



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

## **TESIS**

Patogenicidad de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**AUTOR:**

**Br. Marlon Alexander Vergaray Ramírez**

**PATROCINADOR:**

**Dra. Carmen Calderón Arias**

**Lambayeque – Perú**

**2014**

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

**TESIS**

Patogenicidad de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio

**AUTOR:**

**Br. Marlon Alexander Vergaray Ramírez**

**APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:**

-----  
**Dra. Carmen Calderón Arias**  
**PATROCINADORA**

-----  
**M.Sc. Luis García Chiscul**  
**PRESIDENTE**

-----  
**Dra. Elsa Angulo Plascencia**  
**SECRETARIA**

-----  
**M.Sc. Jhon García López**  
**VOCAL**

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES:**

**Gloria y Germán**, por su apoyo y amor incondicional en todo sentido, porque siempre han creído en mí. Por sus consejos y por su gran afecto.

### **A MI HERMANO:**

**Dustin**, por su paciencia, su comprensión y por su ayuda constante. Por alegrar mis días y por enseñarme a ser un mejor hermano.

## **EPIGRAFE**

"si desaparecieran todos los insectos de la tierra, en menos de 50 años toda la vida sobre la tierra desaparecería; si todos los seres humanos desaparecieran de la tierra, todas las formas de vida florecerían".

**Jonas Salk**

“Si desapareciese toda la materia del Universo excepto los nemátodos, nuestro mundo todavía sería débilmente reconocible y si, como espíritus incorpóreos, pudiésemos investigarlo, sería posible encontrar sus montañas, colinas, valles, ríos, lagos y océanos representados por una delgada película de nemátodos...”

**Nathan Augustus Cobb**

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS porque permitió la realización de este trabajo, por medio de personas tan increíbles que me han ofrecido su amistad y su colaboración.

A la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, particularmente a la Facultad de Ciencias Biológicas, por darme la oportunidad de lograr una meta más.

A mi patrocinadora Dra. Carmen Calderón Arias, por su apoyo en la realización del presente trabajo de tesis y por sugerencias brindadas en todo momento.

Al Ing. Mg.Sc.Jesús Alcázar Sedano del Centro Internacional de la Papa (CIP)-Lima, por darme las pautas necesarias para realizar el trabajo de laboratorio, por esclarecer mis dudas en la metodología y por brindarme información actualizada que ha enriquecido este trabajo de investigación.

A la Ingeniera María Elena Neyra Espejo, por permitirme utilizar las instalaciones del Laboratorio de Biocontrol (Entomopatógenos) para ejecutar la parte experimental de mi trabajo de tesis y al biólogo Darwin Perez Tesén por su apoyo y sugerencias brindadas en los bioensayos.

Al jefe del Laboratorio Referencial Regional de Lambayeque de la Dirección Regional de Salud, Msc.Wilmer Carpio Montenegro, por haberme brindado la disponibilidad y el uso de las instalaciones, materiales y equipos para la crianza del mosquito *Aedes aegypti*.

Al biólogo Pablo Villaseca de laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud (INS)-Lima por sus enseñanzas en la crianza y en la identificación del mosquito *Aedes aegypti* durante el temporada que me estuve capacitando en Lima.

A la Dra. María Alejandra Bertolotti, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC)-Argentina por responder cada una de las dudas que surgieron al momento de ejecutar el presente trabajo de investigación.

A los profesores Fernando Carranza Lent y Jorge Fupuy, por sus sugerencias y apoyo en los análisis estadísticos.

A los profesores miembros del jurado, Msc.Luis García Chiscul, Dra. Elsa Ángulo Plasencia y M.Sc. John García López, por el análisis crítico del presente documento y las sugerencias para mejorarlo.

Al señor Francisco Faya del Centro de Salud de Motupe, por ayudarme en la recolección de larvas de *Aedes aegypti* en campo.

A Yesenia Baca Choque por enseñarme la crianza de los nemátodos entomopatógenos y del insecto *Galleria mellonella*.

A Ronald Milian Perez, Halder Isla por sus indicaciones para mejorar la crianza de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

A María Isabel Arroyo Olivera, por su ayuda en la preparación de material, en la instalación de los ensayos y su amable colaboración en la toma de fotos.

A Patricia Lora, por su apoyo en la elaboración del Abstract y por sus sugerencias.

A todos mis amigos, por lo mucho que me enseñaron, por sus consejos y porque me alentaron a concluir el presente trabajo de investigación.

**EL AUTOR**

## RESUMEN

*Aedes aegypti* es un mosquito de las regiones tropicales y subtropicales, en donde representa una seria amenaza para la salud pública. Nuevas alternativas para el control de este vector están siendo investigadas. Una de ellas es el uso de nemátodos entomopatógenos. Por esta razón, se llevó a cabo el presente trabajo de investigación en condiciones de laboratorio, con el objetivo de evaluar la patogenicidad de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Un ensayo “cinco en uno” fue aplicado usando *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp.* Se obtuvieron porcentajes de mortalidad de 13.8% y 17.4% para la primera y segunda cepa respectivamente.

En el ensayo llevado a cabo con *Heterorhabditis sp.* se obtuvo una concentración letal media de 209.3 JIs/larva.

De acuerdo a estos resultados los nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* tienen un gran potencial para el control de las larvas del mosquito vector del dengue. Este es el primer reporte de la patogenicidad de nemátodos entomopatógenos aislados del Perú sobre larvas de *Aedes aegypti*, con resultados promisorios. Por lo tanto, se debería profundizar su estudio para determinar si pueden resultar efectivos como agentes autóctonos para el control biológico del mosquito *Aedes aegypti*, y otros de interés sanitario en el país.

**Palabras claves:** Patogenicidad, Nemátodos entomopatógenos, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis sp.*, *Aedes aegypti*, Ensayo cinco en uno, Concentración letal media.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is a mosquito from tropical and subtropical regions, where it represents a serious threat to public health. New alternatives for controlling this vector are being investigated. One of these is the use of entomopathogenic nematodes. For this reason, a research has been carried out under laboratory conditions with the aim of assessing the pathogenicity of entomopathogenic nematodes of the *Heterorhabditis* genus on *Aedes aegypti* larvae.

A “five on one” assay was applied using *Heterorhabditis bacteriophora* and *Heterorhabditis* sp. Mortality percentages of 13.8% and 17.4% were obtained for the first and second strains respectively.

On the assay carried out on *Heterorhabditis* sp. a median letal concentration of 209.3 IJs/larva was obtained.

According to the results, entomopathogenic nematodes of *Heterorhabditis* genus show high potential for the control of larvae of dengue mosquito vector. This is the first report of pathogenicity of entomopathogenic nematodes isolates from Peru against larvae of *Aedes aegypti*, with promising results. Therefore, further studies must be carried out to determine if these nematodes would be effective as autochthonous agents for the control of *Aedes aegypti* and other mosquitoes of sanitary interest in the country.

**Key Words:** Pathogenicity, entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis* sp, *Aedes aegypti*, five on one assay, median letal concentration.



## ABREVIATURAS

**ADE:** Agua destilada estéril

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal media

**°C:** Grados centígrados

**DL<sub>50</sub>:** Dosis letal media

**et al.** Et alli (latín), y otros

**H.R:** Humedad Relativa

**INIA:** Instituto Nacional de Innovación Agraria

**INS:** Instituto Nacional de Salud

**DJ:** Juvenil dauer

**JI:** Juvenil infectivo.

**JIs/larva:** Juvenil infectivo de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* por larva de *Aedes aegypti*

**µL:** Microlitro

**ml:** Mililitro

**NEP:** Nemátodo entomopatógeno

**NEPs:** Nemátodos entomopatógenos

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad Agraria

**sp.:** Se utiliza para una especie concreta cuyo epíteto específico es desconocido.

## GLOSARIO

**BIOENSAYO:** Cualquier método que mida alguna propiedad de un estímulo físico, químico, biológico o fisiológico, en términos de respuesta biológica de un organismo de prueba.

**CEPA:** Aislamiento de una especie de microorganismo de características conocidas que se conserva cultivado en el laboratorio para determinados ensayos.

**CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL<sub>50</sub>):** Estimador estadístico obtenido a partir del análisis Probit, que representa la concentración de un factor causante del 50% de la mortalidad en un bioensayo. También se le conoce como Dosis letal media (DL<sub>50</sub>).

**CONTROL BIOLÓGICO:** Definición ecológica o funcional: “La acción de parasitoides, depredadores y patógenos para mantener la densidad de otros organismos (huéspedes o presas) a un nivel más bajo del que ocurriría en su ausencia”. Definición disciplinaria: “Estudio, importación, conservación y aumento de organismos benéficos para la supresión de poblaciones plagas”. Tradicionalmente, se reconocen tres tipos de control biológico: clásico, aumentativo y de conservación.

**ENSAYO UNO EN UNO (5:1):** Ensayo para determinar la calidad de los juveniles infectivos y por ende su patogenicidad. Un juvenil infectivo es usado para infectar un insecto.

**ENSAYO CINCO EN UNO (1:1):** Ensayo para determinar la calidad de los juveniles infectivos y por ende su patogenicidad. Cinco juveniles infectivos son usados para infectar un insecto.

**INSTAR:** Forma adoptada por un insecto inmaduro entre las diferentes mudas.

**JUVENIL INFECTIVO:** También llamado “Juvenil dauer” o juvenil 3 (J3). Estado inmaduro de los nemátodos rhabditidos que permanecen dentro de la última muda y tienen la capacidad de infectar a sus huéspedes.

**NATIVO:** Originario de un país o región determinada; endémico; indígena.

**PATOGENICIDAD:** La calidad o estado de ser patógeno. La capacidad potencial de producir la enfermedad.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>I.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 DEL INSECTO: <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 GENERALIDADES Y POSICIÓN TAXONÓMICA DE <i>Aedes aegypti</i> .....	4
2.1.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE <i>Aedes aegypti</i> .....	5
2.1.3 IMPORTANCIA DE <i>Aedes aegypti</i> .....	7
2.1.4 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Aedes aegypti</i> .....	8
2.1.5. AGENTE ETIOLÓGICO QUE TRANSPORTA <i>Aedes aegypti</i> .....	11
<b>2.2 DEL NEMATODO: <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis sp.</i> .....</b>	<b>13</b>
2.2.1 GENERALIDADES Y POSICIÓN TAXONÓMICA.....	13
2.2.2 DISTRIBUCIÓN DEL GENERO <i>Heterorhabditis</i> .....	15
2.2.3 CICLO BIOLÓGICO DEL GENERO <i>Heterorhabditis</i> .....	16
2.2.4 COMPLEJO NEMATODO-BACTERIA .....	19
2.2.5 VENTAJAS DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS.....	21
2.2.6 ACCION DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS SOBRE LARVAS DE MOSQUITOS .....	22
<b>III.MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 LUGAR DE MUESTREO .....	26
3.2 POBLACION Y MUESTRA .....	28
3.3 MATERIALES.....	28
3.4 DISEÑO DEL PROCESO DE INVESTIGACIÓN.....	31
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS DE DATOS. ....	33
3.6 METODOS.....	34
3.6.1 MUESTREO DE CAMPO .....	34
3.6.2 LABORATORIO .....	35
3.6.2.1 CRIANZA DEL MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....	35
3.6.2.2 CRIANZA DE <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidóptero: Pyralidae) .....	39
3.6.2.3 MULTIPLICACION DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis sp.</i> .....	42

3.6.2.4 CUANTIFICACION DE NEMATODOS Y CONSERVACION.....	45
3.6.2.5 BIOENSAYOS .....	46
<b>IV.RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
4.1 Ensayo cinco en uno de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis sp.</i> ( <i>Nematoda: Heterorhabditidae</i> ) sobre larvas de <i>Aedes aegypti L.</i> ( <i>Diptera: Culicidae</i> ) en condiciones de laboratorio.....	53
4.2 Ensayo para establecer la Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) sobre larvas de <i>Aedes aegypti L.</i> ( <i>Diptera: Culicidae</i> ) en condiciones de laboratorio de la cepa de nematodo entomopatógeno que presente la mortalidad promedio mayor en el ensayo anterior. ....	57
<b>V.DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
5.1 Ensayo cinco en uno de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis sp.</i> ( <i>Nematoda: Heterorhabditidae</i> ) sobre larvas de <i>Aedes aegypti L.</i> ( <i>Diptera: Culicidae</i> ) en condiciones de laboratorio.....	64
5.2 Ensayo para establecer la Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) sobre larvas de <i>Aedes aegypti L.</i> ( <i>Diptera: Culicidae</i> ) en condiciones de laboratorio de la cepa de nematodo entomopatógeno que presente la mortalidad promedio mayor en el ensayo anterior. ....	66
<b>VI.CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>VII.RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>88</b>

## INDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica del mosquito vector <i>Aedes aegypti</i> .....	5
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación taxonómica de los nemátodos entomopatógenos.....	15
<b>Cuadro 3.</b> Cepas de nemátodos entomopatógenos que fueron utilizadas.....	42
<b>Cuadro 4.</b> Porcentajes de mortalidad de larvas de segundo estadio de <i>Aedes aegypti</i> inoculadas con JIs de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis</i> sp (Nativo) en el ensayo “cinco en uno” y prueba t de student.....	55
<b>Cuadro 5.</b> Aplicación de dos cepas de nemátodos entomopatógenos del ensayo “cinco en uno” en larvas de segundo estadio de <i>Aedes aegypti</i> .....	56
<b>Cuadro 6.</b> Análisis Probit de la mortalidad obtenida para la cepa <i>Heterorhabditis</i> sp (Nativo) sobre las larvas de segundo estadio de <i>Aedes aegypti</i> en los ensayos evaluados a las 72 horas.....	59

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de <i>Aedes aegypti</i> . Las líneas (color marrón) delimitan los paralelos de distribución.....	7
<b>Figura 2.</b> Ciclo Biológico del mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Ciclo Biológico de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Un juvenil infectivo (JI) de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , mostrando en su intestino a la bacteria simbiótica <i>Photorhabdus</i> sp etiquetada con proteína verde fluorescente.....	21
<b>Figura 5.</b> Ubicación geográfica de Motupe.....	27
<b>Figura 6.</b> Diseño del proceso de Investigación.....	32
<b>Figura 7.</b> Recolección de larvas de <i>Aedes</i> sp.....	35
<b>Figura 8.</b> Jaulas metálicas utilizadas para la crianza de <i>Aedes aegypti</i> .....	38
<b>Figura 9.</b> Materiales presentes en la jaula metálica.....	38
<b>Figura 10.</b> Alimentación de adultos hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	39
<b>Figura 11.</b> Crianza de <i>Galleria mellonella</i> .....	41
<b>Figura 12.</b> Modo de inoculación de los nematodos entomopatógenos sobre larvas de ultimo instar de <i>Galleria mellonella</i> .....	43
<b>Figura 13.</b> Diseño de Trampa White modificada.....	44
<b>Figura 14.</b> Nemátodos entomopatógenos del género <i>Heterorhabditis</i> en solución.....	46
<b>Figura 15.</b> Unidad experimental para el ensayo “cinco en uno” y placa DAS-ELISA de 24 celdas.....	48
<b>Figura 16.</b> Número de Unidades experimentales para realizar el ensayo “cinco en uno” de NEPs del género <i>Heterorhabditis</i> sobre larvas de segundo estadio de <i>Aedes aegypti</i> .....	49
<b>Figura 17.</b> Unidad experimental para determinar la $CL_{50}$ .....	51
<b>Figura 18.</b> Número de Unidades experimentales utilizadas para determinar la $CL_{50}$ y número de repeticiones por cada tratamiento.....	52
<b>Figura 19.</b> Larvas de <i>Aedes aegypti</i> del ensayo “cinco en uno”.....	53
<b>Figura 20.</b> Larvas de <i>Aedes aegypti</i> del ensayo para establecer la $CL_{50}$ .....	57

<b>Figura 21.</b> Concentración letal media (CL50) de Heterorhabditis sp (Nativo) sobre larvas de segundo estadio de Aedes aegypti. Evaluación a las 72 horas (Primer ensayo).Lambayeque-Perú.2014.....	61
<b>Figura 22.</b> Concentración letal media (CL50) de Heterorhabditis sp (Nativo) sobre larvas de segundo estadio de Aedes aegypti. Evaluación a las 72 horas (Segundo ensayo).....	62
<b>Figura 23.</b> Concentración letal media (CL50) de Heterorhabditis sp (Nativo) sobre larvas de segundo estadio de Aedes aegypti. Evaluación a las 72 horas (Tercer ensayo).....	63

## I. INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* (Linneo) es una de las principales especies de mosquito en el ecosistema urbano. Originario de África, se encuentra distribuido y adaptado a las regiones tropicales y subtropicales del mundo y tiene gran importancia desde el punto de vista médico-epidemiológico, por ser vector de los virus del dengue y de la fiebre amarilla (Varma, 1989) y también del virus chikungunya (Lahariya y Pradhan, 2006). Es una especie predominantemente urbana, aunque se encuentra también en zonas suburbanas y rurales. Se cría en recipientes artificiales y naturales localizados dentro o en los alrededores de las viviendas humanas, como son tambos, floreros, llantas, latas, botes, cubetas, agujeros en árboles o en hojas de plantas tropicales (Gómez & Ibáñez., 1994). Esta especie se caracteriza por su preferencia por climas cálidos (de 15 a 40 °C) y con niveles de precipitación pluvial moderados y altos, donde se generan condiciones ambientales favorables para su reproducción (Caballero et al., 2006).

El dengue es una infección viral sistémica transmitida entre humanos por mosquitos *Aedes*, debido principalmente al hábito hematofágico de las hembras (Simmons et al., 2012; Danis et al., 2002). Es la enfermedad metaxénica viral más importante en salud pública, causada por alguno de los cuatro serotipos (DEN-1, 2, 3 y 4) del virus dengue, un virus ARN de cadena positiva de la familia Flaviviridae, el cual produce un espectro de enfermedad que va desde una fiebre por dengue hasta el dengue hemorrágico / síndrome de choque (shock) por dengue, esta última una infección grave con anormalidad vascular y hemostática que puede llevar a la muerte (Gubler, 1998).

El dengue es la arbovirosis humana que causa mayor morbilidad, mortalidad y afectación económica a nivel mundial (Gluber & Clark, 1995). El dengue en los últimos años ha tenido un incremento significativo en el mundo, debido, entre otros, al deterioro de los programas de control del vector, al cambio climático y al aumento de la urbanización no planificada. Se estima que, aproximadamente, 3 billones de personas habitan en áreas tropicales del



mundo; la proyección anual de infecciones por dengue está entre 50 y 100 millones, con 24.000 muertes, aproximadamente, la mayoría en niños (*Shepard et al., 2011*).

Desafortunadamente, las opciones disponibles para la prevención y el control del dengue epidémico son poco favorables. En los últimos 30 años se ha dado demasiada confianza en el uso de insecticidas para el control de este insecto, subrayándose una eficacia baja y gran toxicidad al medio ambiente (*OMS, 2008*). Es más, uno de los principales obstáculos en la aplicación del control químico, lo constituye la resistencia que ha desarrollado este vector a una variedad cada vez más elevada de insecticidas orgánicos sintéticos; lo cual favorece la transmisión de la enfermedad y se transforma en una gran amenaza para la salud en el ámbito mundial (*OMS, 1986*).

Una de las opciones disponibles que está creciendo rápidamente como estrategia de lucha contra los vectores es el uso de agentes biológicos (*TDR, 1993*), y entre ellos tenemos a los nemátodos entomopatógenos (NEPs). A inicios de 1930 se inicia su investigación como agentes controladores de insectos, convirtiéndose en la última década en el área de la entomología con mayor dinámica e innovación en el control biológico (*Gaugler & Campbell, 1991*).

Entre estos nemátodos entomopatógenos los más importantes son las familias *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*. Las familias *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae* están asociados simbióticamente a las bacterias *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, respectivamente (*Boemare, 2002*). Estos nemátodos presentan un estado infectivo llamado tercer estado juvenil o juvenil infectivo (JI), este se introduce en el insecto por sus aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) (*Tanada y Kaya, 1993*) o a través de las partes suaves del integumento (*Peters y Ehlers, 1994*). Cuando el juvenil infectivo entra al hemocele del insecto libera la bacteria. La bacteria se multiplica rápidamente y mata al insecto por septicemia entre 24 y 48 horas (*Adams y Nguyen, 2002*). Los nemátodos se reproducen en el cadáver del insecto y se alimentan de la biomasa bacteriana y de los tejidos del insecto metabolizados por la bacteria (*Boemare, 2002*).

Esto ha despertado el interés mundial en los nemátodos heterorhabditidos y steinernematidos para ser desarrollados como biocontroladores de insectos plagas en diferentes cultivos de importancia económica, pero son escasos los estudios en donde se evalúe la posibilidad de estos nemátodos como controladores biológicos de vectores de enfermedades metaxénicas. Entre los primeros estudios que evaluaron la potencialidad de los nemátodos rhabditidos sobre mosquitos tenemos a *Bronskill (1962)*, *Welch y Bronskill (1962)*, *Daad (1971)* y *Poinar y Kaul (1982)*. En el Perú aún no se han reportado investigaciones para determinar la patogenicidad de NEPs sobre mosquitos, en especial sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Con relación a lo anterior se determinó la siguiente hipótesis: “Nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* (Nematoda: *Heterorhabditidae*) serían patógenos sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio”.

Para contrastar la hipótesis se planteó como objetivo principal de este trabajo de investigación “Determinar la patogenicidad de Nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio” para lo cual se plantearon como objetivos específicos los siguientes:

1. Realizar el ensayo cinco en uno de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio.
2. Establecer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio de la cepa de nemátodo entomopatógeno que presente la mortalidad promedio mayor en el ensayo anterior.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 DEL INSECTO: *Aedes aegypti*

#### 2.1.1 GENERALIDADES Y POSICIÓN TAXONÓMICA DE *Aedes aegypti*

Tradicionalmente al mosquito *Aedes aegypti* se le ha conocido como el "mosquito de la fiebre amarilla", que durante siglos fue una enfermedad grave en los trópicos de América y África, llegó a extenderse durante los veranos hasta áreas templadas, causando epidemias con alta mortalidad en puertos y poblados cercanos. Actualmente la importancia de *Aedes aegypti* radica en que es el vector del dengue, enfermedad que ha estado presente durante siglos (Thirión, 2003).

La familia en la que se encuentra este mosquito es la *Culicidae*, en donde también se encuentran los géneros *Culex* y *Anopheles*; pertenecen al suborden Nematocera, Orden Diptera. Conocer su posición taxonómica es de mucha importancia (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica del mosquito vector *Aedes aegypti* (Garza, 2010)**

Súper Reino: Eukariota
Reino: Metazoa
Phyllum: Artropoda
Superclase: Hexápoda
Clase: Insecta
Subclase: Neoptera
Infraclase: Endopterygota
Orden: Diptera
Suborden: Nematocera
Infraorden: Culicimorpha
Superfamilia: Culicoidea
Familia: Culicidae
Subfamilia: Culicinae
Tribu: Culicini
Género: <i>Aedes</i>
Subgénero: <i>Stegomyia</i>
Especie: <i>Aedes aegypti</i>

### **2.1.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE *Aedes aegypti***

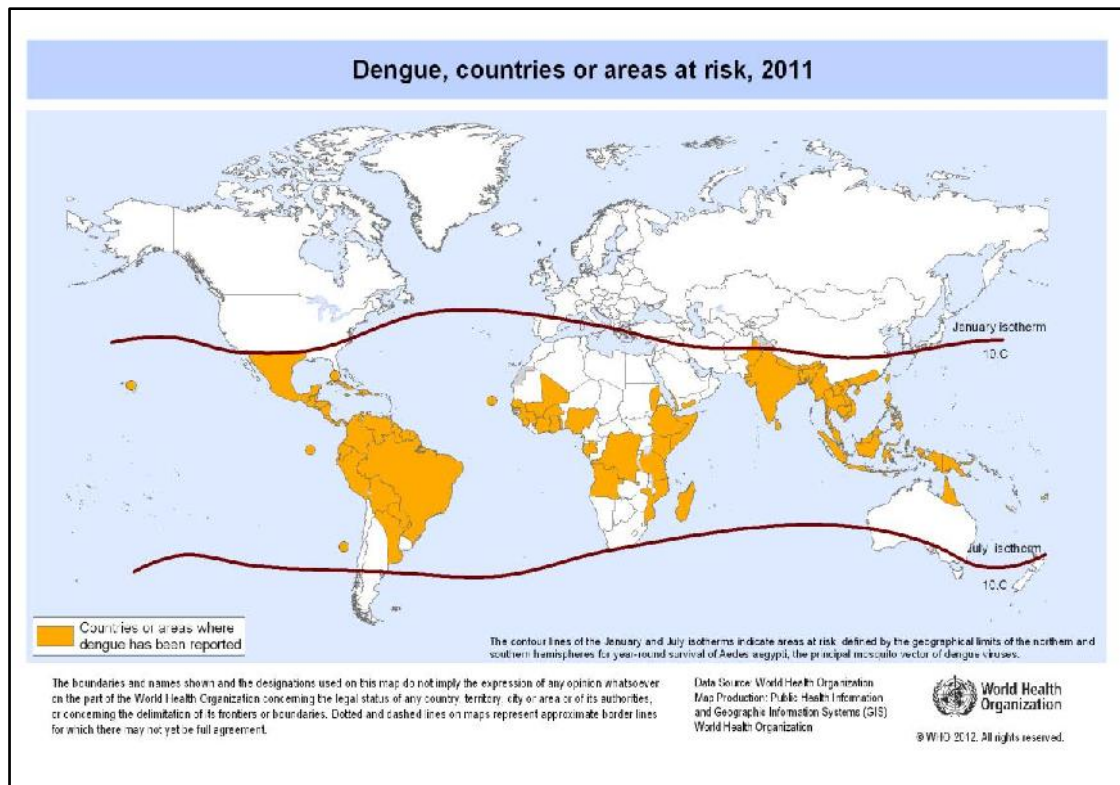
La especie *Aedes aegypti* probablemente es originaria de Etiopía. En el Continente Africano existen tres formas. Una es la forma típica, otra *Aedes aegypti queenslandensis* y *Aedes aegypti formosus*, este último es un mosquito selvático de color más oscuro y talla pequeña. Únicamente las dos primeras formas se encuentran en el Continente Americano, muy probablemente fueron introducidas las formas inmaduras en los barriles de agua de los barcos durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas (Nelson, 1986; Oldstone, 2002); les tomó décadas adecuarse y dispersarse por el Caribe y establecerse en el Continente, lográndolo debido a que el tránsito marítimo se intensificó en esta región, desde ese entonces (Gómez & Rodríguez, 1994).

*Aedes aegypti* fue introducido en América durante los tiempos de la colonización europea, motivando reiteradas epidemias de fiebre amarilla urbana, que ya se registraban previamente, de forma focal, en la América precolombina mediante otros mosquitos vectores autóctonos y en diversas áreas del continente (OPS, 1995).

*Aedes aegypti* es una especie de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, limitada por las latitudes 35° Norte y 35° Sur, correspondiente a una isotérmica de verano de 10 °C . Otra limitante es la altitud, se ha registrado a 2,200 metros sobre el nivel del mar en Colombia, donde la temperatura media anual es de 17 °C, más allá del Ecuador rara vez se encuentra por arriba de los 1,000 metros de altura (Nelson, 1986) (Figura 1).

Con excepción de Canadá y de áreas donde la altitud, temperatura u otras condiciones climáticas han impedido su colonización, *Aedes aegypti* infesta o ha infestado todos los países del continente (Marquetti & Bisset, 2008).

El *Aedes aegypti*, se encuentra distribuido en las principales ciudades de la Amazonía y la costa norte del Perú, desde Tumbes hasta Lima (Leiva & Cáceres, 2004).



**Figura 1. Distribución geográfica de *Aedes aegypti*. Las líneas (color marrón) delimitan los paralelos de distribución (OMS, 2012).**

### **2.1.3 IMPORTANCIA DE *Aedes aegypti***

*Aedes aegypti*, es un díptero probablemente de origen Africano, y que actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo, principalmente en regiones tropicales, donde el mosquito está presente todo el año, aunque en época seca disminuyen las poblaciones y desaparecen en las regiones templadas (Chaverri, 2001; Fernández, 2009).

La eficiencia de *Aedes aegypti* como vector del dengue se debe a su alta susceptibilidad al virus, y a sus rasgos específicos en sus patrones de alimentación y comportamiento que son heredados y la preferencia para obtener sangre como alimento de los huéspedes humanos (antropofilia-antropofagia) y su hábitat preferencial dentro de las casas (endofilia). El horario de actividad de picadura y la capacidad de picar a varias personas, entra a etapa de viremia, con la capacidad de infectar al momento de alimentarse. La

hembra permanece infectada de por vida. El comportamiento anterior permite el incremento de riesgo de transmisión del virus del dengue (Gubler, 1998).

