



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación
para el Desarrollo Integral Regional
CIIDIR-IPN U. OAXACA**



**MAESTRIA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES.
ESPECIALIDAD EN PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL NEMATODO *Strelkovimermis
spiculatus* PARÁSITO DE LARVAS DE MOSQUITOS.**

MARICELA EDITH CANSECO PINACHO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS.

**SANTA CRUZ XOXOCOTLÁN, OAXACA
JUNIO 2006.**



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, Oaxaca siendo las 13:00 horas del día 05 del mes de 06 de 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA), para examinar la tesis de grado titulada:

“Caracterización del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* parasito de larvas de mosquitos”

Presentada por el alumno (a):

| | | |
|---------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Canseco | Pinacho | Maricela Edith |
| <small>Apellido paterno</small> | <small>materno</small> | <small>nombre(s)</small> |

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante al grado de: **MAESTRO EN CIENCIAS EN CONSERVACION Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

Dr. Rafael Pérez Pacheco

Dr. Jaime Ruiz Vega

Dra. Yolanda Donaji Ortiz Hernández

Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez

M en C. Gerardo Rodríguez Ortiz

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dra. María del Rosario Arnaud Viñas



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez., Oaxaca, el 1 de junio de 2006, la que suscribe **MARICELA EDITH CANSECO PINACHO**, alumna del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A040002**, adscrita al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autora del trabajo de Tesis: **“CARACTERIZACIÓN DEL NEMATODO STRELKOVIMERMIS SPICULATUS PARASITO DE LARVAS DE MOSQUITOS”**, realizado bajo la dirección del Dr. Rafael Pérez Pacheco, por lo cual cede los derechos de dicho trabajo, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: **Calle Hornos No. 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca** o e-mail ciidirox@ipn.mx o marychel31@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



MARICELA EDITH CANSECO PINACHO

INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
CIDIR-UNIDAD-OAXACA

RESUMEN

Los agentes de control biológico, más reconocidos por su efectividad en el control de mosquitos vectores de enfermedades, son: bacterias, nematodos parásitos, peces larvívoros, hongos e insectos acuáticos depredadores. En Estados Unidos, Cuba, India, Rusia, Colombia y México se han utilizado nematodos que parasitan a larvas de mosquitos (*R. culicivora* y *R. iyengari*), donde han demostrado que constituyen una alternativa potencial para el control de mosquitos (Petersen y Willis, 1975; Santamarina, 1994; Pérez *et al.*, 1996).

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron: Conocer la capacidad de oviposición del nematodo *S. spiculatus*. Evaluar la capacidad parasítica de *S. spiculatus* en condiciones de laboratorio y criaderos de larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Determinar la capacidad de supervivencia (reciclaje) de *S. spiculatus*, en criaderos de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*. Cuantificar y determinar el efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *S. spiculatus* en larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*.

Esta investigación se realizó en la Planta de producción masiva de nematodos parásitos de mosquitos, instalada en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional.

Bajo condiciones de laboratorio el promedio de huevecillos ovipositados por una hembra de *S. spiculatus* fue de 5063.5. La dosis 20, 15, 10, 5 y 3 nematodos *S. spiculatus* por larva de mosquito *C. quinquefasciatus* ocasionan 100% de parasitismo. Las medias de infestación se incrementaron con respecto al aumento de la dosis de nematodos aplicadas, indicando que las larvas del mosquito *C. quinquefasciatus* son altamente susceptibles al parasitismo del nematodo *S. Spiculatus*. En las evaluaciones en criaderos de larvas de *C. quinquefasciatus* la dosis más efectiva fue de 3000 nematodos por metro cuadrado.

En criaderos de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*, los nematodos *S. spiculatus*, se pueden reproducir, a través del tiempo siempre y cuando el organismo huésped esté presente en el mismo criadero. El parasitismo múltiple de *S. spiculatus* sobre larvas de *C. quinquefasciatus*, ocasiona mayor proporción de machos con respecto a las hembras.

ABSTRACT

The most recognized agents of biological control according to its effectiveness to control vector mosquitoes are: bacteria, parasitic nematodes, larvivorous fishes, fungi and predatory aquatic insects. In some countries like USA, Cuba, India, Russia, Colombia and Mexico, researches have been using nematodes that parasite mosquito larvae (*Romanomermis culicivorax* and *Romanomermis iyengari*). They have shown that nematodes are a potential alternative to control mosquitoes. (Petersen and Willis, 1975; Santamarina, 1994; Pérez *et al.*, 1996).

The objectives of this work were know the oviposition capacity of the nematode *Strelkovimermis spiculatus*; and to evaluate the parasitic capacity of *S. spiculatus* in conditions of laboratory and mosquitoes (*Culex quinquefasciatus*) larvae nurseries; to determine the survival capacity (recycling) of *S. spiculatus* in mosquitoes larvae nurseries; and quantify determine the effect of multiple parasitism in sex determination of *S. spiculatus* in mosquito larvae.

Under lab, the average of oviposited eggs by a female of *S. spiculatus* was of 5063. With the doses 20, at 15, 10, 5 and 3 nematodes by larva of mosquito *C. quinquefasciatus* a full parasitism was achieved. Average infestation increased with the dose of nematodes applied. Thus, the larvae of *C. quinquefasciatus* are highly susceptible to parasitism by the *S. spiculatus*. In evaluations in nurseries

of larvae of *C. quinquefasciatus* the dose most effective was of 3000 nematodes m^{-2} .

In mosquitoes larvae nurseries, *S. spiculatus* kept reproductions as long as the hosts are available. Multiple parasitism increased the male/ females ratio.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darme la oportunidad de realizar una mas de mis metas propuestas y porque en el he encontrado la fuerza y la entereza para afrontar los retos que a mi vida han llegado.

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-U. OAXACA), por el apoyo otorgado durante mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN (PIFI), por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco por la asesoría y dirección brindada para la realización de la presente investigación.

A la Dra. Yolanda Donaji Ortiz Hernández, por la asesoría brindada y sobre todo por su amistad y apoyo incondicional durante mi estancia en el programa de maestría.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega, por la asesoría otorgada en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael del Castillo Sánchez, por sus valiosas sugerencias, asesoría y apoyo en la realización de los análisis estadísticos de los datos de esta tesis.

Al M. en C. Gerardo Ortiz Rodríguez, por su asesoría y apoyo en la realización de los análisis estadísticos de los datos de esta investigación y la revisión de la tesis en general.

A el Ing. Juan Bustamante Lujan por el apoyo y amistad incondicional que me ha brindado siempre.

Agradezco especialmente al técnico Gonzalo Flores Ambrosio, por su valioso apoyo, brindado en el desarrollo de los experimentos realizados en el laboratorio. Y por su amistad.

A mis amigas: Irma Flor López Guerra, Graciela Zárate Altamirano, Silvia Avendaño Flores y Adela Pérez Ríos, por su amistad y por todos los momentos que compartimos juntas. Siempre las tendré presentes en mi corazón.

A mi amigo Nicolás Hernández Ruiz por su amistad y apoyo brindado durante el tiempo en la maestría.

A Sabino Honorio Martínez Tomas, por su apoyo y amistad.

DEDICATORIA

A mis padres

***María de Jesús Pinacho Ramírez
y
Domingo Canseco Hernández***

Por todo el apoyo, amor, cariño y confianza que me han brindado.

A mis hermanos:

***Javier, Miguel y Toño
Que los quiero mucho.***

***En especial a mis sobrinitas
Ixchel y Elenita.***

***Deseándoles que cumplan todos sus objetivos que se planten en sus
vidas.***

A mis cuñadas:

***Chely y Yaqui
Que forman parte de nuestra gran familia.***

CONTENIDO

| Título | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | xii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Objetivos..... | 4 |
| 1.1.1 Objetivo general..... | 4 |
| 1.1.2. Objetivos particulares..... | 4 |
| 1.2. Hipótesis..... | 4 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 5 |
| 2.1. Los Dípteros..... | 5 |
| 2.1.1. Morfología general..... | 5 |
| 2.1.2. Ubicación taxonómica <i>C. quinquefasciatus</i> | 7 |
| 2.1.3. Ciclo biológico del mosquito Culicidae..... | 7 |
| 2.1.4. Subfamilia Culicinae..... | 9 |
| 2.1.5. Género Culex..... | 10 |
| 2.1.6. Larva..... | 11 |
| 2.1.7. Pupa..... | 11 |
| 2.1.8. Adulto..... | 12 |
| 2.2. Nematodos parásitos de insectos..... | 13-15 |
| 2.2.1. Descripción general de los nematodos parásitos de larvas de mosquitos..... | 15 |
| 2.2.2. Ubicación taxonómica de <i>Strelkovimermis spiculatus</i> | 17 |
| 2.2.3. Ciclo biológico <i>Strelkovimermis spiculatus</i> | 17 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 3.1. Material Biológico..... | 19 |
| 3.1.1. Cría del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> | 19 |
| 3.1.2. Reproducción del nemátodo <i>S. spiculatus</i> | 19 |
| 3.2. Oviposición del nematodo <i>Strelkovimermis spiculatus</i> | 21 |
| 3.3. Susceptibilidad de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> , al parasitismo de diferentes dosis del nematodo <i>S. spiculatus</i> | 23 |
| 3.4. Efecto de la aplicación de diferentes densidades de nematodos en criaderos de larvas de mosquitos <i>C. quinquefasciatus</i> | 24 |
| 3.5. Efecto de diferentes profundidades de agua, en la capacidad parasítica de nematodos <i>S. spiculatus</i> | 26 |
| 3.6. Supervivencia (reciclaje) de <i>S. spiculatus</i> en criaderos de mosquitos <i>C. quinquefasciatus</i> | 27 |
| 3.7. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de | |

| | |
|--|----|
| <i>S. spiculatus</i> en larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> | 29 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| 4.1. Oviposición del nematodo <i>Strelkovimermis spiculatus</i> | 31 |
| 4.2. Susceptibilidad de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> , al parasitismo de diferentes dosis del nematodo <i>S. spiculatus</i> | 33 |
| 4.3. Efecto de la aplicación de diferentes densidades de nematodos <i>S. spiculatus</i> en criaderos de larvas de mosquitos <i>C. quinquefasciatus</i> | 35 |
| 4.4. Efecto de diferentes profundidades de agua, en la capacidad parasítica de nematodos <i>S. spiculatus</i> | 39 |
| 4.5. Supervivencia (reciclaje) de <i>S. spiculatus</i> en criaderos de mosquitos <i>C. quinquefasciatus</i> | 40 |
| 4.6. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de <i>S. spiculatus</i> en larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> | 45 |
| V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 50 |
| VII. LITERATURA CITADA | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1. | Ciclo biológico del género <i>Culex quinquefasciatus</i> . | 8 |
| 2. | Huevecillos de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 10 |
| 3. | Larva de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 11 |
| 4. | Pupa de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 12 |
| 5. | Adulto de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 12 |
| 6. | Ciclo biológico de <i>S. spiculatus</i> . | 18 |
| 7. | Efecto de la aplicación de diferentes dosis de nematodos <i>S. spiculatus</i> , sobre larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> . | 34 |
| 8. | Infestación de <i>S. spiculatus</i> sobre larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> en criaderos. | 36 |
| 9. | Parasitismo de <i>S. spiculatus</i> sobre larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> en criaderos. | 37 |
| 10. | Infestación y parasitismo ocasionado por <i>S. spiculatus</i> sobre larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> . | 40 |
| 11. | Comportamiento de la infestación de <i>S. spiculatus</i> en criaderos de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 41 |
| 12. | Comportamiento de los datos de parasitismo obtenidos del experimento de supervivencia (reciclaje) de <i>S. spiculatus</i> en criaderos de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 43 |
| 13. | Comportamiento de los datos de infestación obtenidos del experimento de parasitismo múltiple de <i>S. spiculatus</i> en criaderos de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 46 |
| 14. | No. de nematodos <i>S. spiculatus</i> que alcanzaron la fase posparasitaria en larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> . | 47 |
| 15. | Hembras y machos de <i>S. spiculatus</i> emergidos de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> , a diferentes dosis de aplicación. | 48 |

I. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista médico epidemiológico, los mosquitos constituyen un problema grave de salud pública a nivel mundial, debido a que son vectores de enfermedades como el paludismo, el dengue, y el virus del Nilo. Transmitidas por los mosquitos de los géneros *Anopheles spp.*, *Aedes spp.*, y *Culex spp.*, respectivamente.

