



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro Interdisciplinario de Investigación para
el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca

Maestría en Ciencias en Conservación y
Aprovechamiento de Recursos Naturales

“Evaluación de sustratos como medio de cultivo para la
producción masiva del nematodo *Romanomermis iyengari*

Welch, parásito de larvas de mosquitos”

Tesis que para obtener el grado de:
Maestro en ciencias

Presenta:
Alonso Ramos Alicia Yadira

Director de Tesis:
Dr. Rafael Pérez Pacheco



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 26 del mes de mayo del 2015 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: "Evaluación de sustratos como medio de cultivo para la producción masiva del nematodo *Romanomermis iyengari* Welch, parásito de larvas de mosquito"

Presentada por la alumna:

Alonso

Apellido paterno

Ramos

materno

Alicia Yadira

nombre(s)

Con registro:

A	1	3	0	0	3	0
---	---	---	---	---	---	---

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

Director de tesis

Dr. Rafael Pérez Pacheco

Dr. Alfonso Vázquez López

M. en C. Graciela Eugenia Gonzales Pérez.

Dr. José Antonio Sánchez García

Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. José Rodolfo Martínez y Cárdenas
Encargado de la Dirección



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



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 26 del mes de mayo del año 2015, el (la) que suscribe: Alicia Yadira Alonso Ramos alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A130030, 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 del Dr. Rafael Pérez Pacheco y cede los derechos del trabajo titulado, "Evaluación de sustratos como medio de cultivo para la producción masiva del nematodo *Romanomermis iyengari* Welch, parásito de larvas de mosquito", 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 ó aliyar805@hotmail.com se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



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

Alicia Yadira Alonso Ramos

RESUMEN

En la presente investigación se realizaron cuatro experimentos, en los cuales se evaluaron cinco tipos de sustratos (fibra de coco, fibra de agave, dos especies de musgo del género *Sphagnum* y arena) como medio de cultivo para la producción de nematodos. En los primeros dos experimentos se evaluaron tres sustratos (musgo *Sphagnum* Orchid Moss®, musgo *Sphagnum* Oaxaca de los Mixes y arena): en el primero se utilizaron 200 individuos (100 hembras y 100 machos) y en el segundo se utilizó 1g de nematodos por unidad experimental; el tercero consistió en evaluar cinco tipos de sustrato (fibra de coco, fibra de agave, *Sphagnum* Orchid Moss®, *Sphagnum* Oaxaca y arena) usando 2g de nematodos en cada unidad experimental, inundado tres medios de cultivo por edad (4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas) por sustrato utilizado; en un cuarto experimento se evaluaron los mismos cinco sustratos, inundando tres medios de cultivo de cada sustrato, en cuatro tiempos (1, 3, 5 y 7 meses). Con los primeros dos experimentos se comprobó la reproducción de *R. iyengari* en las dos especies de musgo y determinó la cantidad de nematodos a utilizar en los siguientes experimentos. En el tercer experimento, el mayor rendimiento de medios de cultivo con cuatro semanas de edad, se obtuvo con la fibra de agave (436,100 preparasíticos) y con 24 semanas de edad sólo se obtuvieron preparasíticos en medios de cultivo con fibra de coco (5,556), fibra de agave (56) y *Sphagnum* Oaxaca (56). Los resultados indican, que la fibra de agave al igual que el musgo *Sphagnum* Oaxaca (309,444 con seis semanas de edad) pueden sustituir el uso de arena, debido a que superaron los rendimientos obtenidos por la arena, además de ser sustratos ligeros que su movimiento no genera disminución en los rendimientos. En los primeros tres experimentos se verificó la capacidad infectiva de los nematodos obtenidos en los diferentes sustratos, con una dosis de 5:1 (nematodo: larva), registrando porcentajes de parasitismo entre 56-85% y medias de infestación entre 3.2 y 6.4 (nematodos por larva) por lo que los nematodos no se vieron afectados fisiológicamente, ni en su capacidad parasítica. Para el cuarto experimento, se obtuvieron rendimientos hasta la cuarta inundación con *Sphagnum* Orchid Moss® (2,333), *Sphagnum* Oaxaca (166) y fibra de coco (277), en el caso de la fibra de agave y arena sólo se obtuvieron rendimientos hasta la tercera inundación. La edad de los medios de cultivo es un factor importante, ya que sus rendimientos disminuyen con el tiempo.

Palabras clave: *Romanomermis iyengari*, fibra, musgo, cultivo de nematodos

ABSTRACT

In this research were realized four experiments, in which five types of substrates (coconut fiber, agave fiber, two species of *Sphagnum* moss and sand) were evaluated as substrate for the production of nematodes. In the first two experiments, three substrates (Moss *Sphagnum* Orchid Moss®, moss *Sphagnum* Oaxaca of the Mixes and sand) were evaluated: in the first experiment 200 nematodes were used (100 males and 100 females) and in the second experiment were used 1g of nematodes for experimental unit; the third experiment were to evaluate five types of substrate (coconut fiber, agave fiber, *Sphagnum* Orchid Moss®, *Sphagnum* Oaxaca and sand) using 2g of nematodes in each experimental unit, were flooding three different cultures by age (4, 6, 8, 12, 16, 20 and 24 weeks) for substrate used; in a fourth experiment were evaluated the same five substrates, flooding three cultures in each substrate, in four times (1, 3, 5 and 7 months). With the first two experiments was the reproduction of *R. iyengari* was proved in the two moss species and was determined the amount of nematodes for use in the following experiments. In the third experiment, the higher yield of cultures with four weeks old, were obtained with the agave fiber (436,100 preparasitics) and with 24 weeks old only were obtained preparasitics in cultures with coconut fiber (5,556), agave fiber (56) and *Sphagnum* Oaxaca (56). The results indicate that the agave fiber as moss *Sphagnum* Oaxaca (309,444 six weeks old) can replace the use of sand, because they exceeded the yields obtained by sand, besides being lightweight substrates, than its movement don't generate decrease in the yields. in the first three experiments were verified infectivity capacity of nematodes obtained in the different substrates, with a dose of 5:1 (nematodes: larva), registering parasitism percentages between 56-85% and mean of infestation between 3.2 and 6.4 (nematodes per larva) so that the nematodes were not affected physiologically or in its parasitic capacity. For the fourth experiment, were obtained yields to fourth flood with *Sphagnum* Orchid Moss® (2,333), *Sphagnum* Oaxaca (166) and coconut fiber (277), in the case of sand and agave fiber only were obtained yields until third flood. The age of the cultures is an important factor, because its yields decrease with time.

Key words: *Romanormis iyengari*, fiber, moss, cultivate of nematodes

AGRADECIMIENTOS

*La presente tesis, es el resultado del esfuerzo conjunto de distintas personas e instituciones, por lo que primeramente agradezco a mi director de tesis, el **Dr. Rafael Pérez Pacheco** por confiar en mi persona para la realización del presente trabajo, así como por sus consejos, asesoría y apoyo en todo momento. Y sin importar el orden de aparición, agradezco a:*

***Dr. Alfonso Vásquez López**, por sus comentarios, conocimiento y apoyo incondicional durante la tesis.*

***Dr. Celerino Robles**, gracias por su accesibilidad y apoyo en el laboratorio de suelos para la realización de la caracterización.*

***Dr. Gerardo Rodríguez Ortiz**, por ser una enorme guía en el desarrollo de los análisis estadísticos, paciencia, colaboración y observaciones muy importantes en el presente trabajo.*

***M. en C. Graciela Eugenia Gonzales Pérez**, por el tiempo para la revisión de esta investigación, así también agradecer sus observaciones y opiniones que contribuyeron al mejoramiento del trabajo.*

***Dr. José Antonio Sánchez García**, agradezco sus comentarios, y el tiempo dedicado en la revisión de la investigación.*

***Dr. Teodulfo Aquino Bolaños**, por sus sugerencias e importantes comentarios en el desarrollo del presente trabajo.*

*Al Técnico **Gonzalo Flores Ambrosio**, por todos sus conocimientos, experiencias compartidas, amistad y sobre todo, su apoyo en el laboratorio durante la realización de los experimentos.*

Agradecimientos especiales a las instituciones como: el Instituto Politécnico Nacional, que por medio del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA), brindaron el espacio para el desarrollo de la presente investigación y estudios de maestría.

La Secretaría de Investigación y Posgrado, que por medio de la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) y al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) que otorgaron el apoyo económico necesarios para la realización del presente trabajo.

Finalmente, agradezco a todo el personal del CIIDIR-Unidad Oaxaca, que directa e indirectamente contribuyeron en mi formación profesional y en la investigación desarrollada. Y por todos los momentos de desesperación, angustia, risas, apoyo incondicional y sobre todo, por su gran amistad a: Elía, Fany, Yaz y Tania, que siempre estuvieron a mi lado.

Dedicado Con Todo Mi Cariño A Mis Padres:
JULIAN ALONSO MORALES Y ERNESTINA RAMOS LÓPEZ
Y HERMANO JOSÉ CARLOS ALONSO RAMOS

CONTENIDO

	PAG
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1. Importancia de los mosquitos.....	4
3.2. Control de mosquitos vectores de enfermedades.....	4
3.2.1. Control químico.....	4
3.2.2. Control biológico.....	5
3.3. Nematodos parásitos de larvas de mosquitos.....	5
3.4. <i>Romanormis iyengari</i>	6
3.4.1. Ciclo de vida.....	7
3.5. Producción masiva de nematodos parásitos de larvas de moquitos..	9
3.5.1. Infestación en larvas de mosquito de segundo instar con	
nematodos infectivos.....	9
3.5.2. Colecta y siembra de nematodos postparásitos inmaduros.....	10
3.5.3. Almacenamiento de medios de cultivo.....	10
3.5.4. Transporte de medios de cultivo.....	11
3.6. Arena como sustrato de medios de cultivo.....	12
3.7. Sustratos orgánicos.....	13
3.7.1. Musgo.....	13
3.7.2. Fibra.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Experimento 1. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando	
100 ♀ y 100 ♂ de <i>Romanormis iyengari</i> en tres sustratos.....	17
4.2. Experimento 2. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando	
1 g de <i>Romanormis iyengari</i> en tres sustratos.....	20
4.3. Experimento 3. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando	
2 g de <i>Romanormis iyengari</i> en cinco sustratos durante seis	
meses.....	21
4.4. Experimento 4. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando	
2 g de <i>Romanormis iyengari</i> en cinco sustratos durante	
inundaciones consecutivas.....	22
4.5. Caracterización de sustratos.....	23

4.5.1. Densidad aparente.....	23
4.5.2. Densidad real.....	23
4.5.3. Espacio poroso total.....	24
4.5.4. Humedad.....	24
4.5.5. Capacidad de retención de agua.....	25
4.5.6. Conductividad eléctrica y pH.....	25
4.5.7. Materia orgánica y ceniza.....	25
4.5.8. Carbono total.....	26
4.5.9. Nitrógeno.....	26
4.5.10. Relación C/N.....	26
4.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	26
4.6.1. Experimento 1. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos.....	26
4.6.2. Experimento 2. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos....	28
4.6.3. Experimento 3. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos durante seis meses.....	29
4.6.4. Experimento 4. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos durante inundaciones consecutivas.....	31
4.6.5. Caracterización de sustratos.....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1. Experimento 1. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos.....	34
5.2. Experimento 2. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos.....	36
5.3. Experimento 3. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos durante 6 meses.	38
5.4. Experimento 4. Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos en inundaciones consecutivas.....	45
5.5. Caracterización de sustratos.....	48
5.5.1. Propiedades físicas.....	48
5.5.2. Propiedades químicas.....	50
6. CONCLUSIONES.....	57
7. BIBLIOGRAFÍA.....	59

INDICE DE CUADROS

	PAG
1. Diseño del experimento 1, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos.....	27
2. Diseño del experimento 2, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos.....	28
3. Diseño del experimento 3, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos.....	30
4. Diseño del experimento 4, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos durante inundaciones consecutivas.....	31
5. Rendimiento promedio de nematodos preparasíticos en medios de cultivo con 100 ♀ y 100 ♂ de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres tipos de sustratos distintos.....	35
6. Porcentajes de parasitismo y medias de infestación para el experimento de rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos.....	36
7. Rendimiento promedio de medios de cultivo con 1g de individuos de <i>R. iyengari</i> en tres tipos de sustratos.....	37
8. Porcentajes de parasitismo y medias de infestación del experimento 2, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1g de <i>Romanomermis iyengari</i> en tres sustratos.....	38
9. Rendimiento promedio de medios de cultivo con 2g de nematodos <i>R. iyengari</i> en cinco tipos de sustratos durante 6 meses.....	39
10. Prueba de rangos múltiples de Tukey $\alpha=0.05$ de confiabilidad en el en el experimento 3, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos durante 6 meses.....	40
11. Prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de confiabilidad entre el tipo de sustrato en el experimento 4, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos en inundaciones consecutivas.....	45
12. Prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de confiabilidad entre la inundación en el experimento 4, rendimiento de cultivos de nematodos	

depositando 2g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos en inundaciones consecutivas.....	46
13. Caracterización física de los sustratos utilizados, densidad aparente (DA), densidad real (DR), espacio poroso total (EPT) y humedad.....	50
14. Caracterización química de sustratos; cenizas, materia orgánica (MO), carbono (C), pH, conductividad eléctrica (CE), nitrógeno (N) y la relación carbono-nitrógeno (C/N).....	52

INDICE DE FIGURAS

	PAG
1. Ciclo vital del nematodo <i>R. iyengari</i> , parásito de larvas de mosquitos (Pérez <i>et al.</i> , 2004).....	7
2. Temperaturas registradas cada 15 minutos con un Data Logger HOBO U12-012 durante 8 meses.....	33
3. Humedad relativa registrada cada 15 minutos con una Data Logger HOBO U12-012 durante 8 meses.....	34
4. Rendimiento de cultivos de <i>R. iyengari</i> de cinco sustratos con diferentes edades 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas.....	41
5. Comportamiento del rendimiento de cinco sustratos utilizados como cultivos de <i>R. iyengari</i> a lo largo de seis meses.....	43
6. Rendimientos totales de cultivos de <i>R. iyengari</i> para cada tipo de sustrato.....	44
7. Rendimientos acumulados de cuatro inundaciones a cultivos de <i>R. iyengari</i> en cinco sustratos diferentes.....	46
8. Rendimientos obtenidos en 4 inundaciones en cinco diferentes sustratos durante 7 meses.....	47
9. Cluster integrado por 35 tratamientos (TRAT) del experimento “rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de <i>Romanomermis iyengari</i> en cinco sustratos durante 6 meses” y la caracterización de sustratos.....	52



1. INTRODUCCIÓN

El combate a mosquitos vectores de enfermedades, se ha hecho tradicionalmente con insecticidas organosintéticos como el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), Malatión y Temephos (abate), lo que ha ocasionado contaminación al ambiente, intoxicaciones a personas expuestas y resistencia de los mosquitos a los insecticidas (Pérez-Pacheco *et al.*, 2005).

El control biológico de mosquitos utilizando nematodos parásitos de larvas de mosquito la familia Mermithidae, es una alternativa amigable con el ambiente y ha demostrado ser un método eficaz para el control de las larvas de mosquitos en condiciones de laboratorio y de campo (Santamarina y Bellini, 2000).

Una de las especies más importantes dentro de esta familia, *Romanomermis iyengari* Welch, ha demostrado ser un nematodo capaz de reducir las altas densidades poblacionales de larvas de mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* en condiciones de campo (Santamarina y Bellini, 2000).

Durante su reproducción en laboratorio *R. iyengari* se aparea y deposita sus huevos en arena húmeda. Cuando ésta se inunda con agua, los huevos se rompen y se liberan las etapas infectivas denominados juveniles o también nematodos preparásitos (Santamarina y Pérez, 1998).

De esta forma, la arena húmeda es considerada como el principal medio de cultivo para la producción de esta especie (en su etapa postparásita). Daim *et al.* (1987), mencionan que el tamaño de partícula de la arena en la producción de los parásitos de *R. iyengari* es un factor importante a considerar cuando se requiere su producción masiva, obteniendo una buena producción con un tamaño de partícula de arena entre 1.4 y 2.0 mm.



Otro factor importante para considerar en la producción masiva de esta especie es el manejo de los medios de cultivos, ya que Petersen y Levy (1980) registraron pérdidas del 81-90 % en el rendimiento de los cultivos con arena como sustrato debido principalmente al manejo, es decir, el movimiento provocado por el transporte de los medios de cultivo. Aunado a este problema, Cupello *et al.* (1982) mencionan que la inmovilización del medio de cultivo puede ser el factor más importante en la reducción de las pérdidas de preparasíticos, puesto que existe una eclosión prematura o daños a los huevos maduros como resultado del movimiento del medio durante el transporte y la manipulación, así el peso y volumen se consideran otro factor a considerar para mejorar el método de almacenamiento y transporte.