#### **2.1.4 CICLO BIOLÓGICO DE *Aedes aegypti***

El ciclo biológico de los mosquitos, presenta cuatro fases y se incluye en el grupo de los holometábolos (metamorfosis completa), es decir; pasan por los estados huevo, larva, pupa y adulto (Brewer *et al.*, 1987)

Estos mosquitos tienen dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fases acuática y aérea. Durante la fase acuática o de estadios inmaduros, existen tres formas evolutivas diferentes: huevo, larva y pupa. A la fase aérea o de adulto corresponde el mosquito adulto o Imago que vuela (Trpis, 1977):

##### **a) Fase acuática:**

Esta etapa está representada por las formas evolutivas de huevo, larva y pupa.

**Huevos:** Mide aproximadamente 1 mm, es ovalado, blanco y luego se torna a negro al desarrollar el embrión. Es depositado individualmente en diferentes recipientes por encima del nivel del agua. El ciclo desde la postura a la eclosión en condiciones óptimas de humedad y temperatura dura 48 horas, pero puede prolongarse hasta cinco días. La hembra puede ovipositar de 100-200 huevos por postura, pudiendo resistir las sequías hasta un año (Balta, 1997). Su forma es ovoide, alargada como un bastón y su apariencia ligeramente afelpada es debida a sus formaciones reticulares geométricas (CRAT, 1970). La fecundación ocurre al momento de la postura del huevo, debido a que los espermatozoides en la hembra se almacenan inmediatamente después de ocurrir la cópula en una estructura denominada espermateca, el óvulo al pasar por el oviducto al nivel de esta estructura se fusiona con un espermatozoide iniciando el desarrollo embrionario que transcurre en alrededor de 48 horas si el ambiente es húmedo y cálido, si la temperatura es baja se prolonga hasta por cinco días (Nelson, 1986).

Generalmente, después de cada alimentación sanguínea se desarrolla un lote de huevos. Sin embargo, este mosquito con frecuencia se alimenta con sangre más de una vez entre cada postura, especialmente si es perturbado antes de estar completamente lleno de sangre. Las alimentaciones escasas producen menos huevos por lote y una alimentación muy reducida no las produce. Por otra parte se ha demostrado que *Aedes aegypti* presenta la habilidad de incrementar o disminuir la duración de la alimentación requerida lo cual viene aparejado con interferencia fisiológica durante el proceso de la alimentación y consecuentemente aumenta su eficiencia vectorial (*Chadee et al., 2002*).

**Larva:** Las larvas y pupas de *Aedes aegypti* son acuáticas, y como en la mayoría de los insectos holometábolos (con metamorfosis completa), los estadios larvales son el período de crecimiento y desarrollo. Las larvas se alimentan prácticamente durante todo el día de cualquier materia orgánica acumulada en las paredes y en el fondo del recipiente, utilizan sus sedas bucales que tienen forma de abanico (*Nelson, 1986*).

Tiene cuatro estadios o fases evolutivas inmaduras. Entre cada estadio las larvas tienen una ecdisis en la cual se desprende el exoesqueleto o exuvia cada vez (*Méndez & Montesano, 1994*). Se divide en cabeza, tórax y nueve segmentos abdominales; el segmento posterior y anal tienen cuatro branquias lobuladas; un sifón respiratorio corto por el cual respira y se mantiene en la superficie casi vertical. Poseen cuatro espinas torácicas, dos a cada lado. El octavo segmento con una hilera de siete a doce dientes formando el peine y sifón con el pecten. Tiene un movimiento serpenteante y fotofobia. La fase completa demora entre ocho a doce días (*Balta, 1997*).

La duración del desarrollo larval está en función de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el criadero. En condiciones óptimas, el período larval desde la eclosión hasta la pupación puede ser de cinco días, pero por lo regular ocurre de siete a catorce días. Los primeros tres estadios se desarrollan rápidamente, el cuarto se toma más tiempo aumentando considerablemente su tamaño y peso, en condiciones de baja temperatura o escasez de alimento el cuarto estadio puede prolongarse



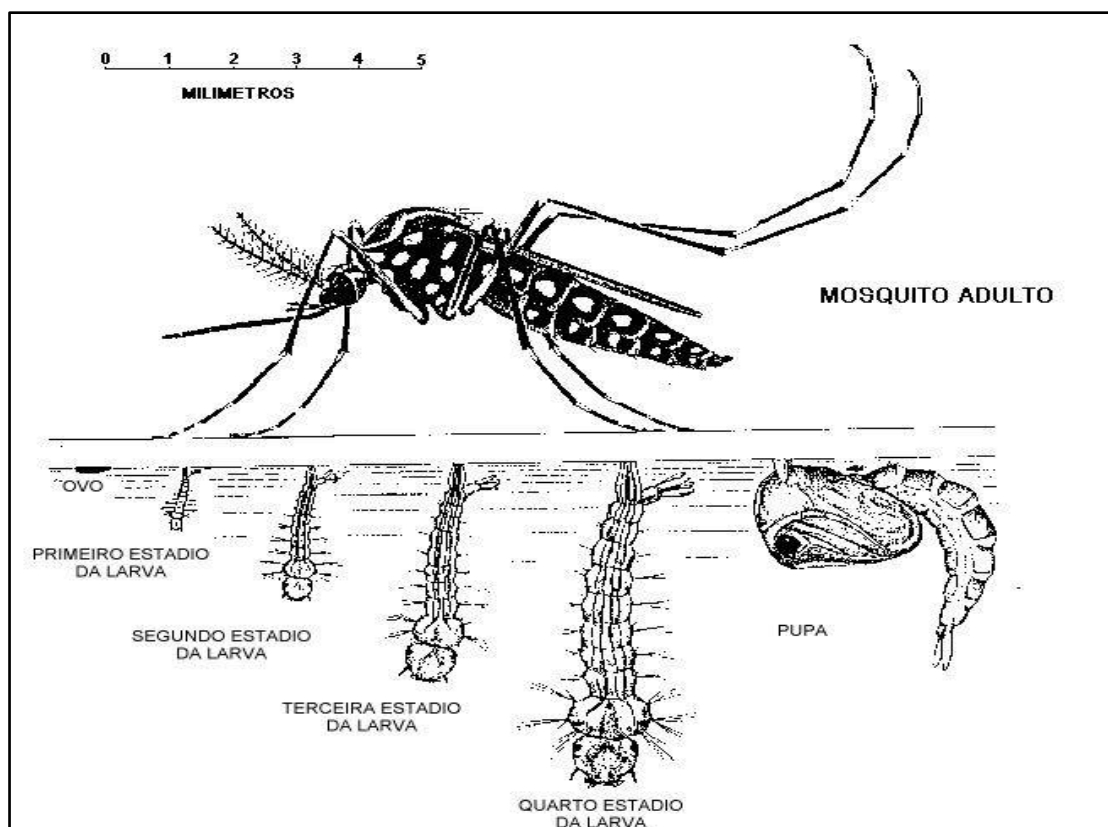
por varias semanas. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan más rápido que las hembras (Nelson, 1986).

**Pupa:** La larva de estadio cuarto se transforma en pupa, última fase evolutiva acuática, que se caracteriza por tener una forma de coma, está envuelta en un exoesqueleto queratinoso impermeable y corresponde a la maduración del nuevo adulto (CRAT, 1970). Las pupas no se alimentan. Su función es la metamorfosis del estadio larval al adulto. Las pupas de los mosquitos son diferentes a las de otros insectos holometábolos por presentar reacciones inmediatas a estímulos externos tales como vibraciones y cambios en la intensidad de la luz, desplazándose activamente por todo el criadero. Cuando están inactivas flotan en la superficie, esta propiedad facilita la emergencia del adulto. El estadio de pupa dura aproximadamente dos o tres días, emergiendo alrededor del 88% de los adultos en cuestión de 48 horas (Méndez et al., 1996).

#### **b) Fase Aérea:**

**Adulto:** *Aedes aegypti* es un mosquito negro con manchas de color plateado en diversas partes del cuerpo que en su conjunto dan la apariencia de una lira en la parte del mesonoto. La cabeza presenta mechones de escamas plateadas en los ápices de los palpos. Las hembras presentan antenas con pelos cortos y escasos (Méndez & Montesano, 1994). La función más importante del adulto de *Aedes aegypti* es la reproducción. En la mayoría de los insectos voladores, inclusive otras especies de mosquitos, el adulto también hace la labor de dispersión de la especie. Sin embargo, para *Aedes aegypti* el transporte pasivo de huevos y larvas en recipientes ha tenido mayor trascendencia en su distribución (Nelson, 1986).

Las hembras hematófagas poseen hábitos de alimentación diurnos, en cercanía a los domicilios humanos, con gran afinidad a la alimentación sobre el hombre. Estudios realizados en Tucson Arizona mostraron en el análisis de la sangre del estómago de hembras que un 80% de las mismas se alimentaron sobre humanos (Hoeck et al., 2003).



**Figura 2. Ciclo Biológico del mosquito *Aedes aegypti*.** Se muestran el desarrollo desde huevo (ovo) hasta mosquito adulto. La larva pasa por cuatro estadios larvarios: Primer estadio larvario (larva de primer instar), segundo estadio larvario (larva de segundo instar), tercer estadio larvario (larva de tercer instar) y cuarto larvario (larva de cuarto instar). La pupa tiene forma de coma. (<http://hospitalcubara.gov.co/wp-content/uploads/2013/02/ciclo-devidamosquito-aedes-aegypti.jpg>)

#### **2.1.5. AGENTE ETIOLÓGICO QUE TRANSPORTA *Aedes aegypti***

El virus del dengue es un arbovirus (“arbo” acrónimo del inglés artrópodo-borne, transportado por artrópodos) y pertenece al género de *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, un grupo de más de 68 agentes virales agrupados por su relación serológica y por la determinación de secuencias genómicas; al menos 30 de estos virus causan enfermedades en humanos (*Calisher et al., 1989; Lewis et al., 1993*). Esta familia está representada por tres géneros: *Flavivirus* (It flavus, amarillo), *Pestivirus* (It pestis, peste, plaga) y *virus hepatitis C* (gr Hepato, hígado; también conocidos como Hepatacivirus) (*Rice, 1996*).

Existen 4 serotipos diferentes, conocidos como Dengue 1, 2, 3, 4 (DENV-1 a DENV-4), que son transmitidos al humano principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. Estudios recientes indican que el DENV surgió hace aproximadamente 1000 años a partir de un virus de mono y que su transmisión al hombre ocurrió en el transcurso de los últimos 300 años (*Weaver y Barret, 2004; Wang et al., 2007*).

Los virus ARN se replican con una elevada tasa de error, debido a la ausencia de actividad correctora de errores de su ARN polimerasa, y se organizan a poblaciones de muy alta diversidad genética denominadas cuasiespecies, es decir como una nube de mutantes fuertemente relacionados genéticamente (*Domingo, 2002; Wang et al., 2002*).

Estas características les confieren a los virus de ARN una gran capacidad de adaptación a los cambios en las presiones selectivas. Además se ha comprobado la recombinación entre cepas de DENV, posiblemente debido a la circulación simultánea de genotipos diferentes de un serotipo en un mismo hospedero, lo que también es un importante mecanismo de generación de diversidad genética, pudiendo ocasionar la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, mayor capacidad de transmisión o más virulentas (*Twiddy & Holmes, 2003*).

La infección de una persona con uno de los cuatro serotipos confiere inmunidad contra ese serotipo y por corto tiempo contra los otros 3 serotipos. Infecciones secuenciales pueden predisponer el desarrollo del dengue severo (*Anderson y Rico, 2006*). Los cuatro serotipos del virus se han asociado con el Dengue Hemorrágico, sin embargo la severidad de la enfermedad varía dependiendo de la cepa y el serotipo (*Gibbons y Vaughan, 2002*).

## **2.2 DEL NEMÁTODO: *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp.**

### **2.2.1 GENERALIDADES Y POSICIÓN TAXONÓMICA**

El *Phylum Nematoda*, es luego de los *Artropoda* uno de los más diversos del Reino Animal. Se encuentran en ambientes tan contrastes y hostiles, como tundras y desiertos, desde aguas congeladas a aguas termales, ambientes marinos y de agua dulce, entre otros. Esta amplia diversidad de hábitat, permite relacionarse con otros organismos como los insectos, generándose interacciones que van desde asociaciones fortuitas o foréticas, hasta parasitismos tanto facultativos como obligatorios (*Kaya et al., 1993; Tanada y Kaya, 1993*).

Los nemátodos son gusanos cilíndricos no segmentados, que poseen una cutícula exterior acelular bajo la cual se encuentra la epidermis seguida por las fibras musculares longitudinales, carecen de peritoneo, razón por la cual se incluyen dentro de los pseudocelomados. Tienen sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, pero sin sistema circulatorio y respiratorio (*Kaya & Stock, 1997*).

El primer nemátodo parásito de insectos fue aislado en Alemania en el año 1923 y descrito por Gotthold Steiner como *Aplectana kraussei*. En 1927 Travassos erige el género *Steinernema* y renombra dicha especie como *S. kraussei*, denominación que se mantiene en la actualidad (*Sánchez, 2002*).

La importancia de los nemátodos como parásitos de insectos y el papel que juegan en la regulación natural se conoce desde hace muchos años. Un total de 19 familias fueron reportadas con algunos miembros que son parásitos facultativos u obligados de insectos, tales como: Allantonematidae, Diplogasteridae, Heterorhabditidae, Mermithidae, Neothylenchiae, Rhabdithidae, Sphaerularidae, Steinernematidae y Tetradonematidae e incluyen especies que atacan a insectos matando, esterilizando o alterando el desarrollo del huésped (*Poinar, 1979*).

De todos los nemátodos conocidos como biorreguladores de insectos, los nemátodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* Chitwood y *Chitwood, 1937* y *Heterorhabditidae* Poinar, 1976 constituyen los de mayor relevancia (Sánchez, 2002). Los representantes de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, conocidos como NEPs, están asociados simbióticamente con bacterias patógenas de insectos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, así tenemos que *Heterorhabditis* está asociado con bacterias del género *Photorhabdus* y *Steinernema* con *Xenorhabdus* (Boemare, 2002; Montesinos, 2003).

En lo que concierne a la familia *Heterorhabditidae* también comprende parásitos obligados de muchos grupos diferentes de insectos, en los que provocan coloraciones rojas, pardas, púrpura anaranjado y algunas veces marrón, con luminiscencia en la oscuridad. Los juveniles infectivos presentan el poro excretor posterior al anillo nervioso y una estructura esclerosada en forma de diente en la región cefálica. Los machos poseen bursa y nueve pares de papilas genitales (Kaya y Stock, 1997).

Los nemátodos entomopatógenos más usados en control biológico pertenecen al orden Rhabditida, clase Secernentea. Es de mucha importancia conocer su posición taxonómica, ya que nos permite saber que características comparte o no con otros grupos de nemátodos. Además, cada vez se están aislando más nemátodos entomopatógenos en diversas partes del mundo (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica de los nemátodos entomopatógenos (Adams et al., 2006)**

<b>Reino: Animal</b>	
Phylum: Nematoda	
Clase: Secernentea	
Orden: Rhabditida	
Suborden: Rhabditina	
Superfamilia: Rhabditoidea	
<b>Familia: Heterorhabditidae</b>	<b>Familia: Steinernematidae</b>
Género: Heterorhabditis	Género: Steinernema
Especies:	Especies:
H.bacteriophora Poinar, 1975	S.anomali Kozodoi, 1984
H.brevicaudis Kaya et al., 1993	S. carpocapsae Weiser, 1955
H.baujardi Phan et al., 2003	S.feltiae Filipjep, 1934
H.downesi Stock et al., 2002	S. glaseri Steiner, 1929
H.indicus Poinar et al., 1992	S.kraussei Steiner, 1923
Sinónimo H.hawaiiensis Gardner et al., 1994	S.kushidai Mamiya, 1988
H.marelatus Liu and Berry, 1996	S.scapterisci Nguyen y Smart, 1990
H.megidis Poinar et al., 1987	etc.
H.mexicana Nguyen et al., 2004	
H.zealandica Wouts, 1979	
H.taysearae Shamseldean et al., 1996	

### 2.2.2 DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO *Heterorhabditis*

El género *Heterorhabditis* fue establecido por Poinar (1976) con *Heterorhabditis bacteriophora* como especie tipo (Hominick et al., 1997), la que también es la más ampliamente distribuida, encontrándose en Norte y Sur América (Stock et al., 1999; Poinar, 1990; Stock, 1993), Sureste de Europa (Smits et al., 1991; De Doucet y Gabarra, 1994), Australia (Poinar, 1990), y Asia (Li y Wang, 1989; Hominick, 2002; Saeb, 2006).

### 2.2.3 CICLO BIOLÓGICO DEL GÉNERO *Heterorhabditis*

El ciclo de vida de los nemátodos es simple; consta de huevo, cuatro estados juveniles, separados por mudas, y adulto (*Woodring & Kaya 1998*).

Tanto *Steinernema* como *Heterorhabditis* pasan por cuatro estadios juveniles, siendo el tercero o dauer, el único capaz de sobrevivir fuera del hospedante y moverse de un insecto a otro (*Poinar, 1990*); por lo tanto, el tercer estado juvenil (J3 o JI) es la única forma de vida libre. En esta etapa el nemátodo obtiene el 60% del total de su energía de los lípidos metabolizados (*Hatab y Gaugler, 1997*) y su cuerpo está protegido por la cutícula de la anterior etapa (Juvenil 2), brindándole resistencia a las condiciones del medio ambiente a las que se ve expuesto al salir en busca de un nuevo hospedero (*Woodring & Kaya, 1998*). El juvenil de tercer estadio es el único que conduce su bacteria simbiote (*Akhurst, 1983*). Los juveniles infectivos detectan las huellas químicas de los hospederos principales mediante anfidas (*Gaugler et al., 1980*)

Los juveniles infestivos del tercer estadio acarrean las células de su bacteria simbiote en el tracto alimentario, las que se localizan en una porción ventricular modificada del intestino en *Steinernema*, mientras que en *Heterorhabditis* también pueden encontrarse en el lumen intestinal y esporádicamente en el lumen faringeal (*Poinar, 1990*). Los nemátodos penetran en el huésped por las aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) y en el caso de *Heterorhabditis* también pueden penetrar directamente a través del tegumento intersegmental (*Beeding y Molyneux, 1982*). Estas formas llegan hasta el hemocelo y liberan las células bacterianas (*Kaya & Koppenhöfer, 1999*). La bacteria provoca la muerte del insecto por septicemia en las primeras 48-72 horas y propicia que el juvenil infectivo comience a alimentarse de los tejidos desintegrados por la acción de la bacteria. Se desarrolla y da lugar a una hembra hermafrodita (*Grewal y Georgis, 1999*).

Este adulto hermafrodita deposita alrededor de 300 huevos, los cuales eclosionan dando lugar al primer estado juvenil que atraviesa por otros dos estados juveniles adicionales y eventualmente se desarrollan como hembras o machos (*Peteira et al., 2008*).

Unas 2 o 3 generaciones de nemátodos son completadas dentro del cadáver del insecto. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables o la fuente de nutrientes es escasa, el primer estado juvenil se convierte en juveniles, los cuales abandonan el cadáver del insecto en busca de un nuevo hospedante para repetir su ciclo de vida (*Grewal y Georgis, 1999; Johnigk y Ehlers, 1999*) (Figura 3).



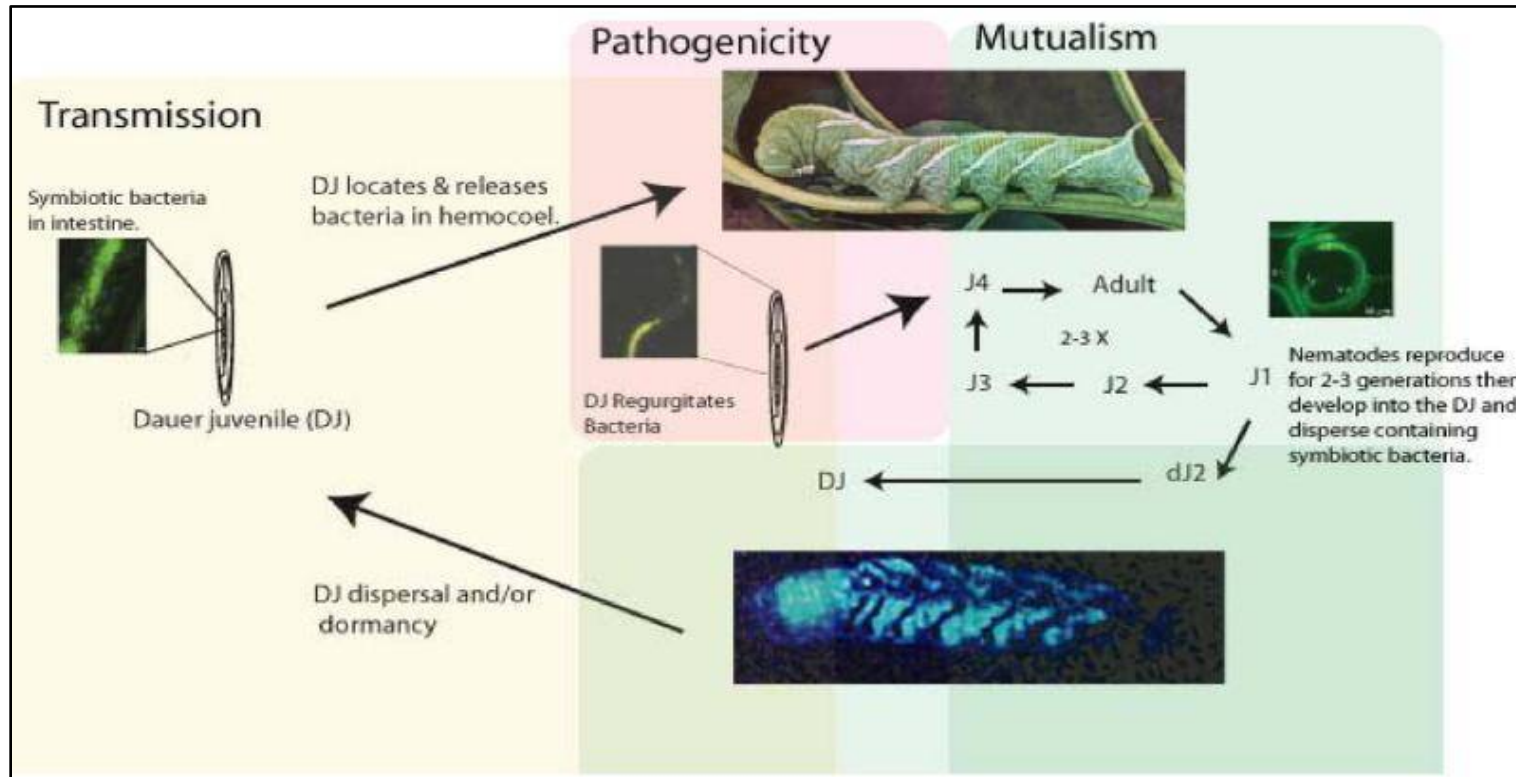


Figura 3. Ciclo Biológico de *Heterorhabditis bacteriophora*. En la etapa de juveniles infectivos (JIs) no se alimentan, en este estado también conocido como juvenil dauer (DJ) es cuando infecta insectos. El JI contiene un monocultivo de bacterias simbióticas en su lumen intestinal. Los JIs(o JDs) localizan a un insecto hospedero y penetran en su hemocoele, donde regurgitan a las bacterias simbióticas. Estas bacterias rápidamente matan al insecto y producen metabolitos para inhibir a sus competidores. Después de 2-3 generaciones los JIs(o DJs) se forman de nuevo y emergen en masa del hospedero, transmitiendo a las bacterias simbióticas (Ciche, 2007).

#### 2.2.4 COMPLEJO NEMÁTODO-BACTERIA

La interrelación entre el nemátodo y la bacteria se considera simbiótica porque el nemátodo no se puede reproducir dentro del hospedante sin la acción de la bacteria y ésta no puede penetrar a la hemolinfa del insecto para reproducirse y causar la infección si el nemátodo no la transporta (*Kondo e Ishibashi, 1991; Georgis, 1992*) y además se ha demostrado que no es patógena cuando se ingiere directamente (*Poinar y Thomas, 1967; Milstead, 1979*).

Las bacterias asociadas no forman esporas y por tanto no poseen un estado resistente al ambiente. Esto lo confirma el hecho de que nunca han sido encontradas en ningún otro lugar a excepción del interior de los nemátodos o dentro de los insectos afectados (*Akhurst y Boemare, 1990; Poinar, 1990*) siendo incapaz de sobrevivir en el agua o el suelo (*Poinar, 1979*). En la simbiosis, el nemátodo posibilita la protección a la bacteria no solo ambiental sino que incluso, es capaz de destruir el sistema inmune del insecto con la producción de toxinas extracelulares garantizando de esta forma el desarrollo bacteriano (*Akhurst y Boemare, 1990*), además las bacterias se propagan y matan al hospedero en 48 horas por septicemia letal estableciendo condiciones favorables para el desarrollo de los nemátodos (*Akhurst, 1982*) al producir antibióticos que previenen e inhiben el crecimiento de muchas especies de bacterias y levaduras en el cadáver (*Poinar y Himsworth, 1967*); también se menciona que, aunque la bacteria es la responsable de la muerte de la mayoría de los insectos plaga, el nemátodo también produce una toxina letal para el insecto (*Smart, 1995*).

Todas las especies de *Steinernema* están relacionadas con especies de *Xenorhabdus* *Thomas y Poinar, 1979* y las de *Heterorhabditis* con *Photorhabdus* *Boemare, Akhurst, Mourant, 1993 (Boemare et al., 1993)*. Estas bacterias están estrechamente relacionadas y presentan las siguientes características comunes: son bacterias que pertenecen a la Familia Enterobacteriaceae, las cuales son gram-negativas, bacilos grandes y móviles, peritricas y anaeróbicas facultativas. La mayoría de las cepas producen colonias pigmentadas de color rojo, rosa o amarillas. Ambas son patógenas de

insectos, se encuentran en el lumen del intestino de los nemátodos entomopatógenos y de los insectos infectados, pero también hay características que las diferencian: *Photorhabdus* es luminiscente y *Xenorhabdus* no. Esto indica que los cultivos in vitro de *Photorhabdus* resplandecen y los cadáveres infectados pueden ser detectados en la oscuridad, además *Xenorhabdus* presenta una catalasa negativa mientras que en *Photorhabdus* es positiva (Thomas y Poinar 1979).

Ambos organismos (bacteria y nemátodo), actúan juntos para ocasionar la muerte del insecto plaga (Fisher-Le Saux et al., 1998) y se ha planteado que la patogenicidad del complejo nemátodo-bacteria depende de la patogenicidad de la cepa bacteriana, del aislado de nemátodo y de la interacción entre ambas (Gerritsen et al., 1998).

El juvenil infectivo ingresa al hospedero por aberturas naturales (boca, espiráculos, ano) o adelgazadas áreas de la cutícula del hospedero (común solo en heterorhabditidos) (Kaya y Gaugler, 1993). El juvenil infectivo entonces libera la bacteria por el ano para los steinernematidos o por la boca para los heterorhabditidos (Ciche y Ensign, 2003). Una vez liberada la bacteria en la hemolinfa desarrolla su metabolismo secundario en los tejidos, produciendo complejos de toxinas; los cuales son capaces de matar al hospedero en períodos de 48 horas (Bedding y Molineaux, 1982).

*Photorhabdus luminiscens* produce diversas toxinas que generan complejos (Proteínas Tc), la actividad biológica se encuentra en los componentes TccC3 y TccC5. La TccC3 modifica la proteína de citoesqueleto actina (ADP-Ribosylation) y la TccC5 actúa sobre las proteínas RhoA de las células de las larvas de insectos. Otra proteína, la TcA, forma poros en las células del huésped, por lo que son necesarias para que las toxinas TccC3 y TccC5 puedan entrar en las células del insecto (Lang et al., 2010).

Los nemátodos se reproducen en el cadáver, alimentándose de la biomasa producida por la bacteria y de los tejidos del insecto que ha metabolizado la bacteria. Cuando los juveniles infectivos escapan del cadáver del insecto, portan ya las células de la bacteria en su interior, asegurando la

persistencia de la asociación simbiótica entre ambos organismos a través de generaciones (*Fisher-Le saux et al., 1998*).

Esta combinación nemátodo-bacteria constituye un eficiente sistema en la muerte de los insectos y representa uno de los agentes de control biológico más usados en la actualidad (*Peteira et al., 2008*) (Figura 4).