Las regiones tropicales y subtropicales del mundo son las áreas de más alto riesgo debido a las condiciones climáticas y geográficas que favorecen la reproducción del mosquito (Pérez, 2002). Por ejemplo, los vectores del paludismo se distribuyen principalmente en zonas tropicales (Secretaría de Salud, 1996).

Los estados de la Republica Mexicana con mayor riesgo para enfermedades transmitidas por mosquitos son: Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. De los cuales, según reportes de la Secretaría de Salud (1996) Oaxaca y Chiapas presentan los mas altos índices de paludismo.

Los programas oficiales de combate de mosquitos vectores de enfermedades, normalmente han utilizando insecticidas químicos tóxicos como

el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), Malatión[®] y Temephos[®] (Abate), los cuales han originado contaminación del ambiente; por daños a la fauna, flora, y a la salud humana. Además, han generado resistencia de los mosquitos a los insecticidas, ocasionando que se apliquen cada vez dosis más altas, lo cual también ha redundado en altos costos económicos. Por lo tanto es necesario buscar alternativas de control que permitan mantener las poblaciones de insectos transmisores de enfermedades a niveles que no causen daño. El control biológico es un método viable que no causa daños al ambiente (Pérez, 2002).

Los agentes de control biológico, más reconocidos por su efectividad en el control del mosquito, son: bacterias entomopatógenas, nematodos parásitos, peces larvívoros, hongos entomopatógenos e insectos acuáticos depredadores. En Estados Unidos, Cuba, India, Rusia, Colombia y México se han evaluado nematodos que parasitan larvas de mosquitos (*R. culicivorax* y *R. iyengari*), y que han demostrado potencial para el control de mosquitos (Petersen y Willis, 1975; Santamarina, 1994; Pérez *et al.*, 2004, 2005).

Los nematodos *Romanomermis iyengari* y *R. culicivorax* son específicos para larvas de mosquitos, inofensivos para el resto de la fauna acuática, no generan resistencia en los mosquitos, no afectan al humano y pueden

permanecer en el medio después de su aplicación. La producción a gran escala se puede realizar con materias primas locales (Pérez, 2002).

Strelkovimermis spiculatus, otra especie de nematodo parásito de larvas de mosquitos en 1982 fue encontrada en Buenos Aires Argentina, parasitando larvas de *Aedes albifasciatus* (Camino y Reboredo, 1994), a la fecha se ha generado poca literatura de características biológicas, derivada de estudios no claramente definidos experimentalmente.

En el CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca, se ha trabajado en los últimos diez años en la línea de investigación control biológico de larvas de mosquitos con nematodos parásitos, utilizando principalmente *Romanomermis iyengari* y *Romanomermis culicivorax*, obteniendo resultados exitosos. También se está produciendo la especie *S. spiculatus*, para caracterizar su potencial y sus diferencias con respecto a *R. culicivorax* y *R. iyengari*.

Por lo tanto, el presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de conocer características biológicas y parasíticas del nematodo, para dar inicio a la determinación de su potencial como agente de control de larvas de mosquito de importancia en México.

1.1 Objetivos

1.1.1. Objetivo general.

Determinar características biológicas del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* sobre larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

1.1.2. Objetivos particulares.

1. Conocer la capacidad de oviposición del nematodo *S. spiculatus*.
2. Evaluar la capacidad parasítica de *S. spiculatus* en condiciones de laboratorio y criaderos de larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*.
3. Determinar la capacidad de supervivencia (reciclaje) de *S. spiculatus*, en criaderos de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*.
4. Cuantificar y determinar el efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *S. spiculatus* en larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*.

1.2. Hipótesis.

El nematodo *S. spiculatus* representa una alternativa de control biológico de poblaciones de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Los dipteros.

2.1.1. Morfología general

Los Culícidos, pertenecen al orden Diptera, y se les conoce comúnmente con el nombre de mosquitos. Son insectos pequeños, de cuerpo alargado, el cual consta de tres regiones corporales: cabeza, tórax y abdomen, presentan ojos compuestos. El tórax presenta los tres segmentos fusionados, siendo el más desarrollado el mesotorax. Las patas son largas y los tarsos constan de cinco artejos que terminan en un par de uñas. Presentan un par de alas bien desarrolladas y el par posterior transformado en halterios. El abdomen está compuesto por once segmentos. Las antenas, se insertan en la parte media de la cabeza, entre el clípeo y el extremo anterior de la frente en dos fosetas antenales. Las antenas son cortas y están formadas por tres segmentos, el basal o escapo, el intermedio o pedicelo el apical o flagelo, en el pedicelo se localiza el órgano Johnston, que es un órgano sensorial compuesto por un conjunto de células receptoras que detectan los movimientos del flagelo (OPS/OMS, 1990).

El aparato bucal de las hembras es de tipo picador-chupador, ya que pertenecen al grupo de los insectos hematófagos, y esta formado por una

probóscide bien desarrollada y formada por el labro-epifaringe, el labio, la hipofaringe, un par de mandíbulas anterolaterales y un par de maxilas posterolaterales las cuales son funcionales solamente en las hembras, siendo de forma aplanada, cortantes y con los márgenes estiliformes y penetrantes (OPS/OMS, 1990).

Las antenas tienen 15 antenómeros. El primero apenas visible, recibe el nombre de escapo y tiene forma de anillo, el segundo es conocido como torus o pedicelo, es muy globoso y en él se localiza el órgano de Johnston. Los machos están provistos de antenas plumosas con pelos largos y abundantes, los palpos son del tamaño de la proboscis; por lo que su aparato bucal no está adaptado para perforar y alimentarse de sangre. El macho se alimenta de néctar y jugo de frutas, principalmente. Las antenas de las hembras, presentan pelos cortos y escasos, los palpos son de un tercio o menos de longitud que la proboscis, se alimenta de lo mismo que el macho, pero, adicionalmente requiere al menos de una ingestión de sangre de mamíferos para el desarrollo de sus huevecillos (Secretaría de Salud, 1993).

Los mosquitos, no presentan ocelos, los ojos son compuestos. El cuerpo está revestido de escamas excepto en Anophelinae (OPS/OMS, 1990).

2.1.2. Ubicación taxonómica de *Culex quinquefasciatus* (Ibáñez y Martínez, 1994).

| | |
|-------------|-------------------------|
| Phyllum: | Artropoda |
| Clase: | Insecta |
| Orden: | Díptera |
| Suborden: | Nematocera |
| Familia: | Culicidae |
| Subfamilia: | Culicinae |
| Tribu: | Culicini |
| Género: | <i>Culex</i> |
| Especie: | <i>quinquefasciatus</i> |

2.1. 3. Ciclo biológico de los mosquitos de la familia Culicidae.

Todas las especies de culícidos no se desarrollan en el mismo hábitat. Hay especies que colonizan aguas limpias, otras que prefieren aguas sucias para que las hembras ovipositen. También la temperatura es un factor importante para determinar el hábitat de desarrollo, ya que hay especies que se desarrollan mejor a bajas temperaturas; aunque, en general, la mayoría de las especies se ven favorecidas con temperaturas elevadas del agua. Los mosquitos son holometabolos (metamorfosis completa), presentan cuatro fases de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 1), las tres primeras de hábitos

acuáticos. La larva, a su vez pasa, por cuatro estadios o instares (I, II, III y IV instar) que son morfológicamente similares, excepto por el incremento secuencial de tamaño; en el instar I las larvas miden aproximadamente 1-2 mm y en el IV de 8-10 mm; según la posición con respecto a la superficie del agua. Posteriormente pasan a la fase de pupa, se mantienen en reposo y sin alimentarse, pero pueden moverse si son perturbadas. Después emerge el adulto que es volador (OPS/OMS, 1990).

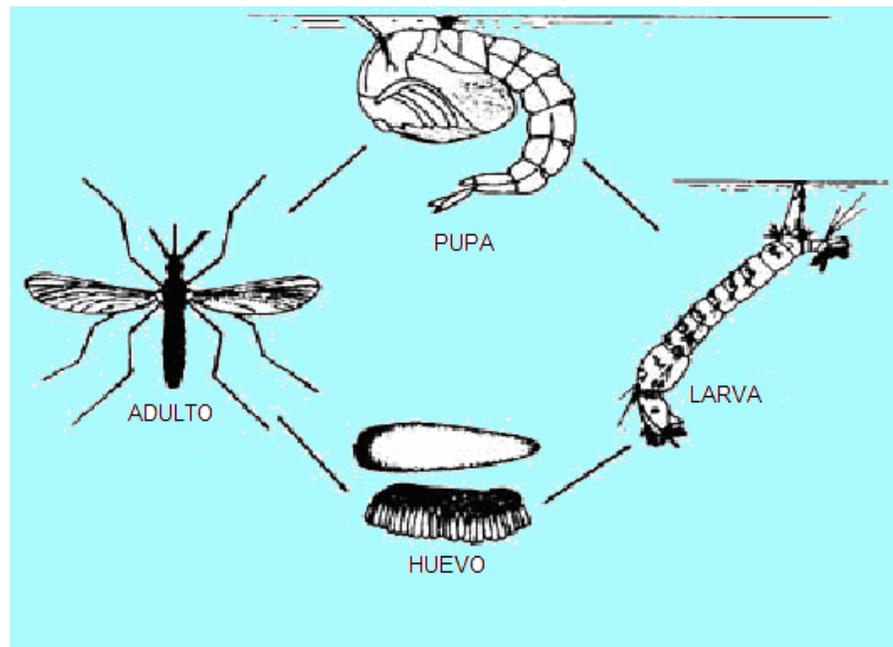


Fig. 1. Ciclo biológico del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

2.1.4. Subfamilia Culicinae

La subfamilia Culicinae esta formada por seis tribus que son: Aedini, Culicini, Culisetini, Mansoniini, Orthpodomyiini y Uranotaeniini. La diferenciación morfológica de esta subfamilia se establece de la siguiente manera:

En las hembras los palpos maxilares son más cortos que la probóscide. El escutelo tiene tres lóbulos claramente marcados, presentando cada uno de ellos, un grupo de setas y con los espacios interlobulares desnudos. El abdomen se encuentra revestido de escamas. El segmento anal de los machos está provisto de un esternito bien desarrollado. Las hembras presentan tres capsulas seminales (Secretaria de Salud, 1993).

