

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

Tabla 4.7. Correlación de las variables consideradas en el análisis de textura con los dos ejes principales del ACP. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado. ARG: arena gruesa, ARF: arean fina, LIM: limo, ARC: arcilla.

	AXE 1	AXE 2
ARG **	-0.2841 0.0807 *	0.9501 0.9026 *
ARF **	-0.9804 0.9613 *	-0.1561 0.0244 *
LIMO **	0.9461 0.8951 *	-0.1101 0.0121 *
ARC **	0.8688 0.7549 *	0.2543 0.0647 *

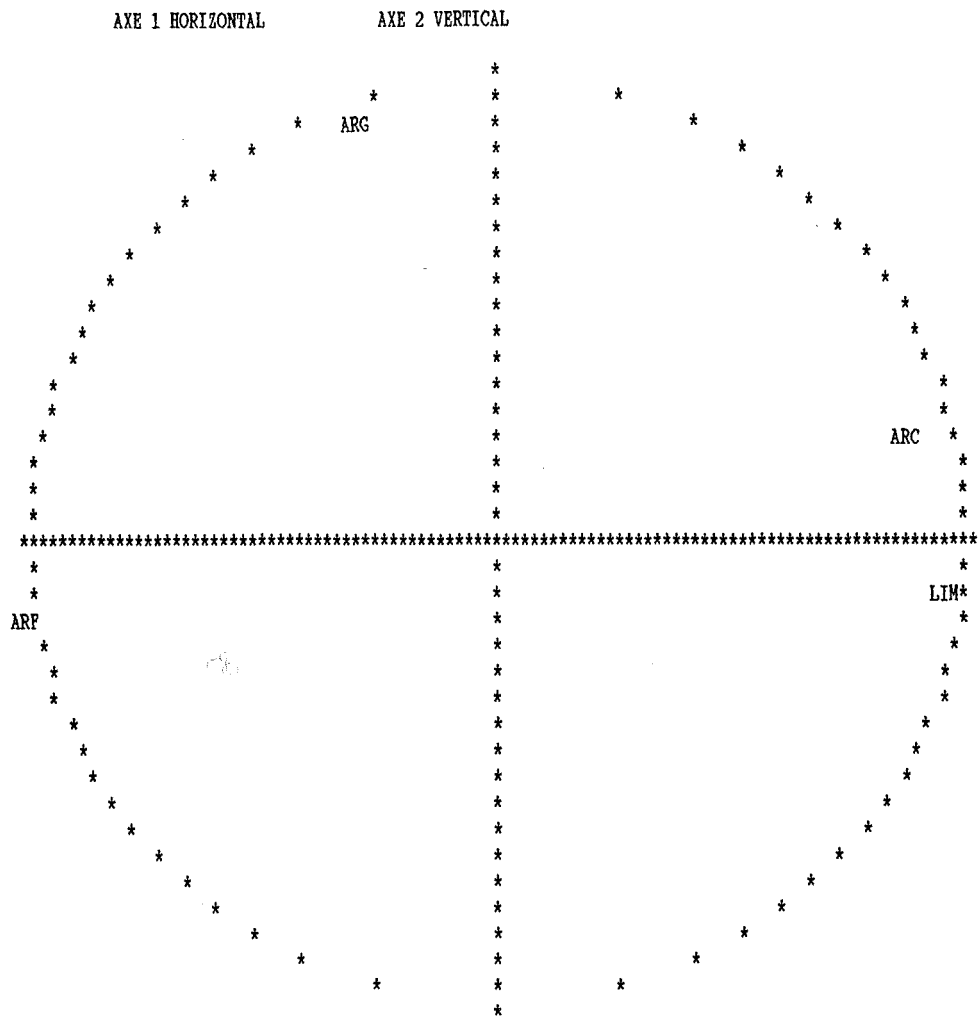


Figura 4.7. Representación de las variables consideradas en el análisis de textura de los suelos del Baix Llobregat sobre los dos ejes principales. ARG: arena gruesa, ARF: arean fina, LIM: limo, ARC: arcilla.

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

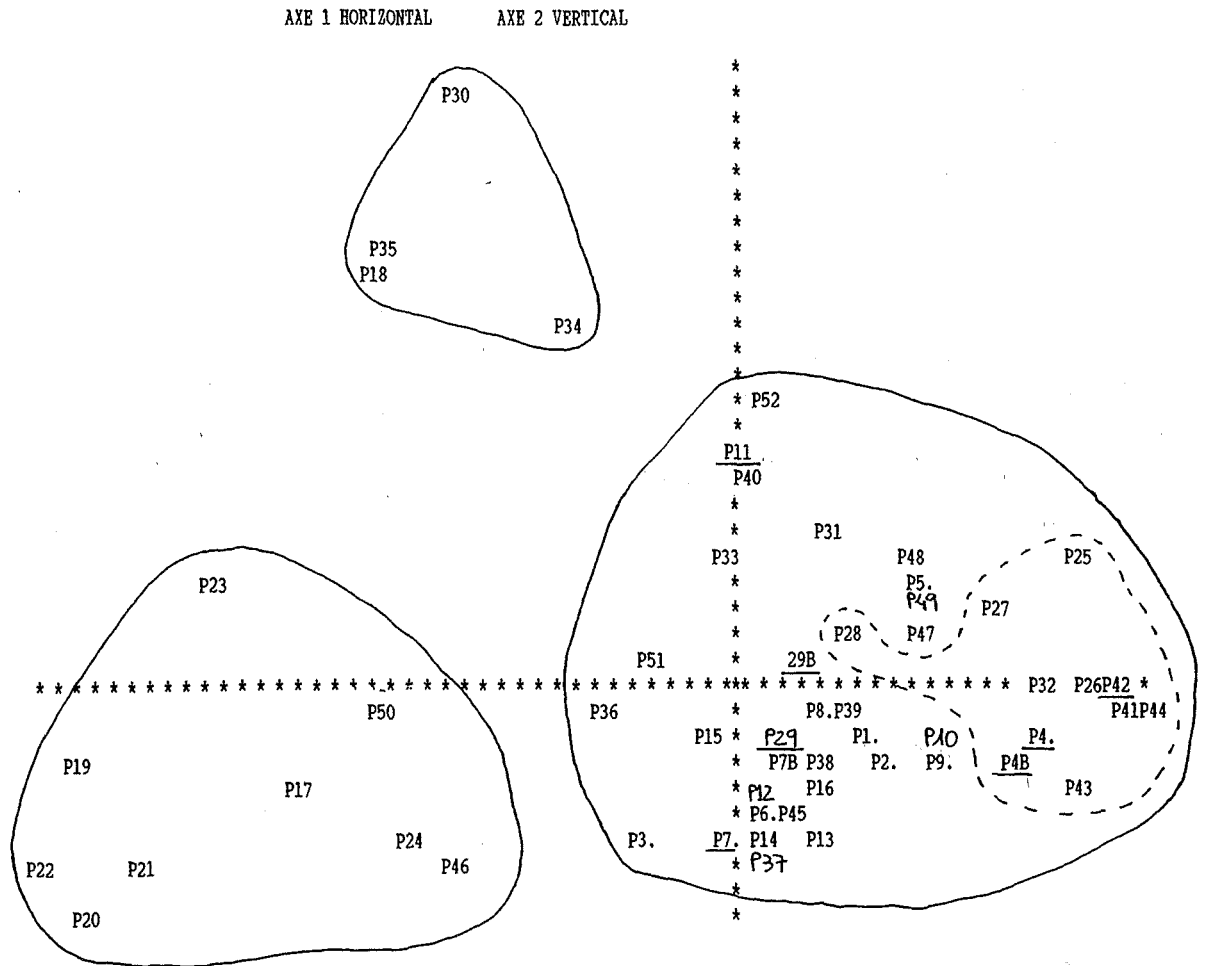


Figura 4.8. Representación de las muestras de suelos del Baix Llobregat sobre los dos primeros ejes principales según sus características granulométricas..

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

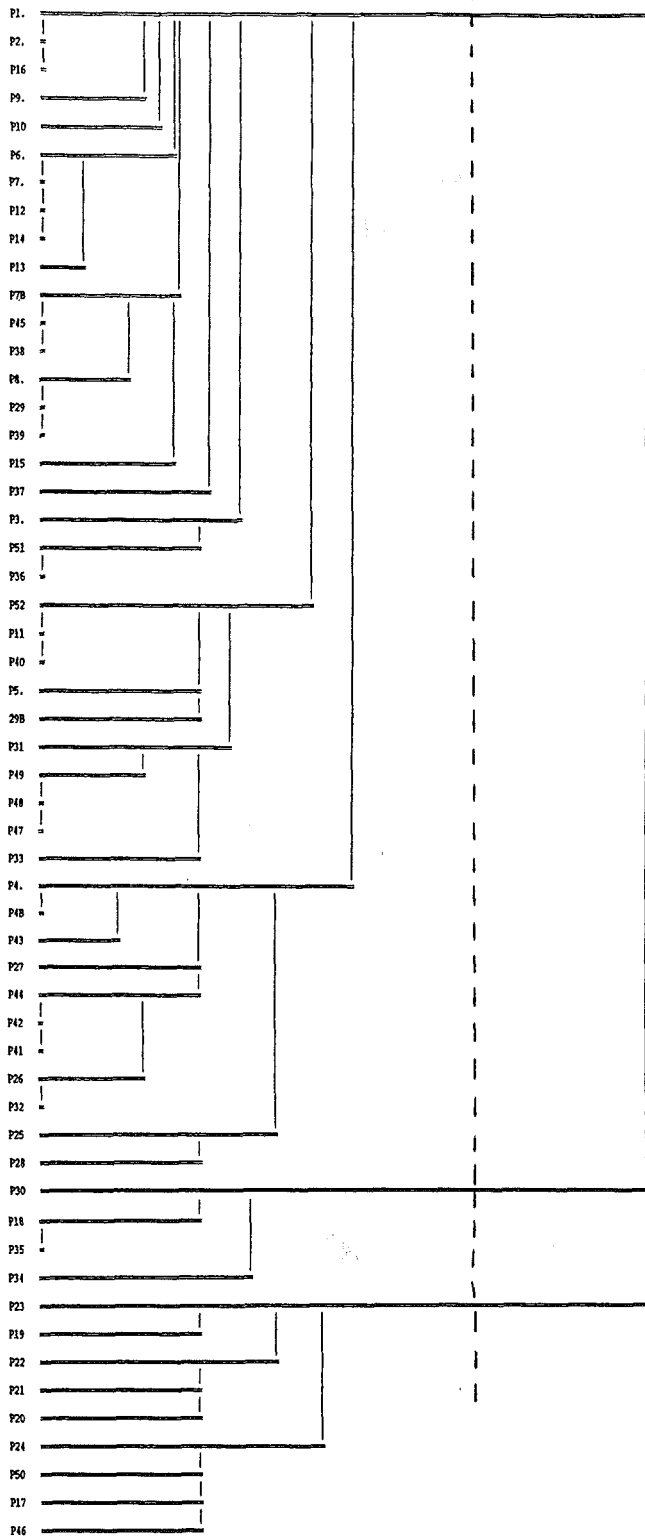


Figura 4.9. Dendrograma de las muestras de suelo del Baix Llobregat, clasificados según sus características granulométricas. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendrograma para separar las clases.

- Suelos del Maresme.

La representación gráfica de las variables del ACP de la textura de los suelos del Maresme se puede observar en la fig. 4.10. La variabilidad explicada por los dos primeros ejes principales es del 93,6% de la variabilidad total. Las correlaciones de las variables con los ejes principales se muestran en la tabla. 4.8.

El primer eje explica el 62,3% de la variabilidad y separa por su parte negativa los suelos con un mayor contenido en limo y arcilla mientras que por su parte positiva se agrupan los suelos con un mayor contenido en arena, principalmente arena gruesa. El segundo eje explica el 31,3% de la variabilidad y agrupa en su parte positiva los suelos con un mayor contenido de arena fina. La representación gráfica de los suelos de este análisis nos da una dispersión continua de puntos de difícil interpretación (fig. 4.11). El análisis de clasificación automática (cluster) separa cinco grupos de suelos en los cuales existe una mayor homogeneidad interna (fig. 4.12). En primer lugar se observa un gran grupo central de suelos franco arenosos rodeado por su derecha de tres pequeños grupos de suelos con una tendencia a un mayor contenido en arena fina en la parte superior del gráfico y arena gruesa en la parte inferior. A la izquierda del gran grupo central se separa un pequeño grupo de suelos francos con un mayor contenido de limo o arcilla.

Los suelos con presencia de nematodos se encuentran tanto en el grupo de suelos francos con un mayor contenido de arena (M9) como en el grupo de suelos francos con un mayor contenido de arcilla y limo (M44).

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

Tabla 4.8. Correlación de las variables consideradas en el análisis de textura de los suelos del Maresme con los dos ejes principales del ACP. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado. ARG: arena gruesa, ARF: arenan fina, LIM: limo, ARC: arcilla.

	AXE 1	AXE 2
ARG **	0.8730 0.7622 *	-0.4877 0.2379 *
ARF **	0.1858 0.0345 *	0.9808 0.9619 *
LIMO **	-0.9361 0.8763 *	-0.0472 0.0022 *
ARC **	-0.9060 0.8208 *	-0.2201 0.0485 *

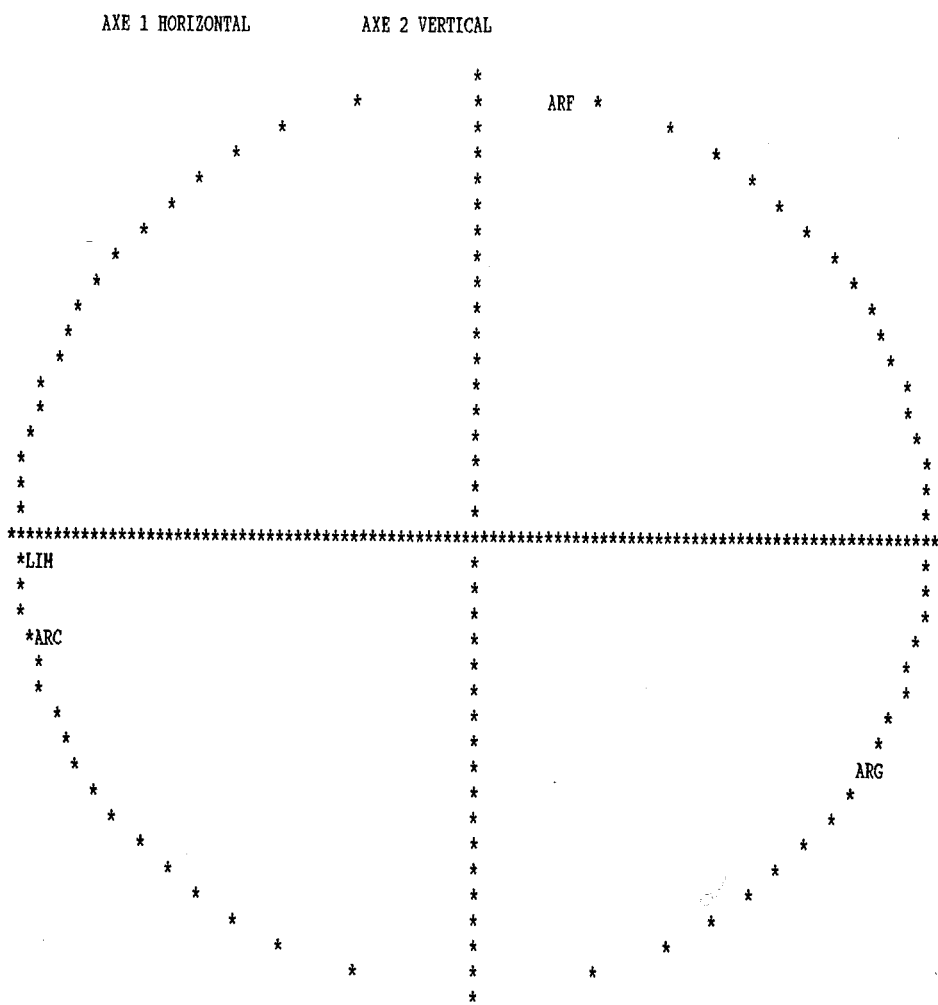


Figura 4.10. Representación de las variables consideradas en el análisis de textura de los suelos del Maresme sobre los dos ejes principales. ARG: arena gruesa, ARF: arenan fina, LIM: limo, ARC: arcilla.

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

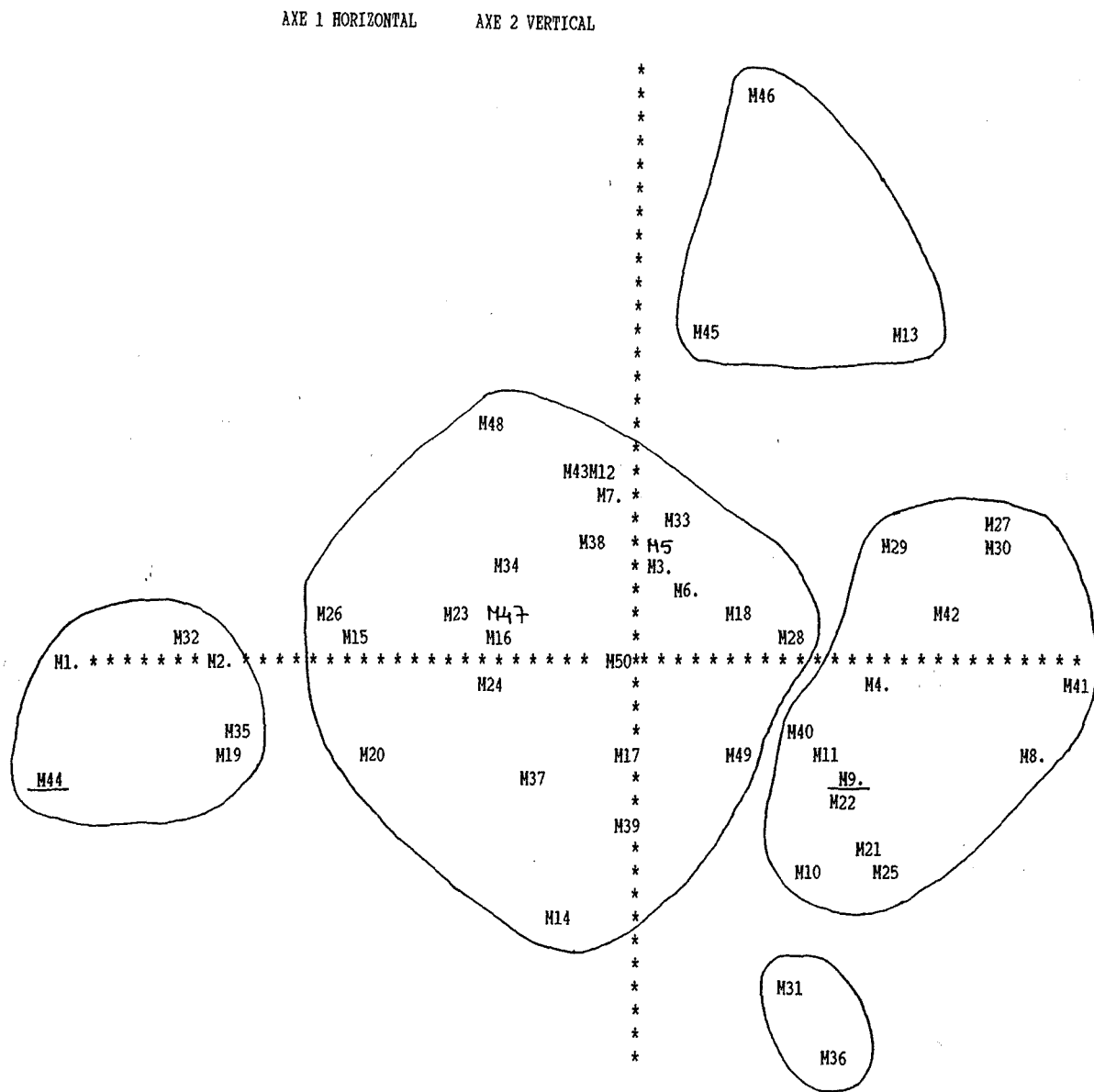


Figura 4.11. Representación de las muestras de suelos del Maresme sobre los dos primeros ejes principales según sus características granulométricas..

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

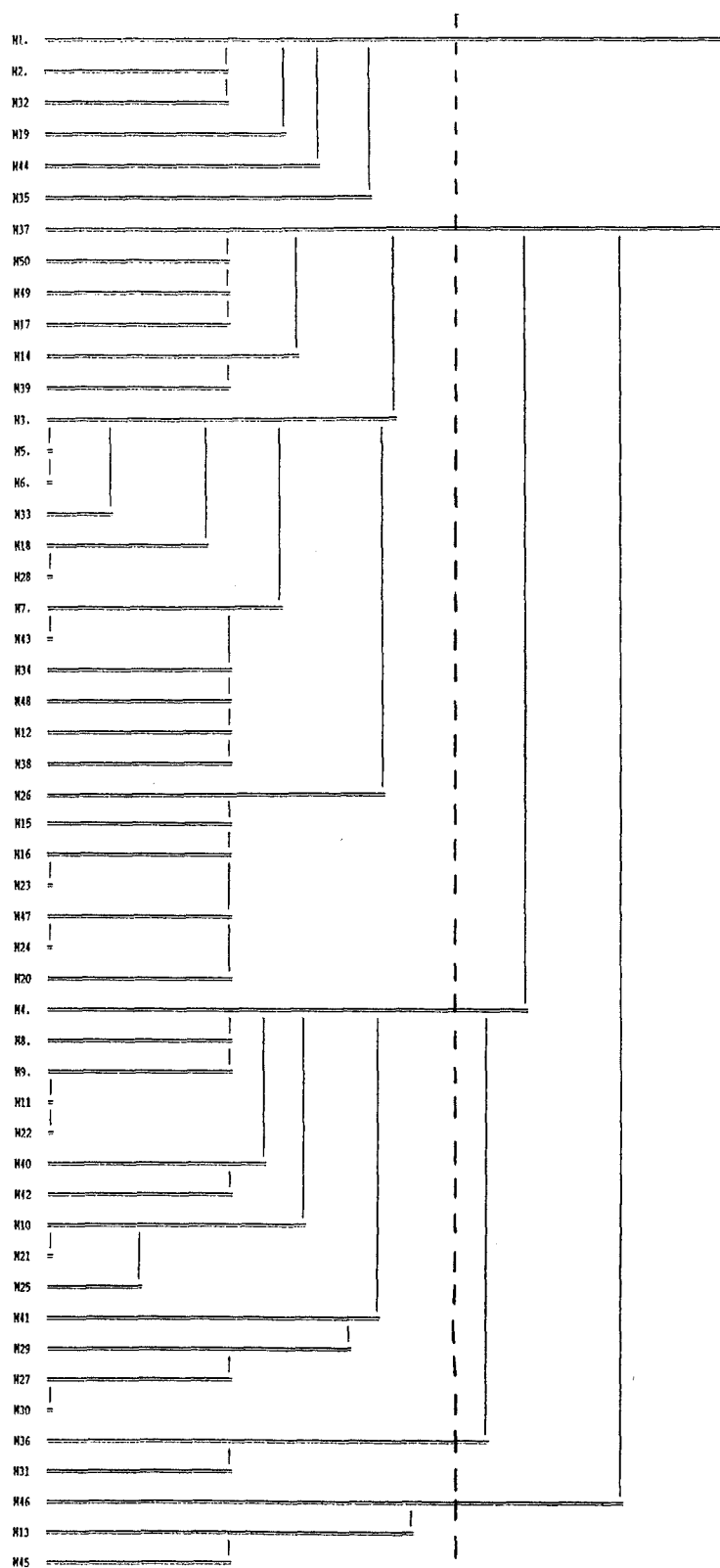


Figura 4.12. Dendrograma de las muestras de suelo del Maresme, clasificados según sus características granulométricas. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendrograma para separar las clases.

B.- Influencia de las características organoquímicas del suelo.