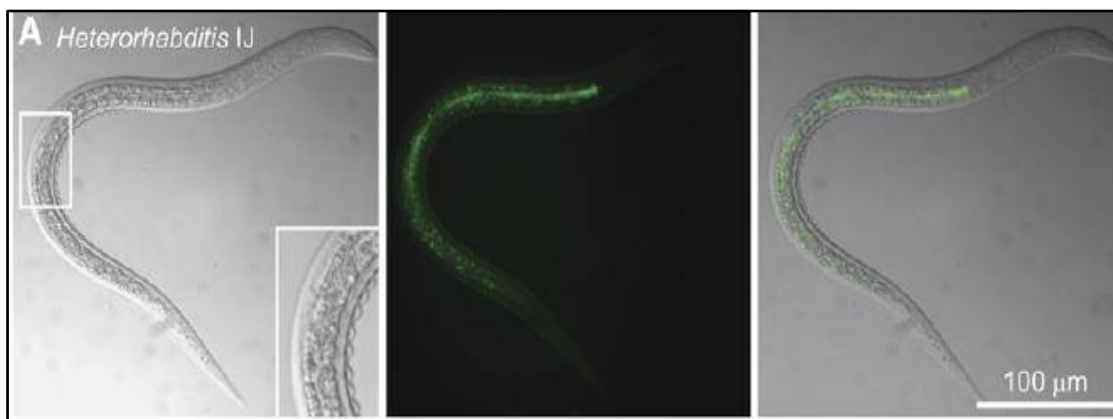


Figura 4. Un juvenil infectivo (JI) de *Heterorhabditis bacteriophora*, mostrando en su intestino a la bacteria simbiótica *Photorhabdus sp* etiquetada con proteína verde fluorescente (GFP, puntos de color verde). Izquierda, imagen Nomarski (cuadro blanco indica región ampliada en el recuadro); centro, imagen de epifluorescencia; derecha, superposición (*Hallem et al., 2007*).

## 2.2.5 VENTAJAS DE LOS NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS

Los nemátodos de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, poseen los atributos de un agente de control biológico “ideal” (*Timper et al., 1988; Kaya y Gaugler, 1993; Kaya, 1993*), teniendo en cuenta que no afectan adversamente a los animales, organismos no objetivos, plantas y tampoco contaminan el ambiente (*Poinar, 1979; Georgis, 1992; Kaya y Gaugler, 1993*).

Por su distribución geográfica, *Heterorhabditis* es ubicuo y sus especies se encuentran presentes en todo el mundo (*Adams et al., 1998; Hominick, 2002; Stock et al., 2002; Stock y Hunt, 2005*). Por el rango de hospederos, atacan a varias especies de ordenes Thysanura, Coleoptera, Lepidóptera,

Orthoptera y Diptera (Gaugler y Kaya, 1990; Kaya, 1990; Georgis, 1992); además, sólo en América alrededor de 100 especies de 11 órdenes de insectos son susceptibles a estos nemátodos (Poinar, 1979; Wassink y Poinar, 1984). Las larvas del tercer estadio o juvenil infectivo constituyen una forma especializada para sobrevivir, dispersarse e invadir al hospedero (Kaya y Gaugler, 1993). Estos nemátodos pueden ser producidos en masa, aplicados con un equipo convencional, y son también compatibles con el uso de insecticidas químicos (Grewal et al., 2001).

Además las ventajas que presentan para realizar en ellos mejoramiento genético que les permita aumentar su persistencia hacia la desecación, a la radiación ultravioleta y su virulencia, también por el corto periodo de sus generaciones, su facilidad de manejo y cultivo (Gaugler, 1987; Gaugler et al., 1989; Gaugler et al., 1992a; Gaugler, 1993; Gaugler et al., 1994).

#### **2.2.6 ACCION DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LARVAS DE MOSQUITOS**

La lucha antivectorial puede ser una herramienta poderosa para controlar las enfermedades transmitidas por vectores, que constituyen una de las principales causas de mortalidad en los países en vías de desarrollo (Dobrokhotoy, 1991) y una de las alternativas serían los nemátodos entomopatógenos.

Para estudiar la acción de los nemátodos entomopatógenos sobre los mosquitos vectores de enfermedades metaxénicas se han utilizado diferentes términos como son parasitismo, patogenicidad, virulencia, mortalidad, eficacia, infectividad, capacidad, entre otros. En este estudio se optó por utilizar el término patogenicidad de acuerdo a *Steinhaus y Martignoni (1970)* quienes la definen como: “La calidad o estado de ser patógeno. La capacidad potencial de producir la enfermedad”

Uno de los primeros estudios fue el de *Bronskill (1962)* quien reportó que los juveniles infectivos del *rhabditido DD136* penetraron en las larvas de segundo y tercer estadio de *Aedes aegypti*, donde completaron su desarrollo.

Además *Welch y Bronskill (1962)* mencionan que cuando pocos nemátodos estaban presentes en el interior del huésped, la mayoría fueron encapsulados; pero cuando muchos estaban presentes, pocos fueron encapsulados; la reacción del huésped inactiva el nemátodo pero el nemátodo y sus bacterias tienen un uso potencial como agentes de control biológico.

*Dadd (1971)* observó que los juveniles infectivos del nemátodo patógeno *Neoaplectana carpocapsae* fueron fácilmente ingeridos por las larvas de cuarto estadio del mosquito *Culex pipiens*, pero fueron ingeridas relativamente mal por las larvas de tercer estadio y fueron excluidos por larvas de segundo y primer estadio.

*Poinar y Kaul (1982)* probaron varias concentraciones del nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre el segundo, tercer y cuarto estadio larvario del mosquito *Culex pipiens*. Los nemátodos entraron en el hemocèle y se alcanzó 100% de mortalidad de las larvas de tercer y cuarto estadio con concentraciones entre 170 a 200 nemátodos por hospedero.

*Molta y Hominick (1989)* realizaron un ensayo dosis-respuesta de *Heterorhabditis heliothidis* y *Steinernema feltiae* sobre larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*. Ellos encontraron que en ambos nemátodos la mortalidad de las larvas mostró una correlación lineal positiva con la dosis de nemátodos y el tiempo de la exposición. Concluyeron que la  $DL_{50}$  para *Steinernema feltiae* fue 141 Jls/larva y para *Heterorhabditis heliothidis* fue 126 Jls/larva.

En Tailandia, se estudió la Eficacia de Nemátodos entomopatógenos (Nematoda: Rhabditida) sobre larvas de *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae). Los resultados indicaron que las tasas de mortalidad en los instares 3<sup>er</sup>o y 4<sup>to</sup> de larvas de *Culex gelidus* causados por *Sterinernema carpocapsae* (Weiser) fueron mayores que *Heterorhabditis indica* (aislado Local Thai) con 63% y 13%, respectivamente. También reportaron que *Steinernema carpocapsae* (Weiser) mata más del 50%(53% y 63%) con dosis de 2000 y 4000 Jls por larva; en

cambio *Heterorhabditis indica* (aislado Local Thai) con la dosis de 2000 y 4000 Jls por larva solo llega a 8% y 13% respectivamente. (Maharmart., 2008).

En Córdoba (Argentina), se ha probado la capacidad para parasitar de *Steinernema rarum* (aislado OLI) sobre larvas de *Culex apicinus Philippi*, las cuales fueron expuestas a seis dosis (1:1, 5:1, 10:1, 15:1, 100:1, 400:1) de juveniles infectivos. Se registró un incremento de la mortalidad de las larvas del mosquito con el aumento de la dosis del nemátodo. El mayor porcentaje de mortalidad de larvas del mosquito (75%) se obtuvo con las dosis 400:1. Con la dosis de 5:1 obtuvieron un porcentaje de mortalidad menor al 10%. (Gagnolo & Almirón, 2010).

También en Argentina se ha realizado bioensayos para determinar la infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) en larvas de *Aedes aegypti* (L.) y *Culex quinquefasciatus* Say en condiciones de laboratorio, determinando que los porcentajes fueron en aumento a partir de la dosis 100:1 y la mayor mortalidad se registró a la dosis 1500:1, con valores de 80% y 92,5% para *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* respectivamente. En *Culex quinquefasciatus*, del 93% al 100% de los nemátodos fueron melanizados en todas las dosis evaluadas y en *Aedes aegypti* menos del 50%, excepto para las dosis 1:1 y 15:1 (87,5% y 100% respectivamente), el resto de los nemátodos desarrolló a adulto en ambos hospederos. Las  $DL_{50}$  fueron 99 para *Aedes aegypti* y 146 para *Culex quinquefasciatus*. Estos resultados demuestran que las dos especies de mosquitos son susceptibles al parasitismo por *Heterorhabditis bacteriophora* (Ulvedal et al., 2011).

Recientemente en Egipto, se ha estudiado la Eficacia de los Nemátodos *Steinernematidos* y *Heterorhabditidos* para el control del mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae); en donde se menciona que los nemátodos entomopatógenos pueden ser considerados agentes de biocontrol efectivos de plagas de insectos en el hábitat acuático. Las larvas de *Culex quinquefasciatus* Say fueron expuestas a juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*, *Steinernema carpocapsae*, y *Steinernema feltiae* en condiciones de laboratorio. Sus resultados revelaron el papel supresor de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica* en el

control del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Estos nemátodos se establecieron con éxito en el cadáver de acogida y produjeron juveniles infectivos. Por otro lado, tanto *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae* no se establecieron en las larvas de acogida o alcanzaron bajos valores de mortalidad (Zohdy et al., 2013).

En México han probado en condiciones de campo la infección experimental de larvas de segundo estadio del mosquito *Aedes aegypti* con el nemátodo *Steinernema carpocapsae*. En esta investigación se trabajó con cuatro concentraciones de nemátodos (500 000, 1 000 000, 1 250 000 y 1 500 000 nemátodos/ml) que se expusieron sobre larvas de segundo estadio del mosquito *Aedes aegypti*, en donde determinaron que el mejor tratamiento fue a una concentración de 500 000 nemátodos/ml que produjo un 65% de mortalidad con respecto al grupo control luego de 72 h (Ávila y Vidal, 2012).



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LUGAR DE MUESTREO

El distrito de Motupe está ubicado a 78.5 Kilómetros aproximadamente de la ciudad de Chiclayo, en el valle de La Leche en el departamento de Lambayeque. Limita al Norte y Oeste, con el distrito de Olmos; al Este, con los de Salas y Chóchope; al Sur, con los de Jayanca y Salas. Está ubicado en la región costa o Chala.

Geográficamente se encuentra ubicado entre las siguientes coordenadas:

- Longitud Oeste: 79° 42' 51" W
- Latitud Sur: 06° 09' 03" S
- Altitud Promedio: 130 m.s.n.m.

La temperatura ambiental de la zona es cálido y húmedo en los meses de Mayo a Agosto, entre los meses de Diciembre a Marzo se presenta intensas lluvias, la temperatura media anual varía entre 16° C a 25°C. Presenta temperaturas que no suben de 35°C y muy rara vez bajan de los 15°C; con más de 300 días de sol. La temporada húmeda (de Diciembre a Marzo) se traduce por la presencia de nubes en la tarde y unas escasas precipitaciones. En invierno (Junio, Julio), un poco más frío y la temperatura desciende hasta una media de 15°C.

Las precipitaciones son en forma de lluvia, esto se da en los meses de Diciembre a Marzo, y durante los meses de Junio a Agosto las precipitaciones escasean.

El distrito de Motupe tiene una extensión territorial de 557,37 km<sup>2</sup> y una población total de 24 011 habitantes (según el censo del 2007, XI de población y VI de vivienda) (Figura 5).

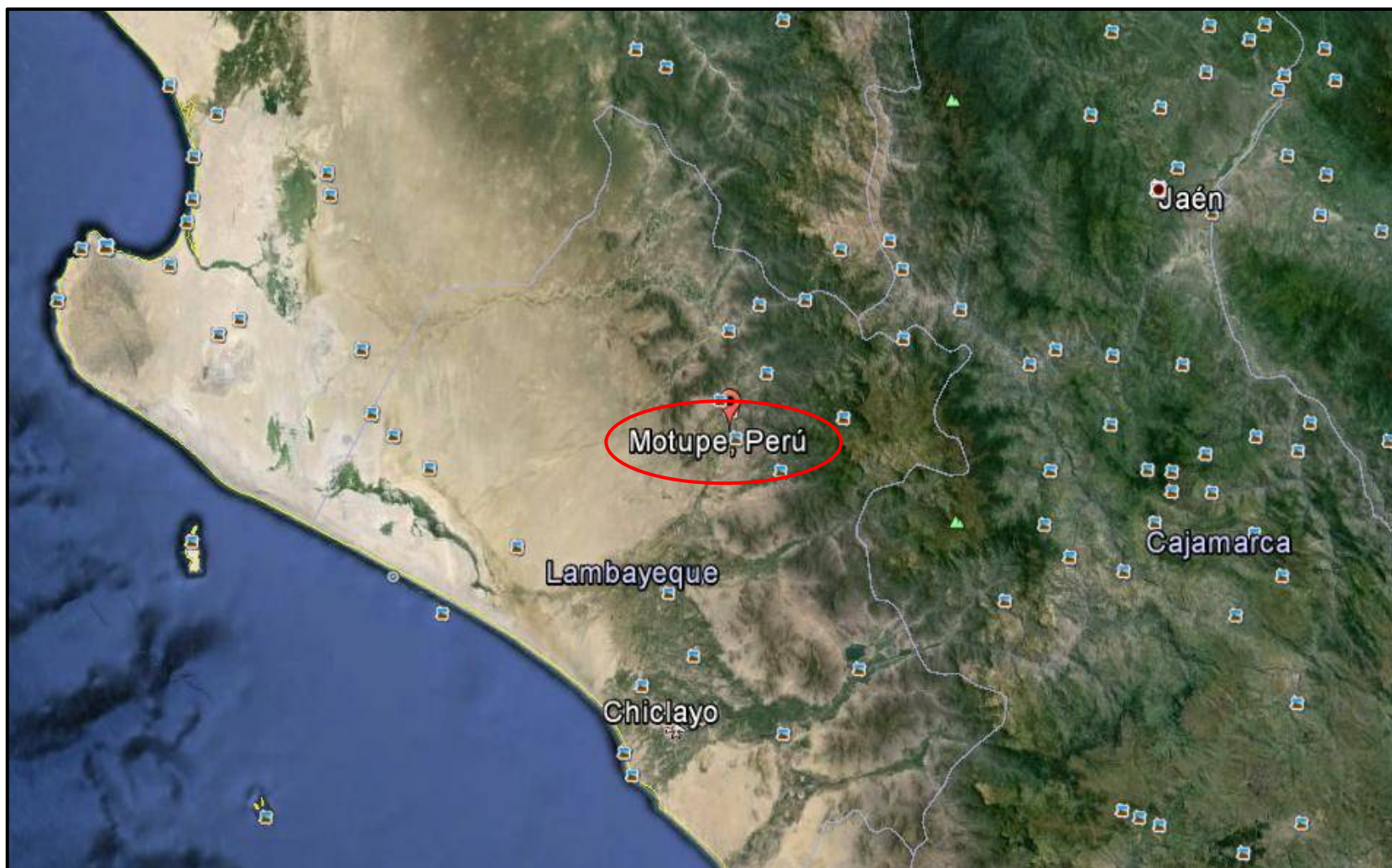


Figura 5. Ubicación geográfica de Motupe (Google Earth, 2014)

### 3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población del presente trabajo de investigación estuvo constituida por larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* provenientes del distrito de Motupe, de la Región Lambayeque.

La muestra estuvo constituida por 3024 larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* que fueron sometidas a los ensayos de patogenicidad: el ensayo “cinco en uno” y el ensayo para establecer la CL<sub>50</sub>.

En el primer ensayo (ensayo cinco en uno) se utilizaron 288 unidades experimentales, pero como el experimento se repitió tres veces, hizo un total de 864 unidades experimentales.

En el segundo ensayo (ensayo para establecer la CL<sub>50</sub>) se utilizaron 720 unidades experimentales, pero el experimento se repitió tres veces en el tiempo, lo cual hizo un total de 2160 unidades experimentales.

### 3.3 MATERIALES

#### 3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se empleó como material biológico nemátodos entomopatógenos (NEPs), al insecto *Aedes aegypti* vector del dengue y una determinada población de *Galleria mellonella* para la reproducción de los nemátodos entomopatógenos, los cuales se detallan a continuación:

##### 3.3.1.1 ENTOMOPATÓGENOS

- *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: *Heterorhabditidae*), proporcionado por la EEA Vista Florida del INIA. Su origen es el Programa Nacional de Control Biológico del SENASA.
- *Heterorhabditis* sp (Nematoda: *Heterorhabditidae*). Este material es un aislamiento proveniente de los campos de cultivo de hortalizas, pertenecientes al centro poblado Montegrande, Requena. Esta cepa o

aislamiento también fue proporcionado por EEA Vista Florida del INIA. Se le llama “Nativo”.

### **3.3.1.2 POBLACIÓN DE INSECTOS**

- Larvas de *Aedes aegypti* en segundo estadio larvario. Las larvas de *Aedes aegypti* fueron recolectadas de Motupe y se realizó su crianza en el laboratorio de Entomología de la Dirección Regional de Salud.
- Larvas de *Galleria mellonella* de ultimo instar larval para la reproducción de los nemátodos entomopatógenos, obtenidas de la crianza masal de la EEA Vista Florida del INIA.

### **3.3.2 MATERIAL DE LABORATORIO**

- Materiales de vidrio
  - Vasos de precipitación de 600 ml
  - Probetas graduadas de 100 ml
  - Placas de Petri de (10 cm de diámetro)
  - Vaso de precipitación de 250 ml
  - Vasos de precipitación de 100 ml
  - Pipetas graduadas de 1ml
  - Pipeta graduada de 5 ml
  - Viales de vidrio
- Materiales de plástico
  - Pipetas Pasteur de plástico de 1 ml
  - Placas de contaje
  - Placas DAS ELISA de 24 pozos.
  - Taper BASA N°5
  - Taper QPLAST
  - Piseta de 500 ml
  - Galoneras de 1.5 L
  - Goteros de plástico
  - Tips(para micropipeta)

- Reactivos
  - Hipoclorito de sodio al 4.9 %
  - Alcohol 96°
  - Detergente
  - Agua destilada
  
- Equipos
  - Balanza digital
  - Estereoscopio
  - Microscopio
  - Termómetro de mercurio
  - Termohigrometro
  - Termoventilador
  - Micropipeta
  
- Otros
  - Papel absorbente
  - Pinzas
  - Navajas
  - Bisturí
  - Etiquetas
  - Bolsas plásticas(de color negro)
  - Tijeras
  - Calculadora
  - Corrector
  - Cintas para medir PH
  - Cuchara de plástico
  - Marcador indeleble
  - Libretas de notas
  - Jeringas de 3 ml, 5ml, 10 ml
  - Tuberculinas de 1ml
  - Toalla pequeña

### 3.4 DISEÑO DEL PROCESO DE INVESTIGACIÓN

En la presente investigación se colectaron larvas del mosquito de *Aedes aegypti* en casas del distrito de Motupe, las cuales se trasladaron al Laboratorio Referencial en Salud Pública-Lambayeque, en donde se inició la crianza del mosquito. A partir de aquí se obtuvo las larvas de segundo instar de *Aedes aegypti* para los bioensayos.

Paralelamente se realizó la multiplicación de las dos cepas de nemátodos entomopatógenos (NEPs) sobre larvas de último instar de *Galleria mellonella* en el Laboratorio de Biocontrol (Entomopatógenos) de la EEA “Vista Florida” del INIA. Estas cepas de nemátodos fueron: *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp. (Nativo)*.

Después de establecer las crianzas tanto del mosquito *Aedes aegypti* como de los nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*, se los enfrentó para determinar la patogenicidad de estos últimos sobre los primeros. (Figura 6)

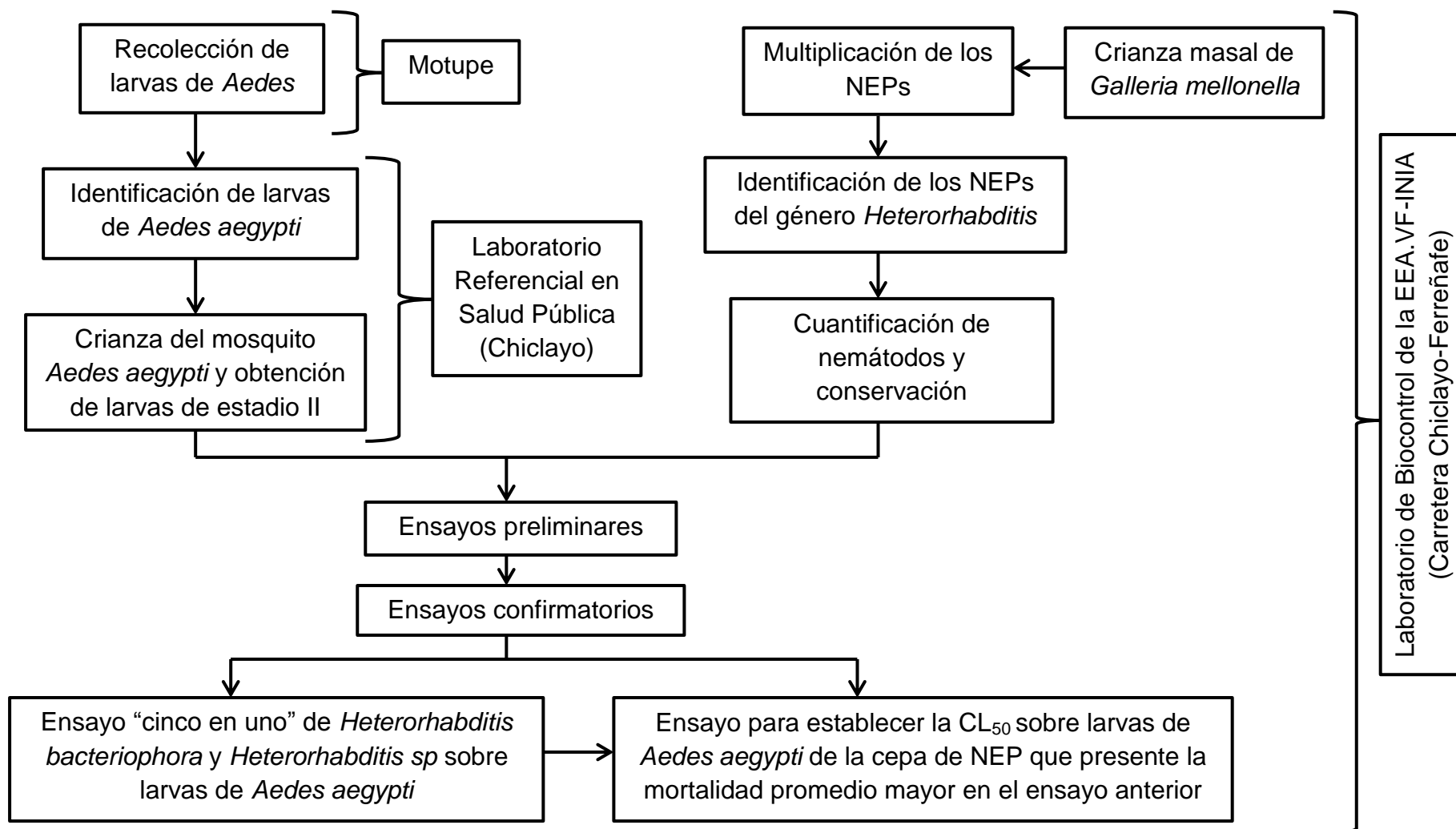


Figura 6. Diseño del proceso de Investigación.

### 3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS.

El presente estudio corresponde al diseño experimental de estímulo creciente (Goode y Hatt, 1986) en el que las larvas de estadio II de *Aedes aegypti* fueron sometidas a los nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* a diferentes concentraciones en Jls/larva (50, 100, 250, 500 y 750). Así mismo, corresponde a un diseño clásico (grupo experimental y grupo control).

En el ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp* sobre larvas de *Aedes aegypti* la unidad experimental fue una celda de la placa de DAS-ELISA de 24 celdas, con una larva de segundo estadio de *Aedes aegypti* por celda. Las diferencias de los tratamientos fueron estimadas mediante una Prueba T de Student de muestras independientes al 95% de confiabilidad ( $p < 0,05$ ).

En los ensayos para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), la unidad experimental estuvo representada por bandejas de plástico con 30 larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*. Para determinar la  $CL_{50}$  y los límites fiduciales (intervalos de confianza) se realizó el análisis Probit.

En ambos ensayos se trabajó con un nivel de significancia de 0,05. En los ensayos la mortalidad larval en el hospedero fue calculado acorde a Abbott (1925). Los valores de  $CL_{50}$  fueron calculados acorde a Finney (1971) usando el Análisis Probit (SPSS, v18).

El procedimiento estadístico se realizó con ayuda de un ordenador Intel(R) Core (TM) i3-2350M CPU@ 2.30 GHz y software Microsoft Excel 2010 y SPSS, v18.



### 3.6 MÉTODOS

#### 3.6.1 MUESTREO DE CAMPO

Con ayuda de los encargados de la campaña de abatización del Área de Sanidad Ambiental del Centro de Salud de Motupe se logró recolectar la suficiente cantidad de larvas para establecer la crianza de *Aedes aegypti* en el Laboratorio Referencial en Salud Pública-Lambayeque. (Anexo 1).

La búsqueda de las larvas de *Aedes sp* se realizó inspeccionando cuidadosamente todos los ambientes dentro y fuera de la vivienda. Se empezó desde el fondo de la vivienda hacia fuera para localizar todos los recipientes de cualquier tipo o todo recipiente que sea capaz de retener agua, dentro y fuera de la vivienda (*Balta, 1997*). Una vez encontradas las larvas en un determinado recipiente, se procedió a almacenarlas en botellas de plástico y en viales para su transporte a la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Estas botellas contaban con agujeros en la parte superior para permitir la entrada de oxígeno. Botellas y viales fueron identificadas con los datos técnicos relevantes de ubicación y caracterización.

Para recolectar las larvas, los materiales que se usaron fueron cucharón sopero de mango largo, goteros, linterna, lupa, viales, alcohol al 70% (*Balta, 1997*) (Figura 7)



**Figura 7. Recolección de larvas de *Aedes sp.* (A) Revisando en un balde la presencia y/o ausencia de larvas de *Aedes sp.* (B) Acondicionando las larvas recolectadas en botellas plásticas.**

### **3.6.2 LABORATORIO**

#### **3.6.2.1 CRIANZA DEL MOSQUITO *Aedes aegypti***

Se realizó la identificación del mosquito *Aedes aegypti* en el estadio de larva y en estadio de adulto. Para el estadio de larva se hicieron observaciones microscópicas, considerando la presencia de las prominentes espinas laterales (torácicas), la hilera de 7-12 escamas del peine en el VIII segmento abdominal; cada escama presentó una espina media y dientes laterales y las escamas del pecten del sifón (Nelson; 1986) (Anexo 2). Para el estadio de adulto se hicieron observaciones al estereoscopio, donde se observó manchas plateadas que dan la apariencia de lira en el mesonoto (Méndez & Montesano, 1994) (Anexo 3).

Los mosquitos *Aedes aegypti* fueron criados en el Laboratorio Referencial Regional de la Dirección Regional de Salud (DIRESA-Lambayeque) siguiendo la metodología propuesta por el Instituto Nacional de Salud (INS)-Lima con algunas modificaciones.

El objetivo de la crianza de este insecto fue disponer de material biológico (larvas) para los bioensayos a realizar en el laboratorio. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

#### **a) Mantenimiento de las larvas**

Una vez identificada la especie *Aedes aegypti*, se procedió a la crianza del mosquito en condiciones de laboratorio. Para este fin se utilizaron jaulas metálicas. Las dimensiones de la jaula eran de 60 cm x 60cm x 60 cm. Una sección de la parte delantera de la jaula estaba provista de una manga de tela. (Figura 8).

Las larvas fueron transferidas a recipientes de plástico de 12.5 cm de altura por 9.5 cm de diámetro menor y 12 cm de diámetro mayor, que contenían agua reposada por lo menos 24 horas, con el fin de mantener la temperatura (Anexo 5). Se colocaron tres de estos recipientes plásticos por jaula (Figura 9). Se revisaron todos los días y para alimentarlas se les agregó una “Dieta seca” a base de harina de alverja, hígado de pollo y Sera micrón en una proporción 13:1:1 (*Villasaca, comunicación personal*) (Anexo 4). Se observó los cuatro estadios larvarios de *Aedes aegypti*: estadio I (larva 1) mide de 1-2 mm; estadio II (larva 2) mide de 2-3 mm; estadio III (larva 3) mide 4-6 mm y estadio IV (larva 4) mide de 7-9 mm. Las larvas de estadio I aparecieron a las 2 horas, las de estadio II a las 24 horas, las de estadio III a las 72 horas y las de estadio IV a las 96 horas aproximadamente (*Christophers, 1960*).

#### **b) Mantenimiento de pupas**

Las pupas se criaron en las mismas bandejas de las larvas (Anexo 5). En esta etapa el mosquito no se alimentó. Después de 2 -3 días la pupa se transformó en imago (Figura 9).