Desde el 2004, Pérez *et al.* (2004) habían propuesto que la producción masiva del nematodo *R. iyengari* se realice con materias primas locales, haciéndolo altamente competitivo en comparación con otros métodos, desde el punto de vista económico y sustentable. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado un sustrato adecuado como medio de cultivo de nematodos parásitos de larvas de mosquito, que sustituya el uso de arena por los inconvenientes antes mencionados.

Por lo que en el presente trabajo se propone la evaluación de diferentes materiales como posibles sustratos para obtener una mayor producción de nematodos, los cuales presenten un buen desarrollo biológico; es decir, nematodos con capacidad parasítica y al mismo tiempo que el sustrato sea el adecuado para el almacenamiento y transporte de postparasitos en diferentes tiempos.



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar sustratos orgánicos como medio de cultivo para la producción masiva del nematodo *Romanomermis iyengari*.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la emergencia de preparasíticos de *Romanomermis iyengari* en cinco tipos de sustratos.
2. Determinar la capacidad parasítica de *Romanomermis iyengari* producidos en cinco tipos de sustratos.
3. Evaluar el rendimiento de medios de cultivo de cinco tipos de sustratos durante seis meses.
4. Caracterización físico-química de sustratos orgánicos utilizados para la producción de *Romanomermis iyengari*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 IMPORTANCIA DE LOS MOSQUITOS

Desde el punto de vista ecológico, los mosquitos o zancudos (Diptera: Culicidae) como se les conoce en algunos lugares de México, se caracterizan principalmente por su importancia médica y veterinaria, debido a que las hembras tienen hábitos hematófagos, lo cual les confiere capacidad biológica de transmitir agentes infecciosos como protozoarios, helmintos, bacterias y virus (Casas y Orozco, 2006; Ruiz, 2010).

En México se encuentran presentes 150 especies, dentro de las cuales destacan por su importancia en el sector salud las siguientes: *Aedes aegypti* Linnaeus, *A. albopictus* Skuse, transmisores potenciales del flavivirus agente causal del dengue; *Anopheles albimanus* Wiedemann, *A. pseudopunctipennis* Theobald, *A. vestitipennis* Dyar, vectores de la malaria o paludismo y especies del género *Culex* como *C. pipiens* Linnaeus y *C. quinquefasciatus* Say, transmiten arbovirus como el virus del Nilo (Savage y Miller, 1995; Casas y Orozco, 2006; Samanidou-Voyadjogluo *et al.*, 2007).

3.2 CONTROL DE MOSQUITOS VECTORES DE ENFERMEDADES

3.2.1 CONTROL QUÍMICO

Debido a los problemas antes mencionados, desde hace muchos años atrás se ha buscado un método eficaz para regular las poblaciones de estos insectos, recurriendo al uso de sustancias químico sintéticas como organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos. Sin embargo, el mal uso de estas



sustancias ha traído consecuencias para el ambiente y el humano por ejemplo, contaminación al ambiente, intoxicación a personas expuestas, desarrollo de resistencia de los mosquitos a distintos grupos toxicológicos de insecticidas (Samanidou-Voyadjogluo *et al.*, 2007).

3.2.2 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico surge como una alternativa al uso de sustancias químicas sintéticas en el control de mosquitos (Flores *et al.*, 1998). Dentro de los agentes biológicos para el control de mosquitos, los más reconocidos por la efectividad de control son bacterias entomopatógenas, nematodos parásitos, peces larvívoros, hongos e insectos acuáticos depredadores. Los nematodos parásitos de larvas de mosquitos (*R. culicivora* Ross y Smith y *R. iyengari*) se han utilizado en países como Estados Unidos de Norte América (U.S.A.), Cuba, India, Rusia, Colombia y México, donde se ha demostrado que constituyen una alternativa potencial para el control de mosquitos (Petersen y Willis, 1975; Santamarina, 1994; Pérez *et al.*, 1996).

3.3 NEMATODOS PARÁSITOS DE LARVAS DE MOSQUITOS

Las especies que tienen alguna relación de parasitismo con los insectos pertenecen a 23 familias de nematodos, de las cuales, siete han sido estudiadas por su potencial para el control biológico de insectos tales como: Allantonematidae, Heterorhabditidae, Mermithidae, Neothylenchidae, Rhabditidae, Sphaerulariidae y Steinernematidae e incluyen especies que atacan a insectos matando, esterilizando o alterando el desarrollo del huésped (Morton, 2009; Ruiz, 2010).

La familia Mermithidae se ubica en el orden Enoplina, la cual constituye un importante grupo de parásitos obligados que atacan estadios acuáticos de sus

hospederos, son muy similares variando principalmente en el tiempo que requieren para completar su ciclo de vida (Kurihara, 1976). Esta familia agrupa especies como: *Romanomermis culicivorax*, *R. iyengari*, *R. wuchangensis* (Bao) y *Strelkovimermis spiculatus* (Poinar y Camino), 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 larva de mosquitos, el parasitismo que provocan es siempre letal para el hospedero, son completamente inoocuos para la fauna acompañante y por la capacidad de permanencia en los cuerpos de agua (Petersen y Cupello, 1981).

Según Martínez (1996) esta familia se caracteriza porque sus representantes son de pequeño tamaño, de color blanquecino y transparente en su mayoría, forma cilíndrica y extremos aguzados.

3.4 *Romanomermis iyengari*

La especie *R. iyengari* es un endoparásito obligado de larvas de mosquito, que pertenece al género *Romanomermis*, el cual fue colectado por primera vez en los arrozales en el área de Pondicherry India, parasitando larvas de *Anopheles* (Gajanana, 1978).

El adulto es de color blanquecino y de diferente tamaño, dioicos; la hembra presenta una longitud promedio de 18 mm con una vagina que conduce al exterior por medio de una vulva que se localiza en la parte media ventral; en el macho este orificio suele ser más pequeño (12.5 mm) denominado cloaca, su región posterior suele estar curvada en forma de gancho, constituyendo un órgano copulador llamado bursa (Pérez, 2002; Arequipeño *et al.*, 2010).

3.4.1 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *R. iyengari* consta de cuatro fases: huevo, preparásitico, parásito y postparásito. Cada hembra oviposita un promedio de 2000 (Gajanana, 1978) hasta 2500 (Paily, 1990) huevos en un tiempo aproximado de un mes hasta 11 semanas en agua destilada a un pH de 4.5 y a una temperatura de 25 ± 2 °C (Pérez-Pacheco *et al.*, 1998).

Los huevos son esféricos, con un diámetro promedio de 80 μ y un espesor en su cascara de 8 μ (Gajanana, 1978). En condiciones naturales se encuentran en la profundidad (sustrato) de los criaderos y tardan 12 días en eclosionar.

Durante el desarrollo embrionario se presenta una primer muda juvenil 1 (J1) dentro del huevo (Pérez, 2002). Éste emerge del huevo en la fase juvenil 2 (J2), que se conoce como preparásitico o fase preparásitica, el cual se mantiene en forma de vida libre en la superficie del agua (presenta geotropismo negativo) buscando las larvas de mosquitos, que también están en la superficie por necesidad de respiración y mediante un estilete penetra la pared cuticular de la larva de mosquito, iniciando su fase parásita, de no encontrar una larva huésped muere (García Del Pino, 1994).

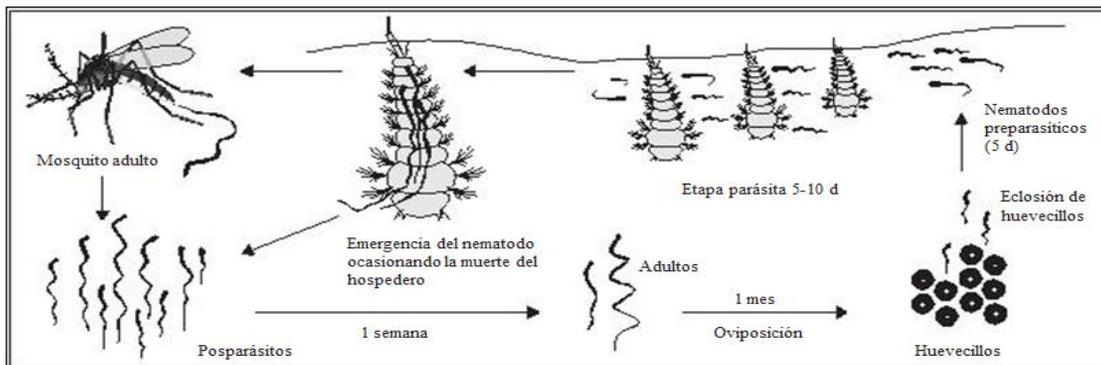


Figura 1. Ciclo vital del nematodo *R. iyengari*, parásito de larvas de mosquitos (Pérez *et al.*, 2004).

Se denomina parasítico, cuando se encuentra en el interior de la larva de mosquito, donde muda a juvenil 3 (J3), iniciando su fase parásita que dura de seis a ocho días a temperatura de 27 °C. Los hábitos alimenticios ocurren únicamente durante la fase parásita, presenta una membrana de células hipodérmicas con presencia de poros (110 Armstrong) a través de los cuales pasan las partículas de alimentos que provienen de la hemolinfa del hospedero (el resto de las fases no se alimenta) causando un empobrecimiento de metabolitos y al término de su parasitismo emerge de la larva y pasa a la fase juvenil 4 (J4), ocasionando la muerte de la misma por la perforación realizada (Gajanana, 1978).

Los estados parasíticos se pueden encontrar en la cabeza, tórax o abdomen de la larva de mosquito durante los primeros estadios de desarrollo parasítico y más tarde se mueven hacia el abdomen del hospedero, en este estado generalmente dejan de alimentarse poco antes de emerger, llegando incluso algunos a formar una segunda cutícula, lo que les permite incrementar su tolerancia a factores ambientales externos (Pérez *et al.*, 1996).

La fase J4, conocida como postparasítica, es de vida libre y presenta geotropismo positivo, por lo que el nematodo se concentra en el sustrato de la profundidad del criadero en ambientes naturales y en la gravilla en laboratorio. Estas formas postparasíticas sólo requieren un sustrato húmedo para mudar y reproducirse a temperatura ambiente de 24 a 27° C (Paily, 1990; Santamarina y Bellini, 2000).

Durante la copula, el extremo posterior en forma de gancho en el macho, se enreda en torno al cuerpo de la hembra, en la región de los poros genitales, durante la transmisión de espermatozoides a la vagina y para que se mantenga abierto el gonoporo femenino, las espículas copuladoras del macho asoman por la cloaca y el ano (Arequipaño *et al.*, 2010).

3.5 PRODUCCIÓN MASIVA DE NEMATODOS PARASITOS DE LARVAS DE MOQUITOS

La producción masiva del nematodo *R. iyengari*, a gran escala, se puede realizar con materias primas locales, haciéndolo altamente competitivo en comparación con otros métodos desde el punto de vista económico y sustentable; asimismo, su aplicación se puede realizar con aspersores convencionales y técnicas tradicionales (Pérez *et al.*, 1996).

3.5.1 INFESTACIÓN EN LARVAS DE MOSQUITO DE SEGUNDO INSTAR CON NEMATODOS INFECTIVOS

Generalmente para la obtención de biomasa de nematodos necesaria, se forman grupos de larvas de mosquito de la especie *Culex quinquefasciatus* en estadio II de desarrollo, que son expuestas a un número determinado de preparasíticos infectivos de *R. iyengari* (o según la especie de nematodo a producir) en una proporción generalmente de cinco preparasíticos por larva (Santamarina y Bellini, 2000).

Previamente a este paso se inundan con agua destilada medios de cultivo que contienen huevos de *R. iyengari* con el objetivo de inducir la eclosión de los huevos y la emergencia de las formas infectivas. Tres horas después se recolecta y determina el volumen del inóculo (agua de los cultivos que contenían los preparasíticos infectivos), mediante el método de dilución volumétrica (Petersen y Willis, 1972). La infestación se realiza con pipetas de 25 mL en depósitos plásticos de 44 x 37 x 7 cm que contienen cada uno 3 500 mL de agua corriente con pH 5.5.

3.5.2 COLECTA Y SIEMBRA DE NEMATODOS POSTPARÁSITOS INMADUROS

Siete días después de la infestación, una vez que las larvas se encuentran en estadio IV, se trasladan a tamices de 50 x 30 x 5 cm forrados con tela de malla estos se colocan en depósitos plásticos de 60 x 40 x 7 cm con agua para la recolección de los nematodos postparásitos tras la emergencia de las larvas parasitadas (Santamarina y Bellini, 2000).

Una vez concentrados todos los nematodos, se lavan con agua destilada para su posterior siembra, ésta se realiza con agujas entomológicas ligeramente curvas en su extremo distal. Los nematodos hembras y machos son sembrados en recipientes plásticos de 30 x 20 x 10 que contienen una capa de 3 cm de arena de río lavada y esterilizada y una capa de agua destilada de 2 mm, para facilitar el descenso de los nematodos al fondo de los cultivos (Santamarina y Bellini, 2000).

3.5.3 ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Una vez que son sembrados los nematodos, los cultivos se almacenan antes de su uso y finalmente se mantienen ligeramente húmedos con el agua destilada decantada el agua destilada para mantenerlos ligeramente húmedos, cubiertos herméticamente y almacenados a temperatura ambiente. Petersen y Willis (1972) inundaron medios de cultivo con dos semanas de almacenamiento, observando pocos huevos o huevos inmaduros, lo que disminuye el rendimiento de los medios de cultivo de nematodos hasta en un 29%.

Transcurridas entre cuatro y ocho semanas los medios de cultivo son inundados para provocar la emergencia de preparasíticos y obtener altos rendimientos hasta 34 semanas, no obstante según Petersen y Willis (1972), los mayores rendimientos se producen en la primera inundación ya que el rendimiento de estos



medios de cultivo va disminuyendo con el tiempo (Santamarina *et al.*, 1996; Petersen y Levy, 1980).

Santamarina y Bellini (2000) reportan un alto rendimiento de medios de cultivo de nematodos almacenados por seis semanas (aproximadamente 250,000 preparasíticos por cultivo). Sin embargo, se pueden producir eclosiones adicionales si los cultivos se secan y se almacenan correctamente durante tres a cuatro semanas adicionales (Petersen y Willis, 1972).

3.5.4 TRANSPORTE DE MEDIOS DE CULTIVO

Una vez almacenados los medios de cultivo de nematodos pueden ser transportados o enviados a localidades, regiones o países donde se requieran y no exista una planta productora de estos. Para el transporte se coloca arena en bolsas de plástico y posteriormente se introducen en un recipiente de espuma de poliestireno para proteger a los nematodos de las temperaturas extremas, sin embargo, Petersen y Levy (1980) reportan pérdidas en los rendimientos de preparasíticos entre un 80-90 %.

Un año después continuaron con estas investigaciones y evaluaron los rendimientos de los medios de cultivo por edades, en aquellos cultivos que contienen huevos maduros que son sometidos a un manejo descuidado, ocurre una eclosión prematura y los preparasíticos recién nacidos perecen. Si bien, el transporte de cultivos jóvenes (dos a cuatro semanas) reduce las pérdidas durante el transporte (38% comparados con el 80% de pérdidas en medios de cultivo con ocho semanas), los cultivos requieren de cinco a siete semanas adicionales después de la llegada a madurar, y esto a menudo es un gran inconveniente ya que el cultivo no está listo para usarse en el momento de la llegada (Petersen y Levy, 1980).

Las pérdidas son ocasionadas por el estrés impuesto a los cultivos durante el transporte, dando lugar a una eclosión temprana de los huevos o a la mortalidad de los nematodos por la acción de presión del cultivo de arena. Así, la inmovilización del medio de cultivo puede ser el factor más importante en la reducción de las pérdidas de preparasíticos (Petersen y Levy, 1980).

3.6 ARENA COMO SUSTRATO DE MEDIOS DE CULTIVO

El término “sustrato” se refiere a todo material sólido diferente del suelo que puede ser natural o sintético, mineral u orgánico y que en contenedor, de forma pura o mezclado, permite el anclaje de las plantas a través de su sistema radicular. El sustrato puede intervenir o no en el proceso de nutrición de la planta allí ubicada, esto último, clasifica a los sustratos en químicamente inertes (arena, vermiculita) o químicamente activos (fibras y musgo). En el caso de los materiales químicamente inertes, éstos actúan únicamente como soporte de la planta, mientras que los restantes intervienen además en procesos de adsorción y fijación de nutrientes (Pastor, 2000).