Los resultados de los análisis de fertilidad de las muestras de todos los suelos del Baix Llobregat y del Maresme en que han aparecido nematodos entomopatógenos, conjuntamente con la media de los suelos en que no han aparecido nematodos, se muestran en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Características organoquímicas de los suelos hortícolas del Baix Llobregat y del Maresme.

	C.E. (dS/m)	pH	M.O. (% p/p)	FOSFORO (mg./kg.)	POTASIO (mg./kg.)
SUELOS CON NEMATODOS					
P4	0,52	8,01	3,84	147,7	907,51
P4B	0,42	8,1	3,41	106,12	725,45
P7	0,6	8,16	2,43	50,97	624,14
P11	0,51	7,98	4,58	137,94	864,65
P29	0,4	7,99	3,16	49,49	299,46
P29B	0,77	7,51	4,1	101,34	487,37
P42	0,77	8,16	3,25	55,72	386,57
MA9	0,12	8,25	0,75	29,57	88,64
M44	0,28	7,53	3,58	81,53	476,63
MEDIA	0,49	7,96	3,23	84,49	540,05
± SD	±0,21	±0,27	±1,11	±41,54	±267,82
SUELOS SIN NEMATODOS					
MEDIA	0,57	7,72	2,98	102,19	317,60
± SD	±0,48	±0,60	±1,26	±55,08	±217,30

La salinidad media de los suelos en que han aparecido nematodos, es menor que la que presentan los suelos sin nematodos, sin embargo esta diferencia no puede considerarse estadísticamente significativa (Test Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$). El pH de los suelos con presencia de nematodos (7,9) es muy similar al encontrado en los suelos sin nematodos (7,7) (Test Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$). La cantidad media de materia

orgánica oxidable en los suelos con nematodos (3,23% p/p) es superior a la encontrada en los suelos sin nematodos (2,98% p/p) aunque esta diferencia tampoco rebasa los límites de la significación estadística (T-TESTS, $p > 0,05$).

El fósforo asimilable encontrado en los suelos con nematodos es inferior, aunque no significativamente (T-TEST, $p > 0,05$), al encontrado en los suelos sin nematodos. El potasio asimilable que se ha determinado en los suelos con nematodos es significativamente mayor (T-TEST, $p = 0,005$) al analizado en los suelos sin nematodos (Tabla 4.9).

Para realizar el **análisis multivariante** de las características organoquímicas, se han analizado independientemente las dos zonas hortícolas estudiadas.

En la realización del Análisis de Componentes Principales de las características organoquímicas obtenidas en los análisis de fertilidad, para determinar la tipología de los grupos de suelos que presentan nematodos entomopatógenos, hemos eliminado el fósforo y el potasio. Estos factores aportan una enorme variabilidad en cuanto a la composición química de los suelos analizados, debido a las grandes fluctuaciones que pueden presentar por la intervención del agricultor mediante el abonado de los campos. Además estos dos factores no presentan ningún efecto negativo en la capacidad de movilidad, infectabilidad o persistencia de los nematodos entomopatógenos en el campo (Rao et al. 1975).

- Suelos del Baix Llobregat.

La representación de las variables consideradas (conductividad eléctrica (salinidad), materia orgánica y pH) en el ACP para tipificar los suelos del Baix Llobregat por las características que se desprenden de los análisis de fertilidad se muestran en la figura 4.13. La variabilidad explicada por los dos primeros ejes principales es del 82,3% de la variabilidad total de las muestras. En la tabla 4.10 se muestran las correlaciones entre las variables y los ejes principales.

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

El primer eje explica el 54,4% de la variabilidad y separa por su parte positiva aquellos suelos con valores altos de pH y por su parte negativa agrupa los suelos con una mayor salinidad y materia orgánica. El segundo eje explica el 27,9% de la variabilidad y separa en su parte positiva los suelos con mayor cantidad de materia orgánica y en su parte negativa los suelos con mayor salinidad. La representación gráfica de los suelos sobre estos ejes (fig. 4.14) y el posterior análisis de clasificación automática (cluster) (fig. 4.15) separa cuatro grupos de suelos en donde la variabilidad intragrupos es menor que la variabilidad intergrupos. Un gran grupo central con unas características de C.E., M.O. y pH intermedias, donde se encuentran incluidos los suelos que contienen nematodos (subrayados), y tres pequeños grupos a su izquierda que presentan una mayor salinidad, una mayor cantidad de materia orgánica o un menor pH.

Tabla 4.10. Correlación de las variables del análisis organoquímico con los dos ejes principales considerados en el ACP de los suelos del Baix Llobregat. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado. CE: conductividad eléctrica, pH, MO: materia orgánica.

	AXE 1	AXE 2
CE **	-0.6927 0.4799 *	-0.6299 0.3968 *
pH **	0.8330 0.6939 *	0.0140 0.0002 *
MO **	-0.6760 0.4570 *	0.6628 0.4393 *

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

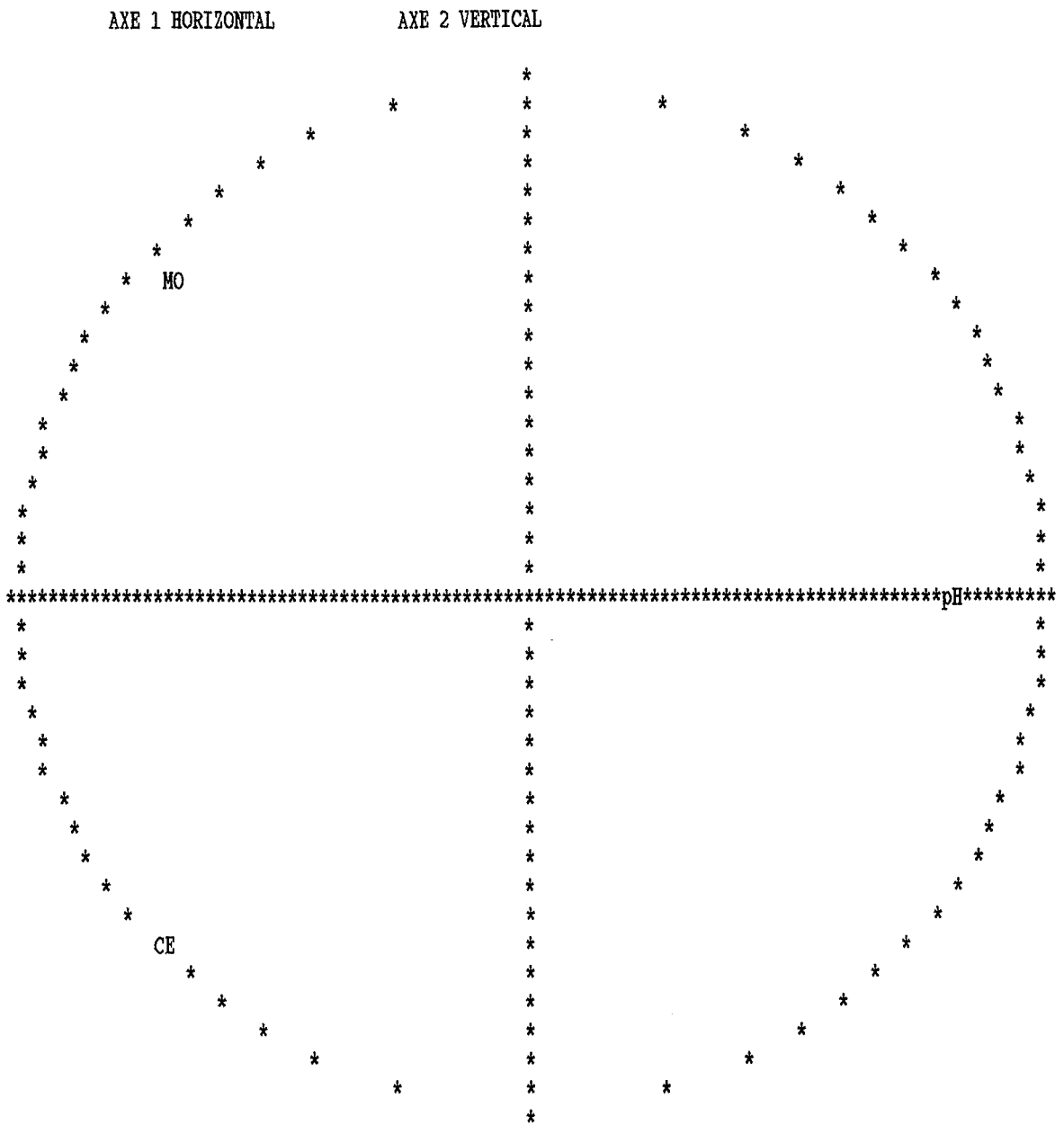


Figura 4.13. Representación de las variables consideradas en el análisis de fertilidad de los suelos del Baix Llobregat sobre los dos ejes principales. CE: conductividad eléctrica, pH, MO: materia orgánica.

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

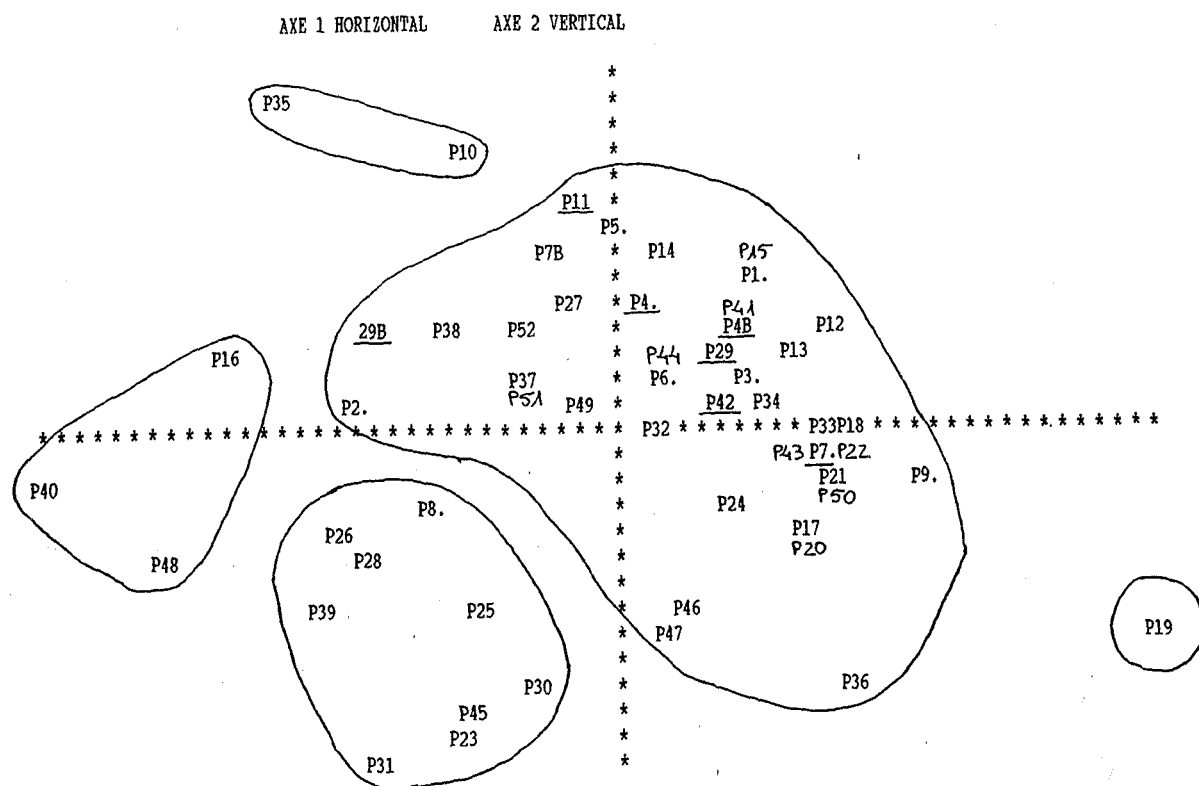


Figura 4.14. Representación de las muestras de suelos del Baix Llobregat sobre los dos primeros ejes principales según sus características organoquímicas..

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

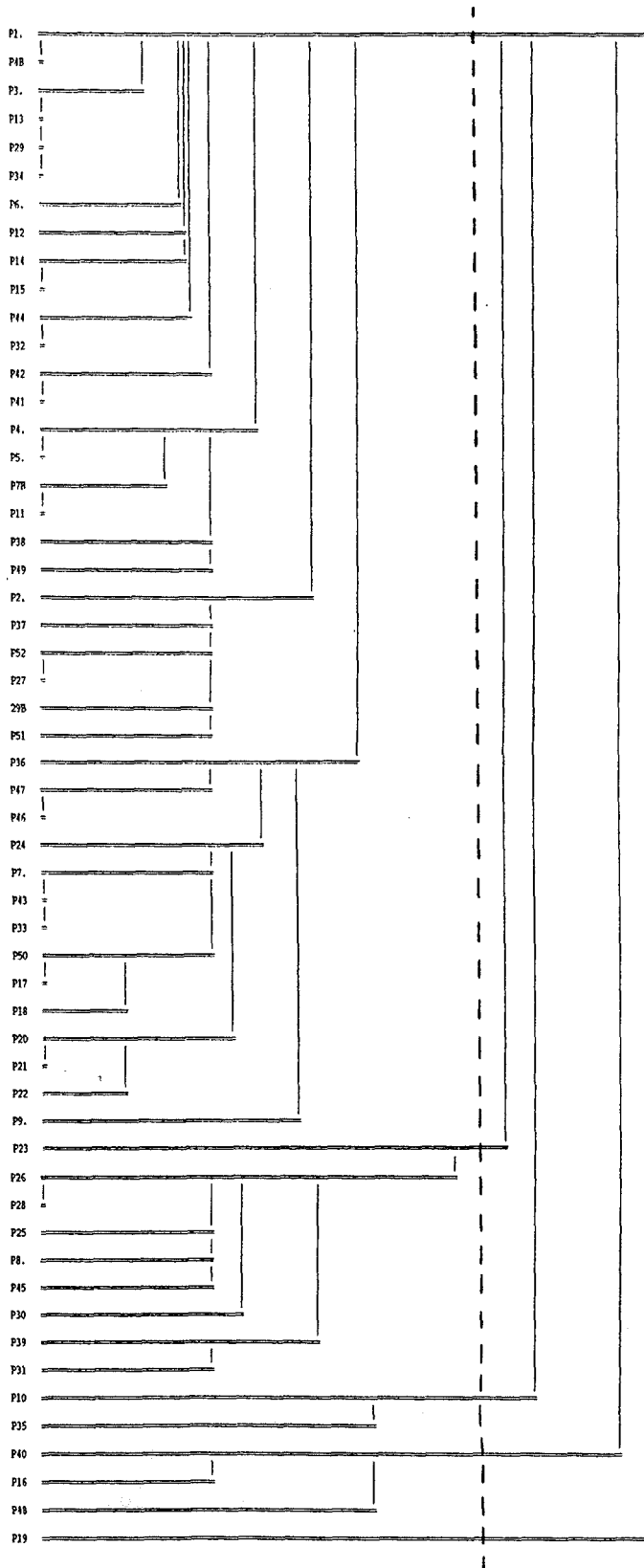


Figura 4.15. Dendograma de las muestras de suelo del Baix Llobregat, clasificados según sus características organoquímicas. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendograma para separar las clases.

- Suelos del Maresme.

La representación de las variables del ACP de los suelos del Maresme para los factores de conductividad eléctrica, salinidad y pH se muestra en la fig. 4.16. La variabilidad que explican los dos primeros ejes principales es del 87,5% de la variabilidad total. Las correlaciones entre las variables y los ejes principales se muestran en la tabla 4.11. El primer eje explica el 66% de la variabilidad y separa por su parte positiva los suelos que presentan una mayor salinidad y materia orgánica y por su parte negativa aquellos suelos con un elevado valor de pH. El segundo eje explica el 21,5% de la variabilidad y también tiende a separar por su parte positiva los suelos con un mayor pH. La representación gráfica de los suelos (fig. 4.17) muestra una dispersión de puntos de difícil interpretación. El análisis cluster (fig. 4.18) separa de forma difusa cuatro categorías de suelos. Únicamente cabe señalar que los suelos con presencia de nematodos se encuentran en el grupo central de la representación gráfica, quedando tipificado por unos valores intermedios de salinidad y materia orgánica y una tendencia hacia los valores altos de pH.

Tabla 4.11. Correlación de las variables del análisis organoquímico con los dos ejes principales considerados en el ACP de los suelos del Maresme. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado. CE: conductividad eléctrica, pH, MO: materia orgánica.

	AXE 1	AXE 2
CE **	0.8613	0.7418 *
pH **	-0.7267	0.5281 *
MO **	0.8430	0.7106 *

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

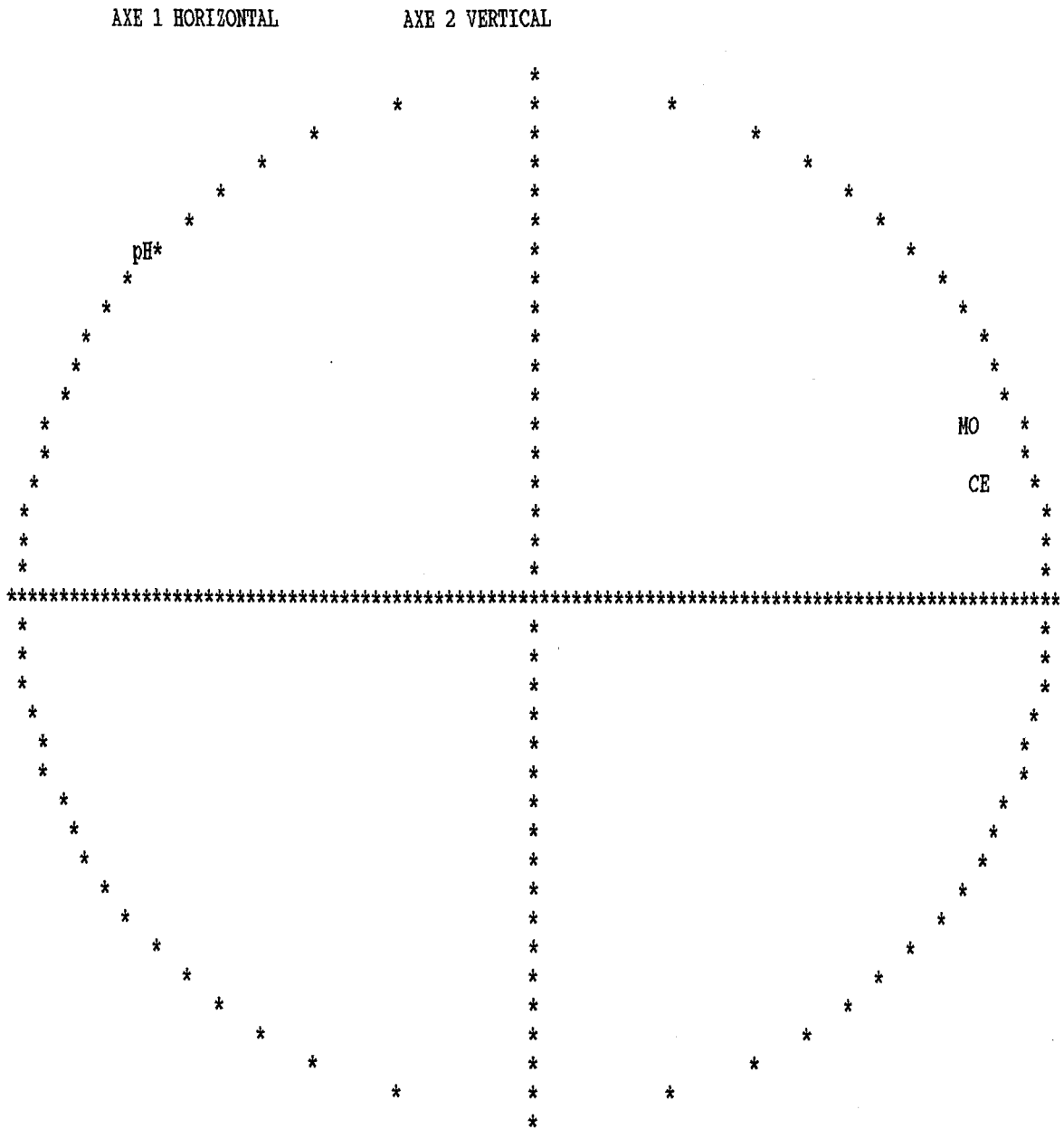


Figura 4.16. Representación de las variables consideradas en el análisis de fertilidad de los suelos del Maresme sobre los dos ejes principales. CE: conductividad eléctrica, pH, MO: materia orgánica.

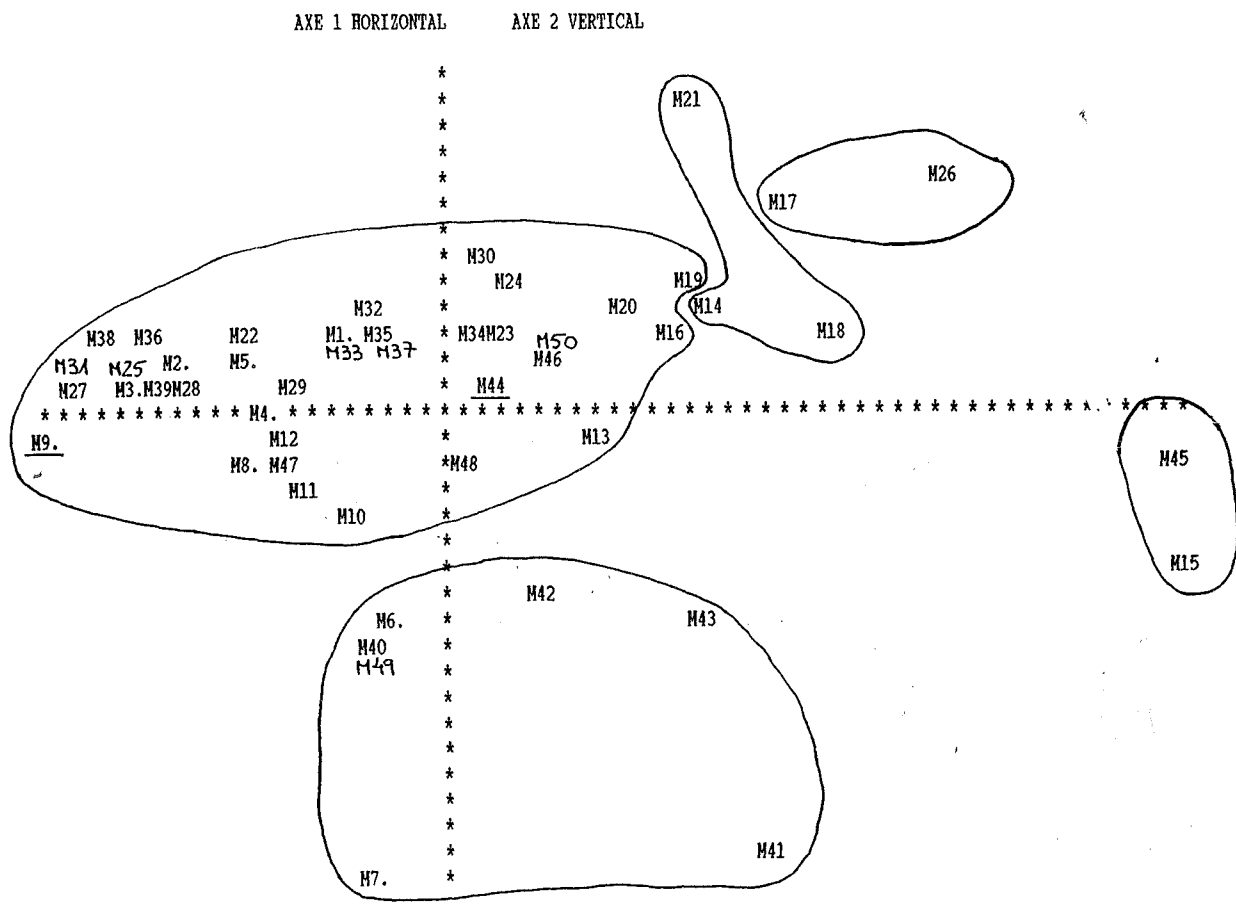


Figura 4.17. Representación de las muestras de suelos del Maresme sobre los dos primeros ejes principales según sus características organoquímicas..