#### **c) Mantenimiento de adultos**

Los adultos fueron mantenidos en jaulas metálicas de 60 cm x 60 cm x 60 cm (Figura 8). Dentro de la jaula se colocó una bola elaborada de algodón

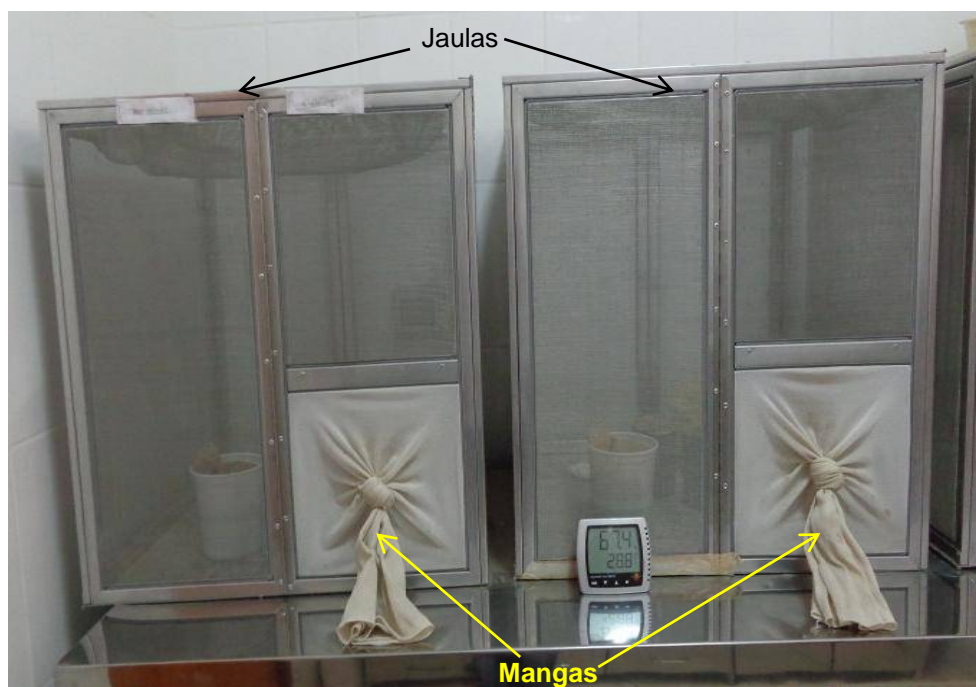
embebida en una solución azucarada al 10% sobre una placa de Petri, esta solución sirvió como alimento para los adultos machos y hembras (Figura 9, Anexo 5). El algodón se cambió dejando un día. A las hembras se las alimentó con sangre humana durante una hora, tres veces a la semana (Figura 10). La manga de tela de la parte delantera de la jaula metálica sirvió para introducir el antebrazo y dejarse picar por las hembras del mosquito *Aedes aegypti* (Anexo 5). Con un trapo húmedo se limpió una vez a la semana el piso de la jaula con el fin de evitar que se contaminara.

#### **d) Mantenimiento de los huevos**

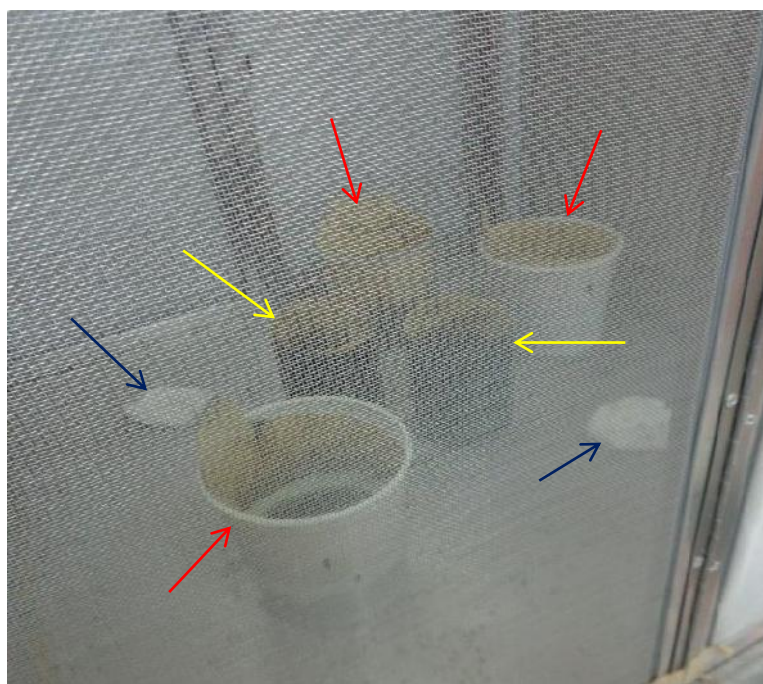
Para la recolección de huevos se utilizó las Ovitrampas, recipientes plásticos de color negro de 11.5 cm de altura y 8 cm de diámetro, su pared interior llevaba una banda de papel kraft (en cuya superficie quedaron adheridos los huevos, al estar en contacto con el agua) y luego se agregó agua reposada hasta llenar dos tercios del recipiente (Figura 9).

Al quinto día de la ovipostura los papeles se sacaron y se dejaron secar por tres días a temperatura ambiente, luego se realizó el conteo de los huevos con ayuda de una lupa y posteriormente se guardaron en un recipiente de plástico de 25 cm de largo x 15 cm de ancho x 7 cm de espesor (Anexo 5). Este recipiente estuvo herméticamente cerrado para evitar que entren los *Corredentia* y se coman los huevos de *Aedes aegypti*. Se guardaron los huevos hasta tener la cantidad suficiente para realizar el ensayo “cinco en uno” y el ensayo para establecer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).

Para inducir la eclosión de los huevos, estos se inundaron en bandejas de porcelana conteniendo 500 ml de agua de caño reposada y sometidas a una temperatura de 30 °C (esto se consigue con ayuda de un foco de 60 watts) y humedad relativa de 64%.



**Figura 8. Jaulas metálicas utilizadas para la crianza de *Aedes aegypti*.**



**Figura 9. Materiales presentes en la jaula metálica. En el centro se observan las dos Ovitrampas (flechas amarillas). Tres recipientes plásticos (flechas rojas) donde se criaron las larvas y las pupas. A los costados de la jaula se observan dos bolas elaboradas de algodón (flechas azules).**



**Figura 10.** Alimentación de adultos hembras de *Aedes aegypti*. (A) Mosquitos hembras utilizando un antebrazo humano como fuente de sangre. (B) Antebrazo humano después de alimentación de mosquitos hembra.

### **3.6.2.2 CRIANZA DE *Galleria mellonella* L. (Lepidóptero: Pyralidae)**

Se realizó la crianza de *Galleria mellonella* “Polilla de la cera” con el propósito de disponer de larvas en las cuales se realizó la multiplicación de los Nemátodos Entomopatógenos (Kaya & Stock, 1997).

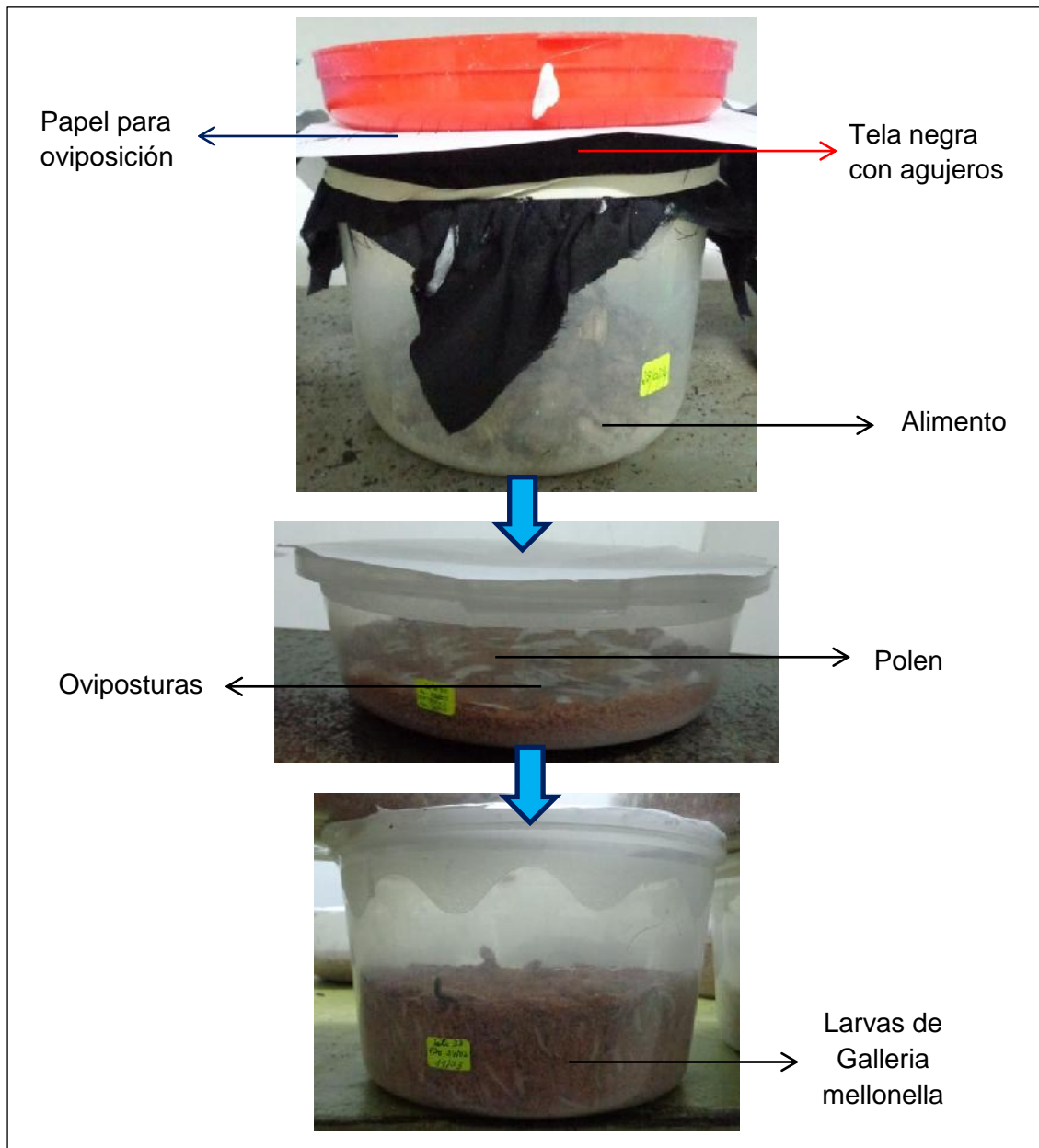
Los nemátodos requeridos para desarrollar el ensayo “cinco en uno” y el ensayo de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fueron reproducidos sobre el ultimo instar larval de *Galleria mellonella*. Estas larvas fueron extraídas de la crianza masal realizada en la Estación Experimental Agraria Vista Florida del Instituto Nacional de Innovación Agraria(INIA)-Lambayeque.

Los adultos se mantienen en recipientes plásticos de forma circular tapados con una tela de color negro. En cada recipiente se colocan 200 larvas aproximadamente. La tela de color negro presenta agujeros que permite la oviposición de los adultos de *Galleria mellonella*. Sobre esta tela se colocó una hoja de papel en donde se recolectó los huevos de *Galleria mellonella*.

La alimentación es a base de Ricocan, salvado de trigo y miel en la proporción 2:1:2(Anexo 6) .Las oviposturas fueron colocadas semanalmente en recipientes plásticos que contienen la dieta anterior, además se agregó polen para inducir la eclosión de los huevos. El tiempo de eclosión de los huevos se da entre 6 a 10 días. Los estadios larvales son ocho: estos los realiza entre 25 a 30 días aproximadamente y la prepupa forma un cocoon duro del cual emerge el adulto en 8 días aproximadamente.

El ambiente de cría se acondicionó a 25°C y 75% de H.R, dentro de este ambiente se registraron los cambios de temperatura y humedad relativa. Para mantener la humedad en la sala de cría se colocó bandejas de latón con agua en el piso. Su ciclo biológico duró aproximadamente 45 días (Figura 11)





**Figura 11. Crianza de *Galleria mellonella*.**



### 3.6.2.3 MULTIPLICACIÓN DE LOS NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp*

Previamente se realizó la identificación de los nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*. Para ello se utilizaron larvas de ultimo instar de *Galleria mellonella* en donde los insectos muertos por NEPs del género *Heterorhabditis* se tornan de color rojo, púrpura, naranja o en algunos casos marrón (Kaya y Stock, 1997) (Anexo 7).

Las dos cepas de nemátodos estuvieron representados por la especie *Heterorhabditis bacteriophora*, procedente del Programa Nacional de Control biológico del SENASA (En Chiclayo fueron facilitados por la EEA Vista Florida del INIA) y por el nemátodo entomopatógeno nativo del Género *Heterorhabditis* (*Heterorhabditis sp*) aislado del Distrito de Reque, Provincia de Chiclayo, Departamento de Lambayeque (Cuadro 3). En un estudio previo se había informado la presencia del nematodo nativo (Córdova y Perez, 2010).

**Cuadro 3. Cepas de nemátodos entomopatógenos que fueron utilizadas.**

Cepa(aislado)	Origen
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Proporcionado por INIA.Procedente del Programa Nacional de Control Biológico
<i>Heterorhabditis sp</i> (Nativo)	Proporcionado por INIA.Procedente del distrito de Reque.

Siguiendo la metodología de Kaya (1990) con algunas modificaciones, se realizó la multiplicación de los nemátodos entomopatógenos, la cual consistió en inocular 4000 juveniles infectivos (JIs) en un taper de plástico (15 cm de largo x 8 cm de ancho) provisto de papel absorbente sobre 200 larvas de *Galleria mellonella* del último estadio. De esta manera se estableció una proporción de 20 nematodos/larva. Posteriormente el taper fue tapado con una

bolsa de plástico (30 cm x 50 cm) para conservar la humedad y se incubó por una semana de 20- 26 °C y 85% de Humedad Relativa (H.R).



**Figura 12. Modo de inoculación de los nematodos entomopatógenos sobre larvas de ultimo instar de *Galleria mellonella*.**

Trancurridos cuatro días después de la muerte de las larvas de *Galleria melonella* causada por los nemátodos, se colocaron en trampas White modificada y se incubaron a 20 °C hasta le emergencia de los juveniles infectivos (Kaya & Stock, 1997). (Figura 13)

Los nemátodos que emergieron de la trampa se cosecharon por siete días, cambiando diariamente el agua destilada de la trampa White. La emergencia de los juveniles infectivos varió de acuerdo a la cepa (aislado) de nemátodo entomopatógeno; para el caso de *Heterorhabditis bacteriophora* fue de 13-15 días, en cambio para *Heterorhabditis sp (Nativo)* fue de 9-11 días. Los juveniles infectivos migraron del cadáver al agua debido al higrotropismo positivo que poseen (Stock, 1992). En todos los experimentos se usaron nemátodos de menos de 15 días de emergidos. Conforme se realizó el trabajo de laboratorio se confirmaron los Postulados de Koch y por ende la patogenicidad de los nemátodos entomopatógenos.

Es muy importante tener en cuenta que al momento de realizar las aplicaciones de NEPs, no se debe trabajar con soluciones tan viejas (las que tienen más de 30 días), ya que tendríamos más probabilidades de trabajar con nemátodos muertos (Anexo 8)

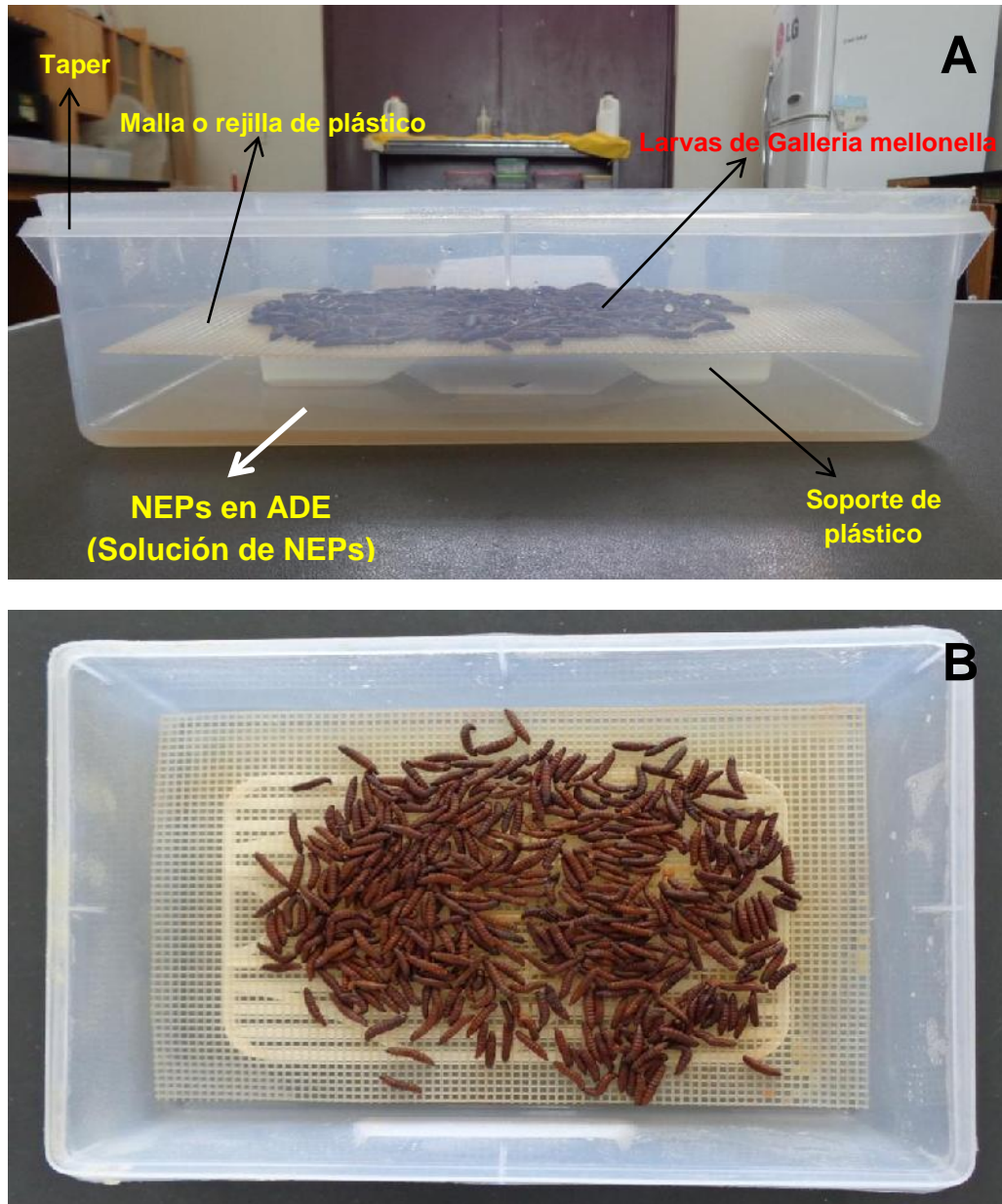


Figura 13. Diseño de Trampa White modificada. (A)Partes de la Trampa White modificada, vista lateral. (B) Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por NEPs del Género *Heterorhabditis* vistas desde la parte superior de la trampa White modificada

### 3.6.2.4 CUANTIFICACIÓN DE NEMÁTODOS Y CONSERVACIÓN

Para el conteo de los nemátodos se utilizó el método de la dilución volumétrica de *Lecuona (1996)*. Se colocó con una micropipeta 10 µl de la suspensión inicial en una placa de Petri (5cm de diámetro) rayada o dividida y se realizó el conteo directo de los nemátodos al estereoscopio (Figura 14). Este procedimiento se repitió tres veces. La concentración de nemátodos se determinó mediante la siguiente formula:

$$A = V.a/v$$

**Donde:**

- ✓ **A** = número de nemátodos en la solución
- ✓ **a** = número de nemátodos en la muestra
- ✓ **V** = volumen de la solución
- ✓ **v** = volumen de la muestra

Respecto al almacenamiento de los nemátodos, los juveniles infectivos obtenidos en las trampas White modificadas fueron vaciados en un vaso de precipitación y luego se agregó ADE. Luego los JIs concentrados en agua destilada fueron absorbidos por esponjas rectangulares de poliuretano y almacenados en bolsas de polietileno, en un ambiente de 15 °C.

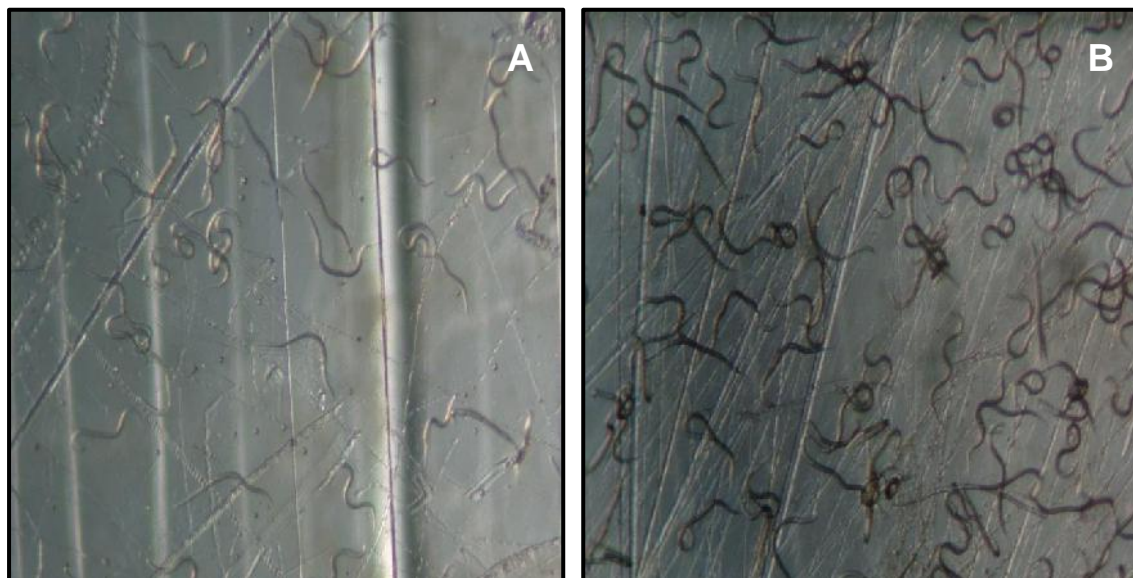


Figura 14. Nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* en solución (placa de Petri). (A) *Heterorhabditis bacteriophora*. (B) *Heterorhabditis* sp (Nativo).

### 3.6.2.5 BIOENSAYOS

#### 3.6.2.5.1 Ensayo cinco en uno de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio.

Se utilizó el ensayo “cinco en uno” de acuerdo a Kaya et al (2005). Este ensayo sirve para evaluar la calidad de los nemátodos entomopatógenos. La calidad de los nemátodos puede ser afectado por varios factores incluyendo el insecto hospedante (por ejemplo: calidad del hospedero) y por otras condiciones como son: apiñamiento, oxígeno, temperatura, etc. Es muy importante conocer la calidad de los JIs porque esto a su vez nos va permitir conocer su patogenicidad sobre el insecto hospedante que se está estudiando. Este es un ensayo de rutina en muchas empresas de biotecnología que producen nemátodos entomopatógenos.

Se trabajó con dos cepas de nemátodos entomopatógenos (NEPs), *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., los cuales fueron criados sobre larvas de *Galleria mellonella* en la Estación Experimental Agraria “Vista Florida” del INIA.

Se realizaron ensayos preliminares y se hicieron algunas modificaciones en la metodología adaptándola al hábitat acuático de las larvas de segundo instar de *Aedes aegypti*. La mayoría de los trabajos con nemátodos entomopatógenos se han realizado con insectos plagas de cultivos agrícolas cuyo hábitat es el suelo.

Se utilizaron placas de DAS-ELISA de 24 pocillos para este ensayo. Cada pocillo o celda de esta placa constituyó la unidad experimental. Estos pocillos fueron aforados hasta 1500 µl con ADE. Sobre este pocillo se inoculó cinco nemátodos entomopatógenos (juveniles infectivos) pertenecientes al género *Heterorhabditis* y una larva de segundo estadio de *Aedes aegypti*. Dos días antes se hicieron eclosionar los huevos de *Aedes aegypti*. El grupo control fué inoculado solo con ADE (Figura 15, Anexo 11).

Este ensayo consistió en dos tratamientos: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis sp.* Para cada tratamiento se utilizó 96 larvas de *Aedes aegypti* (96 unidades experimentales). En el grupo control también se utilizaron 96 larvas de *Aedes aegypti*, pero en los pocillos solo se agregó ADE. El experimento completo se repitió tres veces (Figura 16).

Las placas de DAS-ELISA se cubrieron con una tapa como medida de bioseguridad, luego fueron incubadas a 24 °C en la oscuridad. La evaluación se realizó a las 72 horas. Esta consistió en disectar las larvas en suero fisiológico bajo un estereoscopio para verificar la presencia de los JIs que penetraron al hemocele del hospedero (Anexo 14).



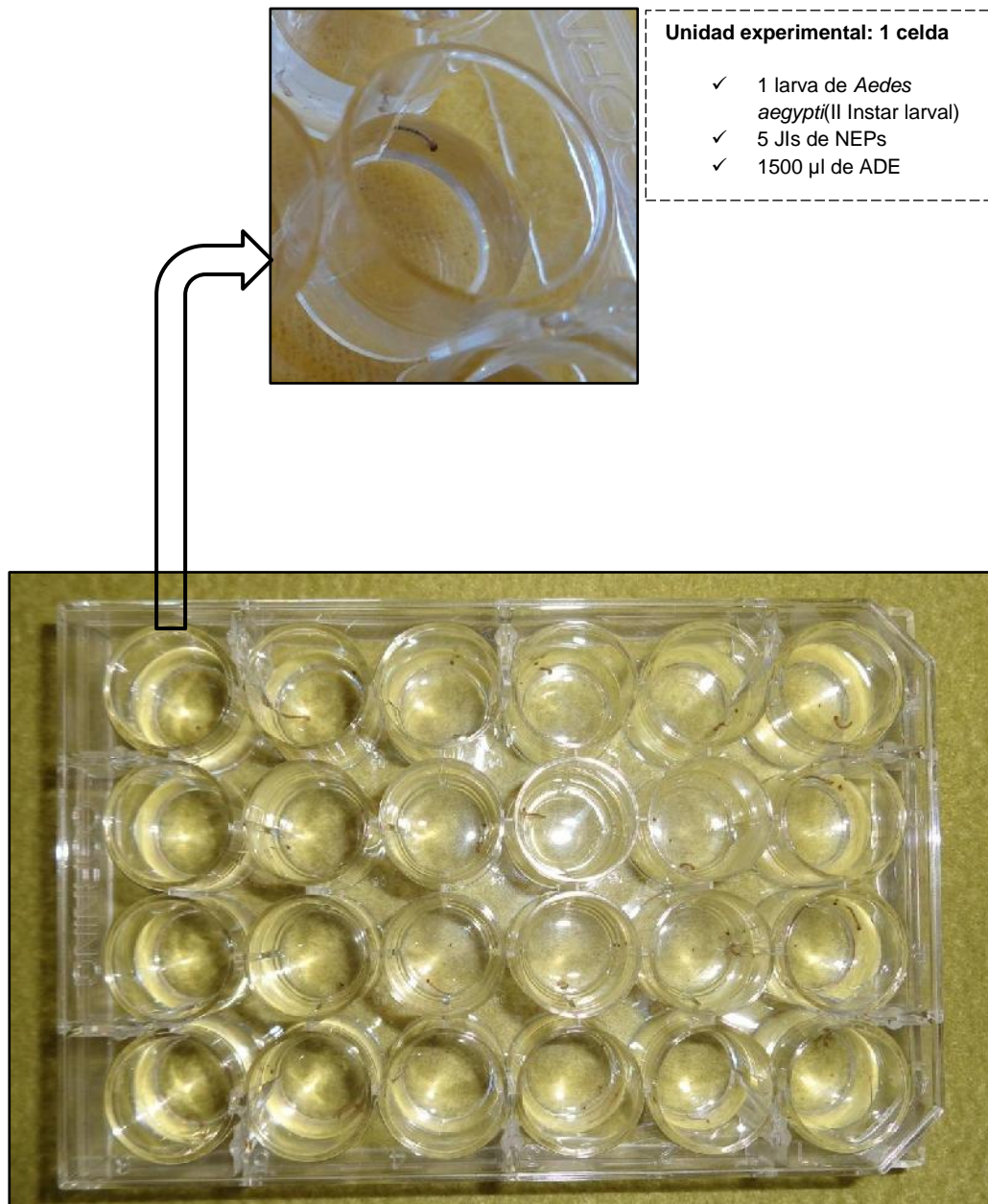


Figura 15. Unidad experimental para el ensayo “cinco en uno” y placa DAS- ELISA de 24 celdas (pocillos).