La arena consiste en pequeños granos de roca que van de 0.02 a 2.0 mm de diámetro, formados como resultado de la intemperización de diversas rocas, dependiendo de su composición mineral de la roca madre que le dió origen. Procede de canteras (granito, gneis, basalto, etc.), o en ríos procedente de depósitos de formación aluvial, más o menos reciente (Baixauli y Aguilar, 2002).

Es el material más pesado de los minerales que se utilizan como medio de crecimiento de las raíces. Las características físicas de la arena varían en función del tamaño de las partículas, por ser una material granular sin porosidad interna, depende básicamente de la granulometría (Zárate, 2007). Las arenas finas con tamaño de partícula inferior a 0.5 mm presentan una buena retención de agua

pero baja aireación, por el contrario, las arenas gruesas retienen menos agua fácilmente disponible y presentan mayor aireación (Zárate, 2013).

La arena constituye el medio de siembra de *R. iyengari* para su maduración, reproducción, oviposición y almacenamiento en el laboratorio. Para ello se coloca una cantidad suficiente en recipientes que cubran aproximadamente 2 cm de profundidad, posteriormente se agrega agua destilada a 1 cm de profundidad (Pérez-Pacheco *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Santamarina *et al.*, (1996) fueron evaluados cuatro tipos de arena de río como medio de cultivo, observando que el descenso de los individuos hacia el fondo de los cultivos ocurrió en un tiempo promedio de 30 minutos y las distintas tallas de los granos de arena permitieron el desplazamiento de los postparásitos, sin embargo no encontraron diferencias en la capacidad reproductiva de los nematodos adultos en distintos tipos de arena.

Daim *et al.*, (1987) reporta que la producción masiva de nematodos parásitos de larvas de mosquito puede ser afectada por el tamaño de partícula de los medios de cultivo para los postparásitos. Por lo tanto, es importante utilizar medios de cultivo de arena con tamaños de partícula medio entre 1.4 y 2.0 mm o arena sin tamizar para obtener una producción óptima de preparásitos.

3.7 SUSTRATOS ORGÁNICOS

3.7.1 MUSGO

Las Briophytas o musgos, son plantas terrestres de tamaño pequeño que viven en ambientes húmedos y sombríos. En los lugares urbanos, las briofitas son visibles en todo su esplendor durante las temporadas de lluvia formando parches o cojines

de color verde en lugares con sombra y muy diversos, como encima del concreto, en escalones, paredes, pisos, sobre los troncos de los árboles (Mateo, 2011).

Éstos se han usado como material de relleno de colchones y almohadas, para lechos o camillas del hombre y sus animales domésticos, tal vez por su suavidad, textura elástica y gran poder de absorción de líquidos. En varios lugares se han utilizado como material de empaque para ropa y objetos frágiles, para frutos y vegetales o para transportar plantas vivas. Pocos materiales de empaque combinan suavidad, capacidad de retención de humedad y sus propiedades antisépticas (Delgadillo y Cárdenas, 1990).

También es conocida la acción antibiótica de muchas briofitas frente a hongos y bacterias. Se han identificado diversas sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos y de otras que ejercen efectos similares sobre las plántulas de algunas fanerógamas, cuando menos en condiciones experimentales. Este efecto inhibitor se ha denominado alelopatía. Algunos compuestos producidos por las briofitas sirven para impedir o reducir el ataque por insectos fitófagos y otros animales. La presencia de compuestos biológicamente activos tienen un alto significado ecológico para las briofitas y para otros organismos, pues es evidente que el control químico en este nivel trófico puede alterar la estructura y funcionamiento de sus poblaciones (Glime, 2007).

El género *Sphagnum* posee especies con valor comercial, ya que se comercializa la parte viva de la planta, la cual es deshidratada previamente y considerada como un material con gran capacidad de retención de agua, se usa principalmente como sustrato en el cultivo de las orquídeas y todo tipo de plantas con un requerimiento importante de humedad constante, y de un sustrato que sea estéril. Su porosidad le ofrece una capacidad de absorción que puede llegar hasta el 200% de absorción, con lo cual, 5kg de *Sphagnum* seco pueden llegar a retener hasta 100 litros de agua (www.sphagnumshop.com; Larraín, 2009).

En su estado natural, las células del *Sphagnum* atrapan gran cantidad de nutrientes (más de los que necesitan), dejando el agua que las rodea a un nivel de agua destilada apenas sin nutrientes. Atrapan también gran cantidad de agua debido a la particular morfología de sus hojas, ya que presenta poros de 5-20 μm de diámetro en las células hialinas ubicadas en los caulidios y filidios y células fotosintéticas que alternan con células vacías y porosas, estas son las que atrapan el agua, abarcan alrededor del 80% del volumen del musgo (Dominguez y Larraín, 2012).

Su alto contenido en agua acida y falta de oxígeno hace que no se descomponga tan rápidamente como el resto y que prácticamente sea estéril de bacterias y microorganismos, evita en gran medida los parásitos e infecciones y no se pudre. Sus propiedades más destacables son, el permitir mantener adecuadamente la humedad de las raíces de las plantas, reducir el riesgo de enfermedades, conservar de una manera natural los nutrientes del suelo y generar una oxigenación óptima en el mismo. Está compuesto por fibras de hasta 100 mm de musgo deshidratado, posee un porcentaje de materia orgánica entre el 95 y 98%, un pH entre 3.5 y 4.5. Su crecimiento se puede dar a partir de caulidios (tallo), este crecimiento es lento, entre 2.5 a 5.0 mm por año (www.sphagnumshop.com; Larraín, 2007).

3.7.2 FIBRA

Los materiales fibrosos se emplean como componentes de sustratos de cultivo y su tamaño no está bien estandarizado. Sus características dependen de su origen.

El fruto del cocotero (*Cocus nucifera* Linneo) es una drupa fibrosa. La cubierta o cáscara (mesocarpo) en un fruto maduro constituye una masa fibrosa (Zárate, 2007).



El sustrato de fibra de coco se origina del desfibramiento industrial del mesocarpo de las cáscaras de coco, obteniéndose fibras largas, cortas y polvo. Las primeras se utilizan para hacer cuerdas y colchones, entre otros usos; las fracciones restantes, que pueden ser o no tamizadas para separar fibras de longitud media dan lugar al polvo y fibras cortas, éste es el material que se emplea como sustrato estructura granular homogénea (Vargas *et al.*, 2008), con alta porosidad, además posee elevada capacidad de aireación y retención de agua, baja densidad aparente, pH entre 5 y 6 y estructura física altamente estable (Muñoz, 2007).

El agave más comúnmente utilizado en la región de Oaxaca para la extracción de mezcal es *Agave angustifolia* Haw. Dependiendo de la región donde se ubique y del tipo de agave es su utilización, este puede ser usado como leña, preparación de bebidas, uso agrícola y doméstico, forraje, alimentación, construcción, producción de fibras, medicinal, en la industria química y hasta como ornamental (Zárate, 2013).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca), ubicado a 5 km al sur de la ciudad de Oaxaca, en el municipio de Santa Cruz Xoxocotlán. Las coordenadas geográficas son 17° 01' 33" latitud norte, 96° 12' 10" longitud oeste y una altitud de 1545 m (INEGI, 2013), en el laboratorio denominado "Bioplanta de producción masiva de nematodos parásitos de larvas de mosquitos".

Se realizaron cuatro experimentos en el período comprendido de enero a septiembre del año 2014, con cantidades diferentes de nematodos. Los primeros dos experimentos se establecieron para corroborar la reproducción de nematodos en las especies de musgo y determinar la cantidad de nematodos necesarios a sembrar, en los recipientes a utilizar en los siguientes experimentos. Una vez establecida la cantidad de nematodos a sembrar en los medios de cultivo se procedió a realizar el tercer experimento, en éste se utilizaron medios de cultivo con distintas edades para efectuar las inundaciones y finalmente en el cuarto experimento se realizó el seguimiento a medios de cultivo, los cuales se inundaron en repetidas ocasiones.

4.1 Experimento 1.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de *Romanomermis iyengari* en tres sustratos

De la producción de *R. iyengari* que se mantiene constante en la bioplanta se tomaron nematodos adultos inmaduros, los cuales se lavaron haciéndolos pasar a un recipiente con agua destilada limpia con ayuda de un aguja de doble punta, se realizó este procedimiento hasta que el agua destilada se observó limpia, sin partículas de alimento o larvas de mosquito muertas.



Una vez obtenidos los nematodos postparásitos limpios, se observaron individualmente en el estereoscopio para el sexado de 1200 hembras y 1200 machos. La identificación se basó en la observación de la vulva (triángulo transparente que se localiza en la parte media de los organismos) en hembras (♀), caso contrario en machos (♂) ya que estos no presentan vulva.

Los nematodos sexados fueron separados por cada 100 individuos (100 hembras o 100 machos) y colocados en vasos de precipitado con agua destilada para su posterior uso.

El musgo del género *Sphagnum* utilizado fue colectado de la Sierra Norte de Oaxaca (*Sphagnum* Oaxaca), el cual se lavó perfectamente hasta retirar la tierra adherida al mismo, así como restos de otras especies de plantas, para posteriormente solarizarla y esterilizarla en una autoclave Chromalox®, a una presión constante de 1.5 Lb de presión y una temperatura de 121°C durante 15 minutos. Una vez terminada la esterilización, el musgo se mantuvo en bolsas de polietileno debidamente identificadas, para su enfriamiento y evitar su contaminación. La segunda especie de musgo se obtuvo de la compra del producto comercial Premium Grade “Orchid Moss” de la empresa Better-Gro®, esta especie procedente de la República de Chile (*Sphagnum* Orchid Moss®), no se lavó ya que el producto estaba limpio, pero si se esterilizó como se mencionó antes y se depositó en bolsas de polietileno identificadas para su enfriamiento. Finalmente se utilizó la arena que posee la bioplanta para la producción masiva, ésta fue esterilizada e identificada para su enfriamiento, siguiendo el mismo método que se aplicó en las dos especies de musgo.

Se colocó un sustrato estéril (una especie de musgo o arena) en recipientes de plástico, se agregó agua destilada estéril rebasando ligeramente la superficie del sustrato y colocando posteriormente 100 nematodos postparásitos hembras limpios y 100 nematodos postparásitos machos limpios. Transcurridas dos horas



se retiró el agua destilada, decantando los recipientes. Estos recipientes fueron tapados y mantenidos bajo condiciones semicontroladas a $24^{\circ}\text{C} \pm 4$, para llevar a cabo la muda, maduración sexual y reproducción de los nematodos, así, a este procedimiento se le conoce como siembra.

Al cabo de cuatro semanas y un año, los medios de cultivo fueron inundados con 100 mL de agua destilada para provocar la eclosión de preparasíticos o juveniles 2 (J2). Después de dos horas, se colectó el agua en un vaso de precipitado para medir el volumen obtenido denominado inóculo y por el método de dilución volumétrica de Petersen y Willins (1972) se determinó la cantidad de preparasíticos obtenidos en el volumen de inóculo.

Con el número de preparasíticos obtenidos se procedió a realizar infestaciones en larvas de mosquito de la especie *Culex quinquefasciatus* de segundo instar, las cuales fueron obtenidas de la producción que se mantiene en la bioplanta, con una dosis 10:1 (nematodo: larva) y 5:1, por cada medio de cultivo inundado. Transcurridas 24 h después de la infestación con los preparasíticos, las larvas fueron alimentadas por la mañana y por la tarde con alimento para peces previamente molido con agua suavizada y tamizado. Con una pipeta Pasteur de plástico se tomó el alimento y se adicionó a los recipientes con larvas de mosquito (cuidando de no excederse en la cantidad de alimento agregado, ya que esto provocaría la muerte de las larvas) cuidando el nivel de agua, puesto que se debe mantener al mismo nivel del inicio del proceso.

Al cabo de tres días se tomaron 20 larvas por cada medio de cultivo inundado, las cuales fueron colocadas de manera individual en placas de cultivo de tejido, depositando en cada pocillo, primero 2 mL de agua destilada y posteriormente la larva parasitada, manteniendo los mismos cuidados y alimentación antes descritos.

Una vez que los nematodos comenzaron a emerger de las larvas de mosquitos, los pocillos fueron observados bajo el estereoscopio para el conteo de nematodos por larva y determinar porcentajes de parasitismo y medias de infestación.

4.2 Experimento 2.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1g de *Romanomermis iyangari* en tres sustratos

Debido al tiempo que se requiere para sexar los nematodos, se eligió pesarlos, ya que es un procedimiento mucho más rápido; así, de los nematodos postparásitos limpios obtenidos previamente, se pesó 1g para colocarlos en recipientes de plástico con un tipo de sustrato (musgo del género *Sphagnum* Oaxaca, *Sphagnum* Orchid Moss® o arena) previamente estéril y con agua destilada rebasando el nivel del sustrato. Transcurridas dos horas se decantó el agua destilada, para posteriormente tapar perfectamente los recipientes y mantenerlos en condiciones semicontroladas 24°C \pm 4.

Posteriormente, se tomó tres muestras más de 0.25 g de nematodos postparásitos para contar la cantidad de hembras y machos en este peso y estimar a 1 g.

Transcurridas cuatro semanas y un año, se inundaron los medios con 200 mL de agua destilada estéril para provocar la emergencia de preparásitos (J2). Después de dos horas se decantó el agua y se determinó el número de preparásitos por el método de dilución volumétrica, como se describió anteriormente.

Con el inóculo obtenido se procedió a realizar las infestaciones en larvas de mosquito de segundo instar con una dosis de 10:1 (nematodo: larva) y 5:1, manteniéndolas y cuidándolas como ya se mencionó para así determinar porcentajes de parasitismo y medias de infestación.

4.3 Experimento 3.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *Romanermis iyengari* en cinco sustratos durante seis meses

En este experimento se utilizó fibra de agave, fibra de coco y los musgos antes mencionados (el musgo del género *Sphagnum Oaxaca* y el comercial *Sphagnum Orchid Moss®*). La fibra de coco (*Cocus nucifera* Linneo) se obtuvo mediante el desfibramiento de cocos procedentes de la Central de Abastos de Oaxaca, para ello se utilizó la maquina desfibradora del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca. Posteriormente, la fibra se separó del resto del material, se lavó hasta que el agua que se obtuvo del lavado no presentó algún color proveniente del mismo y a continuación se secó para su posterior esterilización.

Las pencas de agave (*Agave angustifolia* Haw) se adquirieron con productores de mezcal de la región de Tlacolula, Oaxaca, éstas fueron colocadas en la máquina desfibradora del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca, la cual retira la pulpa de dichas hojas. Ya que la máquina no elimina toda la pulpa de la fibra, se necesitó que el material resultante se lavara hasta retirar la pulpa, para su posterior secado y esterilización antes descrita.

Del conjunto de nematodos postparásitos inmaduros lavados se separaron grupos de 2g y se colocaron en recipientes de plástico de 20 x 13 x 6 cm, que previamente se les colocó un tipo de sustrato esterilizado hasta la mitad del recipiente y agua destilada rebasando 2 cm del sustrato.

Transcurridas dos horas, los nematodos bajaron y se depositaron en el fondo de los recipientes, momento en el cual se decantaron y se retiró el agua destilada de los medios de cultivo, para posteriormente tapar los cultivos, etiquetándolos y almacenándolos en condiciones semicontroladas de 24°C ±4. El mismo procedimiento se efectuó para cada tipo de sustrato.

Transcurrido el tiempo de cada inundación, es decir la edad de los cultivos (cuatro semanas, seis semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses y seis meses de edad), se colocó agua destilada estéril a los cultivos sembrados para provocar la emergencia de preparasíticos (J2). Después de dos horas se decantó el agua en un vaso de precipitado para medir el volumen obtenido de preparasíticos (inóculo) de cada medio de cultivo por separado y se determinó el número de preparasíticos o rendimiento por el método de dilución volumétrica.

Con el inóculo obtenido se procedió a realizar las infestaciones en 20 larvas de mosquito de segundo instar en una dosis 10:1 y 5:1 (nematodo: larva), manteniéndolas y cuidándolas como ya se mencionó anteriormente, realizando este procedimiento en cada edad antes mencionada.

