

Evaluación de la infectividad del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 formulado en microcápsulas de alginato sobre larvas de la mosca chichera (*Hermetia illucens*) (Diptera: Stratiomyidae) en condiciones de laboratorio

Zamia Rojas Miranda

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2018

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la salud y las fuerzas para continuar día con día.

Agradezco a cada uno de mis familiares principalmente a mi mamá María Rojas Miranda por tenerme siempre en sus oraciones y a Emmanuel Machado por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad de Costa Rica por permitirme formar parte de esta prestigiosa institución.

A la profesora Lidieth Uribe por todo su ayuda y paciencia.

A los profesores Lorena Flores, Danny Humphreys y Julio Arias por las revisiones realizadas.

A cada uno de los integrantes del Laboratorio de Microbiología Agrícola por sus consejos y amistad.

A todos los amigos que me dejó esta etapa universitaria que esta por culminar, por su apoyo en los buenos y malos momentos.

Gracias a cada uno de ustedes porque sin su ayuda esta tesis no hubiese sido posible.

Evaluación de la infectividad del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 formulado en microcápsulas de alginato sobre larvas de la mosca chichera (*Hermetia illucens*) (Diptera: Stratiomyidae) en condiciones de laboratorio

Zamia Rojas Miranda

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA
AGRÓNOMA CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

_____	DIRECTORA DE TESIS
Lidieth Uribe Lorío. Dra.	
_____	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Lorena Flores Chaves. M.Sc.	
_____	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Julio Arias Reverón. Ph.D.	
_____	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Danny Humphreys Pereira. Dr.	
_____	DIRECTOR DE ESCUELA
Luis Gómez Alpízar. Ph.D.	
_____	SUSTENTANTE
Zamia Rojas Miranda. Ing. Agr.	

IINDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE CUADROS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
REVISIÓN DE LITERATURA	14
Morfología y generalidades de <i>Hermetia illucens</i>	14
Ciclo de vida	15
Factores ambientales que influyen en el desarrollo de <i>Hermetia illucens</i>	16
Descripción del daño al cultivo del banano.....	18
Manejo agronómico de <i>Hermetia illucens</i>	18
Generalidades de los nematodos entomopatógenos	18
Ciclo biológico del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis</i>	19
Factores ambientales que afectan a los NEP	21
Métodos de reproducción de <i>Heterorhabditis</i>	22
Formulación y aplicación de <i>Heterorhabditis</i>	23
Infección de larvas de <i>H. illucens</i> con nematodos del género <i>Heterorhabditis</i>	24
METODOLOGÍA	25
1. Material biológico	25
2. Reproducción <i>in vivo</i> de los juveniles infectivos de <i>Heterorhabditis</i> sp. en <i>Galleria mellonella</i>	25
3. Almacenamiento de los nematodos	26
4. Elaboración de las microcápsulas de alginato	26
5. Determinación de la concentración de nematodos en una suspensión	27
6. Infección de larvas de <i>H. illucens</i> con suspensiones de los nematodos <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 y <i>Steinernema costarricense</i>	27
6.1. Efecto de la aplicación de una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre larvas de <i>H. illucens</i>	28
6.2. Efecto de la aplicación de una suspensión con tres concentraciones 2000, 3000 y 4000 JI/ml de los nematodos <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 y <i>Steinernema costarricense</i> sobre larvas de <i>H. illucens</i>	28
7. Evaluación de la eficacia de cápsulas de alginato con el nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre las larvas de <i>H. illucens</i> en el medio platos Petri	29

7.1. Infección de larvas de <i>H. illucens</i> con dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con una concentración de 200 JI/ml.....	30
7.2. Infección de larvas de <i>H. illucens</i> con dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con tres concentraciones de nematodos.....	30
7.3. Infección de larvas de <i>H. illucens</i> con dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) y dos concentraciones de nematodos.....	31
8. Evaluación del efecto de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) conteniendo <i>Photorhabdus</i> sp. y <i>Xenorhabdus</i> sp. sobre larvas de <i>H. illucens</i> en platos Petri	32
9. Inoculación de larvas de <i>H. illucens</i> con 5 dosis de cápsulas (1, 2, 3, 4 y 5 cápsulas/1larva) y una concentración de 9000 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 en recipientes plásticos con residuos de banano	34
10. Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
1. Infección de larvas de <i>H. illucens</i> con suspensiones de los nematodos <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 y <i>Steinernema costarricense</i>	36
1.1. Efecto de una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre larvas de <i>H. illucens</i>	36
1.2. Efectividad de una suspensión con una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml de los nematodos <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 y <i>Steinernema costarricense</i> sobre larvas de <i>H. illucens</i>	38
2. Eficacia de cápsulas de alginato con el nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre las larvas de la mosca chichera en platos Petri	42
2.1. Efectividad de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con una concentración de 200 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre larvas de <i>H. illucens</i>	42
2.2. Efectividad de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con tres concentraciones (2000, 3000 y 4000 JI/ml) del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre larvas de <i>H. illucens</i>	43
2.3. Efectividad de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con dos concentraciones (8000 JI/ml y 9000 JI/ml) del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre larvas de <i>H. illucens</i>	46
3. Evaluación del efecto de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) conteniendo <i>Photorhabdus</i> sp. y <i>Xenorhabdus</i> sp. sobre larvas de <i>H. illucens</i> en platos Petri	49
4. Efectividad de 5 dosis de cápsulas (1, 2, 3, 4 y 5 cápsulas/1larva) elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre larvas de <i>H. illucens</i> en recipientes plásticos con residuos de banano	51
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	56
LITERATURA CITADA	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número y posición de los espiráculos en larvas del orden Díptera; a) holopnéustico, b) perinéustico, c) heminéustico, d) anfipnéustico, e) propnéustico, f) metapnéustico, g) apnéustico Tomado de Guimarães y De Souza (2006)	15
Figura 2. a) Plato Petri con larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 y b) Trampa White	26
Figura 3. a) Microcápsulas de alginato con la bacteria simbionte <i>Photorhabdus</i> sp. y b) Microcápsulas con una concentración de 9000 JI/ml observada al estereoscopio.....	27
Figura 4. a) Larvas medianas y 10 cápsulas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 y b) Establecimiento del ensayo en el laboratorio de Microbiología Agrícola-CIA.....	31
Figura 5. a) Bacterias rayadas en medio AN; <i>Xenorhabdus</i> sp. (izquierda) y <i>Photorhabdus</i> sp. (derecha) y b) Suspensión de las bacterias en 5 ml de agua autoclavada.....	33
Figura 6. a) Tratamiento con una dosis de 5 cápsulas/larva, b) Agujeros en la tapa para permitir la oxigenación de las larvas y c) Establecimiento del ensayo en el invernadero.....	35
Figura 7. Proporción de larvas pequeñas y medianas de <i>H. illucens</i> infectadas con una suspensión de 200 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07.....	37
Figura 8. Porcentajes de mortalidad de larvas pequeñas y medianas de <i>H. illucens</i> al utilizar tres concentraciones y dos géneros de nematodos.....	39
Figura 9: Proporción de larvas de <i>H. illucens</i> infectadas según tres concentraciones crecientes del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07.....	40
Figura 10. Concentración de JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 requerido para obtener la DL ₅₀ en larvas pequeñas (P) y medianas (M) de <i>H. illucens</i> cuando se utilizan: a) 5 cápsulas/5larvas y b) 10 cápsulas/5larvas 5 cápsulas/5larvas	44
Figura 11. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL50 en larvas pequeñas (P) y medianas (M) de <i>H. illucens</i> infectadas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 a una concentración de a) 2000 JI/ml, b) 3000 JI/ml y c) 4000 JI/ml	45
Figura 12. Proporción de larvas pequeñas (P) y medianas (M) de <i>H. illucens</i> infectadas al colocar: a) 5 cápsulas/5larvas y b) 10 cápsulas/5larvas elaboradas con una concentración de 8000 y 9000 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07	47
Figura 13. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL50 en larvas pequeñas (P) y medianas (M) de <i>H. illucens</i> infectadas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 a una concentración de: a) 8000 y b) 9000 JI/ml.....	48
Figura 14. Cápsulas deterioradas (mordidas) por las larvas de <i>H. illucens</i>	50
Figura 15. Porcentaje de mortalidad de larvas medianas de <i>H. illucens</i> inoculadas con cinco dosis de cápsulas elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml.....	52
Figura 16. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL ₅₀ en larvas medianas de <i>H. illucens</i> infectadas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 a una concentración de 9000 JI/ml.....	52

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de tratamientos utilizados para realizar el segundo ensayo control	29
Cuadro 2. Número de tratamientos utilizados para llevar a cabo el segundo experimento	31
Cuadro 3. Número de tratamientos utilizados para la realización del tercer experimento	32
Cuadro 4. Número de tratamientos utilizados para llevar a cabo el tercer experimento control.....	33
Cuadro 5. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para la variable tamaño de larva al utilizar una suspensión de 200 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 sobre larvas de <i>H. illucens</i>	36
Cuadro 6. Tabla de contingencia con porcentajes de mortalidad de larvas pequeñas y medianas de <i>H. illucens</i> al utilizar una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07.....	37
Cuadro 7. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables tamaño de larva, género y concentración de nematodos aplicados en suspensión acuosa sobre las larvas de <i>H. illucens</i> ..	38
Cuadro 8. Valores de la DL_{50} y sus respectivos intervalos de confianza para los dos tamaños de larva y los dos géneros de nematodos cuando se utilizó una suspensión con una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml.....	40
Cuadro 9. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables tamaño de larva y número de cápsula (elaboradas con una concentración de 200 JI/ml)	42
Cuadro 10. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables concentración (2000, 3000 y 4000 JI/ml), número de cápsulas y tamaño de larva.....	43
Cuadro 11. Concentración de JI/ml requeridos para alcanzar la DL_{50} de larvas pequeñas y medianas de <i>H. illucens</i> cuando se utilizan 5 y 10 cápsulas/5larvas elaboradas con una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml.....	44
Cuadro 12. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas de <i>H. illucens</i> infectadas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 a una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml.....	45
Cuadro 13. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables concentración (8000 y 9000 JI/ml), número de cápsulas y tamaño de larva.....	46
Cuadro 14. Concentración de JI/ml requeridos para alcanzar la DL_{50} de larvas pequeñas y medianas de <i>H. illucens</i> cuando se utilizan 5 y 10 cápsulas/5larvas elaboradas con una concentración de 8000 y 9000 JI/ml.....	47
Cuadro 15. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas de <i>H. illucens</i> infectadas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 a una concentración de 8000 y 9000 JI/ml.....	48
Cuadro 16. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables tamaño de larva, género de bacteria y número de cápsulas evaluadas sobre larvas de <i>H. illucens</i>	50
Cuadro 17. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para la variable número de cápsulas elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml y evaluadas sobre larvas medianas de <i>H. illucens</i> ...	51
Cuadro 18. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas medianas de <i>H. illucens</i> infectadas con el nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. CIA-NE07 a una concentración de 9000 JI/ml.....	52

RESUMEN

El uso de nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* para el control biológico de plagas ha cobrado interés recientemente, debido a que estos organismos no generan resistencia, no contaminan el ambiente y se pueden producir masivamente. Sin embargo, la efectividad de los NEP se ve afectada por condiciones ambientales, por tal motivo, se ha implementado la formulación de nematodos en cápsulas de alginato la cual favorece la sobrevivencia del nematodo hasta que éste encuentra a su presa.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la infectividad del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 formulado en microcápsulas de alginato sobre las larvas de la mosca chichera (*Hermetia illucens*) en dos medios (platos Petri y recipientes con residuos de banano). El estudio se realizó en el laboratorio e invernadero del Área de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA).

Se establecieron tres ensayos a nivel de laboratorio en los que se evaluó el efecto de diferentes dosis de cápsulas y concentraciones de nematodos. En todos los ensayos se utilizaron dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) y dos tamaños de larvas: pequeñas (0,5 a 1 cm) y medianas (1 a 2 cm) de *H. illucens*. En el primer ensayo se evaluó el efecto de una concentración de nematodos de 200 JI (juveniles infectivos)/ml, en el segundo experimento se estudió el efecto de 3 concentraciones de nematodos (2000, 3000, 4000 JI/ml) y en el tercero las concentraciones 8000 y 9000 JI/ml. Previamente y con el fin de verificar la infectividad del nematodo, se evaluó en dos ensayos, el efecto de suspensiones con diferentes concentraciones de nematodos sobre la mortalidad de *H. illucens*. Además, se realizó un ensayo a nivel de invernadero, en el que se determinó el efecto de 5 dosis de cápsulas (1, 2, 3, 4, y 5 cápsulas/larva) elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml sobre larvas medianas de *H. illucens*. Este ensayo se llevó a cabo en los meses de febrero y abril del año 2018.

La utilización de cápsulas preparadas con 200 JI/ml no tuvo efecto sobre *H. illucens*. Mientras que el uso de 10 cápsulas y una concentración de 4000 JI/ml (en el segundo experimento) presentó los mejores resultados. Cuando se evaluaron concentraciones más altas (8000 y 9000 JI/ml) se encontró una mejor respuesta con 10 cápsulas y una concentración de 9000 JI/ml que causaron un 96 y 92% de mortalidad en larvas pequeñas y medianas respectivamente. Por su parte, los resultados obtenidos en los ensayos control indican que la mortalidad utilizando suspensiones fue mayor que la observada con el uso de cápsulas.

Cuando se estudió el uso de cápsulas a nivel de invernadero se encontró que ninguna de las cinco dosis alcanzó la DL_{50} , ya que se requerían 7,6369 cápsulas con una concentración de 9000 JI/ml para matar la mitad de la población de las larvas medianas de *H. illucens*. El porcentaje más alto se obtuvo

cuando se utilizó una dosis de 5 cápsulas/larva (35%). Con las demás dosis de cápsulas el porcentaje de mortalidad fue igual al obtenido en el testigo (sin JI/ml).

INTRODUCCIÓN

En Costa Rica el banano es el cultivo de mayor importancia económica, para el año 2017 se exportaron aproximadamente 2.553.420 toneladas métricas de banano, generando 378.894,4 millones de colones en divisas (SEPSA 2018). Esta producción se obtuvo a partir de 42.921 hectáreas distribuidas principalmente en la zona Caribe y la zona del Pacífico. La actividad bananera ha brindado empleo a más de 140.000 personas (40.000 empleos directos y 100.000 empleos indirectos), es decir, esta actividad generó un 6,0% del empleo de Costa Rica (CORBANA 2016, SEPSA 2018).

Hasta mediados del siglo pasado el cultivar que se sembraba en Costa Rica era ‘Gros Michel’, el cual por su alta susceptibilidad a la enfermedad Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. cubense), se dejó de cultivar comercialmente y se sustituyó por los clones del subgrupo Cavendish ‘Valery’, ‘Gran Enano’ y ‘Williams’ (Bolaños 2011). Estos cultivares son utilizados por su alta productividad y tolerancia al Mal de Panamá, sin embargo, presentan la desventaja de ser muy susceptibles al ataque de plagas y enfermedades (Rojas 2011).

Los insectos plaga en el cultivo del banano se dividen en cuatro grupos, según la parte de la planta que afecten: 1. Barrenadores de cormo y pseudotallo como *Cosmopolites sordidus*, *Metamasius hemipterus sericeus* (Col.: Curculionidae) y *Castniomera humboldti* (Lep.: Castniidae); 2. Plagas que atacan flores como *Anatrachyntis rileyi* (Lep.: Cosmopterigidae), 3. Defoliadores entre los que se encuentran *Colaspis* sp, *Allocolaspis* spp (Col.: Chrysomelidae), *Antichloris viridis* (Lep.: Erebidae), *Caligo memmon*, *Opsiphanes tamarindi* (Lep.: Nymphalidae), *Acharia apicalis* (Lep.: Limacodidae) y 4. Las plagas que atacan la fruta (*Frankliniella párvula* (Thys.: Thripidae), *Pseudococcus elisa* (Hem.: Pseudococcidae), *Diaspis boisduvalii* (Hem.: Diaspididae), *Pentalonia nigronervosa* (Hem.: Aphididae) y *Hermetia illucens* (Dip.: Stratiomyidae) (Cubillo 2013).

Los insectos que atacan el fruto se diferencian según el daño que causen, algunos causan grietas superficiales por oviposición en los tejidos tiernos, contaminación por las excretas, cicatrices por alimentación y transmisión de enfermedades (Cubillo 2013, Morales 2008). El mercado del cultivo del banano es exigente en cuanto a calidad y presentación del fruto, es por este motivo que de todos los insectos plaga que afectan al banano los que atacan la fruta se consideran los de mayor importancia, ya que causan un daño directo durante su alimentación u oviposición en la superficie del banano (Ortiz 2004, Sandoval 2010).

Hermetia illucens conocida como la mosca chichera o mosca soldado negro se asocia comúnmente al ganado o a la materia orgánica en descomposición (desecho animal o residuos vegetales), sin embargo, es una plaga ocasional del banano, siendo el estadio de huevo y específicamente la sustancia

que los adhiere a la fruta la que causa el daño, ya que los adultos no se alimentan y las larvas lo hacen principalmente de materia orgánica en descomposición (Díclaro y Kaufman 2009).

En la producción de banano se generan desechos durante la siembra, cultivo y cosecha (vástagos, hijos, hojas y flor), y en el proceso de empaque (banano de rechazo y pinzote o raquis) (Steiner 2006). Solo en el año 2004 se generó un total de 14.251.595 toneladas de residuos de pseudotallos, hojas y flor, 2.212.632 toneladas de banano de rechazo (Steiner 2006, Pérez y Pérez 2010) y aproximadamente 193.379 toneladas métricas de pinzote (9,44 TM de banano equivalen a 1 TM de pinzote) (Casanova 2014).

Si bien una gran cantidad de estos residuos son procesados a manera de compost o abono orgánico, actualmente no son tratados en su totalidad, debido al alto volumen generado, por lo tanto, son llevados a los botaderos o “trincheras” de la plantación y al no recibir ningún tratamiento previo, pueden servir de alimento para las larvas de la mosca chichera que lo utilizan como sustrato aumentando su población en el campo (Steiner 2006, Guillen 2018¹).