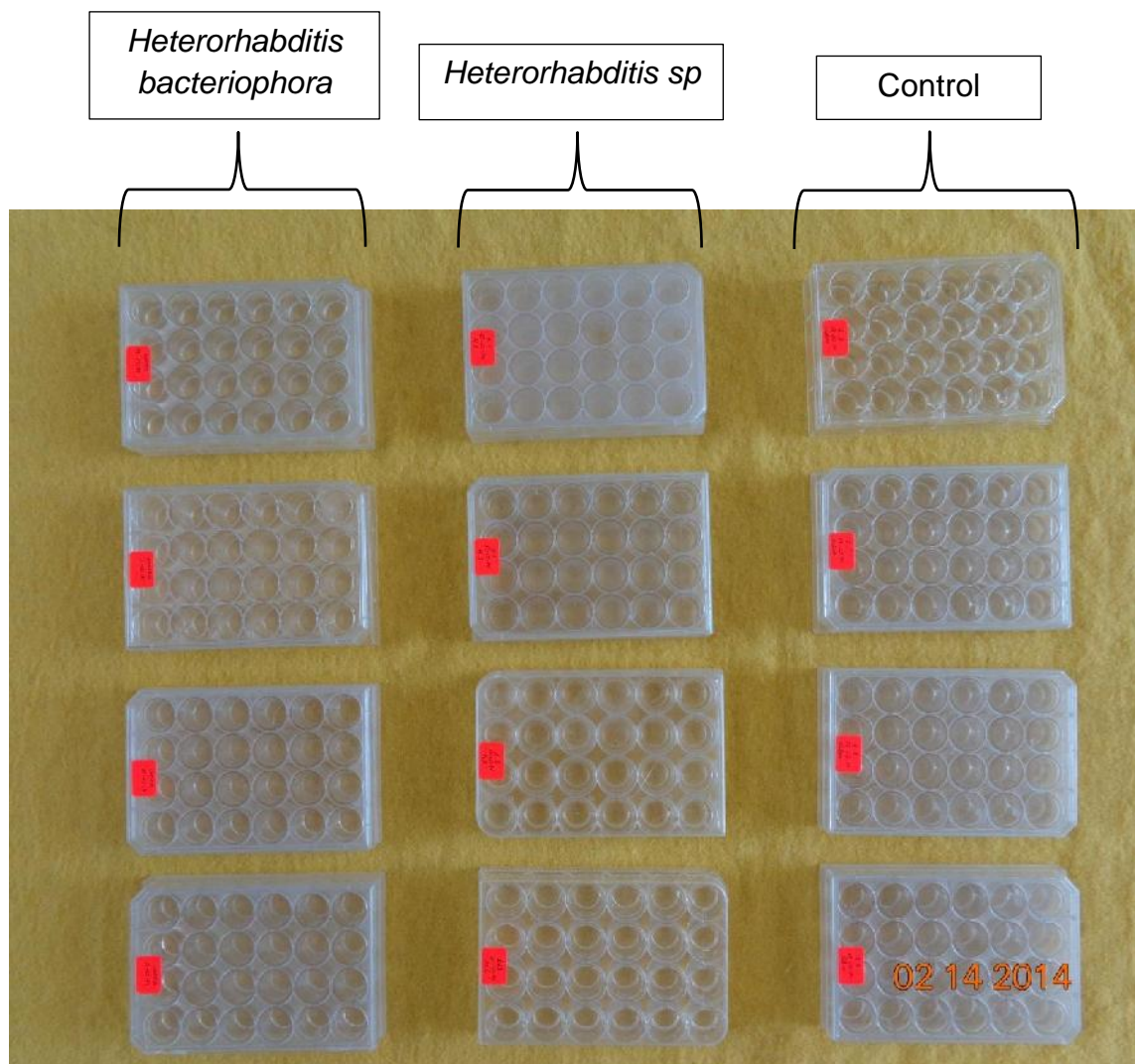


Figura 16. Número de Unidades experimentales para realizar el ensayo “cinco en uno” de NEPs del género *Heterorhabditis* sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*.



### **3.6.2.5.2 Ensayo para establecer la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio de la cepa de nemátodo entomopatógeno que presente la mortalidad promedio mayor en el ensayo anterior.**

Se calculó la CL<sub>50</sub> de acuerdo a *Ulvedal et al (2011)*. La Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) es la concentración de Juveniles infectivos que matan al 50% de los individuos de la especie plaga, en este caso larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*. Esta medida también es un indicativo muy importante de la patogenicidad de los NEPs. La CL<sub>50</sub> es determinada por la exposición de la especie plaga a una serie de concentraciones de nemátodos.

Guiándonos por los antecedentes y por los ensayos preliminares que realizamos, determinamos nuestras propias concentraciones. Se evaluaron las concentraciones de 0 (control), 50, 100, 250, 500, 750 JIs/larva. Se realizaron cuatro réplicas por concentración (tratamiento). El grupo control contuvo sólo larvas del mosquito en agua destilada estéril (ADE) (Figura 18).

Para realizar este ensayo dos días antes se hicieron eclosionar los huevos de *Aedes aegypti*. La unidad experimental fue un taper de plástico de 12x8x4 cm. Se utilizaron 30 larvas de *Aedes aegypti* de segundo estadio por unidad experimental. Previamente se añadió en este taper la concentración de nemátodos con la que queríamos trabajar y se aforó hasta 60 ml con ADE. (Figura 17, Anexo 12, Anexo 13).

Los tapers de plástico fueron cubiertos con una tapa como medida de bioseguridad. Luego fueron incubados a 25°C y a 85% de H.R en una funda plástica para evitar la pérdida de humedad. Las evaluaciones se realizaron después de 72 horas (Anexo 14). Para confirmar la muerte de las larvas por acción de los nemátodos, estas fueron colocadas en placas de Petri (vacías) para ser disectadas con la ayuda de un estilete y observar la presencia de hembras hermafroditas o juveniles en el estereoscopio (Anexo 9). Las larvas muertas fueron diseccionadas en suero fisiológico. Al momento de evaluar se debe diferenciar la larva de *Aedes aegypti* muerta por acción del nemátodo de la que ha muerto por otros factores (Anexo 10).

Con los datos de mortalidad total acumulada de cada concentración se determinó la  $CL_{50}$ , y sus límites de confianza respectivos mediante el análisis de Probit, utilizando el programa estadístico SPSS versión 18.

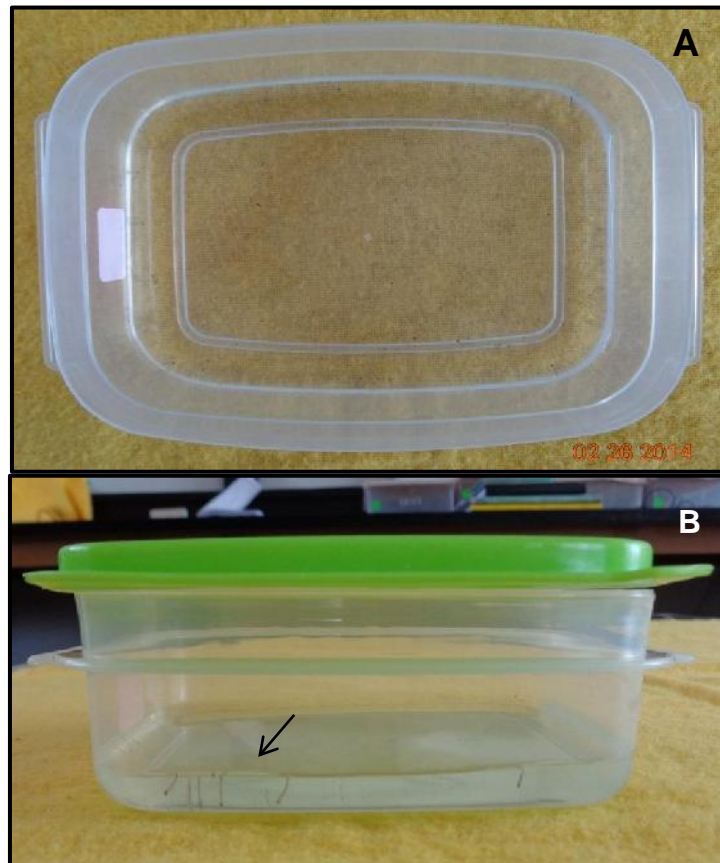
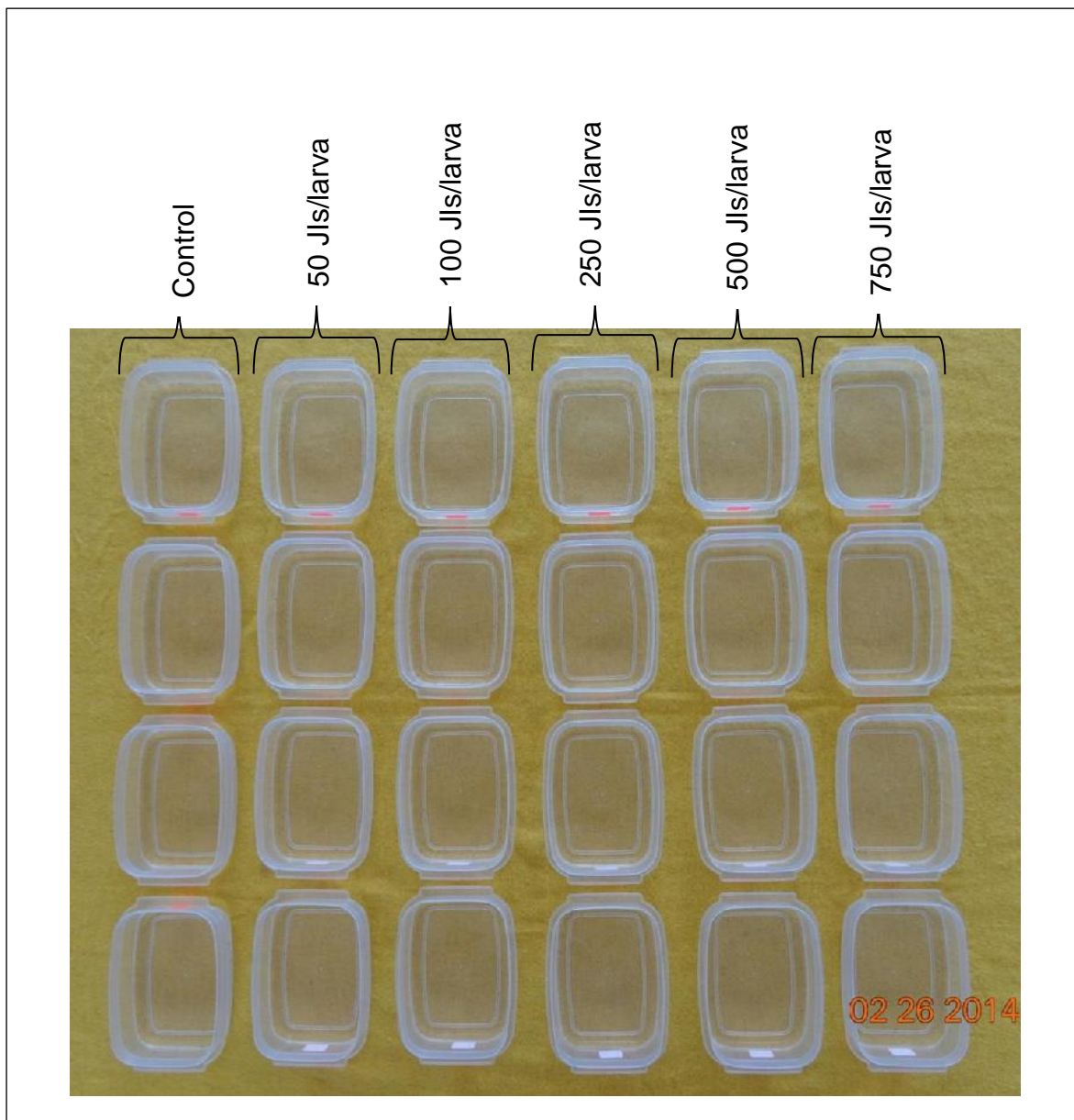


Figura 17. Unidad experimental para determinar la  $CL_{50}$ . (A) Vista Superior. (B) Vista lateral, donde se observa como están dispuestas las larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* en ADE. Unidad experimental: 30 larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*, ADE y solución de NEPs (*Heterorhabditis* sp) de acuerdo a cada concentración. El taper (Unidad experimental) se enrasó a un volumen de 60 ml.



**Figura 18. Número de Unidades experimentales utilizadas para determinar la  $CL_{50}$  y número de repeticiones por cada tratamiento. Unidades experimentales por tratamiento: 4. Total de Unidades experimentales: 24. El grupo control contiene solo ADE. Cada taper se enrasó a un volumen de 60 ml.**

## IV. RESULTADOS

4.1 Ensayo cinco en uno de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio.

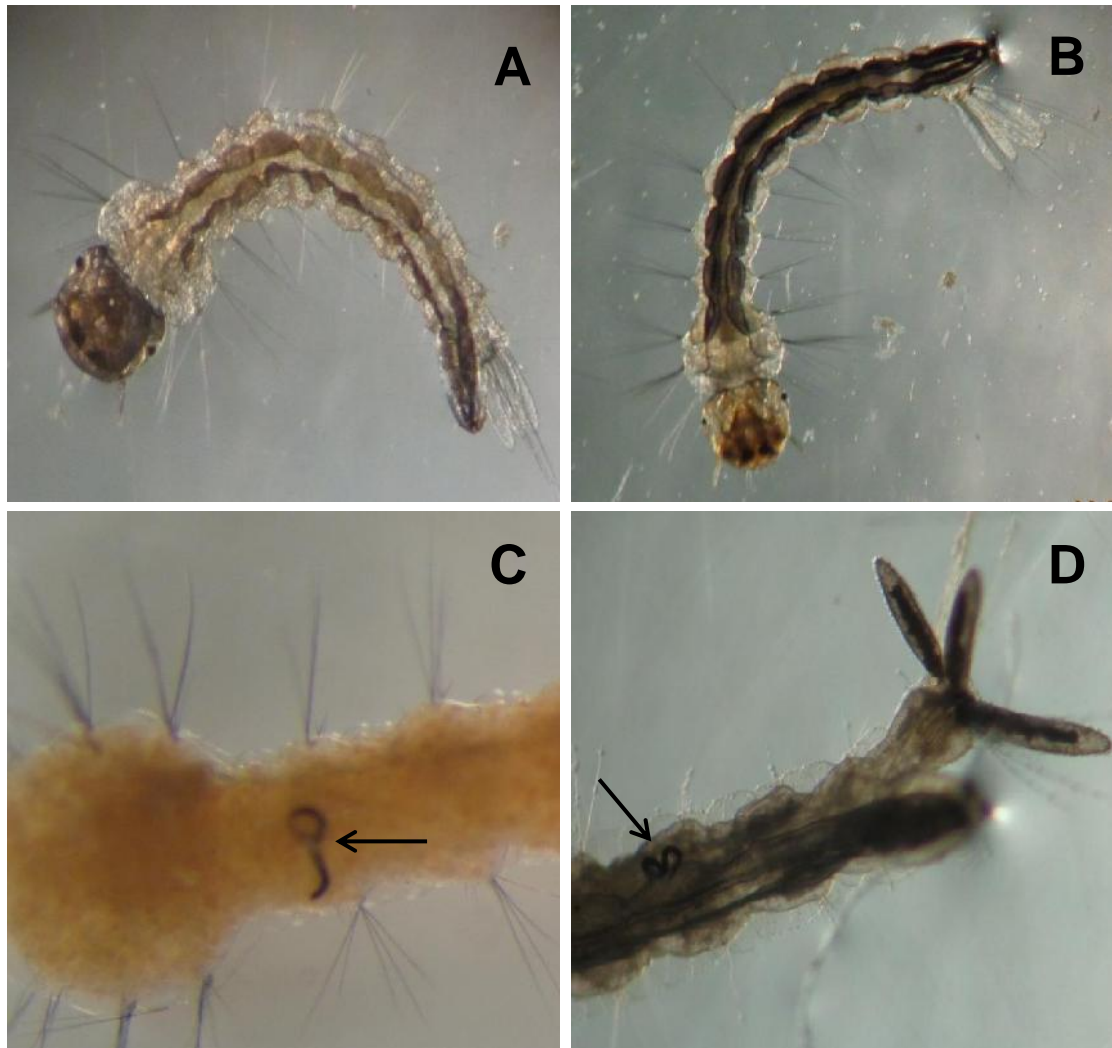


Figura 19. Larvas de *Aedes aegypti* del ensayo “cinco en uno”. (A) Larva de *Aedes aegypti* de segundo estadio en el grupo control. (B) Larva de *Aedes aegypti* después de 72 horas (evaluación) en el grupo control. (C) Larva de *Aedes aegypti* parasitada por *Heterorhabditis bacteriophora*. (D) Larva de *Aedes aegypti* parasitada por *Heterorhabditis* sp (Nativo). En C y D se muestra a los nemátodos melanizados.

En las dos cepas de nemátodos entomopatógenos evaluadas se encontró que son capaces de buscar y causar mortalidad en las larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* en pocillos de placas de DAS-ELISA con 1500 µl de ADE (Figura 19).

En el cuadro 4 y en el cuadro 5 se muestra que *Heterorhabditis sp* presentó una mortalidad de 17.4% y *Heterorhabditis bacteriophora* presentó una mortalidad de 13.8%. La prueba t de Student revela que existe diferencia significativa entre las dos cepas de nemátodos evaluadas ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 4). En el grupo control no se encontró mortalidad (0%).

El ensayo “cinco en uno” se repitió tres veces en el tiempo, los datos que se muestran son los promedios.

En los anexos 15, 16, 17 se muestra de manera detallada la forma en que se registraron los datos para realizar el ensayo “cinco en uno” en la primera, segunda y tercera repetición en el tiempo.

En el anexo 18 se muestra el Análisis estadístico de los datos del ensayo “cinco en uno”.

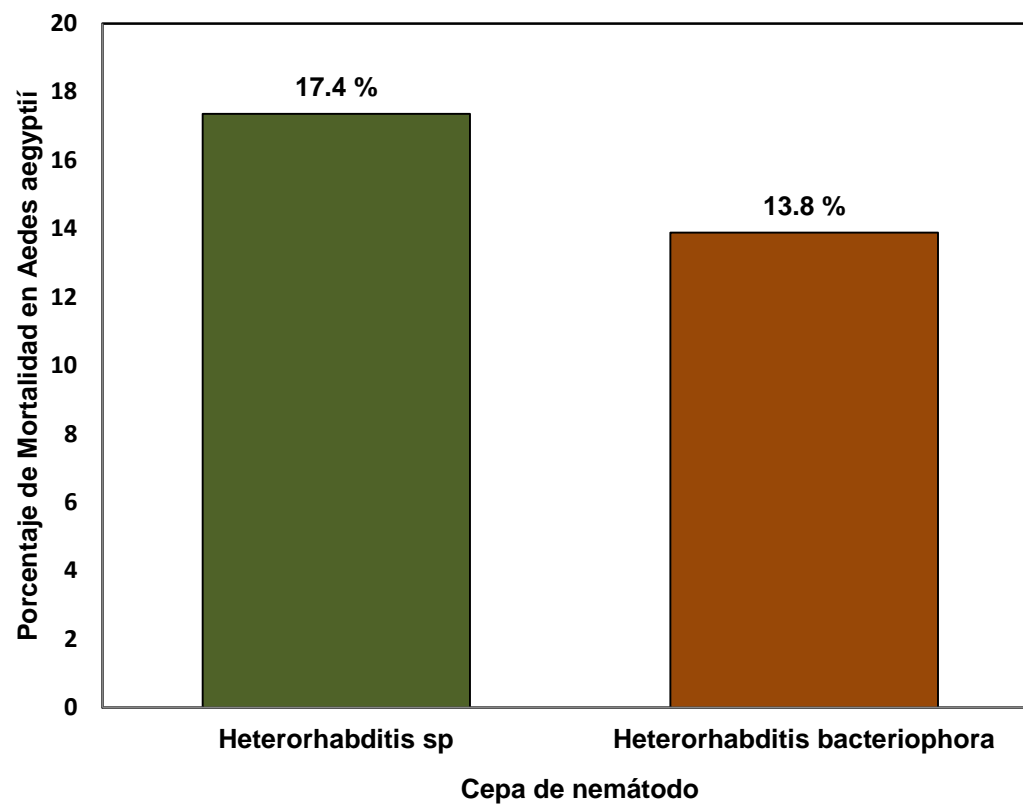
También se observó que la larva de *Aedes aegypti* como mecanismo de defensa melanizó a los nemátodos entomopatógenos que penetraron, pero eso no evitó la muerte de la larva (Figura 19).

**Cuadro 4. Porcentajes de mortalidad de larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* inoculadas con JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp (Nativo)* en el ensayo “cinco en uno” y prueba t de student.**

<b>Nematodos(cepas)</b>	<b>Número de larvas</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>% Mortalidad</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>Significancia</b>
<i>Heterorhabditis sp(Nativo)</i>	96	3	17.4	7.07	0.002
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	96	3	13.8		
Control	96	3	0		

**Fuente:** Elaboración propia (2014)

Cuadro 5. Aplicación de dos cepas de nemátodos entomopatógenos del ensayo “cinco en uno” en larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*.



Fuente: Elaboración propia (2014)



4.2 Ensayo para establecer la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio de la cepa de nemátodo entomopatógeno que presente la mortalidad promedio mayor en el ensayo anterior.

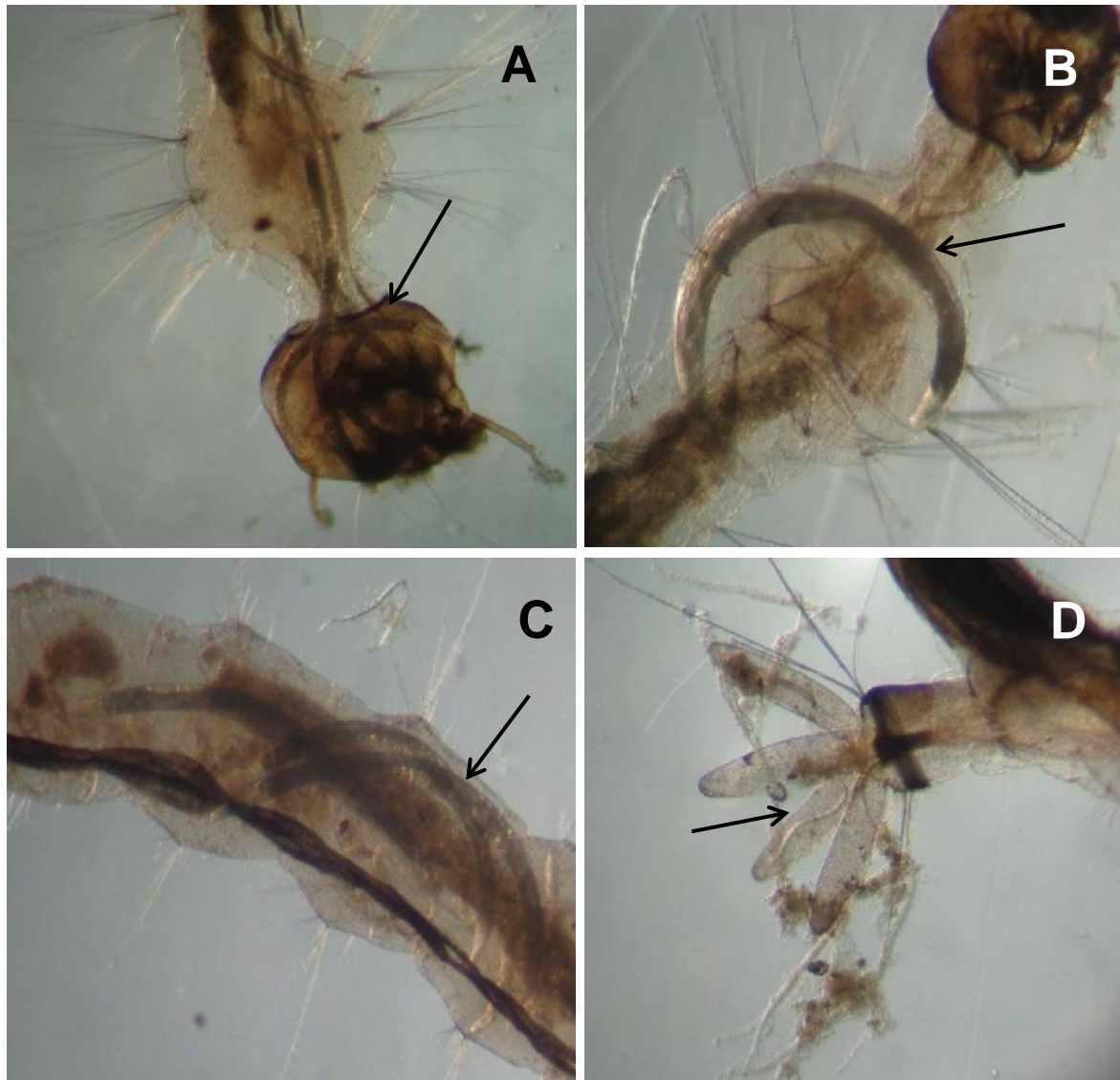


Figura 20. Larvas de *Aedes aegypti* del ensayo para establecer la CL<sub>50</sub>. (A) Se muestra el estado de adulto de *Heterorhabditis sp* (Nativo) en la cabeza de *Aedes aegypti*. (B) Adulto de *Heterorhabditis sp* (Nativo) en el tórax de *Aedes aegypti*. (C) Adultos de *Heterorhabditis sp* (Nativo) en el abdomen de *Aedes aegypti*. (D) Juvenil de *Heterorhabditis sp* (Nativo) en el segmento anal de *Aedes aegypti*.



En el ensayo anterior se determinó que *Heterorhabditis sp* tenía un porcentaje de mortalidad mayor que *Heterorhabditis bacteriophora*, es por eso que en el segundo ensayo solo se utiliza a la cepa nativa.

Al realizar los cortes histológicos se pudo verificar la presencia del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis sp (Nativo)* en la cabeza, tórax y abdomen (incluido el segmento anal y sifón) de la larva de *Aedes aegypti*. Se encontraron nemátodos de estado juvenil y adulto en la larva hospedante. Las observaciones se realizaron con ayuda de un estereoscopio (Figura 20).

En el cuadro 6 se aprecia la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de la cepa *Heterorhabditis sp (Nativo)*, aislada de Reque, a las 72 horas de evaluación.

Así mediante el análisis Probit se determinó que las CL<sub>50</sub> evaluadas a las 72 horas, en tres ensayos distribuidos en el tiempo, fueron 250.1, 209.2, 168.6 juveniles infectivos por larva de segundo estadio de *Aedes aegypti*; haciendo un promedio de 209.3 JIs/larva.

Al realizar el análisis de regresión Probit en los tres ensayos distribuidos en el tiempo, los datos del grupo control fueron excluidos del análisis porque no presentaron letalidad.

Al analizar la significancia de los parámetros del análisis Probit, encontramos que ambos (intersección y concentración) son significativos ( $p < 0.05$ ), en los tres ensayos distribuidos en el tiempo.

La prueba de Chi cuadrado al resultar no significativa ( $p > 0.15$ ), indica que el modelo es adecuado para representar los datos del experimento, en los tres ensayos distribuidos en el tiempo.

**Cuadro 6. Análisis Probit de la mortalidad obtenida para la cepa *Heterorhabditis sp (Nativo)* sobre las larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* en los ensayos evaluados a las 72 horas.**

Repeticiones en el Tiempo	Número de larvas tratadas	Límites de confianza	Ecuación de Regresión	X <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub>
Primer ensayo	720	144.4 – 328.0	$y = -6.341 + 2.644x$	0.234	250.1
Segundo ensayo	720	76.6 – 327.9	$y = -4.258 + 1.835x$	0.284	209.2
Tercer ensayo	720	68.8 – 255.5	$y = -5.053 + 2.269x$	0.231	168.6
<b>Promedio</b>					<b>209.3</b>

Fuente: Elaboración propia (2014)

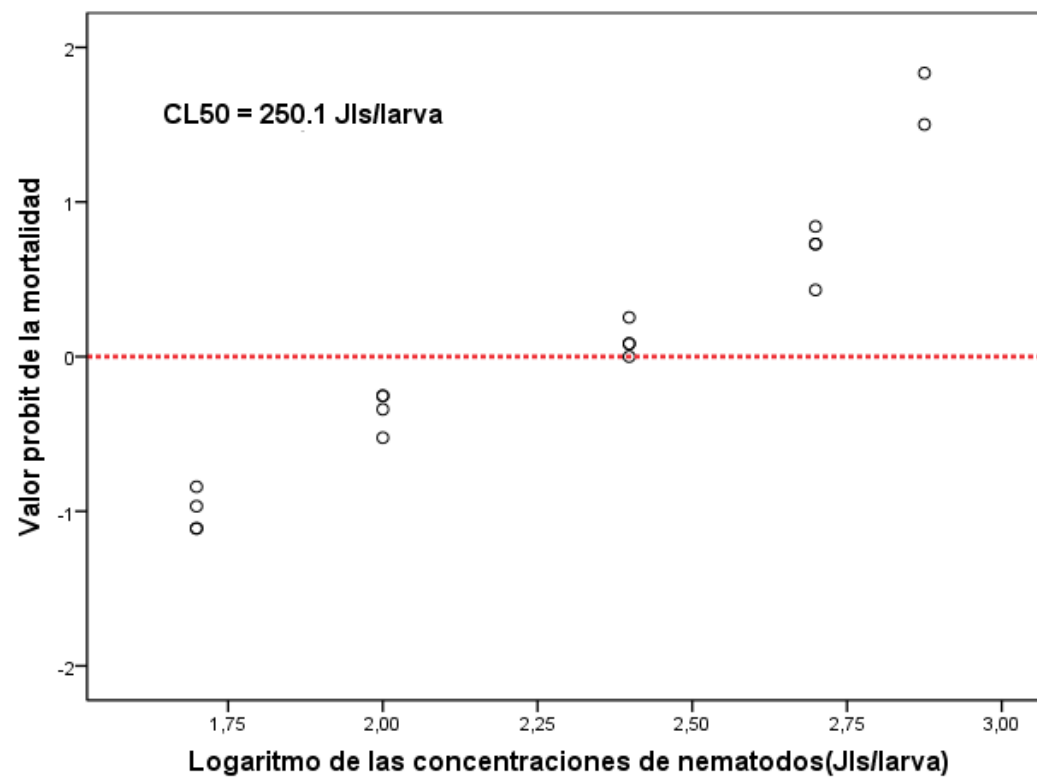
En las figuras 21, 22, 23 se observan las Concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ) de *Heterorhabditis sp* (Nativo) sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*, evaluadas a las 72 horas. También se observa que existe una relación directa entre el porcentaje de mortalidad (valor Probit de la mortalidad) y las concentraciones de los nemátodos (logaritmo de las concentraciones de nemátodos).

