

Machos:

Las características biométricas de los machos de la primera y segunda generación se muestran en la tabla 5.67. Cabe señalar que, al igual que ocurría en el caso de las formas infectivas, las características morfológicas y biométricas de los dos aislamientos son similares, lo que confirma la estabilidad de los caracteres observados propios de esta cepa.

Presentan una abertura bucal triangular con un primer anillo de 6 papilas labiales y un segundo anillo de 4 papilas cefálicas (fig. 5.48A), entre las que se sitúan dos anfidios bastante aparentes. El poro excretor se sitúa en la mitad posterior de la longitud de la faringe en la primera generación (índice A = 61%) y sobre la mitad de la longitud de la faringe en la segunda generación (índice A = 48-53%). Presentan un total de 23 papilas genitales (11 pares y una impar) (fig. 5.49). En general la disposición de la papilas es de 6 pares de papilas preanales y subventrales (1-6 fig. 5.49), un par preanal y lateral (7), un par adanal (8), dos pares postanales y subventrales (9-10), un par postanal subdorsal (11) y una gran papila preanal ventral impar (12 fig. 5.49). En ocasiones el par de papilas adanales (8) pueden ocupar una posición más o menos postanal. Las espículas son bastante cortas y poseen un manubrio redondeado o cuadrangular, pero casi siempre más ancho que largo (figs. 5.48B, 5.50 y 5.51). Este hecho queda reflejado por los caracteres biométricos en la mayor anchura media que longitud media del manubrio en las dos generaciones y en los dos aislamientos (tabla 5.67). Las espículas presentan generalmente un elevado grado de curvatura (fig. 5.48, 5.50 y 5.51). El gubernáculo suele presentar un estrechamiento en su parte proximal adquiriendo en ocasiones forma de gancho (fig. 5.50C). La cola es muy alargada; 39,6 micras en la primera generación y 34 micras en la segunda, que conjuntamente con la pequeña longitud de las espículas le confieren un valor del índice E bastante bajo (Índice E = 1,2-1,3). La cola termina en un mucrón que si bien presenta unas dimensiones reducidas en la primera generación (longitud media 4,4 micras) (fig. 5.49B), alcanza una longitud desmesurada en la segunda generación con una longitud media de 17,7 micras y un máximo de 25 micras (fig. 5.51).

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

Tabla 5.67. Medidas de la primera y segunda generación de los machos del primer y segundo aislamiento de la cepa M10.

CEPA M10	1 ^a GENERACIÓN				2 ^a GENERACIÓN			
	2 ^o aislamiento		1 ^{er} aislamiento		2 ^o aislamiento		1 ^{er} aislamiento	
Medidas: (n = 25)	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango
Longitud total	1404,8	(920-1696)	976,96	(864-1160)	1105,6	(944-1304)		
Anchura máxima	154,8	(115-184)	64,2	(50-76)	66,3	(57-80)		
Longitud estoma	4,8	(4-6)	4,36	(4-5)	4,3	(4-5)		
Anchura estoma	5,5	(5-7)	6,04	(6-7)	5,5	(5-7)		
Distancia: cabeza-poro excretor	91,2	(78-101)	73,64	(65-87)	71,8	(55-86)		
Distancia: cabeza-anillo nervioso	110,2	(98-123)	101,28	(92-116)	109,7	(90-121)		
Distancia: cabeza-base faringe	149,3	(136-165)	137,72	(122-151)	149,6	(121-167)		
Distancia: ano-reflexión del testículo	1037,2	(590-1327)	625,08	(513-738)	645,4	(515-821)		
Longitud cola	39,6	(31-50)	34,44	(27-41)	34,0	(29-43)		
Anchura a nivel del ano	55,2	(45-66)	34,32	(30-39)	35,8	(32-40)		
Longitud espículas	52,1	(48-57)	41,96	(38-51)	44,7	(37-54)		
Longitud cabeza espícula (manubrio)	10,4	(7-15)	8,24	(6-11)	9,2	(7-12)		
Anchura cabeza espícula (manubrio)	12,1	(9-17)	9,4	(7-12)	10,1	(8-13)		
Longitud gubernáculo	35,9	(25-42)	27,04	(22-30)	32,1	(26-38)		
Anchura gubernáculo	6,4	(3-9)	5	(4-7)	6,0	(5-7)		
Longitud muércon	4,7	(0-15)	17,64	(13-21)	17,7	(13-25)		
Índice A	0,610	(0,530-0,720)	0,533	(0,464-0,600)	0,482	(0,372-0,583)		
Índice B	0,107	(0,093-0,154)	0,141	(0,122-0,160)	0,136	(0,111-0,154)		
Índice C	0,028	(0,023-0,037)	0,035	(0,028-0,042)	0,031	(0,026-0,036)		
Índice D	0,037	(0,031-0,054)	0,043	(0,037-0,051)	0,040	(0,035-0,048)		
Índice E	1,330	(1,000-1,640)	1,227	(0,976-1,516)	1,324	(1,088-1,660)		
Índice F	0,003	(0-0,009)	0,018	(0,013-0,024)	0,016	(0,011-0,023)		
Índice G	0,689	(0,490-0,833)	0,647	(0,520-0,750)	0,720	(0,619-0,814)		
Índice H	0,950	(0,816-1,111)	1,224	(1,108-1,457)	1,250	(1,088-1,515)		

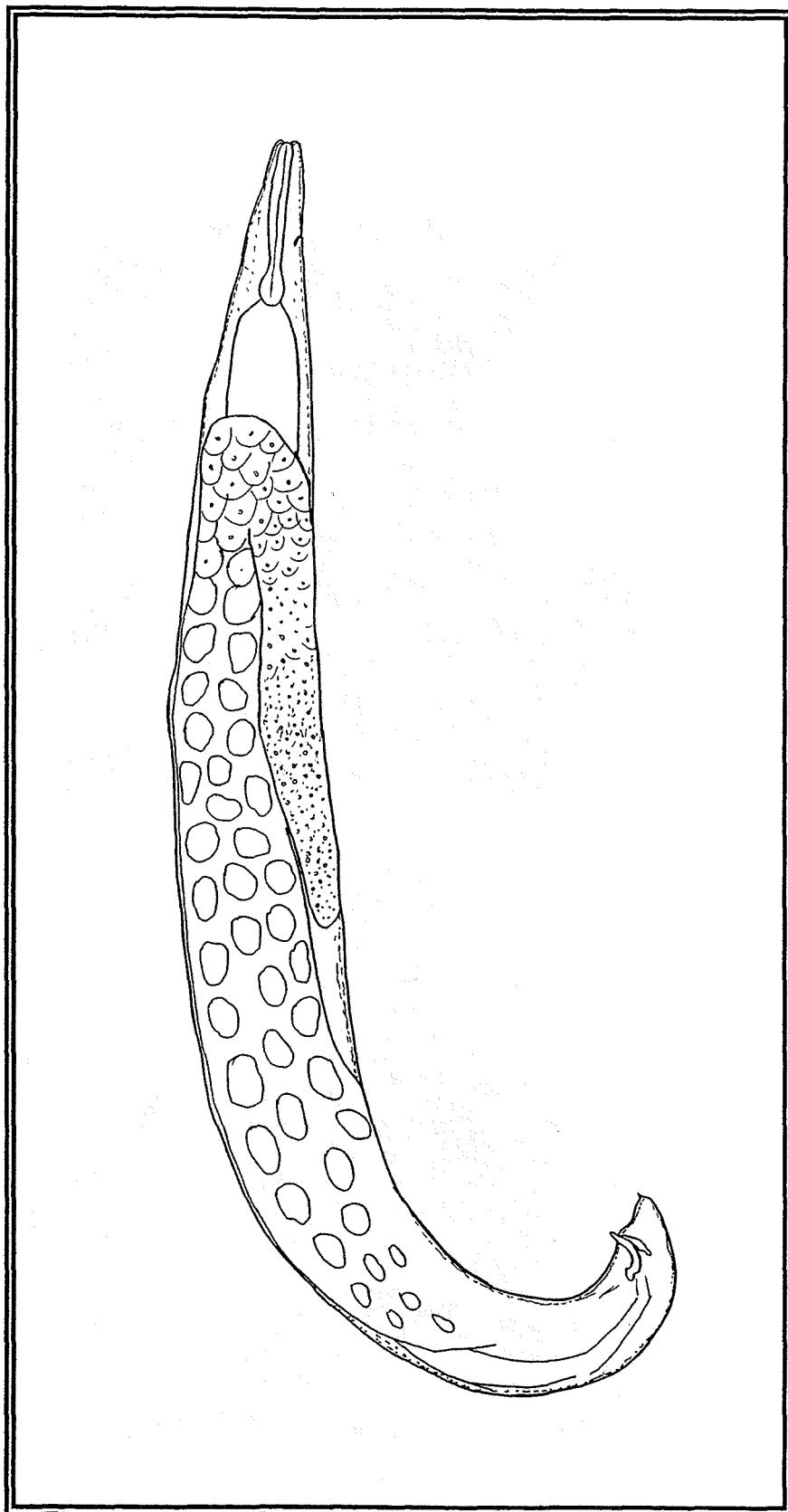


Figura 5.47. Macho de primera generación de la cepa M10.

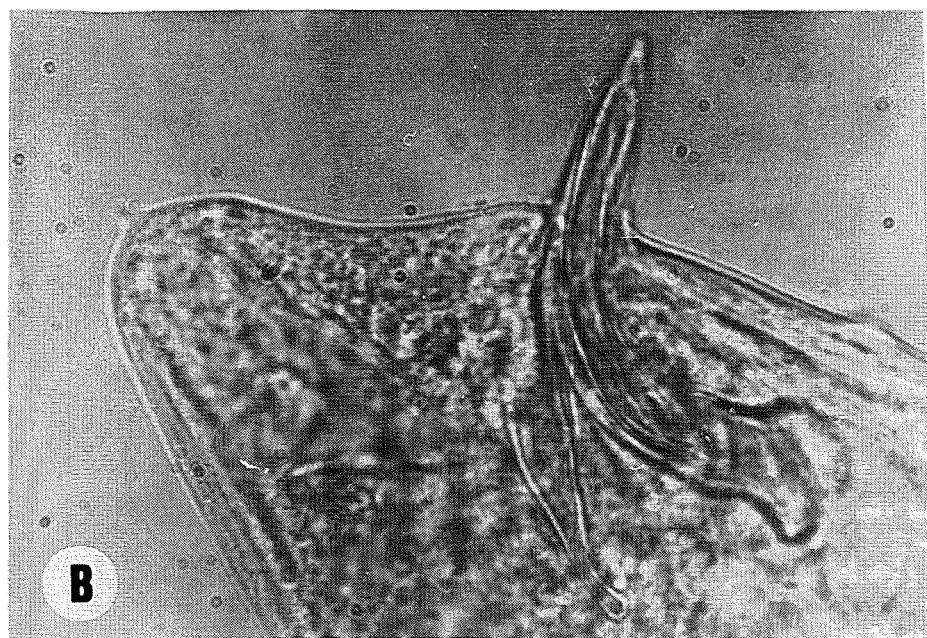
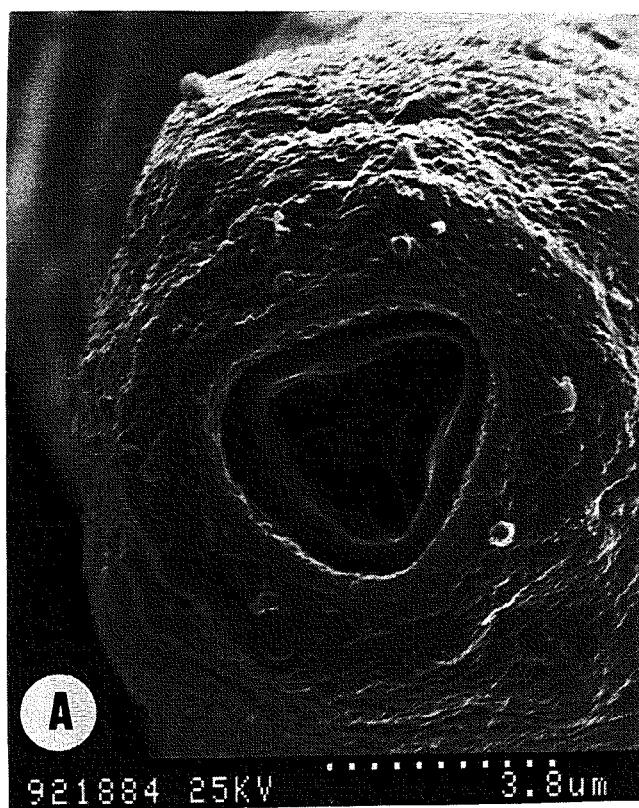


Figura 5.48. Machos de la primera generación de la cepa M10. A. Abertura bucal triangular y papillas labiales y céfálicas. B. Región caudal, espículas y gubernáculo.

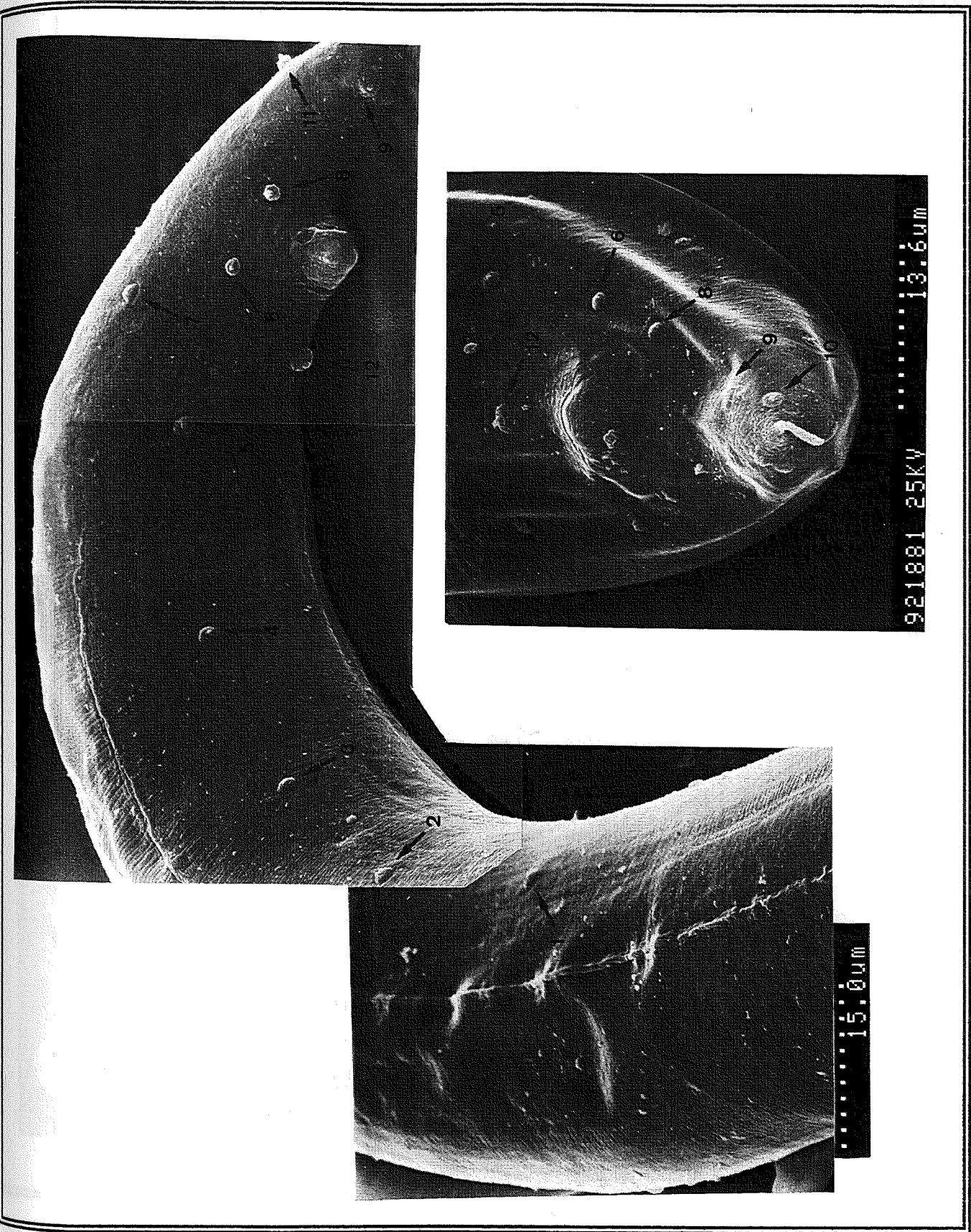


Figura 5.49. Disposición de las papilas genitales de los machos de la cepa M10.