4.4 Experimento 4.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *Romanermis iyengari* en cinco sustratos durante inundaciones consecutivas

Al experimento de rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *R. iyengari* en cinco sustratos durante seis meses, se le dio seguimiento a 15 medios de cultivo los cuales, realizada la primera inundación, se taparon y se mantuvieron en condiciones semicontroladas $24^{\circ}\text{C} \pm 4$. Transcurridos dos meses se volvieron a inundar los medios como se ha descrito y se realizó el conteo de preparasíticos por el método de dilución volumétrica. Posteriormente, estos medios de cultivo inundados fueron tapados para, transcurridos nuevamente los dos meses, volver a inundar los medios; este el procedimiento se realizó hasta no obtener algún preparasítico de los medios de cultivo.

4.5 Caracterización de sustratos

En la determinación de las propiedades física y química de los sustratos se tomaron en cuenta los siguientes parámetros; densidad aparente, densidad real, espacio poroso total, humedad y capacidad de retención de agua para la caracterización física. En la caracterización química se tomó en cuenta conductividad eléctrica, pH, materia orgánica, carbono total y nitrógeno. Las determinaciones se realizaron de la siguiente forma:

4.5.1 Densidad aparente

La densidad aparente de los materiales se determinó por el peso sólido (masa) que ocupó en una probeta de 0.5 L (por unidad de volumen), incluyendo el espacio poroso de las partículas. La determinación de la densidad aparente de los materiales se basó en la obtención del peso seco del sustrato contenido en un volumen previamente conocido (Ansorena, 1994; López, 2011; Moya, 2013).

4.5.2 Densidad real

La densidad real se calculó siguiendo el método descrito y modificado por Martínez y Urrestarazu (2012) tomado de De Boodt *et al.* (1974), en el que se supone un valor fijo de densidad real para los suelos minerales de 2.65 g cm⁻³ y de 1.45 g cm⁻³ para los sustratos orgánicos. La ecuación matemática utilizada para el cálculo de la densidad real (DR) es la que se muestra a continuación:

$$DR = \frac{100}{\frac{MO}{1.45} + \frac{MM}{2.65}}$$

Donde: DR = densidad real (g cm⁻³), MO = materia orgánica (%), MM = materia mineral (%).

4.5.3 Espacio poroso total

El espacio poroso total (EPT) se calculó a partir de los datos de densidad real y densidad aparente, según la metodología descrita de Martínez y Urrestarazu (2012) y por Noguera *et al.* (2000), mediante la ecuación:

$$EPT = \left(1 - \frac{DA}{DR}\right) 100$$

Donde: EPT = espacio poroso total (%), DA = densidad aparente (g cm^{-3}), DR = densidad real (g cm^{-3}).

4.5.4 Humedad

La humedad se determinó por el método propuesto en la NOM-021-RECNAT-2000, de determinación del contenido de humedad del suelo por gravimetría. El método se basa en la medición de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de suelo (Martínez y Urrestarazu, 2012). Esta masa de agua se referencia de la masa de suelo seco de la muestra. La determinación de la masa de agua se realizó por la diferencia en peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se consideró como suelo seco aquél secado a la estufa a 105°C hasta obtener un peso constante. Con los datos obtenidos en el procedimiento se aplicó la siguiente ecuación:

$$\theta_g = \frac{(P_B + P_{sh}) - (P_B + P_{ss})}{(P_B + P_{ss}) - P_B} \times 100$$

Donde:

θ_g = contenido de humedad gravimétrica (%).

PB = peso del bote con tapa (g).

Psh = peso de suelo húmedo (g).

PB+ Psh = peso del bote más peso del suelo húmedo (g).

PB + Pss = peso del bote más peso del suelo seco (g).

4.5.5 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA), se determinó según la modificación de la metodología de De Boodt *et al.* (1974), propuesta por Martínez (1992) y Martínez y Urrestarazu (2012). Consiste en una desecación del sustrato a 105° C durante 24 h, una vez aplicada la tensión a 10 cm de columna de agua. Para esto se utilizó la masa de la anilla de 4 cm lleno de sustrato después de ser sometido a succión en 10 cm de columna de agua, así como la masa de este mismo sustrato tras desecación a la estufa y el volumen de la anilla. Para esto se utilizó la siguiente ecuación, expresado en mL de agua por L de sustrato:

$$CRA = \left(\frac{B - C}{V} \right) 100$$

Donde: CRA = mL L⁻¹, B = peso de la anilla con sustrato húmedo, C = peso del sustrato seco en estufa a 105°C, hasta peso constante, V = volumen de la anilla.

4.5.6 Conductividad eléctrica y pH

La determinación de pH y la conductividad eléctrica, de las muestras fueron determinados en extractos de pasta de saturación en una relación peso/volumen (1:10), éstos se determinaron con un potenciómetro marca Orion modelo 710 A (Warncke, 1986; López, 2011; Moya, 2013).

4.5.7 Materia orgánica y ceniza

Para la obtención del contenido de cenizas y materia orgánica se siguió la metodología propuesta por Martínez (1992) y Martínez y Urrestarazu (2012). Para ello se pesó en crisol de porcelana 5.0 g de cada sustrato y se calcinó en horno mufla Herauss, modelo A-114 a 550 °C, para después ser enfriado en desecador y



pesado en báscula analítica con dos centésimas de precisión del gramo. La materia mineral de cada sustrato se expresó como porcentaje de residuo seco referido a la masa seca inicial, la materia orgánica total se calculó como porcentaje de pérdida de masa referida a la masa seca inicial (López, 2011; Moya, 2013).

4.5.8 Carbono total

La determinación de la materia y carbono orgánico se realizó utilizando el método de Tyurin (Martínez y Urrestarazu, 2012).

4.5.9 Nitrógeno

Para la determinación de nitrógeno total se siguió la metodología del método semimicro-kjeldahl modificado para incluir nitratos de análisis en tejidos vegetales (Bremmer, 1965; Martínez *et al.*, 2009; López, 2011; Martínez y Urrestarazu, 2012, Moya, 2013).

4.5.10 Relación C/N

La relación C/N fue calculada con base en los análisis anteriores de carbono y nitrógeno total. Los resultados obtenidos se reportaron en base seca (López, 2011; Moya, 2013).

4.6 Diseño experimental y análisis estadístico

4.6.1 Experimento 1.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de *Romanomermis iyangari* en tres sustratos

Cada medio de cultivo con un tipo de sustrato y los nematodos sembrados constituyó la unidad experimental. Los primeros dos experimentos se establecieron bajo un diseño experimental completamente aleatorio. En el

experimento de rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de *R. iyengari* en tres sustratos, debido a la disponibilidad de nematodos, se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento (tipo de sustrato), de las cuales dos repeticiones se inundaron a las cuatro semanas de edad y las otras dos se inundaron al año de edad (Cuadro 1), contando con un total de 12 unidades experimentales.

Cuadro 1. Diseño del experimento 1, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de *Romanomermis iyengari* en tres sustratos.

SUSTRATOS	INUNDACIONES	REPETICIONES	UNIDADES EXPERIMENTALES
T1. ARENA (TESTIGO)	2	4	4
T2. <i>Sphagnum Oaxaca</i>	2	4	4
T3. <i>Sphagnum Orchid Moss</i> ®	2	4	4
TOTAL DE UNIDADES EXPERIMENTALES			12

Se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas en los datos de rendimiento por cultivo. Cuando los datos no cumplían con estos supuestos, se realizaron transformaciones a los datos de rendimiento, usando el cuadrado del logaritmo natural (SQRT (log)), logaritmo base 10 (Log 10) o dividiendo entre 100 y raíz cuadrada ($\sqrt{100}$). Posteriormente se les realizó análisis de varianza (ANOVA) con separación de medias (Tukey, 0.05).

Así, se demostró la normalidad de los datos, bajo las pruebas de normalidad que obtuvieron significancias superiores al 0.05 (Shapiro-Wilk 0.11, Kolmogorov-Sairnov 0.15, Cramer-von Mises 0.24, Anderson –darling 0.17), con un valor de media = 14,942 y mediana =16,625 muy similares.

4.6.2 Experimento 2.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1 g de *Romanermis iyengari* en tres sustratos

En el segundo experimento de rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1 g de *R. iyengari* en tres sustratos, debido a la cantidad de nematodos disponibles se realizaron seis repeticiones para la arena y *Sphagnum* Orchid Moss® y dos repeticiones para *Sphagnum* Oaxaca, de los cuales tres repeticiones de *Sphagnum* Orchid Moss® y arena junto con una repetición de *Sphagnum* Oaxaca se utilizó para inundarlos a las cuatro semanas de edad y el resto de las repeticiones de cada tipo de sustrato se inundaron al año de edad (Cuadro 2), teniendo un total de 14 unidades experimentales.

Cuadro 2. Diseño del experimento 2, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1g de *Romanermis iyengari* en tres sustratos.

SUSTRATOS	INUNDACIONES	REPETICIONES	UNIDADES EXPERIMENTALES
T1. ARENA (TESTIGO)	2	6	6
T2. <i>Sphagnum</i> Oaxaca	2	2	2
T3. <i>Sphagnum</i> Orchid Moss®	2	6	6
TOTAL DE UNIDADES EXPERIMENTALES			14

Al igual que en el experimento anterior, los datos de rendimiento por cultivo fueron analizados para comprobar los supuestos de normalidad y homogeneidad. Cuando los datos no cumplían con estos supuestos, se realizaron transformaciones a los datos de rendimiento, usando el cuadrado del logaritmo natural (SQRT (log)), logaritmo base 10 (Log 10) o dividiendo entre 100 y raíz cuadrada ($\sqrt{100}$). Posteriormente se analizaron con un ANOVA separando las medias con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Considerando un nivel de significancia del 5%, todas las pruebas demostraron que los datos presentan una distribución normal, ya que para la prueba de Shapiro-Wilk se obtuvo un valor de $p = 0.29$, Kolmogorov-Smirnov $p = 0.15$, Cramer-von Mises $p = 0.25$ y para Anderson-Darling una $p = 0.25$, superando el valor de 0.05.

Para la comprobación de homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba de Bartlett, se obtuvo un valor de $p = 0.17$, siendo esta significativa.

4.6.3 Experimento 3.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *Romanomermis iyengari* en cinco sustratos durante seis meses

En el caso del tercer experimento de rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *R. iyengari* en cinco sustratos durante 6 meses, el diseño experimental aplicado fue completamente aleatorio desbalanceado con arreglo factorial (5 x 7, sustratos x edad del cultivo). Los sustratos evaluados fueron arena, *Sphagnum* Orchid Moss®, *Sphagnum* Oaxaca, fibra de coco y fibra de agave y la edad del cultivo: de 4 semanas a 6 meses (correspondiente a siete edades), obteniendo un total de 35 tratamientos.

Los tratamientos con *Sphagnum* Orchid Moss®, *Sphagnum* Oaxaca, fibra de coco y fibra de agave contaron con tres repeticiones por cada edad de los cultivos; sin embargo, el tratamiento testigo que es la arena en las primeras edades contó con tres repeticiones y las subsecuentes edades disminuyeron las repeticiones, debido a la cantidad de nematodos disponibles, teniendo así un total de 97 unidades experimentales (Cuadro 3).

Para poder realizar el análisis de los datos, primeramente se comprobó que estos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, para lo cual, a la variable correspondiente al número de preparásitos (o rendimiento) se le realizaron varias transformaciones a los datos de rendimiento, usando el cuadrado del logaritmo natural (SQRT (log)), logaritmo base 10 (Log 10) o

dividendo entre 100 y raíz cuadrada ($\sqrt{100}$)., hasta comprobar con las pruebas de Shapiro- Wilk, Kolmorov- Smirnov, Cramer-von-Mises, Andreson-Darling y Barlett dichos supuestos. Una vez comprobada la normalidad de los datos, estos fueron analizados bajo un ANOVA y una prueba de separación de medias Tukey (0.05).

Así, la normalidad de los datos se comprobó transformando los datos con el $\sqrt{\log(x)}$ (raíz cuadrada del logaritmo natural), con lo cual se obtuvo un coeficiente de variación mucho menor correspondiente a 3.43%, un valor de media 3.29, mediana 3.40 y moda 3.29. Debido a que las pruebas anteriores generaron valores significativos ($p = 0.0001$) se utilizó esta transformación porque homogeniza las medidas de tendencia central de los datos.

Cuadro 3. Diseño del experimento 3, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *Romanormis iyengari* en cinco sustratos.

SUSTRATOS	EDAD	REPETICIONES	UNIDADES EXPERIMENTALES
T1. ARENA (TESTIGO)	4 semanas	3	3
	6 semanas	2	2
	8 semanas	2	2
	12 semanas	2	2
	16 semanas	2	2
	20 semanas	1	1
	24 semanas	1	1
T2. <i>Sphagnum Oaxaca</i>	4 semanas	3	3
	6 semanas	3	3
	8 semanas	3	3
	12 semanas	3	3
	16 semanas	3	3
	20 semanas	3	3
	24 semanas	3	3
T3. <i>Sphagnum Orchid Moss</i>®	4 semanas	3	3
	6 semanas	3	3
	8 semanas	3	3
	12 semanas	3	3
	16 semanas	3	3
	20 semanas	3	3
	24 semanas	3	3
T4. FIBRA DE AGAVE	4 semanas	3	3
	6 semanas	3	3
	8 semanas	3	3
	12 semanas	3	3
	16 semanas	3	3
	20 semanas	3	3
	24 semanas	3	3
T5. FIBRA DE COCO	4 semanas	3	3
	6 semanas	3	3
	8 semanas	3	3
	12 semanas	3	3
	16 semanas	3	3
	20 semanas	3	3
	24 semanas	3	3
TOTAL DE UNIDADES EXPERIMENTALES			97

4.6.4 Experimento 4.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *Romanomermis iyengari* en cinco sustratos durante inundaciones consecutivas

Este experimento se estableció bajo un diseño experimental simple aleatorio con repeticiones homogéneas (balanceado) y arreglo factorial (5 x 4, sustratos x inundaciones). Se evaluaron los mismos factores (sustratos e inundación); sin embargo, la diferencia radica en que se les dio seguimiento a 15 unidades experimentales (medios de cultivo) los cuales fueron inundados en cuatro ocasiones, obteniendo un total de 20 tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño del experimento 4, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *Romanomermis iyengari* en cinco sustratos durante inundaciones consecutivas.

SUSTRATOS	INUNDACIONES	REPETICIONES	UNIDADES EXPERIMENTALES
T1. ARENA (TESTIGO)	4	3	3
T2. <i>Sphagnum Oaxaca</i>	4	3	3
T4. FIBRA DE AGAVE	4	3	3
T5. FIBRA DE COCO	4	3	3
TOTAL DE UNIDADES EXPERIMENTALES			15

Al igual que el experimento anterior, a los datos de rendimiento se le realizaron las mismas pruebas de normalidad y homogeneidad. Cuando los datos no cumplían con estos supuestos, se realizaron transformaciones a los datos de rendimiento, usando el cuadrado del logaritmo natural (SQRT (log)), logaritmo base 10 (Log 10) o dividiendo entre 100 y raíz cuadrada ($\sqrt{100}$). También se realizaron ANOVA y la prueba de separación de medias Tukey (0.05).

Es así que, la distribución normal de los datos se demostró, con la transformación de los datos mediante la $\sqrt{\log(x)}$ (raíz cuadrada del logaritmo natural), obteniendo así un coeficiente de variación bajo correspondiente al 4.03%, los valores para la media, mediana y moda fueron 3.18, 3.33 y 2.41 respectivamente, ya que estos valores fueron significativos ($p = 0.0001$), se eligió esta transformación, ya que homogeniza estas medidas de tendencia central.

4.6.5 Caracterización de sustratos

A los valores obtenidos en cada propiedad física y química de la caracterización, se les realizó una comparación de medias con una prueba de Tukey (alfa = 0.05), para determinar si existen diferencias significativas en los tratamientos (sustratos), así como los mayores valores. Todos los ANOVAS fueron solucionados en el Statistical Analysis System (SAS, 2004).

Existen valores obtenidos en la caracterización que se expresan en porcentajes, por lo cual son transformados aplicando la función arcoseno, para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad, sin embargo, los resultados de las pruebas de separación de medias se presentan en las unidades en las que fueron obtenidas (%) para su mejor comprensión, el resto de las unidades que no se expresan en porcentajes, no fueron transformadas.

Mediante un análisis cluster en el programa Statical Analysis System (SAS, 2004), se integraron los datos del experimento tres “rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *Romanormis iyengari* en cinco sustratos durante 6 meses” y la caracterización. Se establecieron grupos de tratamientos con características similares y que estos a su vez ayudaran a visualizar que propiedades de la caracterización tanto física como química son las que comparten los grupos formados y que determinen los mayores rendimientos.