4.1- Ocurrencia de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas.

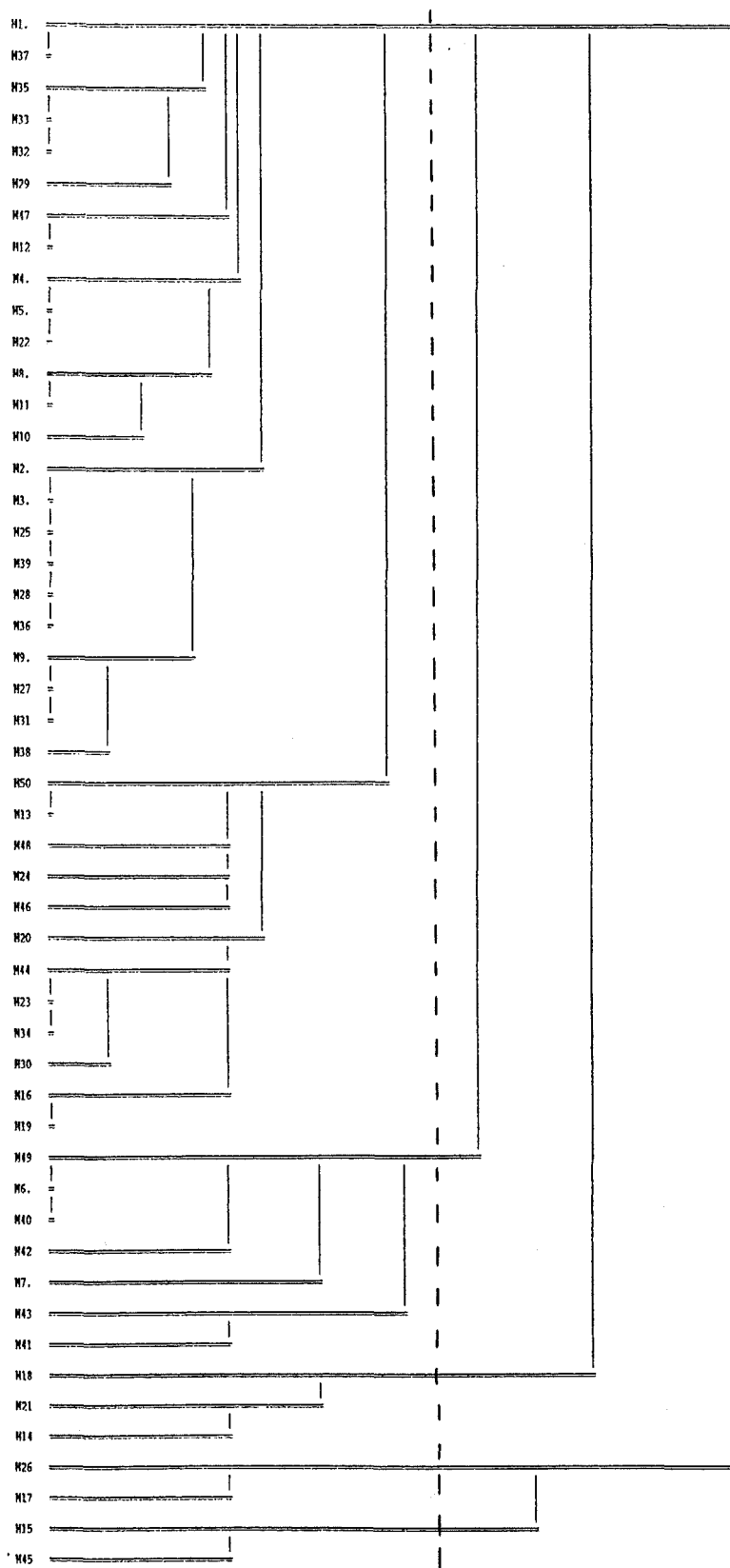


Figura 4.18. Dendrograma de las muestras de suelo del Maresme, clasificados según sus características organoquímicas. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendrograma para separar las clases.

4.1.4. Discusión.

Los suelos de cultivos hortícolas son un hábitat potencialmente idóneo para la presencia de los nematodos entomopatógenos, al no presentar problemas de desecación debido a que son cultivos de regadío y donde suelen existir numerosos insectos que pueden actuar como hospedadores de los nematodos entomopatógenos. Sin embargo, en contra de lo que cabría esperar en el muestreo realizado en este trabajo hemos obtenido una baja frecuencia de ocurrencia de nematodos (6,7% de los suelos), muy inferior a la ocurrencia de nematodos entomopatógenos en los suelos del hábitat "cultivo" (28,2%) del estudio de distribución del capítulo anterior.

Este hecho podría ser debido a que en estas zonas hortícolas de las proximidades de Barcelona fuesen menos comunes los nematodos entomopatógenos, sin embargo tenemos fundadas sospechas de que intervienen otros factores en esta baja aparición de nematodos entomopatógenos. En estas zonas hortícolas están generalizadas las aplicaciones fitosanitarias indiscriminadas y más concretamente la desinfección periódica de los suelos (ej. bromuro de metilo). Este hecho se da de forma más generalizada en la zona hortícola del Maresme, donde tienen una gran importancia los cultivos ornamentales, y es en esta zona donde hemos encontrado la menor presencia de nematodos, 4% de los suelos analizados frente al 9,1% del Baix Llobregat.

Existen numerosos trabajos sobre la compatibilidad entre los nematodos entomopatógenos y algunos productos fitosanitarios y fertilizantes, que han determinado la inocuidad de algunos de estos productos, permitiendo así su utilización conjunta (Rao et al. 1975, Fedorko et al., 1977a,b,c, Hoy y Shea, 1981, Hara y Kaya, 1982, 1983, Heungens y Buysse, 1987, Ishibashi y Kondo, 1987, Rovesti et al. 1988, Rovesti y Deseo, 1990, 1991). Sin embargo, estos mismos trabajos han comprobado la toxicidad de muchos insecticidas organofosforados y carbamatos, de los nematicidas y por supuesto de los desinfectantes del suelo. Creemos que la utilización indiscriminada de muchos de estos productos en las zonas hortícolas muestreadas, principalmente en el Maresme, ha sido la causa de esta baja tasa de nematodos entomopatógenos encontrada. Este aspecto se ve corroborado por el hecho de que en los muestreos de los cultivos cubiertos (invernaderos), donde el empleo de fitosanitarios y en particular la desinfección del suelo se

produce de manera más frecuente, no hemos encontrado ningún nematodo entomopatógeno.

La mayor presencia de nematodos de la familia Heterorhabditidae (6 de las 7 especies aisladas) corrobora lo observado en el capítulo anterior sobre el mayor predominio de los nematodos heterorhabdítidos en zonas de elevada temperatura (Hominick y Briscoe, 1990a) y en las proximidades del mar (Hara et al. 1991, Downes y Griffin. 1991), como es el caso de estas dos zonas hortícolas.

La influencia en la presencia de nematodos entomopatógenos, de la toxicidad de los productos fitosanitarios que se utilizan en los campos muestreados, es un factor que no se ha podido considerar al caracterizar los diferentes suelos analizados y que puede interferir en la aparición de estos nematodos en los diferentes campos tipificados por su textura o características organoquímicas del análisis de fertilidad.

El efecto de los diversos factores físicos del suelo en la persistencia y eficacia de los agentes de control biológico de insectos del suelo, y en particular de los nematodos entomopátogenos, ha sido ampliamente revisada por Barbercheck (1992).

La influencia de la textura del suelo en la aparición de nematodos entomopatógenos ha sido observada por diversos autores (Griffin et al. 1991, Blackshaw, 1988, Burman et al. 1986, Vänninem et al. 1989, Hominick y Briscoe, 1990), quienes determinaron, en sus prospecciones de nematodos entomopatógenos, una mayor aparición en suelos con un mayor contenido de arena y una menor aparición en aquellos suelos con una mayor cantidad de arcilla en su composición.

Wallace (1971) estableció que la interacción entre el tipo de suelo, la humedad y la aireación afecta la movilidad de los nematodos y la energía que consumen. Los suelos arcillosos presentan un tamaño de poro pequeño y altos contenidos de humedad, dando lugar a un ambiente de baja aireación para los nematodos. Los nematodos que se encuentran en estas condiciones de pobre aireación consumen ineficaz y rápidamente las reservas alimenticias a través de la fermentación de los hidratos de carbono (Croll y Matthews, 1977). Por el contrario los suelos arenosos presentan un tamaño de poro mayor con un bajo contenido hídrico dando lugar a un ambiente de excelente aireación para los nematodos. En estas condiciones, los nematodos utilizan eficazmente los lípidos almacenados

en sus reservas mediante oxidación (Croll y Matthews, 1977), dando lugar a una mayor supervivencia de los nematodos en este tipo de suelo.

Posteriores estudios de laboratorio han determinado la influencia del tamaño de las partículas que forman la textura del suelo en la movilidad, y por lo tanto supervivencia, de los nematodos entomopatógenos (Georgis y Poinar, 1983a, Molyneux y Bedding, 1984, Kung y Gaugler, 1990, Barbercheck y Kaya, 1991, Blackshaw y Senthamizhselvan, 1991). Todos los autores coinciden en que en suelos con un elevado contenido en arcilla, los poros son pequeños y tortuosos, lo que limita la movilidad de los nematodos.

Sin embargo en nuestro estudio hemos determinado que los nematodos entomopatógenos se encontraban con una mayor frecuencia en suelos francos con un tendencia hacia un mayor contenido en limo, que en aquellos suelos que presentaban mayor proporción de arena.

Aunque consideramos que la baja frecuencia de aparición de nematodos y la presencia de productos fitosanitarios pueden influir en esta aparición diferencial en función de la textura del suelo, constatamos que los nematodos entomopatógenos pueden aparecer en suelos con elevadas proporciones de limo (60%) y arcilla (30%) (como es el caso de la muestra P42), y que la media de los suelos en que han aparecido nematodos presentan unas características de suelos franco limosos con una elevada proporción de limo (45%) y arcilla (20%).

Si para simplificar consideramos que todas las partículas que forman la textura de estos suelos son esféricas, el diámetro teórico del poro entre tres de estas partículas apiladas es de 0,154 veces el diámetro de la partícula (Cumberland, 1985). Aplicando este índice a los resultados obtenidos por nosotros, nos encontramos que el diámetro del poro dejado por las partículas de limo es entre 7,7 y 0,31 micras, muy inferior al diámetro medio de los nematodos (30 micras), y el dejado por las partículas de arcilla es menor a 0,31 micras, por lo que teóricamente y simplificando mucho (ya que tratamos las partículas de forma independiente), por el 65% de los poros dejados por la textura media de los suelos que presentan nematodos, no podrían penetrar los propios nematodos.

Este hecho nos muestra que aunque la textura del suelo tiene cierta importancia, el suelo es un medio muy complejo, donde la arena, el limo y la arcilla sólo son un simple aspecto de la estructura del suelo, y los experimentos de laboratorio, donde se analiza la movilidad y

supervivencia de los nematodos en suelos de diferentes texturas, han destruido, al menos en parte, esta estructura que es la que determina las verdaderas características (poro, permeabilidad, aireación, etc) que presentan los suelos.

En este sentido vemos la importancia que presenta la materia orgánica en la estructura del suelo. La materia orgánica hace que las partículas pequeñas se aglutinen en agregados mas grandes, lo que implica que existan unos poros mayores de lo que cabría esperar por el simple análisis granulométrico, y por lo tanto una mayor permeabilidad y oxigenación del suelo. Cabe señalar que en los análisis de los suelos que han presentado nematodos entomopatógenos en nuestro estudio, el porcentaje de materia orgánica obtenido (3,23% p/p) es superior al encontrado en los suelos sin nematodos (2,98% p/p), y puede considerarse como un nivel alto o muy alto dentro de los suelos agrícolas de zonas mediterráneas (Porta et al. 1987), por lo que sin duda este elevado contenido en materia orgánica ha influido en el aumento de la porosidad y aireación de estos suelos con presencia de nematodos y textura franco limosa.

La salinidad media encontrada en los suelos con presencia de nematodos (0,49 dS/m) está exactamente en el límite (0,5 dS/m) que se considera perjudicial para los vegetales. Esta salinidad media de los suelos con nematodos es inferior, aunque no significativamente, a la observada en suelos sin nematodos (0,57 dS/m), por lo que cabría pensar que la salinidad del suelo podría tener algún efecto perjudicial para los nematodos entomopatógenos, como han sugerido Hara et al. (1991).

No obstante, el haber encontrado nematodos en suelos con un índice de salinidad de hasta 0,77 dS/m, nos permite afirmar que los nematodos entomopatógenos detectados en nuestro estudio se encuentran bien adaptados a persistir en estos suelos de moderada o fuerte salinidad.

La elevada salinidad de estos suelos con estrecha relación con el ambiente costero, puede ser la causa de la predominancia de los nematodos de la familia Heterorhabditidae frente a la familia Steinernematidae que hemos constatado anteriormente (ocho heterorhabdítidos frente a un steinernemátido).

Milstead y Poinar (1978) comprobaron como las formas infectivas de los heterorhabdítidos sobrevivían un mayor tiempo cuando eran guardadas en solución Ringer que en agua, y Poinar y Hess-Poinar (en

Poinar, 1993) afirman que las formas infectivas de estos nematodos sobreviven más tiempo en agua de mar que en agua dulce.

Poinar (1993) sostiene que los nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae han evolucionado a partir de un ancestro del tipo *Pellioiditis* del ambiente arenícola marino (a diferencia de los nematodos de la familia Steinernematidae que se originarían de un antecesor "*proto-Rhabditonema*" de ambiente terrestre) y que los heterorhabdítidos actuales, que viven en ambientes completamente terrestres continúan siendo halófilos, por lo que la salinidad del suelo determina en gran medida su distribución.

El valor medio de pH observado en los suelos con nematodos (pH= 7,96) nos indican que se tratan de suelos moderadamente básicos (según clasificación USDA, 1971) que se encuentra en el intervalo considerado como normal dentro de los suelos cultivados (pH= 7,0±1,5) según Casanellas (1986). Estos valores de pH están dentro del espectro de supervivencia e infectabilidad de los nematodos entomopatógenos (Kung et al. 1990).

Nuestros datos sugieren que si bien son importantes ciertos factores que se suelen tener en cuenta en los estudios de distribución o de aplicabilidad de los nematodos entomopatógenos (textura, temperatura y humedad del suelo, pH, etc.), la complejidad del suelo es tal, que para considerar su verdadera estructura y ver de que forma ésta influye en la presencia o supervivencia de los nematodos, no se pueden considerar separadamente estos factores. Es necesario contemplar las múltiples interacciones existentes entre todos ellos, conjuntamente con otros factores (actividad biológica del suelo, densidad y continuidad de la vegetación, prácticas agrícolas, etc.), y el resultado final determinará la presencia o la mayor o menor persistencia de los nematodos entomopatógenos en el suelo. Sin olvidar que la intervención humana mediante el uso de productos fitosanitarios (insecticidas, nematicidas y desinfectantes del suelo) juega un papel importantísimo en esta distribución.

4.2. PERSISTENCIA DE POBLACIONES NATURALES DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN SUELOS DE CULTIVOS HORTÍCOLAS

4.2.1. Introducción.

Los estudios que hemos realizado hasta el momento, sobre la presencia de nematodos entomopatógenos, nos han mostrado que estos nematodos se encuentran ampliamente distribuidos por toda la geografía catalana, así como nos han permitido señalar algunos de los factores que pueden intervenir en su aparición. Sin embargo, cada lugar analizado ha sido muestreado una sola vez, por lo que hemos obtenido únicamente una "instantánea" de la dinámica de población de estos nematodos.

En el presente apartado pretendemos analizar algunos de los factores que pueden determinar la aparición y persistencia de las poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos en el suelo.

La presencia y persistencia de los nematodos en el suelo, puede venir determinada por diversos factores bióticos y abióticos. Entre los factores bióticos cabe señalar la presencia de insectos que actúen como hospedadores, y la presencia de antagonistas que limiten las poblaciones de estos nematodos.

Las oscilaciones temporales en la presencia de posibles hospedadores ya sea por las fluctuaciones propias de las relaciones hospedador-parásito, o bien por el intermitente aporte de insectos debido al tipo de cultivo o a las labores culturales realizadas en el campo, pueden hacer que estos periodos de escasez de hospedadores sean muy amplios lo cual puede repercutir en una menor persistencia a largo plazo.

El otro factor biótico que puede delimitar la presencia y persistencia de los nematodos entomopatógenos en el suelo son los antagonistas. Entre ellos cabe destacar el grupo de hongos nematófagos como *Arthrobotrys* sp., *Drechmeria* sp. (Moniliales, Deuteromycetes), que pueden hacer disminuir las poblaciones de nematodos en general (Kim et al. 1988) y de entomopatógenos en particular (Poinar y Jansson, 1986a,b). También los microartrópodos nematófagos como ácaros o colémbolos pueden jugar un papel importante en la reducción de las poblaciones de nematodos entomopatógenos en el suelo (Epsky et al. 1988, Gilmore y Potter 1993).

Entre los factores abióticos, aspectos tales como la temperatura, humedad, textura y estructura del suelo, también juegan un papel importantísimo en la presencia y persistencia de los nematodos entomopatógenos en el suelo (Kaya, 1990)

Existen poquísimos trabajos sobre el seguimiento temporal de poblaciones naturales de nematodos heterorhabdítidos y steinernemátidos, y ninguno sobre su evolución en suelos cultivados. Únicamente Hominick y Briscoe (1990) realizaron un estudio temporal de 15 lugares en 28 meses de forma bimensual o trimestral (10 prospecciones en total) sobre unas poblaciones de *Steinernema bibionis* en suelos de diferentes hábitats no cultivados.

En este trabajo hemos realizado un estudio temporal a lo largo de 30 meses con un muestreo mensual durante 14 meses en 10 campos de cultivos hortícolas sobre poblaciones naturales de nematodos steinernemátidos y heterorhabdítidos.

4.2.2. Materiales y Métodos.

El estudio temporal de la aparición de los nematodos entomopatógenos se realizó en 10 campos de cultivos hortícolas situados en el Baix Llobregat. Se utilizaron 5 campos en los que, como determinamos en apartado anterior, aparecieron nematodos en un primer aislamiento (P4, P7, P11, P29, P42), tres parcelas (P4B, P29B y P43) que se encontraban colindantes a los campos P4, P29 y P42 (separados de ellos únicamente por un camino), y dos campos con cultivo cubierto bajo plástico (P8 y P10) próximos a las parcelas P7 y P11.

El primer muestreo se realizó en julio de 1990, y a partir de septiembre de 1990 y hasta octubre de 1991 se realizó un muestreo mensual de cada campo. Posteriormente se realizaron dos muestreos puntuales en agosto de 1992 y enero de 1993.

En cada campo se recogía una muestra compuesta de tres submuestras y se anotaba el cultivo presente en ese momento. La muestra era llevada al laboratorio, donde se dividía en tres fracciones iguales y colocaban en tres recipientes de plástico de 1 litro de capacidad para ser procesadas del mismo modo que el capítulo anterior, procediéndose a extraer los nematodos mediante la "trampa de *Galleria*".

Para valorar la existencia de nematodos en cada campo, se

consideraba tanto la simple presencia de nematodos entomopatógenos en un campo, como el número de "muestras" con nematodos por campo, considerando en este caso como "muestra" cada uno de las tres fracciones en que se repartía la muestra original y que era procesada independientemente. Este aspecto más cuantitativo nos indicaba la abundancia de nematodos existente en cada campo.

Se recogieron los datos climáticos de temperatura media, máxima y mínima, precipitación y humedad relativa a lo largo de todo en periodo que se desarrolló el estudio. Igualmente se realizó un análisis de fertilidad y textura del suelo de los 10 campos en los que se realizó el seguimiento.

Durante el periodo que duró el ensayo no se realizó ninguna desinfección ni aplicación de nematicidas en los campos al aire libre, desconociéndose las posibles aplicaciones de este tipo que recibieron los campos bajo plástico (invernaderos). Sin embargo no ha sido posible controlar la aplicación de otros productos fitosanitarios en los cultivos de los campos al aire libre analizados.

Paralelamente para estudiar la distribución vertical de las poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos en el suelo, se han realizado muestreos en profundidad mediante sondas, durante los meses de abril-91, septiembre-91, octubre-91, agosto-92 y enero-93 en aquellos campos en los que mediante el muestreo periódico había sido detectada su presencia .

Los muestreos en profundidad consistían en la recogida de 10 muestras por campo mediante una sonda de media caña de 30 mm de diámetro, que nos permitía obtener una muestra de suelo de 3 cm de diámetro y 30 cm de profundidad. Este perfil de suelo era cortado en fragmentos de 5 cm y colocados de forma individual en placas de Petri de 9 cm de diámetro, debidamente etiquetadas para su traslado al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, cada placa actuaba a modo de "trampa de *Galleria*" mediante la introducción de 4 larvas de último estadio de *Galleria mellonella* para la extracción de los nematodos. Las placas eran guardadas a una temperatura de 23 ± 2 °C y cubiertas por una bolsa de plástico para evitar su desecación. A los 10 días se desenterraban las larvas y se disecaban para detectar la presencia de nematodos en su interior, anotando el número de larvas de *Galleria* parasitadas por nematodos a cada profundidad.

4.2.3. Resultados.

Las características granulométricas y el análisis de fertilidad de los suelos de los campos estudiados se muestran en la tabla 4.12.

Las condiciones climáticas que hemos considerado: temperatura mínima, máxima y media mensual, pluviometría y humedad relativa del aire (HR) media mensual, a lo largo de los 14 meses en que se realizó el muestreo mensual se encuentran en las figuras 4.19A, B y C. En ellas se puede observar una clara estacionalidad con una temperatura mínima invernal de 1,2 °C pero con mínimas medias mensuales no inferiores a 5°C y una temperatura media mensual de alrededor 10°C. Durante el verano las temperaturas máximas alcanzan valores de 33 °C, aunque la media mensual de las máxima no sobrepasa los 30,5 °C (fig. 4.19A).

La estacionalidad también se manifiesta en la pluviometría, con una mínima precipitación en los meses de junio y julio (3,6 y 13,3 mm respectivamente) (fig. 4.19B), y en la humedad relativa del aire con un menor porcentaje de HR a partir de abril hasta septiembre, alcanzando sus valores mínimos (60% HR) en el mes de agosto (fig. 4.19C).

En la tabla 4.13 observamos el número de campos y el número total de muestras que hemos detectado con nematodos entomopatógenos.

De los 10 campos muestreados en cuatro no hemos detectado nematodos entomopatógenos durante todo el periodo de muestreo. En uno de estos campos (P42) se aislaron nematodos entomopatógenos en el primer muestreo del mes de julio-90 pero a partir de septiembre y hasta el último muestreo (enero-93) no se volvieron a detectar nematodos. De los tres campos restantes en que no se encontraron nematodos entomopatógenos, dos (P8 y P10) correspondían a los campos con cultivo protegidos bajo plástico, mientras que el otro campo (P43) se trataba de un campo al aire libre muy próximo al campo P42 donde, como hemos comentado, sólo detectamos nematodos en el primer muestreo de junio.

La no presencia de nematodos entomopatógenos en los campos con cultivos protegidos bajo plástico, a lo largo del amplio periodo en que se desarrolló el ensayo (30 meses), nos indica un hecho ya observado en el capítulo anterior, que es la elevada utilización de productos fitosanitarios y más concretamente desinfectantes de suelo que se emplean en este tipo de cultivo, lo que impide la presencia de nematodos entomopatógenos.

4.2- Persistencia de poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos...