La gran cantidad de residuos agrícolas que genera la actividad bananera y el mal manejo que se le da en el campo, permiten que la población de la mosca chichera se convierta en una plaga importante en el cultivo del banano.

Los nematodos que afectan a los insectos se denominan nematodos entomopatógenos (NEP), estos organismos se utilizan como controladores biológicos debido a que tienen la capacidad de matar a diversas larvas habitantes del suelo consideradas como plagas. Entre los nematodos más utilizados como biocontroladores, se encuentran los del género *Heterorhabditis*, los cuales se asocian de manera mutualista con bacterias del género *Photorhabdus* (Bogantes *et al.* 2018, Tourtois 2014). En Costa Rica, el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 se ha evaluado en diferentes plagas de cultivos como *Phyllophaga elenans*, *Cosmopolites sordidus* y *Hermetia illucens* obteniendo como resultado una alta eficacia (Amador *et al.* 2015, Bogantes *et al.* 2018, Rodríguez *et al.* 2009, Rodríguez 2011).

El método de aplicación de los NEP más utilizado son las suspensiones acuosas de juveniles infectivos o de cebos (larva infectada con nematodos), los cuales reducen el potencial que estos microorganismos tienen como controladores biológicos al verse expuestos a condiciones climáticas desfavorables. Debido a esta problemática las recientes investigaciones se han enfocado en encontrar una solución. Una alternativa muy promisoría ha sido la encapsulación de los nematodos entomopatógenos con un material que les brinde las condiciones ideales para mantener la sobrevivencia y la virulencia y además que les permita salir de la cápsula con facilidad.

¹ Ing. César Guillén. CORBANA. Comunicación personal.

En Costa Rica, Bogantes *et al.* (2018) encontraron al encapsular el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 utilizando alginato al 2%-Ca, una sobrevivencia del 80% de los JI después de 28 días de haber sido encapsulados, además encontraron que los nematodos que salen de las cápsulas tienen la capacidad de infectar a las larvas del último instar de *Galleria mellonella*, ya que al utilizar cápsulas con una concentración de 500 JI/ml a una dosis de 0,4 cápsulas/larva encontraron un porcentaje de mortalidad de $76\pm 7,5$ al día 15 de evaluación. Sin embargo, se desconoce si los JI del género *Heterorhabditis* encapsulados en alginato al 2%-Ca son efectivas contra otros insectos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar en el laboratorio la infectividad de diferentes concentraciones del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 formulado en microcápsulas de alginato sobre las larvas de la mosca chichera (*Hermetia illucens*) en dos medios (platos Petri y recipientes con residuos de banano).

Objetivos específicos

1. Evaluar la eficacia de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) y seis concentraciones del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre las larvas de la mosca chichera en platos Petri.
2. Evaluar la eficacia de cinco dosis de cápsulas (1, 2, 3, 4 y 5 cápsulas/larva) y una concentración de 9000 JI/ml del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre las larvas de la mosca chichera en recipientes con residuos de banano.
3. Determinar la mortalidad de las larvas de la mosca chichera bajo dos condiciones en plato Petri y en bandejas con residuos de banano.

REVISIÓN DE LITERATURA

Morfología y generalidades de *Hermetia illucens*

La mosca chichera pertenece al orden Díptera; uno de los principales grupos de insectos con 3433 géneros y cerca de 24.000 especies descritas para la región Neotropical. Se ubica dentro del suborden Brachycera, de la familia Stratiomyidae; a la cual pertenecen alrededor de 400 géneros y 2600 especies, del género *Hermetia* y de la especie *illucens* (Barros-Cordeiro *et al.* 2014, Gobbi 2012, Guimarães y De Souza 2006).

Las larvas del orden Díptera se encuentran distribuidas en gran parte del mundo y se les puede encontrar en diferentes hábitats, existiendo larvas acuáticas y terrestres, estas últimas se pueden encontrar dentro de las plantas (fitófagas) o en residuos vegetales o animales en descomposición (saprófitas). La morfología de las larvas depende del hábitat al que pertenecen, de esta manera pueden tener una cabeza desarrollada y expuesta con piezas bucales adaptadas para morder y masticar o pueden tener una cabeza parcial o totalmente insertada en el protórax en cuyo caso las piezas bucales están adaptadas para picar y raspar. Los adultos tienen antenas con un máximo de seis segmentos, pero en la mayoría de las familias no sobrepasa de tres segmentos (Guimarães y De Souza 2006).

Las larvas del suborden Brachycera se caracterizan por ser segmentadas (diferente número de segmentos según la familia a la que pertenezca) y muy activas. Las larvas que pertenecen a la familia Stratiomyidae presentan únicamente 11 segmentos, los cuales se dividen en región torácica (segmentos del 1 al 3) y región abdominal (segmentos del 4 al 11) (Coto 1998, Guimarães y De Souza 2006).

La respiración de las larvas de la familia Stratiomyidae generalmente es anfipnéustica o metapnéustica (Figura 1), en el caso de las larvas de la mosca *Hermetia illucens* la respiración es anfipnéustica; lo que significa que tiene dos espiráculos localizados en la parte anterior (en el primer segmento torácico) y dos espiráculos en la parte posterior (en el último segmento abdominal) como se observa en la Figura 1.d (Coto 1998, Guimarães y De Souza 2006, Tourtois 2014).

Las larvas de la mosca chichera carecen de patas y tienen una cutícula endurecida por la incorporación de CaCO_3 , la cutícula presenta un patrón de hexágonos acromados lo que la hace fuerte, gruesa y resistente pero flexible, esta característica ayuda a reducir la pérdida de agua y la entrada de parásitos o patógenos (Guimarães y De Souza 2006, Tourtois 2014).

La mosca *H. illucens* es nativa de las zonas tropicales, subtropicales y cálidas templadas de América; en donde se encuentra distribuida de norte a sur (Tran *et al.* 2015). Sin embargo, ha sido introducida por el hombre a Europa (principalmente a países del sur), África, Asia e islas del Pacífico, las larvas se han adaptado a esos diversos tipos de hábitat y climas, aunque prefieren zonas húmedas

o saturadas de agua (Roháček y Hora 2013). En Costa Rica la mosca chichera se reportó por primera vez en el año 1988, se encontró en diferentes lugares del Valle Central en cadáveres humanos, en basureros y composteras (Studt 2010).

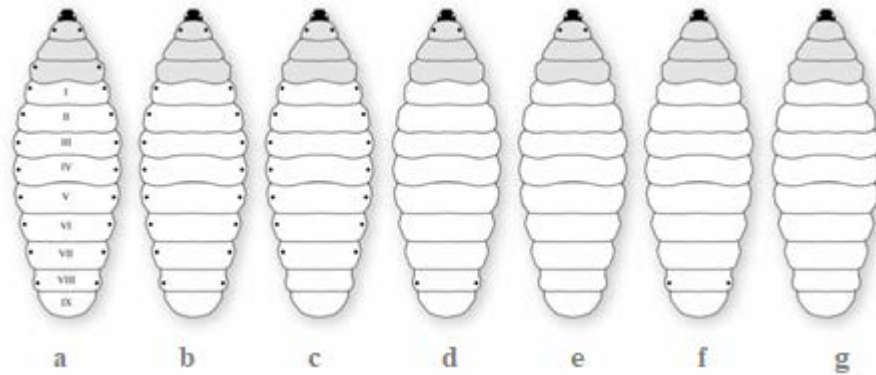


Figura 1. Número y posición de los espiráculos en larvas del orden Díptera; a) holopnéustico, b) perinéustico, c) heminéustico, d) anfipnéustico, e) propnéustico, f) metapnéustico, g) apnéustico.

Tomado de Guimarães y De Souza (2006).

Las larvas viven y se alimentan bajo corteza y materia orgánica en descomposición de diversos orígenes, la mayoría de las investigaciones se enfocan en la eficacia que tienen estas larvas como descomponedoras de residuos vegetales y excretas de diferentes animales (Diener *et al.* 2011, Studt 2010). Por otro lado, las pupas se han estudiado principalmente por su alto contenido de proteínas y grasas lo que las convierte en una fuente potencial de materia prima para la elaboración de alimento para peces, gallinas, cerdos y ganado (Banks 2014).

Los adultos al no alimentarse, ya que no poseen boca ni órganos digestivos (Park 2016), no representan un problema directo en la agricultura, sin embargo, los huevos que las hembras colocan principalmente cerca de donde hay presencia de materia orgánica son los que ocasionan importantes pérdidas en el cultivo del banano (Cubillo 2013).

Ciclo de vida

La mosca chichera pasa por cuatro estadios: adulto (hembra y macho), huevo, larva (comprende 6 instares) y pupa, los cuales se describen a continuación:

- **Adulto:** No se alimentan y viven aproximadamente 8 días. La principal función de los adultos es reproducirse utilizando para ello la reserva de energía almacenada durante su etapa larval. Cinco días después de emerger el adulto ocurre la cópula donde el macho intercepta a la hembra en el

aire (Gobbi 2012, Segura 2014). Son de color negro o azul metálico, con un tamaño entre 1,5 a 2,0 cm de largo, en su primer segmento abdominal tienen dos áreas translúcidas, que hacen que parezca que tienen una cintura pequeña lo que tiende a confundirlas con avispa (Segura 2014, Studt 2010). Tiene antenas alargadas con tres segmentos y las patas son largas y delgadas de color negro con la zona basal de los tarsos de color blanco (Cubillo 2013, Diclaro y Kaufman 2009). El tamaño y el color del abdomen ayudan a diferenciar machos de hembras; la hembra es más grande que el macho y tiene el abdomen de color negro, en cambio el macho tiene el abdomen bronceado (Coto y Saunders 2004).

- **Huevo:** La hembra busca un lugar seco y que esté cerca de materia orgánica o bananos maduros en descomposición y oviposita una masa que contiene alrededor de 600 huevos preferiblemente sobre frutos jóvenes (verdes) de banano (Cubillo 2013, Segura 2014, Diclaro y Kaufman 2009, Park 2016). Los huevos son cilíndricos con los extremos redondeados, tienen un tamaño de 1mm y cambian de color crema a amarillo conforme van madurando. Este estadio tiene una duración de cuatro días (Studt 2010).
- **Larva:** Cuando el huevo eclosiona las larvas caen al suelo, ya que la cáscara verde del banano es muy gruesa y no se pueden alimentar de ella, una vez en el suelo las larvas van en busca de materia orgánica para alimentarse (Diclaro y Kaufman 2009). Las larvas se caracterizan por su rápido crecimiento y por su gran movilidad (Segura 2014). Pasan por seis instares (L1 a L6 o prepupa), los cuales son difíciles de identificar, ya que lo único que cambia es el tamaño y el color; llegando a medir hasta 4 cm de largo y 0,5 mm de ancho y cambian de color blanco opaco en los primeros instares a color amarillo, café y negro (prepupa). Su cuerpo es elipsoidal, aplanado y rígido. Este estadio tiene una duración de 14 días si las condiciones ambientales son favorables, de lo contrario podrían tardar hasta seis meses en alcanzar la etapa de pupa (Coto y Saunders 2004, Gobbi 2012).
- **Pupa:** En este estadio la larva deja de alimentarse y busca un lugar seco y seguro, principalmente debajo de residuos de banano en los que haya suelo suelto para pupar (Coto y Saunders 2004), las larvas se inactivan y la cutícula se endurece y oscurece. Esta fase toma aproximadamente dos semanas antes que surja el adulto por metamorfosis completa (Diclaro y Kaufman 2009, Park 2016).

Factores ambientales que influyen en el desarrollo de *Hermetia illucens*

Todas las etapas del ciclo de vida de *H. illucens* se ven afectadas de manera positiva o negativa por los factores bióticos (cantidad y tipo de alimento, densidad poblacional, hábitat) y abióticos (temperatura, humedad relativa, radiación, textura de suelo, luminosidad), por ejemplo, en condiciones óptimas las larvas tardan aproximadamente dos semanas para convertirse en pupa, pero

si las condiciones no son las ideales ese tiempo se puede extender hasta por 10 meses (Banks 2014, Sheppard *et al.* 2002).

Algunos autores reportan que la temperatura y la humedad relativa son los principales factores para que ocurra un adecuado desarrollo, longevidad y ovoposición de *H. illucens*. Las larvas, prepupas y adultos (excepto durante la ovoposición), pueden tolerar temperaturas extremas (Coto y Saunders 2004, Cubillo 2013, Gobbi 2012), sin embargo, la duración de cada estadio se extiende cuando la temperatura está por debajo de la temperatura óptima y se acorta cuando está por encima. Gobbi (2012), utilizó en su experimento tres temperaturas (25 °C, 30 °C y 35 °C) y encontró que las altas temperaturas (35 °C) acortaron las etapas de huevo y larval, mientras que la fase de pupa se extendió por más días y en los adultos la mortalidad se incrementó. El autor concluyó que la temperatura óptima para las pupas y los adultos está entre 25 °C y 30 °C. Por su parte Banks (2014), menciona que las condiciones ideales para la oviposición y eclosión de los huevos son: temperatura mayor a 26 °C, humedad relativa mayor a 60% y alta luminosidad. Mientras que, en el caso de las larvas, estas se desarrollaron adecuadamente a temperaturas entre 27-30 °C.

Holmes (2010), probó 2 porcentajes de humedad relativa (30% y 70%), obteniendo como resultado que los huevos de *H. illucens* eclosionaron más rápido a 70% que a 30% de humedad relativa (84,21 ± 3,23 horas y 131,22 ± 1.85 horas respectivamente). También encontró que a mayor humedad relativa mayor fue la sobrevivencia de las larvas y pupas y mayor fue el número de adultos que emergieron. Los adultos incubados a 70% vivieron más tiempo que los que emergieron en una humedad relativa de 30%. El autor concluyó que la temperatura óptima para el desarrollo de *H. illucens* es de 27 °C y que la temperatura mínima se encuentra entre 15 °C y 18 °C.

Con respecto a la luminosidad, los adultos prefieren aparearse en horas del día donde la radiación solar es más alta, lo que significa que a mayor luminosidad mayor será el apareamiento. Durante el invierno los adultos no se aparean por la poca radiación solar (Park 2016).

La calidad y cantidad del sustrato también intervienen en el desarrollo de *H. illucens*, la etapa de larva se acorta cuando hay suficiente alimento y tienen un mayor crecimiento cuando el alimento es rico en nutrientes (Gobbi 2012, Holmes 2010). Al respecto Harnden y Tomberlin (2016), utilizaron tres dietas (carne de res, carne de cerdo y granos) y tres temperaturas (24,9, 27,6 y 32,2 °C) para alimentar a las larvas de *H. illucens*. Como resultado obtuvieron que las larvas que fueron alimentadas con carne de cerdo y se mantuvieron a una temperatura de 32,2 °C presentaron el mayor crecimiento con una longitud de 20,28±1,4 mm. Con respecto al peso de la larva, se obtuvo un mejor resultado cuando se utilizó carne de res y una temperatura de 32,2 °C (187,7±37,9 mg).

Descripción del daño al cultivo del banano

La hembra de *H. illucens* se ve atraída por el color amarillo o por el olor a putrefacción de la fruta o de los residuos vegetales dejados en la plantación. Después de que ocurre el apareamiento la hembra busca un lugar seco para ovipositar, comúnmente la parte de la planta de banano que brinda el lugar ideal es el racimo, las hembras colocan su masa de huevos en bananos maduros o en proceso de descomposición, sin embargo, cuando hay una alta población lo hace entre los dedos tiernos de banano (menos de tres semanas de edad). El daño es ocasionado por la sustancia que secreta la hembra para adherir la masa de huevos a la fruta, la cual causa en la epidermis del fruto una quemadura y agrietamiento; cuando la fruta madura se observa una mancha que tiene la apariencia de escamas, esta lesión es causada por el resquebrajamiento de la cáscara, lo que causa que la fruta sea rechazada para exportar (Cubillo 2013).

Manejo agronómico de *Hermetia illucens*

- Control cultural: Se realiza un embalse prematuro de la fruta, se recolectan y eliminan los residuos del banano producidos en el campo y en la planta procesadora; estos se pican bien y se les rocía cal viva o bien se tapan y se les aplican microorganismos para una rápida descomposición (Coto y Saunders 2004, Cubillo 2013, Cubillo *et al.* 2001).
- Control químico: Si la población es muy alta se recomienda aplicar un insecticida específico para dípteros como triclorfon o usar fundas impregnadas con insecticidas como clorpirifos o bien bifentrina (Cubillo 2013, Cubillo *et al.* 2001).
- Control biológico: Se usan depredadores como larvas de *Hololepta quadridentata* (Coto y Saunders 2004, Cubillo 2013, Cubillo *et al.* 2001).

Generalidades de los nematodos entomopatógenos

Los nematodos son en su mayoría organismos vermiformes, de cuerpo cilíndrico, con un tamaño aproximado de 0,25 a 5 mm de longitud. De acuerdo con su alimentación los nematodos se clasifican en: nematodos de vida libre (se alimentan de hongos, bacterias, protozoarios), depredadores (se alimentan de otros nematodos) y parásitos (se alimentan de plantas o animales) (Arauz 2011, Vashisth *et al.* 2013).

Entre los nematodos parásitos de animales se encuentran los nematodos entomopatógenos (NEP), que parasitan principalmente a aquellos insectos en los que uno de sus estadios se desarrolla en el suelo, debido a que el estadio infectivo de este nematodo migra al suelo para encontrar una nueva presa y continuar con su ciclo (Smart 1995, Stock *et al.* 2004).

Los nematodos entomopatógenos, pertenecen al filo Nematoda, al orden Rhabditida, a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, los cuales se encuentran asociados de manera mutualista con las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente (Kaya y Gaugler 1993). El género *Heterorhabditis* tiene un alto potencial como controlador biológico de plagas de importancia económica pertenecientes a los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera y Thysanoptera (Grijalva 2014). *Heterorhabditis* es capaz de infectar, dependiendo del insecto, adultos, huevos y larvas de su hospedero, sin embargo, el estadio más susceptible a la infección son las larvas (Vázquez 2012).

En el año 1923 Steiner describió por primera vez un nematodo entomopatógeno el cuál lo clasifico dentro del género *Steinernema*, específicamente *S. kraussei*, posteriormente en el año 1929 *S. glaseri* fue descubierto y descrito por Glaser y en 1955 se describió *S. carpocapsae* (Poinar 1985, Poinar 1992). Por su parte, Poinar (1975) describió por primera vez el género *Heterorhabditis* y la especie *bacteriophora*.

