



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación  
para el Desarrollo Integral Regional,  
Unidad Oaxaca**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACION Y APROVECHAMIENTO DE  
RECURSOS NATURALES**

**(PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL)**

**EFFECTO Y MEJORAMIENTO DE LA TOLERANCIA A LA  
SALINIDAD DE NEMATODOS *Romanomermis iyengari*  
PARÁSITOS DE MOSQUITOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA

NINFA RUIZ SANTIAGO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAFAEL PÉREZ PACHECO

DR. JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ GARCÍA



# INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

## ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 12 del mes de noviembre del 2010 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: **“Efecto y mejoramiento de la tolerancia a la salinidad de nematodos *Romanermis iyengari* parásitos de mosquitos”**.

Presentada por el alumno:

**Ruiz**

Apellido paterno

**Santiago**

materno

**Ninfa**

nombre(s)

Con registro: 

A	0	9	0	2	5	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN 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

Directores de tesis:

Dr. Rafael Perez Pacheco

Dr. José Antonio Sánchez García

Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández

Dr. Alfonso Vasquez López

Dr. Jaime Ruiz Vega

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día **12** del mes de **noviembre** del año **2010**, el (la) que suscribe **Ruiz Santiago Ninfa** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A090259**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Drs. Rafael Pérez Pacheco y José Antonio Sánchez García y cede los derechos del trabajo titulado: **“Efecto y mejoramiento de la tolerancia a la salinidad de nematodos *Romanomermis iyengari* parásitos de mosquitos”**. y cede los derechos 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 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoax@ipn.mx](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [ninfasantiago@yahoo.com.mx](mailto:ninfasantiago@yahoo.com.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ruiz Santiago Ninfa



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

## RESUMEN

Los mosquitos son importantes por los problemas de salud pública que ocasionan al ser vectores de enfermedades como la malaria y el dengue. Una alternativa efectiva, específica y sostenible para el control biológico de mosquitos son los parásitos del género *Romanomermis* spp. Sin embargo el uso práctico y extensivo de los nematodos está limitado a evaluaciones en comunidades y se requiere continuar investigando como mejorar su capacidad reproductiva, viabilidad e infectividad en larvas de mosquitos, debido a que la etapa preparásitica del nematodo es afectada por factores ambientales como la temperatura, salinidad y pH, es por ello que se hace imprescindible el conocimiento del efecto de la salinidad en la capacidad parasítica del nematodo *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) y establecer el efecto de una alta salinidad en el medio. El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto que ejerce las concentraciones de NaCl sobre la capacidad infectiva del nematodo *R. iyengari* y obtener líneas de nematodos tolerantes a altas concentraciones de NaCl por medio de un proceso de selección durante cuatro generaciones consecutivas. La evaluación del efecto de la salinidad en la capacidad parasítica del nematodo *R. iyengari* se efectuó en un rango 0 - 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl. El nematodo *R. iyengari* presentó parasitismo en todas las concentraciones de salinidad evaluadas. Los valores de parasitismo decrecieron respecto a las concentraciones de salinidad, a altas concentraciones de salinidad correspondieron valores bajos de parasitismo y viceversa. Fue considerable la acción de concentraciones altas de NaCl sobre la acción infectiva del nematodo, observándose en una reducción drástica en el porcentaje de parasitismo: 1600 (3.1), 1800 (3.1) y 2000 mg L<sup>-1</sup> (1.25). Los nematodos postparasíticos

obtenidos a partir de la población susceptible fueron seleccionados por tolerancia a altas concentraciones de salinidad y expuestos de forma consecutiva a salinidad 2000 mgL<sup>-1</sup> hasta la F4. Se generaron 11 líneas puras de nematodos *R. iyengari* con mayor tolerancia a NaCl. El traslape de los límites fiduciales en la población susceptible de 1068-1114 (DL<sub>50</sub>) con los de la F4 1113-1263 (DL<sub>50</sub>) indican que las poblaciones son iguales; sin embargo en la evaluación de la capacidad infectiva de una línea pura F4 de *R. iyengari* tolerante a NaCl, está mostró un aumento en el parasitismo respecto a la población susceptible en concentraciones altas de NaCl 1600, 1800 y 2000 mgL<sup>-1</sup> de 20, 5.2 y 1.5% respectivamente, indicando que la selección por tolerancia a 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl en nematodos *R. iyengari* evidenció una mayor tolerancia en la F4.

Palabras clave: *Romanomermis iyengari*, salinidad, tolerancia.

## ABSTRACT

Mosquitoes are important public health problems they cause to be vectors of diseases like malaria and dengue. An effective alternative, specific and sustainable biological control of mosquitoes are parasites of the genus *Romanomermis* spp. However, the practical and extensive use of nematodes is limited to assessments in communities and further research is required to improve their reproductive capacity, viability and infectivity for mosquito larvae, because the nematode preparasitic stage is affected by environmental factors such as temperature, salinity and pH, which is why it is essential to understand the effect of salinity on the ability the parasitic nematode *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) and establish the effect of high salinity in the middle. This work was carried out to determine the effect of different concentrations of NaCl on the infectivity of the nematode *R. iyengari* and obtain nematode lines tolerant to high concentrations of NaCl through a selection process for four consecutive generations. The evaluation of the effect of salinity on the parasitic capacity of the nematode *R. iyengari* was made in a range 0 - 2000 mg L<sup>-1</sup> NaCl. The nematode *R. iyengari* parasitized at all salinity levels tested. The values of parasitism decreased from the levels of salinity, high salinity levels under low levels of parasitism and viceversa. Action was considerably high levels of NaCl on nematode infective action, showing a drastic reduction in the percentage of parasitism: 1600 (3.1) 1800 (3.1) and 2000 mg L<sup>-1</sup> (1.25). Postparasitic nematodes obtained from the susceptible population were selected for tolerance to high salinity and exposed sequentially to salinity 2000 mg L<sup>-1</sup> to F4. We generated 11 inbred lines of nematodes *R. iyengari* with greater tolerance to NaCl. The overlap of fiducial limits in the susceptible population of 1068-1114

(LD<sub>50</sub>) with the F4 1113-1263 (LD<sub>50</sub>) indicate that populations are equal, but in the evaluation of the infectivity of a inbred line of *R. iyengari* F4 . NaCl tolerant is showed an increase in parasitism compared to the susceptible population in high salinity NaCl 1600, 1800 and 2000 mgL<sup>-1</sup> of 20, 5.2 and 1.5% respectively, indicating that selection for tolerance to 2000 mg L<sup>-1</sup> NaCl nematodes *R. iyengari* showed a greater tolerance in the F4.

Keywords: *Romanomermis iyengari*, salinity, tolerance.

*A dios*

*A mi Mamita querida por darme la vida, fuerza y palabras que me guían*

*A mi hermana Feli por estar siempre cuando la necesito, ahí también a Mimin que siempre me espera.*

*A Tulio por su apoyo en mis proyectos de vida*

*Agradecimientos*

Después del trabajo, clases, experiencias, vivencias, risas, llego el momento de agradecer a las personas que formaron parte de esta etapa de mi vida y que enriquecieron mis experiencias personales, ayudaron y apoyaron este proyecto. Muchas son las personas que me han acompañado en este camino y que han contribuido, en alguna medida, a que este proyecto se hiciera realidad. Aunque unas breves líneas no pueden dar cuenta de mi profunda gratitud y de los recuerdos imborrables que guardo, no por ello las obviare.

Sin duda alguna, mi principal agradecimiento va dirigido a mi Director de Tesis, Dr. Rafael Pérez Pacheco, mi tutor y consejero, por quien siento un profundo cariño y admiración. A él le agradezco, entre otras cosas, sus valiosos consejos, su constante paciencia, su gran generosidad y su plena disposición para dedicar parte de su tiempo en momentos de flaqueza. Fue un placer poder compartir y disfrutar de su experiencia y amistad.

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR-Oaxaca), por permitirme crecer en mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado en el tiempo de realización de mis estudios de maestría.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN (PIFI) por promover la integración de los alumnos con investigadores en proyectos.

Quisiera agradecer de forma especial el apoyo del Dr. José Antonio Sánchez García por enriquecer este trabajo con su experiencia y comentarios.

En estas líneas aprovecho para agradecer profundamente al Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández por permitirme crecer en mi formación, gracias a las observaciones realizadas a esta investigación, Doc. por su disponibilidad, amabilidad y amistad, ¡muchas gracias!

Agradezco ampliamente al Dr. Jaime Ruiz Vega por la información proporcionada, guía, comentarios y observaciones al presente trabajo.

Mi más amplio agradecimiento al Dr. Alfonso Vásquez López por las observaciones al trabajo de investigación, amistad y enseñanzas.

Mi agradecimiento a la Dra. Martha Angélica Bautista Cruz por dedicar parte de su tiempo a la revisión del escrito y hacer comentarios para enriquecerlo.

Un agradecimiento especial al M.C. Sabino Honorio Martínez Tomas por su paciencia, apoyo, tiempo y consejos en la realización de este trabajo, porque aunque no formo parte de mi comité siempre estuvo apoyando mi trabajo hasta el final. Además de brindarme su amistad y pasar muy buenos momentos de convivencia en mi estancia en la Bioplanta. ¡Muchas gracias Sabil.

Una persona muy apreciada a la que me gustaría agradecer profundamente es al Técnico Gonzalo Flores Ambrosio por sus buenos momentos, risas, consejos, apoyo, trabajo, compañía y palabras de ánimo. ¡Muchas gracias Don Gonzalo!

A aquellos con los que he compartido algunas etapas desde que empecé en el CIIDIR mi formación o desarrollo de tesis, entre ellos Carlos, Julián, Gris, Edgar, Licha, Juan Reyes, Juan, Alex, Nelly, compañeros de trabajo que me apoyaron con buenos consejos, buenos momentos y por su amistad, ¡ Muchas gracias!

**¡MUCHAS GRACIAS!**

## CONTENIDO

	<b>Pág</b>
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	xi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b> .....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
<b>CAPÍTULO 3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
3.1 Generalidades de mosquitos.....	5
3.2 Generalidades de los nematodos parásitos de mosquitos.....	7
3.3 Generalidades de <i>Romanomermis iyengari</i> (Nematoda: Mermithidae).....	8
3.3.1 Ciclo biológico de <i>R. iyengari</i> .....	8
3.3.2 Capacidad infectiva de <i>R. iyengari</i> .....	10
3.3.3 Salinidad.....	11
3.4 Presión de selección.....	16
3.5 Selección por tolerancia en nematodos entomopatógenos.....	17
<b>CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
4.1 Materiales y biológico.....	20
4.1.1 Cría del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> .....	20
4.1.2 Producción masiva de nematodos.....	20
4.2 Evaluación del efecto de NaCl en la capacidad infectiva del nematodo <i>R. iyengari</i> .....	22
4.3 Selección de líneas puras de nematodos <i>R. iyengari</i> con mayor tolerancia a NaCl.....	23
4.4 Evaluación de la capacidad infectiva de una línea pura tolerante de <i>R. iyengari</i> .....	25
4.5 Análisis estadístico.....	26

<b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>27</b>
5.1 Efecto de NaCl en la capacidad infectiva del nematodo <i>R. iyengari</i> .....	29
5.2 Línea de nematodos <i>R. iyengari</i> con mayor tolerancia a NaCl.....	30
5.2.1 F1.....	30
5.2.2 F2.....	32
5.2.3 F3.....	35
5.2.4 F4.....	38
5.3 Capacidad infectiva de una línea pura F4 tolerante de <i>R. iyengari</i> .....	39
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 7. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>44</b>

## INDICE DE CUADROS

	Pág
1 Efecto de NaCl en la capacidad infectiva de <i>Romanomermis iyengari</i> contra larvas de mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	27
2 Parámetros biológicos de hembras <i>R. iyengari</i> con mayor tolerancia a NaCl en la F1 en larvas <i>C. quinquefasciatus</i> .....	30
3 Parámetros biológicos de hembras <i>R. iyengari</i> con mayor tolerancia a NaCl en la F2 en larvas <i>C. quinquefasciatus</i> .....	33
4 Parámetros biológicos de hembras <i>R. iyengari</i> con mayor tolerancia a NaCl en la F3 en larvas <i>C. quinquefasciatus</i> .....	36
5 Parámetros biológicos de hembras <i>R. iyengari</i> con mayor tolerancia a NaCl en la F4 en larvas <i>C. quinquefasciatus</i> .....	38
6 Efecto de NaCl en la capacidad infectiva de <i>R. iyengari</i> contra larvas de mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	40