Las larvas no poseen la capacidad de girar la cabeza 180°. Las setas cefálicas nunca son pinnadas. El abdomen no presenta setas palmeadas. El VIII segmento presenta una estructura típica: la carda, que es un conjunto de escamas a cada lado del segmento y por último la presencia del sifón respiratorio, que parte de el extremo posterior de su cara dorsal (Secretaria de Salud, 1993).

Los huevecillos (Fig.2) se encuentran desprovistos de flotadores, y aparecen aislados o bien agrupados en forma de balsas (Christopher, 1960).

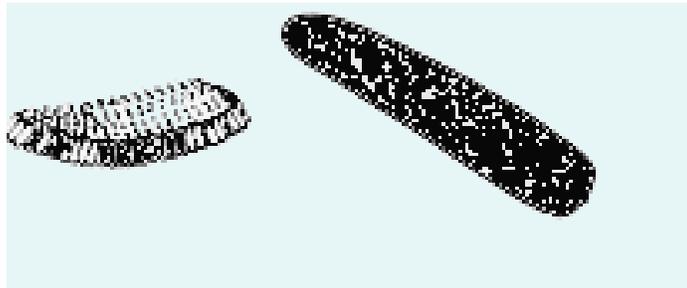


Fig. 2 Huevecillos de *C. quinquefasciatus*.

2.1.5. Género *Culex*

Dentro de éste género, se encuentran mosquitos de pequeño o mediano tamaño. Una característica de los individuos de éste género que los distingue del resto es, la presencia de pulvilos diferenciados.

Las hembras tienen los palpos mucho más cortos que la probóscide. Y poseen dientes cibariales. El primer tarsómero del último par de patas es tan largo o más que las tibias del mismo par. Las uñas del pos-tarso son simples en todas las patas. En cuanto a la genitalia, el labio vaginal inferior presenta un ensanchamiento central, que posee setas dispuestas en forma de corona.

Los machos presentan los palpos más alargados que la trompa y con los dos últimos segmentos adelgazados y pelados. El último segmento está dirigido hacia arriba (Secretaría de Salud, 1993).

2.1. 6. Larva.

La cabeza de la larva es más ancha que larga (Fig. 3), las antenas poseen la seta 1-X formando un abanico, que aparece en la segunda mitad muy separada de otras setas antenales (Secretaria de Salud, 1993).

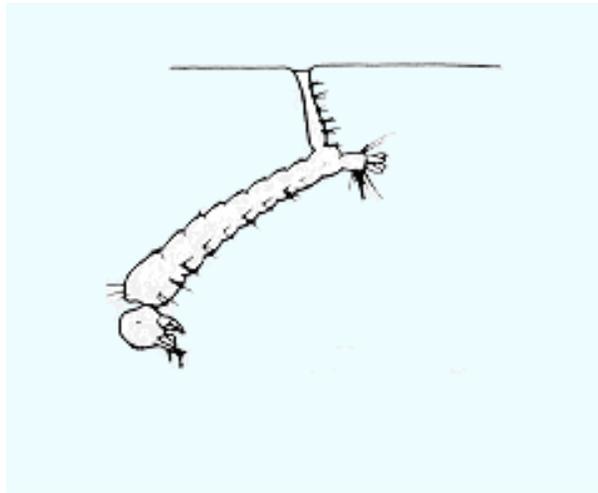


Fig. 3 Larva de *C. quinquefasciatus*.

2.1.7 Pupa.

Las pupas de los mosquitos generalmente son inactivas, pero al agitar el agua, pueden nadar vigorosamente (Fig. 4). Las pupas no se alimentan y esta fase por lo general dura de 2 a 3 días, las pupas de los machos son un poco más pequeñas que las de las hembras y emergen unas horas antes que las hembras (Secretaría de Salud, 1993).

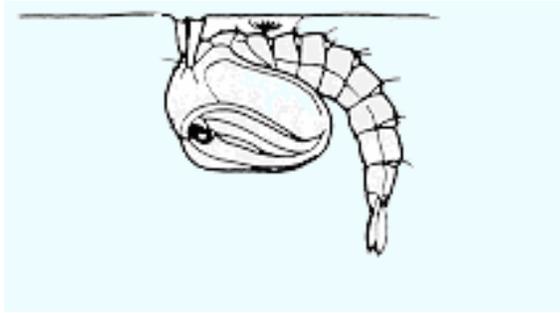


Fig. 4 Pupa de *C. quinquefasciatus*.

2.1.8. Adulto.

La fase aérea del mosquito da inicio cuando emerge de la pupa que es la última fase acuática, figura 5 (Secretaria de Salud, 1993).

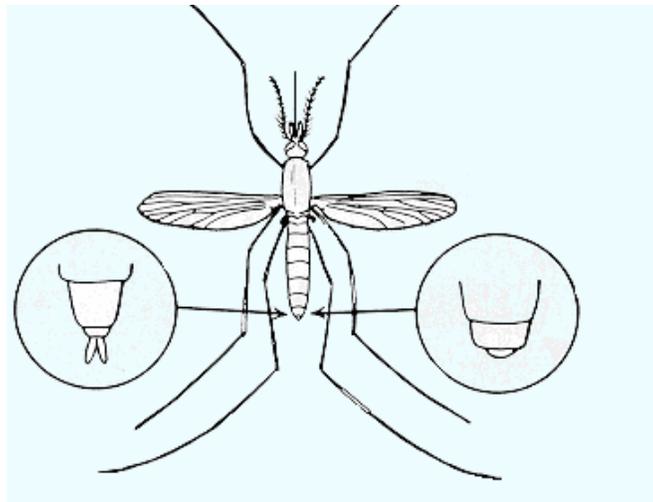


Fig. 5 Adulto de *C. quinquefasciatus*.

2.2. Nematodos parásitos de insectos.

Los parásitos de insectos, conocidos como entomopatógenos o entomofílicos se conocen desde el siglo XVII (Nickle y Welch, 1984). Sin embargo, no fue sino hasta 1930 en que se consideró la posibilidad de usar nematodos para el control del escarabajo *Popillia japónica* (Coleoptera: Scarabeidae). Posteriormente intensivas investigaciones, incluyendo exitosas pruebas de campo despertaron el interés en el uso de nematodos como agentes de control biológico (Alatorre, 1998).

Existe un grupo reducido pero significativo de nematodos, considerados benéficos como agentes potenciales de control biológico de insectos. Las familias: Allantonematidae, Diplogestiredae, Heterorhabditidae, Mermithidae, Neotylenchidae, Rhadotidae, Sphaerularidae, Steinernematidae, Tetradonematidae, incluyen especies que atacan insectos, matando, esterilizando o alterando el desarrollo del huésped (Poinar, 1979).

Chandrasah y Rajagopalam (1979); Santamarina *et al.*, (1993), plantean y avalan el interés que han despertado los mermitidos del género *Romanomermis* como potenciales agentes de control biológico de mosquitos, debido a las características siguientes:

1. No causan daños ambientales.

2. No representan una amenaza de competencia para otros organismos benéficos, presentes en el mismo habitat.
3. Son endoparásitos obligados y específicos para larvas de mosquitos.
4. Se pueden producir masivamente con materias primas locales, haciéndolo altamente competitivo con otros métodos desde el punto de vista económico.
5. Su aplicación requiere sólo aspersoras convencionales.
6. Cuando las condiciones para su reproducción son favorables persiste en el ambiente hasta por un año.

Diferentes especies de nematodos de la familia mermithidae han sido estudiados y se ha demostrado su efectividad como parásitos de larvas de mosquitos, específicamente los nematodos *Romanomermis culicivorax* y *Romanomermis iyengari*, han sido evaluados de manera exitosa en Cuba, Estados Unidos, La India, China y México (Pérez *et al.*, 1996).

Con respecto a *Strelkovimermis spiculatus* nematodo parásito de larvas de mosquito, fue encontrado en el arroyo Miguelín, Ensenada, Provincia de Buenos Aires, Argentina, en febrero de 1982; parasitando larvas de *Aedes albifasciatus*, se atribuye buena tolerancia a varios factores ambientales (Camino y Reboredo, 1994). El ciclo de vida es semejante al de los nematodos *Romanomermis spp.*, con un periodo de 35 días a una temperatura de 20° C

Camino y García (1992) reportan que, para ésta especie, una relación parásito: hospedero entre 12:1 y 15:1, por un periodo de contacto de 20 horas entre ellos son necesarios para lograr altos porcentajes de parasitismo, y poder iniciar la producción masiva de éste mermítido. Estos autores concluyen que la factibilidad de la cría masiva del nematodo utilizando larvas del mosquito *Culex pipiens fatigans*, y el ciclo biológico relativamente corto de esta especie, son características que permiten que este mermítido sea un importante agente de control de éste mosquito (Camino y Garcia, 1988).

Las larvas de culícidos pueden estar parasitadas por uno o más nematodos al mismo tiempo. Ese número variable de parásitos por huéspedes, constituye el parasitismo múltiple. Este fenómeno corresponde a uno de los factores que influyen en la determinación del sexo en los nematodos mermítidos (Petersen y Willis, 1972 y 1975).

2.2.1. Descripción general de los nematodos parásitos de larvas de mosquitos.

La familia Mermithidae forma parte de un grupo importante de parásitos que requieren de un ser vivo para completar su desarrollo. Los miembros de esta familia se caracterizan por ser de tamaño pequeño, color blanquecino y transparente, y forma cilíndrica.

Las características físicas, de los nematodos macho y hembra de *S. spiculatus*, están bien definidas. La hembra es de mayor talla, con una longitud promedio de 19 mm, el macho es más pequeño, con una longitud promedio de 9 mm. Los estados preparásiticos presentan un estilete en su parte anterior, los huevos son de forma esférica y presentan un espesor en su cáscara de 8 micras (Poinar y Camino, 1986).

Los mermithidos son filiformes en su forma con una cutícula lisa, frecuentemente con dos distintas capas transversales de fibras espirales. El cuerpo tiene de 6 a 8 cordones longitudinales y el tracto digestivo es similar al de los nematodos de vida libre solo en larvas preparásiticas. El ano está ausente en las hembras, las gónadas están en pares en ambos sexos, en las hembras la abertura genital se ubica a la mitad del cuerpo y en los machos en la parte final (Rubzov, 1972).