Los nematodos entomopatógenos se utilizaron por primera vez en el control biológico en el año de 1935, cuando se utilizó *S. glaseri* para el control de *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Poinar 1992). Actualmente los nematodos entomopatógenos son de gran importancia en el control biológico por las ventajas que presentan: se pueden reproducir masivamente en el laboratorio debido a su alto potencial reproductivo, son fáciles de aplicar en el campo, poseen una alta virulencia y patogenicidad, son específicos; no dañan las plantas, solamente a los insectos, tienen un amplio rango de hospederos, se pueden aplicar en conjunto con otros microorganismos o productos químicos, su estadio infectivo puede sobrevivir en el suelo en ausencia de su hospedero, son inocuos para mamíferos y seres humanos y no tienen restricción de uso en la mayoría de países (Sáenz 2005, Sáenz y Olivares 2008, Shapiro-Ilan y Gaugler 2002).

En Costa Rica se ha probado la cepa nativa *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 en diferentes plagas de cultivos como *Phyllophaga elenans*, *Cosmopolites sordidus*, *Hermetia illucens* obteniendo como resultado una alta eficacia (Amador *et al.* 2015, Bogantes *et al.* 2018, Rodríguez 2011, Rodríguez *et al.* 2009).

Ciclo biológico del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis*

El ciclo de vida de estos nematodos se desarrolla dentro del insecto, excepto el tercer estadio conocido como juvenil infectivo (JI), este sale del cuerpo del insecto muerto cuando el alimento escasea y se desplaza a través del suelo en búsqueda de un nuevo hospedero, al cual penetra a través de aberturas naturales como ano, boca o espiráculos, aunque el género *Heterorhabditis* se caracteriza por penetrar al hospedero a través de partes delgadas de la cutícula con un diente que tiene localizado en la parte anterior (Amador *et al.* 2015, Kaya y Gaugler 1993, Smart 1995). Mientras el JI se

encuentra en el suelo tienen la abertura estomática y el ano cerrados y no se alimentan ya que su principal función es la dispersión, además tienen la capacidad de sobrevivir largos periodos en el suelo hasta encontrar e infectar un nuevo hospedero (Sáenz y López 2011, Vashisth *et al.* 2013).

Los JI son capaces de percibir estímulos producidos por el huésped como CO₂, temperatura, heces, además pueden buscar al hospedero mediante desplazamiento emboscador; exploran activamente el entorno en búsqueda de los estímulos químicos volátiles emitidos por el insecto (se le facilita encontrar hospederos móviles) o crucero; identifica estímulos emitidos por los hospederos como cutícula o heces (asociado a hospederos sedentarios) (Delgado y Sáenz 2012, Jaramillo *et al.* 2013, Kaya y Gaugler 1993).

Los juveniles infectivos del género *Heterorhabditis* presentan una asociación simbiótica y específica con la bacteria *Photorhabdus* sp., la cual pertenece a la familia Enterobacteriaceae. En esa relación simbiótica ambas partes se benefician; la bacteria produce sustancias altamente tóxicas que matan al insecto, enzimas que permiten la descomposición de los tejidos del insecto, brindándole a los nematodos una fuente rica en nutrientes para que continúen con su ciclo de vida, además, agentes antimicrobianos que evitan la entrada de otros microorganismos al cuerpo del insecto muerto, protegiendo al nematodo y alargando la descomposición del insecto. Por su parte, el nematodo transporta a la bacteria dentro del lumen del tubo digestivo protegiéndola del ambiente externo y la regurgita en el interior del insecto facilitándole la entrada al hemocele del insecto y en algunas ocasiones permite que la bacteria evada la respuesta inmune del insecto (Ehlers y Shapiro-Ilan 2005, Monge 2017).

Dentro del insecto los JI localizan el hemocele y liberan las células de la bacteria *Photorhabdus* sp., la bacteria se reproduce aceleradamente y libera endotoxinas y exotoxinas, sustancias que causan septicemia y posteriormente la muerte del insecto en un periodo de 24 a 48 horas, el color rojizo que toma la larva es producido por la bacteria (Jaramillo *et al.* 2013, Juaneda 2009, Kaya y Gaugler 1993, Stock *et al.* 2008). El ciclo de vida de los nematodos continúa, pasando a J4, posteriormente muda a hembra hermafrodita la cual se autofecunda y da origen a la primera generación por endotoquia matricida dentro del insecto, los juveniles pasan por J1, J2, J3 y J4 y para la segunda generación pasan por adultos (hembra y macho) (Ehlers y Shapiro-Ilan 2005, Shapiro-Ilan y Gaugler 2002, Sáenz y López 2011).

Los nematodos entomopatógenos continúan alimentándose de los restos de la larva que se conserva intacta por los antibióticos liberados por la bacteria, de esta manera, logran desarrollar tres generaciones dentro del insecto, pero cuando el alimento se agota emergen de la larva millones de juveniles infectivos (JI) con la bacteria simbiote dentro del intestino en busca de un nuevo hospedero (Delgado y Sáenz 2012, Stock *et al.* 2004).

Factores ambientales que afectan a los NEP

Algunos de los factores abióticos que limitan la efectividad de los NEP como controladores biológicos son:

- **Temperatura:** Su efecto sobre los nematodos va a depender de la especie y el tiempo de exposición, sin embargo, se ha observado que la mayoría de especies de nematodos se vuelven lentos cuando se exponen a temperaturas menores a 10 °C y se inactivan con temperaturas mayores a 40 °C. De esta manera, se considera que ocurre una mejor longevidad con temperaturas entre 5-15 °C y que temperaturas mayores a 25 °C causan un impacto negativo sobre la persistencia, virulencia y supervivencia de los nematodos entomopatógenos (Atwa 2014, Koppenhöfer y Kaya 2002, Rumbos y Athanassiou 2017). Toledo *et al.* (2006) reportan que la temperatura óptima para el desarrollo del género *Heterorhabditis* es entre 20-25 °C.
- **Radiación ultravioleta:** La exposición directa de la luz ultravioleta sobre los nematodos puede causarles la inactivación o muerte en pocos minutos. Si las aplicaciones de NEP se realizan cuando la radiación solar es alta, en pocas horas podría morir hasta un 50% de la población de los nematodos aplicados, por este motivo es recomendable hacer las aplicaciones durante la mañana o tarde (Atwa 2014, San-Blas 2013, Hiltpold *et al.* 2012, Koppenhöfer y Kaya 2002). La exposición a la radiación ultravioleta inactiva el estadio infectivo de *Heterorhabditis*, según Juaneda (2009) cuando los JI se exponen a 3 minutos de radiación ultravioleta pierden la capacidad patogénica y cuando se exponen a 4 minutos los JI se vuelven incapaces de causar infección.
- **Humedad:** El porcentaje de humedad que se requiere para el desarrollo óptimo de *Heterorhabditis* sp. depende de la textura del suelo. De esta manera en suelos franco arenosos la humedad requerida es de un 25-30 %, en suelos arenosos-arcillosos la humedad óptima es de 18-21% y en suelos arenosos es de un 10% (Sáenz y Olivares 2008, Toledo *et al.* 2014). El desplazamiento de los nematodos durante la búsqueda del hospedero va a depender de la cantidad de agua que tenga el suelo, debido a que los bajos niveles de humedad pueden causar una desecación letal de los nematodos y los altos niveles menor contenido de oxígeno en el suelo lo que afecta de manera negativa a los nematodos (Hiltpold *et al.* 2012, Koppenhöfer y Kaya 2002, Rumbos y Athanassiou 2017).
- **Textura del suelo:** La porosidad juega un papel muy importante en la supervivencia de los nematodos, debido a que entre más pequeños los poros es menor la cantidad de agua infiltrada y más bajos los niveles de oxígeno. Es por eso que se considera que en suelos con textura arcillosa la tasa de supervivencia de los nematodos es menor y en suelos con una mayor proporción de arena favorecen el desplazamiento de los JI (Koppenhöfer y Kaya 2002, Vashisth *et al.* 2013).

- Disponibilidad de oxígeno: La cantidad de oxígeno dentro del suelo se puede ver obstaculizada por texturas arcillosas, alta humedad y elevada cantidad de materia orgánica (Juaneda 2009).

Métodos de reproducción de *Heterorhabditis*

A pesar de que los nematodos entomopatógenos se descubrieron desde el año 1923, fue hasta en 1980 cuando las investigaciones retomaron fuerza como una solución a los problemas causados por el elevado uso de insecticidas químicos, y ya para el año 1981 se empezaron a publicar métodos para la reproducción de los NEP. En la actualidad la reproducción de NEP se enfoca en dos tipos: *in vivo* e *in vitro* (Koppenhöfer y Kaya 2002).

El método *in vivo* consiste en reproducir los nematodos en un hospedero muy susceptible. Actualmente se utilizan larvas de *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor* debido a que son altamente susceptibles a la mayoría de los nematodos, además de la facilidad de cría, la amplia disponibilidad y porque son capaces de producir altas cantidades de nematodos (Realpe-Aranda *et al.* 2007, Rodríguez *et al.* 2009). La recolección de los JI se hace mediante la trampa White (Atwa 2014, Vashisth *et al.* 2013). Dentro de las ventajas que presenta esta técnica es que no se requiere contratar personal con experiencia, no necesita una infraestructura sofisticada, se puede iniciar con poco capital y se obtiene un producto final de alta calidad, sin embargo, los rendimientos son muy bajos y los nematodos obtenidos se almacenan por un corto tiempo, lo que la vuelve una técnica ineficiente para la reproducción masiva de NEP (Grijalva 2014, Vashisth *et al.* 2013).

Por otro lado, el método de reproducción *in vitro* utiliza medios sólidos dimensionales o tridimensionales; por ejemplo, espuma de poliuretano poliéster, arcillas, carbones activados, poliacrilamida, geles de alginato y medios líquidos fermentativos como el agar peptona-glucosa. La ventaja de esta técnica es que se obtiene un mayor rendimiento y su desventaja es el alto costo inicial (Grijalva 2014, Sáenz 2005). Según datos obtenidos por la empresa Biosys, a través del medio líquido se lograron producir volúmenes de hasta ochenta mil litros de juveniles infectivos del nematodo *Steinernema carpocapsae* en el año 1992 (Ehlers y Shapiro-Ilan 2005), por su parte Moreno (2017) aunque no tuvo éxito reproduciendo los JI de *Heterorhabditis* sp. a través de esta técnica, logro fermentar la bacteria *P. luminescens* pasando de una población inicial de $3,7 \times 10^3$ UFC/ml y a una población final de 4×10^{13} UFC/ml. A pesar del alto costo, actualmente esta sigue siendo la técnica que se utiliza para la producción de NEP a nivel comercial (Moreno 2017).

Formulación y aplicación de *Heterorhabditis*

La investigación y uso de nematodos entomopatógenos ha tenido un incremento significativo en los últimos treinta años y continúa en aumento debido a los problemas económicos, de salud humana y ambiental que conlleva el abuso en el uso de productos químicos. Los NEP tienen un alto potencial como controladores biológicos y como sustitutos de los productos tradicionales de control químico por su eficacia, tiempo de respuesta, inocuidad para otros organismos y su fácil producción en masa (Atwa 2014, Hiltpold 2015).

Actualmente los productos a base de NEP disponibles en el mercado están formulados como polvos mojables, geles de alginato, gránulos dispersables en agua, pastas colocadas sobre esponjas y en vermiculita, los cuales se pueden aplicar al suelo o al follaje. Su aplicación se puede realizar con los mismos instrumentos utilizados para los insecticidas químicos o mediante los sistemas de riego. Una vez en el suelo o follaje los NEP inician la búsqueda del hospedero para infectarlo, sin embargo, la efectividad de los JI de *Heterorhabditis* sp. puede ser afectada por condiciones climáticas adversas como baja o alta temperatura, poca humedad o alta radiación (Atwa 2014, Hiltpold *et al.* 2012).

Las desventajas que presenta este tipo de formulación es que requieren altos volúmenes de agua, ya que la superficie del suelo debe mantenerse mojada antes y después de la aplicación para que el nematodo se desplace adecuadamente y la alta tasa de mortalidad de los NEP por las condiciones climáticas (se ha reportado hasta un 50% de mortalidad cuando los NEP se aplican en el suelo y se ven expuestos a una alta radiación ultravioleta) (Goud *et al.* 2010, Hiltpold *et al.* 2012, Koppenhöfer y Kaya 2002, Vashisth *et al.* 2013).

En 1985 Kaya y Nelsen reportaron por primera vez la encapsulación de NEP con alginato de calcio en una solución de CaCl_2 (San-Blas 2013). Con esta nueva formulación se ha logrado prolongar la vida y eficacia de los nematodos durante su almacenamiento y aplicación en el campo. Las cápsulas protegen a los nematodos de condiciones climáticas adversas y reducen la movilidad de los JI, permitiéndoles conservar suficiente energía para parasitar al hospedero (Koppenhöfer y Kaya 2002, Umamaheswari *et al.* 2005). Además, estas cápsulas permiten que los nematodos sean liberados en forma lenta y controlada obteniendo como resultado la persistencia de los JI en el suelo tras la aplicación, lo que permite una disminución en el número de aplicaciones y una dosis reducida (Tiwari 2008, Vemmer y Patel 2013).

En Costa Rica la técnica de encapsulación de nematodos entomopatógenos y específicamente del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 se realizó por primera vez en el año 2016. En ese estudio, se logró formar cápsulas bien definidas gelificando alginato con calcio a una concentración de 2% de alginato. Esas cápsulas permitieron la sobrevivencia de los nematodos cuando se formaron cápsulas con una suspensión de 500 JI/ml. Además, las cápsulas no afectaron la virulencia de los JI, lo cual se

comprobó al exponer larvas del último instar de *G. mellonella* a diferentes dosis de cápsulas (2, 10 y 20) donde se observó que con 10 y 20 cápsulas las larvas empezaron a morir por infección de los nematodos desde el día 2 de evaluación y al día 15 se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad $76\% \pm 7,5$ y $52\% \pm 13,5$ respectivamente. También se determinó la DL_{50} , la cual correspondió a 2,9 cápsulas.larva⁻¹ de *G. mellonella* (Bogantes *et al.* 2018).

Dentro de las ventajas que presenta este tipo de formulación es que simplifica el transporte, almacenamiento, manipulación y aplicación, se puede mezclar con productos químicos y ahorra grandes cantidades de agua, por ejemplo, cuando los NEP se aplican directamente al suelo se requieren aproximadamente 2000 litros de agua, pero cuando se utilizan los nematodos encapsulados se requieren únicamente 0,5 litros (Hiltpold 2015).

Infección de larvas de *H. illucens* con nematodos del género *Heterorhabditis*

Como se mencionó anteriormente, en Costa Rica las larvas de *H. illucens* son una plaga ocasional en el cultivo de banano, sin embargo, cuando se presentan en la plantación causan pérdidas importantes. Rodríguez (2011), evaluó a nivel de laboratorio la infectividad de una suspensión de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de diferentes tamaños de *H. illucens* obteniendo como resultado la mortalidad de un 96,2% de las larvas, en un periodo de 12 días. Estos resultados contrastan con lo obtenido por Tourtois (2014), quién estudió la infectividad y reproducción de nematodos del género *Heterorhabditis* y *Steinernema* en larvas de *H. illucens* encontrando que las larvas fueron poco susceptibles, aun cuando se les modificó la cutícula haciéndole heridas antes y después de la infección para aumentar la entrada de nematodos.

La técnica de encapsulación protege a los nematodos entomopatógenos de las condiciones ambientales, los inmoviliza evitando la pérdida de energía antes de entrar al insecto y permite una liberación lenta de los mismos. Estas ventajas aumentan la efectividad de los NEP en campo y por lo tanto su uso como control biológico. Por este motivo, en el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes dosis de cápsulas elaboradas con 6 concentraciones diferentes del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de dos tamaños de *Hermetia illucens*, tanto a nivel de laboratorio como en invernadero, con el fin de determinar si es viable el uso de NEP encapsulados como control biológico para esa plaga.

METODOLOGÍA

1. Material biológico

Para la presente investigación se utilizó el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 (Rodríguez *et al.* 2009) y su bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* que fue extraída del nematodo en la forma descrita por Vidaurre (2016). Se utilizó como control, el nematodo entomopatógeno *Steinernema costarricense* n. sp. y su bacteria simbiote *Xenorhabdus* sp. aislada en la forma indicada por Stock *et al.* (2008).

Los nematodos fueron brindados por el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) al igual que las larvas de *Galleria mellonella* usadas para la reproducción *in vivo* de los NEP (Rodríguez *et al.* 2009).

Las larvas de *Hermetia illucens* fueron facilitadas por el MSc. César Guillén de CORBANA (Corporación Bananera Nacional) y el material de encapsulación (alginato) fue aportado por la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica.

2. Reproducción *in vivo* de los juveniles infectivos de *Heterorhabditis* sp. en *Galleria mellonella*

En la base de cada plato Petri plásticos de 8,5 cm de diámetro se colocaron dos papeles filtro, sobre cada plato se pusieron 4 larvas de *G. mellonella* (último estadio larval), posteriormente con una micropipeta plástica se roció 1 ml de una suspensión de nematodos, con una concentración de 200 JI/ml de la cepa *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre las 4 larvas, por último, cada plato se selló con película Parafilm (Figura 2a) y se colocaron en un lugar oscuro y seco a temperatura ambiente (Bogantes *et al.* 2018). Cada 15 días se realizaba este procedimiento con 4 a 5 platos Petri, para un total de 16 a 20 larvas infectadas, con el fin de tener nematodos viables disponibles al momento de realizar los ensayos.

Las larvas muertas que presentaban coloración rojiza a los 5 y 6 días se colocaron en trampas White. Estas trampas consisten en colocar los cadáveres de las larvas infectadas por los nematodos sobre un papel filtro dispuesto en el interior de una tapa de un plato Petri plástico de 5,5 cm de diámetro, la cual a su vez se colocó dentro de un plato Petri de vidrio de 9 cm de diámetro que contenía 15 ml de agua (Figura 2b). Cuando el alimento se agotó los JI salieron del cuerpo de la larva muerta hacia el agua (Shapiro-Ilan *et al.* 2016). Los platos Petri se rotularon con la fecha y se colocaron en un lugar seco y oscuro a temperatura ambiente por no más de un mes. Los nematodos se recolectaron constantemente, durante ese periodo.