## INDICE DE FIGURAS

	Pág
1 Ciclo biológico del nematodo <i>R. iyengari</i> parasito de larvas de mosquitos (Pérez-Pacheco <i>et al.</i> , 2004).....	10
2 a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F1 de <i>R. iyengari</i> en larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> por concentración salina .....	32
3 a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F2 de <i>R. iyengari</i> en larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> por concentración salina.....	35
3 a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F3 de <i>R. iyengari</i> en larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> por concentración salina.....	37
4 Parasitismo, b) infestación de los altos niveles de salinidad (1600, 1800, y 2000 mg L <sup>-1</sup> de NaCl) en la generación filial (F4) de <i>R. iyengari</i> en larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> .....	55
5 a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F4 de <i>R. iyengari</i> en larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> por concentración salina.....	39
6 Representación gráfica de la inhibición de NaCl en la capacidad infectiva de <i>R. iyengari</i> .....	57
7 Comportamiento del parasitismo por hembras puras tolerantes a NaCl de <i>R. iyengari</i> en larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> a través de cuatro generaciones filiales.....	41
8 Comportamiento de la infestación por hembras puras tolerantes a NaCl de <i>R. iyengari</i> en larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> a través de cuatro generaciones filiales.....	42

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son importantes por los problemas de salud pública que ocasionan al ser vectores de enfermedades como la malaria y el dengue. De las 3200 especies de mosquitos (Díptera: Culicidae) reportados a nivel mundial en México se encuentran presentes 150, dentro de las cuales existen especies importantes para el sector salud como: *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* que son transmisores potenciales del flavivirus agente causal del dengue; *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopuntipennis*, vectores de la malaria o paludismo y especies del género *Culex* spp que transmiten el virus del Nilo (Samanidou-Voyadjoglou *et al.*, 2007).

La estrategia utilizada con mayor éxito y la que, a su vez, ha despertado las mayores controversias, ha sido el control químico. Entre los compuestos insecticidas se incluyen grupos clorados (diclorodifeniltricloroetano, dieldrin y lindano), fosforados (clorpirifós, fenitrotión, fentilón, malathion, metilpirimifos y temefós), carbamatos (bendiocarb y propoxur), piretroides (permetrina). Sin embargo el uso de estos químicos ha generado resistencia fisiológica y etológica o conductual (Vargas, 1998), además de problemas ambientales tales como: contaminación del suelo, aire y agua, muerte de organismos no blancos, alteración de ecosistemas, intoxicación de personas y altos costos económicos (Brown y Platzer, 1978; Santamarina *et al.*, 1999; Pérez-Pacheco *et al.*, 2004). Se conoce

un total de 56 especies de mosquitos del genero *Anopheles* con resistencia a insecticidas, 20 y 19 especies respectivamente de *Culex* y *Aedes* (Vargas, 1998).

Una alternativa al control químico de mosquitos es el control biológico basado en la utilización de nematodos parásitos de larvas de mosquitos para la reducción de poblaciones de vectores de enfermedades de importancia en salud pública. Algunas especies de nematodos de la familia Mermithidae han demostrado ser eficaces en el control de larvas de mosquitos en condiciones de laboratorio y campo; específicamente realizados con la especie *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) han evidenciado que este nematodo es capaz de reducir altas densidades poblacionales de larvas de mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* en condiciones de campo y laboratorio (Santamarina y Bellini, 2000; Pérez-Pacheco *et al.*, 2004, 2005), presentándose como una alternativa efectiva, específica y sostenible para el control biológico de mosquitos. (Pérez-Pacheco *et al.*, 2005). Los preparásitos son el estado infectivo de los nematodos parásitos de mosquitos; sin embargo, estos son afectados por factores físico-químicos como el pH, salinidad y temperatura, en el agua de criaderos de larvas de mosquitos en donde se aplican, es por ello que la duración de la viabilidad e infectividad de los preparásitos es vital para el mayor potencial de los nematodos (Petersen y Willis 1970; Brown y Platzer 1978; Prindantseva *et al.*, 1990; Peng, 1999; Pérez *et al.*, 1999; Achinelly y García, 2003). La utilización eficiente de nematodos preparásitos *R. iyengari* en el control de mosquitos requiere de estudios profundos tendientes a determinar el efecto de la salinidad y otros factores que afectan la capacidad infectiva de *R. iyengari* para mejorar el impacto en el control de mosquitos. La presente investigación está enfocada para determinar el efecto de diferentes concentraciones de salinidad (NaCl) sobre el parasitismo e infestación del

nematodo *R. iyengari* y mediante un proceso de selección por tolerancia a NaCl incrementar la capacidad infectiva de los nematodos preparasíticos *R. iyengari* para generar líneas puras de nematodos con mayor tolerancia a NaCl por medio de un proceso de presión de selección durante cuatro generaciones consecutivas.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo general**

2.1.1 Determinar el efecto de diferentes concentraciones de NaCl en la capacidad infectiva del nemátodo *R. iyengari* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culícidae) y obtener líneas puras de nemátodos *R. iyengari* con mayor tolerancia a la salinidad.

#### **2.2 Objetivos particulares**

2.2.1 Evaluar el efecto de diferentes niveles de NaCl en la capacidad infectiva de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*.

2.2.2 Obtener líneas puras de *R. iyengari* con mayor tolerancia a NaCl después de un proceso de presión de selección en cuatro generaciones.

2.2.3 Determinar la capacidad infectiva de una línea pura tolerante a la salinidad de NaCl.

## CAPÍTULO 3

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Generalidades de mosquitos

Los mosquitos (Díptera: Culicidae) son importantes por los problemas de molestias que ocasionan con las picaduras y por ocasionar problemas de salud pública al ser vectores de enfermedades. Existen reportados más de 3200 especies de mosquitos a nivel mundial, a excepción del antártico, cubierto continuamente por el hielo (Harwood y James, 1979), en México se encuentran presentes 150 dentro de las cuales existen especies importantes para el sector salud como: *Aedes aegypti*, y *Aedes albopictus* que son transmisores potenciales del virus agente causal del dengue; *Anopheles albimanus* y *A. pseudopunctipennis* vectores de la malaria o paludismo y especies del género *Culex* spp que transmiten el virus del Nilo Occidental (Samanidou-Voyadjoglou *et al.*, 2007)

El ciclo biológico de los mosquitos, presenta cuatro fases y se incluye en el grupo de los holometabolos (metamorfosis completa), es decir, pasan por los estados huevo, larva, pupa y adulto. La larva a su vez pasa por cuatro etapas o instares (I, II, III y IV instar), el adulto o imago es aeroterrestre. Los instares inmaduros se desarrollan preferiblemente en depósitos de agua y los criaderos son variados, constituidos por aguas con un alto grado de contaminación, abundante contenido de materia orgánica, con detritos en proceso de fermentación, en ambientes sombreados, cuerpos de agua cerrados o semilóticos, cercanos al ambiente domiciliario (Brewer *et al.*, 1987).

Los mosquitos miembros del género *Culex* (Diptera: Culicidae) son vectores de arbovirus que afectan al hombre y animales principalmente con dos especies: *C. pipiens*, presente en zonas templadas y *C. quinquefasciatus*, que habita en regiones tropicales y subtropicales (Savage y Miller, 1995).

La especie *C. quinquefasciatus* es acentuadamente antropofílica ya que se encuentra asociado con mayor frecuencia al hábitat humano tanto urbano como rural. Esta especie se ha relacionado con la transmisión de filarias como *Wuchereria bancrofti* y *Dirofilaria immitis*, del virus del Nilo occidental y de los virus causantes de la encefalitis de San Luis y la encefalitis equina Venezolana, entre otros. Aunque en áreas donde no existe riesgo de transmisión de agentes patógenos por esta especie, constituye un problema de salud pública debido a la alergia ocasionada por su picadura y a las molestias causadas por sus altas densidades de población que alcanzan (Salazar y Moncada, 2004).

Una de las estrategias utilizadas con mayor éxito y la que, a su vez, ha despertado las mayores controversias, ha sido el control químico de mosquitos. En la actualidad, esta estrategia es el principal método de control. Alrededor de 36 compuestos insecticidas se han utilizado en el control de los mosquitos; 5 clorados, 16 fosforados, 6 piretroides y 3 carbamatos (Vargas, 1999).

El control de mosquitos con insecticidas químicos ha solucionado el problema de epidemias de importancia en salud pública por muchos años. Por lo que los insecticidas químicos contribuyeron a la extinción de muchas enfermedades transmitidas por los mosquitos y otros insectos. Su uso excesivo y la carencia de conocimiento adecuado tuvieron un impacto destructivo al ambiente y la vida salvaje, incluyendo peces, aves, depredadores,

insectos polinizadores y microorganismos del suelo (Samanidou-Voyadjoglou *et al.*, 2007). Uno de los mayores impactos del uso de insecticidas es el desarrollo de resistencia fisiológica y etológica. La resistencia de los mosquitos a los insecticidas fue detectada en 1940 en especies del género *Aedes*. Seguida en 1950 para *Anopheles* y para 1986, 109 especies de mosquitos fueron reportadas como resistentes al grupo de los clorados. La resistencia se extendió a 38 especies a insecticidas fosforados y 17 especies hacia carbamatos.

### **3.2 Generalidades de nematodos parásitos de mosquitos**

El control biológico de mosquitos con nematodos parásitos es una alternativa que permite disminuir los problemas asociados al uso excesivo de los insecticidas químicos (Santamarina y Pérez-Pacheco, 2007).

La importancia de los nematodos 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*, *Neothylenchidae*, *Rhabdithidae*, *Sphaerulariidae*, *Steinernematidae* y *Tetradonematidae* e incluyen especies que atacan a insectos matando, esterilizando o alterando el desarrollo del huésped (Poinar, 1979).

La familia *Mermithidae* agrupa especies como: *Romanomermis culicivorax*, *Romanomermis iyengari*, *Romanomermis wuchngensis* y *Strelkovimermis spiculatus* que son parásitos de larvas de mosquitos, capaces de reciclarse biológicamente en los criaderos de larvas de mosquitos mejor que muchos organismos patógenos y que se pueden

considerar como agentes con potencial en el control biológico porque presentan: especificidad para larvas de mosquitos, el parasitismo que provocan es siempre letal para el hospedero, son completamente inocuos para la fauna acompañante y por la capacidad de permanencia en los cuerpos de agua (Petersen y Cupello, 1981).

### **3.3 Generalidades de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae)**

#### **3.3.1 Ciclo biológico de *R. iyengari***

El ciclo de vida de *R. iyengari* involucra un hospedero único, una larva de mosquito, consta de las fases siguientes: huevo (Juvenil 1 vive el en interior del huevo), juvenil 2 (J2) denominado preparásitico, J3 que es la fase parasita o parasítica o estado de vida libre/etapa infectiva, parásita o parasítica (cuando se encuentra dentro de la larva del mosquito), J4 fase postparásita (cuando emerge del huésped) y adulto.

Cuando los huevos eclosionan liberan los nematodos preparásiticos que se concentran en la superficie del agua y a través de un estilete en su parte anterior conectado al tubo faríngeo, perforan la pared cuticular de una larva de mosquito, dentro de las 48 a 72 h de eclosión debido a que estos son de vida corta y deben encontrar una larva huésped para continuar su fase parásita en el interior del hospedero. La disminución en los niveles de infestación está relacionada con la pérdida de la energía de los preparásiticos debido a su actividad de búsqueda de larvas hospederas para iniciar su etapa parasítica (Soto y Santamarina, 1996). La fase parasítica tiene una duración de 6 a 8 días dependiendo de la temperatura y se ubica a lo largo de todo el cuerpo de la larva huésped alimentándose de la hemolinfa causando un empobrecimiento en los metabolitos dentro de los tejidos de almacenamiento. El parásito no posee un estilete para facilitar su salida de la larva hospedera por lo que esta se produce

por presión cuticular del interior hacia el exterior de la larva, provocando la muerte del hospedero, la cual se produce por la salida de la hemolinfa de su interior. En la fase postparasítica de su desarrollo se encuentra en forma de vida libre, presentando geotropismo positivo, enterrándose en el sustrato, en donde realizan la muda, copulan y se reproducen (Gajanana *et al.*, 1978, Petersen, 1979).