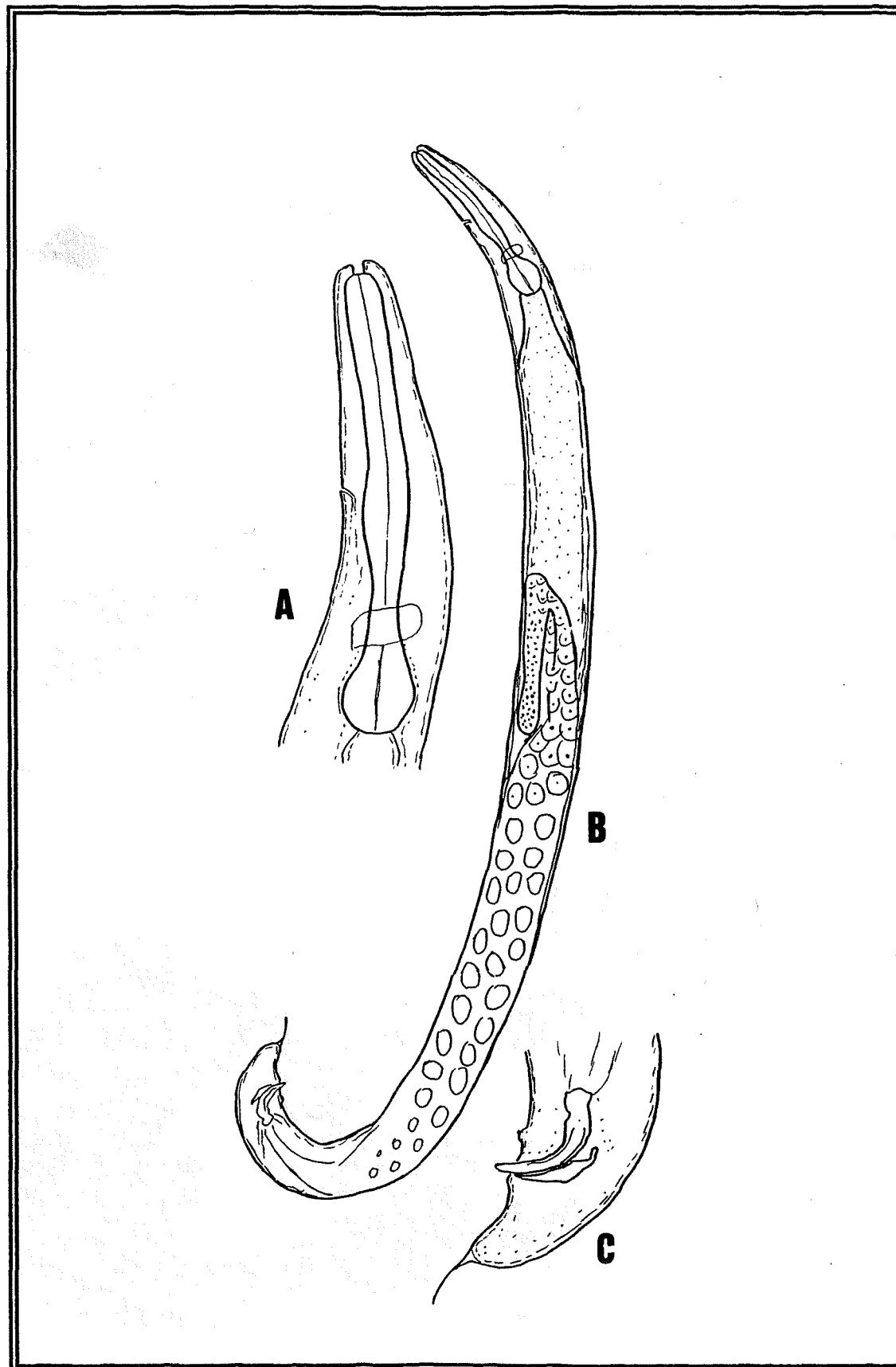


Figura 5.50. Macho de segunda generación de la cepa M10.. A. Región faringea. B. Visión general. C. Región caudal.

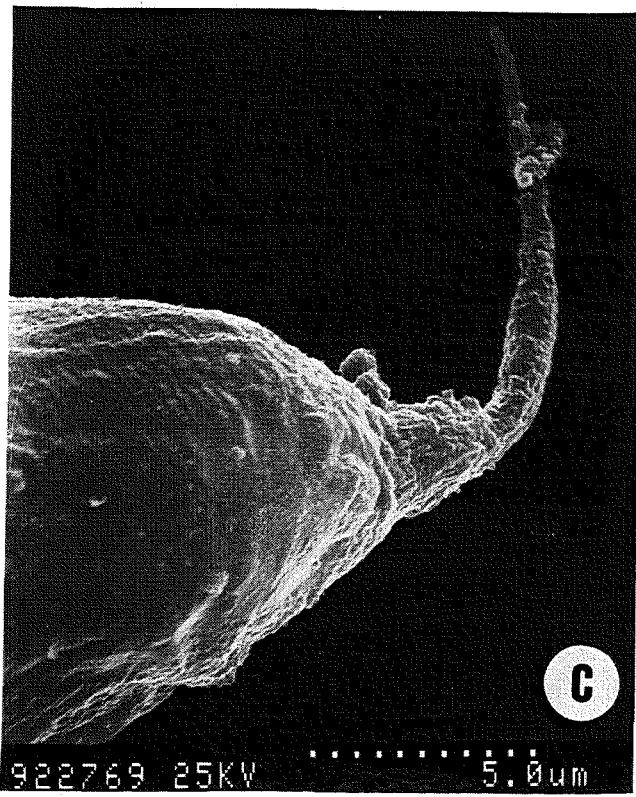
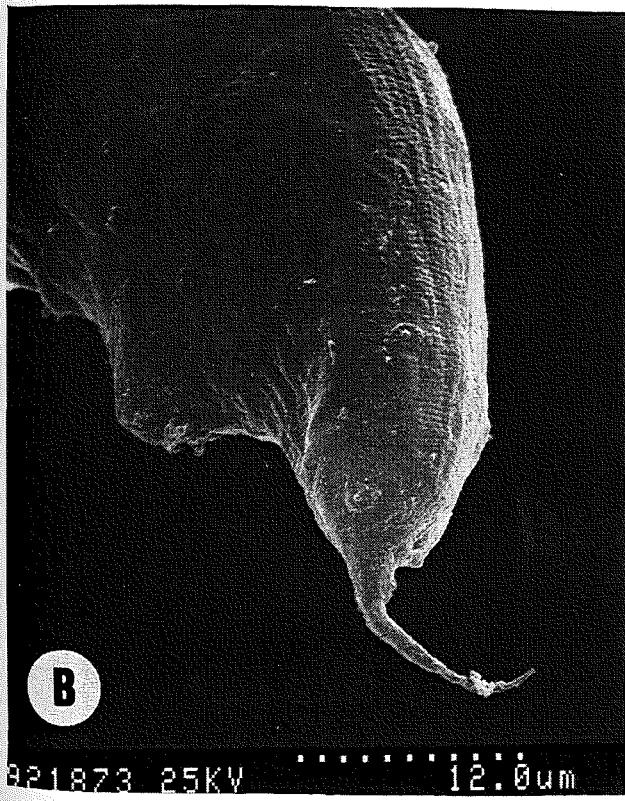
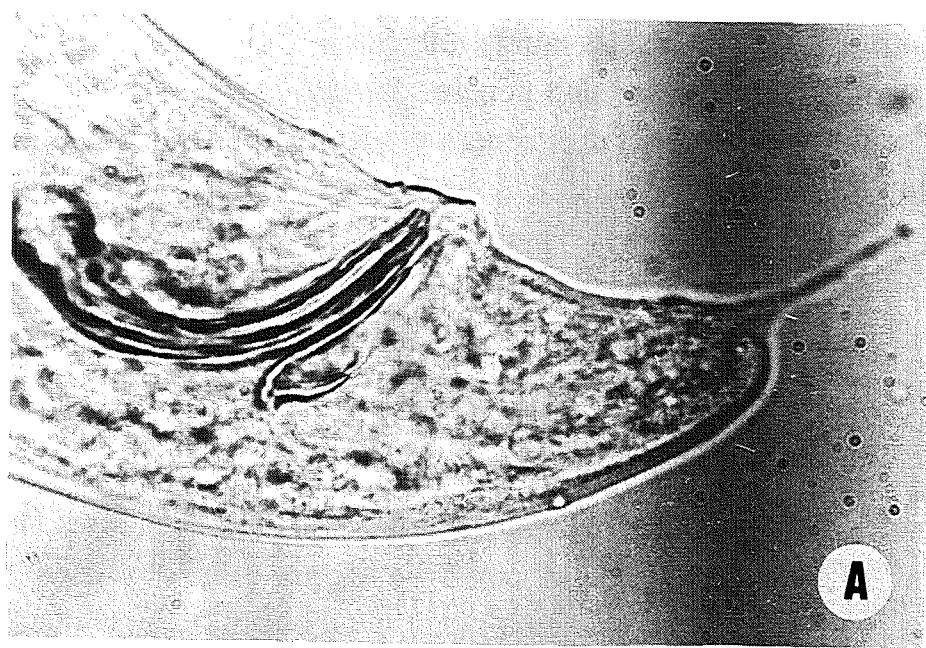


Figura 5.51. Región caudal de los machos de segunda generación de la cepa M10. A. Espículas y gubernáculo. B-C. Mucrón en el extremo de la cola.

Hembras:

La morfología de las hembras no presentan caracteres diferentes de los ya comentados dentro del género *Steinernema*. Las características biométricas de las hembras de primera y segunda generación se muestran en la tabla 5.68.

Tabla 5.68. Medidas de las hembras de primera y segunda generación del segundo aislamiento de la cepa M10.

CEPA: 2º Aislamiento	1ª Generación		2ª Generación	
Medidas: (n= 25)	Media	Rango	Media	Rango
Longitud total	4099,5	(2951-5259)	2177,2	(1690-2642)
Anchura máxima	237,98	(191,9-313,1)	135,04	(103-170)
Longitud estoma	9,31	(8-10)	5,92	(5-8)
Anchura estoma	9,56	(9-11)	7,08	(6-9)
Dist.: cabeza-poro excretor	97,18	(82-104)	78,88	(58-95)
Dist.: cabeza-anillo nervioso	128,93	(116-145)	127,36	(110-148)
Dist.: cabeza-base faringe	180,56	(164-203)	175,2	(147-203)
V	52,32	(47,6-55,6)	54,01	(50,0-57,6)
Longitud cola	62,06	(50-77)	69,68	(59-85)
Anchura a nivel del ano	72,87	(60-95)	41,08	(36-47)
Índice A	0,54	(0,45-0,60)	0,45	(0,33-0,59)
Índice B	0,045	(0,034-0,061)	0,081	(0,070-0,104)
Índice C	0,015	(0,011-0,020)	0,032	(0,024-0,043)

Índice A: Distancia cabeza-poro excretor / Distancia cabeza base faringe. Índice B: Distancia cabeza-base faringe / Longitud total. Índice C: Longitud cola / Longitud total.

B.- Cruzamientos:

Para comprobar que la cepa M10 no pertenece a la especie *S. feltiae*, realizamos cruzamientos de estos nematodos con la cepa OBS III de *S. feltiae*. Esta cepa, de origen holandés, es la utilizada de forma habitual en los cruzamientos de *S. feltiae*.

De las 25 larvas de *Galleria mellonella* inyectadas con una forma infectiva de la cepa M10 y otra forma infectiva de la cepa OBS III, no se ha obtenido descendencia en ningún caso, mientras que en 9 de las 15 larvas de *Galleria* inyectadas con dos formas infectivas de la cepa M10 se obtuvo descendencia fértil. Este hecho confirma que la cepa M10 se trata de una especie diferente a *S. feltiae*.

C.- Diagnosis:

Las formas infectivas de las cepas de esta especie se pueden diferenciar de todas las demás especies del género por la longitud total, siendo ésta significativamente mayor que en *S. carpocapsae*, *S.intermedia*, *S.affinis*, *S.scapterisci*, *S.rara*, y *S.kushidai*, y menor que en *S. glaseri* y *S.anomali*. Esta especie es más próxima a *S. feltiae*, diferenciándose de ésta por ser ligeramente mayor; 900 micras de longitud, frente a 849 micras en *S. feltiae*. Otro carácter diferenciador entre *S. feltiae* y esta cepa, relacionado con el tamaño de ésta ultima, es la mayor longitud de la cola con respecto a las cepas de *S. feltiae* aisladas por nosotros en el presente estudio.

Las bandas del campo lateral también presentan algunos caracteres diferenciadores entre ambas especies. Mientras que en *S. feltiae* existen ocho bandas laterales de igual tamaño en esta nueva cepa el campo lateral también está formado por ocho bandas, pero existen unas mucho más desarrolladas que otras, dando en ocasiones la apariencia de poseer únicamente cinco o seis bandas (fig. 5.46).

Los machos de esta nueva cepa posee unos caracteres diferenciadores frente *S. feltiae* mucho más aparentes. Presentan una cola más larga que los machos de *S. feltiae*. Las espículas son muy diferentes en ambas especies. En la nueva cepa las espículas son más pequeñas; 42-44 micras frente a las 58 micras en los machos de segunda generación de *S. feltiae*. El manubrio que es muy alargado en todas las cepas de *S.feltiae* en esta cepa es redondeado o cuadrangular pero siempre es más ancho que largo. Finalmente el mocrón que presentan los machos de *S. feltiae* en el extremo de la cola posee una longitud entre 4 y 13 micras, sin embargo en la cepa M10, si bien los machos de la primera generación presentan un mocrón de 4,7 micras de longitud media (fig. 5.48), los machos de la segunda generación poseen un mocrón de 17,7 micras de longitud (mínimo 13, máximo 25 micras) (fig. 5.51).

D.- Estudio morfométrico de las cepas aisladas.

Otra cepa que presenta unos caracteres morfológicos muy próximos a esta misma especie es la

Muestra: M91 *Steinernema* sp.

Localidad de aislamiento: Prades (Baix Camp) **U.T.M. CF3278**

Altitud: 1000-1200 m **T^a media anual:** 12-14

Hábitat: Bosque de robles.

Descripción:

Formas infectivas.

Tabla 5.69 . Medidas de las formas infectivas.

CEPA: M91	Medidas: (n=25)	Media	Rango
Longitud total	936	(840-1072)	
Anchura máxima	36,5	(35-40)	
Distancia: cabeza-poro excretor	64	(58-74)	
Distancia: cabeza-anillo nervioso	96	(86-108)	
Distancia: cabeza-base faringe	131,6	(121-153)	
Longitud cola	88,8	(75-105)	
Índice A	25,6	(24-26,9)	
Índice B	7,1	(6,5-7,8)	
Índice C	10,58	(9,8-11,3)	
Índice D	0,487	(0,44-0,58)	
Índice E	0,723	(0,64-0,77)	

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.