También se realizó un análisis de componentes principales usando el programa Statical Analysis System (SAS, 2004), para reducir las variables analizadas y poder identificar aquellas involucradas en la obtención de mayores rendimientos mediante una matriz de correlación de Pearson.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la identificación taxonómica de los sustratos evaluados fueron los siguientes: las especies de musgo fueron determinadas hasta género, correspondiente a *Sphagnum* sp. diferenciando las dos especies por la procedencia, uno comercial (República de Chile, *Sphagnum* Orchid Moss®) y el segundo regional (Oaxaca, Sierra Norte, Región de los Mixes) *Sphagnum* Oaxaca; en el caso del coco, la especie utilizada correspondió a *Cocus nucifera* Linneo y la especie de agave fue identificada como *Agave angustifolia* Haw.

En la figura 2, se muestra el registro de temperaturas cada 15 minutos con un Data Logger HOBO U12-012 durante ocho meses (que comprendió el desarrollo de los experimentos), observando que estos datos alcanzaron un valor máximo de 35.4°C, un valor mínimo de 14.75°C y un valor medio de 24.01°C.

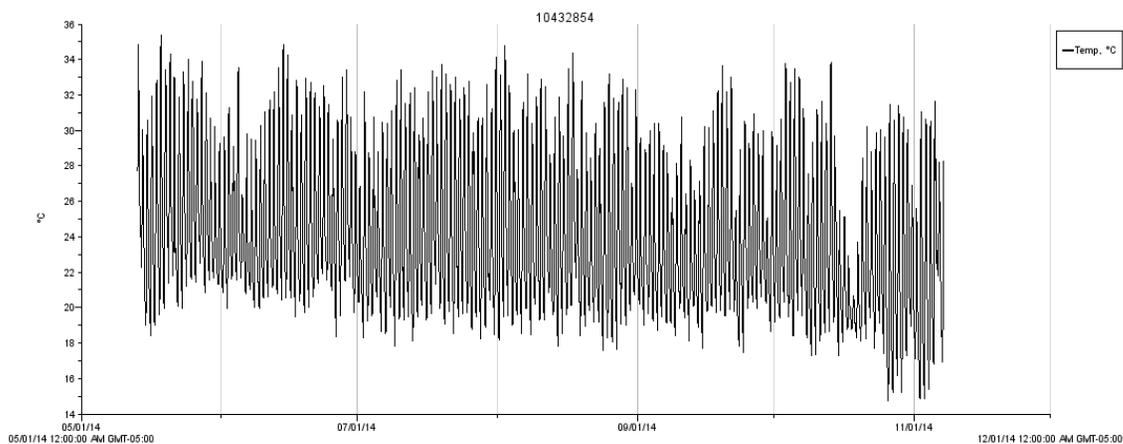


Figura 2. Temperaturas registradas cada 15 minutos con un Data Logger HOBO U12-012 durante 8 meses.

La humedad relativa fue registrada con un Data Logger HOBO U12-012 cada 15 minutos durante ocho meses y graficada en la figura 3, mostrando una humedad relativa promedio de 58.74%, con un rango de entre 89.72% como valor máximo y 21.69% como menor valor de humedad relativa.

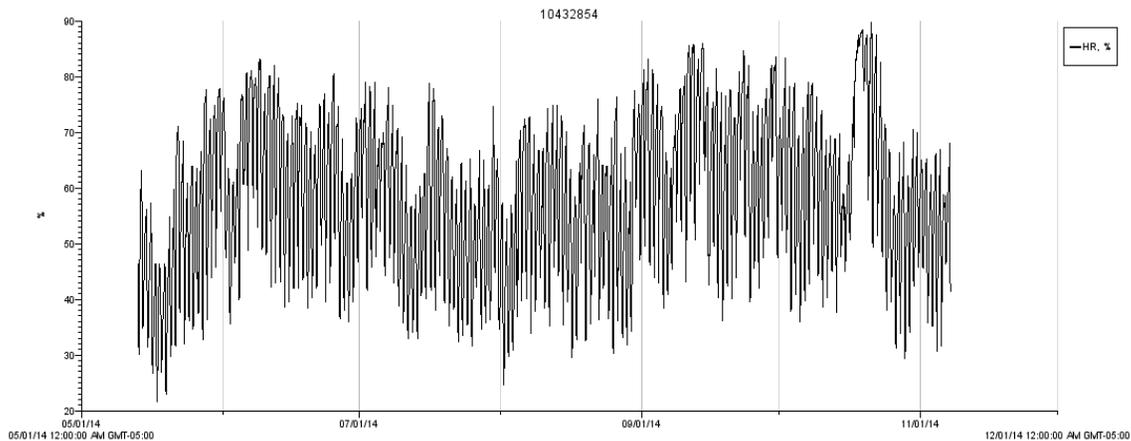


Figura 3. Humedad relativa registrada cada 15 minutos con una Data Logger HOBO U12-012 durante 8 meses.

5.1 Experimento 1.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 100 ♀ y 100 ♂ de *Romanormis iyengari* en tres sustratos

Una vez establecidos los medios de cultivo con los respectivos tratamientos y repeticiones y transcurridas cuatro semanas, se procedió a inundar con agua destilada los medios de cultivo para provocar la emergencia de los preparasíticos. Se obtuvo un volumen total de inóculo de 50 mL por cada unidad experimental.

En este experimento se observa que todos los tratamientos fueron significativamente diferentes ($p = 0.0001$) y que el mayor rendimiento se obtuvo del cultivo con arena (25,375 preparasíticos), con una menor variabilidad (± 375), seguido del sustrato *Sphagnum* Oaxaca con un rendimiento promedio de 16,625 con mayor variabilidad ($\pm 4,800$) y el menor rendimiento se obtuvo de *Sphagnum* Orchid Moss® con 2,825 preparasíticos con una variabilidad del $\pm 1,675$ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Rendimiento promedio de nematodos preparasíticos en medios de cultivo con 100 ♀ y 100 ♂ de *Romanermis iyengari* en tres tipos de sustratos distintos.

Sustrato	Preparasíticos
T1. Arena (testigo)	25,375 a ± 375
T2. <i>Sphagnum</i> Orchid Moss®	2,825 c ± 1,675
T3. <i>Sphagnum</i> Oaxaca	16,625 b ± 4,800

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). La media es acompañada de ± la desviación estándar.

Según Gajanana (1978) cada hembra de *R. iyengari* llega a ovipositar un promedio de 2,000 huevos y tomando en cuenta que se utilizaron 100 hembras en este experimento, se esperaría un rendimiento de 200,000 preparasíticos por medio de cultivo; se obtuvo así un 12.68% (porcentajes de rendimiento promedio) en arena, seguido del 8.31% con el musgo *Sphagnum* Oaxaca y un 1.41% con *Sphagnum* Orchid Moss®; sin embargo, estos datos no pueden compararse, ya que la oviposición estimada por Gajanana (1978) se realizó bajo condiciones distintas a las evaluadas en el presente estudio, por lo se necesitan realizar más estudios para determinar el efecto de diferentes factores que afectan la fecundidad de las hembras en los distintos tipos de sustrato.

En ambas especies de musgo se obtuvieron preparasíticos y todos los rendimientos promedios obtenidos en los tres sustratos, superaron los valores reportados por Daim *et al.*, (1987) en medios de cultivo con arena a las ocho semanas de edad.

Cabe mencionar que los rendimientos antes mencionados se obtuvieron con una proporción 1:1, es decir 50% de ♀ y 50 % ♂, con cuatro semanas de edad. En el caso de los rendimientos de los medios de cultivos con un año de edad no se reportan rendimientos ya que no se encontraron preparasíticos, ni huevos, en ningún tipo de sustrato.

A través de las pruebas de parasitismo, se comprobó que los individuos no se vieron afectados por el tipo de sustrato, ya que se registraron altos Porcentajes de Parasitismo entre 97.5-100%, similares a los reportados por Pérez *et al.* (2004), correspondientes a un rango entre 80.8-91.7% de parasitismo de *R. iyengari* sobre larvas de tercer y cuarto instar de *Culex quinquefasciatus*. Las medias de infestación se encuentran entre 3.8 y 10.3 (nematodos por larva).

Cuadro 6. Porcentajes de parasitismo y medias de infestación de nematodos obtenidos de cultivos de nematodos con 100 ♀ y 100 ♂ de *Romanomermis iyengari* en tres sustratos.

Sustrato	Parasitismo (%)	Media de infestación
T1. Arena (testigo)	100	10.3
T2. <i>Sphagnum</i> Orchid Moss®	83.3	4.71
T3. <i>Sphagnum</i> Oaxaca	97.5	3.8

5.2 Experimento 2.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1g de *Romanomermis iyengari* en tres sustratos

En el segundo experimento, en el que se pesaron los nematodos, se tomó una muestra de 0.25 g para cuantificar el número de individuos y estimar la cantidad de ♀'s y ♂'s en un gramo. Se obtuvo una relación de 36 % de ♀'s y 64 % de ♂'s, contabilizando un total de 4,096 individuos de los cuales 1,475 fueron ♀'s y 2,621 ♂'s.

En los datos de rendimientos de medios de cultivo depositando 1g de *R. iyengari* en tres tipos de sustratos, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.0001$) entre los tratamientos. El sustrato arena (testigo) obtuvo el mayor rendimiento promedio (237,750 preparasíticos con una variabilidad de $\pm 130,790$), seguido de *Sphagnum* Orchid Moss® (200,000 preparasíticos con una variación de $\pm 39,942$) y *Sphagnum* Oaxaca que obtuvo el menor rendimiento (16,500 preparasíticos, variación= ± 0). El menor rendimiento promedio de preparasíticos

en *Sphagnum* Oaxaca, se debe al diseño estadístico, ya que el número de repeticiones en dicho experimento es desbalanceada, teniendo *Sphagnum* Orchid Moss® mayor número de repeticiones que *Sphagnum* Oaxaca, esto se realizó únicamente para poder comprobar la reproducción de nematodos en *Sphagnum* Orchid Moss®, dándole prioridad a dicho sustrato; sin embargo, en ambos tipos de musgo y arena, se logra obtener preparasíticos al mes de la inundación (Cuadro 7).

Cuadro 7. Rendimiento promedio de medios de cultivo con 1g de nematodos de *Romanomermis iyengari* en tres tipos de sustratos.

Sustrato	Preparasíticos		
T1. Arena (testigo)	237,750	a	± 130,790
T2. <i>Sphagnum</i> Orchid Moss®	200,000	ab	± 39,942
T3. <i>Sphagnum</i> Oaxaca	16,500	b	± 0

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). La media es acompañada de ± la desviación estándar.

Con la cantidad de hembras estimadas (1,475), y la cantidad promedio de oviposición de hembras de esta especie, se pudo estimar que se obtendría un rendimiento de 2,950,000 preparasíticos; sin embargo, se obtuvo de un medio de cultivo con arena 343,500 preparasíticos que correspondió a un 11.62% respecto a lo esperado. Los porcentajes promedios obtenidos de cada tipo de sustrato fueron: en arena el 8.05%, seguido de *Sphagnum* Orchid Moss® con un promedio de 6.77% y finalmente *Sphagnum* Oaxaca que presentó un rendimiento muy bajo de 0.55 %. Sin embargo, estos datos, al igual que los datos del experimento anterior no pueden compararse, por lo antes mencionado.

Una vez obtenidos los preparasíticos de los diferentes medios de cultivo, se establecieron bioensayos para determinar la capacidad infectiva de los preparasíticos procedentes de cada tipo de sustrato y se infestaron en larvas de mosquito. Se registraron altos porcentajes de parasitismo entre 91.9% y 96.6%, indicando que los sustratos usados como medios de cultivo no afectan la

capacidad parasítica de los preparasíticos procedentes de estos cultivos (cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentajes de parasitismo y medias de infestación del experimento 2, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 1g de *Romanomermis iyengari* en tres sustratos.

Sustrato	Parasitismo %	Media de infestación
T1. Arena (testigo)	93.4	10.3
T2. <i>Sphagnum</i> Orchid Moss®	91.9	4.71
T3. <i>Sphagnum</i> Oaxaca	96.6	3.8

Los porcentajes de parasitismo obtenidos son superiores a los reportados por Pérez *et al.* (2004) entre 80.8-91.7 % de parasitismo de *R. iyengari* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* de tercer y cuarto instar.

5.3 Experimento 3.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *Romanomermis iyengari* en cinco sustratos durante 6 meses

Se estimó la cantidad de individuos en 2g, obteniendo un total de 5,322 nematodos, con una relación del 71.40% de ♂ y 28.60% (1, 522) de ♀.

En los datos normalizados, el análisis de varianza indica que existe una diferencia estadística significativa entre los sustratos ($p = 0.0001$), tiempo de inundación ($p = 0.0001$) y la interacción de ambos factores ($p = 0.0001$) con un C.V. = 19.67%.

Con una significancia del 5% se observan diferencias ($p=0.0001$) entre el tipo de sustrato; indicando que entre la arena que presenta el mayor rendimiento promedio (181,500 preparasíticos y una variabilidad de $\pm 150,146$), fibra de agave (98,620 preparasíticos y una variabilidad de $\pm 156,080$) y *Sphagnum* Orchid Moss® (108,244 preparasíticos y $\pm 107,297$ de variabilidad) no existe diferencia significativa, es decir presentan un rendimiento de nematodos similar entre ellos.

Los tratamientos de *Sphagnum Oaxaca* (98,620 preparasíticos con la mayor variabilidad $\pm 203,047$) y fibra de coco (93,064 preparasíticos con la menor variabilidad observada $\pm 83,090$) estadísticamente no mostraron diferencias significativas ($p=0.0001$) entre ellos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Rendimiento promedio de medios de cultivo con 2g de nematodos *R. iyengari* en cinco tipos de sustratos durante 6 meses.

Sustrato	Preparasíticos	
S1. Fibra de coco	93,064	b \pm 83,090
S2. Fibra de agave	98,620	ab \pm 156,080
S3. <i>Sphagnum Oaxaca</i>	93,491	b \pm 203,047
S4. <i>Sphagnum Orchid Moss</i>®	108,244	ab \pm 107,297
S5. Arena (testigo)	181,500	a \pm 150,146

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). La media es acompañada de \pm la desviación estándar.

Con respecto al factor edad de los cultivos o tiempo de inundación (Cuadro 10), no se observaron diferencias significativas ($p = 0.0001$) en los resultados obtenidos entre las primeras tres edades de los cultivo (4, 6 y 8 semanas), que correspondieron a un promedio de rendimiento de los cinco sustratos de 261,082 a las cuatro semanas (variación de $\pm 156,684$); 212,872 con seis semanas (con una variación de $\pm 157,062$) y 20,3262 con ocho semanas (variación de $\pm 150,783$). El rendimiento promedio de los cinco sustratos en las últimas cuatro inundaciones (12-24 semanas) varió significativamente respecto a las primeras tres antes mencionadas. Sin embargo, los rendimientos promedio obtenidos de las últimas cuatro edades, no mostraron diferencias significativas ($p= 0.0001$) entre ellas, con rendimientos promedios de 82,330 preparasíticos (variación de $\pm 109,904$) a las 12 semanas; con 16 semanas se obtuvo un rendimiento promedio de 33,098 preparasíticos (variación de $\pm 44,978$); 11,111 preparasíticos fueron obtenidos con medios de cultivo con 20 semanas de edad (variación de $\pm 13,975$) y finalmente 1,133 preparasíticos promedio se obtuvieron en medios de cultivo con 24 semanas de edad ($\pm 2,317$), por lo anterior se infiere que los rendimientos de los medios de cultivo van disminuyendo con el tiempo.

Cuadro 10. Prueba de rangos múltiples de Tukey $\alpha=0.05$ de confiabilidad en el en el experimento 3, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *Romanermis iyengari* en cinco sustratos durante 6 meses.

Edad de medios de cultivo	Rendimiento	
E1. 4 semanas	261,082	a \pm 156,684
E2. 6 semanas	212,872	a \pm 157,062
E3. 8 semanas	203,262	a \pm 150,783
E4. 12 semanas	82,330	b \pm 109,904
E5. 16 semanas	33,098	b \pm 44,978
E6. 20 semanas	11,111	b \pm 13,975
E7. 24 semanas	1,133	b \pm 2,317

Medias con distinta letra en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). La media es acompañada de \pm la desviación estándar.