La reproducción de los nematodos es de forma sexual, la hembra presenta un hábito de oviposición asincrónico, es decir deposita sus huevos indistintamente en el tiempo. Las hembras de *R. iyengari*, tienen un potencial reproductivo promedio por hembra de 2000 huevos a través del tiempo promedio de 3 a 11 semanas en agua destilada a un pH de 4.5 y a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. El tiempo transcurrido desde la puesta hasta la eclosión de los huevos y la emersión de los preparasíticos es de 12 d (Soto y Santamarina, 1996; Pérez-Pacheco *et al.*, 1998).

## Ciclo de *R. iyengari* (Pérez-Pacheco et al., 2004)

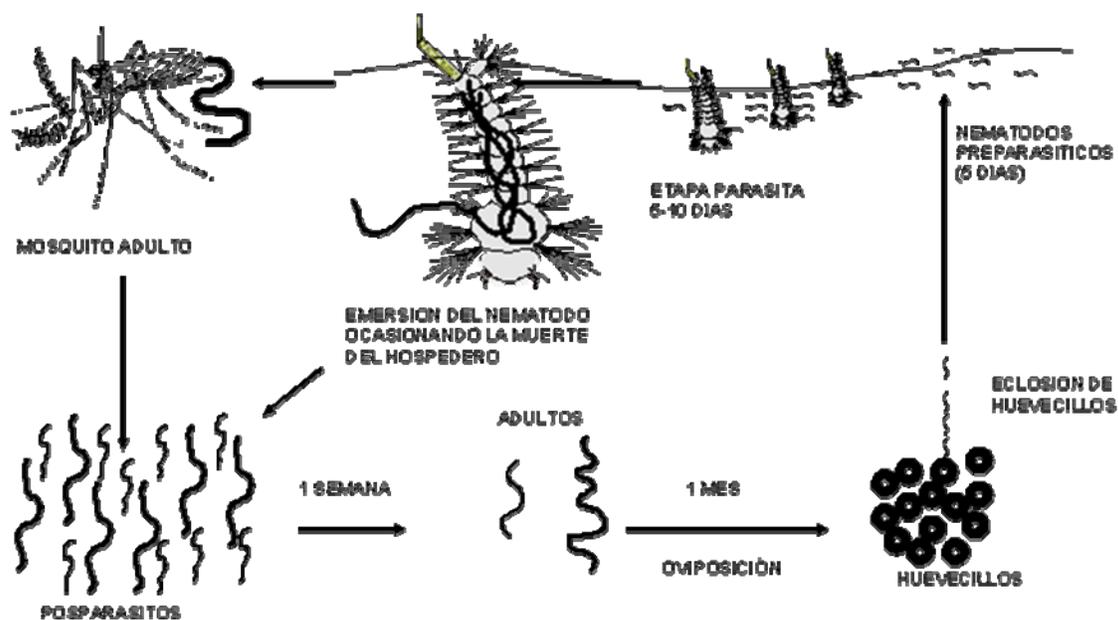


Figura 1. Ciclo biológico del nematodo *R. iyengari* parásito de larvas de mosquitos (Pérez-Pacheco et al., 2004).

### 3.3.2 Capacidad infectiva de *R. iyengari*

Diversos son los reportes de investigadores registran la capacidad del nematodo *R. iyengari* para el control de larvas de mosquitos en campo y laboratorio (Chandrasah y Rajagopalan, 1979; Gajanana et al., 1978; Prindantseva et al., 1990; Santamarina, 1994; Santamarina et al., 1992; 1996, 1999, 2000; Vladimirova et al., 1990, Pérez-Pacheco et al., 2003, 2004, 2005). Sin embargo, son pocos los estudios tendientes a determinar el efecto adverso de la salinidad en la capacidad infectiva de los nematodos parásitos de larvas de mosquitos en diversas condiciones ambientales. La duración de la viabilidad e infectividad de la etapa preparasítica de los nematodos es vital para la aplicación práctica del nematodo (Peng et

*al.*, 1999), debido a que puede ser afectada por diferentes factores físico-químicos como pH, salinidad y temperatura del agua de los criaderos de larvas de mosquitos donde se aplican estos nematodos (Petersen y Willis, 1970; Brown y Platzer 1978; Bheema *et al.* 1979, Petersen 1979; Pridantseva *et al.* 1990; Khanna *et al.* 1997; Pérez *et al.*, 1999).

### **3.3.3 Salinidad**

La salinidad es un factor hidroecológico que afecta el parasitismo de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* y puede ser determinante para pronosticar su efecto en las poblaciones de larvas de mosquito que se desarrollan en diferentes condiciones ecológicas (Pérez, 1999).

La variabilidad de los niveles de infección de *R. iyengari* en campo contra larvas de mosquitos se han relacionado con la elevada salinidad ocasionando un efecto adverso en la capacidad de búsqueda y parasítica del nematodo (Vladimirova *et al.*, 1990).

Con la finalidad de determinar los principales factores responsables del fracaso de los preparásiticos para infectar larvas de mosquitos *Culex fatigans* (Díptera: Culicidae), una especie encontrada en hábitats con aguas contaminadas, Bheema *et al.* (1979), efectuaron estudios de tolerancia de preparásiticos de *Romanomermis* sp. en laboratorio y campo a diferentes concentraciones de salinidad. Para ello diferentes concentraciones de NaCl (580-7590 mgL<sup>-1</sup>) fueron preparadas con agua desmineralizada en el laboratorio, más agua de llave considerada como testigo. Posteriormente adicionaron 1000 nematodos preparásiticos e incubaron a temperatura ambiente, transcurrido un tiempo de 30 minutos se les adicionó 100 larvas de I instar de *C. fatigans*. Después de 30 min fueron extraídas y examinadas 50 larvas sin lavar bajo un microscopio estereoscópico para determinar el parasitismo y el

resto fueron examinadas después de 24 h. Los experimentos en campo consistieron en colocar poco a poco en campos de cultivo de arroz, pozos de absorción y desagües contenedores individuales de 500 mL de capacidad con 1000 nematodos preparasíticos, permitiendo el flujo del agua de estos hábitats dentro de los contenedores, sin desbordarse. La salinidad del medio fue determinada y posteriormente 100 larvas de I instar fueron introducidos dentro de cada contenedor. Después de 30 min la larva fue lavada en agua de llave y en seguida criadas en el medio para desarrollarse. El siguiente día las larvas fueron observadas al microscopio estereoscópico.

Los preparasíticos en laboratorio parasitaron larvas de *C. fatigans* en diferentes concentraciones de NaCl. El agua de llave usado como testigo contenía una concentración de 290 mgL<sup>-1</sup> de NaCl y presentó hasta un 80% de infectividad en larvas expuestas por 30 min. Todas las larvas de mosquito murieron después de las 24 h en altas concentraciones. No fue observado parasitismo en ninguna larva expuesta por 30 min en concentraciones salinas altas a 1750 mgL<sup>-1</sup>. En solución de 580 mgL<sup>-1</sup> solamente de 1 a 10 larvas expuestas por 24 h mostraron infección. Estos resultados indican que altas salinidades de más de 580 mgL<sup>-1</sup> fueron letales para los nematodos preparasíticos. Los resultados de los experimentos en campo presentaron una alta tasa de infestación en aguas de campos de arroz cuando la salinidad fue casi similar a la del agua de llave (290 mgL<sup>-1</sup>). En pozos de absorción y desagüe fue observada baja infección indicando baja sobrevivencia e infectividad de los preparasíticos a altas salinidades y altos niveles de materia orgánica.

La salinidad en el parasitismo del nematodo *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* fue evaluado en laboratorio por Pérez-Pacheco *et al.* (1999). Se prepararon siete soluciones con diferentes concentraciones de NaCl que variaron entre 0.0 y

0.06 M ( $3510 \text{ mgL}^{-1}$ ) y depositaron 1000 mL de cada una de las concentraciones en recipientes de plásticos, se agregaron 100 larvas de *C. quinquefasciatus* de II ínstar de desarrollo y se aplicaron 500 nematodos parasíticos de *R. iyengari*. A los tres días se tomó una muestra de 20 larvas de cada recipiente, las cuales se depositaron individualmente en frascos que contenían 30 mL de agua. Después de la emergencia de los nematodos del cuerpo de las larvas, se determinó el porcentaje de parasitismo (porcentaje de larvas parasitadas) y medias de infección (número promedio de nematodos / larva). Los resultados obtenidos muestran que el parasitismo ocasionado por *R. iyengari* sobre larvas de *C. quinquefasciatus* se presentó en un rango de concentración de NaCl que va de 0.0 M (agua destilada) a 0.05 M ( $2905 \text{ mgL}^{-1}$ ), no observándose infección en concentraciones superiores. En el tratamiento con agua destilada, que se consideró como testigo por no contar con salinidad, se obtuvieron los más altos porcentajes de parasitismo (100%) y una media de infección de 5.7, nematodos/larva; en cambio, en el tratamiento 0.05 M ( $2920 \text{ mgL}^{-1}$  de NaCl) se obtuvo sólo un parasitismo de 1.75%, mostrando el efecto de la salinidad sobre la efectividad del nematodo para realizar el parasitismo en larvas de mosquitos.

Otros estudios tendientes a determinar el efecto de la salinidad en la capacidad parasítica de *Romanomermis culicivorax* (Nematoda: Mermithidae) fueron efectuados por Petersen y Wills (1970), mencionando que este nematodo no fue infectivo en salinidades de  $2300 \text{ mgL}^{-1}$  NaCl (0.04M. Esto fue confirmado por Brown y Platzer (1978) quienes también clasificaron la toxicidad de iones para *R. culicivorax*: cationes sodio<potasio<calcio; y aniones, cloro<carbonat<sulfato<nitrato<nitrito<fosfato. Concluyendo que *R. culicivorax*

es inefectivo para el control de mosquitos en hábitats bajo condiciones que incrementan la salina en el agua.

Camino y García (1991) determinaron el efecto que ejercen las concentraciones de NaCl sobre la capacidad infectiva del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae), en larvas de *Culex pipiens* (Díptera: Culicidae), para ello utilizaron 17 concentraciones de NaCl que variaron entre 0.0 mgL<sup>-1</sup> (agua destilada) y 7300 mgL<sup>-1</sup> de NaCl resultando que el parasitismo de larvas de *C. pipiens* por *S. spiculatus* se produjo en concentraciones de NaCl entre 0.0 y 7000 mgL<sup>-1</sup> no observando infección en concentraciones superiores. Ubicando un 100% de parasitismo en el agua destilada y este fue disminuyendo hasta un 64% en la concentración de 1460 mgL<sup>-1</sup>. Un brusco descenso se observó en 1760 mgL<sup>-1</sup> con 36%, para luego disminuir lentamente hasta un 2% en concentraciones de 7000 mgL<sup>-1</sup> (0.120M), encontrando que en 0.125 M la mortalidad descendió al 0%. Finaliza mencionando que los resultados muestran que *S. spiculatus* parasita larvas de *C. pipiens* en concentraciones de NaCl hasta 7000 mgL<sup>-1</sup> (2% de infección) mientras que *R. culicivorax* no resulta infectivo por encima de 2500 mgL<sup>-1</sup> de NaCl, concentración en la cual *S. spiculatus* parasita a un 22.5 % de larvas. Con los resultados obtenidos concluyen que *S. spiculatus* es más tolerante a la salinidad que *R. culicivorax*, por lo que podría ser introducido en una mayor variedad de criaderos de culícidos.

Khanna. *et al.* (1997) establecieron el rango de tolerancia del nematodo *Caenorhabditis elegans* al pH, salinidad y dureza. *C. elegans* mostro una alta tolerancia en las pruebas. La tolerancia a la salinidad fue realizada de forma individual con NaCl y KCl. Mostrando tolerancia arriba de 15.46 g/L NaCl y 11.51 g/L KCl en K-medium. En MHRW altas

concentraciones de salinidad fueron toleradas entre 20.5 g/L NaCl y 18.85 g/L KCl. Concluyendo que la habilidad de *C. elegans* de resistir el estrés osmótico de las soluciones salinas le permite mas versatilidad que otros organismos comúnmente usados en pruebas de toxicidad acuática y puede ser un organismo muy útil para ser utilizado en salinidades inferiores a 20 ppm.