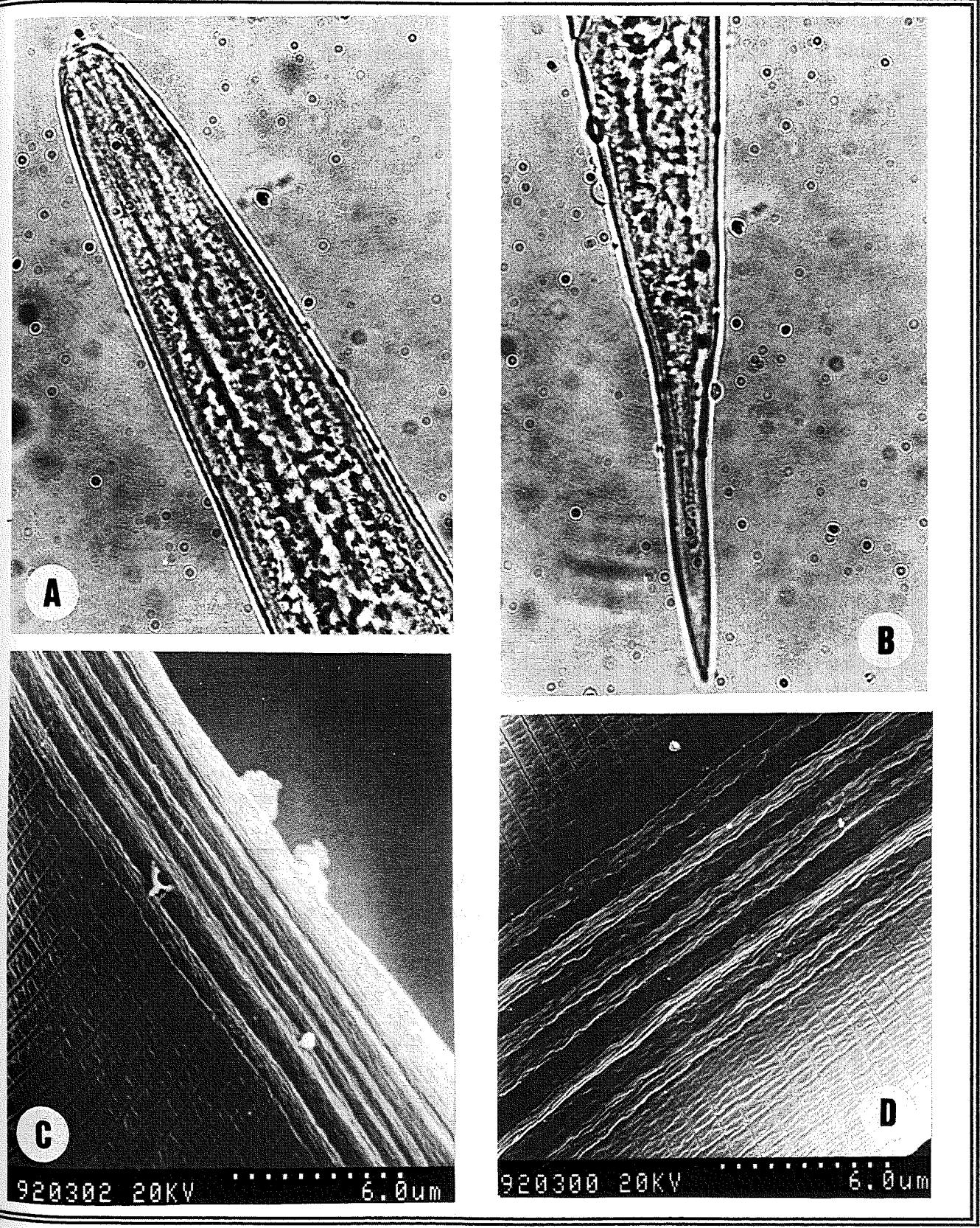


Figura 5.52. Formas infectivas de la cepa M91. A. Regióncefálica. B. Región caudal. C-D. Campo lateral .

Tabla 5.70. Medidas de los machos de segunda generación.

CEPA: M91		
Medidas: (n=10)	Media	Rango
Longitud total	1101,6	(1016-1208)
Anchura máxima	80,4	(72-90)
Longitud estoma	4,9	(4-6)
Anchura estoma	6,2	(5-7)
Distancia: cabeza-poro excretor	73,2	(66-81)
Distancia: cabeza-anillo nervioso	100,1	(92-112)
Distancia: cabeza-base faringe	134	(122-150)
Distancia: ano-reflexión del testículo	667,8	(554-835)
Longitud cola	33,8	(28-39)
Anchura a nivel del ano	32,9	(30-36)
Longitud espículas	48,7	(45-50)
Longitud cabeza espícula (manubrium)	9,5	(8-12)
Anchura cabeza espícula (manubrium)	10,4	(10-11)
Longitud gubernáculo	32,4	(27-36)
Anchura gubernáculo	6	(5-7)
Longitud mucrón	12,1	(8-15)
Índice A	0,547	(0,460-0,618)
Índice B	0,121	(0,108-0,136)
Índice C	0,030	(0,027-0,036)
Índice D	0,044	(0,040-0,048)
Índice E	1,455	(1,250-1,785)
Índice F	0,011	(0,006-0,013)
Índice G	0,665	(0,562-0,734)
Índice H	1,485	(1,371-1,613)

Índice A: Distancia cabeza-poro excretor / Distancia cabeza base faringe. Índice B: Distancia cabeza-base faringe / Longitud total. Índice C: Longitud cola / Longitud total. Índice D: Longitud espículas / Longitud total. Índice E: Longitud espículas / Longitud cola. Índice F: Longitud mucrón / Longitud total. Índice G: Longitud gubernáculo / Longitud espículas. Índice H: Longitud espículas / Anchura a nivel ano.

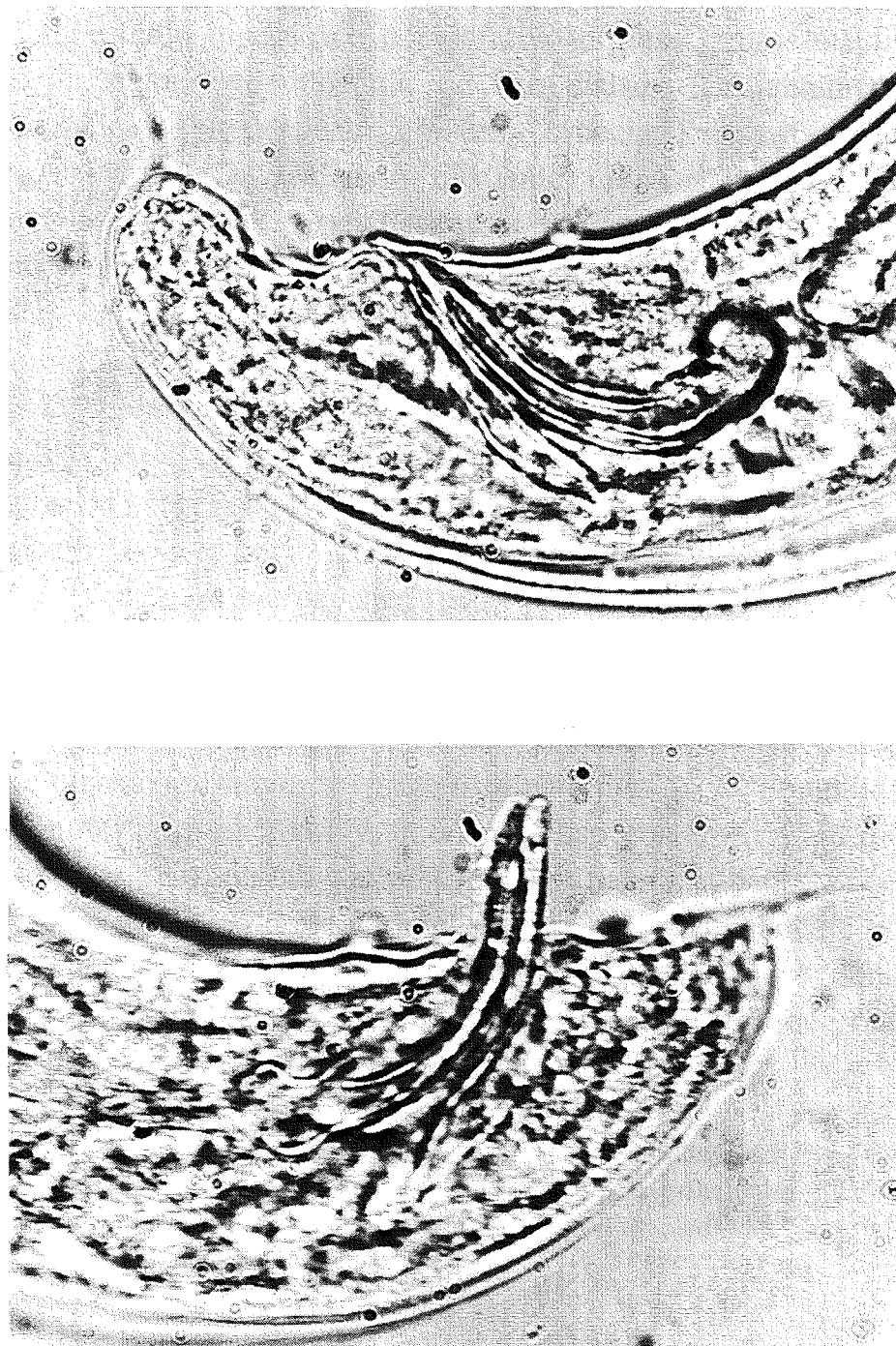


Figura 5.53. Machos de la cepa M91. Región caudal, espirúlas y gubernáculo.

7) Estudio morfológico comparativo de las cepas aisladas

A.- Formas infectivas (L3):

El estudio biométrico comparativo de las formas infectivas de las cepas de steiner nemátidos que se han aislado, conjuntamente con las características biométricas de las especies descritas del género *Steinernema*, se ha realizado mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP). Este análisis y su posterior clasificación automática (cluster), nos permite observar la proximidad morfológica de las cepas aisladas en el presente estudio con las especies descritas en la bibliografía.

La representación de las características biométricas consideradas en el análisis (ACP), puede observarse en la figura 5.54. En la tabla 5.71 se muestra la correlación entre los caracteres analizados y los ejes principales.

Los dos primeros ejes principales explican el 81,5% de la variabilidad morfológica total de las formas infectivas de las cepas y especies de nematodos analizadas. El primer eje, que explica el 64,2% de la variabilidad, separa aquellas cepas y especies de nematodos que poseen unas dimensiones mayores (principalmente una mayor longitud total, una posición del poro excretor y anillo nervioso posterior, y un mayor valor del índice B y D), de las que presentan un menor tamaño. El segundo eje que explica el 17,3% de la variabilidad separa principalmente por su parte positiva aquellas cepas y especies que presentan una mayor longitud de la cola y un mayor índice A y por su parte negativa, las que presentan un mayor índice E y C y una mayor anchura máxima.

Tabla 5.71. Correlación de las variables consideradas en las características morfológicas de las formas infectivas, con los dos ejes principales del ACP. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado.

	AXE 1	AXE 2
LONG **	-0.9598	0.9212 *
ANCH **	-0.8339	0.6954 *
PE **	-0.9545	0.9111 *
AN **	-0.8861	0.7851 *
BF **	-0.8283	0.6861 *
LC **	-0.7889	0.6224 *
A **	-0.5724	0.3277 *
B **	-0.8561	0.7329 *
C **	-0.5870	0.3446 *
D **	-0.8425	0.7098 *
E **	-0.5724	0.3276 *
		-0.7741
		0.5993 *

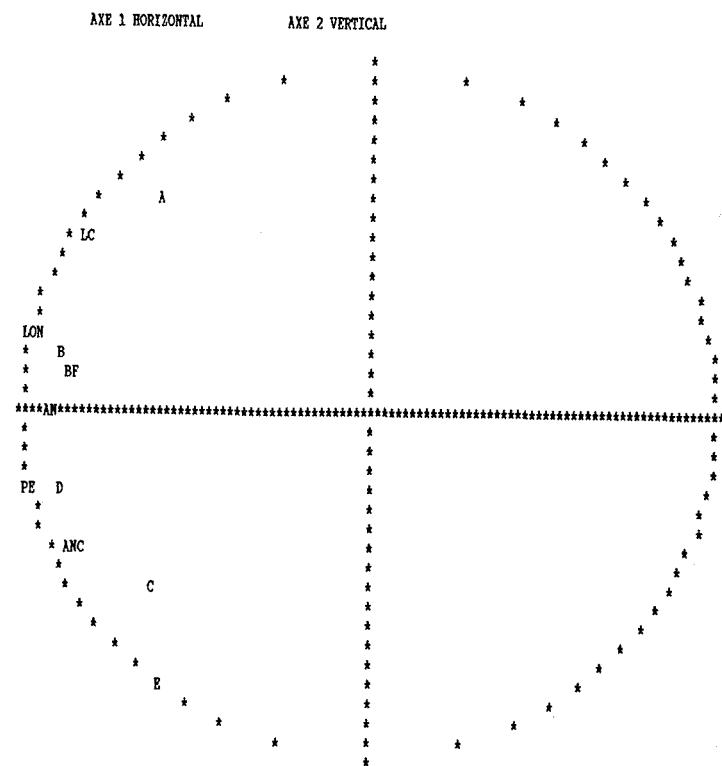


Figura 5.54. Representación de las variables consideradas en el análisis de las características morfológicas de las formas infectivas, sobre los dos ejes principales. Leyenda: LON: longitud total, ANC: anchura total, PE: situación del poro excretor, AN: situación del anillo nervioso, BF: longitud de la faringe, LC: longitud de la cola, Índices A, B, C, D, E.

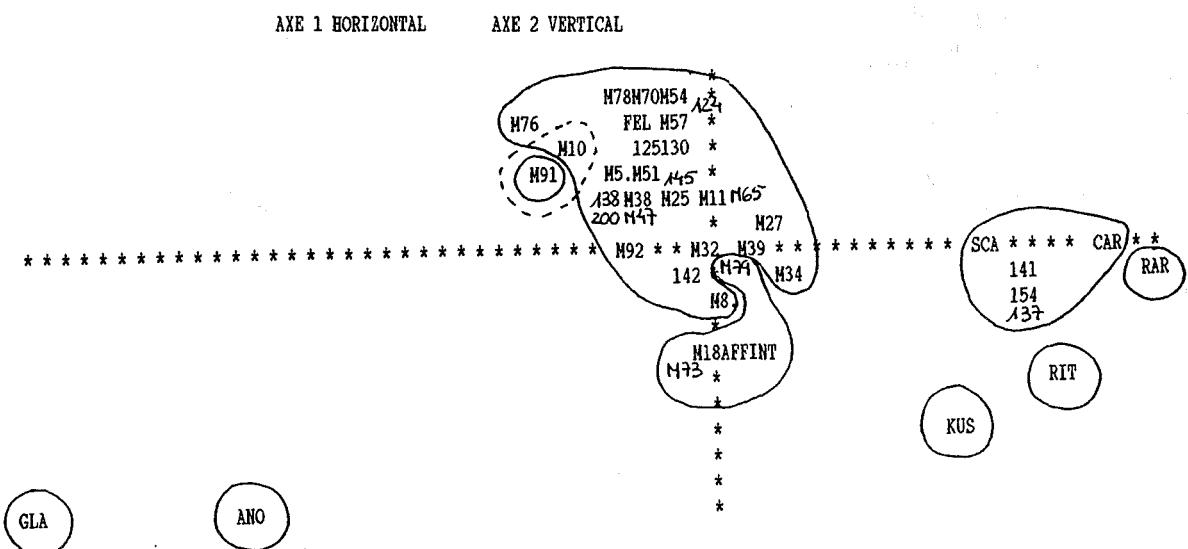


Figura 5.55. Representación de las cepas sobre los dos primeros ejes principales.