De forma general, este comportamiento se corroboró graficando los datos de rendimientos en las distintas inundaciones como se observa en las figuras 4 y 5. Así mismo, se confirmó lo publicado por Cupello *et al.*, (1982) y por Petersen y Willis (1972) quienes reportan que las eclosiones superiores se producen en la primera inundación (cuatro semanas de edad). En el presente trabajo se observa este comportamiento en los sustratos de: fibra de agave, fibra de coco y arena. En el caso de los musgos, *Sphagnum* Oaxaca obtiene el mayor rendimiento a las seis semanas de edad y en *Sphagnum* Orchid Moss® el mayor rendimiento se obtiene a las ocho semanas.

Los rendimientos promedio por edad (inundación), mostraron que el mayor valor se obtuvo de medios de cultivo con fibra de agave con cuatro semanas de edad correspondiente a 436,100 preparasíticos, superando el máximo valor promedio obtenido por la arena (382,827 preparasíticos) con la misma edad (figura 4).

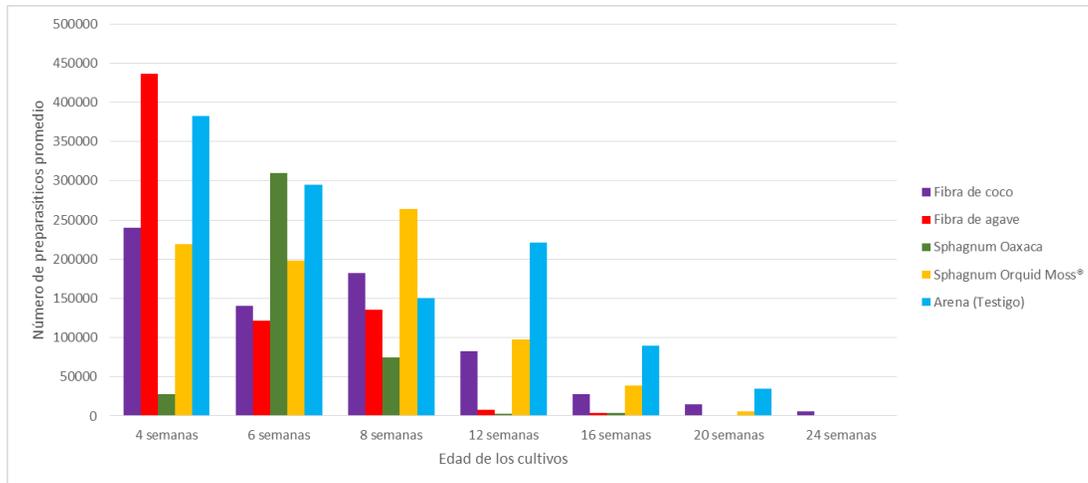


Figura 4. Rendimiento de cultivos de *Romanomermis iyengari* de cinco sustratos con diferentes edades.

Santamarina y Bellini (2000) reportaron un alto rendimiento con un valor de 250,000 preparasíticos como promedio en arena a las seis semanas de edad. Los autores consideraron esta edad como única inundación; sin embargo, en el presente trabajo este valor es superado a las cuatro semanas con el sustrato de fibra de agave y arena, a las seis semanas por los cultivos con sustrato *Sphagnum* Oaxaca y nuevamente arena y a las ocho semanas por *Sphagnum* Orchid Moss® (Figuras 4 y 5).

A las 4 semanas de edad, el mayor rendimiento se obtiene de medios de cultivo con fibra de agave con 436,100 preparasíticos, que supera el rendimiento de medios de cultivo con arena (382,827 preparasíticos), fibra de coco (239,850 preparasíticos) y *Sphagnum* Orchid Moss® (218,867 preparasíticos). El menor rendimiento se obtiene de *Sphagnum* Oaxaca con 27,767 preparasíticos (figura 5).

Con seis semanas de edad, *Sphagnum* Oaxaca obtiene el mayor rendimiento correspondiente a 309, 433 preparasíticos, superando el rendimiento alcanzado por la arena de 294,975 preparasíticos, un rendimiento de 198,317 preparasíticos se obtuvo de *Sphagnum* Orchid Moss®, seguido de la fibra de coco con 140,533

preparasíticos y finalmente el menor rendimiento correspondiente a 121,200 se obtuvo con la fibra de agave.

Para medios de cultivo con ocho semanas de edad, se observó un alto rendimiento promedio con *Sphagnum* Orchid Moss® correspondiente a 264,417 preparasíticos y fibra de coco con 181,927 preparasíticos, ambos sustratos superaron los rendimientos promedios obtenidos por la arena (150,825), la fibra de agave obtuvo 135,533 preparasíticos y el menor rendimiento lo registró *Sphagnum* Oaxaca con 74,417 preparasíticos (figura 5).

Con una edad de 12 semanas, el máximo rendimiento promedio obtenido fue con arena (220,800 preparasíticos), seguido de *Sphagnum* Orchid Moss® (97,217), fibra de coco (82,217), fibra de agave (8,100) y nuevamente *Sphagnum* Oaxaca obtuvo el menor rendimiento (3,317).

Al igual que la edad anterior, para medios de cultivo con 16 semanas de edad, nuevamente la arena obtuvo el mayor rendimiento promedio (89,975 preparasíticos), seguido de *Sphagnum* Orchid Moss® con un rendimiento de 38,833 preparasíticos, la fibra de coco alcanzó un rendimiento de 28,317 preparasíticos, *Sphagnum* Oaxaca 4,433 preparasíticos y el menor rendimiento se registró con la fibra de agave (3,883).

A las 20 semanas sólo se obtuvieron preparasíticos de medios de cultivo con arena (máximo rendimiento 35,000 preparasíticos), fibra de coco (14,445), *Sphagnum* Orchid Moss® (6,111) y *Sphagnum* Oaxaca (500).

La última edad, 24 semanas, sólo registró rendimientos en fibra de coco (máximo rendimiento 5,555 preparasíticos), fibra de agave (56) y *Sphagnum* Oaxaca (56). Así, las fibras fueron las que extendieron la edad de los medios de cultivo, reportando rendimientos hasta las 24 semanas de edad.

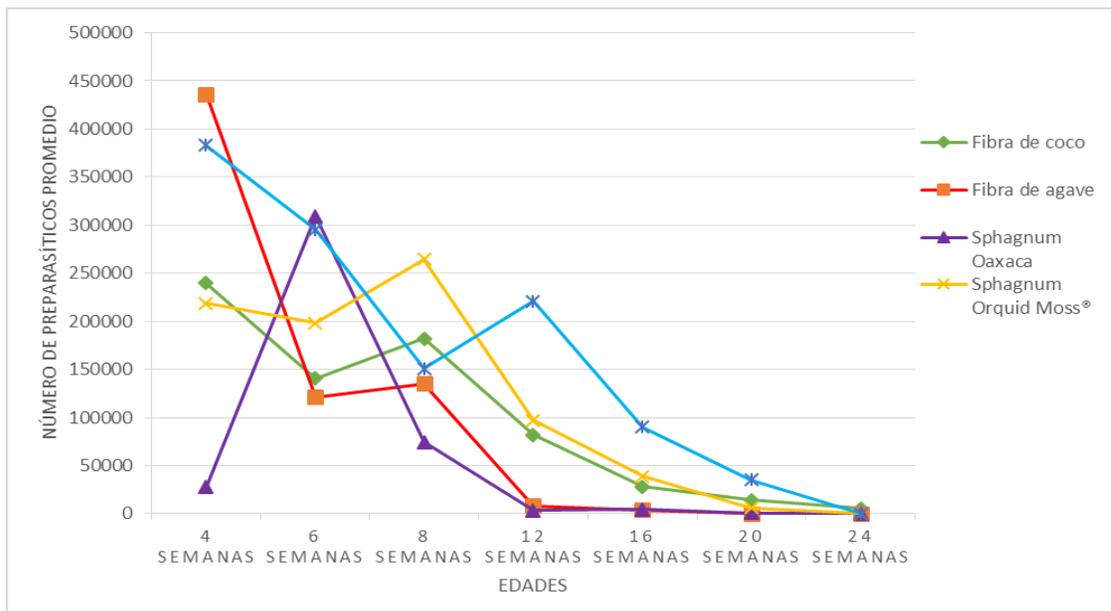


Figura 5. Comportamiento del rendimiento de cinco sustratos utilizados como cultivos de *R. iyengari* a lo largo de seis meses.

En el caso de los rendimientos totales acumulados durante las siete inundaciones realizadas a lo largo de seis meses por cada tipo de sustrato (figura 6), mostraron que el tratamiento con la arena presentó el valor más alto (2,696,630 preparasíticos), seguido de *Sphagnum* Orquid Moss® (2,471,434 preparasíticos), fibra de agave (2,114,150 preparasíticos), fibra de coco (2,061,864 preparasíticos) y finalmente *Sphagnum* Oaxaca (1,258,100 preparasíticos).

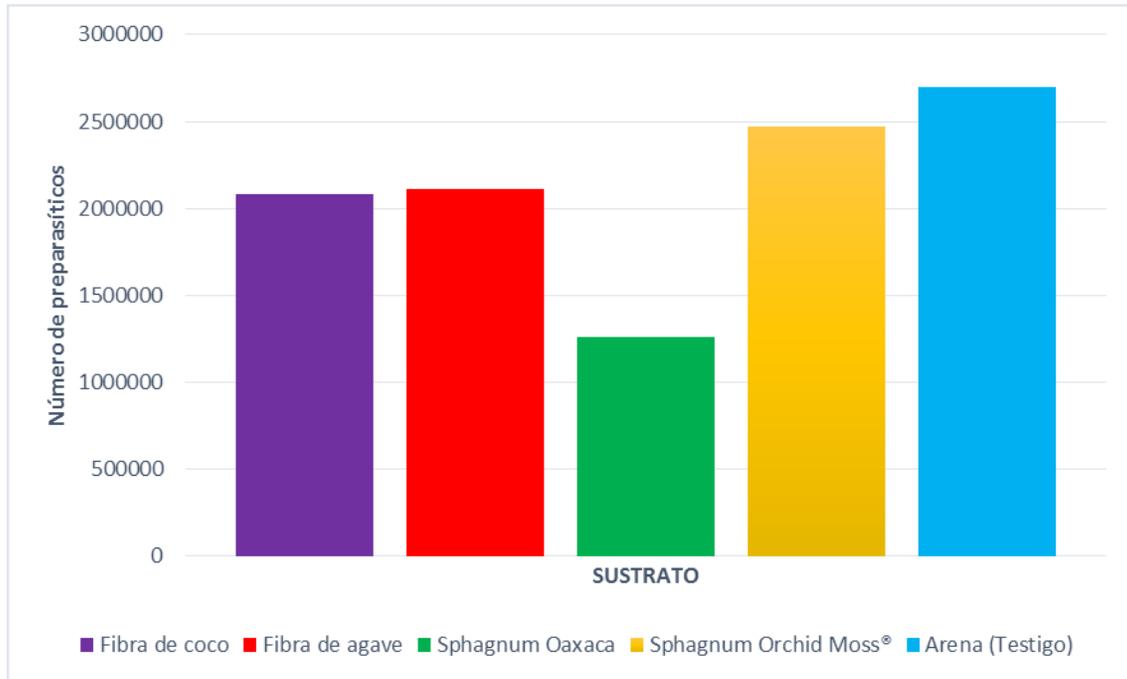


Figura 6. Rendimientos totales de cultivos de *R. iyengari* para cada tipo de sustrato.

De un medio de cultivo con *Sphagnum Oaxaca* se obtuvo un rendimiento de 688,300 preparasíticos con cuatro y seis semanas de edad, superando el máximo rendimiento obtenido en el tratamiento con arena (382,826 preparasíticos) a las 4 semanas y a los rendimientos obtenidos por Daim *et al.* (1987) en medios de cultivo con arena de 2 mm.

Los preparasíticos obtenidos de los medios de cultivo con una edad de hasta 20 semanas presentaron buen movimiento, y búsqueda de su hospedero por lo que el parasitismo en larvas de segundo instar de *Culex quinquefasciatus* no se vio afectado por los sustratos, así mismo se obtuvieron adultos postparásitos de los cinco tipos de sustratos evaluados, sin embargo preparasíticos obtenidos a las 24 semanas de edad presentaron poca movilidad, lo que disminuyó el parasitismo de estos.

5.3 Experimento 4.- Rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *Romanormis iyengari* en cinco sustratos en inundaciones consecutivas

A la par se llevó a cabo el seguimiento a 15 cultivos (tres cultivos por sustrato), los cuales fueron inundados a las cuatro semanas de edad y posteriormente cada dos meses con un total de cuatro inundaciones durante siete meses, mostrando los resultados en la figura 7.

Los datos normalizados mostraron mediante el ANOVA, un efecto significativo producido por el factor inundación ($p = 0.0001$) y la interacción de ambos factores (sustrato x inundación) ($p = 0.0001$) y finalmente el tipo de sustrato mostró un efecto menos significativo ($p = 0.001$). El coeficiente de variación fue bajo, correspondiente al 16.39%.

La prueba de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) se realizó primero en el tipo de sustrato y enseguida para la inundación, mostrando los resultados a continuación (Cuadro 11 y 12).

Cuadro 11. Prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de confiabilidad entre el tipo de sustrato en el experimento 4, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *Romanormis iyengari* en cinco sustratos en inundaciones consecutivas.

Sustrato	Preparasíticos	
S1. Fibra de coco	87,707	b \pm 102,126
S2. Fibra de agave	141,464	a \pm 192,188
S3. <i>Sphagnum</i> Oaxaca	28,976	c \pm 46,877
S4. <i>Sphagnum</i> Orchid Moss®	94,768	b \pm 82,590
S5. Arena (testigo)	114,519	ab \pm 165,028

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). La media es acompañada de \pm la desviación estándar.

Los resultados de la prueba de medias en el tipo de sustrato demuestra que existen diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre los tratamientos (Cuadro 11), entre la Fibra de agave como sustrato, fibra de coco y *Sphagnum* Orchid Moss®, y

Sphagnum Oaxaca. Estadísticamente, a diferencia del experimento anterior, el mayor rendimiento y variabilidad ($\pm 192,188$) se obtuvo de los cultivos con fibra de agave como sustrato con una media de 141,464 preparasíticos y el menor rendimiento así como variabilidad ($\pm 46,877$) lo presentó *Sphagnum* Oaxaca con un rendimiento promedio de 28,976 preparasíticos (figura 7).

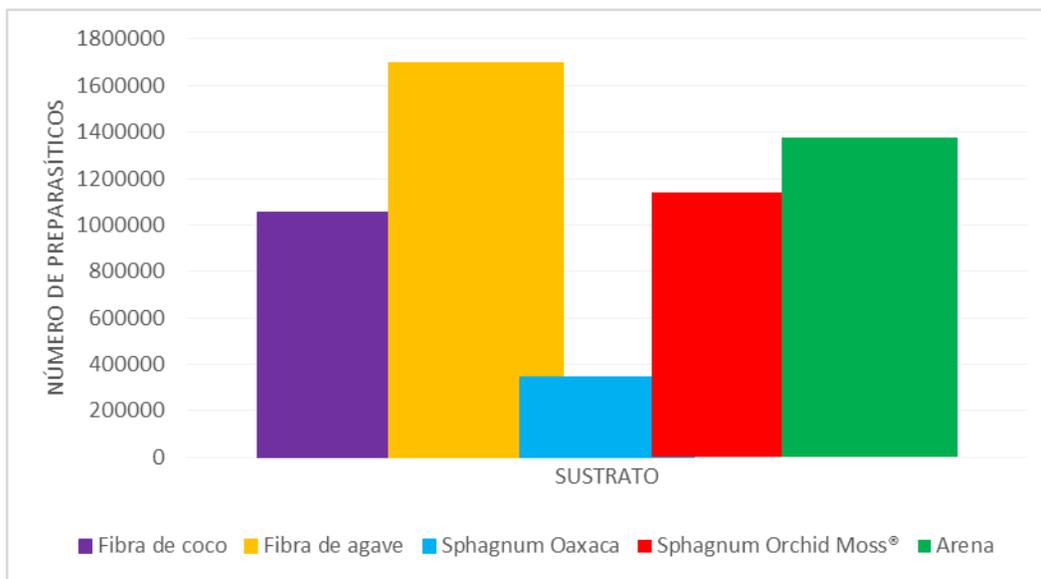


Figura 7. Rendimientos acumulados de cuatro inundaciones a cultivos de *R. iyengari* en cinco sustratos diferentes.

La figura anterior (7) es resultado de la suma de todos los rendimientos en cada tipo de sustrato durante cuatro inundaciones realizadas a los mismos cultivos, representando los datos estadísticos.

Cuadro 12. Prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de confiabilidad entre la inundación en el experimento 4, rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2g de *Romanomermis iyengari* en cinco sustratos en inundaciones consecutivas.