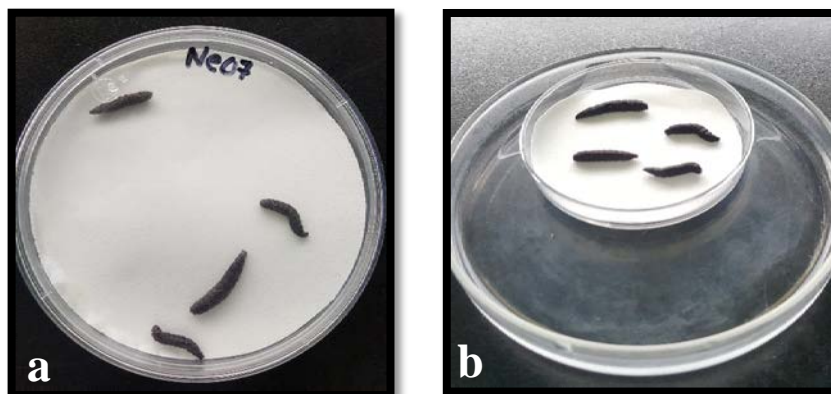


Figura 2. a) Plato Petri con larvas de *G. mellonella* infectadas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y b) Trampa White.

3. Almacenamiento de los nematodos

Los nematodos que emergieron de la trampa White se recolectaron con una micropipeta de plástico de 1ml, al plato se le hicieron tres enjuagues con agua desionizada para recolectar la mayor cantidad de nematodos. Los nematodos se colocaron en un beaker de 50 ml y se dejaron sedimentar durante una hora, luego se descartó el sobrenadante y se adicionó agua desionizada, el procedimiento anterior se realizó 2 veces más, por último, los nematodos se almacenaron en botellas de vidrio con 10 ml de solución Ringer a temperatura ambiente, por no más de un mes (Bogantes *et al.* 2018).

4. Elaboración de las microcápsulas de alginato

Para elaborar las cápsulas se utilizó un plato Petri de vidrio de 14 cm de diámetro al cuál se le agregó agua desionizada y cloruro de calcio dihidratado (CaCl_2) al 4,4%. En un beaker de 50 ml se colocó 5 ml de una solución de alginato al 1,2% y se le agregó 5 ml de una suspensión con una concentración conocida del nematodo o bacteria en estudio según corresponda. Por último, con una pipeta de 10 ml con la punta recortada se tomó la mezcla microorganismo-alginato y se goteó sobre el plato Petri que contenía el cloruro de calcio disuelto en agua desionizada, formando las microcápsulas (Figura 3), las cuales pasados 30 minutos se colocaron en un colador, se enjuagaron con agua desionizada y se almacenaron en un beaker de 50 ml con agua desionizada (Bogantes *et al.* 2018).

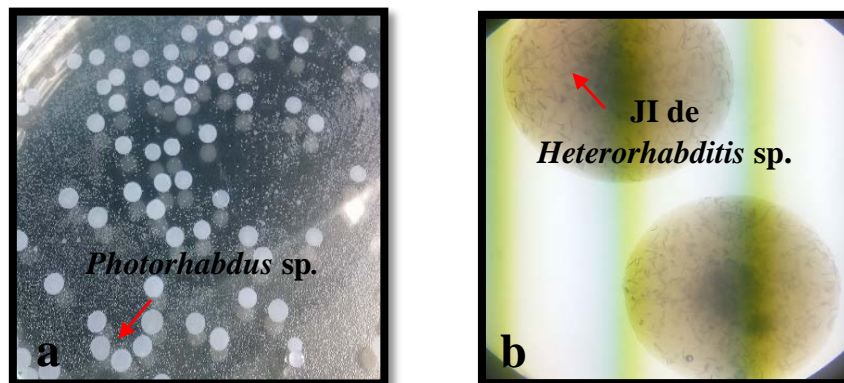


Figura 3. a) Microcápsulas de alginato con la bacteria simbiote *Photorhabdus* sp. y b) Microcápsulas con una concentración de 9000 JI/ml observada al estereoscopio.

5. Determinación de la concentración de nematodos en una suspensión

Para conocer el número de nematodos por mililitro se tomó un volumen conocido de la botella que contiene los nematodos y se colocó en un beaker. En tres eppendorf de 2 ml se colocaron 900 μ l de agua desionizada y 100 μ l de la suspensión, se agitaron en un agitador Vortex por 5 segundos y de cada eppendorf se tomaron 100 μ l, los cuales se colocaron gota a gota en una cuadrícula y se procedió a contar en el estereoscopio únicamente el número de nematodos vivos. Por último, se sacó un promedio de las tres repeticiones y el resultado se multiplicó por 100.

6. Infección de larvas de *H. illucens* con suspensiones de los nematodos *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y *Steinernema costarricense*

A fin de determinar la susceptibilidad de las larvas de *H. illucens* a los nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*, se realizaron ensayos control previos al establecimiento de los experimentos. Los ensayos control consistieron en aplicar directamente sobre las larvas de *H. illucens* suspensiones con cuatro concentraciones de juveniles infectivos del género *Heterorhabditis*.

Como primer ensayo (punto 6.1) se evaluó el efecto de una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens*, ya que según Stock *et al.* (2008) para la reproducción *in vivo* del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, lo recomendable es infectar las larvas de *G. mellonella* con una suspensión de 200 JI/ml.

En el segundo ensayo control (punto 6.2) se evaluó el efecto de suspensiones con tres concentraciones 2000, 3000 y 4000 JI/ml (concentraciones que se probaron en los experimentos con cápsulas) de los nematodos *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y *Steinernema costarricense*. Con el fin

de determinar el efecto que tienen concentraciones de nematodos más altas a la recomendada por Stock *et al.* (2008) sobre las larvas de la mosca *H. illucens*, ya que reportes indican que a mayor cantidad de nematodos que entran al insecto hospedero, mayor es la competencia intraespecífica (Hidalgo 2018, Sepúlveda-Cano *et al.* 2008, Selvan *et al.* 1993).

Estos ensayos de control se establecieron en el medio de platos Petri y se utilizaron dos tamaños de larva; pequeñas (0,5 a 1cm) y medianas (1 a 2 cm).

La variable de respuesta fue el número de larvas muertas, por lo tanto, las larvas muertas que no presentaban el color característico que produce la infección con *Heterorhabditis* (rojo) o *Steinernema* (café) (este último solo para el punto 6.2) se colocaron en trampas White para comprobar la presencia o ausencia de nematodos.

6.1 Efecto de la aplicación de una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens*

Se utilizaron 5 platos Petri plásticos de 8,5 cm de diámetro por tratamiento. A cada plato se le colocó en la base 2 piezas de papel filtro y 5 larvas de *H. illucens*. El ensayo se estableció en el Laboratorio de Microbiología Agrícola-CIA y constó de 4 tratamientos: **1)** larvas pequeñas inoculadas con *Heterorhabditis* sp., **2)** larvas medianas inoculadas con *Heterorhabditis* sp., **3)** larvas pequeñas testigo y **4)** larvas medianas testigo.

En los tratamientos donde se utilizaron nematodos, en cada plato Petri se distribuyó 1ml de una suspensión con una concentración de 200 JI/ml sobre las 5 larvas y en el caso de los tratamientos testigo en cada plato Petri se distribuyó 1 ml de agua estéril sobre las 5 larvas. Posteriormente los platos Petri se sellaron con película Parafilm y se colocaron en un lugar seco a temperatura ambiente. La unidad experimental estuvo formada por cada larva, para un total de 25 repeticiones por tratamiento. Durante 10 días se anotó la fecha, el número de larvas vivas y muertas y el color de las larvas muertas.

A los datos obtenidos se les realizó una regresión logística con el programa JMP versión 9.

6.2 Efecto de la aplicación de una suspensión con tres concentraciones 2000, 3000 y 4000 JI/ml de los nematodos *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y *Steinernema costarricense* sobre larvas de *H. illucens*

Se utilizaron 5 platos Petri plásticos de 8,5 cm de diámetro por tratamiento. A cada plato se le colocó en la base 2 piezas de papel filtro y 5 larvas de *H. illucens*. El ensayo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola-CIA y constó de 14 tratamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de tratamientos utilizados para realizar el segundo ensayo control.

Tratamiento	Tamaño de Larva	Nematodo	Concentración (JI/ml)
1	Pequeña	Hsp	2000
2	Pequeña	Hsp	3000
3	Pequeña	Hsp	4000
4	Pequeña	Sc	2000
5	Pequeña	Sc	3000
6	Pequeña	Sc	4000
7	Mediana	Hsp	2000
8	Mediana	Hsp	3000
9	Mediana	Hsp	4000
10	Mediana	Sc	2000
11	Mediana	Sc	3000
12	Mediana	Sc	4000
13	Pequeña	T	0
14	Mediana	T	0

Hsp: *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, **Sc:** *Steinernema costarricense*

T: Testigo

El experimento se implementó en la forma descrita en el punto 6.1. La unidad experimental fueron las larvas, para un total de 25 repeticiones por tratamiento. El ensayo tuvo una duración de 14 días en los cuales se realizaron 4 evaluaciones (día 1, día 6, día 10 y día 14). En cada evaluación se anotó la fecha, número de larvas vivas y larvas muertas y el color de las larvas muertas. Los datos obtenidos se analizaron utilizando una regresión logística con el programa JMP versión 9.

7. Evaluación de la eficacia de cápsulas de alginato con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre las larvas de *H. illucens* en el medio platos Petri

Se prepararon cápsulas en la forma descrita en el punto 4. Para estos ensayos se utilizaron dos dosis de cápsulas de alginato (5 y 10 cápsulas/larva) preparadas con diferentes concentraciones del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07; 200 JI/ml, 2000 JI/ml, 3000 JI/ml, 4000 JI/ml, 8000 JI/ml y 9000 JI/ml. Todos los ensayos se establecieron en platos Petri plásticos y se utilizaron dos tamaños de larvas; pequeños (0,5 a 1 cm) y medianas (1 a 2 cm).

En las secciones 7.1, 7.2 y 7.3 las evaluaciones se realizaron por un periodo de 10 días, durante los cuales se anotó la fecha, número de larvas muertas, número de larvas vivas y color de las larvas muertas.

La variable de respuesta fue el número de larvas muertas, por este motivo aquellas larvas muertas que no presentaban el color rojizo característico de la infección por el nematodo se colocaron en trampas White para comprobar la presencia o ausencia del mismo (no aplica para el punto 7.4).

7.1 Infección de larvas de *H. illucens* con dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con una concentración de 200 JI/ml

Se utilizaron 5 platos Petri plástico de un diámetro de 8,5 cm por tratamiento. En cada plato se colocaron 2 papeles filtro y 5 larvas de *H. illucens*. El ensayo se estableció en el Laboratorio de Microbiología Agrícola-CIA y constó de 6 tratamientos: **1)** larvas pequeñas + 5 cápsulas, **2)** larvas pequeñas + 10 cápsulas, **3)** larvas medianas + 5 cápsulas, **4)** larvas medianas + 10 cápsulas, **5)** larvas pequeñas testigo y **6)** larvas medianas testigo.

En cada plato se colocó el número de cápsulas según tratamiento y a las 5 larvas de los tratamientos testigo se les distribuyó un 1ml de agua desionizada estéril.

Los platos se sellaron con película Parafilm y se colocaron en un lugar seco a temperatura ambiente. Cada tratamiento constó de 25 repeticiones. La unidad experimental fueron las larvas. A los datos se les hizo una regresión logística utilizando el programa JMP versión 9.

7.2 Infección de larvas de *H. illucens* con dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con tres concentraciones de nematodos

Se utilizaron 5 platos Petri plásticos de un diámetro de 8,5 cm por tratamiento. En cada plato se ubicaron 2 piezas de papel de filtro en la base y sobre el papel 5 larvas de *H. illucens*. El ensayo constó de 14 tratamientos (Cuadro 2).

En cada plato se colocó el número de cápsulas según tratamiento (Figura 4a) y a las larvas de los tratamientos testigos se les distribuyó 1 ml de agua desionizada estéril.

Los platos se taparon, se sellaron y se colocaron en un lugar seco y a temperatura ambiente (Figura 4b). La unidad experimental fue 1 larva. Para cada tratamiento se usaron 25 repeticiones. A los datos se les hizo una regresión logística utilizando el programa JMP versión 9.

Cuadro 2. Número de tratamientos utilizados para llevar a cabo el segundo experimento.

Tratamiento	Tamaño de Larva	Nematodo	Concentración (JI/ml)	Número de cápsulas
1	Pequeña	Hsp	2000	5
2	Pequeña	Hsp	3000	5
3	Pequeña	Hsp	4000	5
4	Pequeña	Hsp	2000	10
5	Pequeña	Hsp	3000	10
6	Pequeña	Hsp	4000	10
7	Mediana	Hsp	2000	5
8	Mediana	Hsp	3000	5
9	Mediana	Hsp	4000	5
10	Mediana	Hsp	2000	10
11	Mediana	Hsp	3000	10
12	Mediana	Hsp	4000	10
13	Pequeña	T	0	0
14	Mediana	T	0	0

Hsp: *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, **T:** Testigo.

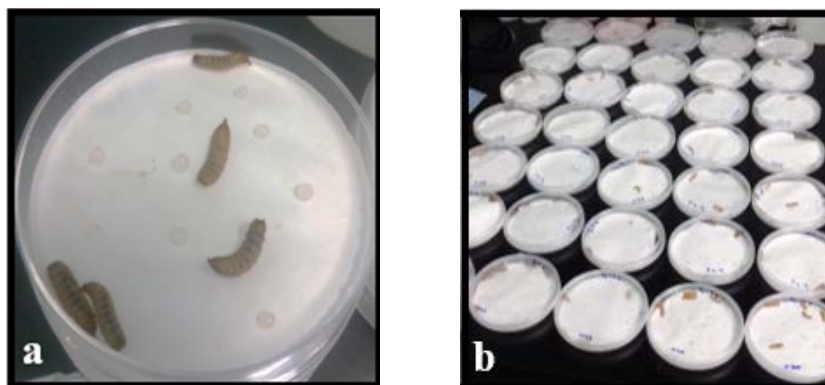


Figura 4. a) Larvas medianas y 10 cápsulas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y b) Establecimiento del ensayo en el laboratorio de Microbiología Agrícola-CIA.

7.3 Infección de larvas de *H. illucens* con dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) y dos concentraciones de nematodos

En cada tratamiento se utilizaron 5 platos Petri plásticos de 8,5 cm de diámetro. A cada plato se le colocaron 2 papel filtro y 5 larvas de *H. illucens*. Este ensayo estuvo conformado por 10 tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de tratamientos utilizados para la realización del tercer experimento.

Tratamiento	Tamaño de Larva	Nematodo	Concentración (JI/ml)	Número de cápsulas
1	Pequeña	Hsp	8000	5
2	Pequeña	Hsp	8000	10
3	Pequeña	Hsp	9000	5
4	Pequeña	Hsp	9000	10
5	Mediana	Hsp	8000	5
6	Mediana	Hsp	8000	10
7	Mediana	Hsp	9000	5
8	Mediana	Hsp	9000	10
9	Pequeña	T	0	0
10	Mediana	T	0	0

Hsp: *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, **T:** Testigo.

En cada plato se colocó el número de cápsulas según tratamiento y a las larvas de los tratamientos testigos se les distribuyó 1 ml de agua desionizada estéril.

Los platos se taparon, se sellaron y se colocaron en un lugar seco y a temperatura ambiente. La unidad experimental fueron las larvas. Cada tratamiento consto de 25 repeticiones. Una vez completos los datos se les hizo una regresión logística utilizando el programa JMP versión 9.

8. Evaluación del efecto de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) conteniendo *Photorhabdus* sp. y *Xenorhabdus* sp. sobre larvas de *H. illucens* en platos Petri

Debido a que se observó en los experimentos anteriores que algunas larvas ingerían las cápsulas, se realizó un ensayo control para determinar si *Photorhabdus luminescens* y *Xenorhabdus* sp. (bacterias simbioses de *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y *Steinernema costarricense*, respectivamente) eran capaces de causar la muerte del nematodo por ingesta ya que estas bacterias presentan actividad oral tóxica (Ahn *et al.* 2013, Sanahuja 2016, Santos da Silva *et al.* 2013).

Las bacterias *P. luminescens* y *Xenorhabdus* sp. se extrajeron en la forma descrita por Vidaurre (2016). Sin embargo, para este ensayo no se realizó la extracción. La bacteria se tomó de la colección del Laboratorio de Microbiología Agrícola, la cual se mantiene congelada a una temperatura de -70 °C en caldo nutritivo. Para la reproducción de estas bacterias se procedió a sacarlas del congelador y de inmediato se rayaron en el medio agar nutritivo (AN) (Figura 5a). Los platos se rotularon con el nombre de la bacteria y la fecha, se sellaron con película Parafilm y se colocaron en una incubadora

a 35 °C, pasados 3 días se procedió a realizar una suspensión igual al estándar número 5 de Mc Farland; transfiriendo con un aplicador estéril parte del cultivo de la bacteria a un tubo de ensayo que contenía 5 ml de agua desionizada estéril (Figura 5b). Posteriormente se procedió a hacer las cápsulas como se indica en el punto 4, utilizando 5 ml de alginato al 2% y 5 ml de suspensión de cada una de las bacterias.