En estos gráficos se observa al marcador (de forma circular y borde negro), que indica el número de repeticiones que se han hecho por cada concentración de nemátodos, por lo tanto por cada concentración debe existir cuatro marcadores; donde se observa un número menor de marcadores, indica que estos están muy cerca o se han superpuesto.

En los anexos 19, 20 y 21 se muestra la forma como se recolectaron los datos para establecer la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) en la primera, segunda y tercera repetición en el tiempo.

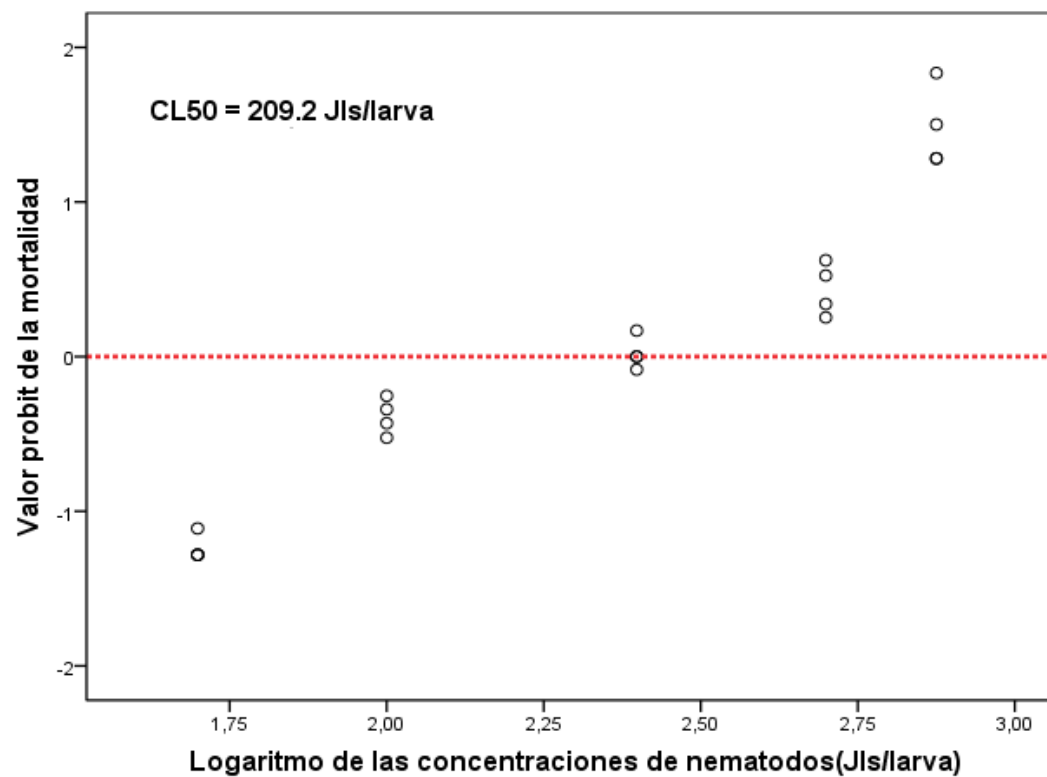
En los anexos 22, 23 y 24 se muestran de manera detallada los límites de confianza del análisis Probit que nos permitió determinar la  $CL_{50}$  de *Heterorhabditis sp* para la primera, segunda y tercera repetición en el tiempo.

Figura 21. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de *Heterorhabditis* sp (Nativo) sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*. Evaluación a las 72 horas (Primer ensayo).Lambayeque-Perú.2014. Línea roja, indica donde se encuentra la CL<sub>50</sub>.



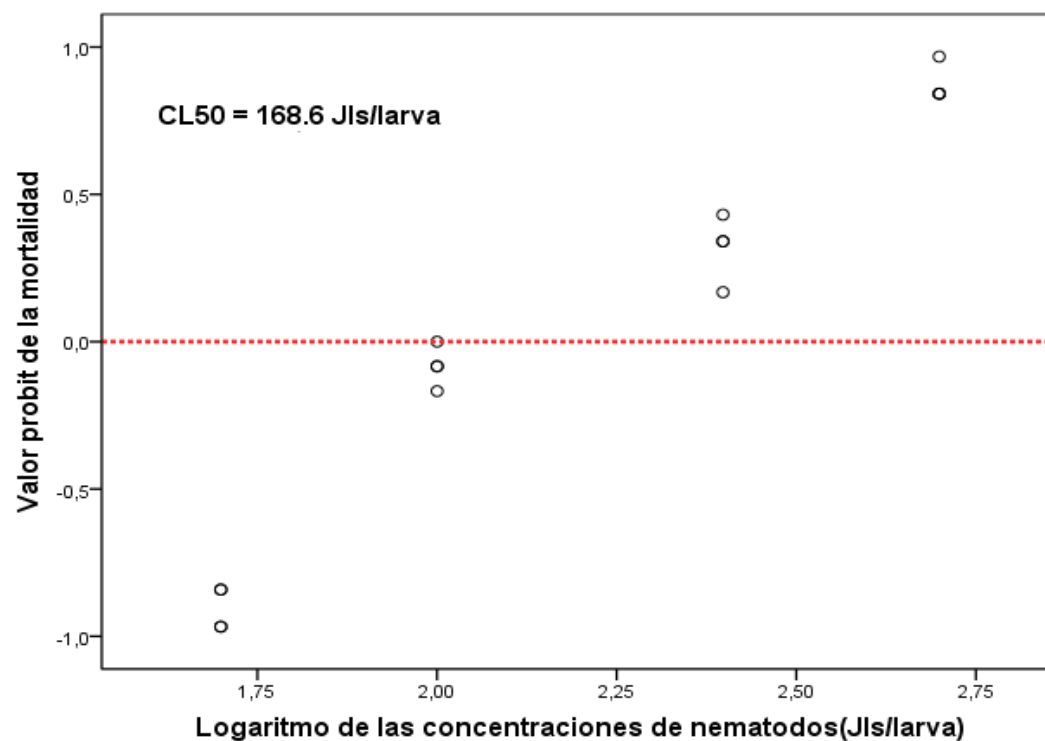
Fuente: Elaboración propia (2014)

Figura 22. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de *Heterorhabditis sp (Nativo)* sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*. Evaluación a las 72 horas (Segundo ensayo). Lambayeque-Perú.2014. Línea roja, indica donde se encuentra la CL<sub>50</sub>.



Fuente: Elaboración propia (2014)

Figura 23. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de *Heterorhabditis sp (Nativo)* sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*. Evaluación a las 72 horas (Tercer ensayo).Lambayeque-Perú.2014. Línea roja, indica donde se encuentra la CL<sub>50</sub>.



Fuente: Elaboración propia (2014)

## V. DISCUSIÓN

La presente investigación nos ha permitido conocer la patogenicidad de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio, la que se discute en los acápites siguientes:

### **5.1 Ensayo cinco en uno de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio.**

En el presente estudio, con el ensayo “cinco en uno” se obtuvo mortalidad con ambas cepas de nemátodos. En cambio en el grupo control no se registró mortalidad. El ensayo cinco en uno es utilizado para evaluar la calidad de los NEPs en muchas partes del mundo.

Existen múltiples ensayos para asegurar la calidad de los nemátodos entomopatógenos, entre estos tenemos: Concentración letal media (CL<sub>50</sub>), Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), ensayo cinco en uno; los cuales incluyen proporciones de más de 4JIs/larva, enmascarándose el comportamiento individual. Pero pueden llegar aislarse cepas en donde solo un juvenil infectivo puede ser capaz de matar al insecto, es por ello que *Molyneux et al* (1983) consideran que es de mucha importancia realizar bioensayos sobre la base de “uno en uno”. Sin embargo se siguió la metodología de *Kaya et al* (2005) con algunas modificaciones, quienes proponen que para nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* se debe utilizar el ensayo “uno en uno” y para nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* se debe utilizar el ensayo “cinco en uno”.

Con relación a los porcentajes de mortalidad obtenidos se muestra que hay diferencia significativa entre *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp ( $p < 0.05$ ). Para el primero se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 13.8 % y con la cepa nativa se obtuvo un porcentaje de

mortalidad de 17.4 %.Nuestros resultados son mejores que los obtenidos por *Ulvedal et al (2011)*, ellos con una dosis de 5 JIs/larva no obtuvieron mortalidad larval (0%).En cambio nuestros datos son similares a los reportes de *Cagnolo & Almirón(2010)* quienes con una dosis de cinco en uno (5:1) obtuvieron un porcentaje de mortalidad alrededor del 10% sobre larvas de *Culex apicinus* con el nemátodo *Steinernema rarum*.

Los porcentajes de mortalidad mostrados en esta investigación son inferiores a los reportados por *Zohdy et al (2013)*.Ellos obtuvieron mediante el ensayo “uno en uno” (1JI/larva) porcentajes de mortalidad con *Heterorhabditis indica* y *Heterorhabditis bacteriophora* de 10 % y 20 % aproximadamente sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*. Ese trabajo lo hicieron sobre larvas de 2<sup>do</sup>, 3<sup>ero</sup> y 4<sup>to</sup> estadio, en cambio nosotros solo lo hicimos con larvas de 2<sup>do</sup> estadio larvario.

Al existir diferencia significativa entre *Heterorhabditis sp* y *Heterorhabditis bacteriophora* ( $p<0.05$ ) y al presentar la cepa nativa un mayor porcentaje de mortalidad, esto nos indica que los nemátodos que ocurren de forma natural constituyen importantes candidatos para la selección de cepas promisorias, a partir de las cuales es posible desarrollar un nuevo agente de control biológico (*Sanchez,2002*).

Por otro lado, ambas cepas de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* que se establecieron en las larvas de *Aedes aegypti* fueron melanizadas, como una respuesta inmune de la larva del mosquito, evitando que los JIs se desarrollen hasta adulto. Esto concuerda con *Bronskill (1962)* y *Welch & Bronskill (1962)* quienes registraron la melanización en el nemátodo *rhabditido DD136* por larvas de *Aedes aegypti*.*Uvelda et al (2012)* señala que este mecanismo conduce a la muerte del nemátodo aunque no evita la muerte del hospedador debido a que las bacterias serían liberadas en el insecto antes que ocurra la deposición de la melanina.



## 5.2 Ensayo para establecer la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio de la cepa de nemátodo entomopatógeno que presente la mortalidad promedio mayor en el ensayo anterior.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) para la cepa *Heterorhabditis* sp (Nativo) sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* fue de 209.3 Jls/larva al ser inoculados con 50, 100, 250, 500, 750 Jls/larva. Nuestros resultados siguen el mismo patrón de respuesta a los cambios en la concentración de nemátodos que los primeros trabajos de Daad (1971) y Poinar & Kaul (1982).

Los datos mostrados en este estudio fueron mejores a los de Maharmart (2008), quien al exponer el NEP *Steinernema carpocapsae* sobre larvas de *Culex gelidus*, con una dosis de 2000 y 4000 Jls por larva obtuvo una mortalidad de 53.0% 63.0% respectivamente, estableciendo una dosis adecuada de 2000 Jls por larva. En cambio con *Heterorhabditis indica* no llegó al 50 % de mortalidad, con las dosis de 2000 y 4000 Jls por larva alcanzaron mortalidades de 8 % y 13 %, respectivamente.

Zohdy et al (2013) reportaron una CL<sub>50</sub> de 231.8 Jls/larva cuando aplicaron *Heterorhabditis bacteriophora* sobre larvas de segundo estadio de *Culex quinquefasciatus*, muy similar a la CL<sub>50</sub> obtenida en nuestro estudio (209.3 Jls/larva). Nuestros resultados fueron superiores a los obtenidos por Ulvedal et al (2011), en donde la DL<sub>50</sub> de *Heterorhabditis bacteriophora* para larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* fue de 99 Jls/larva y para larvas de segundo estadio de *Culex quinquefasciatus* fue 146 Jls/larva.

Nosotros decidimos probar los NEPs sobre larvas de segundo estadio, de acuerdo a Cagnolo & Almirón (2010), Ulvedal et al (2011) y Ávila & Vidal (2012), pero no lo hicimos sobre larvas de tercero y cuarto estadio larvario de *Aedes aegypti*, aunque también observamos parasitismo en estos estadios. Se trabajó con larvas de *Aedes aegypti* de segundo estadio porque no están muy esclerotizadas y para facilitar de esta manera que los Jls penetren en el hospedero. Además en esta etapa demoran de cinco a siete días para

convertirse en pupas, lo cual dió tiempo para mantener los bioensayos y hacer las evaluaciones antes de que el mosquito cambie de etapa.

Otros autores al aplicar los NEPs sobre larvas de 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> instar obtuvieron mejores resultados que al aplicarlos sobre larvas de 2<sup>do</sup> instar. *Zohdy et al (2013)* obtuvo una concentración letal media de 121.5 Jls/larva para *Heterorhabditis bacteriophora* y 141.4 Jls/larva para *Heterorhabditis indica* al aplicarlo sobre el 4<sup>to</sup> instar larvario de *Culex quinquefasciatus*. *Molta & Hominick (1989)* reportaron una DL<sub>50</sub> para *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis heliothidis* de 141 y 126 Jls sobre larvas de 3<sup>er</sup> instar de *Aedes aegypti*. Estos resultados están de acuerdo con el efecto del tamaño del huésped reportado por *Poinar y Kaul (1982)*. Ellos mencionan que el parasitismo en general es más alto en las larvas de cuarto estadio, esto debido al hecho que los hospederos más grandes podrían ingerir más fácilmente los nemátodos sin dañarlos. En contraste, larvas de segundo estadio rara vez ingieren nemátodos enteros, con frecuencia los aplastan con sus dientes inferiores debido a su apertura oral más pequeña (*Zohdy et al., 2013*).

Lo mencionado anteriormente puede ser debido a que la capacidad de búsqueda y penetración de juveniles al hospedante varía de acuerdo a la cepa o aislamiento y al hospedante que se emplee para la prueba de patogenicidad (*Griffin et al., 1989; Westerman., 1998*).

Se ha utilizado el análisis Probit para analizar los datos que nos permitan calcular la CL<sub>50</sub>. Sin embargo, cuando un parásito es altamente virulento, la aplicabilidad del Probit es cuestionable, ya que un solo nemátodo steinernematido o heterorhabditido es a menudo capaz de matar a un insecto (*Ricci et al., 1996*). *Zohdy et al (2013)* con una concentración de 1 Jls/larva (ensayo uno en uno) ya obtuvieron mortalidad sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, sin embargo nosotros recién obtuvimos mortalidad sobre larvas de *Aedes aegypti* cuando utilizamos la concentración de 5 Jls/larva, pero fue baja. Es por ello que para obtener porcentajes de mortalidad significativos al momento de establecer la CL<sub>50</sub> se utilizaron concentraciones desde 50 Jls/larva hasta 750 Jls/larva, basándonos en ensayos preliminares.

El hábitat acuático ofrece un excelente ambiente para la supervivencia de los nemátodos. Sin embargo, *Steinernema* y *Heterorhabditis* son organismos del suelo y no están adaptados para la motilidad dirigida en el entorno acuático (Joe, 2000). En los ensayos realizados observamos a los JIs nadando activamente para buscar las larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*, tanto en el ensayo “cinco en uno” como en el ensayo para determinar la CL<sub>50</sub>. Cuando se hacen ensayos con NEPs sobre larvas de *Galleria mellonella* en el suelo, se ha reportado que tienen dos estrategias básicas para encontrar al hospedante que son la “espera pasiva” (ambusher) y la “búsqueda activa” (cruiser) (Kaya y Gaugler, 1993; Lewis et al., 1993). Sin embargo, Cagnolo & Almirón (2010) mencionan que se requiere un diseño experimental apropiado con el fin de conocer el comportamiento de este nemátodo en el medio acuático.

El complejo nemátodo entomopatógeno-bacteria simbiote mata a los insectos tan rápidamente que no llega a establecerse una relación hospedante-parasito tan íntima y específica (Grewal y Georgis, 1999), tal como se vio en nuestro estudio al realizar las evaluaciones a las 72 horas y encontrar larvas de *Aedes aegypti* muertas. Esto representa una ventaja frente a otras asociaciones de nemátodos-insectos como son los nemátodos de la familia Mermithidae.

Recientemente, Ávila & Vidal (2012) han realizado aplicaciones del NEP *Steinernema carpocapsae* sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* en condiciones de campo. El ensayo se realizó a temperatura ambiente y parámetros físico-químicos básicos (O<sub>2</sub>, pH, temperatura, conductividad). El mejor tratamiento fue el de 500 000 nemátodos/ml que produjo 65% de mortalidad con respecto al grupo control después de 72 horas. Nuestro estudio como fue en condiciones controladas nos permitió establecer la CL<sub>50</sub> del NEP *Heterorhabditis* sp, en cambio Ávila & Vidal (2012), al estar en condiciones no controladas no determinaron la CL<sub>50</sub>, ya que la mortalidad de las larvas del mosquito pudo deberse a las variables físico-químicas y no por infección del nemátodo, que es el objetivo.

En conclusión los resultados de nuestra investigación permiten comprobar la hipótesis de patogenicidad de NEPs del género *Heterorhabditis* sobre larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*. *Heterorhabditis* sp (Nativo) al presentar una  $CL_{50}$  de 209.3 JIs/larva muestra un gran potencial para ser utilizado como agente de control biológico del mosquito *Aedes aegypti*. La importancia de este estudio es que es el primer intento en Perú para evaluar la patogenicidad de NEPs del género *Heterorhabditis* sobre larvas acuáticas, para reducir la población de mosquitos antes de la emergencia de adultos.

Los ensayos se realizaron a nivel de laboratorio y no necesariamente ofrecen una garantía de que funcionen en el campo, es por ello la importancia de continuar la evaluación de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* a fin determinar su patogenicidad, persistencia e impacto en el ecosistema.

## VI. CONCLUSIONES

- Se realizó el ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio donde el primer nemátodo entomopatógeno presentó una mortalidad de 13.8 % y el segundo nemátodo entomopatógeno presentó una mortalidad de 17.4 %.
- Se estableció la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del nemátodo entomopatógeno que presentó la mortalidad promedio mayor en el ensayo anterior, siendo este *Heterorhabditis* sp (Nematoda: Heterorhabditidae), sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Su concentración letal media fue 209.3 JIs/larva.

## VII. RECOMENDACIONES

Al concluir el presente trabajo de investigación se recomienda:

- Continuar con el mantenimiento y conservación de la cepa de nemátodo entomopatógeno nativa *Heterorhabditis* sp. , aislada del suelo de un campo de cultivo del distrito de Reque, para profundizar en su estudio y probarlo en condiciones de campo.
- Aislar más nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* del Departamento de Lambayeque. Éstos al ser nativos se adaptarían mejor a las condiciones climáticas, lo cual representaría una ventaja sobre las cepas de nemátodos entomopatógenos que se comercializan o las que proceden de otro lugar.
- Calcular la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de *Heterorhabditis bacteriophora* sobre larvas de *Aedes aegypti*.
- Profundizar en los ensayos que nos permiten calcular la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) para entender mejor el significado de este término en los insectos.
- Determinar la patogenicidad sobre el instar larval III, IV y pupas de *Aedes aegypti*.
- Realizar ensayos con nemátodos entomopatógenos (NEPs) de la familia *Steinernematidae*.
- Probar la efectividad de los nemátodos entomopatógenos (NEPs) sobre vectores de la Malaria, en especial sobre *Anopheles pseudopunctipennis*.

- Caracterizar bioquímicamente y molecularmente a la bacteria simbiote del nemátodo entomopatógeno nativo *Heterorhabditis sp* y a la bacteria simbiote de *Heterorhabditis bacteriophora*.
- Realizar ensayos pilotos en condiciones de campo de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* sobre los vectores del dengue y la malaria del departamento de Lambayeque.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABBOTT, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide, J. Econ. Entomol, 18: 265–267.
- ADAMS, B.; A.BURNELL, T.POWERS.1998. A phylogenetics analysis of Heterorabditis (Nematoda: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer I DNA sequence data. J. of Nematology 30:22-39.
- ADAMS, B.; K.NGUYEN. 2002. Taxonomy and Sistematics.In: Gaugler, R. (ed).Entomopathogenic Nematology.New Jersey: Rutgers University, 1-28.
- ADAMS, B.; A.FODOR; H.KOPPENHÖFER; E.STACKEBRANDT; P.STOCK; M.KLEIN.2006. "Reprint of Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogenus". Biological Control.37:32-49.
- AKHURST, R.1982.Antibiotic activity of Xenorhabdus spp., bacteria symbiotically associated of insect pathogenic nematodes of the family Heterorhabditidae and Steinernematidae. Journal of General Microbiology.128:3061-3066.
- AKHURST, R.1983.Taxonomy study of Xenorhabdus, a genus of bacteria symbiotically associate with insect nematodes.Internacional System Bacteriology.33:38-45.
- AKHURST, R.; N.BOEMARE. 1990. Biology and taxonomy of Xenorhabdus. Pp. 75- 90 En Entomopathogenic nematodes in Biological Control. R. Gaugler; H.K. Kaya (Eds).CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor- Boston
- ANDERSON, J.; R. RICO. 2006. Aedes aegypti vectorial capacity is determinated by the infecting genotype of Dengue virus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 75(5): 886.892.
- ÁVILA, M.; V. VIDAL.2012.Experimental infection of *Aedes aegypti* mosquito larvae with nematodes entomopathogenic (*Steinernema carpocapsae*) for biological control in Yucatán México. Centro de Investigación y de



Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad de Mérida (CINVESTAV).En: Annual Meeting Abstracts-Nematropica.Cancún, México.

BALTA, R.1997.Guía práctica para la identificación de *Aedes aegypti*. Lima: Instituto Nacional de Salud. Serie de Guías Entomológicas N° 2.

BEDDING, R.; A.MOLYNEUX. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (*Heterorhabditidae*: *Nematoda*). *Nematologica* 28:354-359.

BOEMARE, N.; R.AKHURST; R.MOURANT. 1993. DNA Relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J.. Syst. Bact.* 43(2): 249-255.

BOEMARE, N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: *Entomopathogenic nematology* (Gaugler, R. ed.), CABI Publishing, Wallingford, 35-56.

BREWER, M.; L.BUFA; L; W.ALMIRÓN.1987.*Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina.*Rev Per Entomol*, 29:69-72.

BRONSKILL, J.1962.Encapsulation of Rhabditoid nematodes in mosquitoes, *Can. J. Zool.*, 40: 1269-1275 <http://dx.doi.org/10.1139/z62-103>

CABALLERO, R.; T.TORRES; F.CHONG; A.PINEDA; M.ALTUZAR; B.LÓPEZ.2006.Concepciones culturales sobre el dengue en contextos urbanos de México. *Rev Saude Pública*.40:126-133.

CAGNOLO, S.; W.ALMIRÓN.2010.Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (*Rhabditida*: *Steinernematidae*) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae).*Rev.Soc.Entomol.Argent*.69 (1-2):141:145.

- CALISHER, C.; N. KARABATSOS; J. DALRYMPLE; R. SHOPE; J. PORTERFIELD; E. WESTAWAY. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*. 1989; 70(Pt 1):37-43.
- CICHE, T.; J. ENSIGN. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminiscens*, which end of a nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1890-1897.
- CICHE, T. 2007. The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. Disponible en: doi/10.1895/wormbook.1.135.1.
- CHADEE, D; J. BEIER; R. MOHAMMED. 2002. Fast and slow blood-feeding durations of *Aedes aegypti* mosquitoes in Trinidad. *Journal of Vector Ecology*. 27 (2):172-177.
- CHAVERRI, G. 2001. *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Mosquito del dengue, Zancudo del Dengue). *Especies disponibles*. INBIO.Sp.
- CÓRDOVA, O.; E. PÉREZ. 2010. Potencial biocontrolador de nemátodos entomopatógenos nativos (Rhabditida) sobre *Agrotis* sp (Lepidoptera: Noctuidae) en laboratorio. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- CRAT (Centro Regional de Ayuda Técnica). 1970. Claves para la identificación de mosquitos comunes de Estados Unidos. Guía instructivo: Lucha contra insectos. Departamento de salud, educación y bienestar de E.U.A. México. 43 p.
- CHRISTOPHERS, S. 1960. *Aedes aegypti*: The yellow fever mosquito. Cambridge University Press, London.
- DADD, R. 1971. Size limitations on the infectibility of mosquito larvae by nematodes during filter-feeding, *J. Invert. Pathol.* 18: 246-251  
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90152-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(71)90152-2)

- DANIS, R.; M. RODRÍGUEZ MH; M.HERNÁNDEZ. Gender-related family head schooling and *Aedes aegypti* larval breeding risk in Southern Mexico. *Salud Publica Mex* 2002; 44:237-242.
- DE DOUCET, M.; R.GABARRA.1994. On the occurrence of *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Heterorhabditidae) in Catalogne, Spain. *Fundamental and Applied Nematology* 17:441-443.
- DOMINGO, E.2002.Quasispecies theory in virology. *J.Virol*, 76(1), 463-465.
- DOBROKHOTOV B.1991. Alternatives to chemical methods for vector control. *Ann Soc Belg Med Trop*; 71(supl. 1):27-33.
- FERNÁNDEZ, S.2009. Biología y control de *Aedes aegypti*. Manual de operaciones. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2da. Edición. Monterrey, Nuevo León, México. 131 pp.
- FINNEY D.J.1971.*Probit Analysis* (3rd. ed.), London Cambridge University Press, 197: 318
- FISHER-LE SAUX, M.; H. MAULEÓN; P. CONSTANT; B. BRUNEL; N. BOEMARE, N. 1998. PCR-Ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts. *App. And Environ. Microbiol.* 64(11): 4246–4254.
- GARZA, J.2010.Determinación molecular del impacto de infecciones mixtas con el virus del dengue y *Metharizium anisopliae* sobre la capacidad reproductiva y vectorial de *Aedes aegypti*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Ciudad de Reynosa, México.
- GAUGLER, R.1987. "Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvement.In: *Biotechnological Advances in Invertebrate Pathology and Cell Culture*" (H.Maramorosh, Ed.).Pp.457-484. Academic Press, INC.New York.

- GAUGLER, R.1993.Ecological genetic of entomopathogenic nematodes.En  
“Nematodes and Biological Control of Insect Pests”. (R.Bedding,  
R.Akhurst and H.K. Kaya, Eds.pp.89-95.CSIRO Publications Melbourne.
- GAUGLER, R.;CAMPBELL. 1991. Selection for enhanced host-finding of  
scarab larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) in an entomopathogenic  
nematode. Environ. Entomol. 20, 700–706
- GAUGLER, R.; I.GLAZER; CAMPBELL, J; N.LIRAN.1994.Laboratory and field  
evaluation of an entomopathogenic nematode genetically selected for  
improved host-finding.J.Invertebr.Pathol.63 (1):68-74.
- GAUGLER, R; A.BEDNAREK; J.CAMPBELL.1992.Ultraviolet inactivation of  
Heterorhabditid and steinernematid  
nematodes.J.Invertebr.Pathol.59:155-160.
- GAUGLER, R.; H. KAYA.1990.Entomopathogenic Nematodes in Biological  
Control.Boca Raton, F.L.: CRC Press; 365.
- GAUGLER, R.; L. LEBECK; B. NAKAGARI; G. BOUSH.1980.Orientation of the  
entomopathogeus nematode Neoaplectana carpocapsae to carbon  
dioxide.Enviromental Entomology.9:649-652.
- GAUGLER, R.; T.MCGUIRRE; J.CAMPBELL.1989.Genetic variability among  
strains of the entomopathogenic nematode Steinernema  
feltiae.J.Nematol.21:247-253.
- GEORGIS, R. 1992. Present and future prospects for entomopathogenic  
nematode products. Biocontrol Sci. Technol. (2): 83-99.
- GERRITSEN; L.; G.WIEGERS; P.SMITS. 1998. Pathogenicity combinations of  
Heterorhabditis spp. and Photorhabdus luminescens against Galleria  
mellonella and Tipula oleracea. Biological Control 13:9-15.
- GIBBONS, V.; D.VAUGHAN.2002. Dengue: an escalating problem. Biologycal  
Medicine Journal.324: 1563-1566.
- GOODE, W.; P.HATT. 1986. Métodos de investigación social.14<sup>ava</sup> reimpresión.  
México. Editorial Trillas S.A.236 p.