La mayoría de la información disponible sobre la tolerancia a sal en animales de agua dulce se refiere a artrópodos y vertebrados. El mecanismo por el cual los iones afectan la infectividad de nematodos aun no está determinada. La toxicidad a elevadas concentraciones de iones puede ser 1) el resultado de el aumento de la presión osmótica y la subsecuente perdida de agua en los nematodos; 2) El desequilibrio en el balance iónico interno, 3) Efectos tóxicos generales de los nitratos y nitritos, 4) Alteración del balance interno de ácido-base (Brown y Platzer, 1978).

Se puede especular, que un aumento en la tasa metabólica estimulada por las sales puede agotar los recursos energéticos de las etapas infectivas antes de que hacer contacto con el hospedero, por lo que se reduce el potencial infeccioso de los nematodos (Von Brand, 1943). Además, la disminución del agua en el cuerpo de los nematodos en altas concentraciones de sal probablemente disminuye su motilidad y en consecuencia, la infectividad. Los desequilibrios de iones en los nematodos infectivos y en consecuencia los trastornos metabólicos interfirieren con la capacidad infecciosa de los preparásitos (Brown y Platzer, 1978).

### **3.4 Presión de selección**

Presión de selección es la fuerza que actúa sobre las poblaciones y que faculta a algunos organismos con cierta variación a sobrevivir y a que aporten más descendientes (o genes) que los que no la poseen a las futuras generaciones y de este modo, dirigir el proceso de evolución (Begon *et al.*, 1996). Los individuos que presenten variedad que supongan ventaja para superar una determinada presión de selección sobrevivirán y su probabilidad de reproducción será mayor.

En la naturaleza ocurren diferentes agentes de presión de selección y uno de ellos es el medio ambiente que influye de manera decisiva en los seres vivos, en ocasiones la supervivencia de los organismos es difícil, especialmente dada por los cambios climáticos. La presión de selección natural, sirve para adaptar a los organismos a la comunidad biótica y el ambiente en los que viven. La adaptación supone una diferencia ventajosa dada por variaciones genéticas, éstas se generan debido a mutaciones que son cambios o alteraciones en la información genética de un ser vivo que se producen al azar en los genes. Si afectan a los gametos se transmite a la descendencia. La reproducción sexual crea variabilidad debida a la recombinación genética que se produce en la meiosis y a la unión al azar de los gametos en la fecundación. Si el nuevo carácter es heredable y ventajoso, entonces sus descendientes tendrán mayores posibilidades de sobrevivir, y por lo tanto de dejar un mayor número de individuos con estos atributos. Por el contrario si los organismos no pueden superar la presión de selección del medio morirán.

Queda asimismo claro, que a lo largo de las generaciones, las mutaciones de una población están coevolucionando con el resto de sus mecanismos no-mutados. La presión de selección

está operando, más que en otras partes, sobre los genes de alta tecnología encargados de actuar de directores de orquesta del conjunto de genes, debilitando a unos y presionando a otros. Aquí los efectos son más significativos por su mayor nivel jerárquico. El buen éxito de toda la población se mide más por esos genes que por otros más neutros en sus resultados sobre la supervivencia.

Por lo tanto, los métodos de stress sucesivo puede ser usado para mejorar con éxito los niveles de infección en nematodos (Brown *et al.*, 2006).

### **3.5 Selección por tolerancia en nematodos entomopatógenos**

La genética es un medio poderoso para mejorar los rasgos benéficos de agentes de control biológico. Esto es ejemplificado por el mejoramiento de la tolerancia hacia el ambiente extremo de los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae). Los enfoques genéticos adoptados para tal efecto incluyen selección por tolerancia y resistencia; selección de aislamientos naturales con alta tolerancia, hibridación y mutagenesis (Segal y Glazer, 2000, Bilgrami *et al.* 2006).

El mejoramiento de cepas de nematodos entomopatógeno hasta la fecha ha sido principalmente utilizando procesos genéticos convencionales (transgénicos) que han demostrado potencial de tolerancia al ambiente. Sin embargo, la mejora genética de los nematodos entomopatógenos a través de medios convencionales (presión de selección), siguen siendo importantes en el futuro debido a las preocupaciones sobre el uso público de los organismos transgénicos (Burnell, 2002).

La sensibilidad al frío del nematodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) restringen su uso potencial en el control biológico, para mejorar su tolerancia al frío *S. feltiae* fue sometido a selección en generaciones consecutivas. Encontrando que la selección al frío de manera repetida había mejorado la virulencia del nematodo a temperaturas frías (Grewal *et al.*, 1996). La exposición de nematodos preparásiticos a 72 h en soluciones no iónicas dio lugar a un aumento en la tolerancia al calor, sin afectar la viabilidad de los nematodos (Glazer y Salame, 2000).

Debido a que la explotación comercial de *H. bacteriophora* para el control biológico es limitada por su corta vida útil, que está relacionada con su baja tolerancia a ambientales extremos, tales como la desecación, a través de cría selectiva se llevó a cabo mejoramiento genético de la tolerancia a la desecación del nematodo *H. bacteriophora*. Observando mejoramiento de la tolerancia a la desecación cuando el proceso de adaptación se incluyó en el proceso de selección, que estaba relacionada con una mayor variación fenotípica después de la adaptación (Strauch *et al.*, 2004). La expresión de genes tolerantes o susceptibles a la desecación en nemátodos para determinar si aumentaba la tolerancia de las poblaciones como respuesta de la expresión de genes o no existía tal respuesta fue estudiado por Somvanshi *et al.* (2008). Encontrando que la respuesta los nemátodos susceptibles al estrés respondieron a este por la expresión inducida en los genes. Puesto que los diversos niveles de expresión del gen fueron encontrados y relacionados con diversas capacidades de tolerancia al estrés de los nemátodos, estos cocientes de la expresión de los genes se pueden potencialmente utilizar como marcadores de la tolerancia a la desecación en nematodos entomopatógenos.

Ruiz-Carballo (2009), generó líneas tolerantes al calor y a la desecación en tres especies de nematodos entomopatógenos (*Steinernema glaseri*, *Steinernema riobrave*, *Heterorhabditis bacteriophora*). Los tratamientos para selección por tolerancia al calor fueron aplicados de la F1 a la F6, aplicando temperaturas de 25, 30 y 35° por 48 h para selección por resistencia a la desecación aplicó actividades del agua de 0.86, 0.90, 0.97 para las mismas generaciones por 48 h a medida que la  $A_w$  fue menor, la sobrevivencia de los nematodos disminuyó, después de la F3 *S. glaseri* fue el que acumuló más tolerancia a la desecación, seguido por *S. riobrave*. Después de la generación F3, las tres especies de nematodos incrementaron su tolerancia a las altas temperaturas, especialmente *S. glaseri* y *H. bacteriophora*, los cuales alcanzaron sobrevivencias de 80 y 70% a 35°C, respectivamente, en la F6. En la evaluación de las líneas generadas utilizando larvas de *Galleria mellonella* sobresalieron *S. riobrave* y *S. glaseri* por su capacidad de control a alta temperatura (35°C) mientras que *H. bacteriophora* y *S. riobrave* mostraron buena capacidad de control a baja actividad del agua ( $A_w = 0.86$ ). Tomando en cuenta su capacidad para controla tanto larvas de *Phyllophaga vetula* como de *G. mellonella*, *S. glaseri* fue el más efectivo a altas temperaturas, mientras que *H. bacteriophora* tuvo mejor capacidad de control a  $A_w$  bajos. En las tres especies de nematodos se incremento su tolerancia a altas temperaturas, específicamente *S. glaseri* y *H. bacteriophora*, incrementando su sobrevivencia de 80 y 70% a 35°C, respectivamente, en la F6.

## CAPÍTULO 4

### MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó de enero 2008 a noviembre 2010 en las instalaciones de la planta de producción masiva de nematodos parásitos de larvas de mosquitos (Bioplanta), perteneciente al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional, con coordenadas 96° 44' longitud oeste, 17° 02' latitud norte y a una altura de 1, 530 msnm.

#### **4.1 Material biológico.**

Las larvas del mosquito *C. quinquefasciatus* y los nematodos de *R. iyengari*, se obtuvieron de la planta de producción masiva de nemátodos del CIIDIR-IPN-Oaxaca, producidos según la metodología de Pérez *et al.* (2003).

##### **4.1.1 Cría del mosquito *C. quinquefasciatus*.**

La cría del mosquito *C. quinquefasciatus* se inició con la colecta de pupas en criaderos naturales, se llevaron al laboratorio, se determinaron y depositaron en bandejas con agua, que posteriormente se introdujeron en jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los machos se alimentaron con agua azucarada y azúcar en una proporción de 80:20, las hembras se alimentaron con sangre de un pollo que se introdujo en la jaula entomológica durante 12 h.

Una vez que los adultos hembra ovipositaron los paquetes de huevos llamados “balsas”, se colectaron y se depositaron en recipientes de plástico (47 x 35 x 12 cm) con agua para su eclosión. Después de la emergencia, las larvas se alimentaron con una solución de alimento para peces tilapia api-aba (maltaCleyton), previamente molió, licuado y colado. Cuando las larvas pasaron a la fase de pupa se capturaron, se depositaron en recipientes con agua y fueron colocadas en las jaulas entomológicas para la emergencia de adultos. Con la colecta de huevos se continuó la reproducción del ciclo biológico, para obtener continuamente las larvas de II instar, utilizadas en los experimentos y en la producción masiva de nemátodos (Pérez-Pacheco, 1998).

#### **4.1.2 Producción masiva de nemátodos.**

La cría masiva de nemátodos y obtención de los preparásitos (juveniles 2) se inició depositando paquetes de huevos del mosquito *C. quinquefasciatus* en bandeja de plástico (47 x 35 x 12 cm) con 4 L de agua para su eclosión y a los 3 días se obtuvieron larvas de II instar. De manera paralela se depositó agua destilada a tres cultivos de nemátodos para obtener nemátodos preparásitos o (inoculo) que parasitan larvas de mosquitos, después el inoculo de los cultivos se decantó y mediante el método de dilución volumétrica, con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se calculó el volumen necesario de inoculo para infestar cierta población de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus* (Petersen y Willis, 1972).

La aplicación de nematodos en las bandejas con larvas de II instar fue en una proporción de 5:1 (cinco preparásitos por larva de mosquito). Una vez que las larvas alcanzaron el IV

instar y aparecieron larvas muertas flotando en la superficie del agua, se tamizaron para coleccionar los nemátodos que emergen del interior de las larvas huésped.

Previamente el sustrato o medio de cultivo (arena de río) se lavó para eliminar restos de materia orgánica e impurezas y se esterilizó para eliminar bacterias u otros organismos. Posteriormente la arena se colocó en charolas de plástico de 21 x 13.5 x 5.5 cm. con agua destilada para facilitar el descenso de los nematodos al fondo y con agujas entomológicas de punta curva se realizó la siembra de los nemátodos; posteriormente se decantó el agua y los recipientes se cerraron herméticamente para evitar la desecación del cultivo. Los cultivos se etiquetaron (por especie, fecha de siembra) y se almacenaron a temperatura ambiente ( $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 6 semanas.

#### **4.2 Evaluación del efecto de NaCl en la capacidad infectiva del nematodo *R. iyengari***

La salinidad del agua reduce la capacidad infectiva de *R. iyengari* en los criaderos naturales de larvas de mosquitos en donde se aplican, por lo tanto la determinación del efecto de salinidad (NaCl) en la capacidad infectiva de *R. iyengari* fue evaluada.

Para evaluar el efecto de la salinidad en la capacidad infectiva del nematodo *R. iyengari* se utilizó cloruro de sodio (NaCl) (Sodium Chloride S271-500<sup>®</sup>), de la cual se pesó: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 y 2.0 gr de NaCl en una báscula graduada. Posteriormente las diferentes sales pesadas fueron colocadas de forma individual en vasos de precipitados a los que se le agregó 1000 ml de agua desionizada, obteniendo diez soluciones salinas (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 mg L<sup>-1</sup>) de NaCl más un testigo (agua desionizada sin sales).

Con las soluciones de NaCl se estableció un experimento con once tratamientos de cuatro repeticiones haciendo un total de 44 unidades experimentales en un diseño completamente al azar. Cada unidad experimental consistió de una charola de plástico de 21 x 13.5 x 5.5 cm, en la cual se depositaron 200 mL de solución salina previamente agitada y 100 larvas de *C. quinquefasciatus* en II instar y se aplicaron 1000 nematodos parasíticos (dosis 10:1).