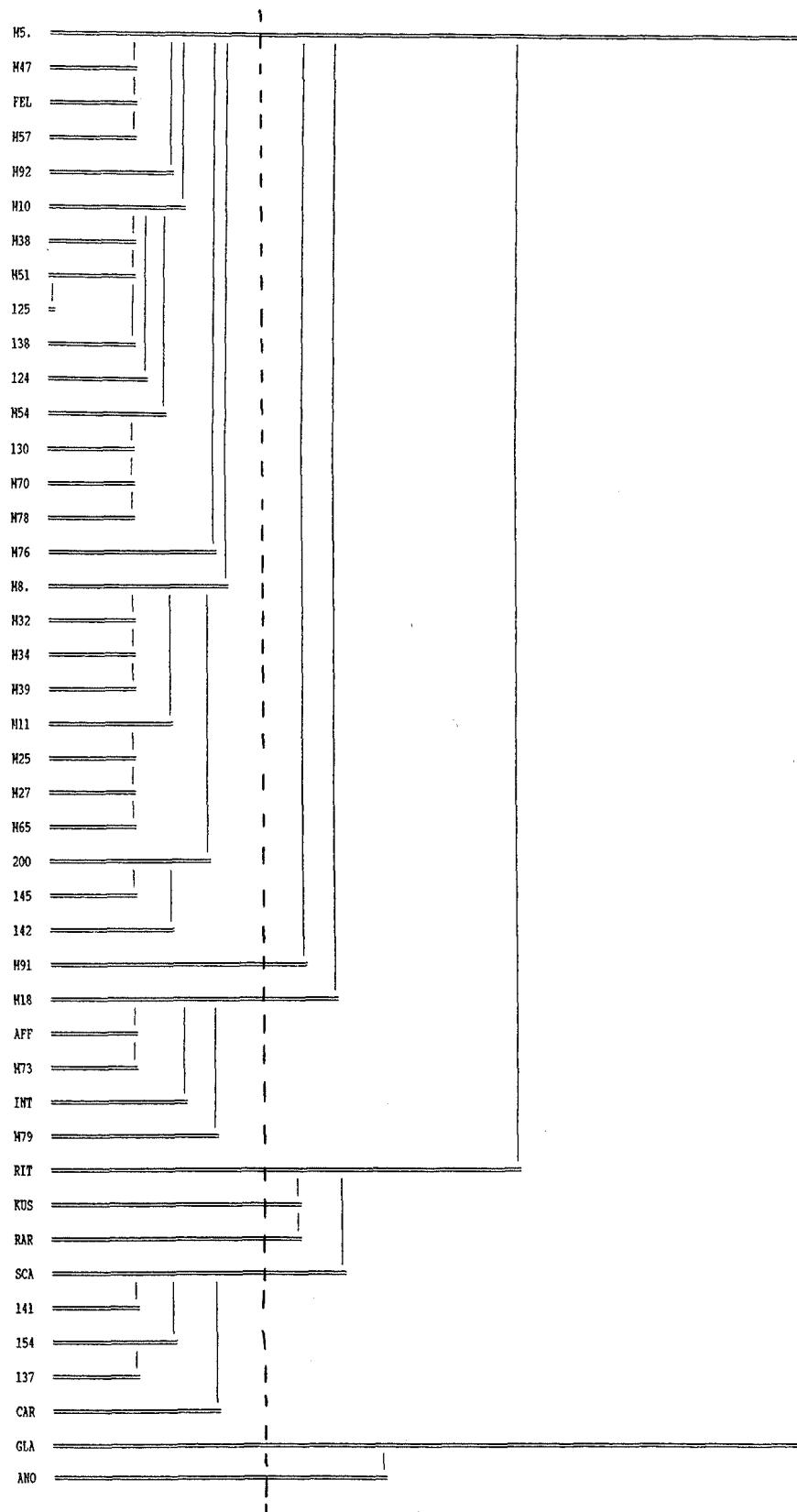


Figura 5.56. Dendrograma de las características morfológicas de las formas infectivas. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendrograma para separar las clases.

La representación gráfica de las cepas y especies de nematodos de este análisis nos da una dispersión de puntos de difícil interpretación (fig. 5.55). El análisis de clasificación automática (cluster) separa nueve clases de cepas en las cuales existe una mayor homogeneidad intraclases que interclases (fig. 5.56).

Principalmente separa las especies *S. glaseri* y *S. anomali* representadas como dos grupos independientes en el extremo inferior izquierdo del gráfico (fig. 5.55), y caracterizadas por poseer unas formas infectivas de gran tamaño, con una elevada longitud total, una situación posterior del poro excretor y anillo nervioso, y por lo tanto un elevado valor del índice D.

Por el otro extremo del gráfico se encuentran las especies con unas dimensiones menores, diferenciando significativamente las especies *S. rara*, *S. rittieri*, *S. kushidai* y un grupo que contiene *S. scapterisci*, *S. carpopcapsae* y las cepas M141, M154 y M137 que pertenecen a esta última especie.

En el centro del gráfico queda representado una nube continua de puntos, en la cual el análisis de clasificación automática (cluster) ha separado tres clases principales; en la parte central se encuentran las cepas pertenecientes a *S. feltiae*, quedando separadas de forma bastante confusa de un grupo inferior en el cual se encuentran representados las cepas pertenecientes a las especies *S. affinis* y *S. intermedia*, y de otro grupo en su parte izquierda en el cual se encuentran las cepas de la nueva especie.

Para evidenciar más las diferencias entre las cepas que hemos aislado en el presente estudio hemos realizado un ACP considerando únicamente las cepas aisladas conjuntamente con las descripciones biométricas de la bibliografía de las especies a las cuales consideramos pertenecen nuestras cepas. De este modo eliminamos la variabilidad introducida por las especies de nematodos que son muy diferentes a nuestras cepas, magnificando así la variabilidad entre las propias cepas.

La representación de las características biométricas consideradas en este segundo análisis (ACP), puede observarse en la fig. 5.57. En la tabla 5.72 se muestra la correlación entre los caracteres analizados y los ejes principales.

En este caso, al existir una menor variabilidad, los dos primeros ejes principales explican únicamente el 75,3% de la variabilidad morfológica total de las cepas de nematodos analizadas. El primer eje que explica el 55,5% de la variabilidad, tiende a separar aquellas cepas de nematodos con unas dimensiones mayores (longitud de cola, longitud total, situación del poro excretor y anillo nervioso posterior) de las cepas con una dimensiones menores. Mientras que el segundo eje principal, que explica el 19,8% de la variabilidad total, separa por su parte negativa aquellas cepas con un elevado valor del índice E y D y una mayor anchura y por su parte positiva las cepas con un elevado valor del índice A y C.

La representación gráfica de las cepas sobre los dos primeros ejes principales (fig. 5.58) y el posterior análisis de clasificación automática (cluster) (fig. 5.59) separa cuatro clases de cepas, en donde la variabilidad intragrupos es menor que la variabilidad intergrupos.

En primer lugar se define un gran grupo central (clase I) con características biométricas intermedias, formado por todas las cepas pertenecientes a la especie *S. feltiae*.

Tabla 5.72. Correlación de las variables consideradas en las características morfológicas de las formas infectivas, con los dos ejes principales del ACP. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado. **Leyenda:** LONG: longitud total, ANCH: anchura total, PE: situación del poro excretor, AN: situación del anillo nervioso, BF: longitud de la faringe, LC: longitud de la cola, Índices A, B, C, D, E.

	AXE 1	AXE 2	
LONG **	0.9287	0.8626 *	0.3463 0.1199 *
ANCH **	0.6259	0.3917 *	-0.4385 0.1923 *
PE **	0.9054	0.8198 *	-0.3823 0.1461 *
AN **	0.8850	0.7832 *	-0.1245 0.0155 *
BF **	0.7689	0.5912 *	0.0146 0.0002 *
LC **	0.9508	0.9039 *	0.1262 0.0159 *
A **	0.6365	0.4051 *	0.6704 0.4495 *
B **	0.8153	0.6647 *	0.3931 0.1545 *
C **	0.0180	0.0003 *	0.5885 0.3463 *
D **	0.8054	0.6487 *	-0.4224 0.1784 *
E **	0.1869	0.0349 *	-0.7475 0.5587 *

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

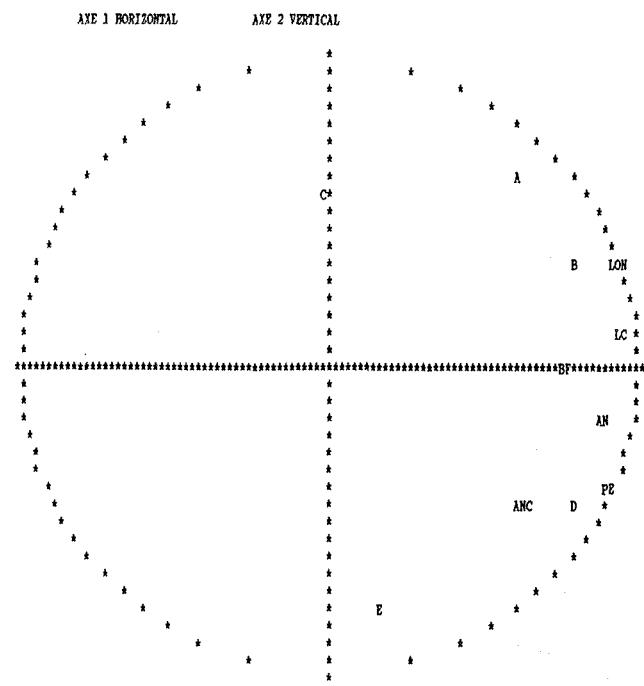


Figura 5.57. Representación de las variables consideradas en el análisis de las características morfológicas de las formas infectivas, sobre los dos ejes principales. Leyenda: igual a la tabla 5.72.

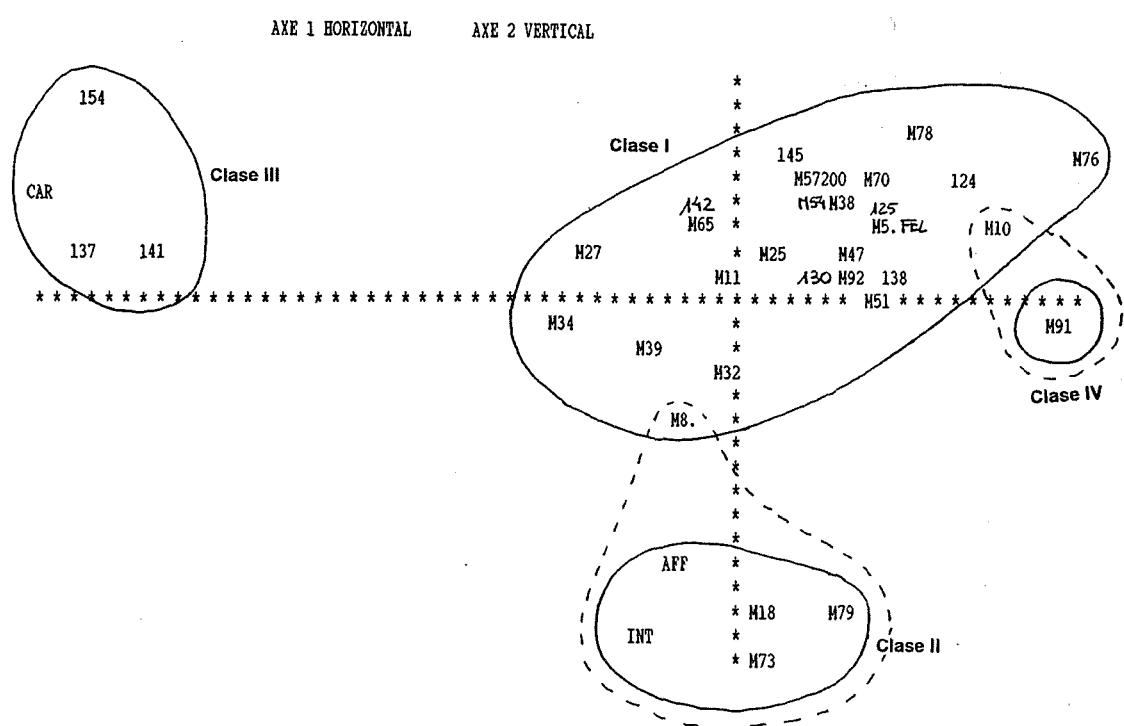


Figura 5.58. Representación de las cepas sobre los dos primeros ejes principales.

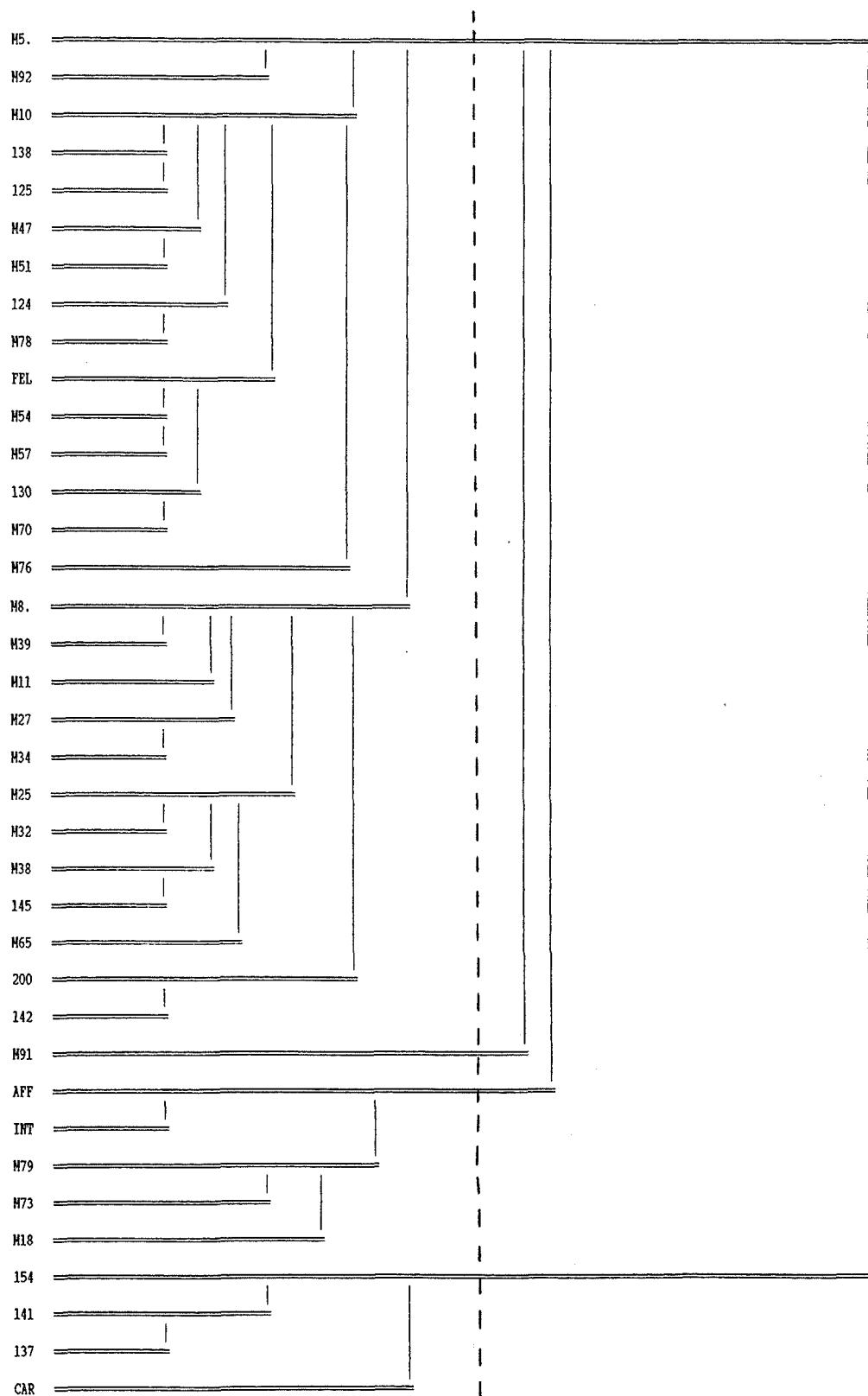


Figura 5.59. Dendograma de las características morfológicas de las formas infectivas. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendograma para separar las clases.