2.2.2. Ubicación taxonómica de *Strelkovimermis spiculatus*.

Poinar y Camino (1986), ubican a *S. spiculatus* en la siguiente posición taxonómica:

| | |
|-----------|------------------------|
| Phyllum: | Nematoda |
| Clase: | Adenophorea |
| Subclase: | Enoplia |
| Orden: | Enoplida |
| Suborden: | Enoplina |
| Familia: | Mermithidae |
| Género: | <i>Strelkovimermis</i> |
| Especie: | <i>spiculatus</i> |

2.2.3. Ciclo biológico de *Strelkovimermis spiculatus*.

Como se observa en la figura 6, el ciclo de vida de *S. spiculatus* es similar al de *R. iyengari* y *R. culicivorax*, consta de cinco fases. La primera corresponde al huevecillo; la segunda al preparásitico o estado de vida libre; la tercera fase es la parásita o parasítica (cuando se encuentra dentro de la larva del mosquito), la cuarta es la posparasítica (cuando emerge del huésped) y finalmente la quinta fase es adulto (Pérez, 2002).

Para completar su ciclo biológico *S. spiculatus* necesita forzosamente una larva de mosquito. Una vez liberadas las etapas infestivas producto de la eclosión de los huevecillos, se concentran en la superficie del agua y mediante su estilete perforan la pared cuticular de una larva de mosquito, con lo cual se inicia su etapa parásita. Por un periodo de 6 a 8 días, y dependiendo de la temperatura del agua, el nematodo se va a localizar a lo largo de todo el cuerpo de la larva hospedera; al emerger el parásito provoca la muerte del hospedero, lo cual se produce por la salida de la hemolinfa. Los parásitos emergidos presentan geotropismo positivo, se entierran en el sustrato del criadero, donde realizan una muda, copulan y la hembra deposita los huevos en el mismo (Gajanana *et al.*, 1978; Pérez, 2002).

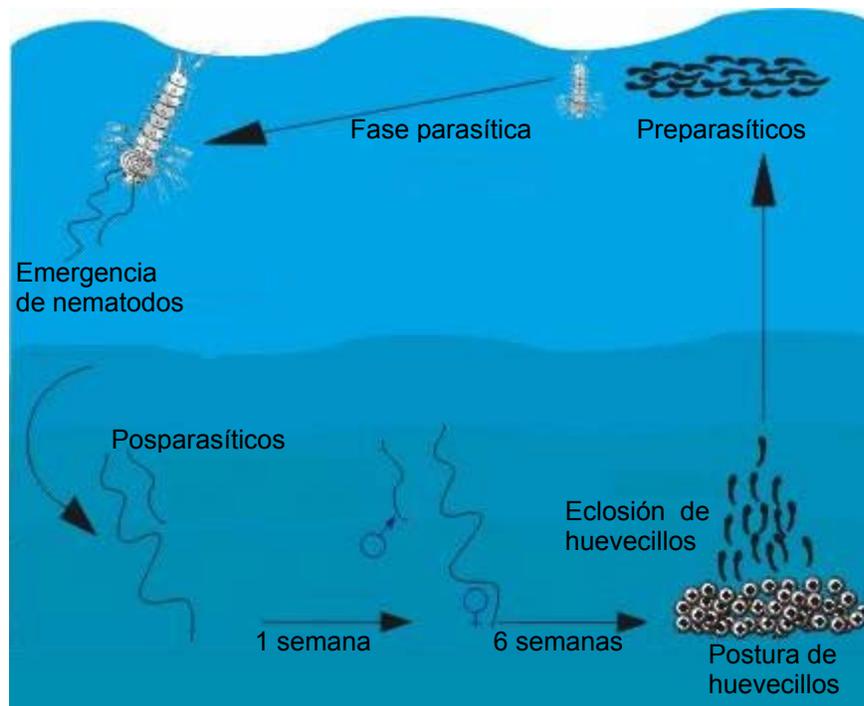


Fig. 6. Ciclo biológico de *S. spiculatus*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó de enero 2004 a marzo de 2006 en la Planta de producción masiva de nematodos parásitos de mosquitos, instalada en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional (IPN), ubicado en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

Para determinar las características biológicas del nematodo *S. spiculatus*, propuestas en el presente estudio se requirió del material biológico necesario y se establecieron cinco experimentos como se describe a continuación.

3.1. Material biológico.

Los nematodos *S. spiculatus* y las larvas del mosquito *C. quinquefasciatus* se obtuvieron de la planta de producción masiva de nematodos ubicada en las instalaciones del CIIDIR Oaxaca.

3. 1. 1. Cría del mosquito *Culex quinquefasciatus*

Se colocaron paquetes de huevecillos (balsas) del mosquito *C. quinquefasciatus* en bandejas de plástico de 47 x 35 x 12cm con agua, hasta

completar la etapa de larvas. Posteriormente las pupas se colectaron diariamente y se depositaron en un recipiente de plástico de 24 x 19 x 9cm con agua y se colocó en una jaula entomológica de 60 x 60 x 60cm. Los adultos se alimentaron con agua azucarada; las hembras fueron alimentadas con sangre de pollo. Los huevecillos depositados por las hembras en la superficie del agua, se recolectaron diariamente, colocándolos en bandejas de plástico de 47 x 35 x 12cm con agua, para su eclosión. En estas bandejas se desarrollaron las larvas, en las cuales se les proporcionó alimento comercial para peces tilapia (Aptilapia® nivel 1) previamente molido, cada 2 días las pupas se trasladaron a jaulas de emergencia para adultos y el ciclo se repitió para disponer continuamente del material biológico para los bioensayos y cría del nematodo (Pérez *et al.*, 2003, 2004).

3. 1. 2. Reproducción del nematodo *Strelkovimermis spiculatus*.

Se depositaron cinco grupos de aproximadamente 200 huevecillos de mosquito *C. quinquefasciatus* en bandejas de plástico de 47 x 35 x 12 cm que contenían 4 litros de agua. Cuando las larvas alcanzaron el II estadio (4-5) días se infestaron con nematodos parasíticos (juvenil 2) de *S. spiculatus*, aplicando una dosis de cinco nematodos por larva de mosquito, para lo cual se utilizaron cultivos de seis semanas de almacenamiento, que fueron inundados con agua destilada, para inducir la eclosión de huevos contenidos en el sustrato y la emergencia de parasíticos infectivos. Cuatro horas después, el agua

que contenían los preparasíuticos se decantó y se colocó en un vaso de precipitado y se procedió a calcular la concentración de nemátodos en la solución mediante el método de disolución volumétrica (Petersen y Willis, 1972), para determinar el volumen necesario a aplicar en las infestaciones. Después de ocho días, las larvas murieron y flotaron en la superficie indicando el término de la fase parasítica del nematodo (juvenil 3). Posteriormente las larvas muertas del mosquito se pasaron a un tamiz sumergido parcialmente en una bandeja con agua limpia, para separarlas de los nemátodos emergidos (juvenil 4) que se fueron al fondo de la bandeja. Estos nemátodos se depositaron en recipientes de plástico de 21 x 14 x 6cm que contenían arena (previamente lavada y esterilizada) inundada con agua destilada. A las dos horas posteriores se eliminó el agua y se taparon los recipientes; posteriormente se almacenaron durante seis semanas para que los nemátodos alcanzaran su madurez sexual, copularan y ovipositaran. Al término de este periodo se inundaron con agua para provocar la eclosión de los huevecillos y al decantar el agua se obtuvo una nueva población de nemátodos preparasíuticos. De esta manera se mantuvo la cría del nematodo en altos niveles poblacionales en sus diferentes estados de desarrollo (Pérez *et al.*, 2003, 2004).

3.2. Oviposición del nematodo *Strelkovimermis spiculatus*.

Para inducir la eclosión de los huevecillos, se inundó un cultivo de *S. spiculatus* con agua destilada. Transcurridas tres horas, el inóculo (agua que

contenía los preparasícticos) fue colectada y almacenada en un vaso de precipitado de 2000ml. Posteriormente, mediante el método de dilución volumétrica, se determinó la cantidad de preparasícticos para la infección de 1400 larvas de mosquito en segundo estadio de la especie *C. quinquefasciatus* a una dosis de 7:1 (7 preparasícticos por larva de mosquito) una vez que las larvas hospederas alcanzaron el cuarto estadio de desarrollo, fueron pasadas a los tamices a través de los cuales se colectaron los posparasícticos. Estos fueron sexados y colocados en una caja de veinticuatro celdas, las cuales contenían 0.5 ml de agua tridestilada y grava esterilizada de aproximadamente 2.0 mm de diámetro, en 12 celdas, se colocaron tres nematodos hembras y en las 12 restantes tres nematodos macho, esto con la finalidad de permitir la muda de los nematodos. Una vez concluida la etapa de muda en otra caja de 24 celdas que contenía la misma cantidad de agua y grava, fueron colocados una hembra y dos machos en cada celda, para favorecer el cruzamiento de los nematodos y posteriormente cuantificar el número de huevecillos ovipositados por cada hembra. Esta variable se midió de la siguiente manera: a los cuatro días de iniciada la oviposición, con una pipeta volumétrica se fueron extrayendo los huevecillos y se colocaron en una caja petri. Antes de realizar el conteo, los nematodos padres, fueron transferidos a otra celda de la caja para que la hembra continuara la oviposición y medirla a intervalos de cinco días hasta que dejara de poner. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se contó el número de huevecillos.

3.3. Susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus*, al parasitismo de diferentes dosis del nematodo *S. spiculatus*.

Para determinar la capacidad parasítica de los nematodos, y determinar el porcentaje de parasitismo y medias de infestación (número de nemátodos que parasitan una larva de mosquito); se colocaron 100 larvas de segundo estadio del mosquito *C. quinquefasciatus*, en bandejas de plástico de 21 X 13.5 X 5.5cm con 500ml de agua destilada, donde se aplicaron cinco diferentes dosis de nemátodos (20:1, 15:1, 10:1, 5:1 y 3:1 nemátodos/larva). Tres días después de la infestación, tiempo necesario para que el parásito actúe, se tomaron 20 larvas de cada unidad experimental, se disectaron con agujas entomológicas bajo un microscopio estereoscópico, para cuantificar el número de larvas o pupas parasitadas y el número de nematodos encontrados en el interior de las mismas.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar (DCA), con cuatro repeticiones y un testigo por cada tratamiento, este consistió en colocar la misma cantidad de larvas como lo indica cada tratamiento, pero, sin la aplicación de nematodos.

El análisis de datos del experimento se realizó bajo la técnica estadística de regresión lineal simple, esta técnica permite determinar el grado de asociación entre dos variables (dosis e infestación). Consiste en ajustar una

línea recta a un conjunto de datos en un espacio bidimensional con el objeto de hacer inferencia acerca del comportamiento de los datos que se ajustaron (Castillo, 2000; STATGRAPHICS, 1999).

Las variables de respuesta fueron: parasitismo e infestación.

El parasitismo (%), se obtuvo dividiendo el número de larvas parasitadas entre el total de larvas muestreadas multiplicado por 100.

Las medias de infestación se determinaron dividiendo la suma total de nematodos encontrados en las larvas disectadas entre el número de larvas muestreadas (Pérez *et al.*, 2004).

La variable explicativa fue la dosis de aplicación (20:1, 15:1, 10:1, 5:1 y 3:1 nematodos/larva).

3.4. Efecto de la aplicación de diferentes densidades de nematodos *S. spiculatus* en criaderos de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*.