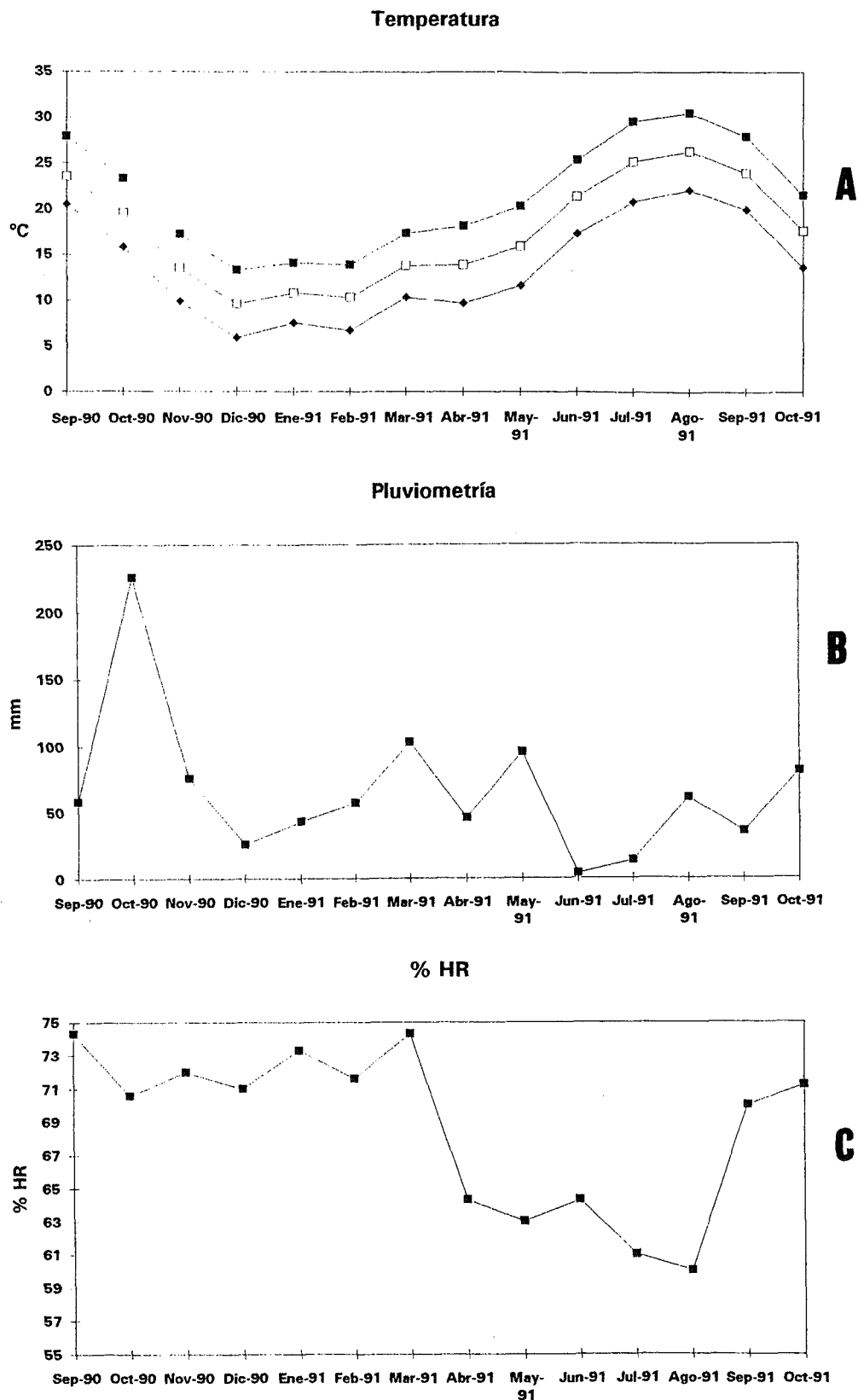


Figura 4.19. Condiciones climáticas durante el periodo en que se realizaron los muestreos. A). Temperatura (máxima, media y mínima), B). Pluviometría, C). Humedad relativa del aire.

4.2- Persistencia de poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos...

Tabla 4.12. Características granulométricas y organoquímicas de los suelos analizados.

	TEXTURA						FERTILIDAD				
	ARENA GRUESA (0,5 < D < 2mm)	ARENA FINA (0,05 < D < 0,5mm)	ARENA TOTAL (0,05 < D < 2mm)	LIMO (0,002 < D < 0,05mm)	ARCILLA (D < 0,002mm)	CLASIF. USDA(1)	C.E. (dS/m)	pH	M.O. (% p/p)	FOSFORO (mg./kg.)	POTASIO (mg./kg.)
P4	1,38	13,61	14,99	60,95	24,06	F-L	0,52	8,01	3,84	147,70	907,51
P4B	1,57	15,04	16,61	60,87	22,52	F-L	0,42	8,10	3,41	106,12	725,45
P7	1,35	34,65	36	51,21	12,79	F-L	0,60	8,16	2,43	50,97	624,14
P8	2,75	28,73	31,48	48,87	19,65	F	1,59	7,96	3,97	147,56	998,98
P10	2,05	20,60	22,65	57,75	19,58	F-L	0,71	7,98	5,43	292,24	1053,48
P11	8,19	29,78	37,97	42,36	19,67	F	0,51	7,98	4,58	137,94	864,65
P29	2,2	31,34	33,54	48,38	19,08	F	0,40	7,99	3,16	49,49	299,46
P29B	4,03	30,32	34,35	44,49	21,16	F	0,77	7,51	4,10	101,34	487,37
P42	1,89	9,25	11,14	59,97	28,89	F-Arc-L	0,77	8,16	3,25	55,72	386,57
P43	0,30	12,93	13,23	61,57	25,20	F-L	0,60	8,18	2,44	48,80	258,71

(1) F: Franco, L: Limoso, Arc: Arcilloso

La desaparición de la población natural de nematodos entomopatógenos detectada en el primer muestreo del campo 42, y que no volvió a aparecer en todo el ensayo, nos señala la poca implantación que presentaba esta población de nematodos, presentando una distribución muy puntual. Este aspecto podría indicar un intento de colonización de este campo por una población nueva de nematodos, que al encontrar unas condiciones adversas (p. ej. suelo excesivamente arcilloso (tabla 4.12)) no se llegó a consolidar. En el campo 43 con unas condiciones muy similares al campo 42 tampoco fueron detectados estos nematodos

En estos campos en los que no se han encontrado nematodos entomopatógenos a lo largo de todo el periodo que duró el ensayo, no fueron incluidos en los cálculos ni en las figuras.

En los seis campos en que hemos encontrado nematodos entomopatógenos, cinco de ellos pertenecen a la familia Heterorhabditidae, mientras que únicamente el campo P7 presentan nematodos pertenecientes a la familia Steinernematidae.

El número medio de campos con presencia de nematodos para los 14 meses es de 2,8; el menor número de campos fue 1 en julio y agosto, y el mayor 5 en octubre de 1991 (tabla 4.13). Similar tendencia se observa si consideramos la abundancia de nematodos referido al número total de muestras con nematodos entomopatógenos, la media de muestras con nematodos en los 14 meses es de 6,9, mientras que en julio y agosto se detectaron únicamente 1 y 2 muestras respectivamente, mientras que el mayor número de muestras con nematodos se produjo en enero y marzo de 1990 con 10 muestras y en octubre de 1991 con 11 muestras positivas.

Tabla 4.13. Número medio de campos y de muestras con nematodos por muestreo.

FECHA	Nº CAMPOS	Nº MUESTRAS
SEP-90	3	7
OCT-90	3	8
NOV-90	4	9
DIC-90	2	4
ENE-91	4	10
FEB-91	3	9
MAR-91	4	10
ABR-91	3	7
MAY-91	2	6
JUN-91	2	6
JUL-91	1	1
AGO-91	1	2
SEP-91	3	7
OCT-91	5	11

La representación gráfica del número de campos y de muestras con nematodos entomopatógenos a lo largo de los 14 meses que realizamos el seguimiento mensual se muestra en la fig. 4.20. Dicha representación presenta una distribución que nos indicaría una cierta estacionalidad en la aparición de los nematodos a lo largo del año que podría tener una relación con los parámetros ambientales considerados anteriormente.

Al realizar una correlación entre estos parámetros ambientales y el número de campos y de muestras con nematodos entomopatógenos obtenemos los coeficientes de correlación que se observan en la tabla 4.14.

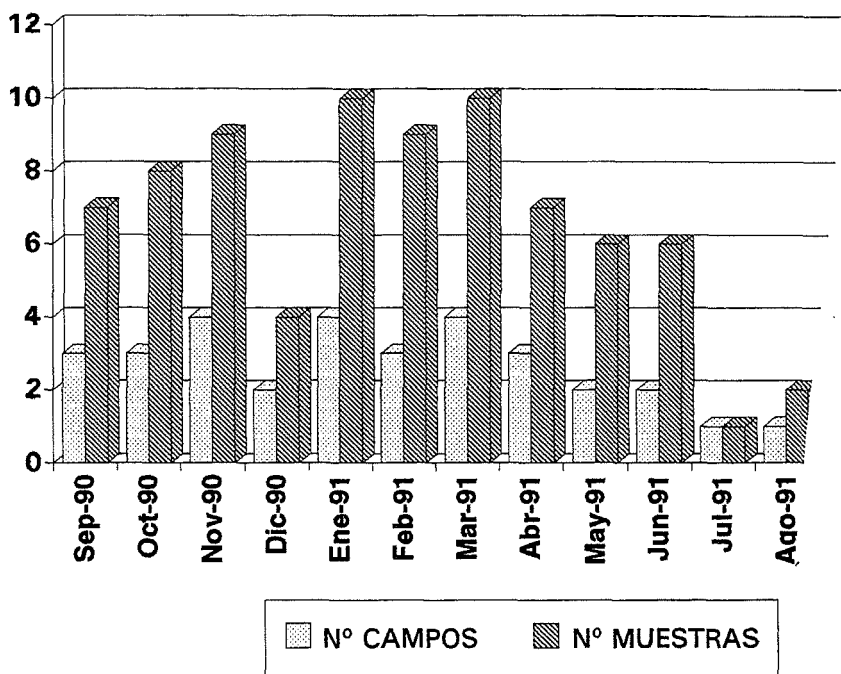


Figura 4.20. Número de campos y de muestras con nematodos entomopatógenos.

Tabla 4.14 Coeficientes de correlación entre el número de campos y de muestras con nematodos entomopatógenos y los diversos factores ambientales considerados.

	T ^a MAX	T ^a MED	T ^a MIN	PRECIP.	% HR
N ^o CAMPOS	-0,49	-0,47	-0,44	0,29	0,78 *
N ^o MUESTRAS	-0,55	-0,53	-0,51	0,36	0,76 *

* Significación $p < 0,001$

Podemos comprobar como la aparición de nematodos entomopatógenos en los campos estudiados presenta una correlación negativa con la temperatura, a mayor temperatura detectamos una menor presencia de nematodos entomopatógenos, una mínima relación con la precipitación y una significativa correlación positiva con la humedad relativa del aire, existiendo un menor número de campos y de muestras con nematodos cuando el porcentaje de humedad relativa del aire es menor.

En las figuras 4.21-4.23 se encuentra representado el número de muestras con nematodos a lo largo de todo el periodo en el que se desarrolló el estudio (de sep-90 a oct-91 de forma mensual y ago-92 y ene-93 de forma puntual) para cada uno de los campos muestreados, detallando el estado en que se encontraba el campo en el momento en que se recogían las muestras.

En general, ningún campo presentó nematodos entomopatógenos durante todo el periodo del estudio, existiendo en todos ellos una menor presencia de nematodos en los meses de verano. Sin embargo, debido a que cada campo sufrió unas prácticas culturales diferentes, creemos conveniente comentar cada campo de una forma particular.

En el campo P4 se detectaron nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae en julio de 1990 (fig. 4.21A), sin embargo en los 12 meses siguientes no fueron detectados nematodos. En el mes de agosto el campo fue arado (lo que implica que no era regado) y sometido a la desecación propia de este mes, sin embargo al mes siguiente (septiembre-91) se plantaron lechugas y se volvieron a detectar los

nematodos entomopatógenos al igual que al mes siguiente cuando el campo estaba cubierto por la vegetación de lechugas. En agosto de 1992 (a los 10 meses del último muestreo mensual) encontramos una gran población de nematodos entomopatógenos, al igual que en enero de 1993, dos años y medio después de haber sido detectados los nematodos en este campo por primera vez.

El campo P4B presenta una situación muy próxima al campo P4, en esta parcela se detectan por primera vez nematodos entomopatógenos pertenecientes a la familia Heterorhabditidae en el mes de enero cuando el campo llevaba varios meses cubierto por una plantación de lechugas (fig. 4.21B). Esta pequeña aparición puntual, detectada únicamente en una única muestra, no se mantiene en los siguientes meses, ya que no vuelven a aparecer nematodos hasta septiembre de 1991 con la presencia de tres muestras positivas. Los muestreos de agosto de 1992 y enero de 1993 resultan ambos positivos detectando nematodos entomopatógenos en todas las muestras analizadas.

En el campo P7 se detecta, desde el primer muestreo, una gran población de nematodos entomopatógenos de la familia Steinernematidae (*Steinernema feltiae*), quedando de manifiesto por la aparición de nematodos en las tres muestras analizadas (fig. 4.22A). Esta gran presencia de nematodos se mantiene durante los 10 meses siguientes a pesar de que el campo ha sufrido diversas prácticas culturales. Durante los meses de septiembre y octubre esta parcela esta cubierta de tomateras en producción, sin embargo en noviembre estas tomateras son arrancadas permaneciendo el campo en estas condiciones hasta que en enero es arado pero sin ser sembrado. En esta situación permanece hasta mayo en que es nuevamente arado y permanece sin sembrar hasta septiembre de 1991 en que se plantan estacas de alcachofa. Es de destacar que este campo no ha estado sometido a cultivo desde el mes de noviembre, por lo que no ha recibido riegos desde ese mes, presenta un menor aporte de insectos, y la estructura de su suelo ha sido destruida al menos en dos ocasiones mediante el arado del campo. No obstante durante todo este periodo hemos continuado detectando una máxima presencia de nematodos entomopatógenos en el suelo. Únicamente durante los meses de julio y agosto no detectamos los nematodos, volviendo a aparecer en el mes de septiembre cuando se produjo la plantación de las estacas de alcachofa y en el mes de octubre de 1991. En la prospección realizada en agosto de 1992 tampoco aparecieron nematodos, mientras que sí que fueron

detectados en enero de 1993.

En el campo P11 se detectan los nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae en el muestreo de julio-90 (fig. 4.22B). Los siguientes muestreos de septiembre, octubre y noviembre también resultan positivos estando el campo cubierto de escarolas. Sin embargo en diciembre ya no son detectados hasta marzo, a pesar de que en enero el campo es arado y dejado sin sembrar, por lo que después de ser destruida la estructura del suelo y permanecer el campo sin sembrar y por lo tanto sin regar durante dos meses, aparecen los nematodos de forma puntual y no vuelven a aparecer nuevamente hasta octubre de 1991. En el muestreo de agosto de 1992 el campo no estaba sembrado y no se encontraron nematodos, sin embargo en enero de 1993 el campo tampoco estaba sembrado y se detectaron nematodos entomopatógenos en las tres muestras analizadas.

El campo P29 es una parcela en la que se han detectado nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae a lo largo de casi todo el ensayo (fig. 4.23A). Únicamente no se encontraron nematodos durante los meses de agosto y septiembre de 1991 y agosto de 1992, sin embargo en el resto de los muestreos se detectaron nematodos a pesar de que el campo fue arado en el mes de diciembre de 1990 y dejado sin sembrar durante los cuatro meses siguientes.

El campo P29B se encuentra situado en las proximidades del campo P29. Se han detectado nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae en noviembre de 1990 después de haber sido sembrado de escarolas (fig. 4.23B). Sin embargo al mes siguiente no son detectados y vuelven a aparecer de enero a abril de 1991 a pesar de que en este último mes la tierra había sido arada. Al mes siguiente el campo es plantado de lechugas y no se detectan nematodos hasta agosto de 1991 cuando el suelo es nuevamente arado encontrándose nuevamente en septiembre y octubre. En las prospecciones de agosto de 1992 y enero de 1993 no se detectaron nematodos estando en las dos ocasiones el campo cubierto con plantaciones en producción de tomates y lechugas respectivamente.

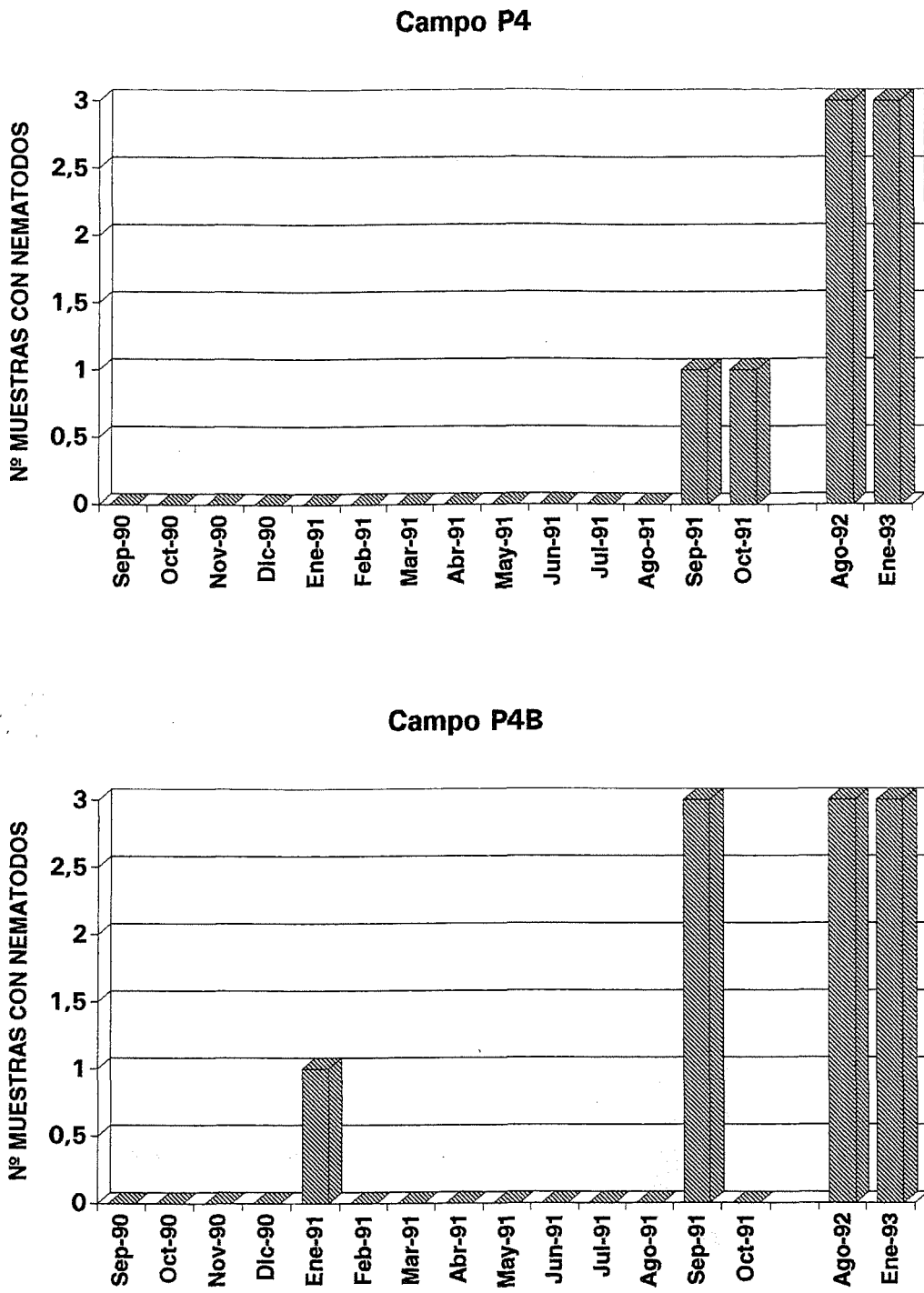


Figura 4.21. Aparición mensual de nematodos en los campos P4 (A) y P4B (B)

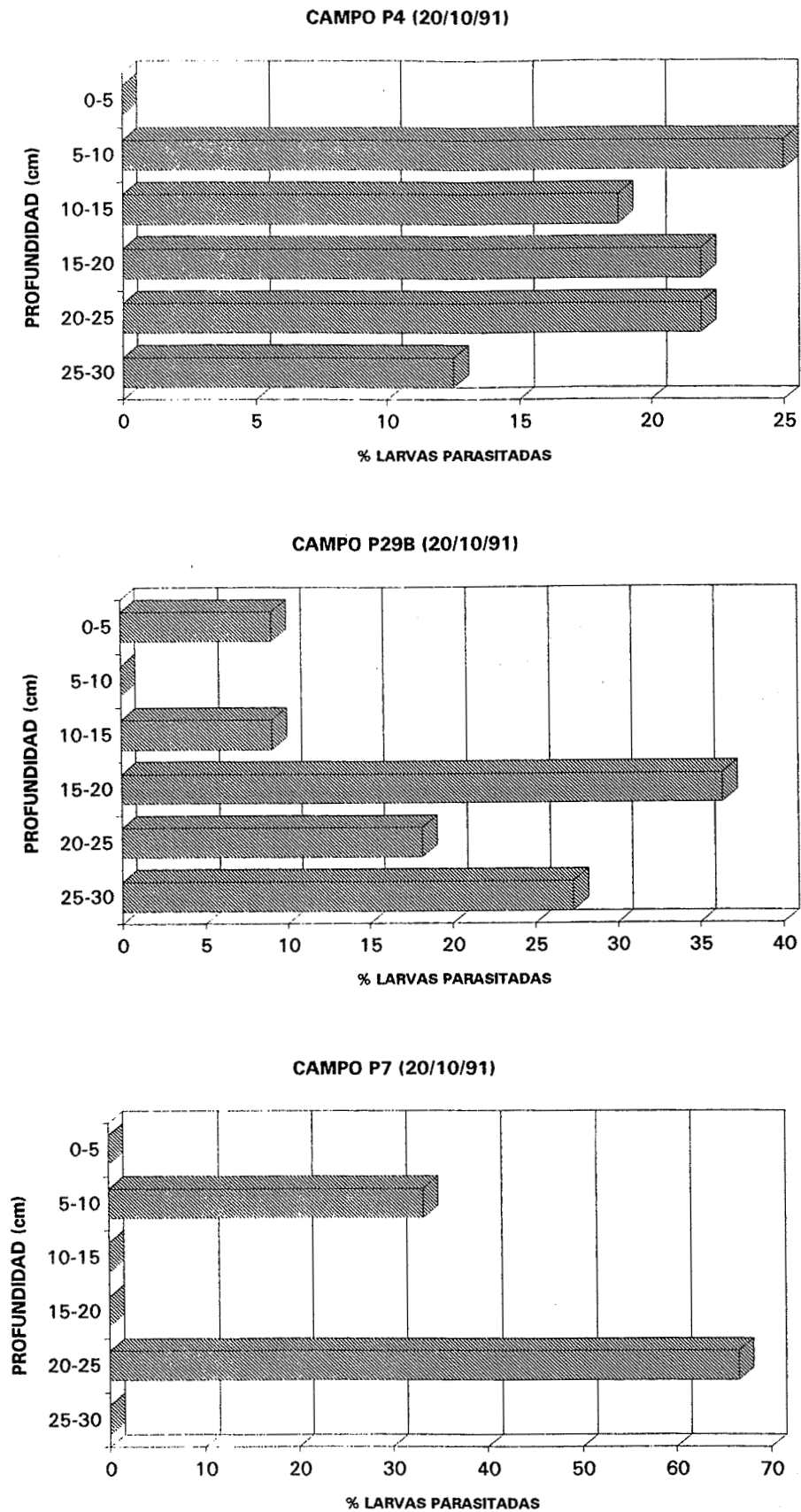


Figura 4.27. Distribución vertical de los nematodos en **OTOÑO**. (A) Campo P4: nematodos heterorhabdítidos. (B) Campo P29B: nematodos heterorhabdítidos. (C) Campo P7: nematodos steinernemátidos