En el extremo izquierdo del gráfico (fig. 5.58) queda muy bien delimitado un pequeño grupo (clase III) formado por los nematodos de pequeñas dimensiones en el que se incluyen las cepas M154, M137 y M141, todas ellas pertenecientes a la especie *S. carpocapsae* que también se haya incluida en dicho grupo. Como ya se ha comentado este grupo se caracteriza por poseer unos valores muy inferiores al valor medio en todas las características biométricas (fig. 5.60), al igual que en todos los índices excepto en el índice C (longitud relativa de la cola respecto a la longitud total) que presenta un valor ligeramente superior al valor medio.

Otro grupo claramente diferenciado del grupo central se encuentra en la parte inferior de la figura 5.58 (clase II). Dicho grupo está formado por las cepas M18, M73 y M79 conjuntamente con las especies *S. intermedia* (a cuya especie pertenecen las tres cepas anteriores) y *S. affinis*. Cabe señalar que el análisis de clasificación automática (cluster) no ha incluido en este grupo a la cepa M8, que, aunque está muy próxima en el gráfico, queda incluida dentro del primer grupo central. No obstante caracteres morfológicos no biométricos de esta cepa, como la presencia de una pequeña espina en el extremo de la cola, nos confirman su pertenencia a *S. affinis*, por lo que debe ser incluida en este grupo (trazo discontinuo del gráfico).

Las características diferenciadoras de esta clase II quedan de manifiesto en la fig. 5.60. Presentan una longitud total intermedia entre la clase I (*S. feltiae*) y la clase III (*S. carpocapsae*) y un anchura máxima mayor que dichas clases, lo que le confiere un valor bajo de índice A y B. La presencia de una cola bastante larga con respecto a la longitud total de las formas infectivas hace que posean un valor de índice C muy bajo. La posición del poro excretor y el anillo nervioso es más posterior que en las cepas de *S. feltiae* y *S. carpocapsae*, lo que determina que posean un valor muy elevado del índice D y E, claramente superior al resto de las cepas aisladas.

Finalmente el ACP y su posterior clasificación automática ha diferenciado un cuarto grupo (clase IV) formado en principio únicamente por la cepa M91. Esta cepa pertenecería a la especie nueva descrita en la cepa M10, que si bien mediante el análisis de cluster no ha sido incluido en esta cuarta clase, las grandes similitudes que presentan ambas cepas ha hecho que el ACP las represente próximas en el gráfico (fig. 5.58). Este hecho, conjuntamente con las características comunes de los machos de ambas especies que veremos más adelante, nos permitirían incluir ambas

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

especies en un mismo grupo (trazo discontinuo del gráfico). Esta cuarta clase (que en principio está representada únicamente por la cepa M91) se caracteriza por poseer unas biometrías superiores al resto de las cepas encontradas (fig. 5.60); mayor longitud y anchura máxima, posición del poro excretor y anillo nervioso posterior, y mayor longitud de la faringe y de la cola (características propias de la cepa M91).

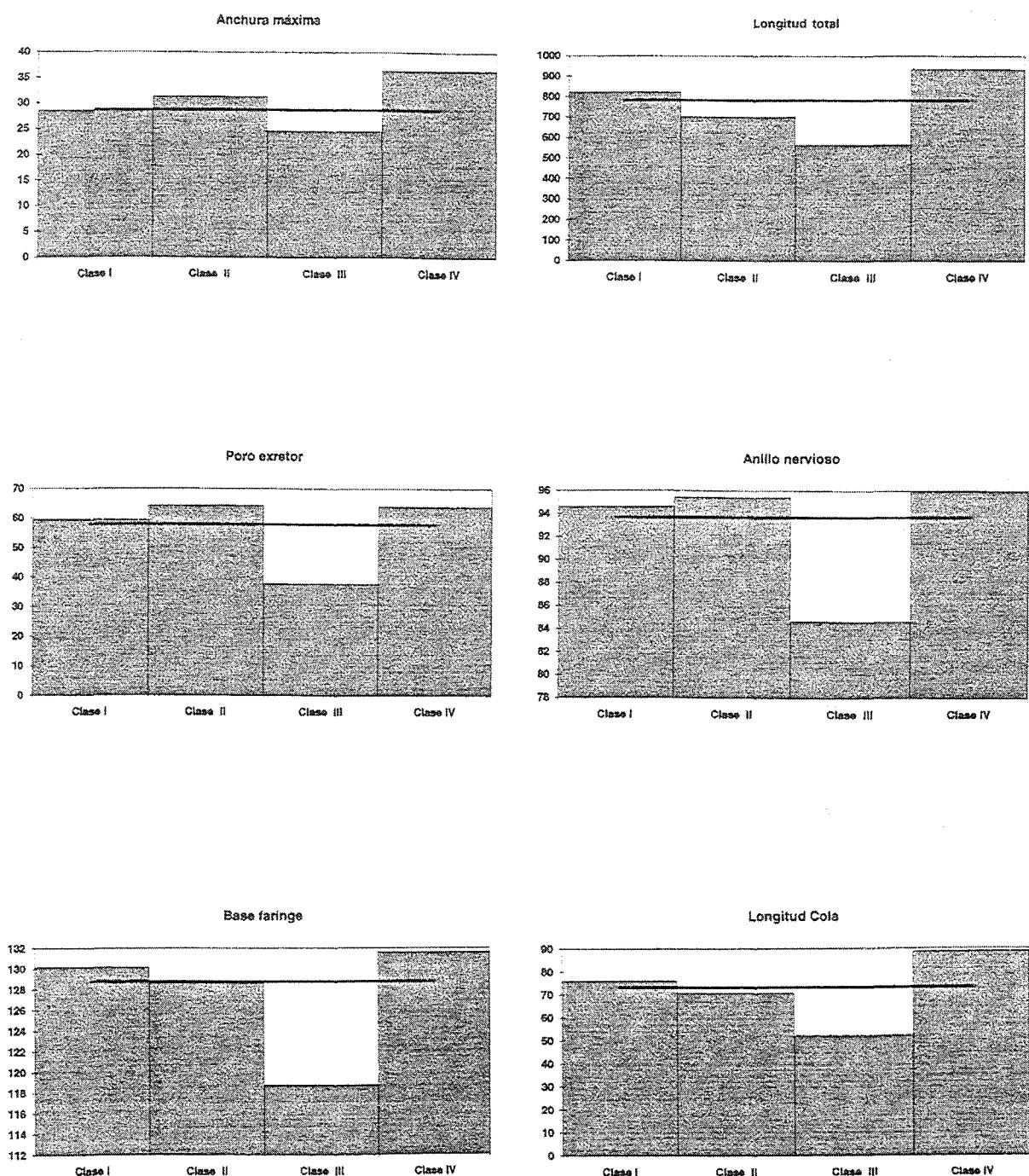


Figura 5.60 Caracteres morfológicos de cada una de las clases de cepas de nematodos separadas en el análisis de clasificación automática (cluster). La línea transversal indica el valor medio para todas las clases. (Todas las unidades están expresadas en micras)

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

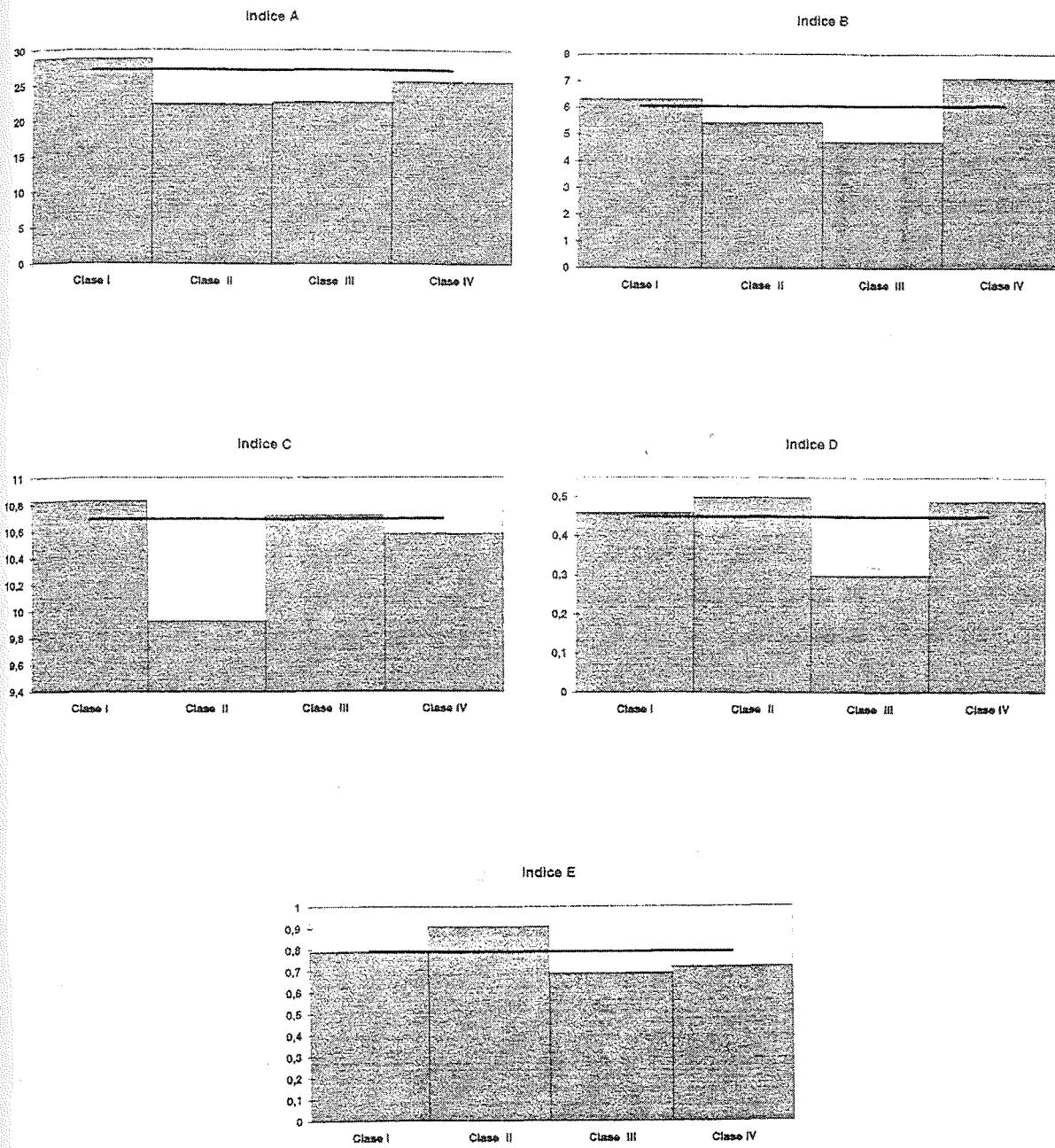


Figura 5.60 (continuación).

Leyenda:

- Clase I: cepas de *S. feltiae*.
- Clase II: cepas de *S. intermedia* y *S. affinis*.
- Clase III: cepas de *S. carpocapsae*.
- Clase IV: cepas de *Steinernema* sp. (M10 y M91).

B.- Machos:

Al igual que se ha realizado con las formas infectivas, el estudio biométrico comparativo de los machos de segunda generación de las cepas de steinernemátidos aisladas en este estudio, conjuntamente con las características biométricas de los machos de las especies del género *Steinernema* descritas en la bibliografía, se ha realizado mediante el Análisis de Componentes Principales (ACP).

La representación gráfica de las características biométricas consideradas, puede observarse en la fig. 5.61. En la tabla 5.73 se muestra la correlación entre los caracteres y los ejes principales.

Los dos primeros ejes principales explican únicamente el 66,2% de la variabilidad morfológica total de los machos de segunda generación de las cepas y especies de nematodos analizadas. El primer eje que explica el 40,2% de la variabilidad, separa aquellas cepas y especies de nematodos que poseen unas dimensiones mayores (mayor longitud total, posición del poro excretor y anillo nervioso posterior, y mayor longitud de la faringe). El segundo eje que explica el 26% de la variabilidad, diferencia las cepas y especies de nematodos a través de otras características morfológicas, principalmente centradas en el tamaño de la cola, espículas, gubernáculo, mucrón y los índices en relación con las mismas.

La representación gráfica de las cepas y especies de nematodos incluidas en este análisis nos da una dispersión de puntos de difícil interpretación (fig. 5.62). El análisis de clasificación automática (cluster) separa siete clases de cepas en los cuales existe una mayor homogeneidad intraclases que interclases (fig. 5.63).

Principalmente separa la especie *S. anomali* de las demás especies por poseer un tamaño significativamente mayor que el resto de las cepas, por otro lado separa a *S. scapterisci* por su elevado valor del índice E y D debido al gran tamaño de las espículas y a *S. rara* por su pequeño tamaño y larga cola lo que le confiere un elevado valor del índice C.

Otro grupo de características bastante diferenciadas del resto de los grupos es el formado por las cepas M10 y M91 que corresponden a la dos cepas pertenecientes a la nueva especie de *Steinernema* encontrada en este trabajo.

El resto de las cepas se encuentran representadas en la zona central del gráfico de forma bastante difusa.

Tabla 5.73. Correlación de las variables consideradas en las características morfológicas de los machos, con los dos ejes principales del ACP. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado. Leyenda: LONG: longitud total, ANCH: anchura total, PE: situación del poro excretor, AN: situación del anillo nervioso, BF: longitud de la faringe, LC: longitud de la cola, LE: longitud de las espículas, LG: longitud del gubernáculo, LM: longitud del mucrón, Índices A, B, C, D, E, F.

	AXE 1	AXE 2
LONG **	-0.9686	0.9382 *
ANCH **	-0.7744	0.5998 *
PE **	-0.8801	0.7746 *
BF **	-0.7749	0.6005 *
LC **	-0.6906	0.4769 *
LE **	-0.6221	0.3870 *
LG **	-0.3563	0.1269 *
LM **	0.3775	0.1425 *
A **	-0.6513	0.4242 *
B **	0.7599	0.5774 *
C **	0.1686	0.0284 *
D **	0.5465	0.2986 *
E **	0.2137	0.0457 *
F **	0.4531	0.2053 *
	0.0217	0.0005 *
	0.0053	0.0000 *
	-0.1016	0.0103 *
	0.1125	0.0127 *
	-0.6072	0.3687 *
	0.6133	0.3762 *
	0.6684	0.4468 *
	-0.4492	0.2018 *
	-0.1842	0.0339 *
	0.0851	0.0072 *
	-0.8283	0.6861 *
	0.6277	0.3940 *
	0.9454	0.8939 *
	-0.4534	0.2056 *

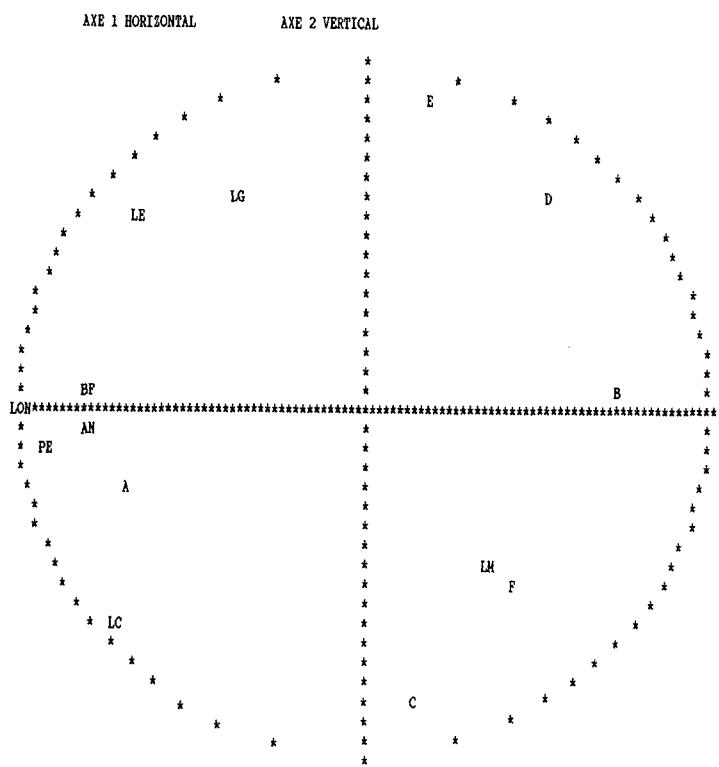


Figura 5.61. Representación de las variables consideradas en el análisis de las características morfológicas de los machos, sobre los dos ejes principales. Leyenda: igual a la tabla 5.73.

