudio; B) Cultivo de berenjena organizado en camellones; C) Daño foliar en planta de berenjena, producto de la alimentación de los adultos.

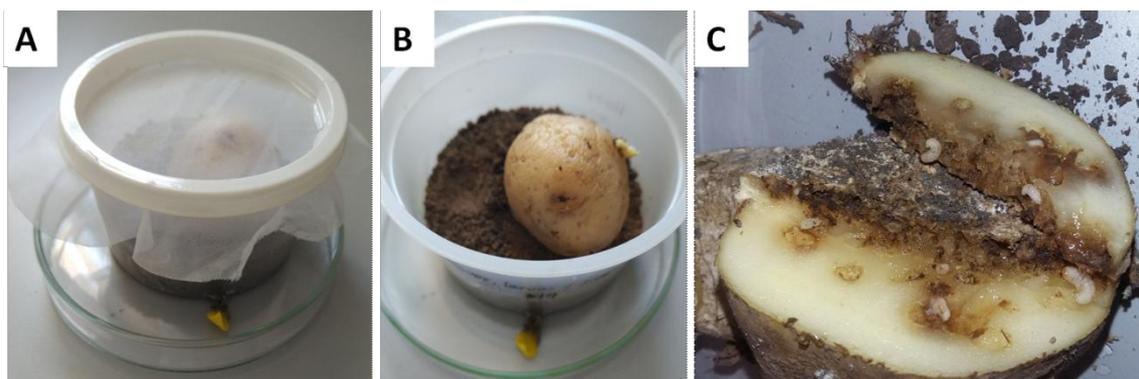


Figura 4.2: Cría de *Phyrdenus muriceus* en el laboratorio. A-B): Recipiente de cría. C) Larvas de *P. muriceus* alimentándose de la papa. Se observan las galerías o cavidades que producen al alimentarse.

2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE *P. muriceus* FRENTE A *H. bacteriophora*

La susceptibilidad de cada estado de *P. muriceus* se probó exponiendo por separado larvas, pupas y adultos ($n = 10$) a los NEPs. Cada estado de desarrollo se colocó en cajas plásticas multicelda a las cuales se les agregó tierra estéril, cuya altura fue de 2 cm. Sobre la superficie de la tierra se agregaron los diferentes estados y el recipiente se cubrió con una tapa. La concentración de JIs utilizada fue de 5.000 JIs por insecto. El número de insectos expuestos se presenta en la tabla 4.1. A su vez, se evaluó una concentración menor en larvas y adultos. El estado de pupa para esta última concentración no fue considerado por falta de material.

B. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO

1. ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA DE LA PLAGA

Durante dos temporadas del cultivo de berenjena, 2016-2017 y 2017-2018 se realizaron observaciones de las plantas de berenjena en el campo y se registró la fecha de aparición de los gorgojos adultos en el cultivo tomando como referencia los datos aportados por Espul y Magistretti (1969), que estudiaron el comportamiento de *P. muriceus* en cultivos de papa en Mendoza. La aparición de los gorgojos fue evidenciada a partir del característico daño en las hojas y por observación de los adultos alimentándose en la base del tallo (Figura 4.5).

2. LIBERACIÓN DE *H. bacteriophora* SUP EN CULTIVO DE BERENJENA

2.1. SITIO DE APLICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL CULTIVO

La liberación de *H. bacteriophora* SUP se realizó en el mismo sitio en que se recolectaron los insectos (Figura 4.1.B). El cultivo se encontraba organizado en camellones con dos hileras de plantas cada uno y fue irrigado por canales de riego. Cada camellón se dividió en parcelas, entre las cuales se designaron parcelas de menor tamaño para ser utilizadas como

zona buffer. Estos buffer fueron utilizados para separar las parcelas tratadas de los controles, teniendo en cuenta que los nematodos pueden desplazarse a través del cultivo. El arreglo del cultivo consistió en 3 camellones divididos en un total de 128 parcelas con 6 plantas cada una y 128 buffer con 4 plantas cada uno. Previo a la liberación se examinaron muestras de suelo para constatar la presencia/ausencia de NEPs nativos en el sitio de aplicación. La liberación de JIs se realizó en el mes de noviembre, ante el primer registro de aparición de los gorgojos adultos en el campo.

2.2. METODOLOGÍA DE APLICACIÓN

La liberación se realizó empleando dos metodologías de aplicación. Para los tratamientos con nematodos se realizaron por un lado, aplicaciones de suspensiones acuosas de 100.000JI/20ml por cada parcela tratada y por otro, utilizando papas inoculadas con nematodos para atraer a los gorgojos adultos considerando que forman parte de su dieta. El uso de cebos alimenticios fue reportado en varios trabajos para la captura de coleópteros (Nair et al., 2000; Sumano López et al., 2012), a su vez combinados con insecticidas. A las papas se les realizaron 6 orificios de 0,5 cm de diámetro cuya profundidad fue de 2 cm por papa. Dentro de cada orificio se colocó 1 ml de una suspensión de JIs en agua. El número total de JIs inoculados en la papa fue de 100.000. Cada orificio fue tapado con un disco de papa luego de la inoculación (Figura 4.3). Se utilizó una papa por parcela. Se espera que los gorgojos sean atraídos, se alimenten y coloquen los huevos en las papas inoculadas, facilitando la infección. Las parcelas tratadas por suspensiones o por papas inoculadas fueron asignadas al azar. Para los controles se asignaron al azar parcelas que no recibieron tratamiento y en otras se colocaron papas sin nematodos. De acuerdo con estudios realizados con otros entomopatógenos a campo (Campbell et al., 1985; Wraight y Ramos, 2005), se realizaron dos aplicaciones consecutivas, la primera en el mes de noviembre, ante el registro de aparición de los gorgojos adultos que pasaron el invierno en el campo; y la segunda a fines de diciembre, anticipando la emergencia de la primera generación de gorgojos adultos del año, que se produciría durante el mes de enero, de acuerdo con Espul y Magistretti (1969).



Figura 4.3: Papa inoculada con *Heterorhabditis bacteriophora* SUP.