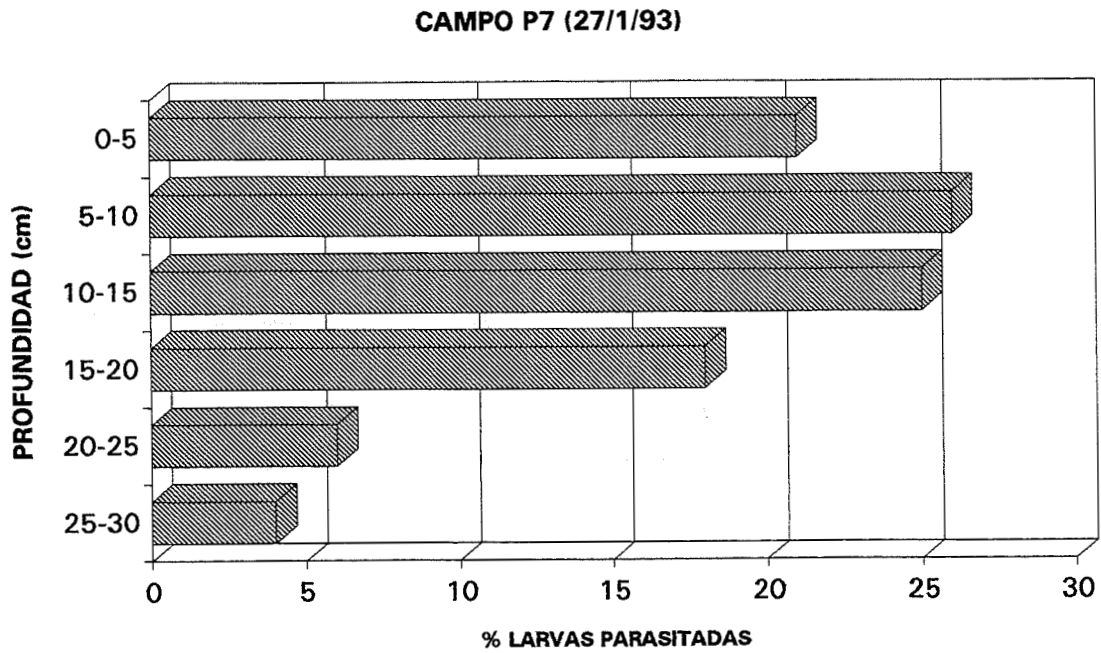
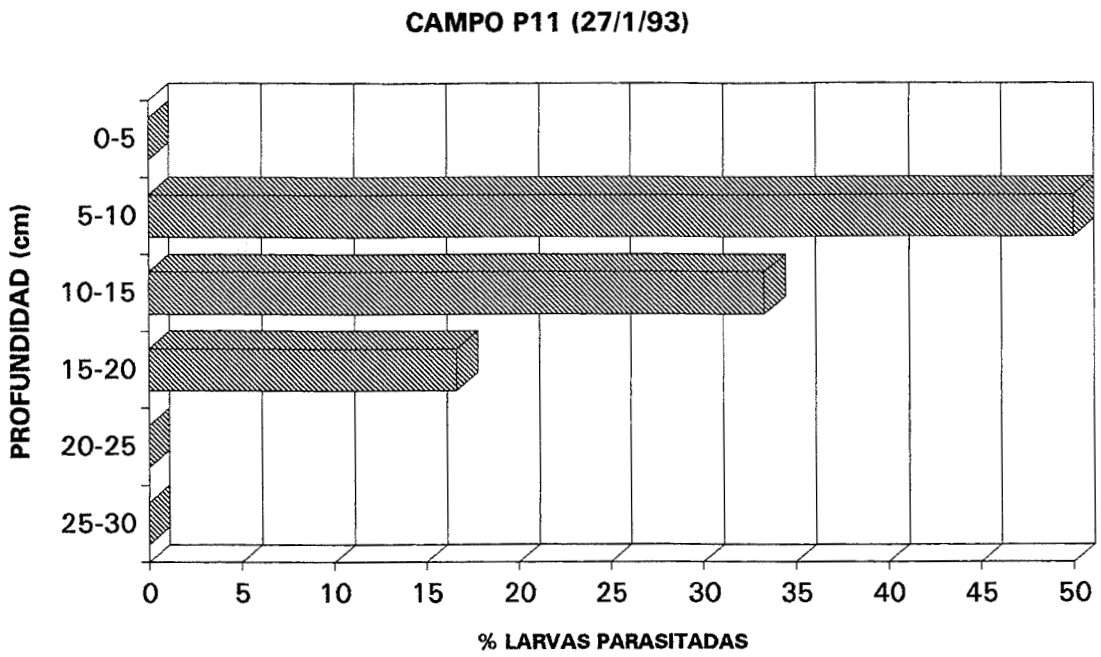


Figura 4.28. Distribución vertical de los nematodos en **INVIERNO**. (A) Campo P11: nematodos heterorhabdítidos. (B) Campo P7: nematodos steinernemátidos

Los resultados sobre la distribución vertical de los nematodos entomopatógenos en el suelo se muestra en la figura 4.24. Hemos representado el porcentaje de larvas parasitadas por nematodos en función de la profundidad en el global de muestras tomadas en las cinco fechas analizadas, en aquellos campos en que se detectaron nematodos. Hemos asumido que el número de larvas infectadas por ensayo está relacionado de alguna manera con el número de nematodos presentes en el suelo (Mracek, 1982).

En estas representaciones se han separado las dos especies de nematodos encontradas (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae*) ya que presentan un comportamiento dispersivo y persistencia diferente, lo que puede condicionar una distribución vertical distinta.

Si bien en ambas especies la mayor presencia de nematodos se detecta entre 5 y 10 cm de profundidad, en términos generales las dos especies presentan una distribución vertical significativamente diferente ($\chi^2=13,10$, g.l. = 5, $p= 0,0224$).

Heterorhabditis bacteriophora presenta una distribución más en profundidad, existiendo la menor presencia de nematodos (6,31% de larvas de *Galleria* parasitadas) en la superficie del suelo (0-5 cm de profundidad) (fig. 4.24A). Sin embargo, *Steinernema feltiae* manifiesta una distribución más superficial con una menor presencia de nematodos en las mayores profundidades: 8,89% de larvas parasitadas a 20-25 cm y 5,18% a 25-30 cm de profundidad (fig. 4.24B).

En la tabla 4.15 se muestra la distribución vertical de los nematodos entomopatógenos en función de la estacionalidad. Estos resultados se han reflejado en el número medio de larvas de *Galleria* infectadas, para el total de muestras positivas detectadas, a cada profundidad y para cada fecha de muestreo.

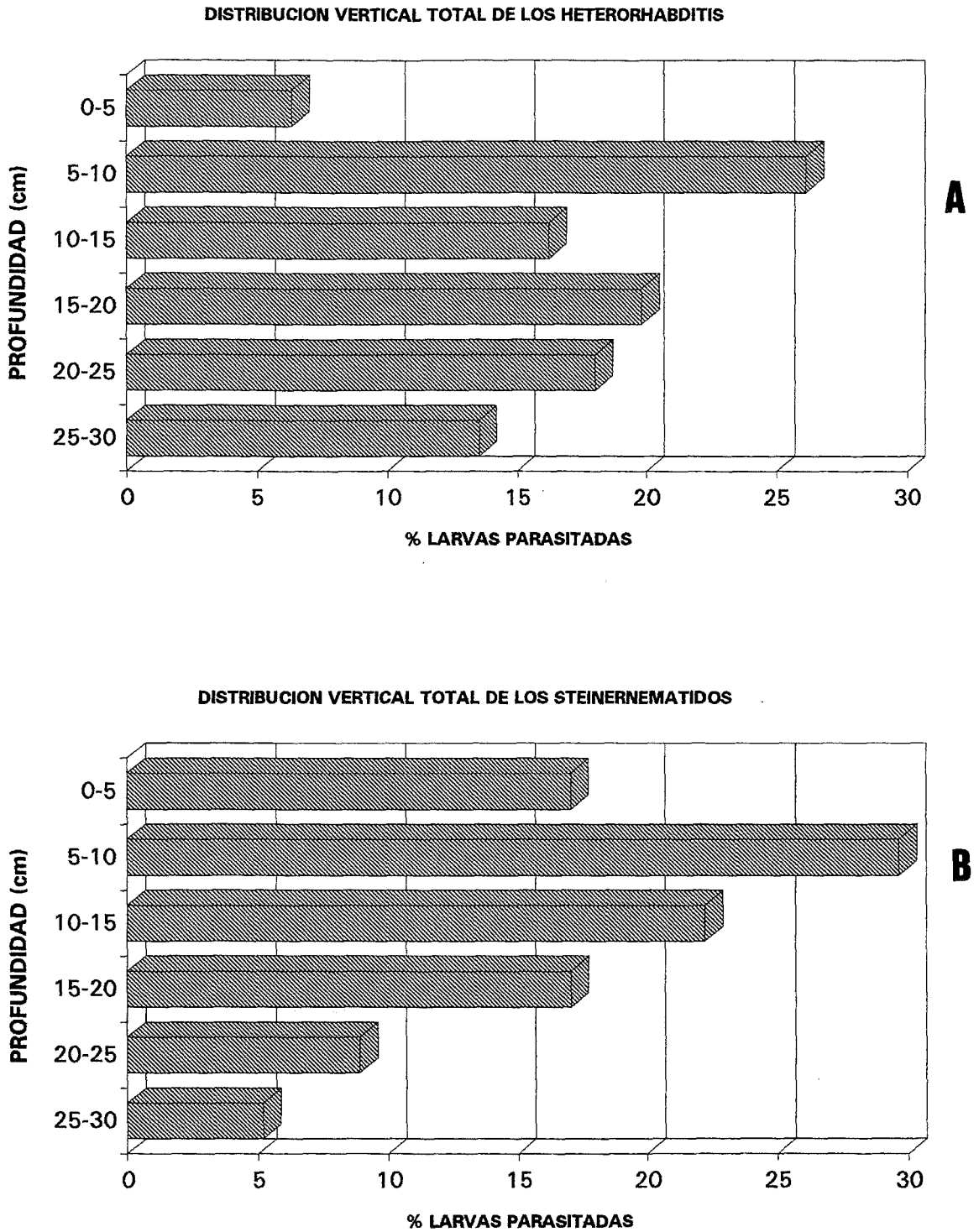


Figura 4.24. Distribución vertical de los nematodos entomopatógenos en el suelo. (A) Heterorhabdítidos, (B) Steinernemátidos.

Tabla 4.15. Distribución vertical de los nematodos entomopatógenos en las diferentes fechas de muestreo.

FECHA: 24-4-1991		
% MUESTRAS POSITIVAS	CAMPO P7 (1)	CAMPO P29 (2)
(n=10)	60%	50%
PROFUNDIDAD	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA
0 - 5 cm	0,33	0,40
5 - 10 cm	2,00	1,20
10 - 15 cm	0,83	0,40
15 - 20 cm	0,83	0,00
20 - 25 cm	0,66	0,00
25 - 30 cm	0,50	0,60

FECHA: 12-8-1991		
% MUESTRAS POSITIVAS	CAMPO P4 (2)	CAMPO P4B (2)
(n=10)	90%	0%
PROFUNDIDAD	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA
0 - 5 cm	0,44	-
5 - 10 cm	1,33	-
10 - 15 cm	0,77	-
15 - 20 cm	1,11	-
20 - 25 cm	1,22	-
25 - 30 cm	0,55	-

(2) *Heterorhabditis bacteriophora*

Tabla 4.15. (continuación).

FECHA: 12-9-1991		
% MUESTRAS	CAMPO P7 (1)	CAMPO P29 (2)
POSITIVAS (n=10)	10%	0%
PROFUNDIDAD	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA
0 - 5 cm	0	-
5 - 10 cm	1	-
10 - 15 cm	0	-
15 - 20 cm	0	-
20 - 25 cm	0	-
25 - 30 cm	0	-

FECHA: 20-10-1991				
% MUESTRAS	CAMPO P4 (2)	CAMPO P29B (2)	CAMPO P11 (2)	CAMPO P7 (1)
POSITIVAS (n=10)	40%	20%	0%	10%
PROFUNDIDAD	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA
0 - 5 cm	0,00	0,50	-	0,00
5 - 10 cm	2,00	0,00	-	1,00
10 - 15 cm	1,50	0,50	-	0,00
15 - 20 cm	1,75	2,00	-	0,00
20 - 25 cm	1,75	1,00	-	2,00
25 - 30 cm	1,00	1,50	-	0,00

(1) *Steinernema feltiae*(2) *Heterorhabditis bacteriophora*

Tabla 4.15. (continuación).

FECHA: 27-1-1993		
% MUESTRAS	CAMPO P7 (1)	CAMPO P11 (2)
POSITIVAS (n=10)	100%	30%
PROFUNDIDAD	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA	X LARVAS PARASITADAS /MUESTRA
0 - 5 cm	2,10	0,00
5 - 10 cm	2,60	1,00
10 - 15 cm	2,50	0,66
15 - 20 cm	1,80	0,33
20 - 25 cm	0,60	0,00
25 - 30 cm	0,40	0,00

(1) *Steinernema feltiae*(2) *Heterorhabditis bacteriophora*

La representación gráfica de estos resultados, reflejados como el porcentaje de larvas de *Galleria* parasitadas por nematodos, en cada profundidad para cada fecha de muestreo y campo analizado, se muestran en las figuras 4.25-4.28. Al igual que hemos hecho anteriormente al reflejar los resultados, diferenciamos aquellos campos que presentan nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae (P4, P4B, P11, P29, P29B) del campo P7 que presenta el nematodo steinernemático *Steinernema feltiae*. En ambas familias de nematodos hemos detectado una distribución vertical estadísticamente diferente en función de la estacionalidad ($X^2 = 154,8$, g.l. = 15, $p < 0,0001$ para *Heterorhabditis bacteriophora* y $X^2 = 342,4$, g.l. = 15, $p < 0,0001$ para *Steinernema feltiae*).

En el muestreo de abril del campo P7 (*Steinernema feltiae*) se encuentran nematodos a todas las profundidades con una mayor presencia

En el muestreo de abril del campo P7 (*Steinernema feltiae*) se encuentran nematodos a todas las profundidades con una mayor presencia entre 5 y 10 cm (fig. 4.25), esta predominancia de nematodos a esta profundidad es mayor en el muestreo de septiembre con un 100% de larvas parasitadas a dicha profundidad (fig. 4.26), mientras que en el mes de octubre la mayor presencia de nematodos se sitúa a mayor profundidad (20-25 cm) con un 66,6% de larvas parasitadas y el restante 33,3% a 5-10 cm de profundidad (fig. 4.27). En el muestreo de enero se vuelven a encontrar nematodos a todas las profundidades, pero como es característico de esta especie, con una tendencia hacia la parte superficial del suelo (0-15 cm) (fig. 4.28).

En el caso de los nematodos heterorhabdítidos, el muestreo de abril indica una mayor presencia de nematodos entre 5-10 cm, pero con una importante aparición de nematodos a la máxima profundidad (25-30 cm) (fig. 4.25). En el muestreo de agosto y octubre nos encontramos una distribución con una elevada aparición de nematodos en todos los niveles, pero con una importante presencia en las profundidades mayores (figs. 4.26 y 4.27). La aparición de nematodos en el mes de enero se centra entre 5 y 20 cm de profundidad, mientras que en la superficie del suelo o a una profundidad mayor de 20 cm no son detectados (fig. 4.28).

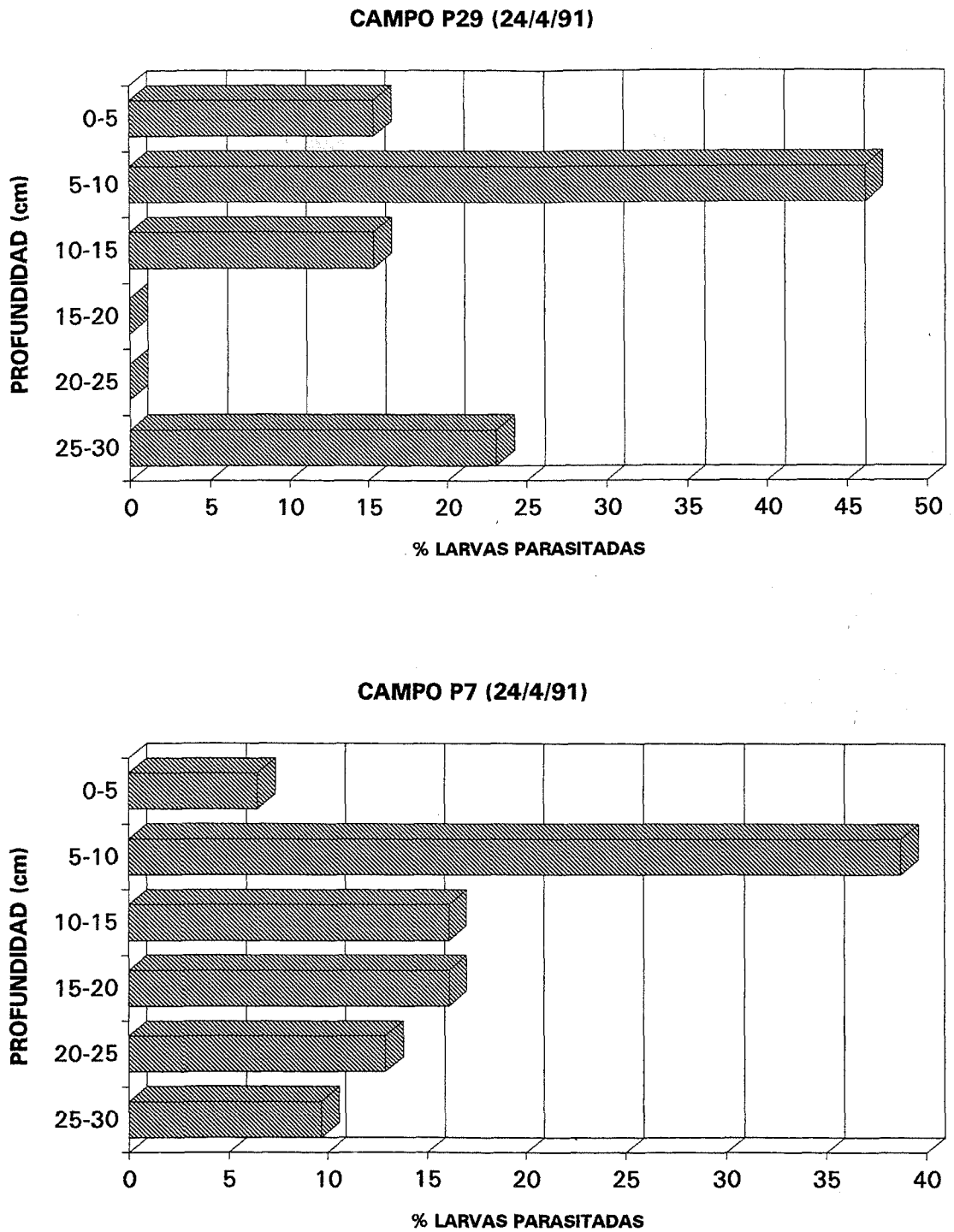


Figura 4.25. Distribución vertical de los nematodos en **PRIMAVERA**. (A) Campo P29: nematodos heterorhabdítidos. (B) Campo P7: nematodos steinernemátidos

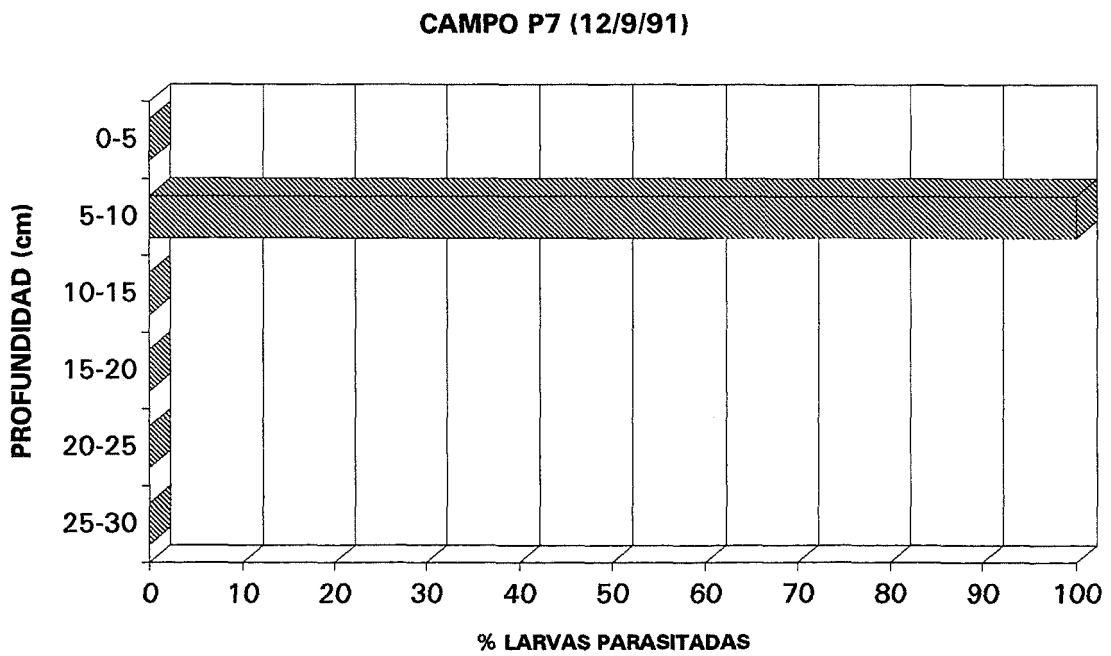
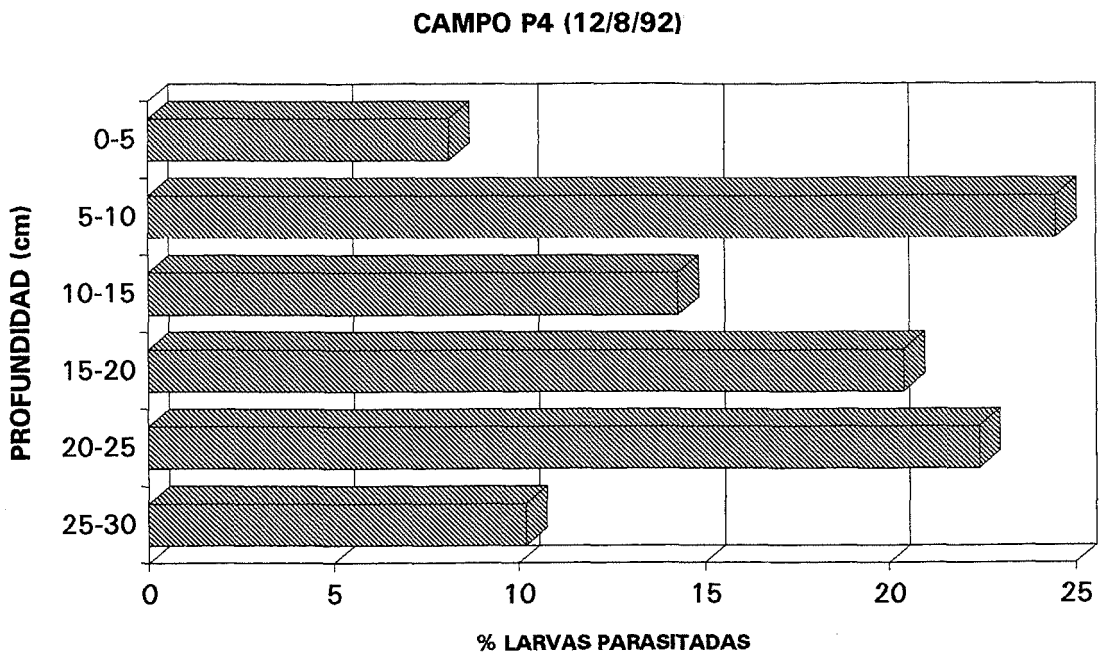