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

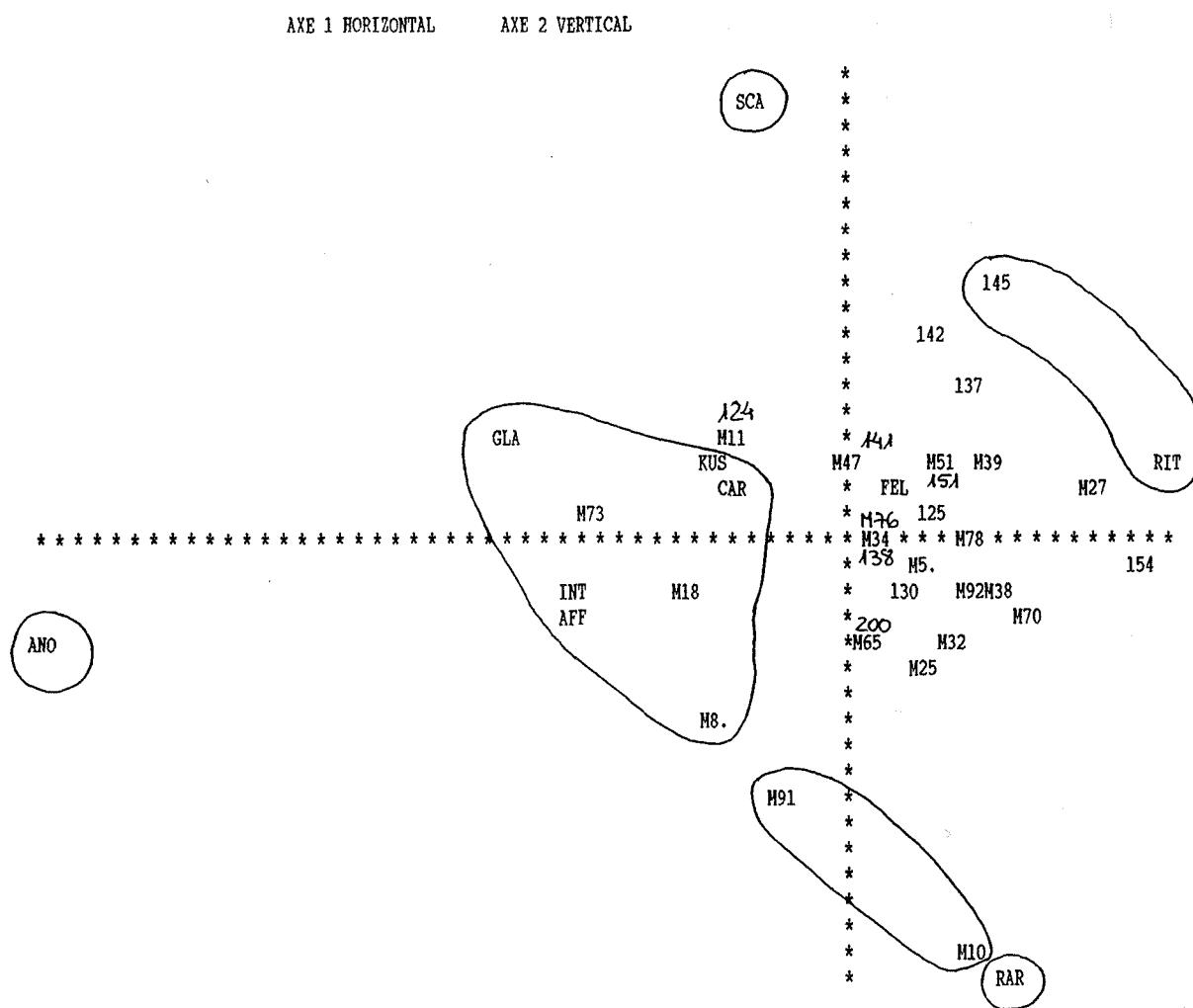


Figura 5.62. Representación de las cepas sobre los dos primeros ejes principales.

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

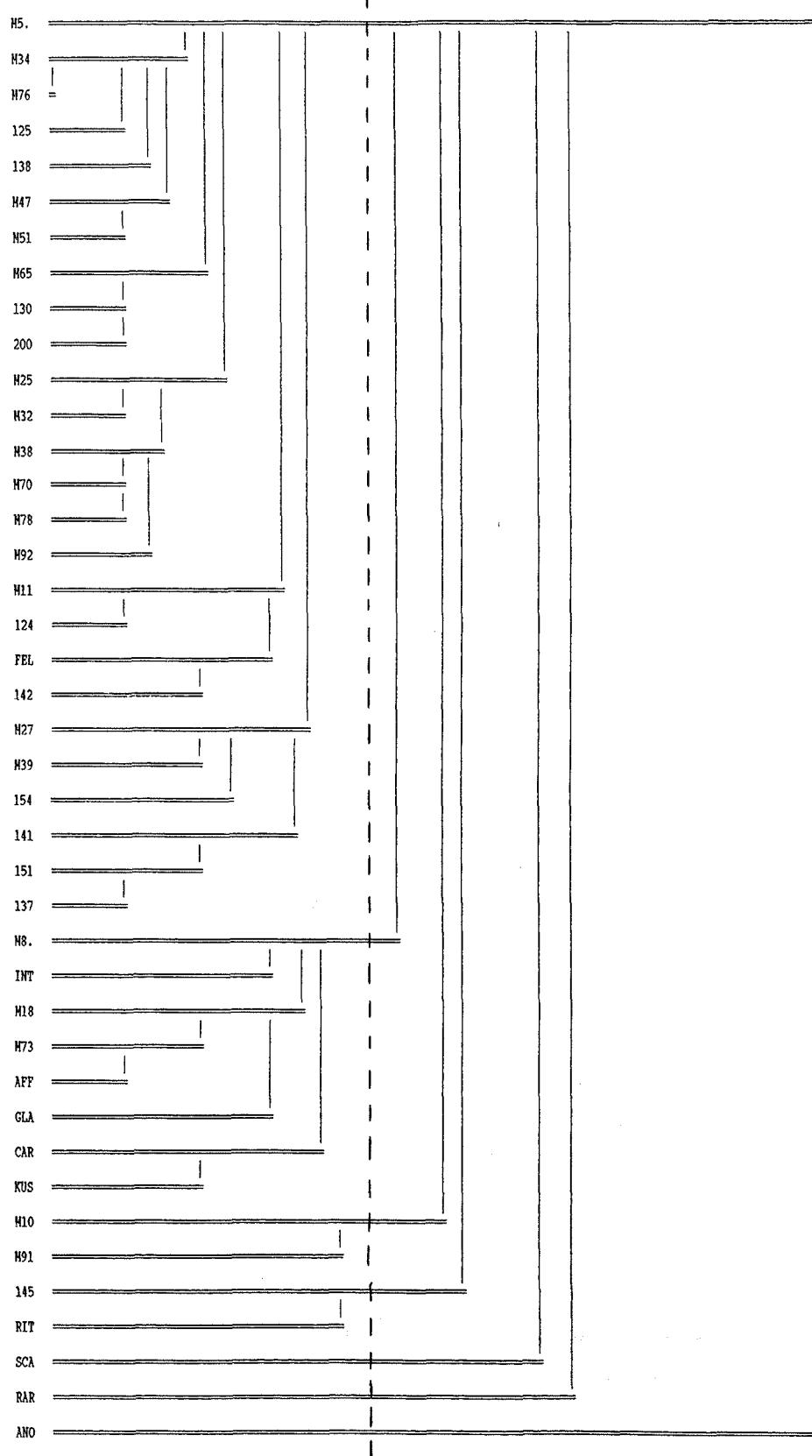


Figura 5.63. Dendograma de las características morfológicas de los machos. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendograma para separar las clases.

Para evidenciar más la variabilidad entre las cepas, y al igual que hemos hecho en el caso de las formas infectivas, hemos realizado un ACP considerando únicamente las características biométricas de los machos de las cepas aisladas en el presente estudio conjuntamente con las descripciones biométricas de la bibliografía de las especies a las que consideramos pertenecen nuestras cepas.

La representación de las características biométricas consideradas en este segundo análisis (ACP), puede observarse en la fig. 5.64. En la tabla 5.74 se muestra la correlación entre los caracteres analizados y los ejes.

Los dos primeros ejes principales explican únicamente el 61,7% de la variabilidad morfológica total de los machos de segunda generación de las cepas y especies de nematodos analizadas. El primer eje que explica el 35,2% de la variabilidad, tiende a separar las cepas por caracteres tales como la longitud de la cola, la longitud total, la posición del poro excretor y anillo nervioso, y los índices E y B. Mientras que el segundo eje que explica el 26,5% de la variabilidad agrupa las especies por caracteres como la longitud del gubernáculo, de las espículas y del mucrón y de los índices F y E.

La representación gráfica de las cepas y especies de nematodos incluidas en este segundo análisis se muestra en la fig. 5.65. El análisis de clasificación automática (cluster) separa diez clases de cepas en las cuales existe una mayor homogeneidad intraclasses que interclases (fig. 5.66). Sin embargo la agrupación de estas clases en algunos casos es difícil de interpretar.

El primer grupo claramente diferenciado (clase IX) está formado únicamente por la cepa M10 perteneciente a la especie nueva que hemos descrito, caracterizándose por una longitud de la cola superior a la media general de todas las cepas, una longitud de las espículas y gubernáculo inferior al resto de las cepas analizadas y un mucrón considerablemente más largo (fig. 5.67). Estas características quedan también reflejadas en un mayor valor del índice C (debido la mayor longitud de la cola), un menor valor de los índices D y E (debido a la menor longitud de las espículas), y un elevadísimo valor del índice F (debido a la gran longitud del mucrón).

Una cepa próxima a la cepa M10 es la cepa M91 que ha sido incluida en la clase X. Esta cepa también se caracteriza por ser de gran tamaño, aunque posee las espículas y el gubernáculo pequeños y un mucrón muy largo (fig. 5.67).

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

Tabla 5.74. Correlación de las variables consideradas en las características morfológicas de los machos, con los dos ejes principales del ACP. Primera columna: correlación, Segunda columna: correlación al cuadrado. Leyenda: LONG: longitud total, ANCH: anchura total, PE: situación del poro excretor, AN: situación del anillo nervioso, BF: longitud de la faringe, LC: longitud de la cola, LE: longitud de las espículas, LG: longitud del gubernáculo, LM: longitud del mucrón, Índices A, B, C, D, E, F.

	AXE 1	AXE 2
LONG **	0.8992	0.8086 *
ANCH **	0.6321	0.3995 *
PE **	0.7476	0.5590 *
BF **	0.6863	0.4711 *
LC **	0.9201	0.8465 *
LE **	0.3978	0.1582 *
LG **	-0.1550	0.0240 *
LM **	-0.0335	0.0011 *
A **	0.4445	0.1976 *
B **	-0.6471	0.4187 *
C **	0.4010	0.1608 *
D **	-0.6263	0.3923 *
E **	-0.6768	0.4581 *
F **	-0.1642	0.0270 *
	0.2983	0.0890 *
	-0.3185	0.1015 *
	0.1612	0.0260 *
	0.0085	0.0001 *
	0.2194	0.0481 *
	-0.7239	0.5240 *
	-0.7673	0.5887 *
	0.6892	0.4750 *
	-0.1797	0.0323 *
	0.3666	0.1344 *
	0.7304	0.5335 *
	-0.3990	0.1592 *
	-0.6900	0.4761 *
	0.7199	0.5182 *

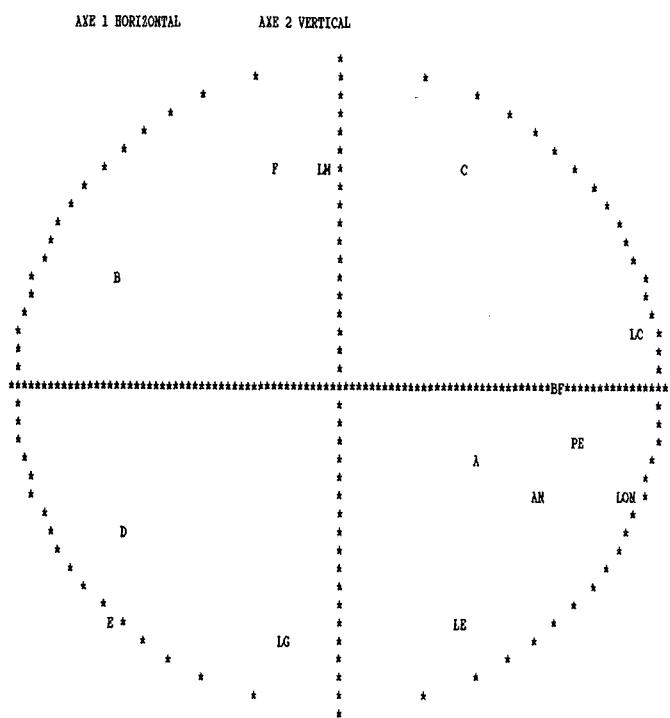


Figura 5.64. Representación de las variables consideradas en el análisis de las características morfológicas de los machos, sobre los dos ejes principales. Leyenda: igual a la tabla 5.73.