Inundación	Preparasíticos
1er inundación	261,082 a $\pm 156,683$
2da inundación	90,310 b $\pm 40,076$
3ra inundación	22,000 c $\pm 25,667$
4ta inundación	555 C $\pm 1,334$

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). La media es acompañada de \pm la desviación estándar.

Respecto al segundo factor que correspondió a la inundación (Cuadro 12), se observa que existe diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre la primer inundación donde se observó que presentó el mayor rendimiento promedio de los cinco sustratos (261,082 preparasíticos y una variabilidad de $\pm 156,683$) y la segunda inundación (90,310 preparasíticos, variabilidad= $\pm 40,076$). En la tercera y cuarta inundación se observa una diferencia significativa ($p = 0.0001$) del resto de las inundaciones, pero no entre ellas, siendo estadísticamente iguales los rendimientos promedio de los cinco sustratos reportados para la tercera (22,000 y variabilidad $\pm 25,667$) y cuarta inundación (555 con una variabilidad de $\pm 1,334$).

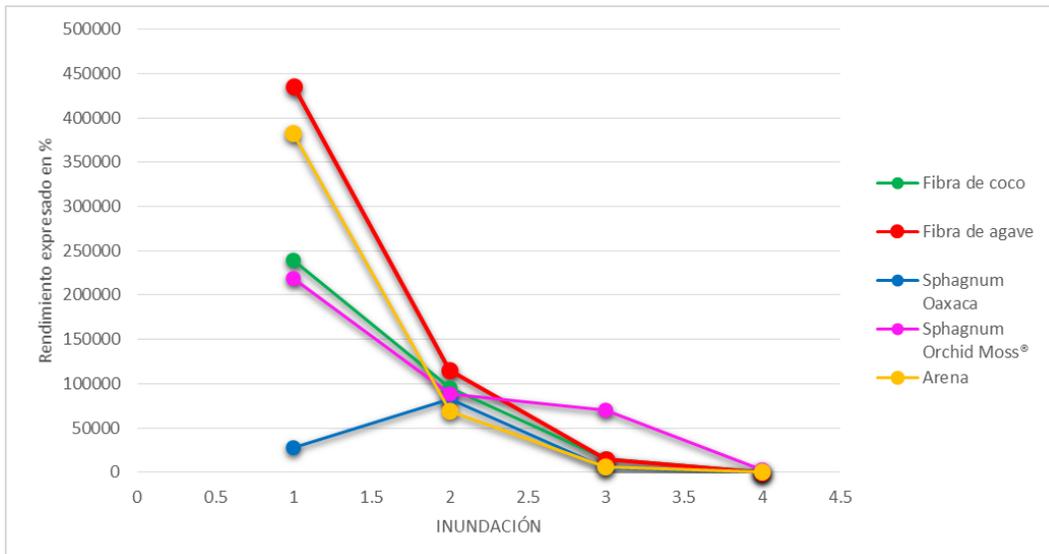


Figura 8. Rendimientos obtenidos en 4 inundaciones en cinco diferentes sustratos durante 7 meses

La figura 8 muestra el rendimiento promedio obtenido de cada tipo de sustrato en las 4 inundaciones realizadas. En la primera inundación el mayor rendimiento se consigue con la fibra de agave que corresponde a un promedio de 436,100 preparasíticos, seguido de arena con 382,827 preparasíticos, fibra de coco con 239,850 preparasíticos, *Sphagnum Orchid Moss®* con 218,867 y el menor rendimiento con *Sphagnum Oaxaca* con 27,767.

Para la segunda inundación realizada a los dos meses después de la primera inundación, es decir a los tres meses, nuevamente el mayor rendimiento se obtiene con la fibra de agave (115,533 preparasíticos), en segundo mayor rendimiento se obtiene de la fibra de coco con 95,533 preparasíticos promedio, *Sphagnum* Orchid Moss® obtiene un rendimiento promedio de 88,317 preparasíticos, seguido de *Sphagnum* Oaxaca con 82,750 preparasíticos y con el menor rendimiento la arena que presentó 69,417 como rendimiento promedio.

En la tercer inundación (cinco meses), el mayor rendimiento se obtiene de medios de cultivo con *Sphagnum* Orchid Moss® como sustrato, con un valor de 69,556 preparasíticos promedio, seguido de la fibra de coco (15,167 preparasíticos), fibra de agave (14,222 preparasíticos), arena (5,833) y el sustrato con el menor rendimiento promedio fue *Sphagnum* Oaxaca con 5,222 preparasíticos.

Finalmente la cuarta inundación, realizada a los siete meses, sólo se registraron rendimientos promedio de medios de cultivo con *Sphagnum* Orchid Moss® con el mayor rendimiento (2,333 preparasíticos), fibra de coco (278 preparasíticos) y *Sphagnum* Oaxaca con el menor rendimiento (167). Así, los musgos soportan inundaciones a los mismos medios de cultivo, es decir reinundarlos hasta tres veces.

5.5. Caracterización de sustratos

5.5.1 Propiedades físicas

La mayor parte de los datos mostrados en el presente trabajos sobre la caracterización física y química, no se discutieron, ya que no se han reportado en otros estudios, por lo que ayudaran en posteriores investigaciones.

Al igual que lo mencionado por Vargas *et al.* (2008), es deseable tener sustratos con una densidad aparente baja pues estos son ligeros, lo que facilita su acarreo y

manejo. En el cuadro 13 se pueden observar las medias obtenidas de cada propiedad en cada tipo de sustrato. En los datos obtenidos para la densidad aparente, estadísticamente existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la arena que obtuvo el mayor valor de DA de 1.43 g.cm^{-3} , muy semejante al valor reportado por Zarate (2007) de 1.66 g cm^{-3} y el resto de los sustratos como la fibra de coco obtuvo el menor valor (0.01 g cm^{-3}), ambas especies de musgo obtuvieron el mismo valor (0.02 g cm^{-3}) y finalmente la fibra de agave con 0.05 g cm^{-3} .

En el caso de la densidad real, al igual que la densidad aparente, estadísticamente se observaron diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre el tratamiento testigo (arena) que obtiene un valor de 2.60 g.cm^{-3} y *Sphagnum Oaxaca* que presentó un valor de 1.49 g.cm^{-3} ; el resto de los sustratos *Sphagnum Orchid Moss*® con un valor de 1.46 g.cm^{-3} , fibra de coco con 1.46 g.cm^{-3} y la fibra de agave con 1.45 g.cm^{-3} , no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), obteniendo los menores valores.

Respecto al espacio poroso total (EPT), después de la transformación de los porcentajes, se observaron diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre la fibra de coco con el mayor valor de 99.19%, *Sphagnum Orchid Moss*® con un valor de 98.66%, fibra de agave con 96.78% y el menor valor obtenido con el tratamiento testigo que correspondió a la arena con 49%. Los valores obtenidos superaron a los reportados por Zarate (2007) de 93% para la fibra de coco y 94.2% para *Sphagnum Oaxaca*.

En el caso de la humedad que toma valores mayores al 100%, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), entre las fibras (donde se obtienen valores superiores y estadísticamente similares entre ellas, coco con 497.11 y agave con 431.36) y la arena con 54.96%.

Para la capacidad de retención de agua (CRA), estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (tipos de

sustratos), obteniendo valores desde 74.49 con la fibra de agave, hasta 99.45 con el sustrato *Sphagnum Oaxaca*. Quesada y Méndez (2005) reportaron para la fibra de coco un valor bajo de 61 %, asociaciones como Agromática publican un valor entre 25 – 50% (www.agromatica.es), igualmente para el caso de arena y la fibra de coco Zarate (2007) reportó valores más pequeños (41 y 88 respectivamente) que los reportados en el presente estudio.

Cuadro 13. Caracterización física de los sustratos utilizados, densidad aparente (DA), densidad real (DR), espacio poroso total (EPT) y humedad.

SUSTRATO	DA (g.cm ⁻³)	DR (g.cm ⁻³)	EPT %	HUMEDAD %	CRA %
<i>Sphagnum Oaxaca</i>	0.02 b	1.49 b	98.93 ab	243.37 ab	99.45 a
<i>Sphagnum Orchid Moss</i> ®	0.02 b	1.46 c	98.66 b	296.20 ab	94.54 a
Fibra de agave	0.05 b	1.45 c	96.78 c	431.36 a	74.49 a
Fibra de coco	0.01 b	1.46 c	99.19 a	497.11 a	79.31 a
Arena	1.43 a	2.60 a	49.0 d	54.96 b	78.68 a

Medias con distinta letra en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

5.5.2 Propiedades químicas

En el cuadro 14, se muestran los valores obtenidos de las propiedades en la caracterización química, como el porcentaje de cenizas, los cuales fueron transformados con la función arcoseno para su análisis estadístico. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en ambas especies de musgo, *Sphagnum Oaxaca* con el mayor valor correspondiente a 6.03%, seguido de *Sphagnum Orchid Moss*® con 1.43% de cenizas, la fibra de agave con un valor de 0.67%, y entre el menor valor obtenido de la arena (0%).

El porcentaje de materia orgánica mostró diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre todos los tipos de sustratos, obteniendo el mayor valor en la fibra de agave con un 99.33%, seguido de *Sphagnum Orchid Moss*® con 98.57%, fibra de coco 98.92% y con el menor valor *Sphagnum Oaxaca* 93.97%.

El análisis de medias para el porcentaje de carbono mostró diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre la fibra de agave con el mayor valor de 55.19%, *Sphagnum* Orchid Moss® con 54.76%, *Sphagnum* Oaxaca 52.21% de carbono, y la arena con el menor valor (0).

En el caso del contenido de nitrógeno de los sustratos, se encontraron diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre la fibra de coco que presentó el mayor (90 cmol kg^{-1}), seguido de los sustratos fibra de agave (65), *Sphagnum* Oaxaca (50), *Sphagnum* Orchid Moss® (47.5) que estadísticamente no mostraron diferencias significativas entre ellos y arena sin valor.

La relación carbono/nitrógeno de los sustratos, mostró mediante la prueba de medias que existe diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre *Sphagnum* Orchid Moss® con un valor de 82.52, la fibra de coco con 43.77 y la arena con un valor de 0.

En el pH, estadísticamente sólo se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el tratamiento con arena como sustrato, ya que se obtiene el mayor valor de 6.90 muy cercano a un pH neutro y muy similar el reportado por Zarate (2007) de 6.2, y el resto de los sustratos no presentaron diferencias teniendo un rango de pH de 5.47 y 5.79.

Respecto a la conductividad eléctrica (CE), se presentaron los mayores valores en *Sphagnum* Oaxaca con 230 dS m^{-1} , mostrando diferencias significativas con la arena que obtuvo el menor valor (9.87 dS m^{-1}). Los sustratos de *Sphagnum* Orchid Moss®, Fibra de agave y Fibra de coco, no se encontraron diferencias significativas obteniendo valores de 152.35, 165.85 y 141.05 dS m^{-1} respectivamente.

Cuadro 14. Caracterización química de sustratos; cenizas, materia orgánica (MO), carbono (C), pH, conductividad eléctrica (CE), nitrógeno (N) y la relación carbono-nitrógeno (C/N).

SUSTRATO	Cenizas (%)	MO (%)	C (%)	N (cmol kg ⁻¹)	C/N	pH	CE (dS m ⁻¹)
<i>Sphagnum</i> Oaxaca	6.03 a	93.97 c	52.21 c	50.0 b	74.51 ab	5.75 b	230.00 a
<i>Sphagnum</i> Orchid Moss®	1.43 b	98.57 b	54.76 b	47.5 b	82.52 a	5.47 b	152.35 b
Fibra de agave	0.67 c	99.33 a	55.19 a	65.0 b	64.16 bc	5.79 b	165.85 b
Fibra de coco	1.08 bc	98.92 d	54.95 ab	90.0 a	43.77 c	5.79 b	141.05 b
Arena	0 d	0 e	0 d	0 c	0 d	6.90 a	9.87 c

Medias con distinta letra en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

El análisis cluster que integró los datos del experimento tres “rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *R. iyengari* en cinco sustratos durante 6 meses” y la caracterización a una distancia de 249,820, mostró que los grupos se formaron de acuerdo a la edad del cultivo o la inundación (Figura 9).

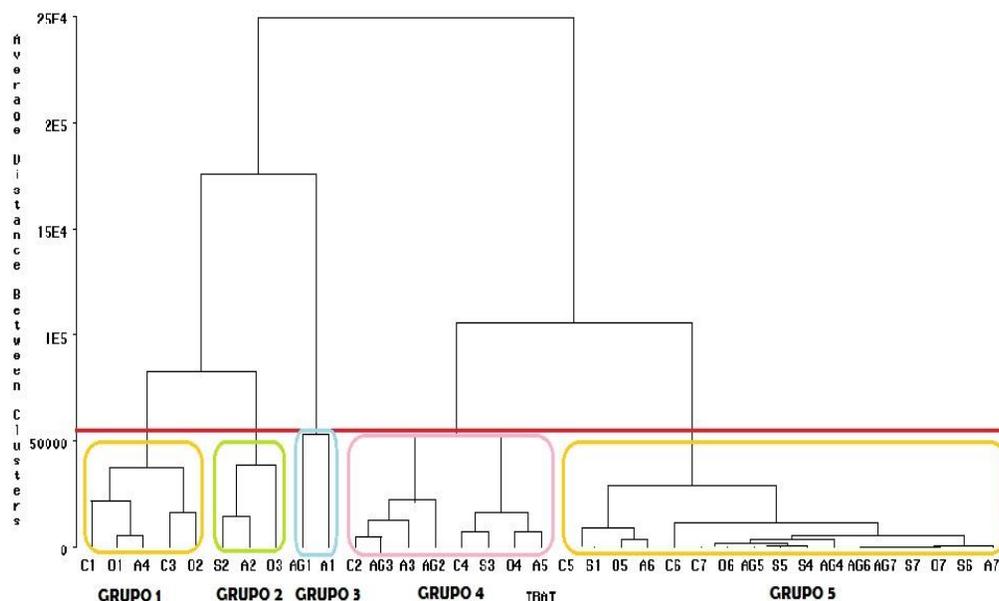


Figura 9. Cluster integrado por 35 tratamientos (TRAT) del experimento “rendimiento de cultivos de nematodos depositando 2 g de *Romanomermis iyengari* en cinco sustratos durante 6 meses” y la caracterización de sustratos.

Así, a una distancia de aproximadamente 55,000, se obtuvieron cinco grupos. Estos cinco grupos se conformaron de la siguiente forma: grupo 1 con una distancia de 37,696 integrado por *Sphagnum* Orchid Moss® en la primer inundación, la arena en la cuarta inundación, fibra de coco en la primera y finalmente la fibra de coco en su tercer inundación y *Sphagnum* Orchid Moss® en la segunda inundación, con rendimientos de 215,556; 220,833; 239,861; 181,944 y 198,333 preparasíticos por tratamiento respectivamente.

Segundo grupo formado a una distancia de 38,468 integrado por sustratos con rendimientos entre 260,000 y 310,000 que correspondieron a *Sphagnum* Oaxaca y arena en la segunda inundación y *Sphagnum* Orchid Moss® en la tercer inundación con 309,444; 295,000 y 264,444 preparasíticos por cultivo, respectivamente.

El tercer grupo con una distancia de 53,342, correspondió a los mayores rendimientos obtenidos; la fibra de agave en la primer inundación con 436,111 y arena en la primer inundación donde se obtuvo un rendimiento de 382,778.

El cuarto grupo a una distancia de 52,846 integrado por sustratos con un rendimiento entre 74,000 y 136,000 preparasíticos, es así que se encuentran la fibra de coco en la segunda inundación con 140,556; la fibra de agave en la tercera inundación con un rendimiento de 135,556 preparasíticos por cultivo, arena en la tercera inundación con 150,833; fibra de agave en la segunda inundación con 121,111 preparasíticos y fibra de coco en la cuarta inundación, *Sphagnum* Oaxaca en la inundación 3, *Sphagnum* Orchid Moss® en la cuarta inundación y la arena en la quinta, con un rendimiento de 82,222; 74,444; 97,222 y 90,000 respectivamente.