Figura 4.26. Distribución vertical de los nematodos en **VERANO**. (A) Campo P4: nematodos heterorhabdítidos. (B) Campo P7: nematodos steinernemátidos

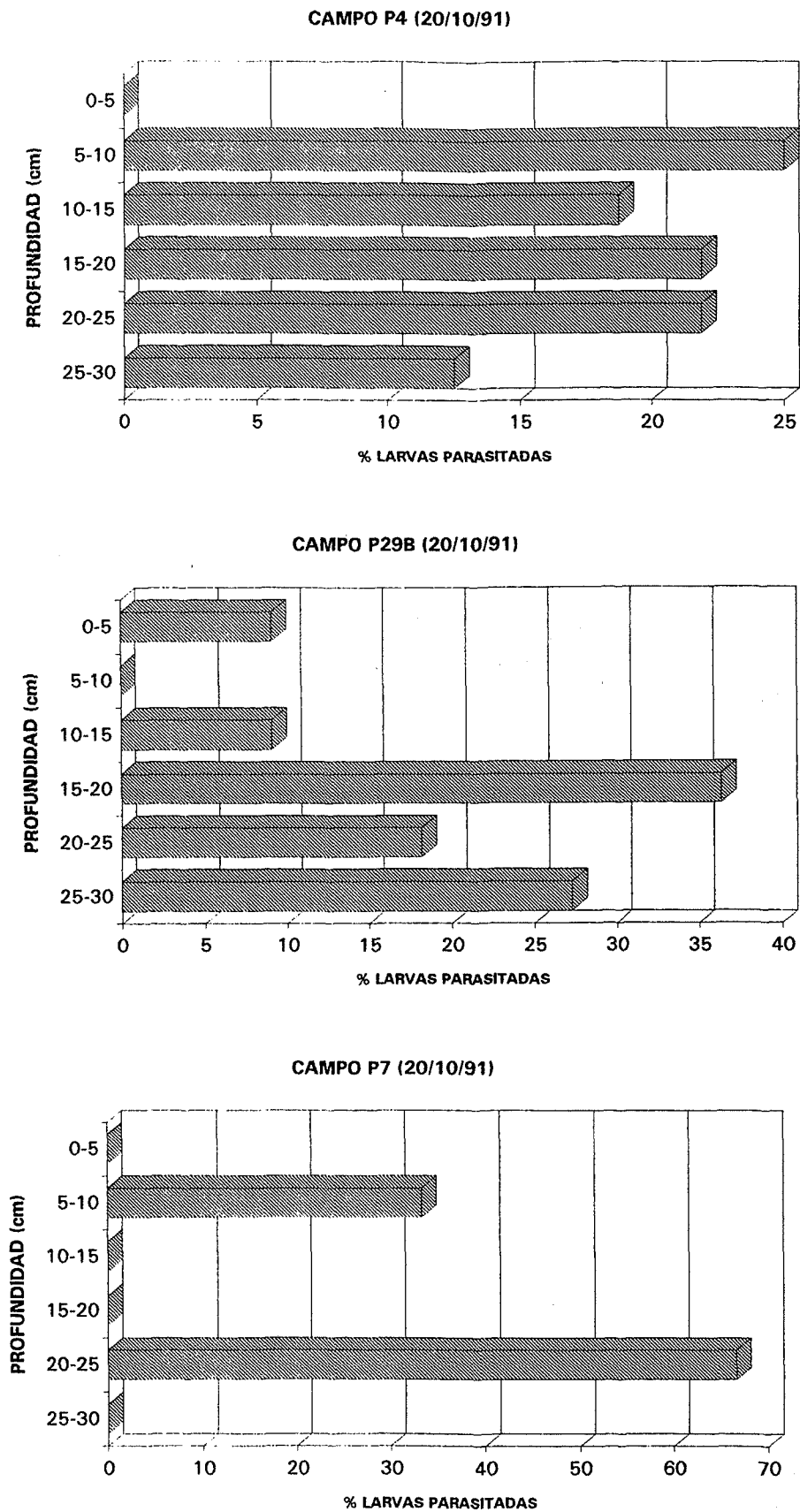


Figura 4.27. Distribución vertical de los nematodos en **OTOÑO**. (A) Campo P4: nematodos heterorhabdítidos. (B) Campo P29B: nematodos heterorhabdítidos. (C) Campo P7: nematodos steinernemátidos

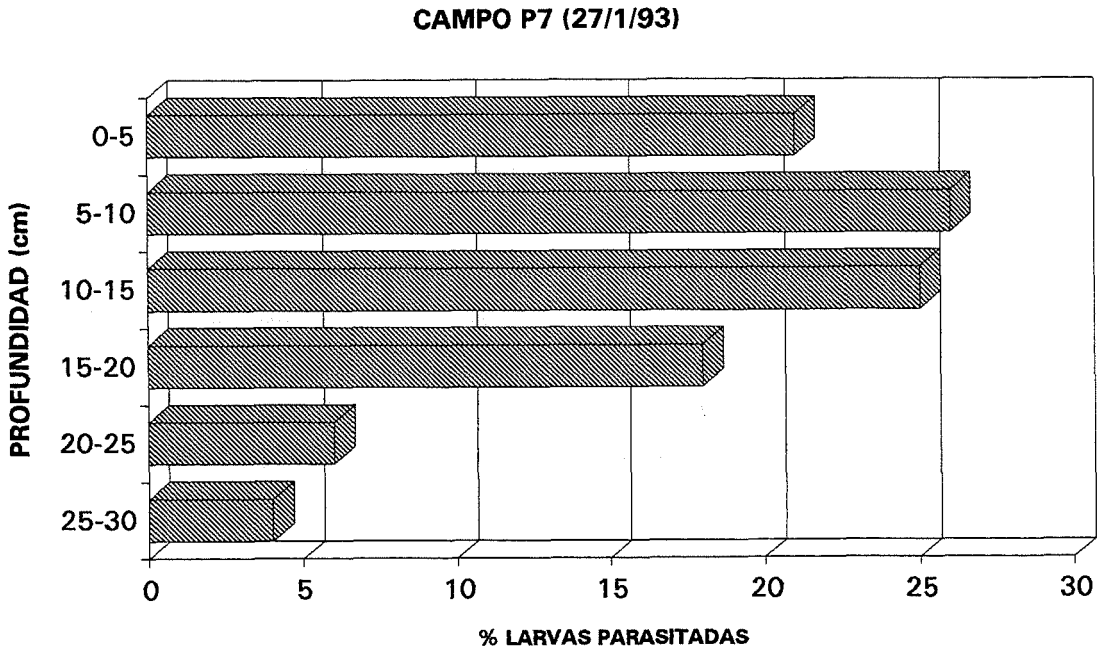
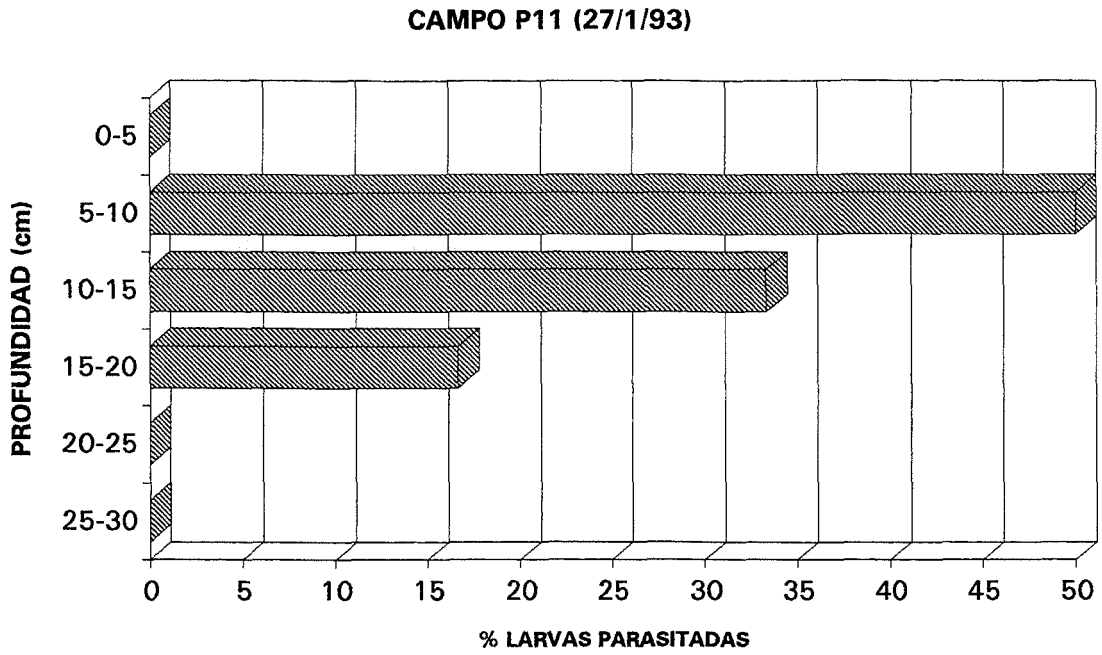


Figura 4.28. Distribución vertical de los nematodos en **INVIERNO**. (A) Campo P11: nematodos heterorhabdítidos. (B) Campo P7: nematodos steinernemátidos

4.2.4. Discusión.

En un capítulo anterior, al realizar el estudio de distribución puntual de nematodos entomopatógenos por la geografía catalana, no hemos detectado estacionalidad en la aparición de nematodos, entre los meses de primavera y otoño en los que se realizaron los muestreos. En este capítulo, que hemos realizado un estudio temporal a lo largo de más de todo un ciclo anual, podemos afirmar que existe una cierta estacionalidad en la aparición de las poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos en el suelo.

No obstante los resultados obtenidos en este capítulo coinciden en cierta medida con los obtenidos en el capítulo anteriormente referenciado, ya que no existen diferencias en la aparición de nematodos entomopatógenos entre los meses de primavera y otoño. La estacionalidad que hemos observado se basa en una menor aparición de nematodos durante los meses de verano cuando las temperaturas son mayores.

Esta estacionalidad observada en nuestro trabajo entra en contradicción con el estudio realizado por Hominick y Briscoe (1990), quienes no encontraron estacionalidad en la aparición del nematodo *Steinernema bibionis* en un seguimiento realizado durante 28 meses en dos regiones del sur de Inglaterra. Estos resultados contradictorios podrían explicarse debido a las diferencias climáticas entre las zonas analizadas en ambos estudios. El rango de temperatura en los meses de julio y agosto en el estudio de Hominick y Briscoe (1990) oscila entre 14,5-22 °C con una temperatura media de 17 °C, sin embargo en nuestro estudio tenemos temperaturas medias de 26,5 °C con unos máximos de 30,5 °C.

Las formas infectivas de los nematodos entomopatógenos, que no se alimentan cuando se encuentran en el suelo, deben contar con sus reservas de alimento como fuente de energía para localizar e infectar a sus hospedadores. En ausencia de insectos, la temperatura es el factor que más influye en la movilidad de los nematodos a través del efecto cinético en el metabolismo y por la estimulación/inhibición del sistema neuromuscular (Croll, 1972), lo que influye en la velocidad con que las reservas alimenticias son utilizadas y por lo tanto en la supervivencia de las formas infectivas en el suelo. Molyneux (1985) determinó que la

pobre supervivencia encontrada en los nematodos heterorhabdítidos y en *Steinernema feltiae* a temperaturas mayores de 15 °C parece estar relacionada con su grado de movilidad, consumo de las reservas alimenticias y aumento de la tasa de respiración de las formas infectivas (Burman y Pye, 1980) a estas temperaturas.

Geden y Axtell (1988) comprobaron como aumentos moderados pero sustanciales de la temperatura limitan la potencialidad de los nematodos como agentes de control biológico de plagas a causa de la reducción de su persistencia en el suelo. Gray y Johnson (1983) observaron un fuerte descenso de la supervivencia de *Steinernema carpocapsae* cuando las temperaturas del suelo superaban los 30 °C. Kung y Gaugler (1991) también determinaron como la temperatura del suelo tiene una importancia crucial en la supervivencia e infectabilidad de los nematodos steinernemátidos.

En nuestro estudio creemos que la temperatura es uno de los factores más determinantes para la baja tasa de aparición de nematodos entomopatógenos en los meses de julio y agosto. Este hecho no se debe a los efectos letales de las altas temperaturas, que no se dan en el interior del suelo, sino a la pérdida de persistencia de las formas infectivas, ya que, debido a este incremento de temperatura, gran parte de la población natural de nematodos consumen sus reservas antes de localizar un hospedador y mueren.

Del mismo modo consideramos que la temperatura influye sobre otros factores abióticos ambientales como la humedad, o bióticos como la presencia de más depredadores y patógenos de los nematodos que determinan una menor supervivencia de estos nematodos en el suelo.

Esta influencia de la temperatura en la baja aparición de nematodos en los meses de verano queda reflejada en la estacionalidad, ya comentada en un capítulo anterior, encontrada por diversos autores en sus prospecciones de nematodos entomopatógenos. Así Mracek (1980) en Checoslovaquia encontró una menor presencia de nematodos en verano que en el resto de las estaciones, al igual que Akhurst y Bedding (1986) en Tasmania (Australia), y Blackshaw (1988) en Irlanda.

Además de los factores ya comentados de la influencia de la temperatura en la menor presencia de nematodos entomopatógenos en el suelo, existen dos aspectos contrapuestos que merecen una especial consideración.

Por un lado, con el aumento de la temperatura durante los últimos meses de la primavera y primeros del verano se produce un incremento en el desarrollo de los insectos y por lo tanto probablemente una mayor disponibilidad de hospedadores para los nematodos. Este hecho implicaría una mayor multiplicación de los nematodos, lo que debería repercutir en una mayor persistencia de los nematodos en el suelo, aspecto éste que se contrapone con nuestros resultados. Por otro lado, esta mayor presencia de insectos en el entorno agrícola en que se desarrolló nuestro ensayo, está íntimamente relacionado con un aumento en la aplicación de productos fitosanitarios que podrían determinar una menor persistencia de los nematodos entomopatógenos en estos campos.

Otro aspecto que merece una atención especial al considerar la persistencia de los nematodos entomopatógenos en suelos de cultivo, es la influencia de las prácticas agrícolas como posibles destructoras de la estructura del suelo, lo cual puede alterar la persistencia natural de estos nematodos. Vänninem et al (1989) afirman que la supervivencia de los entomopatógenos en general depende en gran medida de unas condiciones ambientales estables, incluyendo la continua, o al menos regularmente repetida, presencia de insectos hospedadores. Blackshaw (1988) achaca la menor presencia de nematodos entomopatógenos en primavera, en una prospección realizada principalmente en suelos agrícolas de Irlanda, a que en esta época de año es cuando se inician las labores de cultivo y este hecho podría perjudicar la persistencia de los nematodos.

Nuestro estudio no parece corroborar estas afirmaciones. Veamos el ejemplo de uno de los campos analizados (P7) en que se detectó una población natural de *Steinernema feltiae*. En un principio este campo presentaba un cultivo en producción, con el aporte de posibles insectos hospedador que ello supone, al cabo de dos meses fue arrancado el cultivo y dejado en estas condiciones durante dos meses más, durante todo este periodo continuaron siendo detectados mensualmente los nematodos. Posteriormente la tierra fue arada, con ello se alteró la estructura del suelo, destruyendo el hábitat en que se encontraban protegidos los

nematodos y exponiéndolos a la acción de agentes nocivos (radiación solar ultravioleta, desecación, etc), y sin embargo continuaron apareciendo nematodos. En estas condiciones de barbecho permaneció el campo durante tres meses más, lo que implica que la tierra no fue regada en un periodo de más de seis meses y al no existir cultivo el aporte de insectos hospedador debió ser mínimo, y sin embargo continuaron apareciendo nematodos. Después de estos tres meses de barbecho se volvió a arar la tierra y dejar como barbecho otros tres meses más, durante todo este periodo continuaron apareciendo nematodos en nuestros muestreos mensuales, hasta el mes de julio y agosto en que no fueron detectados. En el mes de septiembre fue sembrada la tierra y volvieron a aparecer nematodos entomopatógenos al igual que al mes siguiente. Sin embargo, el muestreo realizado en agosto del año siguiente volvieron a no ser detectados los nematodos, mientras que en enero (15 meses después de la última detección) volvieron a aparecer los nematodos entomopatógenos en el suelo. Resultados similares se han obtenido en otros campos (ej. P29) con poblaciones naturales de *Heterorhabditis bacteriophora*.

Aunque consideramos que la presencia del cultivo en el campo puede influir en la persistencia de los nematodos entomopatógenos en el suelo, tanto por la acción de las raíces como parte importante en la formación de la estructura del suelo, dando una mayor humedad, porosidad y aireación, como por el efecto indirecto que supone la presencia de un cultivo hortícola: riegos regulares que evitarán la desecación excesiva del suelo, aporte regular de insectos que pueden ser utilizados como hospedadores por los nematodos, etc. Nuestros resultados no parecen reflejar estas influencias en la persistencia de los nematodos entomopatógenos en el suelo de los campos analizados.

Timper et al. (1988) consideran la posibilidad de que los adultos de insectos voladores actúen como mecanismo de dispersión de los nematodos entomopatógenos, al observar como *S. feltiae* puede ser transportado por los adultos de *Spodoptera exigua* en sus migraciones antes de provocar su muerte. Hominick y Briscoe (1990) especulan que este mecanismo de dispersión puede ser el causante de las variaciones observadas en su estudio temporal de persistencia de nematodos entomopatógenos en aquellos lugares donde en ocasiones detecta

nematodos, luego desaparecen y posteriormente vuelven a aparecer nematodos, afirmando que podría deberse a un efecto de extinción y posterior re-introducción de los nematodos por parte de estos adultos de insectos.

En nuestro estudio podríamos lanzar una hipótesis similar como explicación de la aparición de nematodos después de unas condiciones ciertamente adversas (suelos en barbecho, sin cubierta vegetal, sin riego, sin aporte de insectos). Podríamos especular que existe un aporte más o menos constante de nematodos por parte de adultos de insectos que han sido parasitados en otros campos con nematodos y que re-introducen los nematodos en nuestro campo. Sin embargo esta hipótesis no se sostiene en el caso del campo P7 descrito anteriormente, ya que en este campo se detectó la presencia de una población natural de *Steinernema feltiae*, siendo muy puntual su presencia en dicha zona. El resto de nematodos encontrados en la región analizada corresponden a *Heterorhabditis bacteriophora*, por lo que una posible re-introducción de nematodos en el campo P7 hubiera implicado una introducción de nematodos del género *Heterorhabditis*. Sin embargo durante todo el ensayo no existió ningún cambio de especie de las poblaciones naturales que se detectaron en un principio.

Este hecho nos indica que deben existir mecanismos adaptativos que permiten la persistencia de estas poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos en unas condiciones adversas.

Diversos autores han comprobado que las formas infectivas de los nematodos entomopatógenos no son infecciosas al mismo tiempo (Hominick y Reid, 1990, Bednarek y Nowicki, 1991, Fan y Hominick, 1991a), lo que sugiere que los nematodos han adoptado una estrategia de supervivencia al escalonar su periodo de infectabilidad. Fan y Hominick (1991a) observaron como el número de nematodos que infectan un hospedador decrece después de un periodo de almacenaje a bajas temperaturas, pero este fenómeno va seguido por un incremento con el paso del tiempo, lo cual indica que las bajas temperaturas inducen a algunos nematodos a entrar en un estado no infectivo o "diapausa". Fan y Hominick (1991b) también comprobaron como independientemente de la cepa de nematodo utilizada, la concentración, o el número de insectos hospedadores presentes, en unas condiciones óptimas de infectabilidad sólo el 30-40% de los nematodos infectan el hospedador. Este hecho no está del todo explicado, pero Kaya y Gaugler (1993) sugieren que si todos

los nematodos fuesen infecciosos al mismo tiempo, en ausencia de insectos para parasitar, los nematodos podría llegar a desaparecer localmente. Estos hechos explican que la presencia de fenómenos de diapausa o quiescencia (Ishibashi y Kondo, 1986a) en parte de los individuos de una población de nematodos puede alargar su periodo de persistencia en el campo. Womersley (1990, 1993) analizó la facultad de los nematodos entomopatógenos en presentar una quiescencia anhidrobiótica que podría explicar su persistencia en suelos sometidos a desecación. Este fenómeno de la anhidrobiosis ya ha sido observado en otros rhabdítidos como es el caso del nematodo antártico *Panagrolaimus davidi* (Wharton y Barclay, 1993).

Otro aspecto adaptativo que puede incidir en un aumento de la supervivencia de los nematodos entomopatógenos en el campo, es que las formas infectivas de muchas de las especies de estos nematodos presentan una doble cutícula, al conservar exteriormente la cutícula del segundo estadio. Gaur y Perry (1991) comprobaron como el nematodo *Rotylenchulus reniformis*, conservaba las cutículas de las sucesivas mudas y así podía permanecer en suelos muy secos, en un estado de quiescencia, y controlar su pérdida de agua para así sobrevivir a la desecación. Campbell y Gaugler (1991) observaron que esta doble cutícula juega un papel importante como protección contra la desecación en el caso de *Heterorhabditis bacteriophora*, aunque no en el caso de *Steinernema carpocapsae*. Esta doble cutícula también representa una gran protección para ambas especies frente al ataque de hongos nematófagos (Timper y Kaya, 1989).

La distribución vertical de los nematodos entomopatógenos, y su habilidad en encontrar al hospedador a diferentes profundidades ha sido puesta de manifiesto por diversos autores: Schroeder y Beavers, 1987; Gaugler et al. 1989a, b; Choo et al. 1989; Westerman y Godthelp, 1990; Nguyen y Smart, 1990; Shapiro et al, 1993. Algunos trabajos han señalado que ciertas especies del genero *Steinernema* prefieren buscar sus hospedadores en las proximidades de la superficie del suelo (Moyle y Kaya, 1981), mientras otras especies del género *Heterorhabditis*, están adaptadas a buscar a mayor profundidad en el perfil del suelo (Georgis y Poinar, 1983b). Los datos de nuestro trabajo corroboran estos criterios al observar como *Steinernema feltiae* presenta una mayor ocurrencia en las capas altas del perfil de suelo analizado (0-20 cm), mientras que *Heterorhabditis bacteriophora* presenta una mayor ocurrencia en las capas inferiores (hasta los 30 cm analizados).

Muchos animales edáficos tiene la capacidad de evitar los efectos dañinos de la temperatura o falta de humedad mediante migraciones en profundidad (Villani y Wright, 1990). Sin embargo la importancia de este comportamiento de evitación en la supervivencia de los nematodos entomopatógenos no ha sido estudiado hasta el momento. En nuestro trabajo hemos querido aportar una primera contribución a este estudio al analizar la distribución vertical de los nematodos steinernemátidos y heterorhabdítidos a lo largo de las cuatro estaciones analizadas. Los resultados obtenidos no reflejan una tendencia clara, quizás influenciados por la interferencia que supone las prácticas agrícolas que se realizan en estos suelos cultivados. Sin embargo parece observarse una cierta tendencia en el muestreo de septiembre, después de que las poblaciones de nematodos han estado sometidas a la acción nociva de las altas temperaturas en la superficie del suelo, a la aparición de los nematodos (tanto steinernemátidos como heterorhabdítidos) en las capas más profundas del suelo. En cambio en el muestreo de enero, en que la temperatura superficial no representa ningún problema para la supervivencia de los nematodos, parece existir una mayor presencia de nematodos entomopatógenos en la parte superficial del suelo.

Para concluir, podemos afirmar que las poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos poseen mecanismos adaptativos que les permiten sobrevivir y persistir durante un largo periodo de tiempo en su hábitat natural que es el suelo.