Para formar criaderos de larvas de mosquitos, se perforaron hoyos de un metro cuadrado de superficie y 50cm de profundidad en condiciones de semicampo, las paredes fueron cubiertas con plástico negro, para evitar la infiltración de agua. En esas cavidades se agregó un sustrato formado por una

mezcla de arena y tierra de 15cm de espesor. Posteriormente se agregó una lámina de agua de 25cm. Se depositaron 500 larvas de segundo estadio del mosquito *C. quinquefasciatus*, para mantener una densidad larval de 500 larvas por m⁻², bajo la cual se evaluaron las aplicaciones de tres diferentes densidades de nematodos *S. spiculatus* (1000, 3000 y 5000 nematodos/m⁻²). Tres días después de las aplicaciones se tomó una muestra de 20 larvas de cada unidad experimental, las cuales se disectaron con agujas entomológicas bajo un microscopio estereoscopio.

El experimento se analizó a través de una regresión lineal simple bajo el modelo $Y = a + bX$, en donde la variable X se representó por las dosis de aplicación y la variable Y por las medias de infestación.

Las variables de respuesta fueron: parasitismo e infestación.

El parasitismo (%), se obtuvo dividiendo el número de larvas parasitadas entre el total de larvas muestreadas multiplicado por 100.

Las medias de infestación se determinaron dividiendo la suma total de nematodos encontrados en las larvas disectadas entre el número de larvas muestreadas (Pérez *et al.*, 2004).

La variable explicativa fue la dosis de aplicación (1000, 3000 y 5000 nematodos/m²).

Dado que el parasitismo está expresado en porcentajes, para realizar el análisis de regresión lineal simple, a los datos (%) se les aplicó la transformación ASENSO (RAIZ (%/100)).

El modelo de la regresión fue $Y = a + bX$, en donde la variable X se representó por las dosis de aplicación y la variable Y por el parasitismo, utilizando los valores transformados.

3.5. Efecto de diferentes profundidades de agua, en la capacidad parasítica de nematodos *S. spiculatus*.

Se depositaron 100 larvas del mosquito *C. quinquefasciatus* en bandejas de plástico de 30 x 15 x 15cm, con una lámina de agua de 3cm y 12cm de profundidad, aplicando una dosis de 10:1 nematodos/larva. Tres días después de establecido el experimento, se tomó una muestra de 20 larvas de cada unidad experimental, las cuales se disectaron con agujas entomológicas bajo un microscopio estereoscópico.

Las variables medidas en este experimento fueron el porcentaje de parasitismo y las medias de infestación.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar (DCA), con cuatro repeticiones y un testigo por cada tratamiento, y se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey al 0.05 de significancia) para determinar la diferencia entre los tratamientos, para la variable medias de infestación (SAS, 1994).

Para la variable porcentajes de parasitismo los datos solo fueron utilizados para describir el comportamiento de *S. spiculatus* por lo que no fue necesario realizar ninguna prueba estadística.

3.6. Supervivencia (reciclaje) de *S. spiculatus* en criaderos de mosquitos *C. quinquefaciatus*.

En criaderos en condiciones de semicampo de 1 m² de superficie y 50cm de profundidad, recubiertos con plástico negro, se agregó un sustrato formado por una mezcla de arena y tierra de un espesor de 15 cm. Se agregó una lámina de agua de 25 cm. Se depositaron 500 larvas del mosquito *C. quinquefaciatus* de instar II y se aplicaron 5000 nemátodos preparasíticos, (dosis 10:1).

Al tercer día se tomó una muestra de 20 larvas/criadero, las cuales se disectaron, para determinar el porcentaje de larvas parasitadas y la media de infestación, como se explica en la sección 3.3. A partir del décimo día, se colocó

una trampa con 50 larvas, las cuales fueron retiradas al tercer día, para ser disectadas y determinar el parasitismo e infestación. Posteriormente, se colocó semanalmente la misma trampa con igual cantidad de larvas, y se continuó colocando las trampas con 50 larvas semanalmente, por un periodo de 24 semanas, para determinar la supervivencia (reciclaje) del nematodo en condiciones de criaderos en semicampo.

Los resultados obtenidos en este experimento se analizaron bajo un modelo de regresión no lineal (logarítmico) $Y = \beta_0 * X^{\beta_1}$ (SAS, 1994). En donde la variable X fue el tiempo (semanas) y la variable Y fue la infestación y el parasitismo. A los valores de parasitismo, dado que están expresados en porcentaje fueron transformados con la siguiente formula: $(valor\% + 1)^{0.5}$, para posteriormente ser analizados bajo este mismo modelo, en donde dichos valores representan a la variable Y con la misma variable X.

Las variables de respuesta fueron: parasitismo e infestación.

El parasitismo (%), se obtuvo dividiendo el número de larvas parasitadas entre el total de larvas muestreadas multiplicado por 100.

Las medias de infestación se determinaron dividiendo la suma total de nematodos encontrados en las larvas disectadas entre el número de larvas muestreadas (Pérez *et al.*, 2004).

La variable explicativa fue el tiempo que se mantuvo el experimento (semanas).

3.7. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *S. spiculatus* en larvas de *C. quinquefasciatus*.

El experimento se estableció en cajas de plástico de 12 celdas, se agregó una lámina de agua destilada de 3 ml, en cada cavidad se colocó una larva de estadio II de mosquito *C. quinquefasciatus*. Se evaluaron las siguientes dosis 3:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1 y 25:1 nematodos/larva, cada una de las dosis evaluadas se aplicó en una caja de doce celdas y se mantuvieron a una temperatura de 27° C.

a) Para analizar los datos obtenidos de infestación y dosis de aplicación, se utilizó la técnica estadística de regresión lineal simple, bajo el modelo $Y = a + bX$, en donde la variable X fue la dosis de aplicación (3:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1 y 25:1 nematodos/larva) y la variable Y la media de infestación.

La variable de respuesta fue: la infestación.

Las medias de infestación se determinaron dividiendo la suma total de nematodos encontrados en las larvas parasitadas entre el número de larvas muestreadas (Pérez *et al.*, 2004).

La variable explicativa fue la dosis de aplicación.

b) Se cuantificó la frecuencia de parasitismo, es decir el número de parásitos/huésped (nematodos larva), con respecto a la dosis de nematodos aplicada, esto se realizó contando el número de nematodos que emergían del interior de las larvas y en algunos casos disectando a la larva con agujas entomológicas bajo un microscopio estereoscopio.

c) Se espero que los nematodos completaran su fase parásita y emergieran de la larva y se cuantificó el número de hembras y machos, en cada dosis, para obtener la proporción (♂ y ♀) en los tratamientos evaluados.

d) Se determino la razón sexual (expresada en porcentaje) de *S. spiculatus* sobre larvas de *C. quinquefasciatus*, mediante la siguiente formula:

$$\text{Razón sexual} = \frac{\text{♂}}{\text{♀} + \text{♂}}$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Oviposición del nematodo *Strelkovimermis spiculatus*.

El experimento para determinar la fecundidad (capacidad de oviposición de una hembra) se repitió seis veces por dos problemas presentados. El primero fue la contaminación de los nematodos por hongos, debido al periodo prolongado de tiempo que se mantuvieron los nematodos en el agua durante el proceso de muda y cruce de hembras y machos. Para evitar este problema, se controlaron al máximo las condiciones de asepsia, esterilizando previamente el material utilizado (agua, arena y utensilios).

El segundo problema fue al iniciar el periodo de oviposición, debido a que inicialmente se planteo que metodológicamente lo adecuado era cambiar las parejas (hembra y macho) diariamente a una celda diferente para continuar la oviposición, pero se observo que las hembras la interrumpían y no se lograba completar el periodo de oviposición. Esto se corrigió agregando arena en el periodo de cruzamiento y cuando inicio la postura de huevecillos los nematodos se cambiaron de celda cada cinco días, transportando la arena correspondiente a cada celda, de esta manera las hembras expresaron mayor potencial de desovación.

En el comportamiento de oviposición de *S. spiculatus*, los datos registrados oscilaron en un rango de 4620 a 5600 huevecillos, en un periodo de veinte días aproximadamente.

Las hembras ovipositaron en promedio 5063.5 huevecillos, con una desviación estándar de 313.35 y un coeficiente de variación (C. V) de 0.061, que indica una alta confiabilidad de los resultados obtenidos en el experimento.

Ambrós y Santamarina (1995) al realizar experimentos de oviposición en la especie *R. iyengari* en condiciones de laboratorio, encontraron que las hembras ovipositaron un total de 1975.29 huevecillos en 21.76 días. Así mismo Nickle (1972); Gajanana *et al.* (1978) reportan que cada hembra de *R. iyengari* oviposita en promedio 2000 huevecillos en un periodo de treinta días, aproximadamente. Por otra parte, Petersen y Willis (1975), reportó que una hembra de *R. culicivorax*, ovipositó 2480 huevecillos en un sustrato arenoso durante un periodo de desovación de 18 días. El promedio de huevecillos reportados para las especies *R. iyengari* y *R. culicivorax*, no concuerdan con el promedio de huevecillos que oviposita una hembra de *S. spiculatus*, la cantidad que esta última oviposita, se eleva considerablemente con respecto a las anteriores.

El promedio de huevecillos encontrado por cada hembra de *S. spiculatus* es bueno porque confirma la posibilidad de criar masivamente a este nematodo

utilizando larvas de *C. quinquefasciatus*. Los resultados obtenidos en este experimento no concuerdan con los descritos por Camino y Reboredo (1994); donde mencionan que las hembra de *S. spiculatus* ovipositan alrededor de 500 huevecillos.

4.2. Susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus*, al parasitismo de diferentes dosis de *S. spiculatus*.

Los datos de este experimento fueron analizados por regresión lineal simple.

El modelo de regresión lineal obtenido $Y=a+bX$, describe correctamente la relación entre infestación y dosis. La ecuación del modelo es:

$$\text{Infestación} = 1.22+0.96* \text{Dosis.}$$

El valor de $p < 0.01$ obtenido en el análisis de varianza muestra que la relación entre infestación y dosis es altamente significativa con un nivel de confianza del 99%.

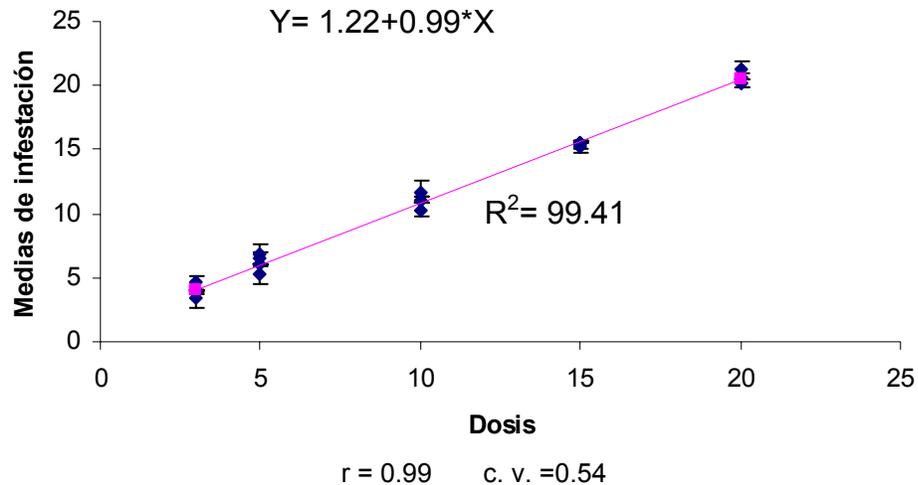


Fig. 7 Efecto de la aplicación de diferentes dosis de nematodos *S. spiculatus*, sobre larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*.