2.3. REGISTRO DE DAÑO

Cada 15 días luego de la aplicación, se seleccionaron dos plantas por parcela, planta 2 y 5, y de cada planta se tomaron dos hojas. Por hoja se contabilizó el número de agujeros (daño) producidos por los gorgojos al alimentarse de la planta. La medida a comparar por tratamiento fue el daño foliar promedio calculado a partir del número de agujeros por hoja (Figura 4.4). El patrón de daño fue determinado en el laboratorio por exposición de hojas de berenjena a gorgojos adultos. Estos agujeros tienen una forma bien redondeada y es diferenciable de la producida por otros insectos herbívoros. Según Lewis et al. (1998) los efectos del tratamiento por NEPs se evidencian a los pocos días o semanas después de la aplicación. Se recolectaron además ejemplares de gorgojos adultos, los cuales se conservaron en el laboratorio para registrar mortalidad por los NEPs.

Los datos fueron analizados utilizando el software R, mediante el test de Kruskal-Wallis, y en los casos en que se detectaron diferencias significativas, se utilizó un método de comparación *pos hoc* el test de Mann-Whitney.



Figura 4.4: Daño foliar en planta de berenjena

3. PERSISTENCIA Y DISPERSIÓN DE LOS JIS APLICADOS EN BERENJENA

Para determinar la capacidad de dispersión e infectividad de los nematodos post-aplicación, se colocaron trampas cebo, con larvas de *T. molitor*. A su vez, se tomaron muestras de suelo de 500 gr de parcelas definidas al azar, así como también de los puntos de aplicación, para registrar la presencia de *H. bacteriophora* SUP. Estas muestras se colocaron en recipientes plásticos a los cuales se agregaron larvas de *Tenebrio molitor* como cebo. Las larvas que mostraron signos de infección 15 días después de la exposición se colocaron en trampas White para registrar emergencia y en su defecto se disecaron. El seguimiento se realizó durante el periodo de noviembre de 2016 a junio de 2017 con el fin de conocer la persistencia en el campo. Al año de realizar la aplicación se evaluaron muestras de suelo con el fin de corroborar el establecimiento de los nematodos.

RESULTADOS

A. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO

2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ADULTOS DE *P. muriceus* FRENTE A *H. bacteriophora*

Heterorhabditis bacteriophora SUP mató los tres estados de desarrollo de *Phyrdenus muriceus* (Tabla 4.1) y logró completar el ciclo, registrándose la emergencia de los JIs a partir de los cadáveres de los coleópteros infectados que presentaron el color rojizo característico por la presencia de bacterias del género *Photorhabdus* (Figura 4.6). Con una concentración de 5000 JIs/insecto se obtuvo el 87,85; 70 y 40% de infectividad para larvas, pupas y adultos, respectivamente, las cuales no resultaron estadísticamente diferentes. Para la concentración de 500 JIs/insectos la infectividad en larvas y adultos fue de 84 y 13,33 %, respectivamente, las cuales resultaron significativamente diferentes (p -valor: $1,2 \times 10^{-7}$).

	500			5000		
	Larvas	Pupas	Adultos	Larvas	Pupas	Adultos
Evaluados	25	-	30	17	10	10
Muertos	21	-	4	15	10	4
Infectados	21	-	4	15	7	4
Infectividad %	84 ^a	-	13,33 ^b	87,85 ^a	70 ^a	40 ^a

Tabla 4.1: Infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* SUP en larvas, pupas y adultos de *Phyrdenus muriceus*. Las letras en superíndice diferentes indican diferencias significativas.

B. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO

1. ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA DE LA PLAGA

En las dos temporadas estudiadas, la primera emergencia de adultos de *P. muriceus* se registró durante la última semana de septiembre para la temporada 2016-2017 y la primera de octubre para la temporada 2017-2018. Estos adultos, de acuerdo con Espul y Magistretti (1969) corresponderían a aquellos insectos que transcurren el invierno en diferentes estados, cuyos adultos ovipondrían originando a la primera generación de adultos del año, que se registró en la primera semana de enero en la temporada 2016-2017 y la última semana de diciembre para la temporada 2017-2018. La aparición de los adultos se detectó a partir de la observación del daño en las hojas de la planta de berenjena (Figura 4.5.A), y a su vez inspeccionando la base de los tallos donde se observó a los adultos alimentándose de la planta (Figura 4.5.B). En el tallo se observaron perforaciones utilizadas para la puesta de los huevos cuyas larvas emergerán provocando galerías en el interior de los tallos (Figura 4.5.C).

2. LIBERACIÓN DE *H. bacteriophora* SUP EN CULTIVO DE BERENJENA

Las muestras de suelo examinadas antes de la liberación resultaron negativas para NEPs, indicando que el sitio de aplicación estaba libre de nematodos entomopatógenos. El

daño foliar promedio que corresponde al número de agujeros por hoja para cada tratamiento y fecha de registro se resume en la figura (Figura 4.7).

En los registros posteriores a la primera liberación, correspondientes a los meses de noviembre, diciembre y enero, no se detectaron diferencias significativas en el daño foliar entre los distintos tratamientos. El análisis de Kruskal-Wallis arrojó los siguientes resultados para los registros de noviembre ($H = 2,3588$, $p\text{-valor} = 0,5013$ y $H = 5,2373$, $p\text{-valor} = 0,1552$), diciembre ($H = 1,974$, $p\text{-valor} = 0,5778$ y $H = 2,8268$, $p\text{-valor} = 0,4191$) y enero ($H = 3,3101$, $p\text{-valor} = 0,3462$). Por el contrario, luego de la segunda liberación (fines de diciembre), las comparaciones realizadas entre los cuatro tratamientos, resultaron significativamente diferentes para los registros del mes de febrero ($H = 17,127$, $p\text{-valor} = 0,0006654$ y $H = 12,326$, $p\text{-valor} = 0,006347$).

Mediante el test de Mann-Whitney, se detectaron diferencias significativas entre las parcelas control y con papas inoculadas, respecto a las parcelas tratadas con suspensiones de JIs y con papas sin inocular (Figura 4.7).