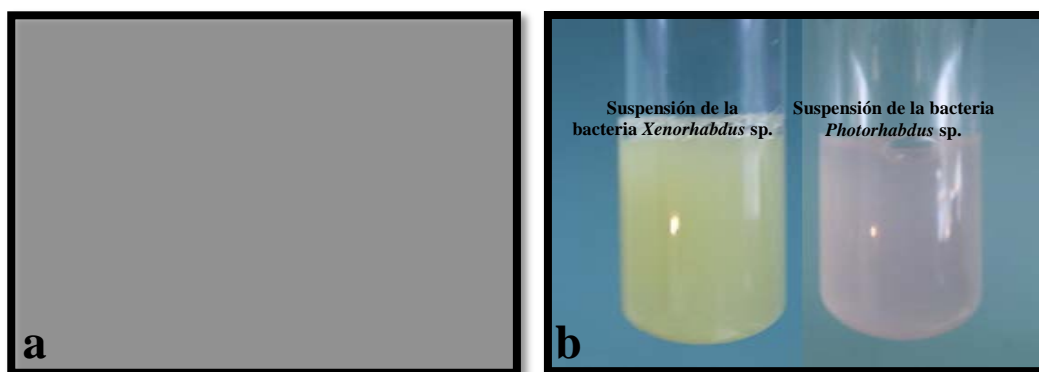


Figura 5. a) Bacterias rayadas en medio AN; *Xenorhabdus* sp. (izquierda) y *Photorhabdus* sp. (derecha) y b) Suspensión de las bacterias en 5 ml de agua autoclavada; *Xenorhabdus* sp. (izquierda) y *Photorhabdus* sp. (derecha).

Se utilizaron 5 platos Petri plásticos de 8,5 cm de diámetro por tratamiento. En cada plato se colocaron 2 papel filtro y 5 larvas de *H. illucens*. El ensayo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y constó de 10 tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de tratamientos utilizados para llevar a cabo el tercer experimento control.

Tratamiento	Tamaño de Larva	Bacteria	Número de cápsulas
1	Pequeña	Psp	5
2	Pequeña	Psp	10
3	Pequeña	Xsp	5
4	Pequeña	Xsp	10
5	Mediana	Psp	5
6	Mediana	Psp	10
7	Mediana	Xsp	5
8	Mediana	Xsp	10
9	Pequeña	T	0
10	Mediana	T	0

Psp: *Photorhabdus* sp, **Xsp:** *Xenorhabdus* sp, **T:** Testigo.

Por último, los platos se sellaron y se colocaron en un lugar seco a temperatura ambiente. La unidad experimental fueron las larvas, para un total de 25 repeticiones por tratamiento. Las evaluaciones se hicieron durante 10 días, se anotó el número de larvas vivas y larvas muertas (variable de respuesta), el color de las larvas muertas y la fecha. Una vez completos los datos se les hizo una regresión logística utilizando el programa JMP versión 9.

9. Inoculación de larvas de *H. illucens* con 5 dosis de cápsulas (1, 2, 3, 4 y 5 cápsulas/larva) y una concentración de 9000 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 en recipientes plásticos con residuos de banano

Se utilizaron 20 recipientes plásticos (14 cm de ancho x 8 cm de alto con una capacidad de 800 ml) por tratamiento. Dentro de cada recipiente se colocó aproximadamente 100 gramos de residuos de banano (vástago picado fresco y semi descompuesto) y una larva mediana (1 a 2 cm) de *H. illucens*. El ensayo estaba conformado por 6 tratamientos a saber: **1)** 1 cápsula + 1 larva, **2)** 2 cápsulas + 1 larva, **3)** 3 cápsulas + 1 larva, **4)** 4 cápsulas + 1 larva, **5)** 5 cápsulas + 1 larva (Figura 6a) y **6)** 0 cápsulas + 1 larva (testigo). En la tapa de cada recipiente se hicieron 5 agujeros (Figura 6b) para permitir la oxigenación de las larvas.

Los recipientes se taparon, se rotularon, se agruparon por tratamiento y se colocaron en el invernadero (Figura 6c). La unidad experimental fueron las larvas, para un total de 20 larvas por tratamiento. El ensayo se evaluó durante 1 mes (del 11 de febrero al 12 de marzo del 2018) de la siguiente manera: la primer semana todos los días y las restantes 3 semanas da por medio. En las evaluaciones se anotó la fecha, el número de larvas vivas y larvas muertas (variable de respuesta) y el color de las larvas muertas. Durante ese periodo de tiempo se midió la temperatura dentro del invernadero utilizando un registrador de temperatura marca Onset Hobo.

Una vez finalizado el ensayo, las larvas muertas que no presentaban el color rojizo característico de la bacteria simbiote *Photorhabdus* sp. se colocaron en trampas White, para comprobar la presencia o ausencia de nematodos. Para el análisis de datos se hizo una regresión logística utilizando el programa JMP versión 9.

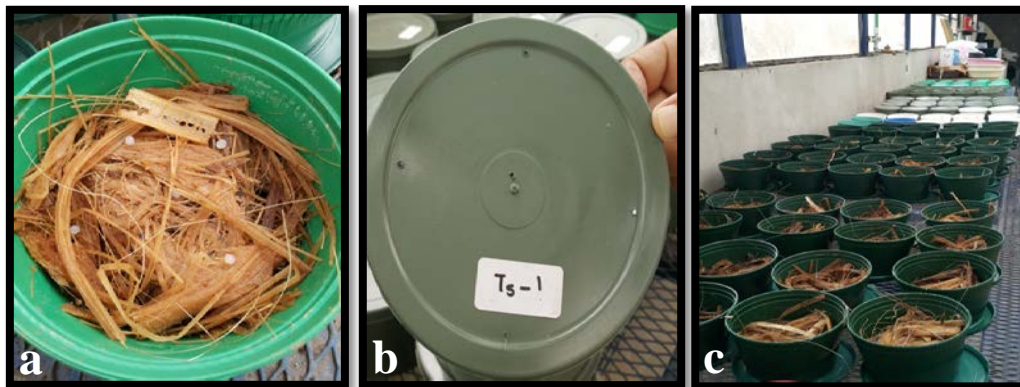


Figura 6. a) Tratamiento con una dosis de 5 cápsulas/larva, b) Agujeros en la tapa para permitir la oxigenación de las larvas y c) Establecimiento del ensayo en el invernadero.

10. Análisis estadístico

Todos los ensayos se analizaron a través de una regresión logística. Este análisis se realiza principalmente cuando la variable de respuesta es dicotómica y se quiere relacionar con un conjunto de variables independientes (De la Fuente 2011). Y el modelo de regresión probit, el cual se utiliza cuando se manejan conjuntos de datos con variable de respuesta categóricas y binarias. Además, permite determinar la toxicidad de un producto (químico u orgánico) sobre organismos vivos, por tal motivo, la variable de respuesta va a ser siempre binomial y la relación entre la dosis y la respuesta es de tipo sigmoidea (Ucedo 2013).

El modelo de regresión probit se representa de la siguiente manera (Ucedo 2013):

$$\pi = E(Y/X) = \Phi(\eta) = \Phi(x^T \beta)$$

Donde:

La variable respuesta Y , sólo puede tomar los valores $Y=1$ (presencia de la característica de interés) o $Y=0$ (ausencia de la característica de interés). Con probabilidad de ocurrencia igual a π .

Según Castillo (2004), el modelo de regresión probit permite estimar la relación dosis-respuesta, utilizando las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y el modelo con las estimaciones de los parámetros encontrados para determinar los valores de la variable. Normalmente se determina la dosis letal media requerida para matar al 50 por ciento de una población de organismos vivos (DL 50) cuya ecuación es:

$$y = a + bx$$

Donde:

y (expresado en unidades probit) = $z + 5$

z = Variable normal estándar = z_0 tal que la Prob ($z \leq z_0$) = p

a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión. Así, cuando $p = 50\%$ entonces

$y = 5$, por lo tanto: $x_5 = \log_{10} DL_{50}$, entonces $DL_{50} = 10^{x_5}$

En todos los experimentos el análisis estadístico se realizó con los datos del último día de evaluación y se trabajó con un nivel de significancia de un 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Infección de larvas de *H. illucens* con suspensiones de los nematodos *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y *Steinernema costarricense*

1.1 Efecto de una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens*

Como se observa en el cuadro 5, el efecto tamaño de larva fue significativamente diferente al presentar una probabilidad menor a 0,05 ($p = 0,0346^*$).

Cuadro 5. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para la variable tamaño de larva al utilizar una suspensión de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens*.

Termino	Estimado	Chi cuadrado	Probabilidad
Intercepto	-0,445887	5,7043499	0,0169*
Tamaño[M]	-0,395734	4,4660783	0,0346*

De esta manera, cuando se utilizó una suspensión con una concentración de 200 JI/ml (40 JI/larva) del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre las larvas de *H. illucens* en platos Petri, hubo un mayor porcentaje de mortalidad de larvas pequeñas (48%) que de larvas medianas (20%) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tabla de contingencia con porcentajes de mortalidad de larvas pequeñas y medianas de *H. illucens* al utilizar una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07.

Tamaño de la larva	Condición de la Larva		Total
	Muerta	Viva	
Mediana	5 (20%)	20 (80%)	25 (100%)
Pequeña	12 (48%)	13 (52%)	25 (100%)

Sin embargo, con ninguno de los dos tamaños de larva se logró infectar al 50% de la población (Figura 7). Lo que indica que las larvas de *H. illucens* son poco susceptibles a los nematodos del género *Heterorhabditis*, ya que se requiere una concentración de nematodos mayor a 200 JI/ml para alcanzar la dosis letal media (DL_{50}).

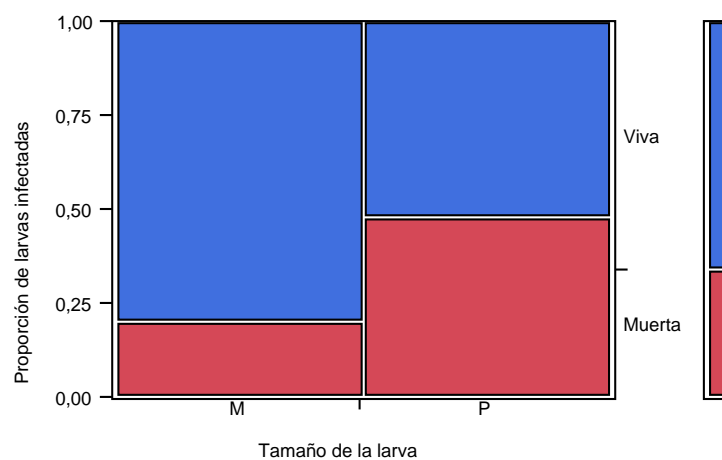


Figura 7. Proporción de larvas pequeñas y medianas de *H. illucens* infectadas con una suspensión de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07.

Los datos anteriores concuerdan con los resultados obtenidos por Rodríguez (2011), quien encontró una mayor mortalidad por acción de JI en las larvas pequeñas cuando evaluó la aplicación de una suspensión de 200 JI/ml del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, sobre cinco tamaños de larvas de *H. illucens* (0,5, 1,4, 1,5, 1,9 y 3,0 cm). El autor obtuvo un 96,2% de mortalidad en larvas menores a 2,0 cm (0,5, 1,4, 1,5, 1,9 cm).

Godjo *et al.* (2018), evaluaron el efecto de cinco dosis de suspensiones (20, 50, 100, 200 y 300 JI/larva) de los nematodos *Heterorhabditis taysearae* (Azohoue2 y Hessa1) y *Steinernema* sp. (Thui) sobre larvas del tercer estadio (con un tamaño de 10 mm) de *Bactrocera dorsalis* obteniendo como resultado mortalidad de larvas mayor al 75%, aún con las dosis más bajas de las dos cepas de *Heterorhabditis*.

La mortalidad de larvas pequeñas (0,5 a 1 cm) de *H. illucens* obtenida en este estudio fue menor a la reportada por Godjo *et al.* (2018) en larvas de *B. dorsalis* y por Rodríguez (2011) en larvas de *H. illucens*, con únicamente un 48% de mortalidad, esto a pesar de que *Heterorhabditis* sp. es una especie crucero, es decir, altamente móvil, y que busca activamente al hospedero a través de la percepción de CO₂, excretas y temperatura emitidas por las larvas (Villanueva 2013).

Una explicación a esa baja mortalidad de las larvas de *H. illucens* al nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 se debe a su morfología, ya que esta larva posee adaptaciones que dificultan el ingreso del JI. Entre ellas el número reducido de espiráculos (2 pares), característica que reduce la entrada de nematodos por esta vía y la cutícula endurecida (compuesta de CaCO₃), evitando que el nematodo entre a la larva a través del tegumento de la cutícula (Tourtois 2014).

1.2 Efectividad de una suspensión con una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml de los nematodos *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 y *Steinernema costarricense* sobre larvas de *H. illucens*

De acuerdo a los datos obtenidos por el análisis estadístico los tres efectos; concentración, tamaño de la larva y género del nematodo presentaron una probabilidad menor a 0,05 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables tamaño de larva, género y concentración de nematodos aplicados en suspensión acuosa sobre las larvas de *H. illucens*.

Termino	Estimado	Chi cuadrado	Probabilidad
Intercepto	-0,852367	7,5802702	0,0059*
Concentración	0,0002513	6,4012544	0,0114*
Tamaño[M]	0,1797905	4,9917468	0,0255*
Nematodo [<i>Heterorhabditis</i>]	0,7153798	84,309715	<,0001*

Como se observa en la figura 8, cuando se utilizó el nematodo del género *Heterorhabditis* hubo un mayor porcentaje de mortalidad que cuando se utilizó *Steinernema*. Por otro lado, en el caso de

Heterorhabditis, la mortalidad de larvas pequeñas (84%) no presentó un incremento al aumentar la concentración, mientras que con las larvas medianas si se observa un incremento. En el caso del género *Steinernema*, se obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad al aumentar la dosis en las larvas pequeñas, sin embargo, esta fue muy baja (4 a 12%). Las larvas medianas presentaron una mortalidad mayor que las pequeñas, se observó además un incremento en la mortalidad cuando se pasó de 2000 a 3000 JI/ml.

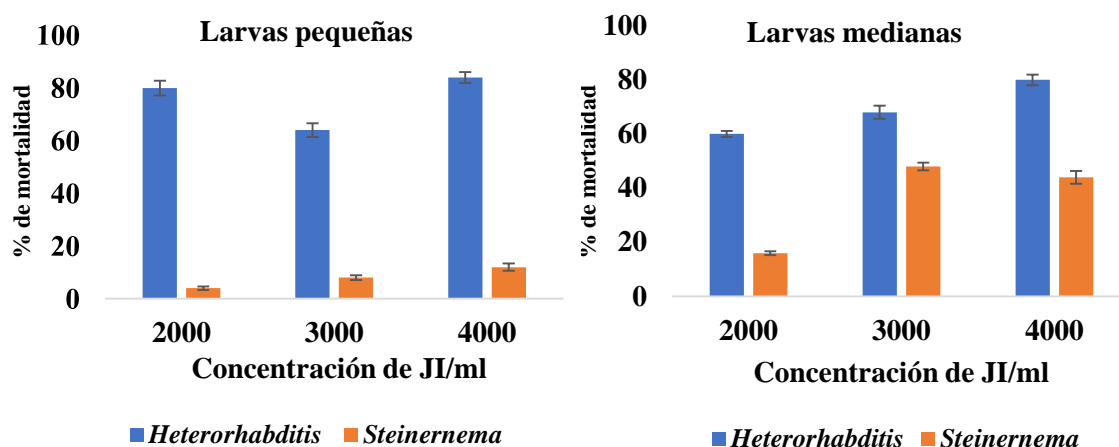


Figura 8. Porcentajes de mortalidad de larvas pequeñas y medianas de *H. illucens* al utilizar tres concentraciones y dos géneros de nematodos.

Según Hidalgo (2018), Sepúlveda-Cano *et al.* (2008) y Selvan *et al.* (1993), entre mayor sea la cantidad de nematodos a los que se exponga el insecto hospedero, más alta será la competencia intraespecífica. Por tal motivo, al usar suspensiones de nematodos con concentraciones altas la infección de las larvas puede no ser creciente, por el contrario, se mantiene estable o es menor que cuando se usan concentraciones bajas. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó la suspensión con una concentración de 4000 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre las larvas pequeñas de *H. illucens*, presentando el porcentaje de mortalidad más alto con un 84% (Figura 8).

Como se observa en el cuadro 8 y la figura 9, cuando se infectaron las larvas de *H. illucens* con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 en el caso de las larvas pequeñas, la dosis letal media requerida para matar el 50% de la población (5 larvas) fue de 1260 JI/ml y para las larvas medianas se necesitaron de -11336,5 a 1415,6 JI/ml para alcanzar la DL_{50} . Cuando se utilizó el nematodo *Steinernema costarricense* para llegar a la DL_{50} con las larvas pequeñas se necesitaron 6953,4 JI/ml y con las larvas medianas se requirió de 5522,7 JI/ml.

Cuadro 8. Valores de la DL₅₀ y sus respectivos intervalos de confianza para los dos tamaños de larva y los dos géneros de nematodos cuando se utilizó una suspensión con una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml.

Tamaño de la larva	Nematodo	DL50	Intervalo Inferior 95%	Intervalo Superior 95%
M	<i>Heterorhabditis</i>	-170,32	-11336,5	1415,56
M	<i>Steinernema</i>	5522,67	4172,0	14449,17
P	<i>Heterorhabditis</i>	1260,46	-5119,8	2394,43
P	<i>Steinernema</i>	6953,44	5051,0	20765,67

Aunque las larvas de *H. illucens* (pequeñas y medianas) fueron infectadas por el nematodo *Steinernema costarricense*, la susceptibilidad a este nematodo fue menor a la presentada con el género *Heterorhabditis*. Además, se observó que con este nematodo el mayor número de larvas muertas se presentó con las larvas medianas.

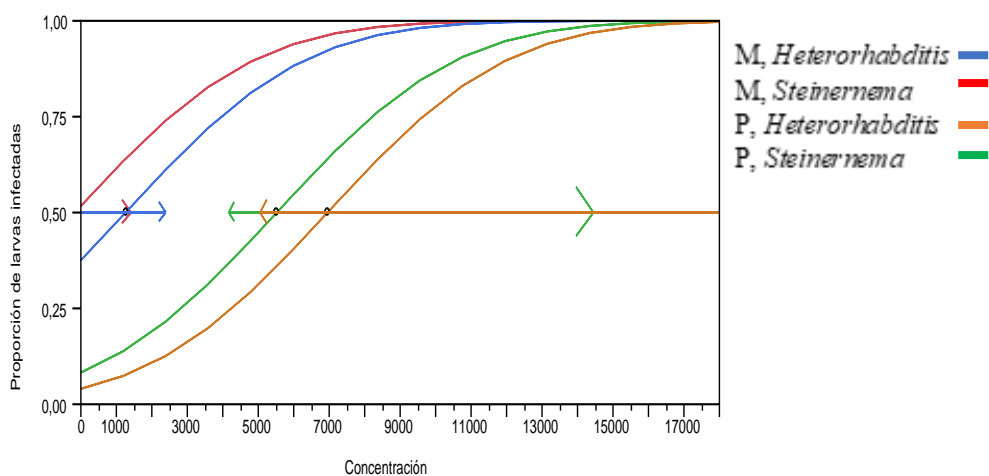


Figura 9: Proporción de larvas de *H. illucens* infectadas según tres concentraciones crecientes del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07.