La R-cuadrada obtenida indica que el modelo es apropiado para explicar el 99.41% de variabilidad en la infestación. El coeficiente de correlación lineal es igual a 0.99, el cual indica una relación muy fuerte entre las variables. El error estándar (\sqrt{CME}) estimado de la desviación estándar muestra un resultado de 0.48 y un coeficiente de variación (C.V) de 0.54, como se observa en la fig. 7.

Los mas altos niveles de infestación se presentaron con la dosis 20:1. Sin embargo, todas las dosis aplicadas pueden recomendarse como buenas, ya que se obtuvo un 100% de parasitismo, lo cual indica que el nematodo es efectivo para el control de larvas del mosquito *C. quinquefasciatus*, presentando niveles de infestación proporcionales al incremento de las dosis (Fig. 7), observando que la media de infestación más alta se presentó con la dosis 20:1 nematodos/larva, estos resultados concuerdan con los experimentos realizados por Petersen y Cupello (1981); Pérez *et al.* (2003) quienes reportan resultados similares en el parasitismo ocasionado por el nematodo *R. culicivora* y *R. iyengari*.

4.3. Efecto de la aplicación de diferentes densidades de nematodos *S. spiculatus* en criaderos de larvas de *C. quinquefasciatus*.

El modelo de regresión lineal obtenido $Y = a + bX$, describe correctamente la relación entre infestación y dosis. La ecuación del modelo es: Infestación = $0.27 + 0.50 * \text{Dosis}$.

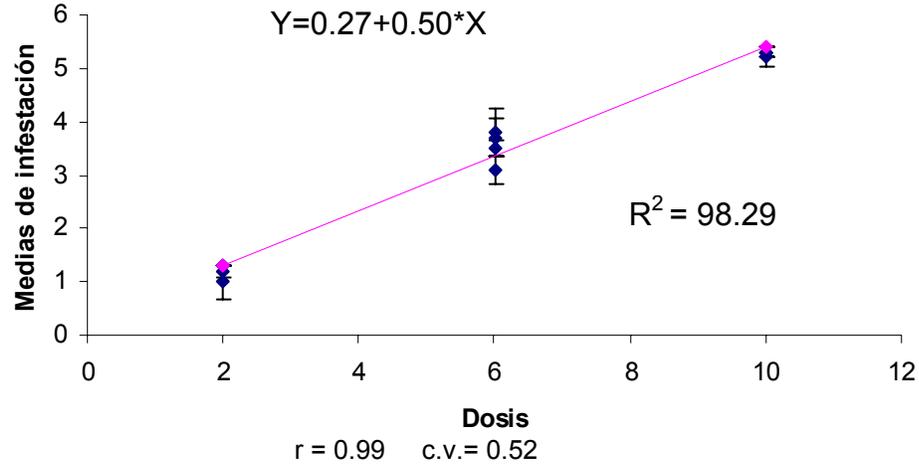


Fig. 8 Infestación de *S. spiculatus* sobre larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* en criaderos.

El valor de $p < 0.01$ obtenido en el análisis de varianza muestra que la relación entre infestación y dosis es altamente significativa con un nivel de confianza del 99%.

La R-cuadrada obtenida indica que el modelo es apropiado para explicar el 98.29% de variabilidad en la infestación. El coeficiente de correlación lineal es igual a 0.99, el cual indica una relación muy fuerte entre las variables. El error estándar estimado de la desviación estándar muestra un resultado de 0.23 y un coeficiente variación (C.V.) de 0.52, como se observa en la Fig. 8.

Las medias de infestación más altas obtenidas en este experimento, se alcanzan con la proporción 10:1 (larvas/mosquito), similar a lo reportado por

Camino y Reboredo (2000), en experimentos realizados con *S. spiculatus* sobre larvas de *C. pipiens* en condiciones de laboratorio.

Para conocer la relación entre las variables dosis y parasitismo se generó, el modelo de regresión lineal $Y = a + bX$, el cual describe correctamente la relación entre parasitismo y dosis.

La ecuación del modelo es:

$$\text{Parasitismo} = 1.13 + 0.04 * \text{Dosis.}$$

El valor de $p < 0.05$ obtenido en el análisis de varianza muestra que la relación entre infestación y dosis es significativa con un nivel de confianza del 95 %.

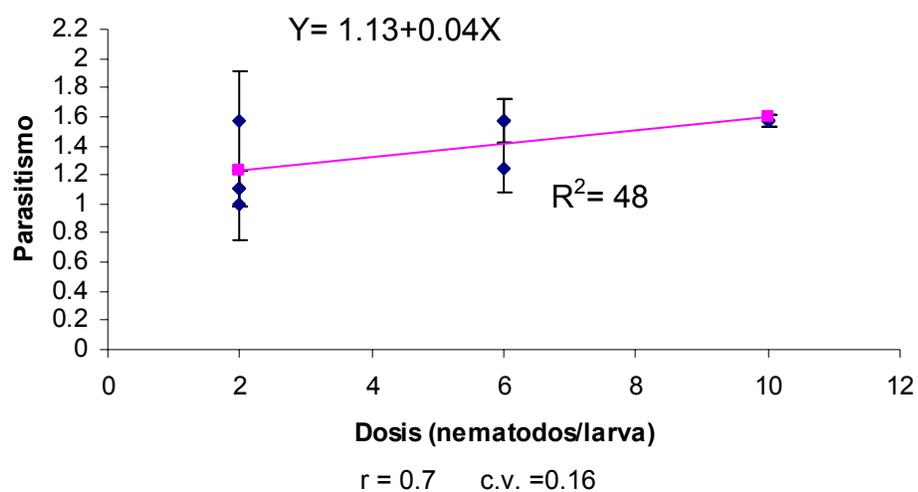


Fig. 9 Parasitismo de *S. spiculatus* sobre larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* en criaderos.

La R-cuadrada obtenida indica que el modelo es apropiado para explicar el 48 % de variabilidad en la infestación. El coeficiente de correlación lineal es igual a 0.7, el cual indica una relación moderada entre las variables. El error estándar estimado de la desviación estándar muestra un resultado de 0.17 y un coeficiente de variación (C.V.) de 0.16, como se observa en la Fig. 9.

El parasitismo varió en un rango del 80 al 100 porciento y las medias de infestación de 1.2 a 5.4 nematodos/larva, resultados que indican un alto nivel de capacidad infectiva de esta especie de nematodo.

Aunque se observa que las medias de infestación del tratamiento 10:1 son mas altas estadísticamente, con un porcentaje de parasitismo de 100; en aspectos prácticos para el control biológico de larvas de mosquitos la dosis (6:1) con una densidad de 3000 nematodos/m² puede ser mas adecuada para garantizar la supervivencia (reciclaje) de los nematodos en criaderos naturales, manteniendo en equilibrio las poblaciones larvales de mosquitos. Por lo tanto, para aplicaciones periodicas de *S. spiculatus* en condiciones de campo se recomendaría dicha dosis.

En este experimento se obtuvieron porcentajes de parasitismo de 100 utilizando una dosis de 10:1 (nematodos/larva), esto en condiciones semicontroladas (criaderos en semicampo). Resultados superiores a los obtenidos por Camino y Reboredo (2000), quienes reportan un 80 % de

parasitismo en experimentos realizados con *S. spiculatus* en condiciones de laboratorio utilizando la misma dosis.

4.4. Efecto de diferentes profundidades de agua, en la capacidad parasítica de nematodos *S. spiculatus*.

Los porcentajes de parasitismo y medias de infestación, obtenidos después de la aplicación de nematodos sobre larvas de mosquitos a dos diferentes niveles de láminas de agua. Se determinó, que estadísticamente no existe diferencia significativa entre los tratamientos probados.

Esto corrobora que el nematodo *S. spiculatus* es un endoparásito obligado y presenta alta capacidad de búsqueda (Pérez *et al.*, 2004). En el experimento realizado, la profundidad del agua no afectó la capacidad infectiva del nematodo.

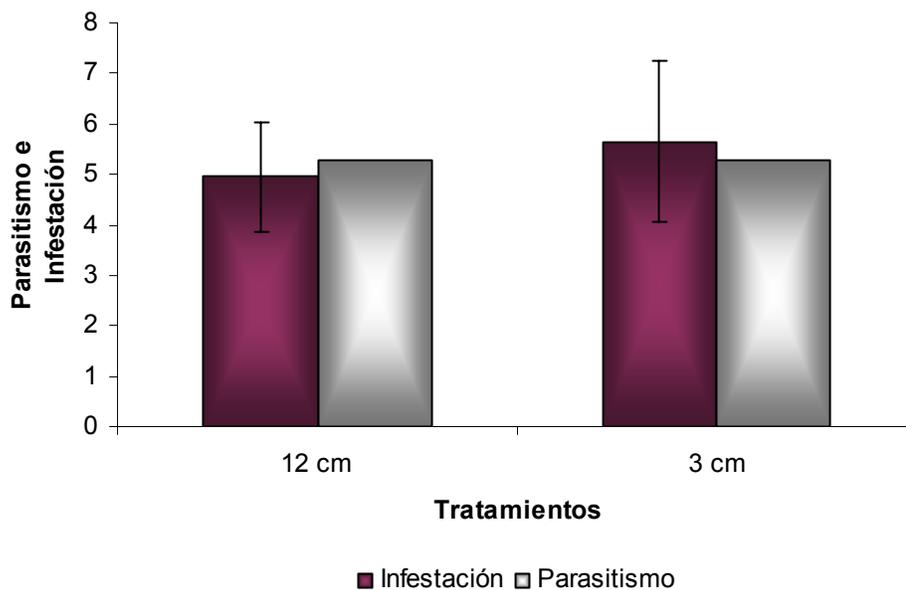


Fig. 10 Infestación y parasitismo ocasionado por *S. spiculatus* sobre larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*.

En este experimento se obtuvieron porcentajes de parasitismo de 100, en ambos tratamientos y medias de infestación de 5.6 para la lámina de agua de 3 cm y de 4.9 para la de 12 cm.

4.5. Supervivencia (reciclaje) de *S. spiculatus* en criaderos de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*.

Este experimento se realizó en un periodo de veinticuatro semanas, que comprende de agosto de 2005 a marzo de 2006, los resultados obtenidos

fueron: las medias de infestación y el parasitismo. Los datos de dispersión se presentan en la figura 11 y 12, respectivamente.