En correspondencia con la eclosión de la primera generación de adultos del año, se registró un incremento del daño promedio durante el mes de enero, alcanzando su máximo para el mes de febrero durante la temporada 2016-2017 (Figura 4.7).

Los adultos recolectados en el campo en el mes enero mostraron, días después de ser trasladados al laboratorio, signos de infección por *H. bacteriophora*. De un total de 10 individuos, 7 estaban infectados con el nematodo entomopatógeno, lo cual sugiere que los JIs fueron capaces de encontrar y parasitar a los gorgojos en el campo (Figura 4.6.F).



Figura 4.5: Daño producido por *Phyrdenus muriceus* en plantas de berenjena. A) Hojas de berenjena atacadas por los adultos del gorgojo; B) Dos adultos alimentándose de la planta; C) Se observan las larvas y perforaciones del tallo.

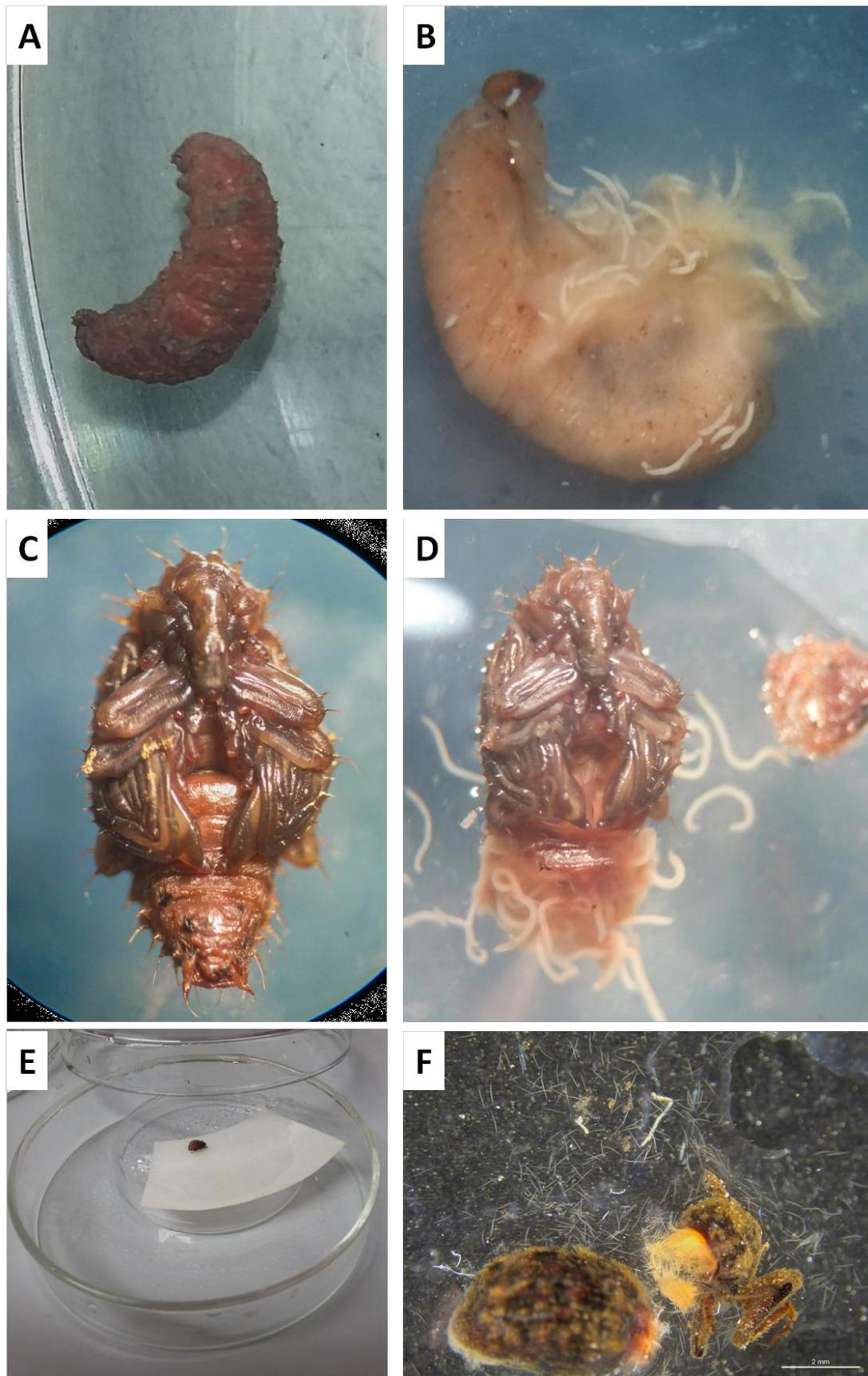


Figura 4.6: Susceptibilidad de *Phyrdenus muriceus* a *Heterorhabditis bacteriophora* SUP. A, C,E: larva, pupa y adulto mostrando la coloración rojiza característica. B,D,F: Disección de larva, pupa y adulto, mostrando la presencia de los nematodos.