- GÓMEZ, H.; S.IBÁÑEZ.1994.Dengue enfermedades tropicales en México, diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. Secretaria de Salud, México. Unidad 1:83-96.
- GÓMEZ, D.; M.RODRÍGUEZ. 1994. Paludismo y Dengue: de la erradicación a las zonas de riesgo. Cuadernos de Salud. Secretaría de Salud, México: 10, 55.
- GREWAL, P.; R.GEORGIS.1999.Entomopathogenic Nematodes. In: Biopesticides. Use and Delivery. F. R. Halla & J. J. Menn (Eds.) Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 271- 299 p.
- GREWAL P.S.; E.NARDO; M.AGUILERA.2001.Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America.Neotrop.Entomol. [serial on the Internet].30(2):191-205.Available from:[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519566X2001000200001&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519566X2001000200001&lng=en).doi:10.1590/S1519-566X2001000200001.
- GRIFFIN, C.; W. R. SIMONS. 1989. Activity and infectivity of four isolates of *Heterorhabditis* spp. *J. Invertebr. Path.* 53(1): 107-112.
- GUBLER, D.; CLARK; G.1995.Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis.*1:55-7.
- GUBLER, D. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinic Microbiology Reviews.*11 (3): 480-496.
- HALLEM, E.; M.RENGARAJAN; T.CICHE; P.STERNBERG.2007. Nematodes, Bacteria, and Flies: A Tripartite Model for Nematode Parasitism. *Current Biology* 17, 898–904.Disponible en: DOI 10.1016/j.cub.2007.04.027
- HATAB, M.; R.GAUGLER. 1997. Growth-mediated variations in fatty acids of *Xenorhabdus* sp. *J. Appl. Microbiol.* 82: 351-358.
- HOECK, P.; F.RAMBERG; S.MERRIL; C.MOLL; H.AGEDORN.2003.Population and parity levels of *Aedes aegypti* collected in Tucson. *Journal of Vector Ecology.* 28 (1)

- HOMINICK, W.; B. BRISCOE; F. DEL PINO; J. HENG; D. HUNT; E. KODOZOY; Z. MRACEK; K. NGUYEN; A. RIED; S. SPIRIDONOV; P. STOCK; D. STURHAN; C. WATURU; M. YOSHIDA. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Jour. Helminth.* 71: 271-298.
- HOMINICK, W. 2002. Biogeography. In: *Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler, (Ed). CAB Publishing, CAB International, New York, USA. 115-143
- JOE, W. 2000. Efficacy against insects in habitats other than soil. In: Gaugler R and Kaya HK. *Entomopathogenic nematodes in biological Control*. Boca Raton, F.L.: CRC Press, pp. 225.
- JOHNIGK, S.; R. EHLERS. 1999. Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology* 1: 717-726.
- KAYA, H. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control of insects. *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agriculture, Pest and Diseases*. Alan R. Liss, Inc.; 189-198.
- KAYA, H. 1993. Entomogeneous and entomopathogenic nematodes in biological control. In: Evans K, Trudgill DL and Webster JM. eds. *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK; pp. 565-591.
- KAYA, H.; J. ALCAZAR; J. SALAZAR. 2005. *Prácticas de Laboratorio con Nematodos Entomopatógenos*. In: *Curso de control biológico de Plagas mediante microorganismos, del 20 al 25 de junio*. Centro Internacional de la Papa. Lima.
- KAYA, H.; R. BEDDING; J. AKHURST. 1993. An overview of insect parasitic and entomopathogenic nematodes. In: *Nematodes and the biological control of insect pests*. East Melbourne Victoria (Australia), CSIRO, information service. p. 1-10.

- KAYA, H.; R. GAUGLER.1993.Entomopathogenic nematodes. Ann. Rev. Entomol. (38): 181-206.
- KAYA, H.; P.STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, LA. (Ed.)Techniques in insect pathology. London: Academic Press, pp 281-324.
- KAYA, H.; A.KOPPENHOFER.1999.Biology and ecology of insecticidal nematodes.En S.Polavarapu(Ed).Optima use of insecticidad nematodes in pest management.pp.1-8.New Brunswick, New Jersey: Rutgers University.
- KONDO, E.; N.ISHIBASHI.1991.Dependency of three steinernematid nematodes on their symbiotic bacteria for growth and propagation. Jap. J. Nematol. 21: 11-17.
- LAHARIYA, C.; S.PRADHAN.2006. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: a review. *J Vect Borne Dis* 43, December 2006, pp. 151–160.
- LANG,A.;G.SCHMIDT;A.SCHLOSSER;T.HEY;I.LARRINUA;J.SHEETS,J;H.MANNHERZ,H;K.AKTORIES. 2010. Photorhabdus luminiscens Toxins ADP-Ribosylate Actin and RhoA to Force Actin Clustering. *Science* 327, 1139.DOI:10.1126/Science.1184557.
- LECUONA, R.1996.Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Primera edición.Argentina.338 p.
- LEIVA; N; O.CÁCERES.2004.Variabilidad genética de Aedes aegypti en algunas áreas del Perú usando Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP). *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2004; 21(3): 157-66.
- LEWIS, E.; R. GAUGLER; R. HARRISON. 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Can. J.Zool.* 71: 765-769.

- LEWIS, J; G.CHANG; R.LANCIOTTI; R.KINNEY; L.MAYER; D.TRENT. 1993. Phylogenetic relationships of Ddengue-2 viruses. *Virology*.197 (1):216-24.
- LI, X.; WANG, G.1989.Preliminary investigation on the distribution of Steinernematidae and Heterorhabditidae in Fujian, Guangdong and Hainan. *Chinese Journal of Zoology* 24: 1-4.
- MAHARMART, S.2008.Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) against *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) larvae. A Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (Public Health) major in infectious diseases and epidemiology .Faculty of Graduate Studies, Mahidol University. Tailandia.
- MARQUETTI; M; J.BISSET.2008. Aspectos bioecológicos de importancia para el control de *Aedes aegypti* y otros culícidos en el ecosistema urbano. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias de la Salud. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Ciudad de Habana. Editorial Universitaria.ISBN 978-959-16-0754-6–186 pág.
- MÉNDEZ, G.; C.MONTESANO.1994. Manual para la vigilancia epidemiológica del dengue. Secretaria de salud. México. pp. 34-41.
- MÉNDEZ, G.; M.RIVAS; M.NÁJERA; M.INETTE; S.CANTO; F.SABIDO.1996. Proyecto de prevención y control del dengue 1995 – 1996. In Secretaría de Salud. Taller sobre avances recientes en el control de *Aedes aegypti* basado en la comunidad: México y Honduras. Mérida, Yucatán, México.22 – 24 de agosto de 1996: 32 – 81.
- MILSTEAD, J.1979. Heterorhabditis bacteriophora as a vector for introducing its associated bacterium into the hemocoel of *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr.Pathol.* 33(3): 324-327.
- MOLTA, N.; W.HOMINICK.1989.Dose- and time-response assessments of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema feltiae* [Nematoda: Rhabditida] against *Aedes aegypti* larvae. *Entomophaga*.Volumen 34, Issue 4, pp 485-493



- MOLYNEUX, A.; R.BEDDING; R.AKHURST. 1983. Susceptibility of larva of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* to various *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp. and underscribed steinernematid (Nematoda). *J. invertebr. Pathol.* 42(1): 7-10.
- MONTESINOS, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6: 245–252.
- NELSON, M. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. REF: PNSP/86-93. Washington, D.C: 50.
- OLDSTONE, M. 2002. Virus, pestes e historia. Fondo de Cultura Económica. México: 67-101.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).1986. *Resistance of Vectors and Reservoirs of Disease to Pesticides. Tenth Report of the WHO.*
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2008. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact Sheet.Nº117.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).2012. Travel Health Information Sheets. Public Health Information and Geographic Information Systems (GYS). Disponible en:[http://www.nathnac.org/pro/clinical\\_updates/images/Dengue\\_2011.jpg](http://www.nathnac.org/pro/clinical_updates/images/Dengue_2011.jpg)
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS).1995.Dengue hemorrágico en las Américas. Guía para su prevención y control. Publ. Científica No.598:1-109.
- PETEIRA, B.; M.RODRÍGUEZ; C.ROSALES; E.SALAZAR. 2008. Uso de técnicas moleculares en la identificación de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes. Revista digital del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Disponible en:[http://www.inia.gob.ve/index2.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=852&Itemid=28](http://www.inia.gob.ve/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=852&Itemid=28)

- PETERS, A.; R.EHLERS.1994.Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* y *Tipula oleracea*; *Tipula*: *Nematocera*) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*.63:163-171.
- POINAR, G.1979.Nematodes for biological control of insects.CRC Press, Boca Raton, FL.
- POINAR, G.; KAUL, H.1982, Parasitism of the mosquito *Culex pipiens* by the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*, *J. Invert. Pathol.* 39: 382-387  
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90063-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(82)90063-5)
- POINAR, G. 1990. Biology and taxonomy. Pp 23-61. En *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. R. Gaugler; H. K. Kaya (Eds). CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor- Boston
- POINAR, G.; P.HIMSWORTH.1967.Neoplectana parasitism of larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *J.Invertebr.Pathol*.9:241-246.
- POINAR, G.; G.THOMAS. 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as insect pathogen. *J. Invertbr. Pathol.* 9: 510
- RICE,C.1996.Flaviviridae:The viruses and their replication.In:Fields BN,Knipe DM,Howley PM,Chanock RM,Melnick JL,Monath TP,et al(ed.)*Fields virology* .3rd ed.Philadelphia:Lippicott-Raven Publisher.p.931-60.
- RICCI, M.; I. GLAZER; J.CAMPBELL; R.GAUGLER.1996.Comparison of Bioassays to Measure Virulence of Different Entomopathogenic Nematodes, *Biocontrol Science and Technol.*, 6: 235-246  
<http://dx.doi.org/10.1080/09583159650039421>
- SAEB, M.; T.AMR. 2006. Phylogenetic and population genetic studies on some insect and plant associated nematodes. PhD. Thesis Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of the Ohio State University
- SÁNCHEZ, L.2002.*Heterorhabditis bacteriophora* HC1.Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas.Universidad Agraria de La

Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez". Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.9613-2002.

SHEPARD, D; L.COUDEVILLE; Y.HALASA; B.ZAMBRANO; G.DAYAN.  
Economic Impact of dengue illness in the Americas. Am J Trop Med Hyg.  
2011; 84:200-7

SIMMONS, C.; J.FARRAR; N.VAN VINH CHAU; B.WILLS. 2012.  
Dengue.N.Engl.J. Med.366, 1423–1432.

SMART; G.1995.Viewpoint: Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects.Journal of Nematology 27(4S):529-534.

SMITS, P.; J.GROENEN; G.DERAAY.1991.Characterization of Heterorhabditis isolates using DNA restriction fragment length polymorphisms. Review of Nematology 14,445-453

STEINHAUS, E.; M.MARTIGNONI.1970. An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology (2<sup>nd</sup> edition).USDA Forest Service,PNW Forest and Range Experiment Station.

STOCK, P.1993. A new species of the genus Heterorhabditis Poinar, 1976(Nematoda: Heterorhabditidae) parasitizing Graphognathus sp. larvae (Coleoptera: Curculionidae) from Argentina. Research and Reviews in Parasitology 53: 103-107.

STOCK, P.; T.GRIFFIN; A.BURNELL.2002.Morphological characterization of three isolates of Heterorhabditis Poinar, 1976 from the 'Irish group' (Nematoda: Rhabditida: Heterorhabditidae) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, H. downesi n. sp. Systematic Parasitology 51:95-106.

STOCK, P.; D.HUNT.2005. Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. In Nematodes as Biocontrol Agents, Grewal, P. S., R. U. Ehlers, and D. Shapiro-Ilan. (Eds.). CABI publishing, CAB International, Oxon, U. K. 1-68

- STOCK, P.; B.PRYOR; H.KAYA.1999.Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA.Biodiversity and Conservation 8: 535-549
- TANADA, Y.; H.KAYA.1993.Insect pathology. Academic Press, San Diego, CA.USA. 666 p
- TDR.1993Progress Report 1991-92.Geneva: WHO.
- THIRIÓN, J.2003.El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. Bayer Environmental Science. México.
- THOMAS, G.; POINAR, G. 1979. *Xenorhabdus* gen.nov, a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae.Internacional Journal of Systematic Bacteriology 29:352-360.
- TIMPER, P.; H.KAYA; R.GAUGLER.1988. Dispersal of the entomopathogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) by infected adult insects.Environ.Entomol.17 (3):546-550.
- TRPIS, M.1977.Autogeny in diverse population of *Aedes aegypti* from East Africa. Tropical Medicine and Parasitology, 28:77-82.
- TWIDDY, S.; E.HOLMES.2003.The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*.J.Gen.Virol.84, 429-440
- ULVEDAL, C.; M.BERTOLOTTI; M.GRECH; S.GAGNOLO; W.ALMIRÓN. 2011. Infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) en larvas de *Aedes aegypti* (L.) Y *Culex quinquefasciatus* Say en condiciones de laboratorio. Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba.Univesidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- ULVEDAL, C.; M.BERTOLOTTI; M.GRECH; S.CAGNOLO; W.ALMIRON. 2012. Melanización de juveniles infectivos pertenecientes a dos aislados de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda) por *Aedes aegypti*

(L.)(Diptera).XI Jornada de Ciencias Naturales de Litoral.III Reunión Argentina de Ciencias Naturales.

VARMA, M.1989.Mosquito-borne virus diseases.En: World Health Organization. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. Geneva: WHO ;( Document WHO/VBC/89.967) [<http://dataserver.ciesin.org/docs/001-613/001-613.html>]

VILLASECA, P.2013.Capacitación en la crianza del mosquito *Aedes aegypti* (Comunicación personal).Lima, Perú, Instituto Nacional de Salud (INS)

WANG, E.; H.NI; R.XU; A.BARRET; S.WAROWICH, S.J., D.GUBLER.2007.Evolutionary Relationship on endemic/epidemic and sylvatic Dengue Viruses.J.Virol.74, 3227-3234

WANG, K.; S.LIN; C.LEE; C.KING; S, CHANG.2002.Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies.J.Virol.76, 4662-4665.

WASSINK, H.; POINAR, G. 1984. Nematological review-use of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae: Rhabditida), in Latin America.Nematropica 14:97-110.

WEABER, S.; A, BARRET. 2004. Transmssion cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nat Rev.Microbiol.2, 789-801.

WELCH; H; J.BRONSKILL. 1962. Parasitism of mosquito larvae by the nematode DD136 (Nematoda: Neoaplectanidae), Can. J. Zool., 40: 1200-1208 <http://dx.doi.org/10.1139/z62-102>

WESTERMAN, P. 1998. Penetration of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* spp. into host insects at 9 and 20°C. J. Invert. Path. 72: 197-205.

WOODRING, J.; H.KAYA. 1998. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of biology and techniques. Arkansas, Estados Unidos, Arkansas Agricultural Experiment Station. 19 p

ZOHDY, N.; M.SHAMSELDEAN; E.ABB-EL-SAMIE; H.HAMAMA.2013.Efficacy of the Steirnenematid and Heterorhabditid Nematodes for Controlling the Mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae).Journal of Mosquito Research.Vol.3, No5.33-44. (doi:10.5376/jmr.2013.03.0005).

<http://hospitalcubara.gov.co/wp-content/uploads/2013/02/ciclo-de-vidamosquito-aedes-aegypti.jpg>

<https://earth.google.es/>

## **ANEXOS**

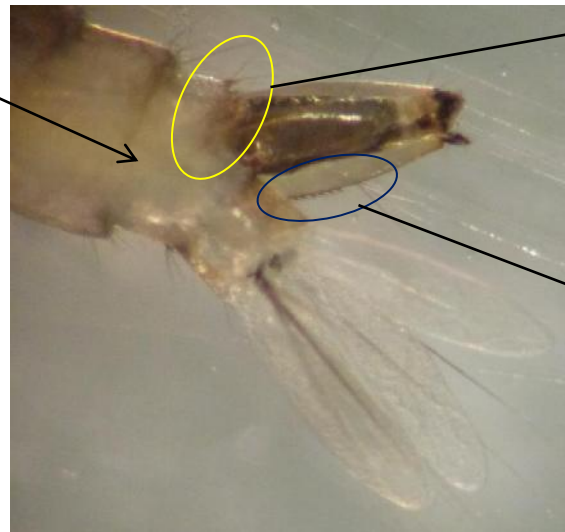
**Anexo 1.** Fechas y el lugar de colecta de las larvas de *Aedes sp* en la localidad de Motupe.

#	Fecha	Lugar de colecta	Deposito
1	16-11-13	Sector II	Tinaja de barro
2	18-11-13	Sector III	Barril
3	18-11-13	Sector III	Balde
4	20-11-13	Sector III	Florero
5	20-11-13	Sector III	Tina
6	20-11-13	Sector V	Barril
7	21-11-13	Sector V	Florero
8	21-11-13	Sector V	Barril
9	21-11-13	Sector V	Florero
10	21-11-13	Sector V	Florero
11	22-11-13	Sector IV	Barril
12	25-11-13	Sector III	Balde
13	26-11-13	Sector VII	Balde
14	26-11-13	Sector VII	Florero

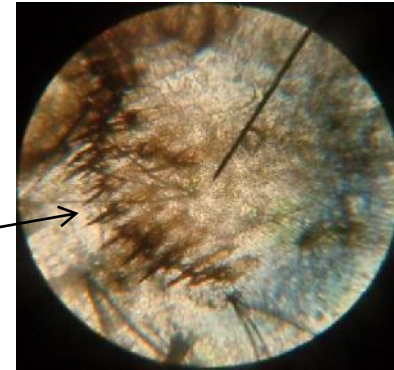
En este cuadro se muestra las fechas en las que se llevó a cabo la recolección de larvas de *Aedes sp* en la localidad de Motupe. También se muestra en que sector de Motupe se realizó la recolección (en el plano urbano Motupe está dividido en ocho sectores) y en qué tipo de depósito.



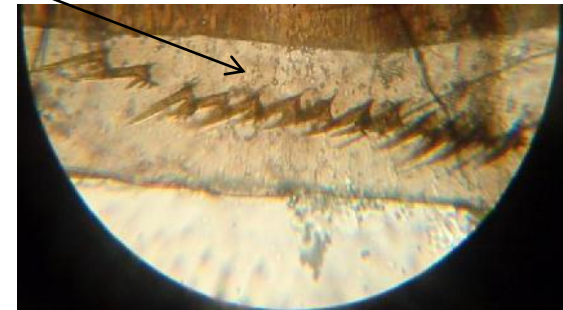
**Anexo 2.**Identificación del mosquito *Aedes Aegypti* en el estadio de larva (*Nelson, 1986*)



Escamas del Peine (del VIII segmento abdominal)



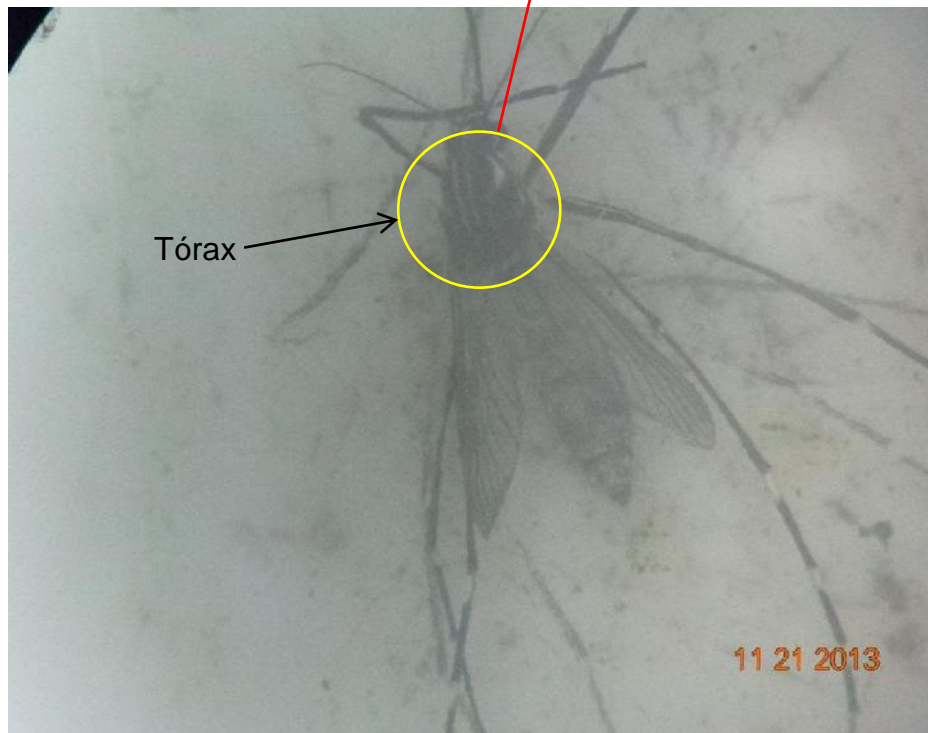
Escamas del Pecten (del Sifón)



Espinas laterales (espinas torácicas)

**Anexo 3.** Identificación de *Aedes aegypti* en el estadio de adulto (Méndez & Montesano, 1994)

Manchas plateadas dan la  
“apariencia de una lira” en  
la parte del Mesonoto  
(Scutum)



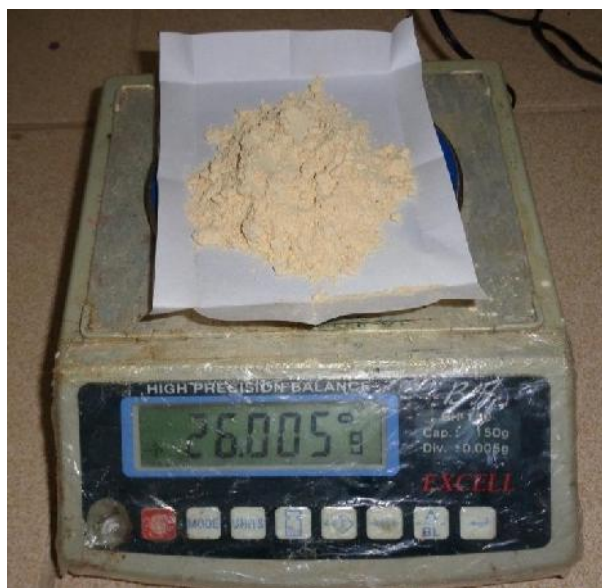
#### **Anexo 4.**Preparación de la “Dieta Seca” para *Aedes aegypti* (*Villaseca, comunicación personal*)

Para preparar esta dieta se utilizan tres ingredientes: Harina de arveja, hígado de pollo y Sera micrón. Éstos se mezclan en una proporción 13:1:1. Por lo tanto si utilizamos 13 g de arveja, tendremos que usar 1g de hígado de pollo y 1g de Sera micrón. Esta dieta es sólo para la alimentación de la etapa larvaria de *Aedes aegypti*.

La harina de arveja se consigue en el mercado, ya la venden procesada. Es rica en proteínas.

El hígado de pollo es rico en proteínas y sales minerales. Se lo tiene que licuar, después llevarlo al horno y mantenerlo a 35 °C aproximadamente. Dejarlo en el horno hasta el día siguiente. Luego al producto obtenido se lo tritura en un mortero.

El Sera micrón es un alimento de cría microfino para todos los peces de las especies ovíparas, que pueden comer inmediatamente después de comenzar a nadar. Permite que las larvas de *Aedes aegypti* se desarrollen más rápido.



Pesando harina de arveja en una balanza digital.



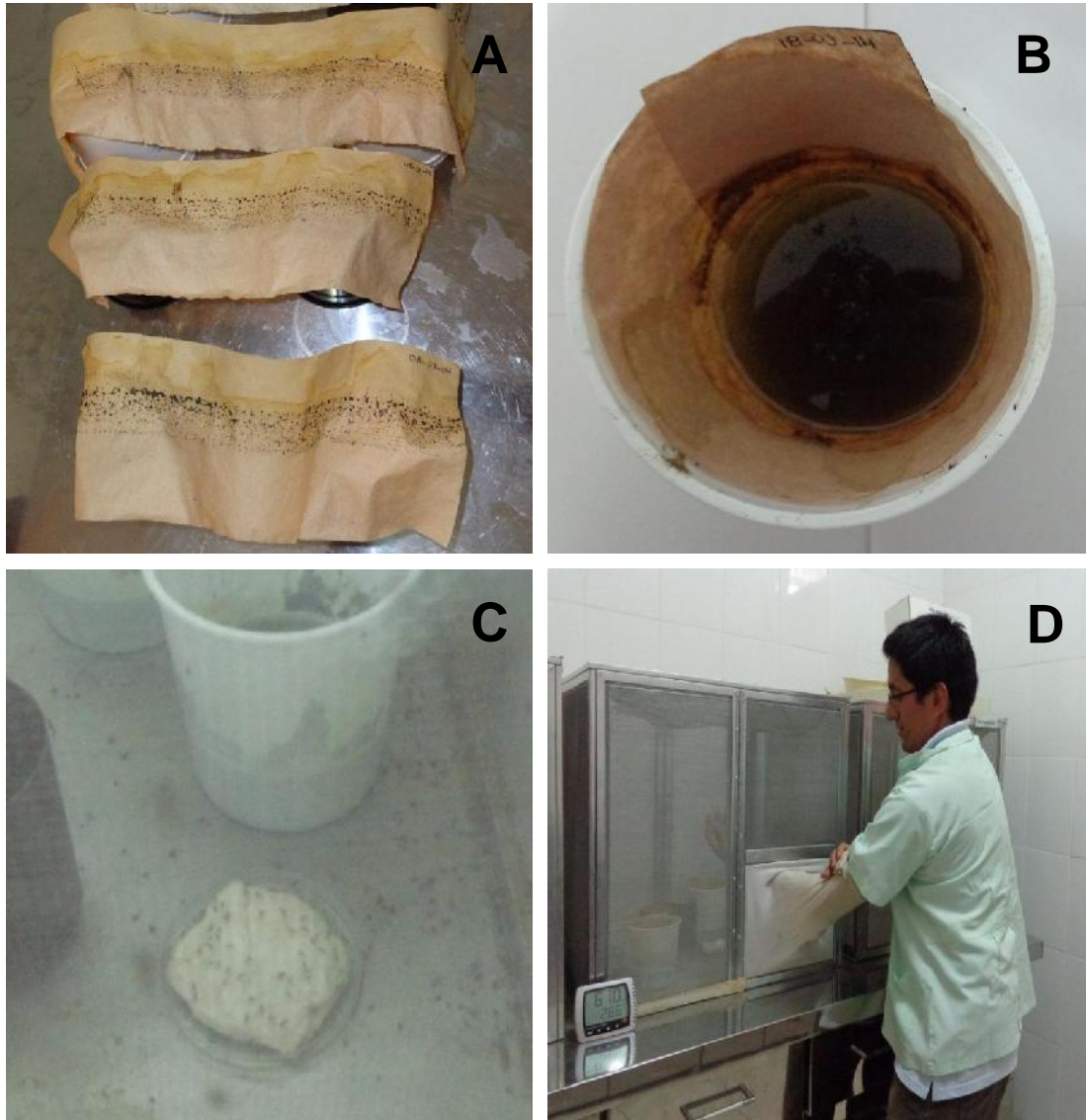
En la primera imagen se muestra el hígado de pollo licuado sobre una placa de Petri. En la segunda imagen se muestra el polvo que se obtiene después de sacar el hígado de pollo del horno y triturarlo en un mortero. Este se pesa en una balanza digital.



En la primera foto se está pesando el Sera micrón en una balanza digital y en la segunda foto se muestra la "Dieta seca" obtenida de la mezcla de los tres ingredientes anteriores.



**Anexo 5.** Realizando la crianza de *Aedes aegypti*.



(A)Secando a temperatura ambiente el papel kraft que contiene adheridos los huevos de *Aedes aegypti*.(B) Vista superior del recipiente que contiene a las larvas y pupas de *Aedes aegypti*.(C)Algodón embebido en una solución azucarada al 10%, los puntos negros son los mosquitos que se están alimentando.(D)Alimentando a las hembras de *Aedes aegypti* con sangre humana.

## **Anexo 6.** Medio de cultivo de *Galleria mellonella* (Córdova y Pérez, 2010)

Medio de cultivo utilizado para la crianza de *Galleria mellonella* facilitado por La EEA.VF-INIA.