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

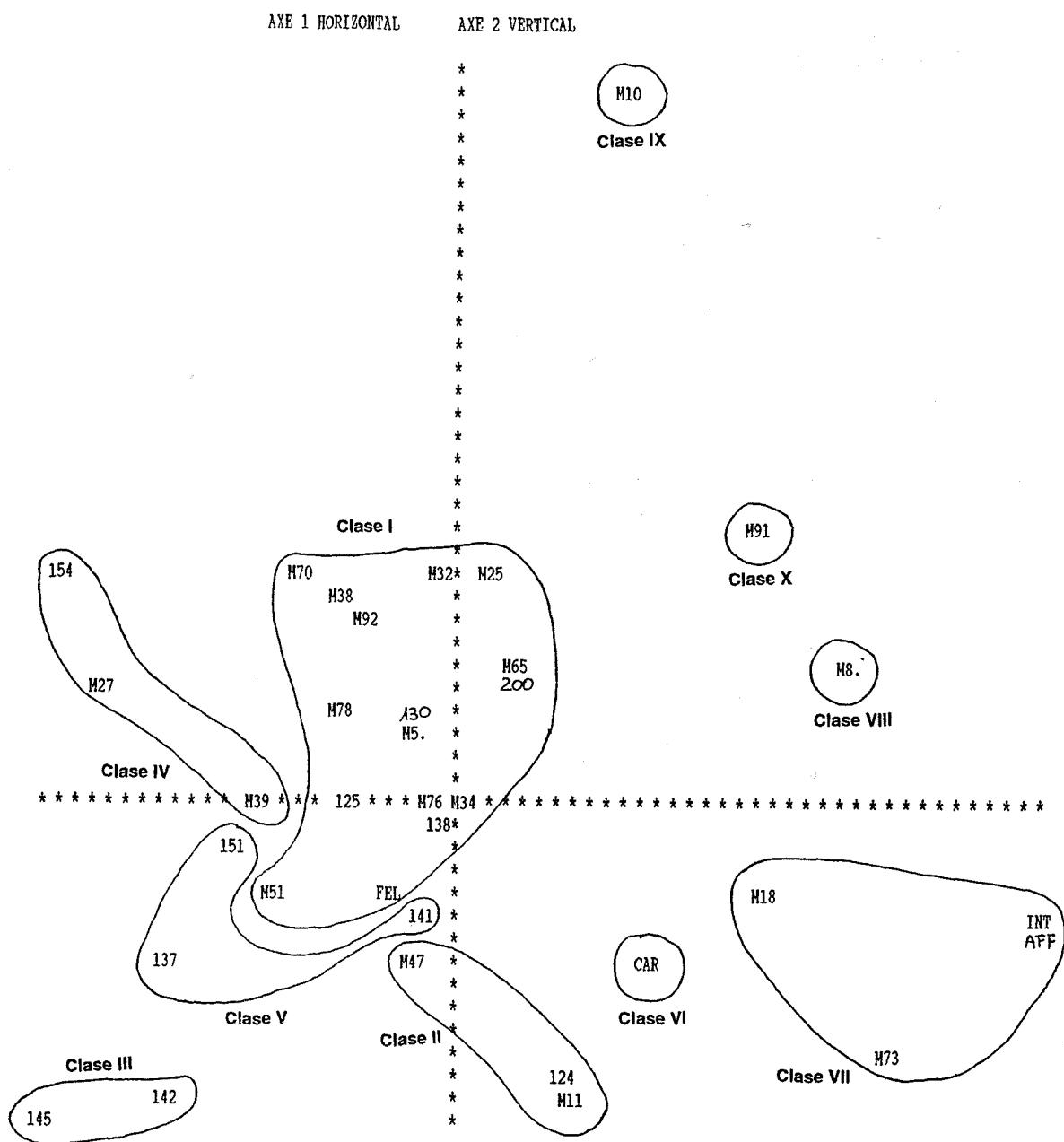


Figura 5.65. Representación de las cepas sobre los dos primeros ejes principales.

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

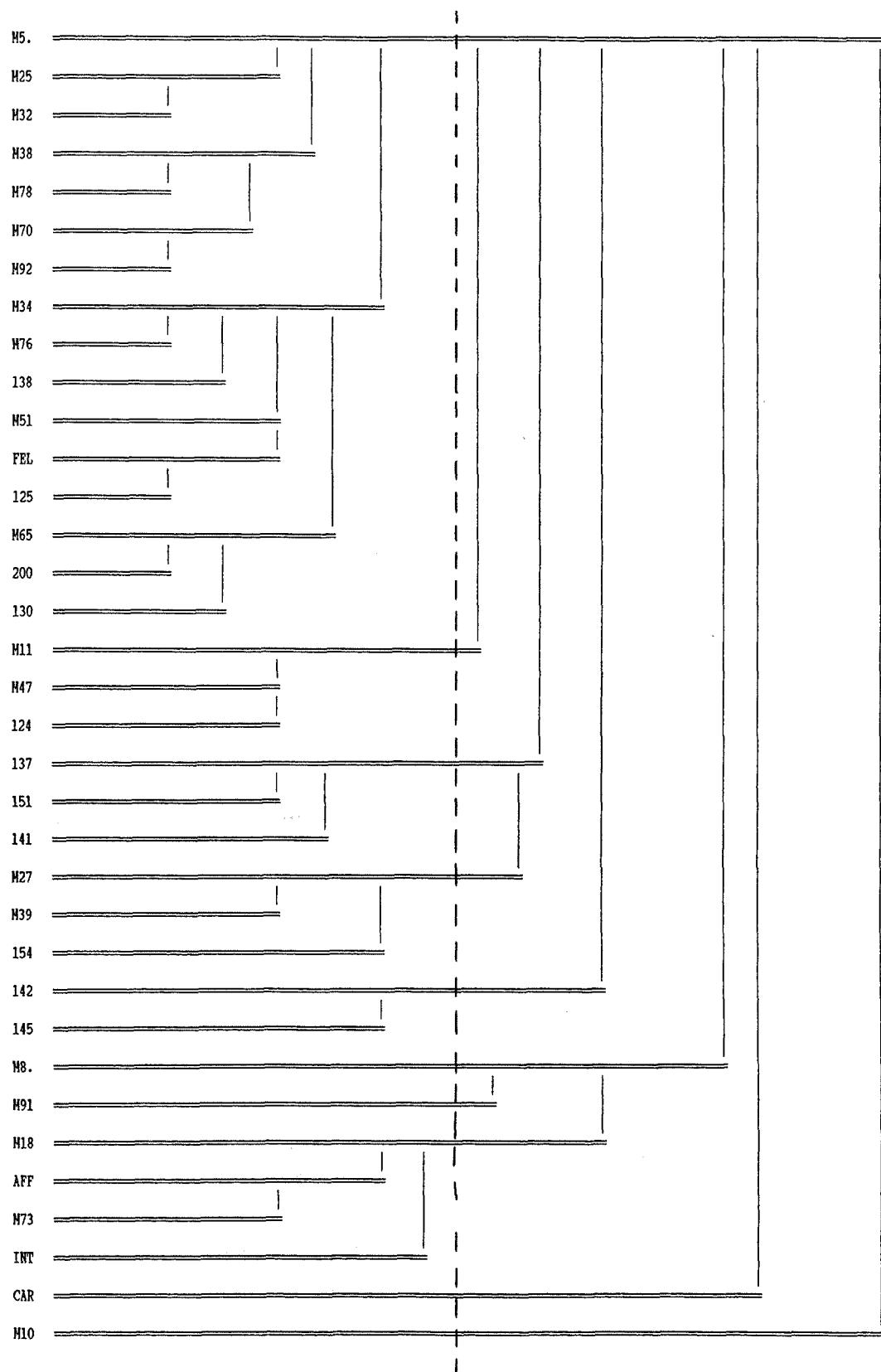


Figura 5.66. Dendograma de las características morfológicas de los machos. La línea discontinua indica el lugar por el que se corta el dendograma para separar las clases.

El siguiente grupo (clase VI) que se separa claramente del resto de las clases, también está formado por una única cepa de nematodos que corresponde a la descripción original de la especie *S. carpocapsae*. Esta especie se diferencia del resto de las cepas por poseer una mayor longitud total, una posición anterior del poro excretor, que se refleja en un menor valor del índice A, y una mayor longitud de las espículas y gubernáculo. Cabe destacar que las cepas de nematodos pertenecientes a esta especie (M141, M151, M154, M137) no han sido incluidas en esta clase VI, sino en las clases IV y V, diferenciándose de la anterior por poseer un tamaño global menor (fig. 5.76).

Otro grupo (clase VIII) separado de los anteriores está formado por la cepa M8 que permanece independiente de la clase VII donde se encuentran las especies *S. intermedia* y *S. affinis* (a la cual pertenece la cepa M8) y las cepas M18 y M73 (fig. 5.65). Ambas clases, que se diferencian entre sí por la posición menos posterior del poro excretor en la cepa M8 y una menor longitud de las espículas y gubernáculo, se diferencian del resto de las clases por poseer una longitud y una anchura mayor a la media del resto de las cepas, una posición más posterior del poro excretor, y una mayor longitud de la cola.

Existen otros tres grupos (Clase I, II, III) pertenecientes todos a la especie *S. feltiae*, que presentan unas características intermedias con respecto al resto de los grupos analizados, caracterizándose principalmente por el elevado valor del índice D, al considerar la elevada longitud de las espículas con respecto a la longitud total de estos machos.

Aunque el análisis de clasificación automática (cluster) ha podido separar los representantes de cada una de las especies encontradas en grupos diferentes, tanto su confusa representación gráfica en el ACP (fig. 5.65), como las numerosas interrelaciones entre los grupos, nos demuestran que los caracteres biométricos que hemos considerado en los machos del género *Steinernema*, por si solos, no permiten diferenciar claramente las especies de este género. Existe una variabilidad biométrica excesivamente elevada de los machos de estas especies, que impide su utilización exclusiva para la determinación de las mismas. Es preciso contrastar estos caracteres cuantitativos con caracteres morfológicos cualitativos (ej. forma de las espículas) que nos confirmen la determinación.

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

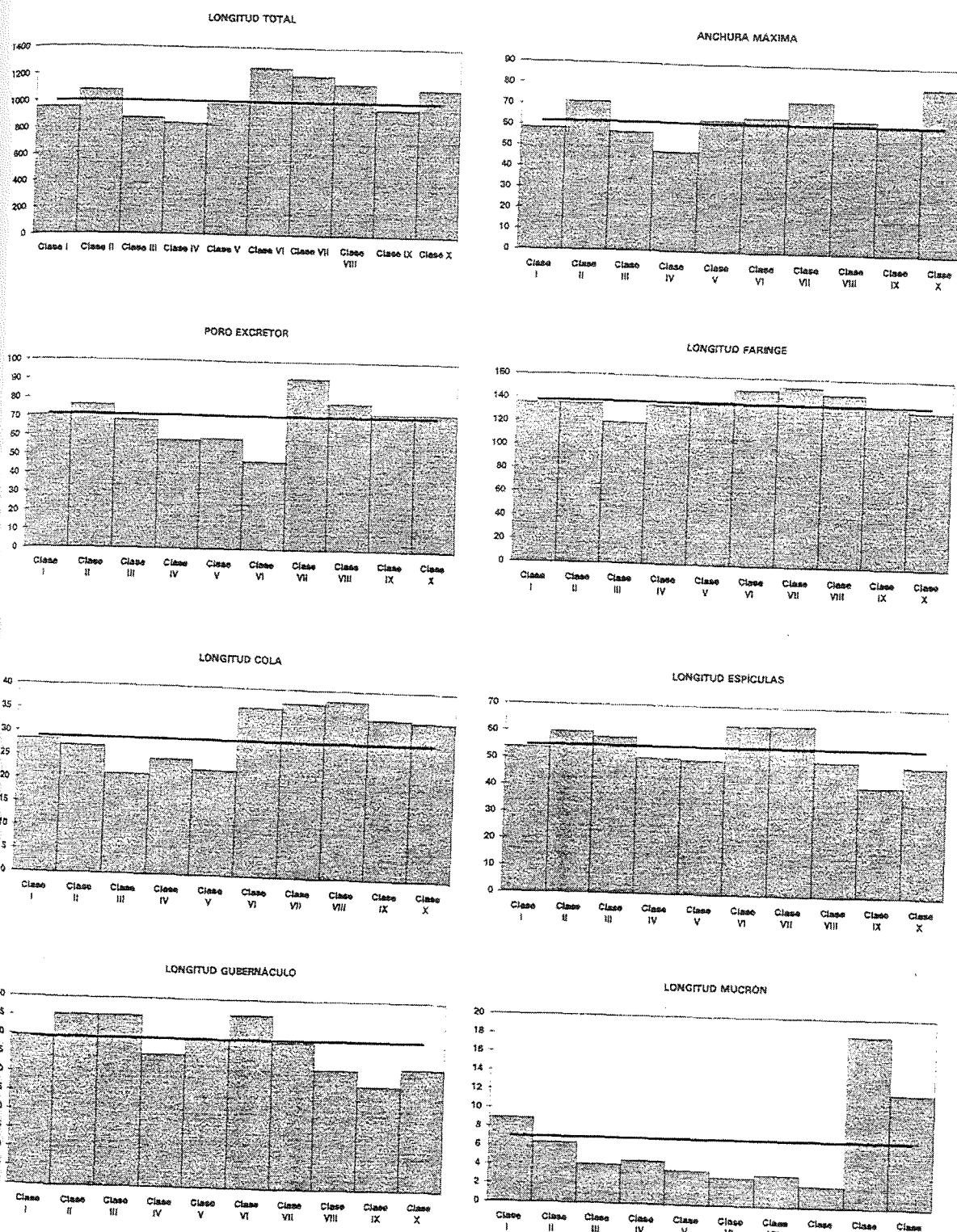


Figura 5.67. Caracteres morfológicos de cada una de las clases de cepas de nematodos separadas en el análisis de clasificación automática (cluster). La línea transversal indica el valor medio para todas las clases.. (Todas las unidades están expresadas en micras).

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

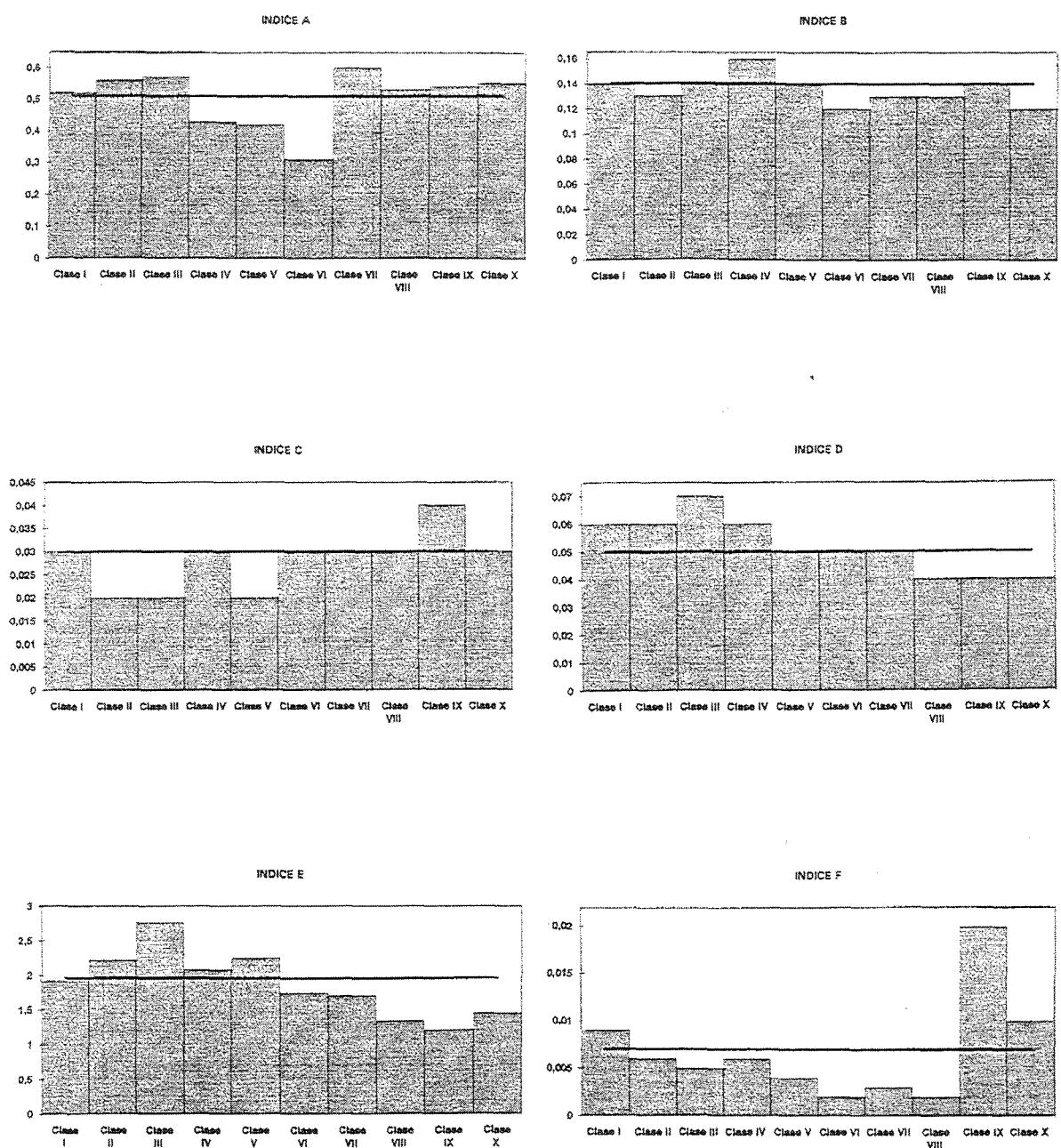


Figura 5.67 (continuación).