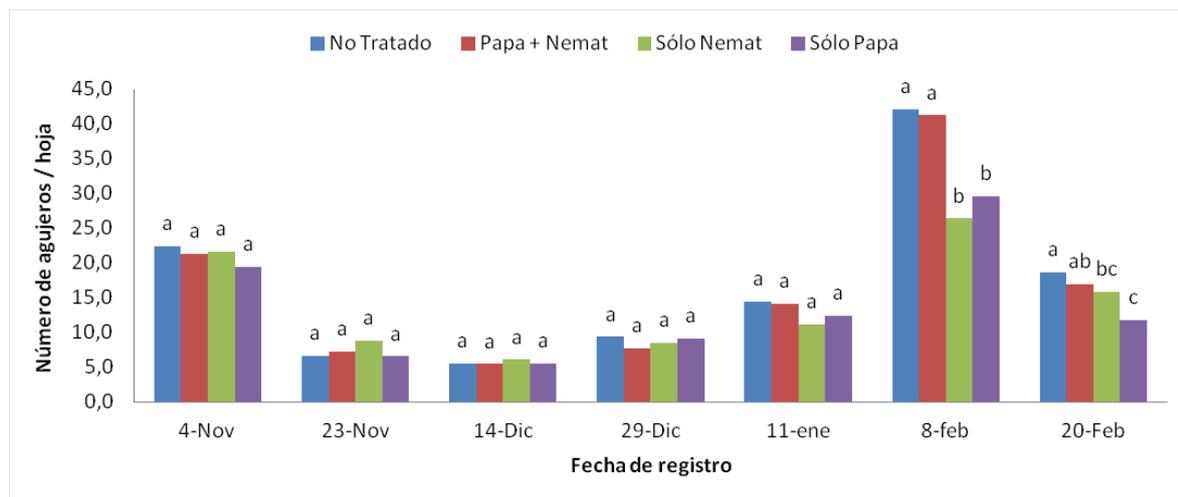


Figura 4.7: Daño foliar producido por la alimentación de adultos de *Phyrdenus muriceus* en plantas de berenjena tratadas con *Heterorhabditis bacteriophora* SUP, correspondientes a la temporada 2016-2017. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos por registro.

3. PERSISTENCIA Y DISPERSIÓN DE LOS JIS APLICADOS EN BERENJENA

Las larvas de *T. molitor* colocadas como trampas cebo en los puntos de aplicación luego del tratamiento mostraron signos de infección por *H. bacteriophora* SUP indicando así la viabilidad de los JIs aplicados (Figura 4.8). A su vez, los *T. molitor* expuestos a muestras de suelo tomadas en diferentes puntos del cultivo en los meses posteriores a la aplicación también mostraron signos de infección por *H. bacteriophora* SUP, lo cual demostró la persistencia de los nematodos durante el periodo evaluado y su dispersión a lo largo del cultivo (Figura 4.9). La figura 4.9 muestra el porcentaje de parcelas positivas, es decir, muestras de suelo que mostraron la presencia de JIs de *H. bacteriophora* SUP en el periodo de tiempo evaluado, por cada tratamiento. Las muestras positivas para los meses de noviembre y diciembre corresponden en su totalidad a parcelas tratadas. En el mes de diciembre se registró una reducción del porcentaje de parcelas positivas, registrándose la presencia y viabilidad de *H. bacteriophora* en solo el 5% de las muestras analizadas. Tras la segunda liberación de los JIs se registró un incremento en las parcelas positivas alcanzando un máximo del 40% de las muestras, porcentaje que se reduce hasta el 30% en los registros de junio de 2017. En el mes de enero el 6,25% de las muestras positivas correspondieron a parcelas con el tratamiento "solo papa", éste representa el primer registro de contaminación de los controles. En el mes de junio los JIs se detectaron en parcelas correspondientes a los controles "no tratados".

En el periodo comprendido entre los meses de noviembre-2016 y junio-2017, se registró la persistencia de los nematodos aplicados, pero a partir del mes de mayo no se registró infectividad en trampas cebo en el campo, si en muestras de suelo trasladadas al laboratorio, evidenciando posiblemente la inactividad de los JIs en esta época del año.

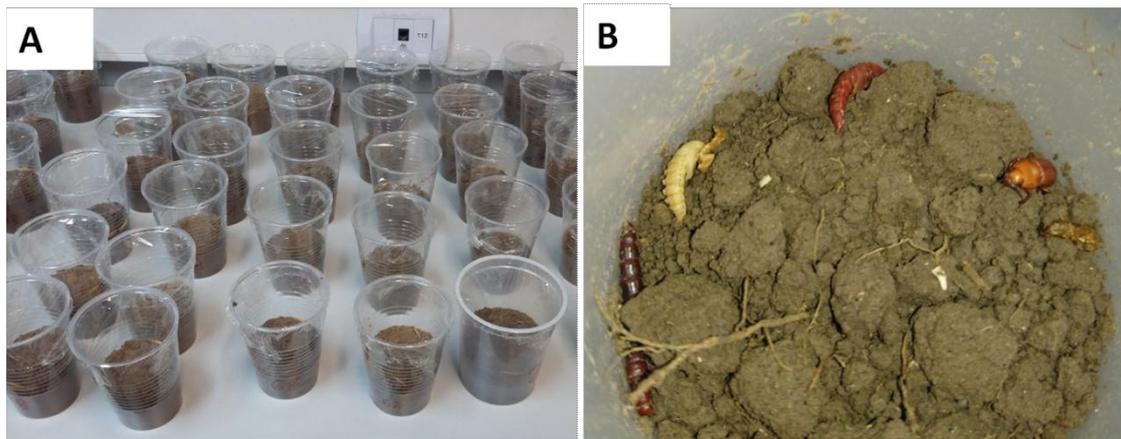


Figura 4.8: Muestras de suelo para evaluar persistencia y dispersión de *Heterorhabditis bacteriophora* SUP liberado en el campo. A) Muestras de suelo evaluadas; B) Muestras positivas.