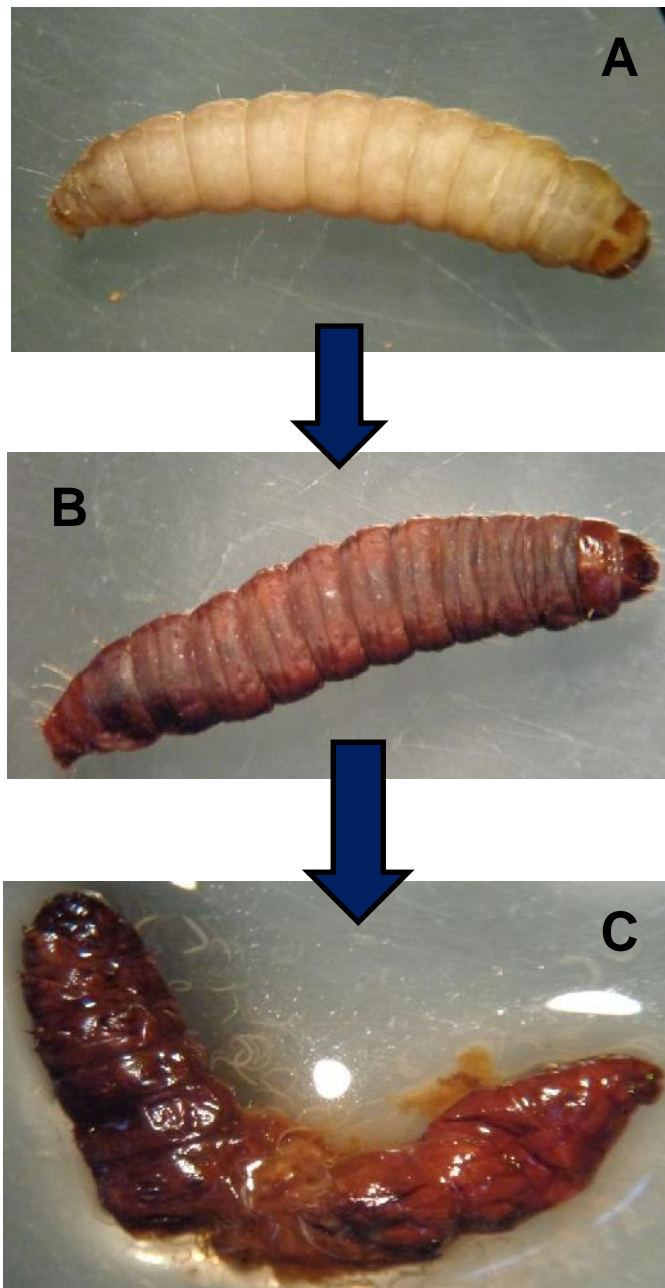
<b>Ingredientes*</b>	<b>Preparación</b>
225 g de Ricocan 125 g de Salvado de trigo  225 g de miel de abeja	<b>Larvas:</b> Mezclar Ricocan, salvado de trigo y miel en la proporción 2:1:2 hasta obtener una pasta de consistencia semisólida. Colocar el alimento en tapers** y posteriormente colocar las larvas.
10 g de granos de polen(solo para cría de huevos)	<b>Huevos:</b> Realizar la misma mezcla para larvas. Triturar granos de polen y espolvorear en el alimento a través de un colador***.Después colocar los huevos.

\* Cantidades para la cría de 100 larvas.

\*\*Los tapers se colocan en una zona oscura. Revisar el desarrollo de las larvas diariamente.

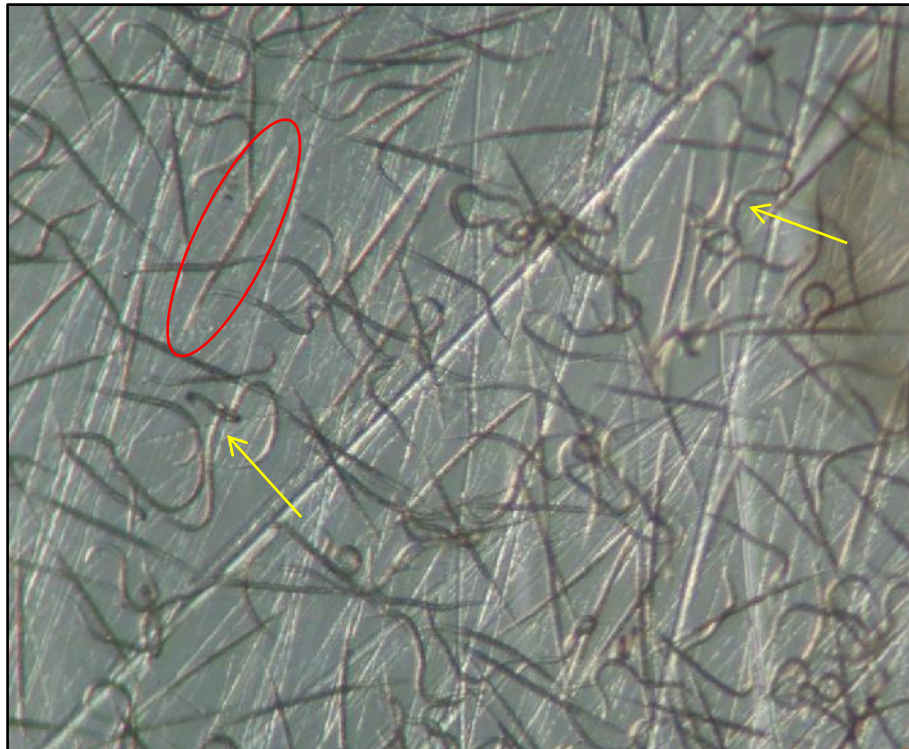
\*\*\*Los granos de polen deben ser lo más fino posible

**Anexo 7.** Identificación de NEPs del género *Heterorhabditis* sobre larvas de *Galleria mellonella* (Kaya y Stock, 1997)



(A) Larva de *Galleria mellonella* antes de ser infectada por los NEPs, esta posee un color cremoso. (B) Larva de *Galleria mellonella* infectada por NEPs, la coloración roja indica que se debe a NEPs del género *Heterorhabditis* (Familia Heterorhabditidae). (C) Disección de la larva de *Galleria mellonella* infectada por NEPs del género *Heterorhabditis*, donde se confirma la presencia de los nemátodos.

**Anexo 8.**Diferenciando NEPs del género *Heterorhabditis* vivos y muertos.



Los vivos se mueven, los muertos están inmóviles. Los muertos adoptan la “forma de una aguja”. El nemátodo que está encerrado en el círculo rojo está muerto. Las flechas amarillas están señalando a nemátodos vivos.



**Anexo 9.** Juveniles infectivos y adulto de NEPs del género *Heterorhabditis*.



En la imagen de la izquierda se observa a los juveniles infectivos (JIs), también conocidos como Juvenil 3 o “larva Dauer”. En la imagen de la derecha se observa al adulto (probablemente una hembra hermafrodita) de los NEPs del género *Heterorhabditis*.

**Anexo 10.** Comparación entre larva de *Aedes aegypti* muerta por otras causas (no NEPs) y larva de *Aedes aegypti* muerta por efecto de los NEPs del género *Heterorhabditis*.

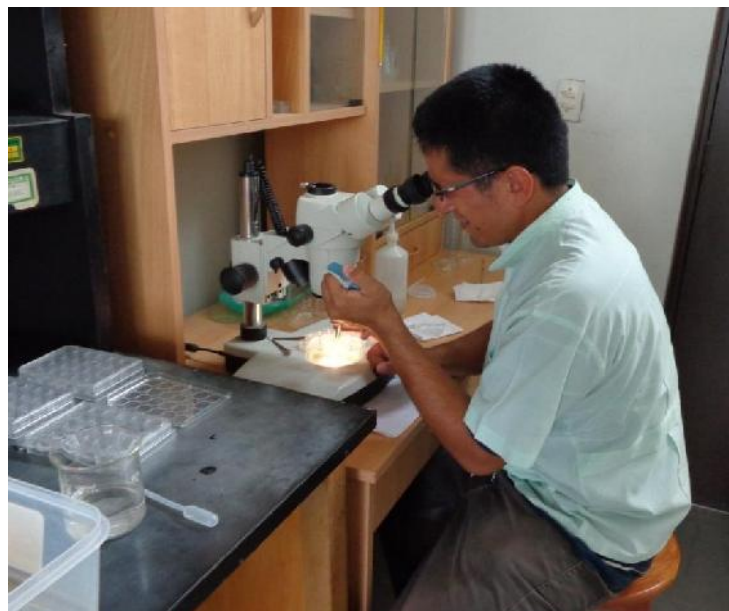


En la imagen de la izquierda la larva de *Aedes aegypti* presenta una coloración clara; esta larva muerta se puede deber a otras causas (muerte natural, daño mecánico, otros) mas no por efecto de los NEPs. En la imagen de la derecha la muerte de la larva se debe a los NEPs; esta larva presenta una coloración oscura (color ladrillo) y se puede observar en su interior a los NEPs.

**Anexo 11.** Realizando el ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio.



Colocando larvas de *Aedes aegypti* de segundo estadio sobre una celda (pocillo) de la placa de DAS-ELISA. Dos días antes se hizo eclosionar los huevos de *Aedes aegypti*.



Colocando 5 J1s sobre una celda (pocillo) de la placa de DAS-ELISA. Esto se realizó con ayuda del Estereomicroscopio y una micropipeta.

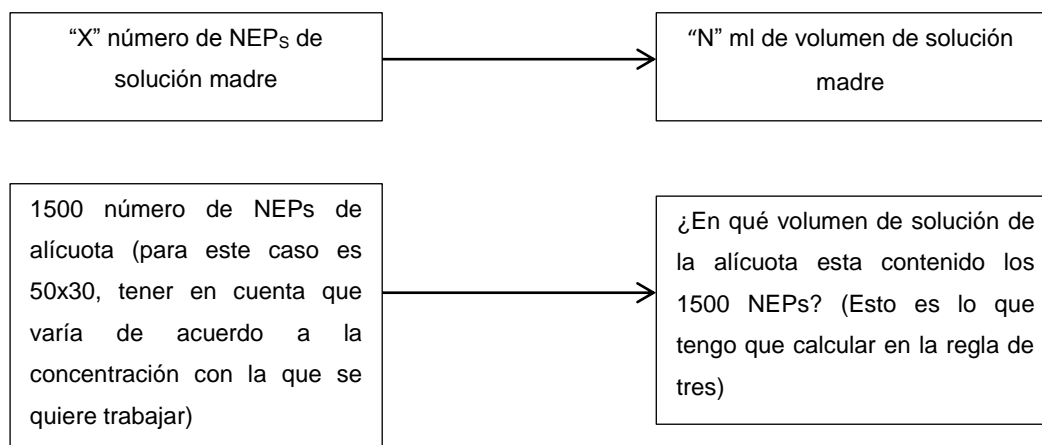
**Anexo 12.** Realizando el ensayo para establecer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del NEP *Heterorhabditis* sp.



(A) Haciendo eclosionar a los huevos de *Aedes aegypti*. (B) Tomando una alícuota de NEPs de la solución madre para después, (C) colocarlo en la unidad experimental, después se afora a 60 ml con ADE. (D) Por último se colocan en las unidades experimentales las larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*. En cada unidad experimental deben ir 30 larvas de *Aedes aegypti*.

**Anexo 13.** Procedimiento para calcular una concentración(o dosis) determinada de *Heterorhabditis sp (Nativo)* para aplicarlo sobre larvas de *Aedes aegypti* (para ensayo de CL<sub>50</sub>)

- ✓ Calcular el volumen de la de la solución madre de NEPs.
- ✓ Determinar el número de NEPs en la solución madre.
- ✓ Multiplicar la concentración(o dosis) con la que queremos trabajar por el número de larvas de la Unidad experimental (en nuestro caso es 30).Por lo tanto si queremos trabajar con la concentración de 50 JIs/larva, se multiplica  $50 \times 30 = 1500$  NEPs .Hacer lo mismo con las otras concentraciones (100, 250, 500, 750)
- ✓ Realizamos una regla de tres para determinar el volumen NEPs que vamos añadir a la unidad experimental.



- ✓ El resultado obtenido es el volumen que vamos agregar a una unidad experimental, en este caso para la concentración de 50 JIs/larva.
- ✓ Lo que falta para llegar a 60 ml (volumen en que se aforó cada unidad experimental) se lo completa con ADE.
- ✓ Se le resta al volumen de la solución madre el resultado encontrado en la regla de tres. Y también se resta al número de NEPs de la solución madre el número de NEPs de la alícuota (que en este caso sería 1500).Del procedimiento anterior vamos obtener una nueva solución madre.
- ✓ Con esta nueva solución madre se repite el procedimiento anterior. Así sucesivamente hasta completar las 20 unidades experimentales a las que se debe añadir los NEPs. Al grupo control solo se le añade ADE y también se afora a 60 ml.



**Anexo 14.** Evaluando a las 72 horas las larvas de *Aedes aegypti* parasitadas y/o muertas por los NEPs del género *Heterorhabditis*.



Evaluación en el ensayo “cinco en uno”. En la foto se muestra los materiales que fueron utilizados para realizar los cortes histológicos.



Evaluación en el ensayo para establecer la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de *Heterorhabditis* sp. Se muestra los materiales que fueron utilizados para realizar los cortes histológicos.

**Anexo 15.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio (Primera repetición). En donde X: larva de *Aedes aegypti* muerta por JIs.

n	Heterorhabditis bacteriophora	Heterorhabditis sp	Control
1	X	X	
2			
3			
4			
5	X		
6			
7		X	
8			
9			
10			
11			
12	X		
13			
14			
15			
16			
17		X	
18			
19			
20	X		
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27	X		
28			
29			
30			
31			
32	X	X	
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39	X		
40		X	
41	X		
42			
43		X	
44			
45			
46	X		
47			
48			

**Anexo 15.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio (Primera repetición). En donde X: larva de *Aedes aegypti* muerta por JIs (**Continuación**).

n	Heterorhabditis bacteriophora	Heterorhabditis sp	Control
49		X	
50			
51			
52	X		
53			
54		X	
55			
56			
57			
58	X		
59			
60			
61			
62			
63			
64			
65			
66	X		
67		X	
68			
69			
70			
71			
72			
73			
74			
75	X	X	
76			
77			
78			
79			
80		X	
81		X	
82			
83			
84			
85			
86	X		
87	X		
88			
89		X	
90	X		
91			
92			
93			
94		X	
95	X		
96			



**Anexo 16.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio (Segunda repetición). En donde X: larva de *Aedes aegypti* muerta por JIs.

n	Heterorhabditis bacteriophora	Heterorhabditis sp	Control
1		X	
2			
3	X		
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12	X	X	
13			
14			
15			
16	X		
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24	X	X	
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33		X	
34		X	
35			
36	X		
37			
38			
39	X	X	
40			
41			
42			
43			
44	X		
45			
46		X	
47			
48			

**Anexo 16.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio (Segunda repetición). En donde X: larva de *Aedes aegypti* muerta por JIs (**Continuación**).

n	Heterorhabditis bacteriophora	Heterorhabditis sp	Control
49		X	
50			
51			
52			
53	X		
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63	X	X	
64			
65			
66			
67			
68		X	
69			
70			
71			
72	X		
73	X		
74			
75			
76			
77		X	
78			
79			
80			
81			
82	X		
83			
84			
85			
86			
87			
88	X		
89			
90	X	X	
91			
92			
93			
94			
95	X		
96	X	X	

**Anexo 17.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio (Tercera repetición). En donde X: larva de *Aedes aegypti* muerta por JIs.

n	Heterorhabditis bacteriophora	Heterorhabditis sp	Control
1	X	X	
2			
3			
4		X	
5	X		
6			
7			
8			
9		X	
10	X		
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19	X		
20		X	
21			
22			
23			
24			
25			
26		X	
27	X		
28			
29			
30			
31			
32			
33		X	
34			
35			
36			
37	X		
38			
39			
40			
41	X	X	
42			
43			
44			
45	X		
46			
47			
48			

**Anexo 17.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio (Tercera repetición). En donde X: larva de *Aedes aegypti* muerta por JIs (**Continuación**).

n	Heterorhabditis bacteriophora	Heterorhabditis sp	Control
49		X	
50			
51	X		
52			
53			
54			
55	X		
56		X	
57			
58			
59			
60			
61			
62	X	X	
63			
64			
65			
66			
67			
68			
69			
70		X	
71			
72	X		
73			
74			
75			
76		X	
77			
78			
79			
80	X		
81		X	
82			
83	X		
84			
85			
86			
87			
88			
89	X		
90			
91			
92	X		
93			
94	X		
95			
96			

**Anexo 18.** Análisis estadístico de los datos del ensayo “cinco en uno” de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: *Heterorhabditidae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio.

Para el ensayo “cinco en uno” se realizó la Prueba t de student de muestras independientes. En donde tenemos que:

- ✓ **Variable dependiente:** Larvas de *Aedes aegypti* (Mortalidad)
- ✓ **Variable independiente:** Nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*
- ✓ **Tratamientos:** *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp

**Modelo estadístico asociado al diseño:**

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1X_2} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}}$$

Dónde:

$$S_{X_1X_2} = \sqrt{\frac{1}{2}(S_{X_1}^2 + S_{X_2}^2)}$$

Aquí  $S_{X_1X_2}$  es la desviación estándar combinada, 1 = grupo uno, 2 = grupo 2. El denominador de  $t$  es el error estándar de la diferencia entre las dos medias.

Por prueba de significancia, los grados de libertad de esta prueba se obtienen como  $2n - 2$  donde  $n$  es el número de participantes en cada grupo.

**Hipótesis:**

- ✓ **Hipótesis nula ( $H_0$ ):** No existe diferencia significativa entre los tratamientos.
- ✓ **Hipótesis alternativa ( $H_a$ ):** Al menos el efecto de un tratamiento es diferente de los demás.

**Anexo 19.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo para establecer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de *Heterorhabditis sp* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Primera repetición en el tiempo.

Concentración(Jls/larva)	Número total larvas	Larvas vivas	Larvas muertas
0	30	30	0
0	30	30	0
0	30	30	0
0	30	30	0
50	30	26	4
50	30	24	6
50	30	26	4
50	30	25	5
100	30	19	11
100	30	18	12
100	30	21	9
100	30	18	12
250	30	15	15
250	30	12	18
250	30	14	16
250	30	14	16
500	30	10	20
500	30	7	23
500	30	7	23
500	30	6	24
750	30	2	28
750	30	0	30
750	30	0	30
750	30	1	29

Cada dosis se repite 4 veces en la columna de Concentración porque ese es el número de repeticiones por tratamiento.

**Anexo 20.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo para establecer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de *Heterorhabditis sp* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Segunda repetición en el tiempo.

Concentración(Jls/larva)	Número total larvas	Larvas vivas	Larvas muertas
0	30	30	0
0	30	30	0
0	30	30	0
0	30	30	0
50	30	27	3
50	30	27	3
50	30	26	4
50	30	27	3
100	30	19	11
100	30	20	10
100	30	21	9
100	30	18	12
250	30	15	15
250	30	15	15
250	30	16	14
250	30	13	17
500	30	12	18
500	30	11	19
500	30	8	22
500	30	9	21
750	30	1	29
750	30	3	27
750	30	2	28
750	30	3	27

Cada dosis se repite 4 veces en la columna de Concentración porque ese es el número de repeticiones por tratamiento.

**Anexo 21.** Ficha donde se registraron los datos del ensayo para establecer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de *Heterorhabditis sp* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Tercera repetición en el tiempo.

Concentración(Jls/larva)	Número total larvas	Larvas vivas	Larvas muertas
0	30	30	0
0	30	30	0
0	30	30	0
0	30	30	0
50	30	24	6
50	30	25	5
50	30	24	6
50	30	25	5
100	30	17	13
100	30	15	15
100	30	16	14
100	30	16	14
250	30	13	17
250	30	10	20
250	30	11	19
250	30	11	19
500	30	6	24
500	30	5	25
500	30	6	24
500	30	6	24
750	30	0	30
750	30	0	30
750	30	0	30
750	30	0	30

Cada dosis se repite 4 veces en la columna de Concentración porque ese es el número de repeticiones por tratamiento.



**Anexo 22.** Límites de confianza del ensayo para establecer la CL<sub>50</sub> de *Heterorhabditis* sp sobre larvas de *Aedes aegypti*. Primera repetición en el tiempo.

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración			Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>a</sup>		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0.010	32.990	5.559	73.401	1.518	0.745	1.866
	0.020	41.829	8.164	87.245	1.621	0.912	1.941
	0.030	48.628	10.417	97.365	1.687	1.018	1.988
	0.040	54.461	12.513	105.754	1.736	1.097	2.024
	0.050	59.719	14.524	113.114	1.776	1.162	2.054
	0.060	64.592	16.487	119.787	1.810	1.217	2.078
	0.070	69.191	18,425	125,965	1.840	1.265	2.100
	0.080	73.585	20.352	131.772	1.867	1.309	2.120
	0.090	77.824	22.278	137.289	1.891	1.348	2.138
	0.100	81.942	24.212	142.576	1.914	1.384	2.154
	0.150	101.439	34.160	166.777	2.006	1.534	2.222
	0.200	120.193	44.885	189.002	2.080	1.652	2.276
	0.250	139.022	56.708	210.514	2.143	1.754	2.323
	0.300	158.433	69.922	232.026	2.200	1.845	2.366
	0.350	178.831	84.855	254.055	2.252	1.929	2.405
	0.400	200.610	101.898	277.064	2.302	2.008	2.443
	0.450	224.203	121.545	301.542	2.351	2.085	2.479
	0.500	250.129	144.432	328.068	2.398	2.160	2.516

a. Base del logaritmo = 10

**Anexo 22.** Límites de confianza del ensayo para establecer la CL<sub>50</sub> de *Heterorhabditis* sp sobre larvas de *Aedes aegypti*. Primera repetición en el tiempo (**Continuación**).

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración			Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>a</sup>		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0.550	279,053	171.397	357.409	2.446	2.234	2.553
	0.600	311.871	203.566	390.663	2.494	2.309	2.592
	0.650	349.852	242.461	429.546	2.544	2.385	2.633
	0.700	394.895	290.125	477.002	2.596	2.463	2.679
	0.750	450.032	349.175	538.624	2.653	2.543	2.731
	0.800	520.534	422.645	626.190	2.716	2.626	2.797
	0.850	616.770	514.215	766.408	2.790	2.711	2.884
	0.900	763.524	633.930	1025.981	2.883	2.802	3.011
	0.910	803.919	663.809	1105.831	2.905	2.822	3.044
	0.920	850.228	696.899	1201.301	2.930	2.843	3.080
	0.930	904.233	734.181	1317.624	2.956	2.866	3.120
	0.940	968.613	777.115	1462.909	2.986	2.890	3.165
	0.950	1047.651	828.000	1650.558	3.020	2.918	3.218
	0.960	1148.790	890.754	1904.778	3.060	2.950	3.280
	0.970	1286.604	972.889	2275,239	3.109	2.988	3.357
	0.980	1495.730	1091,786	2887.185	3.175	3.038	3.460
	0.990	1896.467	1305.530	4214.969	3.278	3.116	3.625

a. Base del logaritmo = 10

**Anexo 23.** Límites de confianza del ensayo para establecer la CL<sub>50</sub> de *Heterorhabditis* sp sobre larvas de *Aedes aegypti*. Segunda repetición en el tiempo.

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración			Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>a</sup>		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0.010	11.287	0.436	41.280	1.053	-0.360	1.616
	0.020	15.891	0.797	52.486	1.201	-0,099	1.720
	0.030	19.744	1.167	61.133	1.295	0.067	1.786
	0.040	23.246	1.555	68.571	1.366	0.192	1.836
	0.050	26.547	1.964	75.289	1.424	0.293	1.877
	0.060	29.725	2.396	81.526	1.473	0.380	1.911
	0.070	32.822	2.852	87.423	1.516	0.455	1.942
	0.080	35.868	3.334	93.067	1.555	0.523	1.969
	0.090	38.884	3.842	98.519	1.590	0.585	1.994
	0.100	41.883	4.377	103.822	1.622	0.641	2.016
	0.150	56.968	7.511	129.038	1.756	0.876	2.111
	0.200	72.746	11.530	153.455	1.862	1.062	2.186
	0.250	89.723	16.646	178.139	1.953	1.221	2.251
	0.300	108.319	23.138	203.770	2.035	1.364	2.309
	0.350	128.976	31.378	230.924	2.111	1.497	2.363
	0.400	152.208	41.870	260.189	2.182	1.622	2.415
	0.450	178.661	55.307	292.246	2.252	1.743	2.466
	0.500	209.180	72.666	327.959	2.321	1.861	2.516

a. Base del logaritmo = 10

**Anexo 23.** Límites de confianza del ensayo para establecer la CL<sub>50</sub> de *Heterorhabditis* sp sobre larvas de *Aedes aegypti*. Segunda repetición en el tiempo (**Continuación**).

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración			Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>a</sup>		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0.550	244.912	95.353	368.502	2.389	1.979	2.566
	0.600	287.476	125.444	415.585	2.459	2.098	2.619
	0.650	339.259	166.099	471.884	2.531	2.220	2.674
	0.700	403.957	222.248	541.990	2.606	2.347	2.734
	0.750	487.683	301.693	634.842	2.688	2.480	2.803
	0.800	601.492	416.306	771.058	2.779	2.619	2.887
	0.850	768.084	581.114	1008.443	2.885	2.764	3.004
	0.900	1044.734	814.419	1534.554	3.019	2.911	3.186
	0.910	1125.313	873.601	1717.751	3.051	2.941	3.235
	0.920	1219.910	939.500	1948.414	3.086	2.973	3.290
	0.930	1333.129	1014.323	2245.422	3.125	3.006	3.351
	0.940	1472.042	1101.434	2639.371	3.168	3.042	3.422
	0.950	1648.225	1206.221	3183.522	3.217	3.081	3.503
	0.960	1882.342	1338.035	3979.981	3.275	3.126	3.600
	0.970	2216.211	1515.149	5253.886	3.346	3.180	3.720
	0.980	2753.450	1780.931	7627.334	3.440	3.251	3.882
	0.990	3876.610	2285.930	13795.892	3.588	3.359	4.140

a. Base del logaritmo = 10

**Anexo 24.** Límites de confianza del ensayo para establecer la CL<sub>50</sub> de *Heterorhabditis* sp sobre larvas de *Aedes aegypti*. Tercera repetición en el tiempo.

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración			Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>a</sup>		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0.010	15.907	1.440	45.605	1.202	0.158	1.659
	0.020	20.976	2.270	55.692	1.322	0.356	1.746
	0.030	25.001	3.030	63.228	1.398	0.482	1.801
	0.040	28.530	3.766	69.566	1.455	0.576	1.842
	0.050	31.764	4.493	75.192	1.502	0.653	1.876
	0.060	34.805	5.221	80.341	1.542	0.718	1.905
	0.070	37.709	5.957	85.148	1.576	0.775	1.930
	0.080	40.515	6.702	89.699	1.608	0.826	1.953
	0.090	43.248	7.460	94.050	1.636	0.873	1.973
	0.100	45.926	8.234	98.245	1.662	0.916	1.992
	0.150	58.896	12.385	117.732	1.770	1.093	2.071
	0.200	71.771	17.124	135.995	1.856	1.234	2.134
	0.250	85.037	22.603	153.962	1.930	1.354	2.187
	0.300	99.027	28.993	172.174	1.996	1.462	2.236
	0.350	114.039	36.501	191.042	2.057	1.562	2.281
	0.400	130.382	45.396	210.945	2.115	1.657	2.324
	0.450	148.420	56.033	232.288	2.171	1.748	2.366
	0.500	168.606	68.889	255.556	2.227	1.838	2.407

a. Base del logaritmo = 10

**Anexo 24.** Límites de confianza del ensayo para establecer la CL<sub>50</sub> de *Heterorhabditis* sp sobre larvas de *Aedes aegypti*. Tercera repetición en el tiempo (**Continuación**).

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración			Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>a</sup>		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0.550	191.539	84.631	281.370	2.282	1.928	2.449
	0.600	218.037	104.207	310.590	2.339	2.018	2.492
	0.650	249.285	129.025	344.484	2.397	2.111	2.537
	0.700	287.073	161.245	385.062	2.458	2.207	2.586
	0.750	334.303	204.347	435.828	2.524	2.310	2.639
	0.800	396.096	264.209	503.724	2.598	2.422	2.702
	0.850	482.680	351.173	605.297	2.684	2.546	2.782
	0.900	618.999	483.923	791.722	2.792	2.685	2.899
	0.910	657.329	518.785	851.451	2.818	2.715	2.930
	0.920	701.663	557.532	924.725	2.846	2.746	2.966
	0.930	753.871	601.082	1016.641	2.877	2.779	3.007
	0.940	816.783	650.880	1135.127	2.912	2.814	3.055
	0.950	894.968	709.331	1293.372	2.952	2.851	3.112
	0.960	996.439	780.711	1515.488	2.998	2.892	3.181
	0.970	1137.085	873.437	1851.915	3.056	2.941	3.268
	0.980	1355.250	1007.334	2433.401	3.132	3.003	3.386
	0.990	1787.152	1249.789	3776.553	3.252	3.097	3.577

a. Base del logaritmo = 10