Sin embargo en muchos de los ensayos que se han realizado para determinar la persistencia de los nematodos entomopatógenos en el suelo (Ishibashi y Kondo, 1986b, Poinar y Hom, 1986, Agudelo-Silva et al. 1987, Nguyen y Smart, 1989, Kaya, 1990, Smits y Wieggers, 1991), se obtienen resultados generalmente desoladores, con una baja supervivencia de estos nematodos. Este hecho creemos que es debido a que, generalmente los ensayos que se suelen realizar para determinar esta persistencia en el suelo se basan en una introducción artificial de nematodos, para luego realizar un seguimiento de su supervivencia e intentar determinar los posibles factores (bióticos y abióticos) que pueden provocar su rápida desaparición.

Los resultados arrojados por nuestro estudio nos hacen pensar que cuando se analiza una población natural de nematodos entomopatógenos muchos de los aspectos considerados como vitales para la supervivencia de los nematodos introducidos artificialmente, y que provocan su baja persistencia en el suelo, dejan de ser tan determinantes. Las poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos presentan una mejor adaptación a las condiciones cambiantes o adversas propias del medio donde se encuentran, por lo que presentan una persistencia muy superior a la obtenida con poblaciones de nematodos introducidos artificialmente.

**5.- ESTUDIO TAXONÓMICO DE LOS NEMATODOS
ENTOMOPATÓGENOS**

5.1 INTRODUCCIÓN

5.1.1. Familia Steinernematidae.

Steiner (1923) aisló en Alemania el primer nematodo steinernemátido y lo describió como *Aplectana kraussei*, en el orden Oxyurata. Según Steiner este nematodo podía ser reconocido por "la falta de estructuras semejantes a valvas en el bulbo basal del esófago". Travassos (1927), en base a este carácter, colocó esta especie en un nuevo género *Steinernema*, pasando a ser *Steinernema kraussei* Steiner, 1923, la especie tipo de este nuevo género. Sin embargo la ausencia de estructuras semejantes a valvas en el bulbo basal era insuficiente para reconocer el género *Steinernema* y no se volvió a asignar ninguna especie a este género.

En 1929, Steiner describe *Neoaplectana glaseri*, y observa que en este género el bulbo terminal también es bastante tenue y la cadena de valvas es indistinguible. En base a estos caracteres designa a esta especie como especie tipo del nuevo género *Neoaplectana* dentro del orden Oxyurata y cerca del género *Steinernema*.

Filipjev (1934) observó las semejanzas entre estos dos géneros, los extrae de la familia Oxyuridae y los sitúa en una nueva subfamilia Steinerneminae dentro de la familia Anguillulidae, orden Anguillulata (orden conocido hoy en día como Rhabditida Chitwood, 1933). Esta subfamilia fue elevada a la categoría de familia Steinernematidae por Chitwood y Chitwood en 1937.

A pesar de que Filipjev (1934) sugirió que *Steinernema* y *Neoaplectana* pueden ser probablemente congéneres, ambos géneros se han considerado como géneros diferentes hasta la publicación del trabajo de Wouts et al. (1982).

En la diagnosis original del género *Neoaplectana*, existían dos caracteres que separaban este género del género *Steinernema*:

- En la región cefálica el número y disposición de las papilas sensitivas era muy diferente. *Steinernema* presentaba un círculo de 6 papilas labiales y 4 papilas submediales o cefálicas, mientras que *Neoaplectana* presentaba dos círculos de seis papilas cada uno.

- En la región caudal, Steiner (1929) comenta: "en *Neoaplectana* el número de las papilas copulatorias es mayor... y su disposición es

diferente".

Sin embargo estudios críticos posteriores sobre la especie tipo original *Steinernema kraussei* (únicamente 5 machos y 18 hembras) reveló la no existencia de diferencias con *Neoaplectana* en cuanto al número y disposición de las papilas labiales, cefálicas y genitales (en los machos), por lo que dichos caracteres no tienen significación en la diagnosis de ambos géneros (Wouts et al. 1982). Consecuentemente, el género *Steinernema* fue reconocido como el género válido y el género *Neoaplectana* como sinónimo.

Según Poinar (1990) en la descripción original de *S. kraussei* se incluyeron dos especies diferentes por lo que la especie *kraussei* permanece como especie "*inquirenda*" y el nombre *kraussei* como "*nomen dubium*". Por ello, para evitar posibles confusiones, la especie tipo del género *Steinernema* es *S. glaseri*.

Otra gran confusión existente entre las especies del género *Steinernema* es el doble uso del nombre específico "*feltiae*" que se ha dado en la literatura. *S. feltiae* fue descrito por Filipjev (1934). Posteriormente, Stanuszek (1970) aisló lo que él determinó como *S. feltiae*, y cruzó su *S. feltiae* con la cepa DD-136 de *S. carpocapsae*, este hecho hizo que considerase *S. carpocapsae* como sinónimo de *S. feltiae* (Stanuszek, 1974a,b). Esta sinonimia también fue aceptada por Wouts et al (1982). Poinar (1989) demostró que la cepa aislada por Stanuszek era en realidad *S. carpocapsae*, por lo que la sinonimia no es válida. Además, Kozodoi et al (1987) y Poinar (1989) mostraron que la especie *S. feltiae* originalmente descrita por Filipjev (1934) es coespecífica con *S. bibionis* Bovien, 1937, por lo que *S. feltiae* tiene prioridad y reemplaza a *S. bibionis*.

Estas confusiones han provocado que la especie *carpocapsae* haya sido referida en la literatura como *S. feltiae* entre los años 1983 y 1989, pero el nombre *S. feltiae* continúa siendo válido ya que sustituye a *S. bibionis*.

En muchos estudios es muy difícil determinar de que nematodo se trata cuando se utiliza el término *S. feltiae*, a menos de que se especifique la cepa utilizada. Para evitar estos problemas, algunos autores en sus artículos usan el término *S. feltiae* (= *S. bibionis*). Esto demuestra la importancia de dar información de la cepa utilizada en todos los estudios realizados con nematodos entomopatógenos.

1) Posición Taxonómica.

Filum: Nematoda Chitwood, 1950.

Clase: Secernentea von Linstow, 1905.

Orden: Rhabditida (Oerly, 1880) Chitwood, 1933.

Suborden: Rhabditina (Oerly, 1880) Chitwood, 1933.

Superfamilia: Rhabditoidea (Oerly, 1880).

Familia: Steinernematidae (Filipjev, 1934) Chitwood y Chitwood, 1937.

Género tipo: *Steinernema* Travassos, 1927.

sin.: *Neoaplectana* Steiner, 1929.

Especie tipo: *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929).

Otras especies:

S. affinis (Bovien, 1937)

S. anomali (Kozodoi, 1984)

S. carpocapsae (Weiser, 1955)

S. feltiae (Filipjev, 1934)
sensu Filipjev

S. glaseri (Steiner, 1929)

S. intermedia (Poinar, 1985)

S. kushidai Mamiya, 1988

S. neocurtillis Nguyen y Smart, 1992

S. rara (Doucet, 1986)

S. ritleri Doucet, 1990

S. scapterisci Nguyen y Smart, 1990

Sinonimias:

¿? *N. arenaria* Artyukhovsky, 1967

N. belorussica Veremchuk, 1966

N. chresima Steiner in Glaser, McCoy y Girth, 1942.

N. dutkyi Turco et al., 1971

N. dutkyi Jackson, 1965

N. dutkyi Welch, 1963

N. elateridicola Veremchuk, 1970

N. semiothisae Veremchuk y Litvinchuk, 1971

N. agriotos Veremchuk, 1969

N. feltiae Filipjev sensu Stanuszek, 1974

N. bibionis Bovien, 1937

N. bothynoderi Kirjanova y Puchkova, 1955

N. georgica Kakulia y Veremchuk, 1965

N. kirjanovae Veremchuk, 1969

N. leucaniae Hoy, 1954

N. menozzii Travassos, 1932

2) Descripción de la Familia Steinernematidae.

Los nematodos steinernemátidos son parásitos obligados de una gran variedad de insectos. Presentan un ciclo biológico con un tercer estadio juvenil infectivo (a menudo en el interior de la cutícula del segundo estadio larvario) que contienen células de una bacteria simbiote (*Xenorhabdus* sp.) en el interior de su tubo digestivo. Estas formas infectivas son capaces de sobrevivir en el medio, entrar en el interior de su hospedador y desarrollarse en machos o en hembras dando dos o más generaciones en el interior del hospedador.

A.- Adultos: Los steinernemátidos presentan sólo generaciones anfimíticas encontrándose únicamente en el interior de los cadáveres de los insectos que parasitan.

No presentan estilete. Poseen seis labios parcial o completamente fusionados; cada labio con una papila labial en su extremo. Se distinguen cuatro papilas cefálicas y dos anfidios laterales en ocasiones inconspicuos. La cutícula es lisa. La cabeza es redondeada con el estoma parcialmente colapsado, y la porción posterior rodeada por tejido de la faringe. Los queilorabdiones generalmente son pronunciados y representados por un grueso anillo de material esclerotizado revistiendo la área fusionada de los labios. Los prorabdiones y mesorabdiones usualmente están presentes, pero los metarabdiones generalmente son vestigiales. La faringe es muscular con un procorpus cilíndrico, en ocasiones con un metacorpus hinchado, seguido por un estrecho istmo que se expande en el bulbo basal que contiene una línea reducida de valvas. El anillo nervioso es conspicuo y generalmente rodeando al istmo de la faringe. El poro excretor es ventral siendo claramente distinguible. El campo lateral y los fasmidos son inconspicuos.

- **Hembras:** Anfidelfas con ovarios opuestos retroflexos. La vulva presenta unos labios aparentes y está situada en la mitad del cuerpo, siendo funcional durante el acoplamiento y durante el primer periodo de la oviposición. La vagina se deteriora en las hembras mayores, las cuales se convierten en ovovivíparas. Las formas larvarias que eclosionan en el interior de las hembras consumen el contenido de su cuerpo provocando la muerte de las mismas. El tamaño de las hembras es variable en función de la cantidad de alimento disponible.

- **Machos:** Testículo simple, retroflexo. Las espículas son pares y separadas. El gubernáculo está presente, pero la bursa es ausente. Cola con o sin mucrón (prolongación cuticular del extremo de la cola), presenta generalmente 23 papilas genitales (excepcionalmente 21). Los espermatozoides, de forma ameboide, comienzan su maduración en los testículos del cuarto estadio larvario.

B- Estados infectivos "dauer": La larva "dauer" o estado infectivo es el tercer estadio larvario, a menudo todavía en el interior de la cutícula del segundo estadio. Las formas infectivas son más estrechas que las demás formas juveniles parasíticas. La cola es puntiaguda. La cutícula presenta de cuatro a ocho estriaciones longitudinales (bandas del campo lateral). La boca y el ano están cerrados y la faringe e intestino colapsados. El poro excretor es anterior al anillo nervioso. Las células de la bacteria simbiote se encuentran en la región anterior del intestino.

3) **Diagnosis.**

Diversos factores han hecho que la diagnosis de las especies de esta familia de nematodos sea tremendamente dificultosa. El primero es que muchas de las primeras descripciones no reflejan ciertos caracteres que hoy en día son considerados importantísimos en la determinación de estos nematodos. El segundo factor, y más importante, es la extrema variabilidad, tanto cuantitativa como cualitativa, dentro de una misma población de nematodos.

Debido a esta gran variabilidad son pocos los caracteres que pueden ser utilizados en la clasificación de estas especies, no obstante existen diversas claves diferenciadoras de las especies de steinernemátidos. A continuación pasaremos a exponer la clave de Poinar (1990) que es la más aceptada y utilizada en la actualidad para distinguir los nematodos de esta familia.

Clave para las formas infectivas de *Steinernema* spp. según Poinar (1990). (Todas las unidades están expresadas en micras).

1. Longitud media de las formas infectivas mayor de 1000 (rango= 724-1500) ----- 2
- 1'. Longitud media de las formas infectivas menor de 1000 (rango= 438-1200) ----- 3

2. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 87-110; índice D varia de 0,58-0,71 ----- *S. glaseri* (Steiner).
- 2'. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 76-86; índice D varia de 0,52-0,59 ----- *S. anomali* (Kozodoi).

3. Longitud media de las formas infectivas de 800-900 (rango= 736-950) ----- *S. feltiae* (Filipjev).
- 3'. Longitud de las formas infectivas menor de 800 (rango= 438-800) ----- 4

4. Longitud media de las formas infectivas de 660-700 (rango= 608-800) ----- 5
- 4'. Longitud media de las formas infectivas de 500-600 (rango= 438-662) ----- 6

5. Con espina refractiva en el extremo de la cola ----- *S. affinis* (Bovien).
- 5'. Sin espina refractiva en el extremo de la cola ----- *S. intermedia* (Poinar).

6. Distancia media de la cabeza a la base de la faringe de 115-127 (rango= 103-190) ----- 7
- 6'. Distancia media de la cabeza a la base de la faringe de 102-111 (rango= 89-120) ----- 8

7. Índice E = 0,73 (rango= 0,60-0,80) ----- *S. scapterisci* Nguyen y Smart.
- 7'. Índice E = 0,60 (rango= 0,54-0,66) ----- *S. carpocapsae* (Weiser).

8. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 38, rango= 32-40: longitud media de las formas infectivas de 511, rango= 443-573: índice D = 0,35 (rango= 0,30-0,39) ----- *S. rara* (Doucet).
- 8'. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 46, rango= 42-50: longitud media de las formas infectivas de 589, rango= 524-662: índice D = 0,41 (rango= 0,38-0,44) ----- *S. kushidai* Mamiya.

Clave para los machos de *Steinernema* spp. según Poinar (1990). (Todas las unidades están expresadas en micras).

1. Extremo de la cola conteniendo un mucrón cuticular (= espina) ----- 2
- 1'. Extremo de la cola sin el mucrón cuticular (= espina) ----- 5
2. Longitud media del mucrón cuticular de la cola (n=10) de 1-4; capítulum de la espícula claramente distinguible ----- 3
- 2'. Longitud media del mucrón cuticular de la cola (n=10) de 4-13; capítulum de la espícula no distinguible ----- *S. feltiae*.
3. Longitud del mucrón de la cola igual o inferior al de las papilas genitales; espículas sin color, sin punta; el extremo distal del gubernáculo sobrepasa la punta de las espículas ----- *S. affinis*.
- 3'. Longitud del mucrón de la cola más largo que las papilas genitales; espículas amarillas, con o sin punta; extremo distal del gubernáculo no sobrepasa la punta de las espículas ----- 4
4. Espículas en punta; seis pares de papilas genitales; espículas con un arco ventral prominente ----- *S. carpocapsae* y *S. scapterisci* (no se han descrito los caracteres de los machos que separan ambas especies).
- 4'. Espículas sin punta; cinco pares de papilas genitales; espículas con un arco ventral (rostrum) inconspicuo ---- *S. rara*.

5. Extremo de la cola redondeado; espículas con una muesca o abultamiento en la punta, moderadamente curvadas (ángulo entre el cálamo y la lámina generalmente entre 50 y 70°) ----- 6
- 5'. Extremo de la cola en punta; espículas sin muesca o abultamiento en la punta, fuertemente curvadas (ángulo entre el cálamo y la lámina generalmente entre 70° y 90°) ----- 7
6. Punta de las espículas abultadas ----- *S. anomali.*
- 6'. Punta de las espículas con una muesca ----- *S. glaseri.*
7. Gubernáculo con un estrechamiento en su parte media, extremo distal sin rodear a la punta de las espículas.
----- *S. kushidai.*
- 7'. Gubernáculo sin el estrechamiento en su parte media, el extremo distal rodea la punta de las espículas --- *S. intermedia.*

Tabla 5.1. Biometría de las formas infectivas de las especies de la familia Steinernematidae.

	<i>S. carpocapsae</i> (Weiser)	<i>S. feltiae</i> (Filipjev)	<i>S. intermedia</i> (Poinar)	<i>S. affinis</i> (Bovien)
Medidas: (en micras)	(según Poinar, 1986)	(según Poinar, 1986)	(según Poinar, 1986)	(según Poinar, 1988)
Longitud total	558 (438-650)	849 (736-950)	671 (608-800)	693 (608-800)
Anchura máxima	25 (20-30)	26 (22-29)	29 (25-32)	30 (28-34)
Distancia: cabeza-poro excretor	38 (30-56)	62 (53-67)	65 (59-69)	62 (51-69)
Distancia: cabeza-anillo nervioso	85 (76-99)	99 (88-112)	93 (85-99)	95 (88-104)
Distancia: cabeza-base faringe	120 (103-190)	136 (115-150)	123 (110-133)	126 (115-134)
Longitud cola	53 (46-61)	81 (70-92)	66 (53-74)	66 (64-74)
Índice A	21 (19-24)	31 (29-33)	23 (20-26)	23 (21-28)
Índice B	4,4 (4,0-4,8)	6,0 (5,3-6,4)	5,3 (5,0-6,0)	5,5 (5,1-6,0)
Índice C	10,0 (9,1-11,2)	10,4(9,2-12,6)	10,0 (9,3-10,8)	10,5 (9,5-11,5)
Índice D	0,26 (0,23-0,28)	0,45 (0,42-0,51)	0,51 (0,48-0,58)	0,49 (0,43-0,53)
Índice E	0,60 (0,54-0,66)	0,78 (0,69-0,86)	0,96 (0,89-1,08)	0,94 (0,74-1,08)

Índice A: Longitud total / Anchura máxima. Índice B: Longitud total / Distancia cabeza-base faringe. Índice C: Longitud total / Longitud cola.

Índice D: Distancia cabeza-poro excretor / Distancia cabeza-base faringe. Índice E: Distancia cabeza-poro excretor / Longitud cola.

Tabla 5.1. (continuación).

	<i>S. scapterisci</i> Nguyen y Smart, 1990	<i>S. rara</i> (Doucet) (según Doucet y Poinar, 1986)	<i>S. ritleri</i> Doucet, 1990	<i>S. kushidai</i> Mamiya, 1988
Medidas: (en micras)				
Longitud total	572 (517-609)	511 (443-573)	510 (470-590)	589 (524-662)
Anchura máxima	24 (18-30)	23 (18-26)	21,5 (19-24)	26 (22-31)
Distancia: cabeza-poro excretor	39 (36-48)	38 (32-40)	43 (40-46)	46 (42-50)
Distancia: cabeza-anillo nervioso	97 (83-106)	70 (60-88)	73 (68-85)	76 (70-84)
Distancia: cabeza-base faringe	127 (113-134)	102 (89-120)	91,5 (85-95)	11 (106-120)
Longitud cola	54 (48-60)	51 (44-56)	49 (44-54)	50 (44-59)
Índice A	-	23 (20-26)	24,1 (19,5-30,9)	22,5 (19-25)
Índice B	-	4,7 (4,1-5,6)	5,5 (4,9-6,3)	5,3 (4,9-5,9)
Índice C	-	9,8 (8,7-11,0)	10,6 (9,2-13,1)	11,7 (9,9-12,9)
Índice D	0,31 (0,27-0,40)	0,35 (0,30-0,39)	0,46 (0,44-0,50)	0,41 (0,38-0,44)
Índice E	0,73 (0,60-0,80)	0,72 (0,63-0,80)	0,88 (0,79-0,97)	0,92 (0,84-0,95)

Índice A: Longitud total / Anchura máxima. Índice B: Longitud total / Distancia cabeza-base faringe. Índice C: Longitud total / Longitud cola.

Índice D: Distancia cabeza-poro excretor / Distancia cabeza-base faringe. Índice E: Distancia cabeza-poro excretor / Longitud cola

Tabla 5.1. (continuación).

	<i>S. glaseri</i> (Steiner)	<i>S. anomali</i> (Kozodoi)	<i>S. neocurtilis</i> Nguyen y Smart, 1992
Medidas: (en micras)	(según Poinar 1986)	(según Poinar y Kozodoi, 1988)	
Longitud total	1130 (864-1448)	1034 (724-1408)	885 (741-988)
Anchura máxima	43 (31-50)	46 (28-77)	34 (28-42)
Distancia: cabeza-poro excretor	102 (87-110)	83 (76-86)	18 (14-22)
Distancia: cabeza-anillo nervioso	120 (112-126)	109 (100-120)	107 (100-119)
Distancia: cabeza-base faringe	162 (158-168)	138 (123-160)	144 (130-159)
Longitud cola	78 (62-87)	75 (64-84)	80 (64-97)
Índice A	29 (26-35)	26 (17-34)	26 (22-29)
Índice B	7,3 (6,3-7,8)	7,6 (5,9-10,8)	6 (5-7)
Índice C	14,7 (13,6-15,7)	13,8 (9,4-16,9)	11 (9-14)
Índice D	0,65 (0,58-0,71)	0,55 (0,52-0,59)	0,12 (0,10-0,15)
Índice E	1,31 (1,22-1,38)	1,19 (1,06-1,30)	0,23 (0,18-0,30)

Índice A: Longitud total / Anchura máxima. Índice B: Longitud total / Distancia cabeza-base faringe. Índice C: Longitud total / Longitud cola.

Índice D: Distancia cabeza-poro excretor / Distancia cabeza-base faringe. Índice E: Distancia cabeza-poro excretor / Longitud cola.

5.1.2. Familia Heterorhabditidae.

La familia Heterorhabditidae fue introducida por Poinar (1975) con la especie *Heterorhabditis bacteriophora* como especie tipo. Estos nematodos son parásitos obligados de insectos con una biología similar a los steinernemátidos excepto que presentan un ciclo heterogénico con una generación de hembras hermafroditas y otra de hembras anfimícticas. Sólo presenta un único género *Heterorhabditis*.

1) Posición Taxonómica.

Filum: Nematoda Chitwood, 1950.

Clase: Secernentea von Linstow, 1905.

Orden: Rhabditida (Oerly, 1880) Chitwood, 1933.

Suborden: Rhabditina (Oerly, 1880) Chitwood, 1933.

Superfamilia: Rhabditoidea (Oerly, 1880).

Familia: Heterorhabditidae Poinar 1976

Género tipo: *Heterorhabditis* Poinar 1976

sin. *Chromonema* Khan, Brooks y Hirschmann, 1976

Especie tipo: *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 1976

Otras especies:

H. bacteriophora Poinar 1976

H. indicus Poinar, Karunakar y David,
1992

H. medigis Poinar, Jackson y Klein, 1987

Sinonimias:

H. zealandica (Poinar, 1990)

H. heliothidis (Khan, Brooks y Hirschmann,
1976) Poinar, Thomas y Hess, 1977

2) Descripción de la familia Heterorhabditidae.

Nematodos parásitos obligados capaces de infectar una gran variedad de insectos. Ciclo biológico con un tercer estadio infectivo a menudo encerrado en la cutícula del segundo estadio larvario. Las células de la bacteria simbiote (*Photorhabdus luminescens*) se encuentran a lo largo del tracto alimentario de las formas infectivas. Estos estadios infectivos son capaces de entrar en el interior del hospedador y desarrollarse en hembras hermafroditas.

- **Adultos:** Los adultos hermafroditas y anfimícticos se encuentran únicamente en el interior de los cadáveres de los insectos infectados. La primera generación de adultos está formada únicamente por hembras hermafroditas, mientras que la segunda (o sucesivas generaciones) son anfimícticas, presentando tanto hembras como machos.

Estos nematodos no presentan estilete, y poseen la cabeza truncada o ligeramente redondeada. Poseen seis papilas labiales con dos papilas adicionales en la base de cada labio submedial; labios laterales con una única papila cefálica y la abertura circular del anfidio. Los queilorabdiones están presentes como un anillo refráctil en la región anterior del estoma. La región posterior del estoma está colapsado, con los pro-, meso-, y metarabdiones reducidos. La región anterior de la faringe rodea la base del estoma. La faringe presenta un procorpus ancho y cilíndrico, estrechándose a nivel del istmo y posteriormente se expande en un bulbo basal con las valvas muy reducidas. El anillo nervioso está diferenciado, generalmente localizado cerca de la mitad del istmo en las hembras y sobre el bulbo basal en los machos.