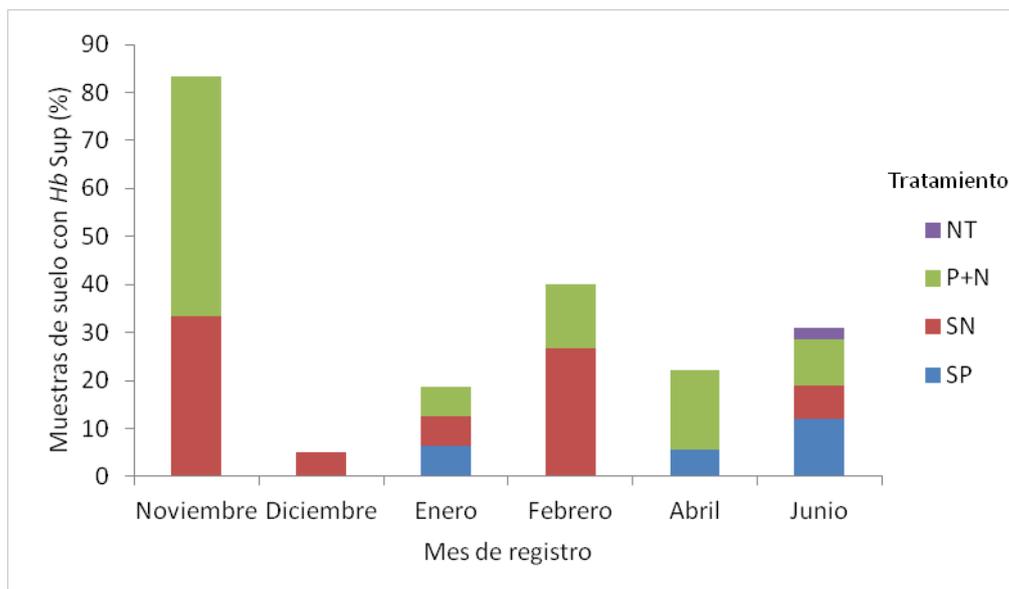


Figura 4.9: Dispersión de JIs de *H. bacteriophora* SUP aplicados en un cultivo de berenjena para el control de *P. muriceus* durante la campaña 2016-2017. Las muestras de suelo corresponden a parcelas con los distintos tratamientos. Se observa en los meses posteriores a las aplicaciones la presencia de *Hb Sup* en parcelas que no han sido tratadas con el nematodo.

DISCUSIÓN

La evaluación en condiciones de laboratorio de la susceptibilidad del coleóptero *P. muriceus* a una nueva población de *H. bacteriophora* del cinturón hortícola bonaerense, arrojó porcentajes de mortalidad en larvas, pupas y adultos de 87,85; 70 y 40%, respectivamente, con una concentración de 5000 JIs/insecto. La mayor susceptibilidad se registró en larvas mostrando a su vez un 84% de mortalidad con una concentración menor de 500 JIs/insecto, respecto a los adultos para los cuales la mortalidad fue solo del 13,33%. Esto convierte al estado larval en un hospedador adecuado para el control utilizando este aislamiento. La susceptibilidad a la infección es a menudo inversamente proporcional al tamaño o la edad del hospedador (Shapiro-Ilian y Gaugler, 2002). A su vez, la respuesta inmune, el comportamiento, la condición nutricional del hospedador y la baja movilidad son factores que limitan la susceptibilidad (Shapiro et al., 1999), esto explicaría que ésta haya sido menor en los adultos, respecto a los estados de desarrollo de larvas y pupas. Los estados de larva temprana se encuentran dentro de la base del tallo, mientras que las larvas tardías y pupas del coleóptero transcurren en el suelo (Espul y Magistretti, 1969), lo cual también favorecería el control con NEPs en estos estados. No se ha probado si los JIs son capaces de parasitar las larvas dentro de la planta, sin embargo, varios estudios han demostrado que los NEPs son efectivos en insectos que habitan en el suelo o viven en hábitats crípticos, como en el interior de galerías de plantas (García del Pino et al., 2018), por ejemplo, podrían encontrar y matar larvas dentro de las galerías en las hojas de tomate (Batalla-Carrera et al., 2010). *Steinernema carpocapsae* puede parasitar larvas y pupas de *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) debajo de la corteza de las raíces de los árboles (Ennis et al., 2010). Las aplicaciones de NEPs realizadas a campo que resultaron exitosas fueron aquellas tendientes a controlar insectos que se encuentran en la superficie del suelo o bien en forma subterránea, no así las aplicaciones foliares debido a la desecación de los JIs (Lacey y Georgis, 2012). Varios investigadores han informado sobre el control exitoso de gorgojos, por ejemplo, *Otiorhynchus sulcatus* (Curculionidae), el gorgojo de la vid negra.

El aislamiento *H. bacteriophora* SUP posee atributos favorables como agente de control sobre *P. muriceus*, demostrado a partir de la mortalidad registrada en larvas de *T. molitor* en las trampas cebo colocadas en el campo luego de su aplicación, lo cual indica un comportamiento de búsqueda activo por parte de los JIs. Son capaces de matar a los tres estados de *P. muriceus*, y completar su ciclo, lo cual podría contribuir al reciclaje en el suelo. Las evaluaciones realizadas a campo mostraron un efecto controlador de *P. muriceus*, tras la segunda aplicación, en la cual se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Estas diferencias detectadas sumadas a la colecta de adultos de *P. muriceus* infectados con *H. bacteriophora*, podría indicar que el nematodo fue responsable de la reducción de las poblaciones de *P. muriceus* y que por consiguiente tuvo un efecto en la reducción del daño foliar. A su vez las muestras de suelo tomadas de parcelas asignadas como tratamiento "solo papa" resultaron positivas para NEPs en el mes de enero, demostrando la dispersión de los JIs a estas parcelas. Esto explicaría que no se hayan detectado diferencias entre este tratamiento respecto a las parcelas tratadas con *H. bacteriophora*. El incremento del daño registrado en el mes de febrero, se corresponde con la eclosión de adultos de la primera generación del año, de acuerdo con los datos obtenidos del campo y en concordancia con Espul y Magistretti

(1969), sin embargo se registró un daño promedio significativamente menor en los tratamientos con suspensiones de JIs y controles con "solo papa" contaminados. Si bien los JIs fueron viables en las papas inoculadas en el laboratorio e infectivos en larvas de *T. molitor* testeados previo a las aplicaciones, se desconoce si los fenómenos relacionados a la aparición de contaminantes secundarios, descomposición, patogenia, depredación, o competencia pudieron haber provocado la mortalidad de los nematodos en los tratamientos con papas inoculadas, comportándose de la misma manera que los controles libres de JIs.