Cuando las larvas de cada unidad experimental alcanzaron el IV instar y empezaron a emerger los nematodos postparasitos, con ayuda de agujas entomológicas y un microscopio estereoscópico se cuantificó las larvas o pupas con y sin nematodos, para determinar el porcentaje de parasitismo (PP) y la media de infestación (MI número promedio de nematodos parasitando una larva).

#### **4.3 Selección de líneas puras de nematodos *R. iyengari* con mayor a NaCl**

Los nematodos tolerantes de *R. iyengari* que infectaron larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus* en niveles salinos 1600, 1800 y 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl se seleccionaron por su tolerancia que les permitió la sobrevivencia e infectividad de larvas de mosquitos en condiciones adversas. Cada hembra obtenida fue seguida de manera individual en su toma de datos, para dar seguimiento en su descendencia en el proceso de selección. Los postparasíticos fueron colectados y separaron por sexo apoyándose de un microscopio estereoscópico, posteriormente fueron colocados en pocillos de platos de cultivo de tejidos de 12 pocillos en los cuales previamente se agregó arena y agua desionizada para facilitar su muda y obtener los nematodos adultos

Cuando los nematodos alcanzaron la etapa adulta, con pinzas esterilizadas, se removió la arena de cada uno de los pocillos y los nematodos adultos se colocaron en pocillos nuevos

con agua desionizada y arena, en una proporción de 2:1 (dos machos y una hembra) para que se llevara a cabo la cruce de los mismos.

Se revisaron cada día los diferentes cruzamientos y cuando se observó la presencia de huevos de nemátodos en el fondo de los pocillos, se procedió a cambiar los nemátodos de cada uno de los cruzamientos a pocillos diferentes cada 3 d y se contó el número de huevos ovipositados de cada hembra en los pocillos de donde se trasladaron los nemátodos.

Cuando en los pocillos con huevos de nematodos se observaron preparasíticos producto de la eclosión de los mismos, se extrajeron y usaron para infestar larvas de II instar de mosquito *C. quinquefasciatus* en soluciones salinas de 2000 mg L<sup>-1</sup>, para determinar la infectividad de los preparasíticos sobre las larvas de mosquitos, la dosis aplicada fue de 5:1 (cinco nemátodos por larva de mosquito), esta fue considerada la F1 y de la cual se tomaron datos de parasitismo e infestación.

Los nemátodos que emergieron de las larvas expuestas al parasitismo en F1 se seleccionaron por hembras y machos, para posteriormente ser ubicados de manera individual en pocillos de platos de cultivo de tejidos para facilitar la muda a estado adulto, se cruzaron de forma individual en una proporción de 2:1 de cada uno de los tratamientos en pocillos individuales. Cada día se observó la presencia de huevos en los diferentes cruzamientos, cuando esto sucedió se llevó a cabo el conteo de huevos por hembra de cada uno de los pocillos, posteriormente al emerger los nematodos preparasíticos se colectaron y utilizaron para infestar larvas de mosquito en pocillos con solución salina de 2000 mg L<sup>-1</sup>.

Los nematodos postparasitos obtenidos se consideraron F2, después de que mudaron los nematodos a fase adulta se volvieron a cruzar y se dio seguimiento en la toma de datos para

cada hembra conservando de forma independiente datos de origen de la hembra madre. A partir de esta generación las hembras fueron elegidas tomando como referencia las que ovipositaron la mayor cantidad de huevos y las demás fueron colectadas y mantenidas en un solo cultivo por concentración de salinidad. Esta metodología se siguió hasta obtener los nemátodos de *R. iyengari* tolerantes a la salinidad en la F4 que al final se cruzaron para reproducirlos en cantidades suficientes para realizar experimentos en diferentes gradientes de salinidad, comparando con la población susceptible y determinar la tolerancia a la salinidad que generaron los nemátodos después de un proceso de selección por tolerancia durante cuatro generaciones.

Los platos de las cajas de cultivo de tejidos que contenían a los nematodos en muda y cruza durante el desarrollo del experimento se guardaron en una incubadora a una temperatura de 27°C.

#### **4.4 Evaluación de la capacidad infectiva de una línea pura tolerante de *R. iyengari***

Los postparasitos de *R. iyengari* obtenidos en la salinidad 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl en la generación filial F4 se colocaron a mudar para alcanzar la madurez sexual y posteriormente se depositaron en pocillos con agua destilada y arena en una proporción de 2:1 para llevar a cabo la cruza. Los pocillos se observaron al microscopio estereoscopio todos los días hasta observar la presencia del 50% ó más de huevos eclosionados para cada una de las hembras. Los preparasíticos se colectaron con una pipeta Pasteur y se depositaron 10 nematodos en cada pocillo con 3 mL de solución salina de 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl, posteriormente se agregó una larva de *C. quinquefasciatus* de II instar para evaluar la infestación. Esta actividad se repitió para cada uno de 12 pocillos que contenía la caja de cultivo de tejidos, considerada

como unidad experimental. Se efectuó el conteo hasta obtener tres repeticiones de nematodos generados en la F4 expuestos a salinidad  $2000\text{mg L}^{-1}$  que se compararon con la población susceptible. El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones de 10 soluciones preparadas más un testigo (agua desionizada sin sales), para comparar la capacidad infectiva de la F4 obtenida respecto a la población susceptible.

En todos los experimentos, las larvas se alimentarán con alimento para peces tilapia api-aba (maltaCleyton), molido, colado y suministrado a partir del 2º d de establecido el experimento hasta que los nemátodos emergieron o las larvas se convirtieron en pupas. Las cajas de pocillos de cultivo de tejidos en los que se colocaron los nemátodos durante el desarrollo del experimento se guardados en una incubadora modelo 815 a temperatura de  $27^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5 Análisis estadístico**

A los datos de parasitismo e infestación en los experimentos realizados, se les aplicó un análisis de varianza con Statistical Analysis System (SAS, 2004) y se compararon las medias mediante una prueba de Tukey al  $\alpha = 0.05$  de significancia para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de NaCl en la capacidad parasítica del nematodo *R. iyengari* sobre larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*, así como para cada una de las generaciones filiales por hembras y tratamientos. A través de un análisis Probit en la población susceptible y línea pura tolerante obtenida (F4) se calculó la  $DL_{50}$ , para cada una de ellas.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Efecto de NaCl en la capacidad infectiva del nematodo *R. iyengari*

En el Cuadro 1, se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de salinidad evaluadas sobre los indicadores biológicos porcentaje de parasitismo y media de infestación (número promedio de nematodos parasitando una larva de mosquito) del nematodo *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*.

Cuadro 1. Efecto de NaCl en la capacidad infectiva de *Romanomermis iyengari* contra larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*

NaCl (mg L <sup>-1</sup> )	Parasitismo (%)	Media Infestación
Control	100.0a	6.8a
200	100.0a	7.2a
400	100.0a	6.8a
600	100.0a	5.8a
800	99.3a	4.0b
1000	62.6b	2.0c
1200	25.6c	1.2cd
1400	8.7d	1.1d
1600	3.1e	1.0cd
1800	3.1e	1.0d
2000	1.2e	1.0d

\*Valores con la misma letra en la misma columna, no difieren estadísticamente ( $\alpha = 0.05$ ,  $p < 0.001$ )

Con el análisis de varianza realizado se determinó estadísticamente que la salinidad influye significativamente  $P < 0.0001$  en los niveles de parasitismo y media de infestación del nematodo *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*

El nematodo *R. iyengari* causó parasitismo de larvas *C. quinquefasciatus* en todas las concentraciones de NaCl evaluadas (200–2000 mg L<sup>-1</sup>) produciendo la muerte de su hospedero.

La prueba de Tukey P<0.0001 determinó que concentraciones salinas de 800 mg L<sup>-1</sup> y menores fueron mejor toleradas por *R. iyengari* en las cuales se registró un 100% de parasitismo y medias de infestación de 5.8 a 6.8 nematodos por larva. Sin embargo, estos valores decrecieron con respecto a las concentraciones de NaCl, obteniendo valores bajos de parasitismo en concentraciones altas de salinidad.

Se determinó que la DL<sub>50</sub> se presentó a 1091.8 mgL<sup>-1</sup> de NaCl en la población susceptible con límites fiduciales del 95% de probabilidad de 1068.29-1114.69. Valores superiores de NaCl inhibieron la capacidad parasítica de *R. iyengari* reduciendo el porcentaje de parasitismo y media de infestación de 1.2 y 1.0 respectivamente en la concentración salina más alta 2000 mgL<sup>-1</sup> de NaCl.

En evaluaciones hechas por Bheema Rao *et al*, (1979) para determinar el efecto de la salinidad en nematodos preparasíticos de *Romanomermis* sp sometieron preparasíticos en un rango de 580-7590 mgL<sup>-1</sup> de NaCl por 30 min en larvas de *C. fatigans*, demostrando que *Romanomermis* sp no pudo tolerar concentraciones mayores a 1750 mgL<sup>-1</sup>, en la evaluación realizada *R. iyengari* toleró y parasitó larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus* en salinidades superiores coincidiendo con Pérez-Pacheco *et al.*(1999), quien demostró la capacidad infectividad del nematodo *R. iyengari* en salinidades de 2920 mgL<sup>-1</sup> de NaCl. Las diferencias en los niveles de tolerancia de *Romanomermis* se atribuyen al tiempo de

exposición de los preparásitos a las concentraciones salinas, debido a que fueron diferentes metodologías experimentales.

La presencia de valores bajos de parasitismo e infestación es resultado de una reducción en la capacidad infectiva de *R. iyengari* por efecto de la toxicidad de concentraciones de NaCl altas, según Von Brand, (1943) la reducción del potencial infectivo de los nematodos es resultado de un aumento en la tasa metabólica estimulada por las sales agotando los recursos energéticos de las etapas infectivas antes de hacer contacto con el hospedero. Además, la disminución del agua en el cuerpo de los nematodos en altas concentraciones de sal probablemente disminuye su motilidad y en consecuencia, la infectividad. El desequilibrio de iones en los nematodos infectivos y en consecuencia los trastornos metabólicos interfirieron con la capacidad infectiva de los preparásitos (Brown y Platzer, 1978).

Aunque el efecto de altas concentraciones de NaCl en la capacidad parasítica de *R. iyengari* es claramente observable por la reducción de su capacidad, los nematodos preparásitos capaces de penetrar larvas hospederas de *C. quinquefasciatus* a salinidades altas presentan una ventaja importante de tolerancia a la toxicidad de NaCl atribuible a la variabilidad genética de la población susceptible.

Se obtuvo un total de 10 nematodos postparasiticos tolerantes a altas concentraciones salinas 1600 (cuatro), 1800 (cuatro) y 2000 mg L<sup>-1</sup> (dos).

## 5.2 Líneas de nematodos *R. iyengari* con mayor tolerancia a NaCl

### 5.2.1 F1

Se obtuvo un total de 10 hembras con mayor tolerancia a concentraciones altas de 1600 (4), 1800 (4), y 2000 mg L<sup>-1</sup> (2) de NaCl a partir de la población susceptible. La H3 (Hembra 3) 1600 mg L<sup>-1</sup> no puso huevos por lo tanto fue eliminada.

En la F1 la descendencia de hembras obtenidas en la concentración salina de 1800 mg L<sup>-1</sup> NaCl fueron estadísticamente superiores en su capacidad parasítica al resto de las hembras con valores 26.8-41.1% (Cuadro 2). Los preparásitos obtenidos de hembras emergidas en concentraciones salinas de 1600 mg L<sup>-1</sup> y 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl no presentaron diferencias estadísticamente significativas en parasitismo el cual fue menor a 25%, sin embargo hubo un incremento de 3.1 y 1.2% respecto a la población susceptible. En los valores de infestación y número de huevos ovipositados no hubo diferencias estadísticamente significativas en las hembras expuestas para la F1.

Cuadro 2: Parámetros biológicos de hembras *R. iyengari* con mayor tolerancia a NaCl en la F1 en larvas *C. quinquefasciatus*.