- Leyenda:
- | | |
|--|---|
| Clase I: cepas de <i>S. feltiae</i> . | Clase VI: <i>S. carpocapsae</i> . |
| Clase II: cepas de <i>S. feltiae</i> . | Clase VII: <i>S.intermedia</i> , <i>S affinis</i> . |
| Clase III: cepas de <i>S. feltiae</i> . | Clase VIII: M8. |
| Clase IV: cepas de <i>S. feltiae</i> , <i>S. carpocapsae</i> . | Clase IX: M10. |
| Clase V: cepas de <i>S.carpocapsae</i> | Clase X: M91. |

8) Caracterización ecológica de las especies aisladas

Para determinar la importancia de los factores ambientales que hemos considerado: estacionalidad, tipo de hábitat (prado, bosque o cultivo), altitud, temperatura y pluviometría media anual, en la aparición de las diversas especies aisladas, hemos realizado un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) cuyos resultados se muestran en la fig. 5.68. Estos resultados son comparables a los obtenidos en el AFC realizado en un capítulo anterior al analizar la presencia de nematodos entomopatógenos en las diferentes áreas muestreadas (fig. 3.11), pero en esta ocasión sólo hemos incluido en el análisis aquellas áreas en las que hemos detectado la presencia de los nematodos.

La variabilidad explicada por el primer eje representado es del 14% de la variabilidad total, mientras que el segundo eje explica el 10%, por lo que la representación que hemos realizado de los dos primeros ejes principales explica únicamente el 24% de la variabilidad total. En la tabla 5.75 se muestra la correlación entre los caracteres analizados y los ejes principales.

En esta representación se observa una tendencia de distribución de las diferentes áreas con presencia de nematodos en función de los diversos parámetros ambientales considerados. Sobre el primer eje se observa una cierta graduación desde las áreas representadas en el extremo izquierdo de la figura 5.68, que presentan una elevada temperatura, una baja pluviometría media anual, y se encuentran situadas en zonas de baja altitud, hasta el extremo derecho donde están representadas las áreas que se encuentran a elevada altitud, con unas temperaturas medias anuales muy bajas y una elevada pluviometría. El segundo eje nos separa las áreas que se encuentran en las condiciones ambientales más extremas (altas y bajas temperaturas, pluviometrías y altitudes) frente a las áreas que presentan unas características ambientales intermedias.

Tabla 5.75 Coordenadas factoriales (primera columna), correlaciones (segunda columna) y contribuciones relativas (tercera columna) de las variables originales sobre los dos primeros ejes obtenidos en el análisis. Leyenda: PRI: primavera, OTO: otoño, CUL: cultivo, BOS: bosque, PRA: prado, AL: altitud, TE: temperatura, PL: pluviometría (orden ascendente de 1 a 9)

		AXE	1		AXE	2	
PRI	** 0.090	0.009	0.1*	0.358	0.145	2.8*	
OTO	** -0.109	0.011	0.2*	-0.406	0.145	3.2*	
	**		0.3 *			6.1 *	
AL2	** -0.859	0.049	1.4*	0.669	0.030	1.2*	
AL3	** -0.781	0.141	3.5*	0.833	0.160	5.4*	
AL4	** -0.714	0.199	4.4*	-0.008	0.000	0.0*	
AL5	** -0.156	0.002	0.0*	-2.295	0.351	13.8*	
AL6	** 0.664	0.046	1.3*	-0.849	0.075	2.8*	
AL7	** 0.241	0.008	0.2*	-0.903	0.116	4.3*	
AL8	** 1.842	0.628	16.4*	0.526	0.051	1.8*	
AL9	** 0.855	0.024	0.7*	1.849	0.110	4.5*	
	**		28.1 *			33.7 *	
CUL	** -0.445	0.255	3.5*	-0.167	0.036	0.7*	
BOS	** -0.236	0.016	0.4*	0.316	0.028	0.9*	
PRA	** 1.364	0.521	12.6*	0.114	0.004	0.1*	
	**		16.4 *			1.7 *	
TE1	** 0.695	0.032	0.9*	1.013	0.068	2.7*	
TE2	** 1.640	0.753	18.2*	0.122	0.004	0.1*	
TE3	** 0.340	0.012	0.3*	-1.705	0.301	11.4*	
TE4	** -0.489	0.025	0.7*	-1.493	0.231	8.7*	
TE5	** -0.735	0.180	4.2*	-0.021	0.000	0.0*	
TE6	** -0.740	0.214	4.8*	0.765	0.229	6.9*	
	**		29.1 *			29.8 *	
PL1	** -0.832	0.022	0.7*	1.081	0.038	1.5*	
PL2	** -0.733	0.150	3.6*	0.413	0.048	1.6*	
PL3	** -0.898	0.026	0.8*	0.130	0.001	0.0*	
PL4	** -0.722	0.120	3.0*	0.310	0.022	0.8*	
PL5	** -0.538	0.030	0.8*	-1.601	0.265	10.0*	
PL6	** -0.212	0.005	0.1*	0.071	0.001	0.0*	
PL7	** 0.907	0.152	4.0*	-1.213	0.272	9.6*	
PL8	** 2.127	0.146	4.4*	0.261	0.002	0.1*	
PL9	** 1.332	0.329	8.6*	0.886	0.145	5.1*	
	**		26.0 *			28.7 *	

Si nos fijamos en las diversas cepas que hemos encontrado en cada una de las áreas representadas en la figura 5.68, observamos como las cepas que se encuentran en áreas de elevada temperatura, baja pluviometría y menor altitud pertenecen prioritariamente a la especie *S. feltiae* y alguna cepa de la especie *S. carposcapsae* (M137) y de la especie *S. intermedia* (M18). Sin embargo en las áreas con un clima más frío con una pluviometría mayor y situados a elevada altitud encontramos algunas cepas de nematodos pertenecientes a la especie *S. feltiae* (en menor proporción que en el caso anterior), representantes de la especie *S. carposcapsae* (M141), la única cepa de nematodos perteneciente a la especie *S. affinis* (M8), y la cepa M10 que pertenecería a la nueva especie descrita en este trabajo. Finalmente en el grupo de áreas con características ambientales intermedias se encuentran cepas pertenecientes a la especie *S. feltiae*, pero también se encuentran las cepas de la especie *S. intermedia* (M73 y M79), y el otro representante de la nueva especie anteriormente referenciada (M91).

5. Estudio taxonómico de los nematodos entomopatógenos.

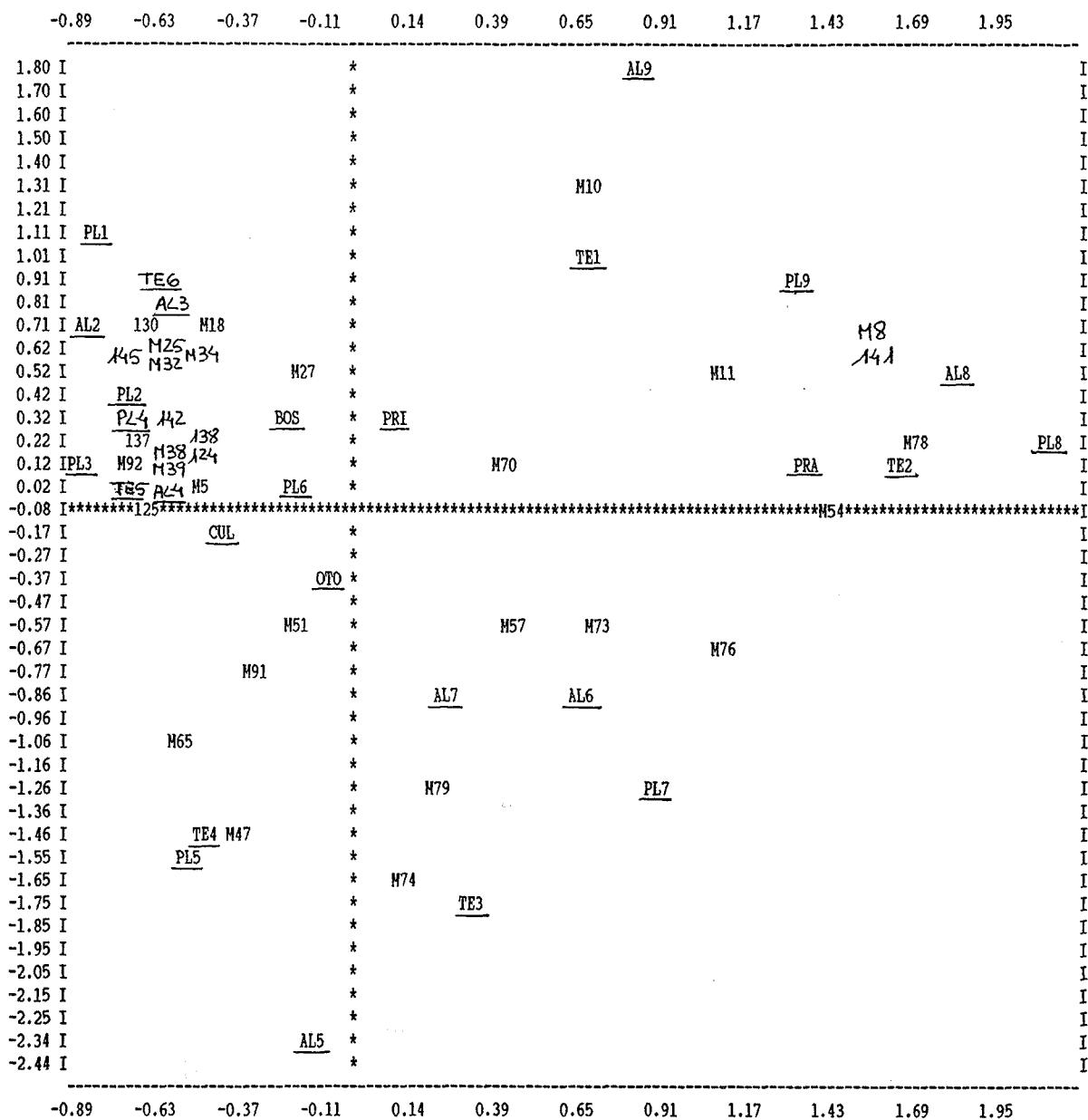


Figura 5.68. Representación de las cepas y variables consideradas sobre los dos primeros ejes principales. (Leyenda: igual que la tabla 5.75).

9) Conclusiones.

La especie de nematodo entomopatógeno más ampliamente representada en los suelos de Cataluña es *Steinernema feltiae* (69,5% de los steinernemátidos encontrados). La distribución conocida de esta especie, incluye: Australia, Nueva Zelanda y gran parte de Europa (Poinar, 1990).

S. feltiae es la única especie encontrada por Blackshaw (1988) en el Norte de Irlanda. Griffin et al, (1991) encontraron que era la especie más frecuente en Irlanda con un 71% de ocurrencia, pero tambien encontraron un 3,3% de las muestras con la especie *S. affinis*. Hominick y Briscoe (1990a) han señalado que *S. feltiae* es la especie más frecuente en los suelos británicos, aunque también encontraron otra especie de steinernemátilo no identificada. Hominick y Briscoe (1990a) afirman que *S. feltiae* también es la especie de steinernemátilo más representada en los suelos de Holanda. En Italia *S. feltiae* es bastante frecuente (Ehlers et al, 1991), aunque estos autores detectaron un mayor número de cepas de *S. carpocapsae*. En Alemania *S. feltiae* es la especie más común seguida de *S. affinis* (Ehlers et al, 1991). En base a la distribución observada de esta especie, Hominick y Briscoe (1990a) apuntan que *S. feltiae* es una especie que prevalece en climas templados estando adaptada a las bajas temperaturas.

Aunque la presencia de *S. feltiae* en Cataluña es la primera cita para la Península Ibérica, hemos comprobado que esta especie se encuentra en casi todos los tipos de áreas muestreadas, desde las áreas con elevadas temperaturas, y baja pluviometría hasta las áreas con bajas temperaturas y elevada pluviometría; desde los 0-100m hasta los 1200-1600m de altitud, y en suelos de cultivos, prados y bosques. Por ello pensamos que *S. feltiae* es una especie de amplia distribución sin excesivas restricciones ambientales que puede adaptarse facilmente a las diferentes condiciones climáticas donde ha sido encontrada.

La segunda especie de steinernemátilo que ha aparecido más frecuentemente en los suelos de Cataluña, ha sido *S. carpocapsae* que representa el 11,1% de los steinernemátidos encontrados. Esta especie es el nematodo entomopatógeno que presenta una distribución más amplia a nivel mundial, abarcando America del Norte y América del Sur,

Australia, Nueva Zelanda y Europa (Poinar, 1990). El presente estudio representa la primera cita de esta especie para la Península Ibérica.

Aunque en Italia esta especie es el mayor representante del género (Ehlers et al, 1991), en Cataluña, sin embargo, representa una especie minoritaria si es comparada con la amplia presencia de *S. feltiae*. En nuestro estudio, las cuatro cepas de *S. carposcapsae* han sido encontradas en áreas con condiciones climáticas muy diversas, lo que demuestra que es una especie cosmopolita que se puede adaptar bastante bien a los diversos climas donde ha sido aislada. El hecho de que dos de estas cuatro cepas fuesen aisladas conjuntamente con la especie *S. feltiae* nos indica que ambas especies pueden compartir un mismo hábitat.

Otra especie encontrada en nuestro estudio ha sido *S. intermedia*, las tres cepas aisladas de esta especie representan el 8,3% de los steinernemátidos encontrados. La distribución conocida de *S. intermedia* estaba delimitada únicamente a la localidad de Charleston, Carolina del Sur (EEUU) donde fue encontrada (Poinar, 1990).

En Cataluña hemos encontrado esta especie en suelos de cultivo (alfalfa) y en diversos bosques (alcornoque y avellano), las muestras donde se encontraron estas cepas estaban situadas en áreas con una temperatura media anual relativamente alta en el caso de la cepa M18 e intermedia baja en el caso de las cepas M73 y M79 y una pluviometría relativamente alta (800-1000 mm).

El hallazgo de estas tres cepas de *S. intermedia* en Cataluña, se puede considerar como la primera cita de esta especie en el continente europeo, por lo que queda ampliado, en gran medida, el rango de distribución de esta especie.

La especie *S. affinis* ha sido encontrada en una sola ocasión, representando el 2,8% de los nematodos steinernemátidos encontrados. Esta especie presentaba una distribución limitada exclusivamente al norte de Europa (Dinamarca y norte de Alemania) (Poinar, 1990). Posteriormente *S. affinis* ha sido encontrada en otros países del norte de Europa como es Irlanda (Griffin et al, 1991).

En Cataluña esta especie ha sido aislada en un prado situado en los Pirineos, a elevada altitud (1200-1600m), con unas temperaturas medias anuales entre 6 y 8°C y una pluviometría elevada (1100-1200 mm). Las características del área donde fue encontrada esta especie conjuntamente

con su rango de distribución original, nos indican que esta especie está adaptada a las bajas temperaturas y necesita unos mayores requisitos de humedad para su persistencia. El hallazgo de esta especie en Cataluña, amplía su rango de distribución al norte y sur de Europa.

Finalmente hemos encontrado dos cepas de una nueva especie del género *Steinernema*, que representan el 5,5% de los steinernemátidos aislados.