La eficacia de los JIs de los nematodos en el campo puede ser alterada por diversos factores bióticos y abióticos tales como la depredación, presencia de patógenos, la luz ultravioleta, temperatura y la desecación en la superficie del suelo. En este sentido, Griffin (2015), determinó una gran mortalidad en los JIs de NEPs tras su liberación en condiciones naturales, lo cual concuerda con la reducción del porcentaje de parcelas positivas registrado en el mes de diciembre. Esta reducción conduciría a una concentración de inóculo insuficiente, que sumado a la superposición de generaciones del gorgojo, podría afectar la eficacia de los NEPs. Considerando las metodologías de aplicación utilizadas para otros entomopatógenos (Campbell et al., 1985; Wraight y Ramos, 2005), dos aplicaciones consecutivas fueron realizadas con el fin de contrarrestar los factores de mortalidad que impone el ambiente. La vegetación, textura y compactación del suelo son factores importantes sobre la capacidad de movimiento de los nematodos, así como también la humedad (Griffin, 2015). Los NEPs requieren una humedad adecuada en el suelo para sobrevivir y moverse, pero demasiada humedad puede causar privación de oxígeno y restringir el movimiento. Se recomienda el riego para mantener la humedad y promover el establecimiento de nematodos en la subsuperficie del suelo (Labaude y Griffin, 2018). A partir de los datos obtenidos, se observó que dos meses después de la aplicación, los JIs se dispersaron a las parcelas asignadas como controles. Esta dispersión, podría explicarse en parte por el movimiento activo de los NEPs, y/o a través de hospedadores infectados, forosis o sistemas de irrigación lo cual favorece la dispersión a distancias mucho mayores y puede explicar su amplia distribución (Koppenhöfer, 2007). Teniendo en cuenta que la humedad del suelo es esencial para el movimiento y la supervivencia de los nematodos (Griffin, 2015), este factor pudo haber sido determinante en la eficiencia de los JIs en el campo, ya sea por afectar tanto la movilidad como la estabilidad de los mismos.

La viabilidad de los JIs aplicados fue comprobada a partir de la infectividad registrada en larvas de *T. molitor* colocadas en trampas cebo en el campo, confirmando que los JIs fueron infectivos entre los meses de noviembre a abril. A partir de mayo la infectividad fue registrada en el laboratorio. Las temperaturas más frías reducirían la actividad y la infectividad en concordancia con Grewal et al. (1994). Según el autor temperaturas entre 12 y 28 ° C se consideran favorables para la aplicación de la mayoría de los NEPs.

Si bien se obtuvieron datos sobre la dispersión y persistencia, este estudio no aportó información sobre el número total de JIs que sobrevivieron en el campo luego de la aplicación. De todos modos las condiciones fueron adecuadas para que los JIs persistan en el campo durante ocho meses lo cual pudo deberse a la infección de nuevos hospedadores en el campo y/o a la tolerancia de la larva *dauer* a la desecación y a las temperaturas extremas, como las registradas en el período donde las máximas superaron los 35 ° C (enero) y mínimas rondaron los 3 ° C (junio) según el Servicio Meteorológico Nacional.

Los resultados de este estudio indicaron que *H. bacteriophora* SUP, podría ser un potencial agente de control de *P. muriceus*, dada la susceptibilidad demostrada en condiciones de laboratorio, la reducción del daño foliar registrado en el campo en los tratamientos realizados, y la recuperación de ejemplares de *P. muriceus* infectados con el nematodo aplicado. A su vez, aportaron información sobre el comportamiento de los JIs en el campo, demostrando su persistencia por siete meses tras su aplicación, su capacidad de dispersión en un sistema de irrigación por surcos de inundación y su capacidad de búsqueda activa de los hospedadores, demostrada durante el periodo comprendido entre los meses de noviembre y abril. Otros estudios deberán realizarse para incrementar la eficacia de los nematodos en el campo con el fin de reducir las densidades de la plaga estudiada por debajo del nivel de daño económico.

BIBLIOGRAFÍA

- Achinelly, M. F., Camino, N., Eliceche, D., Salas, A., & Rusconi, M. (2017a). Status of Entomopathogenic Nematodes in Integrated Pest Management Strategies in Argentina. p 327-347. En: Abd-Elgawad, M. M., Askary, T. H., & Coupland, J. (Eds.). *Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes*. CABI. Wallingford, Reino Unido. p.348.
- Achinelly, M. F., Eliceche, D. P., Belaich, M. N., & Ghiringhelli, P. D. (2017b). Variability study of entomopathogenic nematode populations (Heterorhabditidae) from Argentina. *Brazilian Journal of Biology* 77(3), 569-579.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., & García-del-Pino, F. (2010). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *BioControl* 55(4), 523-530.
- Beirne, B. P. (1980). Biological control: benefits and opportunities. *Biological control: benefits and opportunities.*, 307-321.
- Benencia R & Souza Casadinho J. (2009). Estructura social agraria, producción y tecnología en el cinturón hortícola de la ciudad de Buenos Aires. p.39-70 En: Benencia R., Quaranta Q., & Souza Casadinho J. (coord.), Cinturón hortícola de la Ciudad de Buenos Aires. Cambios sociales y productivos. Ediciones Ciccus, Buenos Aires.
- Benencia R. (1994). La horticultura Bonaerense: lógicas productivas y cambios en el mercado de trabajo. *Desarrollo Económico* 34 (133).
- Benencia, R., & Quaranta, G. (2005). Producción, trabajo y nacionalidad: configuraciones territoriales de la producción hortícola del cinturón verde bonaerense. *Revista Interdisciplinaria de Estudios Agrarios* 23, 101-132.