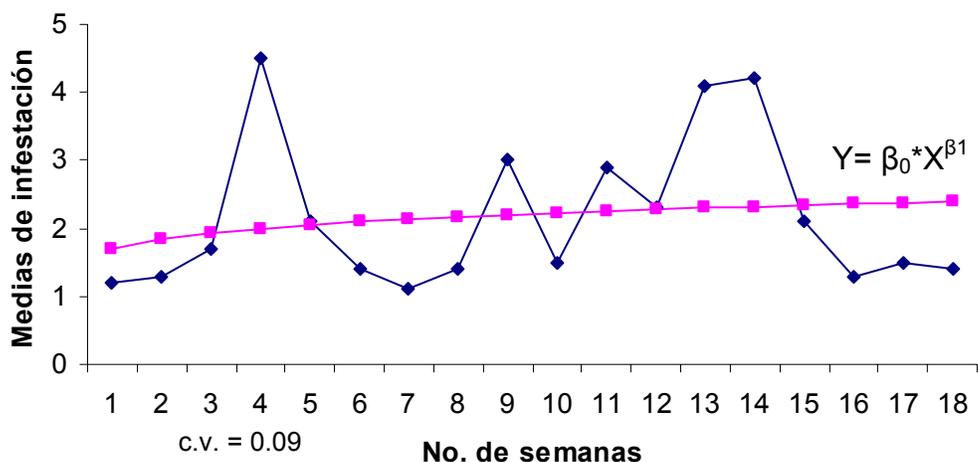


Fig. 11 Comportamiento de la infestación de *S. spiculatus* en criaderos de larvas de *C. quinquefaciatus*.

Para determinar el grado de asociación en las variables No. de semanas y medias de infestación, se generó un modelo de regresión no lineal tipo logarítmico .

La ecuación del modelo es:

$$\text{Infestación} = (1.69) * (\text{Semanas})^{0.1185}$$

La variable X corresponde a los valores del tiempo (semanas) y la variable Y corresponde a los valores de medias de infestación (Fig. 11).

El valor de $p < 0.0001$ obtenido en el análisis de varianza muestra que la relación entre infestación y semanas es altamente significativa con un nivel de confianza del 99.999 %.

El modelo logarítmico obtenido, indica que es apropiado para explicar la variable: medias de infestación, con respecto al tiempo. El coeficiente de correlación (r) es igual a 0.95, el cual indica una relación relativamente fuerte entre las variables. La desviación estándar de la media muestra un resultado de 1.12 y un coeficiente variación (C.V) de 0.51.

El modelo de regresión no lineal (logarítmico) indica la relación entre las variables analizadas. En el criadero se encontrarán nematodos siempre y cuando también se encuentre presente el organismo huésped (larvas de mosquito).

La media de infestación obtenida fue de 2.1 (nematodos/larva), la cual es baja con respecto a los resultados obtenidos en laboratorio. Y es similar a los resultados obtenidos por Pérez *et al.*, (2004) quienes reportan datos de infestación de 2.3 (nematodos/larva) de *R. iyengari* sobre larvas de *A. pseudopunctipennis* en condiciones de campo.

La capacidad parasítica de *S. spiculatus* sobre larvas de *C. quinquefasciatus* con respecto al tiempo que permaneció el experimento en los

criaderos (semicampo), permite inferir que *S. spiculatus* es un nematodo que puede ser utilizado en el control biológico de mosquitos en condiciones naturales. Además, los resultados obtenidos proporcionan información útil para mejorar las estrategias de manejo de los criaderos, ya que posiblemente hay otras variables que estén interfiriendo con los datos, como por ejemplo la variación térmica en los criaderos.

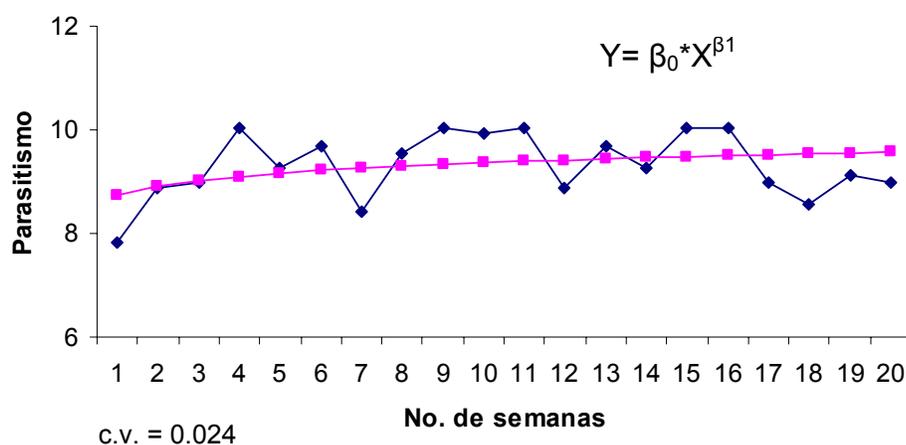


Fig. 12 Parasitismo *S. spiculatus* en criaderos de larvas de *C. quinquefasciatus*.

La relación entre las variables parasitismo y tiempo se determinó mediante el modelo de regresión no lineal $Y = \beta_0 * X^{\beta_1}$.

La ecuación del modelo es:

$$\text{Parasitismo} = (8.72) * (\text{Semanas})^{0.0309}.$$

El valor de $p < 0.0001$ obtenido en el análisis de varianza muestra que la relación entre infestación y semanas es altamente significativa con un nivel de confianza del 99.999 %.

Los resultados obtenidos, en el modelo logarítmico indican que es apropiado para explicar la variable parasitismo, con respecto a la variable tiempo (semanas). El coeficiente de correlación es igual a 0.93, el cual indica una relación relativamente fuerte entre las variables. La desviación estándar muestra un resultado de 0.19 y un coeficiente variación (C.V) de 0.024 (Fig. 12).

En la figura 12, se representan los valores del porcentaje de parasitismo (transformados) obtenidos en el experimento. Se obtuvieron porcentajes que oscilan en un rango de 60 hasta el 100%, es importante mencionar que en las semana 1 se obtuvo un porcentaje de 100 y en las semanas 2, 3 y 4, la media de infestación y el porcentaje de parasitismo fue igual a cero, debido a que durante este periodo los nematodos preparasíticos que fueron aplicados en la semana 1, estaban iniciando con su ciclo de vida. Por lo tanto, los datos se analizaron a partir de la quinta semana.

Según Camino y Reboredo (1994) el ciclo de vida de *S. spiculatus* es semejante al descrito para otros mermítidos parásitos de mosquitos, completándose en 35 días a una temperatura ambiente de 20° C. Los nematodos penetran a larva del mosquito, pasan a la etapa parasítica y cuando

emergen de ella se convierten en posparásitos. Posteriormente pasan a la etapa adulta durante la cual realizan la cópula entre machos y hembras. Después la hembra oviposita, eclosionan los huevecillos y se desarrollan preparásitos de un nuevo ciclo de vida que busquen un hospedero para continuar con su ciclo. En el presente experimento esto ocurrió en aproximadamente 21 días, tiempo en el cual se volvieron a detectar larvas parasitadas.

En este experimento se obtuvo un porcentaje promedio de parasitismo que fue de 86.1, este resultado es favorable, ya que en laboratorio se obtienen porcentajes que oscilan entre 80-100 con la misma dosis (10:1 nematodos/larva). Pérez *et al.*, 2004 reporta resultados similares, 93 por ciento de parasitismo utilizando el nematodo *R. iyengari* sobre larvas de *A. pseudopunctipennis* en condiciones de campo.

4.6. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *S. spiculatus* en larvas de *C. quinquefasciatus*.

Se registró la presencia de uno o más nematodos de *S. spiculatus* parasitando a la misma larva de *C. quinquefasciatus* notándose que existe una relación estrecha entre el número de nematodos con la cantidad de machos y hembras que emergieron de la larva del mosquito.

Con las dosis de 15, 20 y 25 nematodos *S. spiculatus* por una larva de segundo estadio del mosquito *C. quinquefasciatus*, se observaron los valores mas altos de superparasitismo (promedios de 11 a 18 nematodos/larva), lo que ocasionó que el nematodo no terminara su desarrollo normal en el interior de la larva hospedera, ya que esta no soporta la carga de parásitos en su interior y muere antes de que los nematodos puedan completar su fase parásita y emerjan como posparásitos. En las dosis de 3, 5 y 10 nematodos por larva, los nematodos completaron su desarrollo normal, pero, se observó que cuando emergían de 6-10 nematodos por larva, estos eran de tamaño pequeño, y cuando emergen de 1-4 nematodos por larva son de mayor tamaño.

El modelo de regresión lineal obtenido $Y = a + bX$, describe correctamente la relación entre infestación y dosis.

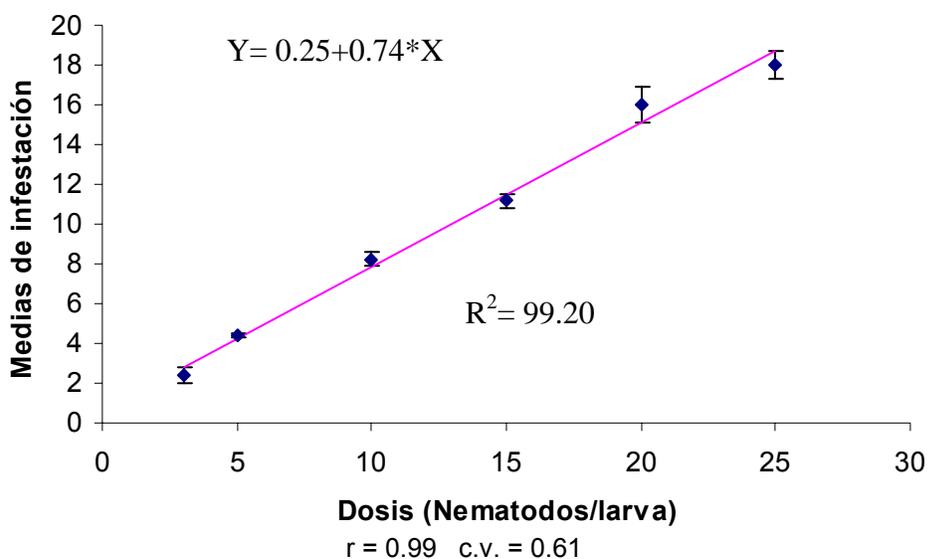


Fig. 13 Comportamiento de los datos de infestación obtenidos del experimento de parasitismo múltiple de *S. spiculatus* en criaderos de larvas de *C. quinquefasciatus*.

La ecuación del modelo es:

$$\text{Infestación} = 0.250 + 0.742 * \text{Dosis}.$$

El valor de $p < 0.01$ obtenido en el análisis de varianza muestra que la relación entre infestación y dosis es altamente significativa con un nivel de confianza del 99 %.

La R-cuadrada obtenida indica que el modelo es apropiado para explicar el 99.20 % de variabilidad en la infestación. El coeficiente de correlación lineal es igual a 0.99, el cual indica una relación muy fuerte entre las variables. El error estándar estimado de la desviación estándar muestra un resultado de 0.64 y un coeficiente de variación de 0.61 (Fig. 13).