Los datos obtenidos en este trabajo no concuerdan con lo reportado por Tourtois (2014), quién encontró al infectar larvas de *H. illucens* con una concentración de 100 JI/larva de los nematodos *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae* y *S. riobrave*, una mayor mortalidad cuando utilizó el género *Steinernema*. Con *S. carpocapsae* obtuvo una mortalidad en el segundo y cuarto estadio de 92 y 74%

respectivamente y en el quinto y sexto estadio de 13 y 17%, con *S. riobrave* en el segundo y cuarto estadio murió un 71 y 69% de larvas y en el quinto y sexto estadio un porcentaje de 53 y 8%. Con *S. feltiae* hubo una mortalidad de larvas del segundo estadio de 57% y la mortalidad más baja del segundo estadio de *H. illucens* se reportó con *H. bacteriophora* (28%). Al igual que en el presente trabajo, Tourtois (2014) encontró una mayor susceptibilidad al nematodo en larvas pequeñas (segundo y cuarto estadio) que en larvas medianas (quinto y sexto estadio).

Kepenekci *et al.* (2015), probaron el efecto de 4 nematodos (*S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora* y *H. marelatus*) a dosis de 0, 100, 500 y 1000 JI/larva y a tres temperaturas (10, 15 y 25 °C), sobre larvas del último instar de *Rhagoletis cerasi*. Los autores encontraron los mejores resultados a una temperatura de 25 °C y una concentración de 1000 JI/larva con una mortalidad de larvas de 95% con *S. feltiae*, seguido de *H. marelatus* con un 82 % y 76% con *H. bacteriophora*. Estos resultados contrastan con los obtenidos en esta investigación, ya que los porcentajes de mortalidad con el nematodo *S. costarricense* fueron los más bajos. Además, los porcentajes de mortalidad obtenidos con *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 fueron más altos que los obtenidos por Kepenekci *et al.* (2015) con el nematodo *H. bacteriophora*.

Morfín (2015), inoculó adultos de *Musca domestica* con 2 concentraciones (1200 y 1600 JI/ml⁻¹) de los nematodos *H. indica*, *Heterorhabditis* sp. y *Steinernema* sp. El mayor y menor porcentaje de mortalidad lo obtuvo con *H. indica* (86,6%) y *Steinernema* sp. (30%) respectivamente. Además, evaluó la mortalidad de larvas de *M. domestica* en diferentes sustratos (papel filtro, salvado de trigo y peat moss), usando la concentración más alta (1600 JI/ml⁻¹). Obteniendo como resultado la mayor mortalidad con el sustrato peat moss y el nematodo *H. indica* (53,33±5,77) y la mortalidad más baja con el sustrato salvado de trigo y el nematodo *Heterorhabditis* sp. (3,33±5,87).

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con la mayor virulencia de *Heterorhabditis* observada por Morfín (2015) en comparación con nematodos del género *Steinernema*. Sin embargo, este autor obtuvo porcentajes de infección más altos que los encontrados en este estudio, aunque utilizó concentraciones de nematodos más bajas. Esto se debe probablemente a que utilizaron especies de la familia díptera más susceptibles a la infección que *H. illucens*.

En cuanto a la DL₅₀, Villanueva (2013), probó la efectividad de los nematodos *H. bacteriophora* y *S. feltiae* sobre larvas de *Bradysia difformis*. *H. bacteriophora* fue el nematodo más virulento ya que se requirió de 15 JI/larva para obtener el 50% de mortalidad de las larvas (DL₅₀) por su parte con *S. feltiae* se necesitaron 196 JI/larva para alcanzar la DL₅₀. Por su parte Pacheco (2015), probó cuatro dosis (50, 100, 200 y 500 JI/larva) del nematodo *Heterorhabditis* sp. sobre larvas del último estadio (con una longitud de 1,77 mm) de *Prodiplosis longijila*, encontrando que a 48 horas se requiere una DL₅₀ (dosis letal medía para matar un 50% de la población) de 33,77 JI por larva de *P. longijila*.

Los resultados obtenidos por Villanueva (2013) y Pacheco (2015) difieren de los observados en este experimento, ya que *H. illucens* requiere una concentración de 1260 JI/ml para obtener la DL_{50} cuando se usa el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, valor superior al reportado por estos autores.

Las características morfológicas de *H. illucens* probablemente sirven de defensa contra la infección del nematodo, a pesar de eso, en este trabajo se observó que al aumentar la concentración de nematodos más de 10 veces (2000, 3000 y 4000 JI/ml) con respecto a la concentración normalmente utilizada (200 JI/ml), ocurre un mayor ingreso de estos al interior de la larva lo cual se ve reflejado en el incremento observado en el porcentaje de mortalidad.

2. Eficacia de cápsulas de alginato con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre las larvas de la mosca chichera en platos Petri

2.1 Efectividad de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con una concentración de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens*

Se evaluó el uso de cápsulas preparadas a partir de una concentración de nematodos de 200 JI/ml, a fin de determinar la virulencia de los nematodos sobre las larvas, cuando estos se encuentran encapsulados. Sin embargo, en ninguno de los dos efectos (tamaño de larva y número de cápsula) hubo diferencias significativas. El valor de p para el efecto tamaño pequeño fue de 0,9997 y para el tamaño mediano fue de 0,1246 y para el efecto número de cápsula la probabilidad fue de 1,0000 (Cuadro 9). Lo que indica que utilizar 5 o 10 cápsulas/5larvas con una concentración de 200 JI/ml da los mismos resultados que no utilizar nematodos (testigo).

Cuadro 9. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables tamaño de larva y número de cápsula (elaboradas con una concentración de 200 JI/ml).

Termino	Estimado	Chi cuadrado	Probabilidad
Intercepto	-4,99168	14,093502	0,0002*
Tamaño[M]	3,2409941	2,3591082	0,1246
Tamaño[P]	-1,620497	1,5448e-7	0,9997
N. Cápsulas	-5,91e-17	0	1,0000

Cuando se aplicó directamente sobre las larvas una suspensión con una concentración de 200 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, es decir, 40 JI/larva se obtuvo un porcentaje de mortalidad de larvas bajo (48% en larvas pequeñas y 20% en larvas medianas) (sección 1.1). Por tal motivo, era de esperar que la mortalidad de las larvas también fuera baja cuando se utilizaran cápsulas elaboradas con la misma concentración, sin embargo, los resultados fueron más bajos de lo esperado.

Según Bogantes *et al.* (2018), en cápsulas elaboradas con una concentración de 500 JI/ml el número de nematodos presente en cada cápsula es de aproximadamente $40 \pm 3,2$ JI. De esta manera, en cápsulas elaboradas con una concentración de 200 JI/ml teóricamente se tendrían 16 JI/ml. Estos valores tan bajos de nematodos dentro de las cápsulas se atribuyen a que una gran proporción de los nematodos presentes en la suspensión no son capturados en las cápsulas. Algunos juveniles infectivos se salen de las cápsulas durante el proceso de formación de las mismas en el cloruro de calcio o durante el almacenamiento de las cápsulas previo a su utilización.

Además, Bogantes *et al.* (2018) encontró al utilizar el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 encapsulado a una concentración de 500 JI/ml y a una dosis de 2, 10 y 20 cápsulas/larva, que el mayor porcentaje de mortalidad de las larvas de *G. mellonella* ($76\% \pm 7,5$) se obtuvo con una dosis de 10 cápsulas/5 larvas al día 15. Estos resultados son superiores a los obtenidos en el presente trabajo, lo que se debe probablemente a que en este estudio la dosis de cápsulas y la concentración de nematodos empleadas fue menor que la utilizada por los autores. Además, las larvas de *Galleria* son más susceptibles al nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 que las de *H. illucens*.

2.2 Efectividad de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con tres concentraciones (2000, 3000 y 4000 JI/ml) del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens*

Se observó diferencias significativas en la concentración y número de cápsulas ($p = 0,0134$ y $p < 0,0001$ respectivamente), pero no hubo diferencia en el tamaño de larva $p = 0,4224$ (Cuadro 10).

Cuadro 10. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables concentración (2000, 3000 y 4000 JI/ml), número de cápsulas y tamaño de larva.

Termino	Estimado	Chi cuadrado	Probabilidad
Intercepto	-1,855154	78,666781	<,0001*
Tamaño[M]	0,0587363	0,6435861	0,4224
Concentración	0,0001879	6,1220343	0,0134*
No. Cápsulas	0,1659325	40,777407	<,0001*

Cuando se utilizó la dosis de 5 cápsulas/5 larvas, no se alcanzó la dosis letal media en ninguno de los dos tamaños de larva (Figura 10a), ya que se requerían concentraciones de nematodos más altas a las utilizadas. En el caso de las larvas pequeñas se requería una concentración de 5771 JI/ml y de 5146 JI/ml para las larvas medianas (Cuadro 11).

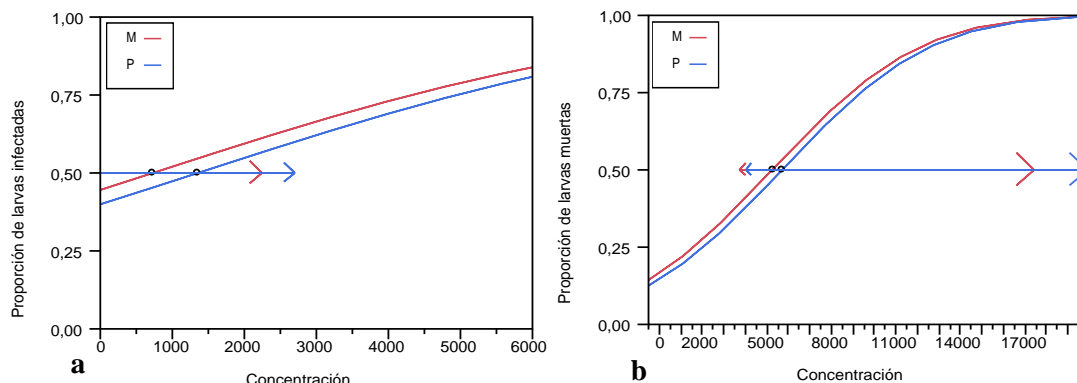


Figura 10. Concentración de JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 requerido para obtener la DL_{50} en larvas pequeñas (P) y medianas (M) de *H. illucens* cuando se utilizan: **a)** 5 cápsulas/5larvas y **b)** 10 cápsulas/5larvas.

Cuadro 11. Concentración de JI/ml requeridos para alcanzar la DL_{50} en larvas pequeñas y medianas de *H. illucens* cuando se utilizan 5 y 10 cápsulas/5larvas elaboradas con una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml.

No. Cápsulas	Tamaño de la larva	DL_{50}	Intervalo Inferior 95%	Intervalo Superior 95%
5	M	5145,927	3673,083	15764,52
	P	5771,221	4091,326	18911,69
10	M	729,726	-9754,06	2243,617
	P	1355,020	-6645,91	2700,893

Por el contrario, cuando se usaron 10 cápsulas/5larvas con los dos tamaños de larvas se logró obtener la DL_{50} (Figura 10b). Con las larvas pequeñas esta se alcanzó con una concentración de 1355 JI/ml y en el caso de las larvas medianas se logró con una concentración de 730 JI/ml (Cuadro 11).

Por su parte, cuando se utilizó una concentración de 2000 JI/ml (Figura 11a) se encontró que para matar el 50% de larvas pequeñas y medianas se requerían 9 cápsulas (Cuadro 12). Como se observa en la figura 11b, con la concentración de 3000 JI/ml para las larvas pequeñas la DL_{50} fue de 8 cápsulas y para las larvas medianas 7 (Cuadro 12). En lo que respecta a la concentración de 4000 JI/ml (Figura

11c) la DL_{50} para larvas pequeñas fue de 7 cápsulas y para las larvas medianas de 6 cápsulas (Cuadro 12). A mayor concentración, menor número de cápsulas.

De acuerdo a lo anterior, los mejores tratamientos fueron aquellos en los que se utilizaron 10 cápsulas y una concentración de 4000 JI/ml. Con esos dos efectos se logró llegar a la DL_{50} con la menor cantidad de JI/ml y con la menor cantidad de cápsulas.

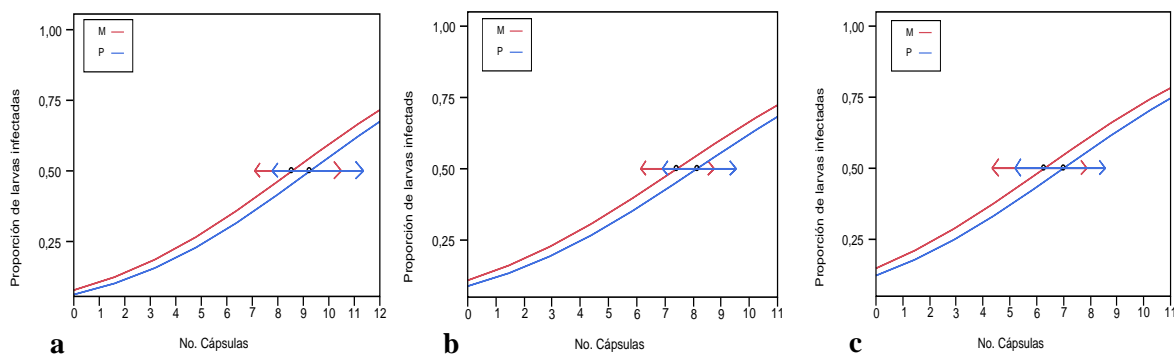


Figura 11. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas pequeñas (P) y medianas (M) de *H. illucens* infectadas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 a una concentración de **a)** 2000 JI/ml, **b)** 3000 JI/ml y **c)** 4000 JI/ml.

Cuadro 12. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas de *H. illucens* infectadas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 a una concentración de 2000, 3000 y 4000 JI/ml.

Concentración	Tamaño de larva	DL_{50}	Intervalo Inferior 95%	Intervalo Superior 95%
2000	M	8,561803	7,092854	10,49157
	P	9,269757	7,775500	11,35953
3000	M	7,429608	6,142850	8,751811
	P	8,137562	6,911463	9,533799
4000	M	6,297413	4,331911	7,872986
	P	7,005368	5,190651	8,564846

Bogantes *et al.* (2018), infectó larvas del último estadio de *G. mellonella* utilizando 3 dosis de cápsulas (2, 5 y 10 cápsulas/larva) y dos concentraciones del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 (1000 y 2000 JI/ml). Los mayores porcentajes de mortalidad de las larvas los obtuvieron con la dosis de 10 cápsulas/larva en ambas concentraciones 30% y 72% respectivamente y los porcentajes de mortalidad de larvas más bajos se presentaron cuando se usó una dosis de 2 cápsulas/larva en

ambas concentraciones 16% y 44% respectivamente. Lo anterior concuerda con los datos encontrados en este ensayo, ya que la mortalidad de las larvas pequeñas aumentó conforme lo hizo la concentración y el número de cápsulas.

2.3 Efectividad de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) elaboradas con dos concentraciones (8000 JI/ml y 9000 JI/ml) del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens*

Las variables concentración y número de cápsulas fueron significativas ya que ambas presentaron una $p < ,0001$, mientras que el tamaño de la larva no fue significativo ($p 0,6089$) (Cuadro 13).

Con ambas dosis de cápsulas se logró alcanzar la dosis letal media (Figura 12). Cuando se utilizaron 5 cápsulas/5larvas se obtuvo la DL_{50} con una concentración de 6849 JI/ml para las larvas pequeñas y de 7114 JI/ml con las larvas medianas (Cuadro 14). Por su parte, cuando se colocaron en los platos Petri 10 cápsulas/5larvas se necesitó una concentración de nematodos más baja que cuando se usaron 5 cápsulas/5larvas. Con las larvas pequeñas la mitad de la población murió cuando se colocaron 4744 JI/ml y en el caso de las larvas medianas la DL_{50} se alcanzó con una concentración de 5010 JI/ml (Cuadro 14).

Cuadro 13. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables concentración (8000 y 9000 JI/ml), número de cápsulas y tamaño de larva.

Termino	Estimado	Chi cuadrado	Probabilidad
Intercepto	-3,968414	73,449239	<,0001*
Tamaño[M]	-0,057992	0,2617946	0,6089
Concentración	0,0004367	22,908112	<,0001*
No. Cápsulas	0,183828	15,939624	<,0001*

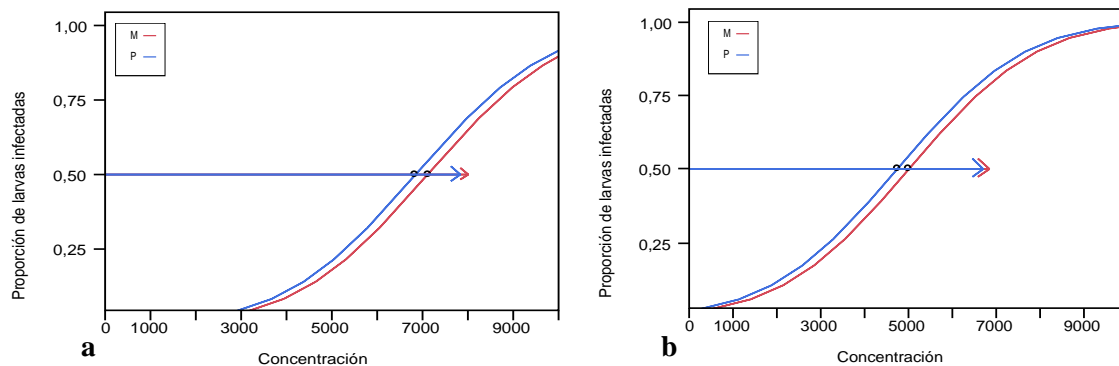


Figura 12. Proporción de larvas pequeñas (P) y medianas (M) de *H. illucens* infectadas al colocar: **a)** 5 cápsulas/5larvas y **b)** 10 cápsulas/5larvas elaboradas con una concentración de 8000 y 9000 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07.