-
- Camino, N., De Villalobos, C., Zanca, F., Achinelly, M., Micieli, V., Ghiringhelli, D., Belaich, M., Eliceche, D., Salas, A. & Rusconi, M. (2013). Contribución al estudio de Nemátodos y Nematomorfos parásitos de insectos. Situación actual del conocimiento. Laboratorio de entomonemátodos (CEPAVE). Berón, Plischuk y Consolo (eds.). En I Taller Argentino de Patología de Insectos y sus aplicaciones en Biocontrol. Universidad Nacional de Mar del Plata, Cap. 2 Nemátodos Entomopatógenos. 21-29. 152 pp.
 - Campbell, R. K., Anderson, T. E., Semel, M., & Roberts, D. W. (1985). Management of the Colorado potato beetle using the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *American Potato Journal* 62(1), 29-37.
 - Demin, P. E. (2014). Aportes para el mejoramiento del manejo de los sistemas de riego: métodos de riego: fundamentos, usos y adaptaciones. INTA 1a. ed. San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca.
 - Ehlers, R. U., & Hokkanen, H. M. T. (1996). Insect biocontrol with non-endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp): Conclusions and recommendations of a combined OECD and COST Workshop on Scientific and Regulatory Policy Issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 295–302.
 - Eldestein y Walter, 2014/15, cartilla digital INTA.
 - Ennis, D.E., Dillon, A.B., & Griffin, C.T. (2010). Simulated roots and host feeding enhance infection of subterranean insects by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, 140–143.
 - Espul, J. C., & Magistretti, G. (1969). Bioecología del gorgojo del tomate *Phyrdenus muriceus* (Germ.) y su control en la provincia de Mendoza. *Revista de investigación agropecuaria* 6(5), 95-117.
 - Fernando Garcia-del-Pino, Ana Morton & David Shapiro-Ilan (2018). Nematodes as Biological Control Agents of Tomato Pests. (Eds.). Nematodes as Biological Control Agents of Tomato Pests Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato. Academic Press. 353pp.
 - Gaugler, R., Lewis, E., & Stuart, R. J. (1997). Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia* 109, 483–489.
 - Grewal, P. S., Selvan, S. E. N., & Gaugler, R. (1994). Nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology* 19(4), 245-253. Griffin, C. T. (2015). Behaviour and population dynamics of entomopathogenic nematodes following application. p. 57-95. In: Campos-Herrera, Raquel (Ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests* . Springer. Cham. pp.531.

-
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, N. (2004). Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology* 27(4), 181-202.
 - Koppenhöfer, A. M. (2007). Nematodes. p. 249-264. In: Lacey, L. A., & Kaya, H. K. (Eds.). *Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. Springer, Dordrecht.
 - Labaude, S., & Griffin, C. (2018). Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. *Insects* 9(2), 72.
 - Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology* 44(2), 218.
 - Lewis, E. E., Campbell, J. F., & Gaugler, R. (1998). A conservation approach to using entomopathogenic nematodes in turf and landscapes. p. 235-254. In: Barbosa P. (Ed.). *Conservation biological control*. 396 pp.
 - Mangione, J., & Sánchez, M. (1999). Cultivo y manejo poscosecha de berenjena. Área de Inspección de frutas y hortalizas. Laboratorio de Fitopatología. Mercado Central de Buenos Aires. <http://www.mercadocentral.com.ar/site2001/tecnicas/berenjena.zip>
 - MMA-ME (2005). Censo Florihortícola de Buenos Aires. Ministerio de Asuntos Agrarios y Ministerio de Economía. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires. 115 p.
 - Nair, S. S., Abraham, V. A., & Nair, C. R. (2000). Efficiency of different food baits in combination with pheromone lures in trapping adults of red weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Curculionidae). *Pestology* 24(6), 3-5.
 - Novo, R. J., Viglianco, A., & Vaudagna, E. (2002). Efectos de insecticidas sobre el gorgojo de la papa, *Phyrdenus muriceus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae). *Agriscientia* 19.
 - Rusconi, J. M. (2017). *Diversidad de entomonemátodos asociados a insectos ortópteros plaga del suelo (Gryllidae y Gryllotalpidae) en el Gran La Plata* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).
 - Sękara, A., Cebula, S., & Kunicki, E. (2007). Cultivated eggplants—origin, breeding objectives and genetic resources, a review. *Folia Horticulturae* 19(1), 97-114.
 - Shapiro, D. I., & Lewis, E. E. (1999). Comparison of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Environmental Entomology* 28(5), 907-911.
 - Shapiro-Ilan, D. I., & Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28(3), 137-146.

-
- Stock, S. P. (1995). Natural populations of entomopathogenic nematodes in the Pampean region of Argentina. *Nematropica* 25(2), 143-148.
 - Sumano López, D., Sánchez Soto, S., Romero Nápoles, J., & Sol Sánchez, Á. (2012). Eficacia de captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae) con diferentes diseños de trampas en Tabasco, México. *Fitosanidad* 16(1).
 - Van Lenteren, J. C. (1986). Evaluation, mass production, quality control and release of entomophagous insects. *Fortschritte der Zoologie (Germany, FR)*.
 - Van Lenteren, J. C. (1986). Evaluation, mass production, quality control and release of entomophagous insects. *Biological plant and health protection* 32, 31-56.
 - Van Lenteren, J. C., Babendreier, D., Bigler, F., Burgio, G., Hokkanen, H. M. T., Kuske, S. & Tommasini, M. G. (2003). Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *BioControl* 48(1), 3-38.
 - Wraight, S. P., & Ramos, M. E. (2005). Synergistic interaction between *Beauveria bassiana*- and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 90(3), 139-150