Salinidad NaCl (mg L <sup>-1</sup> )	Hembras (H)	Parasitismo (%)	Infestación	Número de huevos
1600	H1	8.3b	1.0a	4330a
	H2	15.8b	1.2a	3252a
	H4	25.0b	1.5a	2603a
1800	H1	41.1a	1.8a	3225a
	H2	27.2a	1.5a	2060a
	H3	26.8a	1.5a	3122a
	H4	33.3a	1.0a	2802a
2000	H1	12.8b	1.4a	2895a
	H2	20.4b	2.4a	4913a

\*Valores con la misma letra en la misma columna, no difieren estadísticamente ( $\alpha = 0.05$ ,  $p < 0.001$ )

Los datos de infestación y número de huevos no presentaron diferencias significativas; sin embargo, respecto a la población susceptible la infestación incremento en un 1.4 lo que indican que una mayor cantidad de nematodos toleró la salinidad del medio y pudo penetrar al hospedero. La exposición de los preparásiticos a NaCl no influyó en la puesta de huevos de las hembras adultas que emergieron de larvas parasitadas en concentraciones altas de 2060 a 4913 huevos por hembra.

El comportamiento de los niveles de porcentaje de parasitismo, infestación y número de huevos registrados en la descendencia de nematodos expuestos a concentraciones de NaCl (1600, 1800, y 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl) en la generación F1 se muestran en la figura 2. Corroborando que los nematodos que mostraron mejor adaptación en esta generación fueron los descendientes de 1800 mg L<sup>-1</sup> de NaCl al presentar parasitismo de 32.1%.

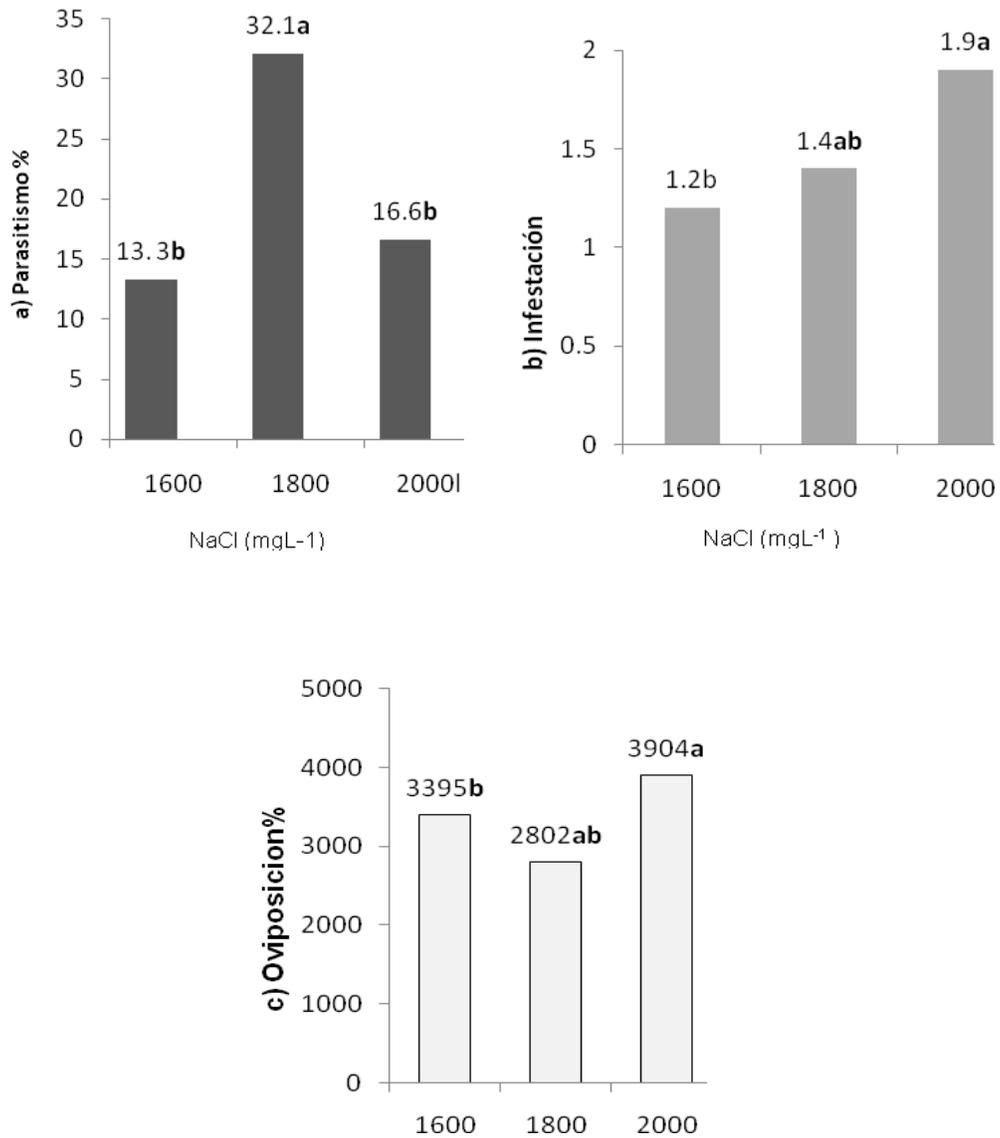


Figura 2: a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F1 de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* por concentración salina.

### 5.2.2 F2

En la F2 se obtuvo un total de 43 hembras con mayor tolerancia (Cuadro 3), de las cuales 18 fueron eliminadas porque pusieron pocos huevos. El mayor número de hembras con

mayor tolerancia (18) correspondió a 1800 mg L<sup>-1</sup> de NaCl seguido de 15 hembras para la concentración salina 1600 mg L<sup>-1</sup> y finalmente 10 hembras para la concentración 2000 mg L<sup>-1</sup>. Resaltando una mayor cantidad de hembras para la salinidad 1800 resultado de un mayor parasitismo en la F2.

Los valores de parasitismo total (100%) correspondieron a hembras obtenidas de concentraciones salinas 1800 mg L<sup>-1</sup> de NaCl (H1G, H1I, H2B, H2G y H3A) y las medias de infestación causadas por estas hembras fueron estadísticamente significativas con 1.2 a 1.8 nematodos por larva de mosquito parasitada en la F2. El número de huevos ovipositados no presentó diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 3: Parámetros biológicos de hembras *R. iyengari* con mayor tolerancia a NaCl en la F2 en larvas *C. quinquefasciatus*.

Salinidad NaCl (mg L <sup>-1</sup> )	Hembras (H)		Parasitismo (%)	Infestación	Número de huevos
1600	H1	A	25.0e	1.4ab	464a
		B	7.1e	1.0ab	423a
	H2	B	5.7b	1.0ab	1057a
		C	100.0b	2.0ab	1055a
		D	100.0b	1.0ab	1198a
1800	H1	E	100.0b	1.0ab	910a
		G	100.0a	1.0ab	931a
	H2	I	100.0a	1.0ab	1303a
		B	100.0a	1.7a	2259a
		G	100.0a	1.5a	10a
H3	A	100.0c	1.2a	816a	
	B	28.5c	1.8a	316a	
2000	H1	D	48.2d	1.2ab	3665a
		B	52.9e	1.5ab	2512a
	H2	C	26.6e	1.0ab	1091a
		D	20.0e	1.5ab	1365a
		E	14.2e	1.0ab	1498a
		F	14.2e	1.0ab	2512a

El parasitismo (88%) infestación (1.3) y número de huevos (937) por concentraciones de NaCl para la F2 se muestran en la Figura 3. Coincidiendo estadísticamente en que los estados infectivos descendientes de 1800 mg L<sup>-1</sup> presentaron valores estadísticamente significativos para los tres parámetros biológicos evaluados.

Se observa nuevamente que los nematodos tolerantes de la concentración salina 1800 mg L<sup>-1</sup> de NaCl en la generación filial 2 fueron los mejor adaptados a la presión osmótica ejercida reflejándose en los niveles de parasitismo y en la cantidad de nematodos por larva de *C. quinquefasciatus* parasitada. Sin embargo se observa una respuesta favorable de adaptación de los nematodos de la concentración salina 2000 mg L<sup>-1</sup>, evidenciado en la presencia de altas medias de infestación superiores a las que presentó la concentración 1600 mg L<sup>-1</sup>, así como una mayor oviposición en esta generación filial.

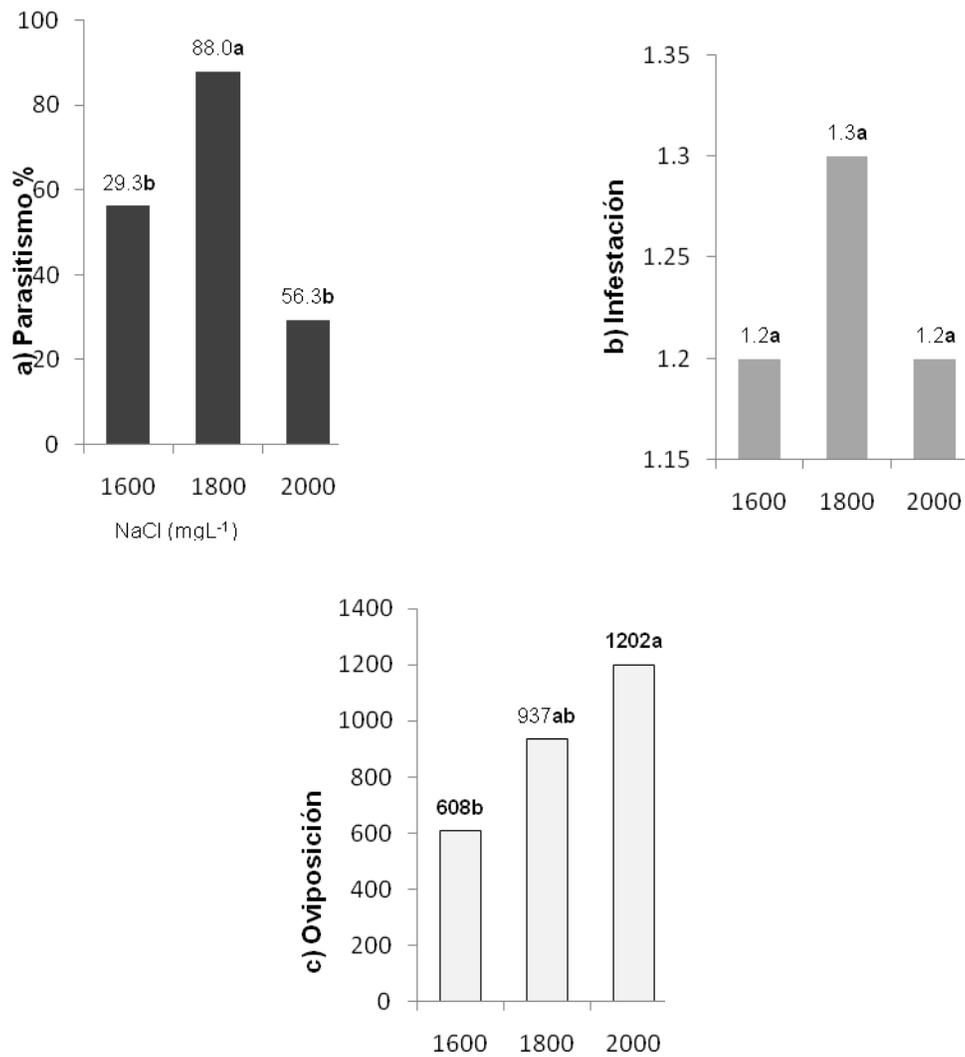


Figura 3: a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F2 de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* por concentración salina.

### 5.2.3 F3

En la F3 se presentó un total de 44 hembras tolerantes a la concentración salina 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl pertenecientes a 1600, 1800 y 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl de las cuales 15 se seleccionaron por una mayor cantidad de huevos ovipositados (Cuadro 4).

Los porcentajes de parasitismo de las hembras H1I3 y H2D1 fueron estadísticamente superiores ( $P>0.0319$ ) respecto al resto de las hembras, evidenciando durante tres generaciones consecutivas los estados infectivos descendientes de concentraciones salinas  $1800 \text{ mg L}^{-1}$  continuaron siendo los mejor adaptados. Las medias de infestación no obstante que no hay diferencias estadísticamente significativa, se ubicaron en un rango de 1 a 4.3 nematodos preparasíticos por larva, siendo la mejor hembra la H2D4 con 4.3 nematodos.

La H2C4 fue la que presentó una alta oviposición con 2327 huevos (Tukey  $P<0.0001$ ), seguido de la hembra  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  H2B3 (1240) y H2D1 (1198) de concentración salina  $1600 \text{ mg L}^{-1}$ .

Cuadro 4: Parámetros biológicos de hembras *R. iyengari* con mayor tolerancia a NaCl en la F3 en larvas *C. quinquefasciatus*.