Cuadro 14. Concentración de JI/ml requeridos para alcanzar la DL₅₀ de larvas pequeñas y medianas de *H. illucens* cuando se utilizan 5 y 10 cápsulas/5larvas elaboradas con una concentración de 8000 y 9000 JI/ml.

No. Cápsulas	Tamaño de la larva	DL50	Intervalo Inferior 95%	Intervalo Superior 95%
5	M	7114,705	-43273,4	8009,573
	P	6849,138	-52446,3	7833,124
10	M	5010,151	-124057	6846,334
	P	4744,584	-133263	6702,978

Además, con ambas concentraciones (8000 y 9000 JI/ml) se logró alcanzar la DL₅₀ en larvas pequeñas y medianas. Con la concentración de 8000 JI/ml (Figura 13a), se requirieron únicamente 2 cápsulas para obtener la mortalidad de la mitad de la población de las larvas pequeñas y con las larvas medianas se necesitaron 3 cápsulas para llegar a la DL₅₀ (Cuadro 15). Con la concentración de 9000 JI/ml (Figura 13b) se necesitan máximo 3 cápsulas para llegar a la DL₅₀ con ambos tamaños de larvas (Cuadro 15).

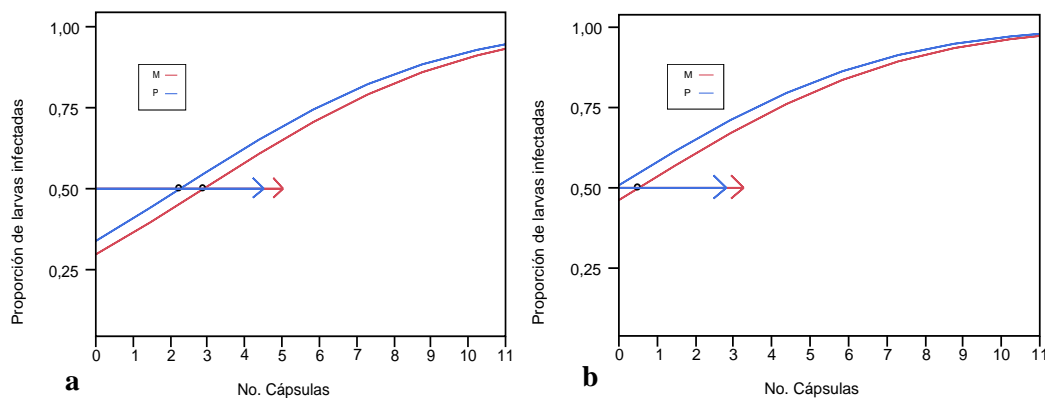


Figura 13. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas pequeñas (P) y medianas (M) de *H. illucens* infectadas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 a una concentración de: **a)** 8000 y **b)** 9000 JI/ml.

Cuadro 15. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas de *H. illucens* infectadas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 a una concentración de 8000 y 9000 JI/ml.

Concentración	Tamaño de la larva	DL50	Intervalo Inferior 95%	Intervalo Superior 95%
8000	M	2,896716	-2,02968	5,027417
	P	2,265782	-3,10736	4,511483
9000	M	0,520916	-6,69993	3,262539
	P	-0,110018	-7,83813	2,807127

Los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos donde se utilizaron 10 cápsulas y una concentración de 9000 JI/ml.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado por Bogantes *et al.* (2018), donde el uso de un mayor número de cápsulas aumentó la mortalidad de las larvas de *Galleria*. Cabe destacar que el uso de cápsulas preparadas con las concentraciones de 8000 y 9000 JI/ml incrementó la mortalidad de las larvas a valores mayores a los encontrados por Rodríguez (2011) y Tourtois (2014) quienes utilizaron nematodos del género *Heterorhabditis* en suspensiones acuosas.

Colocar un mayor número de cápsulas en los platos Petri aumentó la probabilidad de contacto entre los nematodos y las larvas. El mayor número de cápsulas incrementó el número de puntos de salida de los nematodos y por ende su capacidad para localizar e infectar las larvas.

La cantidad de nematodos en las cápsulas es un factor que se debe considerar ya que según Goud *et al.* (2010), el aumento de juveniles infectivos por cápsula también aumenta la muerte de estos. Con una concentración de 8000 JI/cápsula del nematodo *H. indica* la mortalidad de los nematodos fue de 15,48% y 32,66% a los 7 y 15 días respectivamente a una temperatura de almacenamiento de 28.54 ± 1.72 °C. Mientras que con una concentración de 10.000 JI/cápsula el porcentaje de mortalidad de los JI fue de 23,28% a los 7 días y de 42,75% al día 15. Si bien, el trabajo de Gould fue realizado con una concentración mayor de nematodos que la utilizada en este estudio, colocar un mayor número de nematodos por cápsula podría causar la muerte o el escape de los mismos.

3. Evaluación del efecto de dos dosis de cápsulas (5 y 10 cápsulas/5larvas) conteniendo *Photorhabdus* sp. y *Xenorhabdus* sp. sobre larvas de *H. illucens* en platos Petri

Este experimento se estableció como control para descartar la actividad tóxica oral de las bacterias simbiotes, ya que en ensayos previos donde se utilizaron cápsulas con nematodos, se observó que algunas larvas de *H. illucens* destruían las cápsulas (Figura 14), en algunos casos fueron ingeridas total o parcialmente. Por lo mencionado anteriormente, se decidió encapsular las bacterias simbiotes de los dos nematodos, para determinar si al momento de ingerir las cápsulas y por ende la bacteria, esta causaba la muerte de las larvas por su actividad tóxica oral (Ahantaring *et al.* 2009, Sanahuja 2016). Si bien el mecanismo de acción de *Xenorhabdus* sp. y *Photorhabdus* sp. se basa en la producción de toxinas que matan a la larva cuando son liberadas por el nematodo simbiote en el hemocele del insecto; estas bacterias pertenecen a la Familia Enterobacteriaceae y comparten con *Escherichia coli* la presencia de toxinas orales como PirAB (Ahantaring *et al.* 2009). Recientemente estas bacterias se han utilizado para el control de larvas de diferentes géneros de mosquitos, principalmente de aquellos de importancia médica. Obteniendo como resultado la mortalidad de más de un 50% de larvas cuando se ponen en contacto ya sea con la bacteria o con las toxinas que estas producen. La mortalidad se comienza a observar a partir de las 2 horas (Ahn *et al.* 2013, Sanahuja 2016, Santos da Silva *et al.* 2013).



Figura 14. Cápsulas deterioradas (mordidas) por las larvas de *H. illucens*.

Santos da Silva *et al.* (2013), evaluó el efecto de *P. luminescens* y *X. nematophila* sobre larvas del tercer y cuarto instar de *A. aegypti* y encontró efecto patogénico cuando las bacterias fueron ingeridas por las larvas de mosquito, obteniendo una mayor mortalidad de larvas cuando se utilizó *P. luminescens*. Ahantarig *et al.* (2009), evaluaron la actividad larvicida de la toxina PirAB de *Photorhabdus asymbiotica* sobre larvas del primer estadio de *A. aegypti* y *A. albopictus* y obtuvieron como resultado un 100% de mortalidad.

En Costa Rica Sanahuja (2016), utilizando la bacteria *P. luminescens*, en tres concentraciones (0,1, 1,0 y 10%), encontró efecto larvicida sobre larvas del tercero y cuarto estadio de *A. aegypti*. El mayor efecto biocida lo obtuvo con la suspensión de *P. luminescens* recién extraída del nematodo, con una muerte de las larvas de 70%, a las 4 horas y un 75% a las 48 horas.

En este trabajo, sin embargo, no se observó diferencia significativa en ninguno de los tres efectos ya que la probabilidad reportada fue superior a 0,05 (Cuadro 16).

Cuadro 16. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para las variables tamaño de larva, género de bacteria y número de cápsulas evaluadas sobre larvas de *H. illucens*.

Termino	Estimado	Chi cuadrado	Probabilidad
Intercepto	-7,144177	2,403e-8	0,9999
Tamaño[M]	-2,1e-17	2,085e-42	1,0000
Bacteria [<i>Photorhabdus</i>]	-1,81e-17	1,54e-42	1,0000
No. Cápsulas	-3,01e-16	2,666e-39	1,0000

Una posibilidad por la cual se obtuvo este resultado podría ser que los metabolitos secundarios producidos por *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (estilbeno, antraquinonas, xenofuranonas, bencilidenacetona, etc.), (Ahn *et al.* 2013, Ávalos y Pérez-Urria 2009, Monge 2017), provocaran un

efecto repelente que alejó a las larvas de las cápsulas, evitando que estas las ingirieran. Sin embargo, se deben realizar mayores estudios para corroborar este hallazgo.

4. Efectividad de 5 dosis de cápsulas (1, 2, 3, 4 y 5 cápsulas/larva) elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 sobre larvas de *H. illucens* en recipientes plásticos con residuos de banano

Para este experimento se utilizaron solamente larvas medianas por dos razones: 1) en las pruebas anteriores el tamaño de la larva no mostro diferencia significativa y 2) por su tamaño son más fáciles de encontrar, lo que agilizó el proceso de evaluación.

El efecto evaluado en esta prueba fue el número de cápsulas, para el cual el valor de p fue de 0,0147 ($p > 0,05$) (Cuadro 17). Por lo tanto, la mortalidad de las larvas medianas de *H. illucens* fue diferente cuando se colocaron 1, 2, 3, 4 o 5 cápsulas/larva, elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07.

Cuadro 17. Valores del estimado, chi cuadrado y probabilidad para la variable número de cápsulas elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml y evaluadas sobre larvas medianas de *H. illucens*.

Termino	Estimado	Chi cuadrado	Probabilidad
Intercepto	-1,519585	37,75255	<,0001*
No. Cápsula	0,1989782	5,9547715	0,0147*

Sin embargo, con ninguna de las cinco dosis de cápsulas se alcanzó la DL_{50} . Como se observa en la figura 15, con la dosis 5 cápsulas/larva se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad (35%), seguido de un 25% con la dosis de 4 cápsulas/larva y para las dosis de cápsulas 1, 2 y 3 cápsulas/larva el porcentaje de mortalidad fue de 10%; igual al reportado para el testigo (0 cápsulas).

Como se observa en la figura 16 y en el cuadro 18, el modelo de regresión probit estimó que para alcanzar la DL_{50} bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo, se requiere de 8 cápsulas/larva.

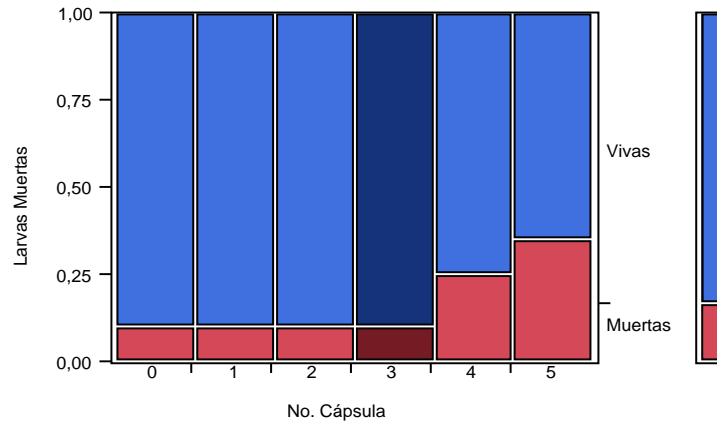


Figura 15. Porcentaje de mortalidad de larvas medianas de *H. illucens* inoculadas con cinco dosis de cápsulas elaboradas con una concentración de 9000 JI/ml.

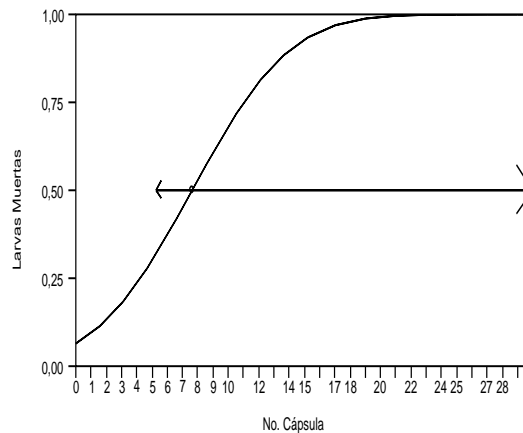


Figura 16. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas medianas de *H. illucens* infectadas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 a una concentración de 9000 JI/ml.

Cuadro 18. Número de cápsulas requeridas para alcanzar la DL_{50} en larvas medianas de *H. illucens* infectadas con el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 a una concentración de 9000 JI/ml.

Concentración	Tamaño de la larva	DL50	Intervalo Inferior 95%	Intervalo Superior 95%
9000	M	7,636939	5,264282	29,97784

Los resultados difieren de los obtenidos en platos Petri, en los cuáles se utilizó la misma concentración de nematodos y solamente dos dosis de cápsulas (1 y 2 cápsulas/larva). En el ensayo en plato se obtuvo una mortalidad de larvas mayor al 80% con la dosis de 1 cápsula/larva y un porcentaje de mortalidad mayor al 90% cuando se usó la dosis 2 cápsula/larva.

Los factores que influyeron en estos resultados podrían haber sido: el área del recipiente, el estado de las cápsulas, la ubicación y alimentación de las larvas, los líquidos producidos por los residuos y la temperatura y humedad dentro del recipiente.

El área evaluada en los platos fue de 13,6 cm² por lo tanto cuando se colocaron 5 cápsulas, había 1 cápsula por cada 2,7 cm² y cuando se colocaron 10 cápsulas el área por cápsula disminuyó a 1,4 cm². Por el contrario, los recipientes tenían un área más grande (21,9 cm²), de esta manera cuando se colocaron 2 cápsulas por recipiente cada una cubría un área de 10,9 cm², cuando se colocaron 3 el área por cápsula era de 7,3 cm², con 4 cápsulas el área que ocupaba cada cápsula era de 5,5 cm² y cuando se colocaron 5 cápsulas el área por cápsula fue de 4,4 cm². Es decir, en platos hubo un mayor contacto de las larvas con las cápsulas y por lo tanto con los JI, los cuales al salir de las cápsulas no requirieron un gasto importante de energía para encontrar a su hospedero. En los recipientes los JI tuvieron que recorrer mayor distancia y obstáculos (residuos de banano picados). Por tal motivo, cabe la posibilidad de que los nematodos no encontraran a las larvas o que al momento de encontrarlas sus reservas de energía se hayan reducido y no fueran capaces de penetrarla o de evadir el sistema de defensa de la larva.

En los platos Petri las cápsulas que no fueron ingeridas por las larvas permanecieron en perfectas condiciones hasta el último día del ensayo. Sin embargo, cuando las cápsulas se colocaron en los recipientes con vástago de banano picado se observó al segundo día de evaluación que estas comenzaron a deshacerse, dejando libres y expuestos a los nematodos tanto a la temperatura como a la humedad del sustrato durante los restantes 28 días.

Durante las evaluaciones las larvas se encontraban con frecuencia dentro de los trozos de vástago, adheridas a la tapa o en el fondo del recipiente, situación que evitó el contacto de los JI con las mismas. Es probable que cuando los nematodos quedaron libres por la descomposición de las cápsulas, hubo una mayor distribución de estos en los residuos, sin embargo, en ninguno de los tratamientos las larvas se alimentaron, por el contrario, los residuos permanecieron intactos.

Por otro lado, los residuos de banano produjeron lixiviados que se acumularon en el fondo de los recipientes, ya que estos no tenían en la base agujeros que permitieran evacuar esos líquidos. Como consecuencia, esta situación pudo haber aumentado la humedad dentro del recipiente afectando de manera negativa la sobrevivencia o virulencia de los nematodos.

Otro factor que pudo haber influido en la efectividad de los nematodos fue la temperatura, ya que el ensayo se llevó a cabo en un invernadero donde se registraron temperaturas máximas superiores a 25°C lo que pudo haber afectado la viabilidad de los nematodos ya que según Koppenhöfer y Kaya (2002) a temperaturas mayores a 25 °C la sobrevivencia y virulencia de los nematodos se ve afectada negativamente. Durante el ensayo, la temperatura promedio en el mes de febrero fue de 20,1 °C con una temperatura máxima de 30,1 °C y una temperatura mínima de 14,5 °C y en el mes de marzo la temperatura promedio fue de 21,4 °C con una temperatura máxima y mínima de 32,9 y 14,7 °C respectivamente.

Estos resultados difieren de lo encontrado por Villanueva (2013), quién infectó larvas y pupas de *Bradysia difformis* en platos Petri y en sustrato con una suspensión acuosa de 5000 JI/ml de los nematodos *H. bacteriophora* y *S. feltiae*. Obteniendo como resultado en el ensayo con sustrato que ambos nematodos fueron igual de virulentos sobre las larvas de *B. difformis*. De esta manera, cuando utilizó el nematodo *H. bacteriophora* se requirieron 37 JI/larva para alcanzar la DL₅₀ mientras que con el nematodo *S. feltiae* se necesitaron 35 JI/larva para matar a la mitad de la población.

Aunque los nematodos del género *Heterorhabditis* poseen un mecanismo de búsqueda del hospedero tipo crucero y pueden ingresar al nematodo por las aberturas naturales y a través de los tegumentos delgados de la cutícula, en este ensayo presentaron un valor de mortalidad de 35%, menor al observado en los platos petri.