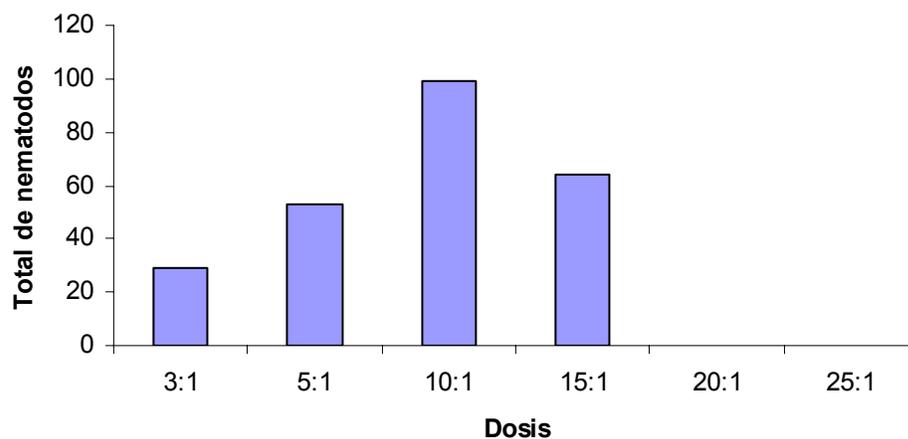


Fig. 14 No. de nematodos *S. spiculatus* que alcanzaron la fase posparásita en larvas de *C. quinquefaciatus*.

Se encontraron distintas frecuencias de parasitismo que varían de un parásito por huésped, es decir por larva de mosquito, hasta 10 nematodos, que completaron su desarrollo normal dentro de la larva, también se encontraron frecuencias de 12:1, 15:1, 18:1, 22:1 y 24:1 estas últimas se encontraron cuando se detectaban larvas muertas que fueron inmediatamente disectadas, ya que por la cantidad de parásitos dentro de un mismo huésped, ambos organismos no pudieron completar su desarrollo y murieron, según se observa en la figura 14 y 15.

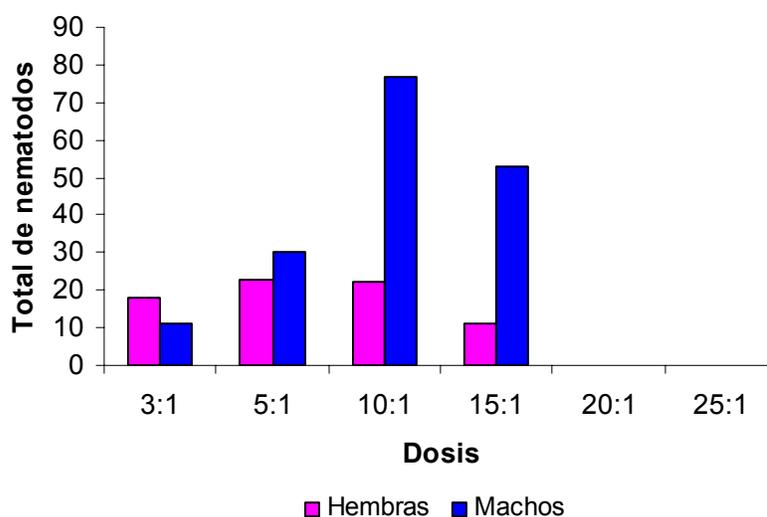


Fig. 15 Hembras y machos de *S. spiculatus* emergidos de larvas de *C. quinquefaciatus*, a diferentes dosis de aplicación.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que la cantidad máxima de parásitos que podría soportar una larva de *C. quinquefaciatus* es de diez individuos, esto concuerda con lo que menciona Camino (1988); la cantidad máxima que podría albergar una larva de *C. p. fatigans* es de 10

individuos. Pero también es importante mencionar que, basta un solo nematodo que parasite a la larva para que se ocasione la muerte de esta última, esto sucede porque cuando el nematodo complete su desarrollo dentro de la larva, perfora el cuerpo del huésped, para que salga.

La relación 5:1 presenta una razón sexual de 56.6 %, esta sería una frecuencia óptima para una cría masiva del parásito ya que presenta una relación macho- hembra de 1:0.76 y según Camino (1988) cuando se tiene igual número o el doble de machos que de hembras, esta cantidad facilita el encuentro de sexos y por lo tanto la cópula, lo que llevaría a una adecuada oviposición. También menciona que cuando el número de hembras disminuye considerablemente, equivale a una baja producción de huevecillos lo que ocasionaría que futuras infecciones sean pobres, así como la población de nematodos.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Derivadas de los resultados obtenidos en la presente investigación se presentan las siguientes conclusiones:

Bajo condiciones de laboratorio el promedio de huevecillos ovipositados por una hembra de *S. spiculatus* es de 5063.

Las dosis 20, 15, 10, 5 y 3 (nematodos/larva) de *S. spiculatus* por larva de *C. quinquefasciatus*, ocasionan 100 % de parasitismo. Las medias de infestación se incrementaron con respecto al aumento de las dosis de nematodos aplicadas.

Bajo condiciones de laboratorio, las larvas del mosquito *C. quinquefasciatus* son altamente susceptibles al parasitismo del nematodo *S. spiculatus*.

El nematodo *S. spiculatus*, presenta alta capacidad parasítica a diferentes profundidades de láminas de agua, en condiciones de laboratorio.

En criaderos, de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus* los nematodos *S. spiculatus*, se pueden reproducir, a través del tiempo siempre y cuando el organismo huésped esté presente en el mismo criadero.

El parasitismo múltiple de *S. spiculatus* sobre larvas de *C. quinquefasciatus*, ocasiona mayor proporción de machos con respecto a las hembras.

La dosis 5:1 presenta una razón sexual de 56.6 %, indicando que es la dosis adecuada para la reproducción del nematodo *S. spiculatus*, utilizando como huésped larvas de *C. quinquefasciatus*.

S. spiculatus es un nematodo que puede ser utilizado en el control biológico de larvas de mosquito en condiciones naturales.

Para aplicaciones en campo de *S. spiculatus* se recomienda utilizar la dosis 6:1 (nematodos/larva).

VI. LITERATURA CITADA

- Alatorre R. R. 1998 Nematodos parásitos de insectos. Río Bravo. Tam., méx. Resumen del IX Curso Nacional de Control Biológico. pp. 113-119.
- Ambros, C. G. A. Santamarina M. 1995. Estudio de la oviposición del nematodo parásito de culicidos *Romanomermis iyengari* en el laboratorio. Revista Cubana de Medicina Tropical. 47 (3): 167-70.
- Camino B. N. 1988. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda, Mermithidae) en larvas de *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828. IHERINGIA. Sér. Misc. Porto Alegre (02):93.97.
- Camino B. N., García J. J. 1992. Algunos factores que afectan el parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en mosquitos. Neotropica, 48. Pp. 75-80.
- Camino B. N. Reboredo R. G. 1994. Biología de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) parásito de mosquitos (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Neotrópica, 40(103-104): 45-48.
- Camino B. N. García J. J. 1998. Crecimiento larval de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828, como hospedador alternativo. pp. 31-37.
- Camino B. N. Reboredo R.G. 2000. Efecto de la temperatura en la infección de tres especies de culicidae (Diptera) por *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda, Mermithidae). Iheringia. Sér.Zool. Porto Alegre.(88): 3-6.
- Castillo M. L. 2000. Introducción a la estadística experimental. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. pp. 169-183.
- Chandrasah R.K. and P. K. Rajagopalan. 1979. Mosquito breeding and the natural parasitism of larvae by a fungus coelomomyces and mermithid nematode *Romanomermis* in paddy fields in pondicherry. Indian Journal Medical Research 69 (1): 63-70.

- Christopher S. R. 1960. *Aedes aegypti* the yellow fever mosquito. Cambridge, at the University Press.
- Gajanana A., S. J. Kazmin, U. S. Bheema Rao, S.G. Suguna and R.K. Chandrajas. 1978. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: Mermithidae) of mosquito larvae isolated in pondicherry . Indian Journal Medical Research 68(2): 242-7.
- Ibáñez B. S. Martínez C. C. 1994. Clave para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la República Mexicana.
- Nickle W. R. 1972. A contribution to our knowledge of the Mermithidae (Nematoda). Journal of Nematology 4(5):113-46
- Nickle W. R., Welch H. E. 1984. History developmente and importante of insect nematology. En: Nicle W. R. (ed) Plant and insect nematodos. Marcel Dekker, New York, pp. 627-653.
- OPS/OMS. 1990. Principios de epidemiología para el control de la malaria. Reproducido por la SSA México, D.F. 301p.
- Pérez P. R., Santamarina M. y S. Martínez T. 1996. Control biológico de larvas de mosquitos transmisores del paludismo con nematodos parásitos en Oaxaca, México. Revista Investigación Hoy. Instituto Politécnico Nacional. Noviembre-Diciembre. pp. 8-14.
- Pérez P. R. 2002. Control de Mosquitos con Nematodos y Extractos vegetales. Tesis de doctorado. Colegio de Posgraduados. Montecillos, Edo. de México. pp. 1-6.
- Pérez-Pacheco Rafael, C. Rodríguez H., J. Lara R., Montes B., G. Ramírez V. y L. Martínez M. 2003. Susceptibilidad de larvas de mosquito *Aedes aegypti* (L.) y *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* (Welch). Folia Entomol. Mex., 42(3): 321-327.
- Pérez-Pacheco Rafael, C. Rodríguez H., J. Lara R., Montes B., G. Ramírez V. y L. Martínez M. 2004. Parasitism of *Romanomermis iyengari* in larvae of three species of mosquito in the laboratory and in *Anopheles pseudopunctipennis* in the field. Agrobiencia 38(4): 413-421.

- Pérez-Pacheco Rafael, C. Rodríguez H., J. Lara R., Montes B. y J. Ruiz V. 2005. Mosquito control *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) with the nematode *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, México. *Biological Control*. 32:137-142.
- Petersen J. J. and O. R. Willis. 1972. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosquito news* 32(2):226-30.
- Petersen J.J. and O. R. Willis 1975. Establishment and recycling of a mermithid nematode for the control of mosquitoes larval. *Mosquito news*. 2:526-32
- Petersen J. J. and J. M. Cupello. 1981. Comercial development and future prospects for entomogenous. *Journal of Nematology* 13(3):280-84.
- Poinar G. O. Jr. 1979. Nematodos for biological control insects. CRC Press. Boca Ratón Florida, USA. 227 p.
- Poinar G. O. Jr. and Nora B. Camino. 1986. *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) Parasitizing *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. *Journal of Nematology* 18(3):317-319.
- Rubzov I. A. 1972. Acuatic Mermithid of the fauna of the USSR. Volumen 1. Zoological Institute, Academy of Science USSR.
- Santamarina M. A., I. García A. y R. González B. 1993. Valoración de la capacidad infectiva del nematodo parasito *Romanomermis iyengari* (nematoda:Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 45(2): 128-31
- Santamarina M. A. 1994. Actividad parasitaria de *Romanomermis iyengari* (Nematodo:mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Miscelánea Zoológica* 17(1): 59-65.
- Secretaría de Salud. 1993. Manual de ordenamiento del medio para el control de vectores. México. 180p.
- Secretaría de Salud. 1996. Situación epidemiológica del paludismo en la republica mexicana. *Boletín de paludismo y otras enfermedades transmitidas por vector*. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud México 8(1): pp. 2-11.
- SAS Institute. 1994. The SAS system for Windows. Release 6.10. SAS Institute. Cary, N. C.

STATGRAPHICS Plus. 1999. Versión 4 for windows.