Salinidad NaCl ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Hembras (H)		Parasitismo (%)	Infestación	Número de huevos
1600	H2	C2	66.6ab	3.1a	920a
		C C3	48.3ab	2.1a	1623a
		C4	23.5ab	1.2a	2327a
	H2	D1	100.0a	1.0a	1198ab
		D D2	70.0ab	2.1a	930ab
		D4	27.0ab	4.3a	1064ab
		E E1	53.8ab	3.4a	180c
1800	H1	I I3	80.0a	2.5a	820bc
	H2	B B1	36.3b	1.7a	285c
	H3	A A1	11.1b	1.0a	60c
		A4	50.0b	2.5a	398c
		B B1	50.0ab	2.6a	229c
2000	H2	B1	17.1ab	2.6a	1179ab
		B B3	47.3ab	1.1a	1240ab
		B8	54.9ab	1.3a	1119ab

El comportamiento de los valores de porcentaje de parasitismo, media de infestación y oviposición en la F3 por niveles de salinidad se muestran en la figura 4. El tratamiento de la

concentración salina 1600 mg L<sup>-1</sup> sobresalió en la F3 en parasitismo, infestación y número de huevos ovipositados en comparación con las generaciones anteriores en donde la concentración 1800 mg L<sup>-1</sup> de NaCl fue la que sobresalió, esto es resultado del proceso de adaptación de los estados infectivos a la salinidad.

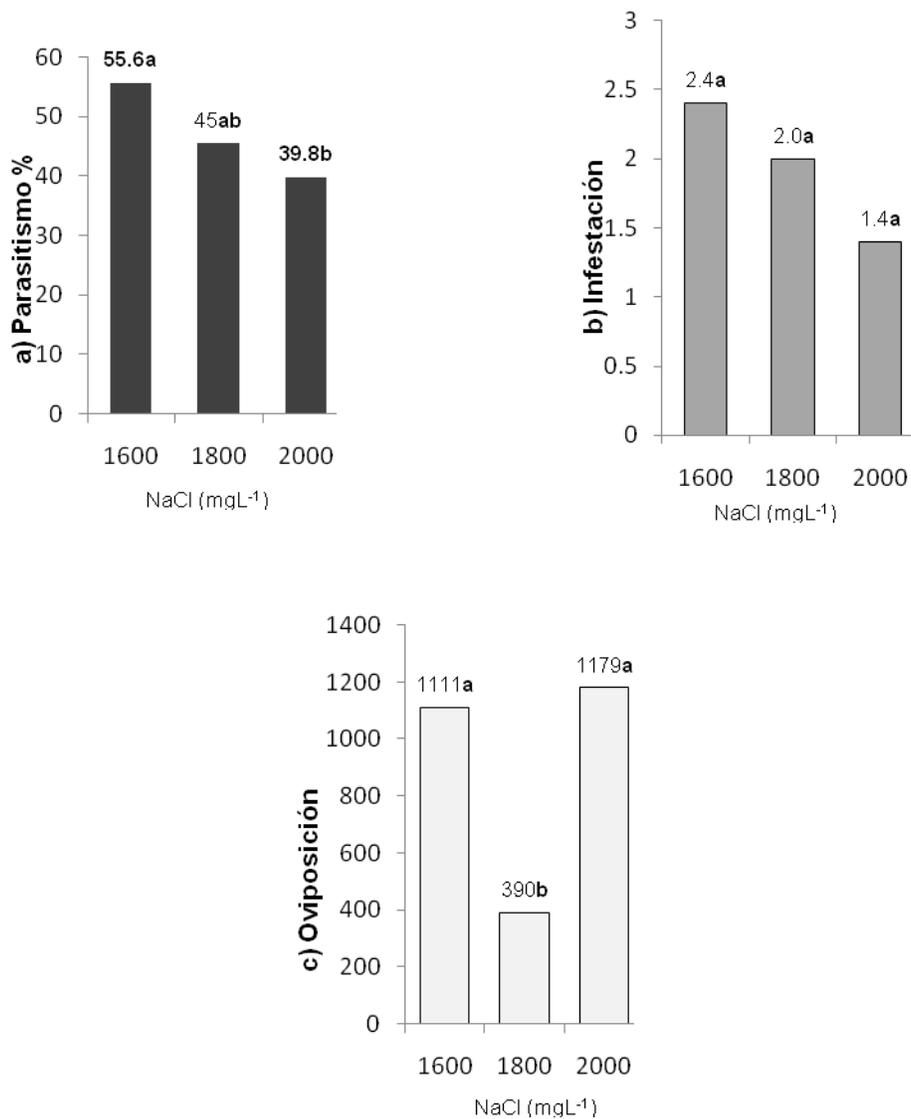


Figura 4: a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F3 de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* por concentración salina.

#### 5.2.4 F4

Un total de once líneas puras tolerantes a NaCl por selección continua a través de cuatro generaciones consecutivas fueron obtenidas: 1600 (5), 1800 (3) y 2000 mg L<sup>-1</sup> (3) (Cuadro 5). La concentración salina 1600 mg L<sup>-1</sup> de NaCl fue el que presentó una mayor cantidad de hembras tolerantes (5) sin embargo, estas provienen de una sola hembra original (H2), a diferencia de 1800 mg L<sup>-1</sup> que las hembras tolerantes finales correspondieron a tres diferentes hembras de origen.

Respecto a los parámetros evaluados parasitismo, infestación y número de huevos ovipositados, se presentó diferencias estadísticamente significativas en el parasitismo entre las hembras puras obtenidas, sobresaliendo H1I3 con parasitismo total. Respecto a la infestación esta se presentó de forma significativa (Tukey P>0.0502) para las hembras H2C3 (3.0); H2C4 (2.2) y H1I3 (1.5).

Cuadro 5: Parámetros biológicos de hembras *R. iyengari* con mayor tolerancia a NaCl en la F4 en larvas *C. quinquefasciatus*.

Salinidad NaCl (mg L <sup>-1</sup> )	Hembras (H)	Parasitismo (%)	Infestación		
1600	H2	C2	50.0ab	1.2ab	
		C	C3	100.0ab	3.0a
		C4	100.0ab	2.2a	
		D	D1	94.7ab	1.5ab
		D2	100.0ab	1.1ab	
1800	H1	I	I3	100.0a	1.5ab
	H2	B	B1	60.0b	1.0b
	H3	A	A4	66.6b	1.3ab
2000	H2	B2	50.0b	1.5ab	
		B	B3	57.1b	1.0ab
		B8	79.3b	2.0ab	

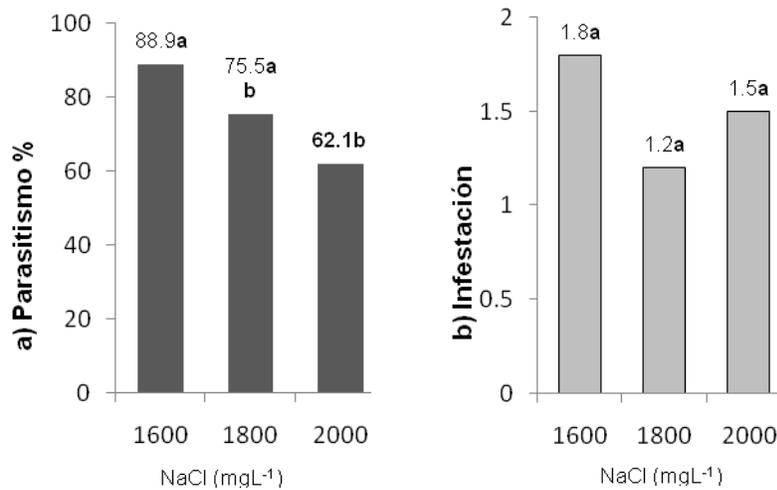


Figura 5: a) Parasitismo, b) infestación y c) número de huevos en la F4 de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* por concentración salina.

### 5.3 Capacidad infectiva de una línea pura F4 tolerante de *R. iyengari*

Los preparasíticos de la línea T10 (2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl) obtenidos de hembras de líneas puras tolerantes (H2B2, H2B3 y H2B8) contra *C. quinquefasciatus* mostraron un aumento en el porcentaje de parasitismo para niveles de salinidad de NaCl para 1600 (20%) y 1800 (5.2) y 2000 mg L<sup>-1</sup> (1.5) respecto a la población susceptible, la media de infestación de 7.2 incremento a 9.2.

Comparando la DL<sub>50</sub> de la población susceptible 1091 (1068.29-1114.69) y la línea pura tolerante T10 con DL<sub>50</sub>=1191 (1113-1263) estos se traslapan en sus límites fiduciales con la población susceptible (Figura 6), por lo tanto el ligero traslape de los límites fiduciales en las DL<sub>50</sub> indican que no hay una diferencia marcada en los límites de tolerancia; sin embargo, se debe considerar que la metodología del experimento con la población

susceptible fue diferente a la metodología del experimento con la línea pura que fue seleccionada por la tolerancia a concentraciones altas. Por lo tanto se seguirá reproduciendo la línea tolerante para que en seis meses, cuando se cuente con un cultivo de nematodos de la línea tolerante se realicen experimentos con la población susceptible bajo la cual se necesitan por lo menos 20,000 nematodos preparásiticos y poder comparar las dos poblaciones en condiciones uniformes.

Cuadro 6. Efecto de NaCl en la capacidad infectiva de *R. iyengari* contra larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*

NaCl (mg L <sup>-1</sup> )	Parasitismo (%)	Infestación
Control	100.0a	9.1 <sup>a</sup>
200	100.0a	9.2 <sup>a</sup>
400	100.0a	7.3 <sup>b</sup>
600	100.0a	5.6 <sup>c</sup>
800	100.0a	3.0 <sup>d</sup>
1000	69.4 <sup>b</sup>	2.3 <sup>de</sup>
1200	38.8 <sup>bc</sup>	1.5 <sup>edf</sup>
1400	28.5 <sup>c</sup>	1.6 <sup>edf</sup>
1600	23.1 <sup>cd</sup>	1.0 <sup>ef</sup>
1800	8.3 <sup>cd</sup>	1.0 <sup>ef</sup>
2000	2.7 <sup>cd</sup>	1.0 <sup>ef</sup>

\*Valores con la misma letra en la misma columna, no difieren estadísticamente ( $\alpha = 0.05$ ,  $p < 0.001$ )



Figura 6: Representación gráfica de la inhibición de NaCl en la capacidad infectiva de *R. iyengari*

En la figura 7 y 8 se presenta la tendencia de los porcentajes de parasitismo y medias de infestación de las once líneas puras de hembras tolerantes a salinidades de 1600, 1800 y 2000 mg L<sup>-1</sup> de NaCl en el transcurso de las cuatro generaciones. Mostrando el incremento en los valores de parasitismo e infestación de 1.2 a 62.13% y de 1.0 a 1.5 respectivamente para el nivel de salinidad 1600 mg L<sup>-1</sup>; 3.1 a 75.53% y de 1.0 a 1.2 para el tratamiento salino de 1800 mg L<sup>-1</sup>; 3.1 a 88.94% de parasitismo y de 1.0 a 1.8 de infestación para la concentración de salinidad 2000 mg L<sup>-1</sup>.

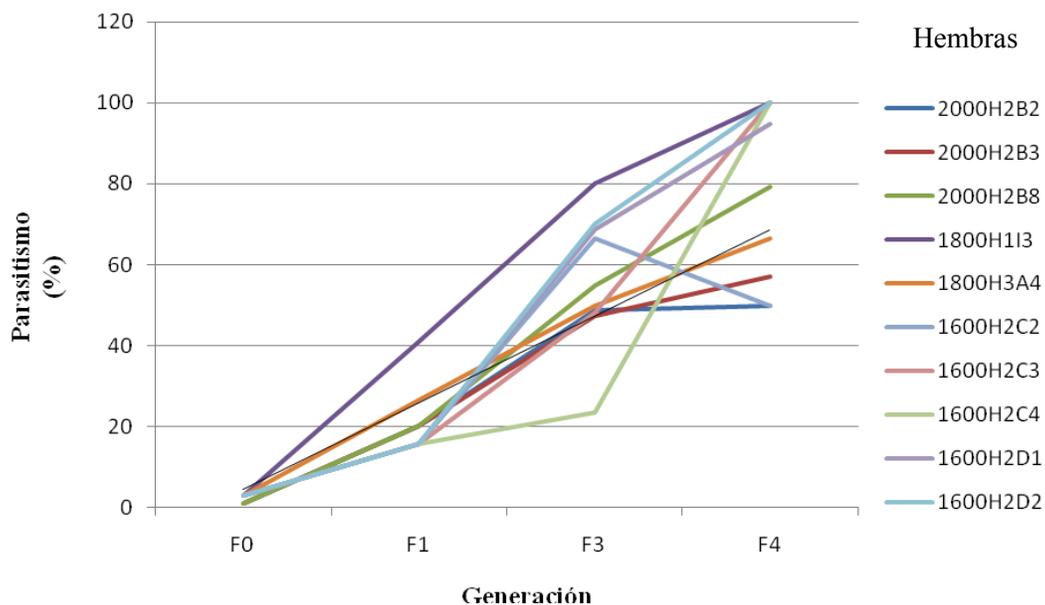


Figura 7: Comportamiento del parasitismo por hembras puras tolerantes a NaCl de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* a través de cuatro generaciones filiales.