CONCLUSIONES GENERALES

- Los resultados del análisis morfológico y molecular permitieron determinar un nuevo aislado de *Heterorhabditis bacteriophora* (SUP) el cual representa un nuevo registro para el cinturón hortícola platense y el primero para la localidad de Melchor Romero, asociado a un cultivo de tomate, el principal cultivo en orden de importancia para el CHP.
- *Photorhabdus luminescens* fue la especie de bacteria asociada a *H. bacteriophora* SUP. Sin embargo los resultados contrastantes de las pruebas bioquímicas y análisis moleculares no permitieron con seguridad la determinación de la subespecie. Podría constituir una nueva subespecie o una variación a nivel regional lo cual debería ser testeado con otros aislamientos a través de las pruebas bioquímicas.
- La susceptibilidad demostrada en larvas de *T. molitor* a *Hb* SUP, hace viable el uso de estos insectos como insectos de cría para la producción in vivo de *Heterorhabditis bacteriophora* siendo una alternativa accesible y económica. El rango de infectividad obtenido fue de 68,9 a 100%.
- Varios factores afectaron la infectividad y la producción de JIs durante la producción in vivo de *Hb* Sup:
 - La concentración de JIs afectó la infectividad, siendo ésta mayor a mayores concentraciones. La mayor concentración evaluada de 400JI/insecto produjo un 100% de infectividad, y registró a su vez los menores tiempos letales.
 - La concentración de JIs también afectó la producción, resultando esta mayor a bajas concentraciones del inóculo. Concentraciones de 25 y 50 juveniles por insecto serían las más adecuadas para la cría in vivo de la población SUP para maximizar el rendimiento durante la producción en el laboratorio. Obteniéndose una producción de más de 100000 juveniles por insecto.
 - La temperatura de exposición tuvo un efecto sobre la infectividad, resultando esta mayor a 25°C respecto a las restantes temperaturas evaluadas, siendo nula a 4°C y 11°C. El rango de temperatura para matar a *T. molitor* podría establecerse entre 16 y 25°C. Resultando a su vez menores los tiempos letales conforme al aumento de la temperatura.
 - La superficie de exposición afectó la infectividad de este aislamiento, resultando esta mayor a superficies intermedias (Capsulas de 10 cm), registrándose a su vez la mayor producción de JIs, y menores tiempos letales.
 - La temperatura de almacenamiento también afectó la infectividad de *Hb* SUP. Una reducción significativa de la infectividad se registró en JIs almacenados a 4°C durante 120 días sin pasar por un hospedador.
- Varios factores afectaron supervivencia de los JIs de *Hb* Sup durante el almacenamiento en el laboratorio:
 - La temperatura afectó la supervivencia media de los JIs de *H. bacteriophora* SUP almacenados, resultando ésta menor conforme aumenta la temperatura. La supervivencia media semanal fue mayor a las temperaturas de 4°C y 16°C.

- La densidad de almacenamiento también afectó la supervivencia media, resultando esta menor a altas densidades (7500 JIs/ml).
- Se establecieron así como condiciones óptimas para la producción *in vivo* de este aislado: inocular al insecto de cría con bajas concentraciones de JIs para maximizar la producción, almacenar las suspensiones acuosas a 16°C y en concentraciones que no superen la densidad de 2500JIs/ml.
- En condiciones de laboratorio: el aislado *Heterorhabditis bacteriophora* SUP resultó ser infectivo sobre *L. insularis*, registrándose una susceptibilidad decreciente en larvas, pupas y adultos. Completó el ciclo en todos los estados de desarrollo de *L. insularis*, lo cual mejoraría el establecimiento y la propagación de este aislamiento tras una aplicación en el campo. Larvas y pupas serían un blanco adecuado para el control con nematodos entomopatógenos.
- En base a las pruebas de laboratorio *Heterorhabditis bacteriophora* SUP podría ser un potencial agente de control de *L. insularis*, aunque los ensayos a campo no resultaron efectivos.
- En condiciones de campo, los JIs mostraron un amplio poder de dispersión distribuyéndose a lo largo de todos los camellones de frutilla. Esta dispersión fue mayor en el cultivo de frutillas respecto al de berenjenas, posiblemente afectada por el sistema de riego utilizado.
- *Heterorhabditis bacteriophora* SUP resultó infectivo sobre los estados de desarrollo de *Phyrdenus muriceus*, coleóptero plaga de las solanáceas. La infectividad fue mayor sobre larvas y pupas, estados que por su hábito de permanecer en el suelo representarían el blanco principal para el control utilizando nematodos. Logró completar su ciclo en los tres estados, lo cual aseguraría la persistencia en el ambiente.
- En condiciones de campo mostró efectividad sobre el control de los gorgojos. Mostrando una reducción del daño foliar tras una segunda aplicación de JIs. La recuperación de adultos de *P. muriceus* infectados en el campo, permitió confirmar que los JIs aplicados lograron encontrar y matar a la plaga.
- Aplicaciones sucesivas son necesarias para garantizar una concentración del inóculo suficiente y mejorar la efectividad en el campo, así como también mayores concentraciones de inóculo.

CONCLUSIÓN FINAL

H. bacteriophora SUP representa el primer registro de un nematodo entomopatógeno asociado a cultivos de tomate en el cinturón hortícola platense, sumándose a la lista de los enemigos naturales presentes en este cultivo. Los resultados demostraron su potencialidad como biocontrolador de plagas agrícolas, resultando infectivos sobre *Phyrdenus muriceus* y *Lobiopa insularis*, dos coleópteros plaga de importancia económica para la región. La factibilidad de producción en el laboratorio, además de la capacidad de infección, establecimiento y dispersión en dos agroecosistemas, con cultivos y plagas diferentes demuestra su potencial utilización como agente de control en programas de Manejo Integrado de Plagas. A su vez los parámetros biológicos indican que es una población adaptada a las

condiciones locales, lo cual resulta ventajoso para su utilización en programas de control biológico en la región.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Las futuras investigaciones incluyen la continuación del trabajo de campo, ajustando el diseño experimental para aumentar la eficacia en el control de poblaciones del gorgojo de la berenjena *Phyrdenus murisceus*. Así también se propone evaluar su potencialidad como agente de control en otras plagas de la agricultura.

Se proyecta desarrollar la producción *in vitro* del aislado y su escalamiento en medios sólidos, líquidos y posteriormente en bioreactores, para alcanzar una producción masiva de juveniles infectivos. El desarrollo y puesta a punto de la producción *in vitro* para este aislado es fundamental para su utilización como bioinsumo. A su vez, altas concentraciones de JIs son necesarias para los estudios a campo, debido a la multiplicidad de factores que podrían afectar la efectividad y/o supervivencia, por lo cual este proyecto forma parte del plan de beca postdoctoral, cuyas actividades se realizarán juntamente con el CINDEFI (Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales) cuyas actividades incluyen: la evaluación de la eficacia de medios de cultivo sintéticos para la producción masiva del complejo nematodo-bacteria, la utilización de biorreactores para la producción *in vitro* en sistemas escalables y la determinación de los parámetros para el control de calidad de la producción masiva *in vitro*: patogenicidad, virulencia, tiempo de desarrollo y densidad del inóculo.