CONCLUSIONES

- Cuando el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 se aplicó en suspensión acuosa, las larvas pequeñas de *H. illucens* fueron más susceptibles al nematodo que las larvas medianas.
- La mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementó la concentración de nematodos en suspensión acuosa.
- Las larvas de *H. illucens* (pequeñas y medianas) son más susceptibles al género *Heterorhabditis* que al género *Steinernema* cuando estos se aplican en suspensión acuosa.
- La susceptibilidad de las larvas de *H. illucens* (pequeñas y medianas) al nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07, disminuye cuando se utilizan cápsulas elaboradas con una baja concentración de nematodos (200 JI/ml).
- El porcentaje de mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementó la dosis de cápsulas y la concentración de nematodos.
- No se pudo comprobar la actividad tóxica oral de las bacterias simbiotes *P. luminescens* y *Xenorhabdus* sp. encapsuladas, ya que no fueron ingeridas por las larvas de *H. illucens*.
- Los nematodos encapsulados causaron mayor mortalidad de larvas medianas de *H. illucens* en platos Petri en el laboratorio, que en los recipientes con residuos de banano en el invernadero.
- El uso de sustratos de origen vegetal o el menor número de cápsulas/área, redujo la susceptibilidad de las larvas medianas de *H. illucens* al nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07.

RECOMENDACIONES

- Cuando se utilice algún tipo de sustrato sería recomendable aumentar la dosis de cápsulas/larva.
- En futuras investigaciones a nivel de invernadero, se recomienda elaborar cápsulas de un mayor grosor.
- Se sugiere realizar orificios de drenaje en los recipientes con el fin de evitar la acumulación de líquidos.
- Se recomienda utilizar un residuo en un proceso de descomposición más avanzado que el utilizado en este experimento para que las larvas se alimenten correctamente.

LITERATURA CITADA

- Alderete, A. 2006. Fundamentos del Análisis de Regresión Logística en la Investigación Psicológica. *Evaluar* 6:52-67.
- Ahn, J; Lee, J; Yang, E; Lee, Y; Koo, K; Song, K; Lee, K. 2013. Mosquitocidal activity of anthraquinones isolated from symbiotic bacteria *Photorhabdus* of entomopathogenic nematode. *Revista de Entomología Asia-Pacífico* 16(3): 317-320.
- Ahantarig, A; Chantawat, N; Waterfield, N; French-Constant, R; Kittayapong, P. 2009. PirAB Toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a Larvicide against Dengue Vectors. *Appl. Environ. Microbiol* 75(13): 4627–4629.
- Amador, M; Molina, D; Guillen, C; Parajeles, E; Jiménez, K; Uribe, L. 2015. Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro. *Agron. Costarricense* 39(3):47-60.
- Arauz, L. 2011. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 2 ed. San José, Costa Rica. P. 137-151.
- Atwa, A. 2014. Entomopathogenic Nematodes as Biopesticides. In: K. Sahayaraj, editor, *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. Springer, India. p. 69-98.
- Ávalos, A; Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal* 2(3):119-145.
- Banks, I. 2014. To assess the impact of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae on faecal reduction in pit latrines. PhD tesis, London School of Hygiene & Tropical Medicine. England. 231 p.
- Barros-Cordeiro, K; Báó, S; Pujol-Luz, J. 2014. Intra-Puparial Development of the Black Soldier-fly, *Hermetia illucens*. doi: 10.1673/031.014.83. Consultado 27 enero 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4212870/>.
- Bogantes, D. 2016. Determinación de la capacidad de tres materiales de encapsulamiento para preservar al nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07. Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 84 p.
- Bogantes, D; Flores, L; Castellón, E; Uribe, L. 2018. Encapsulamiento de nematodos entomopatógenos en materiales basados en biopolímeros y su efecto sobre *Galleria mellonella*. *Agron. Costarricense* 42(2): 9-27.

- Bolaños, E. 2011. Manual de buenas prácticas agrícolas en el cultivo de banano. CORBANA, San José, Costa Rica. 176 p.
- Bulak, P; Polakowski, C; Nowak, K; Waško, A; Wiącek, D; Bieganowski, A. 2018. *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation. Science of the Total Environment 633:912–919.
- Casanova, K. 2014. Implementación de una empresa de papel periódico utilizando el raquis de banano como materia prima. Tesis de maestría, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. 107 p.
- Castillo, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. IMTA, México. 189 p.
- Corporación Bananera Nacional (CORBANA). 2016. Estadísticas bananeras (en línea). Consultado 30 enero 2017. Disponible en https://www.corbana.co.cr/categories/categoria_1348243853.
- Coto, D. 1998. Estados inmaduros de insectos de los órdenes Coleóptera, Díptera y Lepidóptera: manual de reconocimiento. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 153 p.
- Coto, D; Saunders, J. 2004. Insectos plagas de cultivos perennes con énfasis en frutales en América Central. CATIE/EARTH, Turrialba, Costa Rica. 420 p.
- Cubillo, D. 2013. Manejo integrado de insectos plagas en el cultivo de banano: conceptos y aplicaciones. 1a ed. CHEMPLAST. San José, Costa Rica. 105 p.
- Cubillo, D; Laprade, S; Vargas, R. 2001. Manual técnico para el manejo integrado de insectos plaga en el cultivo de banano. CORBANA, San José, Costa Rica. 73 p.
- De la Fuente, S. 2011. Regresión logística. Universidad Autónoma de Madrid, España. 27 p.
- Delgado, Y; Sáenz, A. 2012. Virulencia, producción y desplazamiento de nematodos entomopatógenos sobre larvas del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. Universitas Scientiarum 17(3):283-290.
- Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA). 2016. Programa de fitosanidad: manejo de plagas informe de resultados 2015. LAICA. San José, Costa Rica.
- Diclaro, J; Kaufman, P. 2009. Black soldier fly *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae). Consultado el 30 junio 2017. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/in/in83000.pdf>.

- Diener, S; Studt, N; Roa, F; Zurbrügg, C; Tockner, K. 2011. Biological Treatment of Municipal Organic Waste using Black Soldier Fly Larvae. *Waste Biomass Valor* 2:357-363.
- Ehlers, R; Shapiro-Ilan, D. 2005. Mass Production. In: Grewal, P; Ehlers, R; Shapiro-Ilan, D, editors, *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing., EEUU. p. 65-78.
- Girón, S. 2008. Evaluación de dos formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control de la gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) en maíz. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Xoxocotlán, México.
- Gobbi, F. 2012. Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de *Hermetia illucens* (L., 1758) (Díptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa. Tesis doctoral, Universidad de Alicante, España. 155 p. Consultado 29 enero 2017. Disponible en https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/28345/1/Tesis_Gobbi.pdf.
- Godjoa, A; Zadjia, L; Decraemerc, W; Willemsb, A; Afoudaa, L. 2018. Pathogenicity of indigenous entomopathogenic nematodes from Benin against mango fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) under laboratory conditions. *Biological Control* 117: 68–77.
- Goud, S; Hugar, P; Prabhuraj, A. 2010. Effect of temperature, population density and shelf life of EPN *Heterorhabditis indica* (RCR) in sodium alginate gel formulation. *Journal of Biopesticides* 3(3):627-632.
- Grijalva, I. 2014. Evaluación de cuatro medios sólidos de crecimiento para la producción *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*. Título de licenciatura, El Zamorano, Zamorano, Honduras. 17 p.
- Guimarães, J; De Souza, D. 2006. Díptera. En: Costa, C; Ide, S; Simonka, C, editores, *Insectos Inmaduros: metamorfosis e identificación*. Zaragoza:SEA., España. p. 135-148.
- Harnden L., Tomberlin J. 2016. Effects of temperature and diet on black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), development. *Forensic Science International* 266:109–116.
- Hidalgo, E. 2018. Nematodos entomopatógenos del Noreste de México y su patogenicidad y virulencia sobre *Tenebrio molitor* L. Tesis de bachiller, Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro, Coahuila, México. 52 p.
- Hiltpold, I. 2015. Prospects in the application technology and formulation of entomopathogenic nematodes for biological control of insect pests. In: R. Campos-Herrera, editor, *Nematode*

- Pathogenesis of Insects and Other Pests. Springer International Publishing Switzerland, Australia. p. 187-205.
- Hiltpold, I; Bruce, E; Hibbard, B; Wade, F; Turlings, T. 2012. Capsules containing entomopathogenic nematodes as a Trojan horse approach to control the western corn rootworm. *Plant and Soil* 358:11-25.
- Holmes, L. 2010. Role of Abiotic Factors on the Development and Life History of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae). Master of Science thesis, University of Windsor, Canada. 168 p.
- Jaramillo, C; Celeita, J; Sáenz, A. 2013. Susceptibility of *Delia platura* to seven entomopathogenic nematode isolates from the Central Andes region of Colombia. *Univ. Sci* 18(2):165-172.
- Juaneda, A. 2009. Los nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Título doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España. 179 p.
- Kaya, H; Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic Nematodes. *Annu. Rev. Entomol* 38:181-206.
- Kepenekci, I; Hazir, S, Özdem, A. 2015. Evaluation of native entomopathogenic nematodes for the control of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae) larvae in soil. *Turk. J. Agric. For* 39: 74-79.
- Koppenhöfer, A; Kaya, H. 2002. Entomopathogenic nematodes and insect pest management. In: O. Koul, G. Dhaliwal, editors, *Microbial biopesticides*. Taylor & Francis, NY, Estados Unidos. p. 276-305.
- Monge, C. 2017. Exploración taxonómica y de factores de virulencia en una cepa de *Photorhabdus* sp. aislada en Costa Rica. Informe para optar por el título de licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago. 74 p.
- Morales, D. 2008. Evaluación de *Castollus plagiaticollis* stall como método de control biológico de *Colaspis* spp. en el cultivo de banano. Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 46 p.
- Moreno, C. 2017. Evaluación de parámetros para la producción del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en fermentación líquida. Tesis de maestría, Universidad Nacional De Colombia. Palmira, Colombia. 85 p.

- Morfín, A. 2015. Factibilidad del empleo de nematodos entomopatógenos en el control de *Musca domestica* L. en la Ciénega de Chapala, Michoacán, México. Tesis de maestría, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Michoacán, México. 86 p.
- Ortiz, M. 2004. Manejo del trips de la flor (*Frankliniella* sp.) en el cultivo de banano (*Musa sapientum* L.) en Entre Ríos, Izabal. Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 81 p.
- Pacheco, D. 2015. Patogenicidad de dos nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* sp. y *Steinemema* sp.) sobre larvas y pupas de *Prodiplosis longijila* en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) Lambayeque 2014. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional “Pedro Ruiz Galla”, Lambayeque, Perú. 80 p.
- Parajeles, E; Jiménez, K. 2010. Conservación del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 en tres sustratos y su efecto sobre el insecto *Cosmopolites sordidus*. Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 48 p.
- Park, H. 2016. The Black Soldier Fly Larvae Manual. Consultado el 30 enero 2017. Recuperado de http://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1015&context=sustainableumas_students_showcase.
- Parra, A; Carrejo, N; Gómez, C. 2015. Effects of Larval Density and Feeding Rates on the Bioconversion of Vegetable Waste Using Black Soldier Fly Larvae *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae). Waste and Biomass Valorization 6(6):1059-1065.
- Pérez, J; Pérez, T. 2010. La Biodigestión como estrategia en el manejo sostenible de desechos orgánicos, y para el fomento de alianzas entre la agroindustria, las comunidades y redes de escuelas ecológicas. Tesis de licenciatura, Universidad EARTH, Guácimo, Costa Rica. 118 p.
- Poinar, G. 1975. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. Gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. Fam.). Nematológica 21: 463-470.
- Poinar, G. 1985. *Neoplectana intermedia* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina. Revue Nématol 8(4): 321-327.

- Poinar, G. 1992. Rudolph W. Glaser (1888-1947) - A Pioneer of Steinernematid Nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 1-4.
- Realpe-Aranda, F; Bustillo-Pardey, A; López-Núñez, J. 2007. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé* 58(2):142-157.
- Rodríguez, D. 2011. Evaluación de la patogenicidad de *Heterorhabditis* sp. (Rhabdithidae) sobre larvas de *Hermetia illucens* (Díptera: Stratiomyidae) y *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Scarabidae). Práctica profesional supervisada, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 38 p.
- Rodríguez, D; Torres, M; Uribe, L; Flores, L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 Y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agron. Costarricense* 33(2):171-182.
- Roháček, J; Hora, M. 2013. A northernmost European record of the alien black soldier fly *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae). *Čas. Slez. Muz. Opava* 62: 101-106.
- Rojas, C. 2011. Prospección de la entomofauna benéfica asociada al cultivo de banano (*Musa AAA*), subgrupo "Cavendish," en la Región Atlántica de Costa Rica. Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica. 114 p.
- Rumbos, C; Athanassiou, C. 2017. The use of entomopathogenic nematodes in the control of stored-product insects. *J. Pest. Sci* 90(1):39-49. DOI 10.1007/s10340-016-0795-y.
- Sáenz, A. 2005. Importancia de los nematodos entomopatógeno para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Revista Palmas* 26(2):41-57.
- Sáenz, A; López, J. 2011. Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Rev. Colomb. Entomol* 37(1):43-47.
- Sáenz, A; Olivares, W. 2008. Capacidad de búsqueda del nematodo entomopatógeno *Steinernema* sp. SNIO 198 (Rhabditida: Steinernematidae). *Revista Colombiana de Entomología* 34(1):51-56.
- Sanahuja, A. 2016. Efecto biocida de suspensiones bacterianas y fracción de *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Culicidae). Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 41 p.

- San-Blas, E. 2013. Progress on entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980–2010. *Biological Control* 66:102–124.
- Sandoval, J. 2010. Informe anual de investigaciones 2009. CORBANA. San José, Costa Rica. 321 p.
- Santos da Silva, O; Rodrigues, G; Rosa da Silva, J; Silva, C; Costa, M; Heermann, R. 2013. Oral toxicity of *Photorhabdus luminicens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 112(8): 2891-2896.
- Secretaria Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). 2018. Boletín estadístico agropecuario: 28^a ed. San José, Costa Rica. 225 p.
- Segura, M. 2014. Composición bromatológica *Hermetia illucens*. Tesis de ingeniero técnico agrícola, Universidad de Almería, Almería, España. 80 p.
- Selvan, S; Campbell, J; Gaugler, R. 1993. Density-Dependent Effects on Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an Insect Host. *Journal of Invertebrate Pathology* 62(3):278-284.
- Sepúlveda-Cano, P; López-Núñez, J; Soto-Giraldo, A. 2008. Efecto de dos nematodos entomopatógenos sobre *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Rev. Colomb. Entomol* 34(1): 62-67
- Shapiro-Ilan¹, D; Gaugler, R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 28: 137-146.
- Shapiro-Ilan, D; Morales-Ramos, J; Rojas, M. 2016. In Vivo Production of Entomopathogenic Nematodes. In: T. Glare, and M. Moran-Diez, editors, *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York. p. 137-158.
- Sheppard, D; Tomberlin, J; Joyce, J; Kiser, B; Sumner, S. 2002. Rearing Methods for the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). *J. Med. Entomol* 39(4): 695-698.
- Smart, G. 1995. Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. *Journal of Nematology* 27(4S): 529-534.
- Steiner, R. 2006. Utilización energética de residuos orgánicos en Costa Rica. Consultado 20 enero 2017. Disponible en <http://ley8839.go.cr/blog/wp-content/uploads/2006/04/UTILIZACION->

ENERGETICA-RESIDUOS-ORGANICOS-EN-COSTA-RICA-VERSION-FINAL-Junio-2006-Anhang.pdf.

- Stock, P; Griffin, C; Chaerani, R. 2004. Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. *Nematology* 6(3): 401-412.
- Stock, P; Uribe, L; Uribe, L; Mora, M; Flores, L. 2008. Aplicaciones biotecnológicas de los nematodos parásitos de insectos. UCR. San José, Costa Rica. 87 p.
- Studt, N. 2010. Uso de larvas de mosca soldado negro (*Hermetia illucens*) para el manejo de residuos municipales orgánicos en el Campus de la Universidad EARTH, Costa Rica. Tesis de bachillerato, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 59 p.
- Tiwari, K. 2008. Polymer capsules: fundamental studies and new concepts. Master of Science thesis, University of Maryland, George, United States. 37 p.
- Toledo, J; Rasgado, M; Ibarra, J; Gómez, A; Liedo, P; Williams, T. 2006. Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in a mango orchard. *Entomol. Exp. Appl* 119:155–162.
- Toledo, J; Sánchez, J; Williams, T; Gómez, A; Montoya, P; Ibarra, J. 2014. Effect of soil moisture on the persistence and efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Florida Entomologist* 97(2):528-533.
- Tourtois, J. 2014. On entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae): a potential rearing host, black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) and compatibility with a predatory beetle, *Dalotia coriaria* (Kraatz) (Coleoptera: Staphylinidae). Master of Science thesis, Michigan State University, EE.UU. 94 p.
- Tran, G; Gnaedinger, C; Melín, C. 2015. Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) (en línea). Consultado 03 febrero 2017. Disponible en <http://www.feedipedia.org/node/16388>.
- Ucedo, V. 2013. Comparación de los modelos logit y probit del análisis multinivel, en el estudio del rendimiento escolar. Tesis de licenciatura, Lima, Perú. 141 p.

- Umamaheswari, R; Sivakumar, M; Subramanian, S. 2005. Survival and infectivity of entomopathogenic nematodes in alginate gel formulations against rice meal moth larva, *Corcyra cephalonica* Stainton. Tamil Nadu Agricultural University 5(2):95-98.
- Vashisth, S; Chandel, Y; Sharma, P. 2013. Entomopathogenic nematodes - A review. Agri. Reviews 34(3):163-175.
- Vázquez, E. 2012. Caracterización de nematodos entomopatógenos aislados del Valle de Guasave, Sinaloa, México. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Sinaloa, México. 103 p. Consultado 10 febrero 2017. Disponible en <http://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/13140/1/ELVA%20LORENA%20VAZQUEZ%20MONTROYA.pdf>.
- Vemmer, M; Patel, A. 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. Biological Control 67:380–389.
- Vidaurre, D. 2016. Caracterización molecular y morfológica del nematodo entomopatógeno Cepa CIA-NE07 y descripción de la relación simbiótica con *Photorhabdus* sp. CRCIAP-01 mediante microscopía electrónica de transmisión y la técnica de hibridación *in situ* (FISH). Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 106 p.
- Villanueva, E. 2013. Nematodos Entomopatógenos en el control de la Mosca Negra (Diptera: Sciaridae) en Nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch). Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. 91 p.