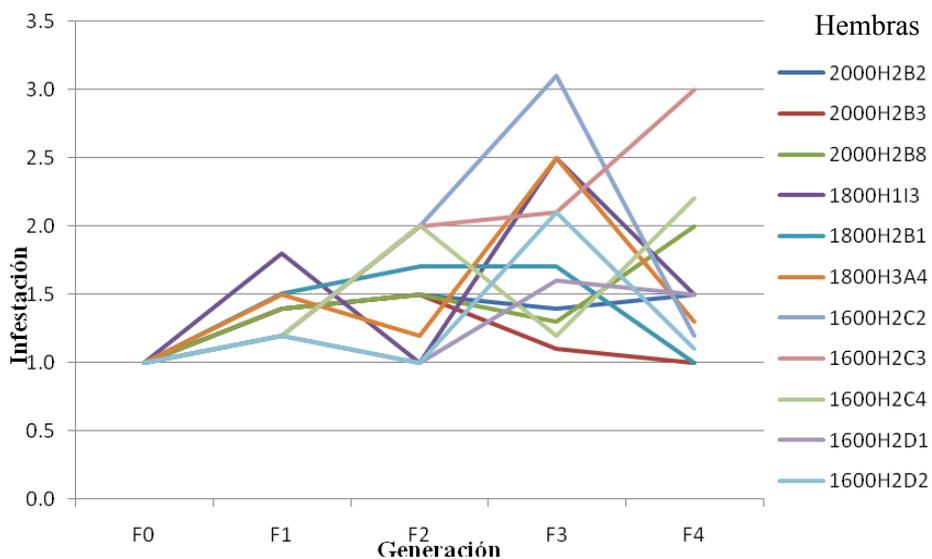


Figura 8: Comportamiento de la infestación por hembras puras tolerantes a NaCl de *R. iyengari* en larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* a través de cuatro generaciones filiales.

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

Las concentraciones de salinidad mayores a  $1091 \text{ mg L}^{-1}$  de NaCl tienen efectos adversos en nematodos parásitos de larvas de mosquito *R. iyengari* al generar un estrés osmótico que afecta en un 50% la capacidad infectiva y de sobrevivencia del nematodo reduciendo hasta 1.2% los niveles de parasitismo en laboratorio.

El rango óptimo de la capacidad infectiva de *R. iyengari* en concentraciones salinas de NaCl es de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  a  $600 \text{ mg L}^{-1}$  registrando parasitismo total 100 % y medias de infestación de 7.2 a 5.8 nematodos por larva de *C. quinquefasciatus* parasitada.

La variación de los niveles de parasitismo y medias de infestación en las diferentes generaciones, se atribuyen al proceso de selección al cual fueron sometidos los individuos.

El traslape de los límites fiduciales de la población susceptible y F4 demuestran que las poblaciones son iguales.

La oviposición de las hembras no fue afectada por la exposición a concentraciones altas de NaCl.

## CAPITULO 7

### LITERATURA CITADA

- Achinelly, M. F. y J. J Garcia. 2003. Efecto de la temperatura sobre la longevidad e infección, de los juveniles de *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae), parásito de culícidos. Rev. Biol. Trop, 51(3): 753-8,
- Becker, N., D. Petric., M. Zgomba., C. Boase., C. Dahl., J. Lane. and A. Kaiser. 2003. Mosquitoes and their control. Kluwer Academic/Plenum Publ., New York.
- Bheema, U. W., A.Gajanana and P. K. Rajagopalan. 1979. A note on the tolerance of the mermithid nematode, *Romanomermis* sp., to different pH and salinity. Indian Journal of Medical Research, 69, 423-7.
- Bilgrami A. I., R. Gaugler., D.I. Shapiro-Ilan and B.J. Adams. 2006. Source of trait deterioration in entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* during in vivo culture, Nematology, 8:397-409
- Brewer M., L. Bufa. and W. Almirón. 1987. *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Díptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina. Rev Per Entomol, 29:69-72.
- Brown, A.M., A.I. Shapiro-Ilan and R.R. Gaugler. 2006. Entomopathogenic nematode infectivity enhancement using physical and chemical stressors. Biological

- Control, 39:147-153. Brown, B. J. and E. G. Platzer. 1978. Salts and the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. Journal of Nematology, 10:53-64.
- Burnell, A. 2002. Genetics and genetic improvement. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI. Publishing, Oxon, Uk, pp. 241-263.
- Gajanana, A., S. J. Kazmi., R. U. S. Bheema., S.C. Suguna. and R. K. Ahas. 1978. Studies on nematode parasite (*Romanomermis sp: Mermithidae*) of mosquito larvae isolated in Pondicherry. Indian J. Med. Res., 68:242-7.
- Glazer, I. and L. Salame. 2000. Osmotic survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapse*. Biol. Control, 18:251-7.
- Grewal, P.S., R. Gaugler and Y. Wang. 1996. Enhanced cold tolerance of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* through genetic selection. Annals of Applied Biology, 129 (2):335-341
- Harrison, G. 1978. Mosquitoes, Malaria and Man: A history of the Hostilities Since 1880. Clarke, Irwin y Co, New York.
- Harwood, R.F. and M. T. James. 1979. Entomology in Human and Animal Health. MacMillan Publ. New York.
- Khanna, N., C.P. Cressman., C.P. Tataru and P.L. Williams. 1997. Tolerance of the nematode *Caenorhabditis elegans* to pH, Salinity and Hardness in Aquatic Media. Environmental Contamination Toxicology. 32, 110-14.

- Martínez, O. E. Conesa., Y. P. Martínez. y C. J. Lucientes. 2003. Sistemas de control biológico de G.E las poblaciones de mosquitos en zonas húmedas. Novograf, S.A. pp 55.
- Peng, Y; Y. Song., J. Song. and E.G. Platzer., 1999. The effect of low temperature on preparasitic juveniles of *Romanomermis* (nematoda: mermithidae). *Nematology* 5:507-511.
- Pérez, P. R., G. Montesino y H. C. Rodríguez., 1999. Salinidad y pH , factores que afectan el parasitismo de *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* . Avances en la investigación. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. pp 21-2.
- Pérez, P.R., H.C. Rodríguez., R. J. Lara., B.R. Montes. y V. G. Ramírez. 2003. Susceptibilidad de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* Welch. *Folia Entomol. Mex.* 42, 321-7.
- Pérez-Pacheco, R., H. C. Rodríguez.; R. J. Lara.; B.Montes.; V. G. Ramírez y M. L. Martínez. 2004. Parasitism of *Romanomermis iyengari* in larvae of three species of mosquito in the laboratory and in *Anopheles pseudopunctipennis* in the field. *Agrociencia*, 38(4):413-421.
- Pérez-Pacheco, R.; C. Rodríguez-Hernández., J. Lara-Reyna., R. Montes-Belmont. y J. Ruiz-Vega. 2005. Control of the mosquito *Anopheles pseudopunctipennis*

- (Diptera: Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, Mexico. *Biological Control* 32:137-142.
- Pérez-Pacheco, R., A. M. Santamarina., S. T. Martínez y G. A. Flores. 1998. Susceptibilidad de las larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* al parasitismo del nemátodo *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae), Estado de Oaxaca, México. *Rev. Cubana Medicina Tropical*, 50(3)199-202.
- Pérez-Pacheco R., A. Santamarina-Mijares., A. Vásquez- López., S. H. Martínez Tomás. y J. Suarez-Espinosa. 2009. Efectividad y supervivencia de *Romanomermis culicivorax* en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Agrociencia*. Vol. 43 (8):861-8.
- Petersen, J. J. 1979. pH as a factor in parasitism of mosquito larvae by the mermithid *Romanomermis culicivorax*. *Journal Nematology*, 11:105-6.
- Petersen, J.J. and J.M. Cupello. 1981. Comercial development and future prospecte for entomogenous nematodes. *Journal Nematology*, 13:1.
- Petersen, J. J. and O. R. Willis. 1970. Some factors affecting parasitism by mermithid nematodes in southern house mosquito larvae. *J. Econ. Entomol.* 63:175-178.
- Prindantseva, E. A., N.I. Lebedeca., Z.P. Sherherban and M.K. Kadyrova. 1990. An evaluation of the possibility for mosquito control in Vzbekistan. *Medical Parazitology (Mosk)*, 1:15-17.

- Ruiz-Carballo, F. 2009. Mejoramiento de la tolerancia al calor y a la desecación de tres nematodos entomopatógenos. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán Oaxaca, México. 1-96.
- Salazar, J. M. y I. L. Moncada. 2004. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Díptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica*.24:385-92.
- Samanidou–Voyadjoglou, A., V. Roussis. and V. P. Petrakis. 2007. 7 Biological control of mosquito populations: An applied aspect of pest control by means of natural enemies. Biological control of mosquito populations. pp 123-149. *In*. Predation in organisms. A. M.T. Elewa. Springer Berlin Heidelberg Editor.
- Santamarina, M. A. 1994. Actividad parasítica de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Miscelánea Zoológica*, 17(1):59-65.
- Santamarina, M. A., I.A. García y R.B. González. 1992. Capacidad infestiva del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquitos en condiciones naturales.
- Santamarina, M. A., G. M. Ruiz., A.E. Rodríguez., A.H. Bustamante and R.P. Pacheco. 1996. Effectiveness of *Romanomermis culicivorax* in *Anopheles pseudopunctipennis* and *Culex quinquefasciatus* in México. *Miscelánea Zoológica*, 19(1):33-37.

- Santamarina, M.A., P. R. Pérez., M.S.H. Tomas., C.L. Enrique y A.G. Flores. 1999. The *Romanomermis iyengari* parasite for *Anopheles pseudopunctipennis* suppression in natural habitats in Oaxaca State, Mexico. *Revista Panam Salud Pública*, 5:23-8.
- Santamarina, M. A y R.P. Pérez. 1998. Efecto patogénico del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio en el estado de Oaxaca, México. *Revista Cubana Medicina Tropical.*, 50(1):8-11.
- Savage, H. and B. Miller. 1995. House mosquitoes of the U.S.A., *Culex pipiens* complex. *Win Beats*, 6:8-9.
- Segal and Glazer, 2000. Genetics for improving biological control agents: the case o entomopathogenic nematodes. *Crop protection*, 19:685-9.
- Somvanshi, V.S., H. Koltai. and I. Glazer. 2008. Expression of different desiccation-tolerance related genes in various species of entomopathogenic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*,158(1):65-71.
- Soto, A.V. and M.A. Santamarina. 1996. Demonstration of the biolarvicidae activity of *Romanomermis iyengari* (nematoda: mermithidae) in laboratory conditions. 1-12.
- Strauch, O., J. Oestergaard, S. Hollmer and R. U. Ehlers. 2004. Genetic improvement of the dessication tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. *Biological Control*, 31(2):218-226.

- Vargas, V. M. 1998. El mosquito, un enemigo peligroso: biología, control e importancia en la salud humana: Díptera: Culicidae. 1. Ed. San José, C.R: Editorial de la Universidad de Costa Rica. P.: il. Publicaciones en antropología,2:214.
- Vladimirova, V. V., E. A. Pridantseva., A. K. Gafurov., M. E. Muratova. 1990. A trial of *Romanomermis iyengari* and *R. culicivorax* mermithids as a means for controlling blood-sucking mosquitoes in the Tadznik. Medi. Parazitol. (Mosk), 3 42-5.
- Von Brand, T. 1943. Physiological observations upon a larval Eustrongylides. IV. Influence of temperature, pH and inorganicions upon the oxygen consumption. Biol.Bull. 84:148-156.