- **Hembras:** Las hembras de los heterorhabdítidos son anfidélficas con ovarios opuestos retroflexos, cuya parte retroflexa se extiende hasta sobrepasar la abertura de la vulva que se encuentra en posición media. Las hembras son ovíparas llegando a ser ovovivíparas al final de su vida. Las hembras hermafroditas presentan esperma en la región próxima del ovotestis y una vulva funcional. Las hembras anfimícticas poseen una vulva no funcional para la puesta de los huevos, siendo únicamente funcional durante el acoplamiento. Las hembras fecundadas a menudo presentan un depósito (tapón copulatorio) rodeando la abertura vulvar. La cola acaba en punta, generalmente con una protuberancia anal o postanal.

- **Machos:** Los machos sólo son producidos durante la generación anfimítica. Presentan un testículo simple y retroflexo, espículas pares bastante rectas, y separadas y un gubernáculo delgado. A diferencia de los machos de la familia anterior, los heterorhabdítidos presentan una bursa abierta, pelodera o levemente leptodera, asistida por un complemento de 9 papilas genitales.

- **Estados infectivos "dauer":** Tercer estadio juvenil, se encuentra siempre en el interior de la cutícula del segundo estadio larvario. Las formas que emigran del cadáver del hospedador parasitado son formas juveniles de segundo estadio, con una cutícula simple, que rápidamente se transforma en una doble cutícula al desarrollarse el tercer estadio larvario en su interior. La cutícula del segundo estadio presenta numerosas líneas longitudinales, mientras que la cutícula del tercer estadio infectivo presentan un campo lateral muy aparente formado por dos bandas longitudinales.

La boca y el ano, tanto del segundo como del tercer estadio libre están cerrados, en el tercer estadio larvario la región cefálica presenta una armadura dorsal (protuberancia dorsal, gancho o espina) y en algunos casos, modificaciones adicionales en la superficie subventral (callo, pequeña espina, gancho, o engrosamiento). La faringe y el intestino están colapsados. El poro excretor está situado en posición posterior al anillo nervioso. Las células de la bacteria simbionte se encuentran a lo largo de todo el tracto alimentario. La cola de las formas infectivas es puntiaguda.

3) **Diagnosis.**

Debido a la menor variabilidad de los caracteres morfológicos de los nematodos pertenecientes a esta familia con respecto a la familia Steinernematidae estudiada anteriormente, para la determinación específica de los heterorhabdítidos es suficiente el estudio morfológico de las formas infectivas, ya que presentan una gran estabilidad en los caracteres utilizados en su clasificación.

Clave para las formas infectivas de *Heterorhabditis* spp. (según Poinar, 1992)

1. Longitud media menor de 570 (rango= 479-573);
media del índice E menor de 1,03 (rango= 0,83-1,03);
media del índice F menor de 0,22 (rango=0,18-0,22)
----- ***H. indicus*** Poinar, 1992.
- 1'. Longitud media mayor de 570 (rango= 512-671);
media del índice E mayor de 1,03 (rango= 1,03-1,20);
media del índice F mayor de 0,22 (rango=0,22-0,36) ----- **2**
2. Longitud media menor de 620 (rango= 512-671);
distancia media de la cabeza a la base de la faringe menor de 135 (rango= 100-139) ---***H. bacteriophora*** Poinar, 1976.
- 2'. Longitud media mayor de 620 (rango= 570-800);
distancia media de la cabeza a la base de la faringe mayor de 135 (rango= 135-147) ----- **3**
3. Longitud media menor de 720 (rango= 570-740);
distancia media de la cabeza a la base de la faringe de 140 (rango= 135-147) ----- ***H. zealandica*** Poinar, 1990.
(considerada sinonimia de *H. bacteriophora*)
- 3'. Longitud media mayor de 720 (rango= 736-800);
distancia media de la cabeza a la base de la faringe de 155 (rango= 147-160) ----- ***H. medigis*** Poinar, Jackson y Klein, 1987.

Tabla 5.2. Biometría de las forma infectivas de las especies de la familia Heterorhabditidae.

	<i>H. bacteriophora</i> Poinar, 1976	<i>H. medigis</i> Poinar, Jackson y Klein, 1987	<i>H. indicus</i> Poinar, 1992
Medidas: (en micras)			
Longitud total	588 (512-671)	768 (736-800)	528 (479-573)
Anchura máxima	23 (18-31)	29 (27-32)	20 (19-22)
Distancia: cabeza-poro excretor	103 (87-110)	131 (123-142)	98 (88-107)
Distancia: cabeza-anillo nervioso	85 (72-93)	109 (104-115)	82 (72-85)
Distancia: cabeza-base faringe	125 (100-139)	155 (147-160)	117 (109-123)
Longitud cola	98 (83-112)	119 (112-128)	101 (93-109)
Índice A	25 (17-30)	26 (23-28)	26 (25-27)
Índice B	4,5 (4,0-5,1)	5,0 (4,6-5,9)	4,5 (4,3-4,8)
Índice C	6,2 (5,5-7,0)	6,5 (6,1-6,9)	5,3 (4,5-5,6)
Índice D	0,84 (0,76-0,92)	0,85 (0,81-0,91)	0,84 (0,79-0,90)
Índice E	1,12 (1,03-1,30)	1,10 (1,03-1,20)	0,94 (0,83-1,03)
Índice F	0,25 (0,22-0,36)	0,25 (0,23-0,28)	0,20 (0,18-0,22)

Índice A: Longitud total / Anchura máxima. Índice B: Longitud total / Distancia cabeza-base faringe. Índice C: Longitud total / Longitud cola.

Índice D: Distancia cabeza-poro excretor / Distancia cabeza-base faringe. Índice E: Distancia cabeza-poro excretor / Longitud cola.

Índice F: Anchura máxima / Longitud cola.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Material recogido.

Los nematodos analizados en este estudio taxonómico provienen de las muestras de suelo recogidas, tanto en el muestreo general realizado en diversos hábitat por todo Cataluña, como del muestreo más puntual realizado en las dos zonas hortícolas (Baix Llobregat y Maresme) analizadas en el capítulo anterior.

A lo largo de todo este capítulo, emplearemos el término "**Muestra**" al referirnos al conjunto de las cinco extracciones de tierra que se realizaban en una área analizada, o al conjunto de tres extracciones que se tomaban en un campo de cultivo hortícola. También introducimos el concepto de "**Cepa**" para designar la población de una especie de nematodo que hemos seleccionado de una de las extracciones de una muestra, y que hemos cultivado *in vivo* y mantenido en el laboratorio para realizar su estudio taxonómico.

5.2.2. Procesado de los nematodos.

Los nematodos entomopatógenos analizados en este capítulo han sido recogidos mediante la técnica de "trampa de *Galleria*" de Bedding y Akhurst (1975). Una vez aislados fueron reproducidos *in vivo* sobre larvas de últimos estadios de *Galleria mellonella* siguiendo la técnica de Dutky et al (1964).

Para la obtención de adultos de primera generación se disecaban las larvas de *Galleria mellonella* a los 4 o 5 días de haber sido parasitadas. Los adultos de la segunda generación se han obtenido mediante la disección de las larvas del séptimo al décimo día de haber sido parasitadas. Las formas infectivas se obtuvieron después de su salida natural del cadaver del insecto.

Todos los nematodos se mataron en agua caliente a 60 °C (para evitar su contracción) y fijados en TAF (7% formalina, 2% trietanolamina, 91% agua destilada) (Southey, 1970). Debido a la acción higroscópica de la trietanolamina, su adición a la solución de 7% de formalina permite evitar la desecación de los ejemplares en caso de una evaporación del fijador.

Para la preparación de los ejemplares destinados a las observaciones de microscopía óptica, los nematodos, después de un mínimo de 4-5 días de fijación con TAF, eran incluidos en glicerina pura (Poinar, 1975). Para ello eran transferidos a unos pocillos con una solución de 75% de etanol (95%), 5% de glicerina y 25% de agua destilada donde se mantenían tapados durante 1 día. Progresivamente se iba destapando el pocillo con lo cual se permitía la evaporación del etanol y el agua y la lenta inclusión en glicerina. Después de 4 o 5 días, en que ya se encuentra el pocillo totalmente destapado, los pocillos son colocados en cámaras de deshidratación conteniendo gel de sílice, donde permanecerán durante 3 o 4 días hasta su completa deshidratación. Los ejemplares así preparados son montados sobre un portaobjetos en una gota de glicerina pura deshidratada, tapado por un cubreobjetos y sellado con parafina para evitar la evaporación y posibles movimientos de la preparación.

Para la observación de los nematodos en el microscopio electrónico de rastreo, los ejemplares eran fijados en TAF, postfijados en tetraóxido de osmio, deshidratados en series graduales de etanol hasta alcanzar el etanol absoluto, y sometidos a punto crítico con CO₂ líquido para su total secado, posteriormente eran montados en platinas para microscopía electrónica de barrido y metalizados en oro. Las observaciones se realizaron mediante un microscopio electrónico de rastreo Hitachi S-500.

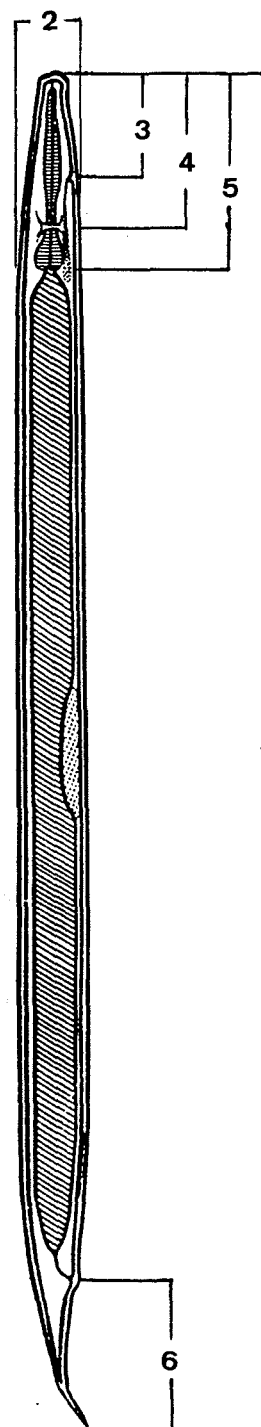
5.2.3. Caracteres morfológicos estudiados.

Para la determinación de las especies de nematodos entomopatógenos mediante microscopía óptica, no se utilizan las fórmulas de Coob, de Man y Goodey, tradicionalmente utilizadas en la determinación de otros grupos de nematodos. Debido a la gran variabilidad que presentan las poblaciones de los nematodos entomopatógenos, éstas fórmulas dan un elevado grado de solapamiento entre especies, lo que imposibilita su separación (Stanuszek, 1974, Poinar, 1979).

Los caracteres que se deben considerar para la separación de los nematodos entomopatógenos se basan principalmente en caracteres de los machos y de las formas infectivas, teniendo muy poca importancia las características de las hembras.

1) Caracteres morfológicos considerados en las formas infectivas:

- 1.- Longitud total.
- 2.- Anchura máxima.
- 3.- Distancia del extremo de la cabeza hasta el poro excretor.
- 4.- Distancia del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso.
- 5.- Distancia del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe.
- 6.- Longitud de la cola.



Índice A = Longitud total (1) / Anchura máxima (2).

Índice B = Longitud total (1) / Distancia cabeza-base faringe (5).

Índice C = Longitud total (1) / Longitud cola (6).

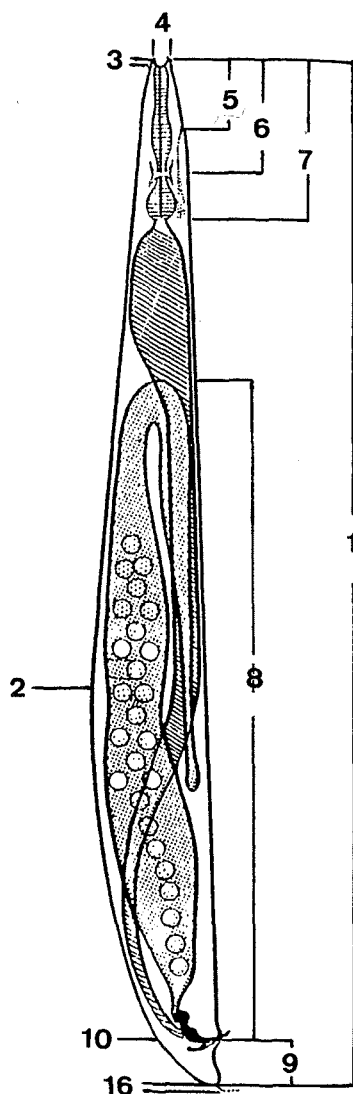
Índice D = Distancia cabeza-poro excretor (3) / Distancia cabeza-base faringe (5).

Índice E = Distancia cabeza-poro excretor (3) / Longitud cola (6).

Índice F = Anchura máxima (2) / Longitud cola (6).

2) Caracteres morfológicos considerados en los machos:

- 1.- Longitud total.
- 2.- Anchura máxima.
- 3.- Longitud del estoma.
- 4.- Anchura del estoma.
- 5.- Distancia del extremo de la cabeza hasta el poro excretor.
- 6.- Distancia del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso.
- 7.- Distancia del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe.
- 8.- Distancia desde el ano a la reflexión del testículo.
- 9.- Longitud de la cola.
- 10.- Anchura a nivel del ano.
- 11.- Longitud de las espículas.
- 12.- Longitud de la cabeza de la espícula (manubrium).
- 13.- Anchura de la cabeza de la espícula
- 14.- Longitud del gubernáculo.
- 15.- Anchura del gubernáculo.
- 16.- Longitud del mucrón.



Índice A = Distancia cabeza-poro excretor (5) /
Dist. cabeza-base faringe (7).

Índice B = Distancia cabeza-base faringe (7) /
Longitud total (1).

Índice C = Longitud cola (9) / Longitud total (1).

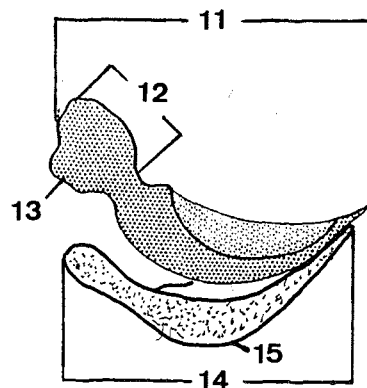
Índice D = Longitud espículas (11) / Longitud total (1).

Índice E = Longitud espículas (11) / Longitud cola (9).

Índice F = Longitud mucrón (16) / Longitud total (1).

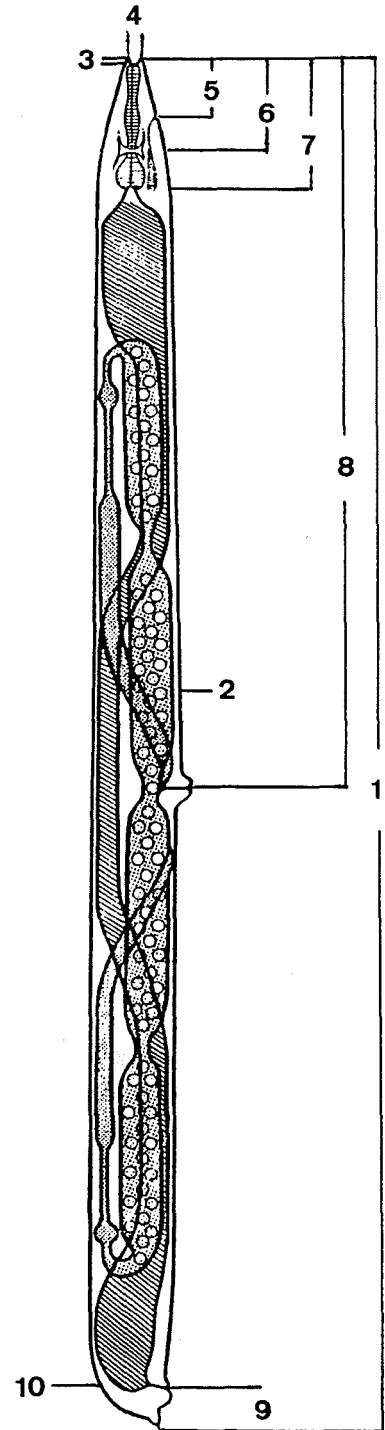
Índice G = Longitud gubernáculo (14) / Longitud
espículas (11).

Índice H = Longitud espículas (11) / Anchura
a nivel ano (10).



3) Caracteres morfológicos considerados en las hembras:

- 1.- Longitud total.
- 2.- Anchura máxima.
- 3.- Longitud del estoma.
- 4.- Anchura del estoma.
- 5.- Distancia del extremo de la cabeza hasta el poro excretor.
- 6.- Distancia del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso.
- 7.- Distancia del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe.
- 8.- % Vulva.
- 9.- Longitud de la cola.
- 10.- Anchura a nivel de ano.



Índice A = Distancia cabeza-poro excretor (5) /
Dist. cabeza-base faringe (7).

Índice B = Distancia cabeza-base faringe (7) /
Longitud total (1).

Índice C = Longitud cola (9) / Longitud total (1).

Todas las biometrías se realizaron sobre ejemplares incluidos en glicerina, y se realizaron con micrómetros oculares de microscopía y mediante el dibujo de los nematodos con la cámara clara del microscopio y posterior medición de los dibujos.

La observación de los nematodos mediante microscopía electrónica de rastreo nos ha permitido observar otros caracteres como:

- Papilas labiales, cefálicas y anfidios de las formas infectivas, machos y hembras.

- Número y disposición de las bandas del campo lateral de las formas infectivas.

- Estructuras cuticulares de las formas infectivas, machos y hembras.

- Número y disposición de las papilas genitales de los machos.

- Presencia del mucrón cuticular en el extremo de la cola de los machos.

- Forma de las espículas de los machos.

5.2.4. Cruzamientos.

Debido a la gran dificultad que presenta la taxonomía de los nematodos entomopatógenos, ya que en algunos casos no se pueden obtener caracteres morfológicos que nos permitan separar las diferentes especies, en ocasiones es necesario utilizar otros métodos para identificar las especies de nematodos entomopatógenos.

Entre estos métodos está el cruzamiento entre dos poblaciones de nematodos, una conocida y otra por determinar, y comprobar la existencia de descendencia fértil. Este método fue propuesto por Poinar (1967) mediante el cruzamiento de dos nematodos en una gota de hemolinfa de *Galleria mellonella*. Posteriormente Akhurst y Bedding (1978) propusieron un nuevo método para realizar los ensayos de cruzamiento de poblaciones de nematodos entomopatógenos mediante el inyectado de dos nematodos en el interior de una larva de *Galleria mellonella*. Este último método es el que hemos utilizado para la clarificación de algunas de las especies cuya determinación era dudosa y disponíamos de cepas estandarizadas para su cruzamiento.

La técnica consiste en inyectar dos formas infectivas, una la cepa estándar que conocemos su identidad y otra de la cepa a determinar, sobre larvas de últimos estadios de *Galleria mellonella*. La inyección se realiza mediante una jeringa de 10 microlitros de capacidad, con una aguja de diámetro de 0,8 mm, cuyo émbolo se desplaza a lo largo de la aguja hasta su extremo (Microliter™ Syringes, Hamilton). Los nematodos se depositan sobre una gota de solución salina (1%) esterilizada y bajo una lupa binocular son absorbidos por la jeringuilla. Ambos nematodos son inyectados en la larva de *Galleria* a nivel del tercer par de pseudópodos, con la punta de la jeringuilla dirigida hacia la parte posterior de la larva.

El recorrido del émbolo de la jeringuilla hasta la punta de la aguja, aseguraba que ambos nematodos sean expulsados al interior de la larva. No obstante, después de cada inyección se comprobaba la posible presencia de algún nematodo en la jeringuilla mediante tres lavados del interior de la aguja.

Las larvas inyectadas son incubadas a 23 ± 2 °C a la espera de la salida de las formas infectivas. En caso de no aparecer las formas infectivas, las larvas de *Galleria* son disecadas y se comprueba la presencia o no de nematodos en su interior.

Si no se obtenía descendencia de los cruces de las cepas analizadas, se realizaban unas pruebas control consistentes en inyectar en las larvas de *Galleria* dos formas infectivas, de la cepa a determinar, comprobándose la presencia de descendencia.

Estas pruebas únicamente se podían realizar en las cepas de steinernemátidos que presentan generaciones anfimíticas, en el caso de los heterorhabdítidos, que presentan una generación hermafrodita, estas pruebas no se podían realizar. Para contrastar la determinación de las especies de heterorhabdítidos recurrimos a otros métodos moleculares (RLFP).

5.2.5 Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de ADN (RLFP "Restriction fragment length polymorphism").

Como hemos comentado, la existencia de una generación hermafrodita en las especies de heterorhabdítidos, impide la realización de pruebas de cruzamientos, por lo que para contrastar la determinación morfológica de algunas especies de *Heterorhabditis* obtenidas en nuestro aislamiento, encargamos la realización un estudio de RLFP. El ensayo se realizó en el Research Institute for Plant Protection (IPO) de Wageningen (Holanda).

El estudio del ADN fragmentado por endonucleasas restrictivas, produce fragmentos de ADN que pueden reflejar la distribución de los lugares de reconocimiento de las endonucleasas restrictivas dentro del genoma. El tamaño y distribución de estos fragmentos de ADN es característico de una muestra dada de ADN, con lo que nos permitirá evaluar las similitudes del ADN de las cepas de nematodos que pretendamos comparar, permitiéndonos incluso distinguir poblaciones diferentes dentro de una misma especie de nematodo.

Los nematodos utilizados para este ensayo fueron propagados en últimos estadios larvarios de *Galleria mellonella* a 25°C siguiendo la técnica de Dutky et al (1964).

Extracción del ADN

El ADN fue extraído mediante la pulverización de 1 millón de formas infectivas de los nematodos en un mortero con nitrógeno líquido hasta producir un fino polvo blanco. Antes de transferir los nematodos al mortero fueron concentrados en papel de filtro mediante un filtro conectado a una bomba de vacío. Al polvo obtenido de la trituración se añadió 1 ml de tampón de extracción (10 mM Tris-Cl pH= 8, 1% SDS, 0,4 M NaCl, 5 mM EDTA). Posteriormente se añadió 50 microlitros de solución de proteinasa K (0,01g/ml) y la mezcla se incubó por 30 min a 37 °C y 60 min a 65 °C. La solución fue extraída dos veces con volúmenes iguales de fenol-cloroform-isoamylalcohol (25:24:1) y finalmente con cloroform-isoamylalcohol (24:1). El ADN fue precipitado de la fase acuosa final mediante la adición de 2 volúmenes de etanol (96%) y 0,1 volumen de 3 M acetato amónico y la mezcla se mantuvo durante 30 min a -70 °C. El precipitado de ADN fue condensado en una microcentrífuga y secado al vacío a temperatura ambiente. El "pellet" fue

resuspendido en 50 microlitros de Tampón- TE (0,01 M Tris-Cl, pH= 7,5, 0,001 M EDTA) y guardado a 4 °C. La concentración de ácido nucleico fue medida en un espectrofotómetro a 260 nm. Generalmente la cantidad de ácido nucleico extraída de 1 millón de formas infectivas es de 200-300 microgramos.

Digestión del ADN

El ADN extraído fue digerido con enzimas restrictivos de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El enzima restrictivo utilizado fue EcoRI (Gibco/BRL), añadido a 25 microgramos de ácido nucleico en Tampón-TE, con un tampón de reacción enzimática adecuado y DNase-free RNase. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 3 horas.

Gel Electroforesis

Una muestra de 10 microlitros del ADN digerido fue mezclada con 2 microlitros de tampón de carga (0,1 % bromofenol blue, 0,25 % xylene cyanol, 40 % p/v sacarosa en agua) y se hizo correr en un gel de agarosa (1,1%) conteniendo 1 microgramo/ml de ethidium-bromide, a temperatura ambiente y 60 V por 3 horas en Tampón de correr TAE (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA pH= 8). Como referencia para conocer el tamaño de los fragmentos de ADN fue utilizado el marcador 1 Kb ADN (Gibco/BRL). El gel fue fotografiado bajo luz ultravioleta.