Finalmente, el quinto grupo se formó con una distancia de 29,591 bajo rendimientos menores a 39,000 preparasíticos, que se obtienen de la fibra de

agave y *Sphagnum* Oaxaca en la sexta y séptima inundación (rendimientos menores a 500 preparasíticos), *Sphagnum* Orchid Moss® y arena en la séptima inundación (sin preparasíticos), la fibra de agave y *Sphagnum* Oaxaca en la quinta inundación y *Sphagnum* Oaxaca en la cuarta (con rendimientos entre 30,000 – 45,00 preparasíticos por medio de cultivo), fibra de coco en la séptima inundación y *Sphagnum* Orchid Moss® en la 6 (rendimientos entre 5,500 y 6,200), fibra de agave en la cuarta inundación con un rendimiento de 8,111 preparasíticos, fibra de coco en la sexta inundación con 14,444 preparasíticos, fibra de coco en la quinta inundación (28,333) y *Sphagnum* Oaxaca en la primer inundación (27,778) y finalmente *Sphagnum* Orchid Moss® en la quinta inundación y arena en la sexta inundación con un rendimiento de 38,889 y 35,000 respectivamente.

El análisis cluster sólo agrupó los tratamientos por tiempo de la inundación, sin arrojar una idea de que características son las que nos determinan los mayores rendimientos.

Así, el análisis de componentes principales demostró las primeras tres variables que corresponden al rendimiento de los cultivos y porcentajes de parasitismo, presentan valores muy altos (11.23, 3.46 y 0.96, respectivamente) en la matriz de valores propios, y en el porcentaje acumulado se observó que nueve variables explican el 100 % de la variación acumulada.

Estas primeras nueve variables correspondieron principalmente a los valores obtenidos por la caracterización física, datos de parasitismo y el rendimiento, sin embargo con las primeras cinco variables se obtuvo el 98.97% de la variación acumulada, ya que las primeras variables correspondieron a propiedades físicas de los sustratos, se observó que estas se pueden agrupar y que estos rendimientos se explican gracias a esas variables, correspondientes al rendimiento, porcentajes de parasitismo 5:1 y 10:1, medias de infestación 5:1 y 10:1, densidad aparente, densidad real, espacio poroso total y material mineral.

Para el caso del rendimiento, en relación con los porcentajes de parasitismo y medias de infestación existe una relación, ya que al no contar con preparasíticos tampoco existieron valores de parasitismo, la naturaleza de los sustratos provoca que también exista una relación entre la densidad real, aparente, espacio poroso total y mineral, ya que las fibras presentan características semejantes, así como los musgos y de una naturaleza muy peculiar, la arena.

De esta forma, la caracterización física tuvo mayor importancia sobre los rendimientos por lo que son agrupadas junto con el rendimiento y la caracterización química produce diferencias entre los sustratos, que no tienen que ver con el rendimiento de los mismos.

Sin embargo, en la matriz de correlación de Pearson presentó valores altos ($r = 0.938$) significativos ($p < 0.0001$) entre la variable de porcentaje de parasitismo con una relación 5:1 (nematodos: larva), con el porcentaje de parasitismo con una relación 10:1; igualmente existió una alta relación ($r = 0.965$) significativa ($p < 0.0001$) entre la media de infestación 5:1 y 10:1; la densidad aparente mostró relaciones altas significativas ($p < 0.0001$) con un valor de $r = 0.999$ la densidad real, el espacio poroso total y el peso, con un valor de $r = 0.998$ la materia mineral, con un valor $r = -0.998$ la materia orgánica y carbono. La densidad real mostró correlaciones altas significativas ($p < 0.0001$) con el espacio poroso total con un valor de $r = -0.999$, con una $r = -0.999$ con el peso, con un $r = 0.996$ con la materia mineral, con la materia orgánica y carbono una $r = -0.996$, con el pH $r = 0.969$, conductividad eléctrica con una $r = 0.973$.

El espacio poroso total mostró correlaciones de Person significativas ($p < 0.0001$) con una $r = -0.998$ entre el peso, con la materia mineral obtuvo un valor $r = -0.996$, con un valor de $r = 0.996$ mostró correlaciones con la materia orgánica y el carbono, con el pH se obtiene una $r = -0.917$, con la conductividad eléctrica $r = -0.980$. La materia mineral obtuvo valores significativos ($p < 0.0001$) en las

correlaciones altas con la materia orgánica y cantidad de carbono ($r = -1$), una $r = 0.999$ se obtuvo con el peso, una $r = 0.967$ con el pH y conductividad eléctrica.

Las correlaciones de Pearson altas significativas se obtuvieron entre la materia orgánica y el carbono ($r = 1$), una $r = 0.998$ con el peso, una $r = -0.967$ con el pH y conductividad eléctrica. El carbono mostró correlaciones altas significativas ($p < 0.0001$) de $r = -0.998$ con el peso, con el pH y conductividad eléctrica se observó un valor de $r = -0.967$. El nitrógeno presentó una correlación significativa ($p < 0.0001$) con la humedad ($r = 0.972$). También se observaron correlaciones significativas ($p < 0.0001$) altas entre los valores de la relación carbono/nitrógeno con el pH ($r = -0.947$); entre el pH y el peso se obtiene un valor de $r = 0.965$ y con la conductividad eléctrica $r = 0.943$; y finalmente entre el peso y conductividad eléctrica con un valor de $r = 0.969$.

Así, la correlación de Pearson, mostró correlaciones altas entre las variables de densidad real, espacio poroso total, materia mineral, materia orgánica, carbono, nitrógeno, relación carbono/nitrógeno, pH, conductividad eléctrica, humedad y peso, no obteniendo valores significativos en la variable de rendimiento.

Es así que de manera general con ayuda de esta matriz de correlación de Pearson, nos corroboró que las propiedades de la caracterización física se agrupan y tienen un comportamiento similar, dejando con pocas asociaciones entre las características químicas; por lo que se consideró que las propiedades físicas son significativas para constituir un medio de cultivo y las propiedades químicas no influyeron significativamente en este experimento.

6. CONCLUSIONES

1. El mayor rendimiento obtenido de medios de cultivo se registró con fibra de agave con 436,100 preparasíticos, superado el rendimiento de 382,827 preparasíticos alcanzado por la arena. La fibra de coco reportó un rendimiento promedio de 239,850 preparasíticos, *Sphagnum* Orchid Moss® 218,867 preparasíticos y *Sphagnum* Oaxaca con 27,767 preparasíticos.
2. La capacidad de búsqueda del hospedero y el parasitismo de los preparasíticos no se ve afectado por los cinco tipos de sustratos evaluados, ya que se obtuvieron porcentajes de parasitismo en *Sphagnum* Orchid Moss® de 84%, fibra de agave 72%, seguido de la fibra de coco con un 69% y finalmente con un porcentaje similar *Sphagnum* Oaxaca y arena con 65%.
3. Las fibras proporcionan condiciones a la viabilidad de los huevos de los nematodos, obteniendo rendimientos de medios de cultivo con 24 semanas de edad (fibra de coco 5,556 preparasíticos y fibra de agave 56). Además de tolerar tres inundaciones con la fibra de agave (144,222) y cuatro con la fibra de coco (278), pudiendo sustituir el uso de arena.
4. Los musgos del genero *Sphagnum*, Orchid Moss® y Oaxaca (de los Mixes) pueden sustituir el uso de arena, porque son sustratos ligeros, en los que obtuvieron los mayores rendimientos de medios de cultivo con seis y ocho semanas de edad (*Sphagnum* Orchid Moss® 309,433 y 74,417; *Sphagnum* Oaxaca 198,317 y 264,417 respectivamente) también toleraron cuatro inundaciones que comprendieron 28 semanas con rendimientos promedio de 2,333 con *Sphagnum* Orchid Moss® y 167 *Sphagnum* Oaxaca.

5. En los rendimientos de nematodos obtenidos se encontró que a una disminución de nematodos hembras hubo una menor cantidad de preparasíticos, ya que en la relación 50:50 se obtuvo un rendimiento de 12.87%, para la relación 36:64 (hembras: machos) 8.05% y finalmente en la relación de 28:72 sólo un 5.9 %.
6. El uso de fibras permitió prolongar el tiempo (6 meses) a utilizar los medios de cultivo, sin embargo, el uso de musgo permitió reutilizar (4 veces) los medios de cultivo.
7. Las propiedades físicas y químicas de los sustratos usados como medio de cultivo, bajo las condiciones del presente experimento, no afectaron la producción masiva de nematodos, ni su capacidad infectiva.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ansorena, J. 1994. Sustratos. Propiedades y caracterización. Mundi-Prensa. Madrid.
2. Arequipeño, V., F. M. Flores, A. M. T. Monsalve, E. G. M. C. Rojas, E. A. G. Rueda y E. Jadit. 2010. *Biología de nematodos*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
3. Baixauli, S. C., y O. J. M. Aguilar. p. *Cultivo sin suelo de hortalizas. Aspectos Prácticos y Experiencias*. Valencia, España. Generalitat Valenciana. Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación.
4. Bremmer, J. M. 1965. Total nitrogen. pp. 1149-1178. *In: C. A. Black (ed), Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.*
5. Casas, M. M. y B. A. Orozco. 2006. *Diversidad y distribución geográfica del género Anopheles del Sur de México*, CONABIO. *Biodiversitas* 67. 12-15.
6. Cupello, J. M., J. J. Petersen and A. R. Chauthani. 1982. An Improved method for Long-Distance shipping the mosquito parasite *Romanomermis culicivorax*. *Journal of Nematology*, 14, 121-125.
7. Daim, N., N. L. Chong and H. H. Yap. 1987. Effect of sand particle size on the production of preparasites of *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae). *Tropical Biomedicine*, 4, 75-77.
8. De Boodt, M; O. Verdonck and J. Cappaert. 1974. Methods for measuring the waterrelease curve of organic substrates. *Acta Hort.* 37:2054-2062.
9. Delgadillo, M. C., y S. M. A. Cárdenas. 1990. *Manual de Briofitas*. D. F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
10. Dominguez, E. D. y J. B. Larraín. 2012. *Sphagnum magellanicum* (pompon): el musgo de la turbera. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Centro Regional de Investigación Kampenaike (CRI). Ministerio de Agricultura. www.inia.cl. *Informativo n. 31*.
11. Flores, A. G., P. R. Pérez, A. M. Santamarina y T. S. Martínez. 1998. Susceptibilidad de larvas de *Anopheles pseudopuntipennis* al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae), Estado de Oaxaca. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 50 (3). pp 199-202.

12. Gajanana, R. K. 1978. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: *Mermithidae*) of mosquito larvae isolated in Pondicherry. *Indian J. Med. Res.*, 68.
13. García del Pino, F. 1994. *Los nematodos entomopatógenos (rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el Control Biológico de Insectos*. Universidad Autónoma de Barcelona. España. P. 78
14. Glime, M. J. 2007. Economic and Ethnic Uses of Bryophytes. *Flora of North America*, 27. 14-41.
15. INEGI. (2013). *Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática*. Recuperado el 1 de abril de 2013, de http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/consulta_localidades.aspx.
16. Kurihara, T. 1976. Population behavior of *Resimermis nielsenii*, a nematode parasite of mosquitoes, with notes in the attraction of infective stage nematodes by mosquito larvae. *Culex pipiens molestus*. Japanese. *Journal of parasitology* 25, 8-16.
17. Larraín, J. 2007. Musgos (Bryophyta) de la estación biológica Senda Darwin, Ancud, isla de Chiloé: lista de especies y claves para su identificación. *Chloris Chilensis, Año 10 N° 1*. URL: <http://www.chlorischile.cl> consultado el 30 de octubre del 2014.
18. Larraín, J. 2009. Musgos de Chile. URL: <http://www.musgosdechile.cl> consultado el 30 de octubre del 2014.
19. López, C. X. A. 2011. *Caracterización de compostas derivadas de residuos orgánicos enfocadas a su uso como sustratos*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario De Investigación Para El Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. México.
20. Martínez, T. S. H. 1996. *Evaluación de Romanomermis iyengari (Nematoda: Mermithidae) en larvas de mosquito en laboratorio y campo*. Tesis de Agronomía en sistemas de Producción Agrícola. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca num. 23. ExHacienda de Nazareno. Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca.
21. Martínez F. X. 1992. Propuesta de la metodología para la determinación de las propiedades físicas de los sustratos. *Acta Hort.* 11: 55-66.

22. Martínez, G.G.A., H. Ortiz, y D. G. M. Urrestarazu. 2009. La rotación de cultivo y las propiedades de la cascara de almendra como sustrato. *Revista Fitotecnia Mexicana*. México. (32)2: 138-142.
23. Martínez G. G. A. y G. M. Urrestarazu. 2012. Cultivo sin suelo en cáscara de almendra. Un sustrato sostenible alternativo. Editorial Académica Española. España
24. Mateo, J. A. L. 2011. *Diversidad de musgos (Bryophyta) de la Reserva Científica Ébano Verde, La Vega, República Dominicana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Santo Domingo. Facultad de Ciencias. Santo Domingo, República Dominicana.
25. Morton, J. A. 2009. *Los nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, Capnodis tenebrionis (Coleóptera: Brupestidae)*. Tesis doctoral. Barcelona España.
26. Moya, R. R. 2013. *Evaluación de mezclas de compostas con aplicación de fertilizante de liberación lenta o solución nutritiva para la producción de tomate y chile*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario De Investigación Para El Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. México.
27. Muñoz, J. Z. P. 2007. *Comparación del sustrato de fibra de coco con los sustratos de corteza de pino compostada, perlita y vermiculita en la producción de plantas de Eucalyptus globulus (Labill)*. Tesis de ingeniería. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Valdivia, Chile.
28. Noguera P., M. Abad and V. Noguera. 2000. Coconut Coir Waste, A new and available ecologically friendly peat substitute. *Acta Horticulturae* 517: 279-286.
29. NOM-021-RECNAT-2000. NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
30. Paily, K. P. 1990. An improved method of mass culturing of *Romanomermis culicivorax*. *Mosq. News*, 40.
31. Pastor, S. J. N. 2000. Utilización de sustratos en viveros. *Terra Latioamericana*, 17 (003). 231-235.

32. Pérez, P. R., Santamarina M. A., y Martínez, T. S. 1996. Control Biológico de larvas de mosquitos transmisores de paludismo con nematodos parásitos en Oaxaca, México. *Revista Investigación Hoy*. Instituto Politécnico Nacional (IPN). 8-14.
33. Pérez-Pacheco, R., M. A. Santamarina, S. Martínez y A. G. Flores. 1998. Susceptibilidad de las larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae), Estado de Oaxaca, México. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 50 (3) 199-202.
34. Pérez, P. R., C. H. Rodríguez, J. R. Lara, R. B. Montes, G. V. Ramírez y L. M. Martínez. 2004. Parasitismo de *Romanomermis iyengari* en larvas de tres especies de mosquitos en laboratorio y de *Anopheles pseudopunctipennis* en campo. *Agociencia*, 38 (004), 413-421.
35. Pérez-Pacheco, P. R., C. Rodríguez-Hernández, J. Lara-Reyna, R. Montes Belmont and J. Ruiz-Vega. 2005. Control of mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera:Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, México. *Biological Control*. 32:137-142.
36. Pérez, P. R. 2002. *Control de mosquitos con nematodos y extractos vegetales*. Tesis de doctorado. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo d México.
37. Petersen, J. J. and J. M. Cupello. 1981. Comercial development and future prospekte for entomogenous nematodes. *Journal Nematology*, 13:1.
38. Petersen, J. J. and R. Levy 1980. Effects of culture age on the Shipment survival of the mosquito parasite *Romanomermis culicivorax*. *Journal of nematology*, 13.
39. Petersen, J. J. and O. R. Willis. 1972. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosquito News*, 32 (2), 226- 230.
40. Petersen, J. J. and O. R. Willis. 1975. Establishment and recycling of a mermithid nematode for the control of mosquitoes larva. *Mosquito News* 2:526-36.
41. Quesada R. G y C. S. Méndez. 2005. Evaluación de sustratos para almácigos de hortalizas. *Agronomía Mesoamericana* 16(2): 171-183.
42. Ruiz, S. N. 2010. *Efecto y mejoramiento de la tolerancia a la salinidad de nematodos Romanomermis iyengari parásitos de mosquitos*. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario

de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, México.

43. Samanidou-Voyadjoglou, A. Ruossis and V. P. Petrakis. 2007. 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.
44. Santamarina, M. A., G. M. Ruiz, A. E. Rodriguez, A. H. Bustamante and R. P. Pacheco. 1996. Effectiveness of *Romanermis culicivorax* in *Anopheles pseudopunctipennis* and *Culex quinquefasciatus* in Mexico. *Miscelánea Coológica*, 19(1):33-37.
45. Santamarina, M. A. y R. P. Pérez. 1998. Efecto patogénico del nematodo parásito *Romanermis iyengari* (Nematoda: *Mermithidae*) en larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) en condiciones de laboratorio en el Estado de Oaxaca, México. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 50 (1), 8-11.
46. Santamarina, M. A., and A. C. Bellini. 2000. Mass production of *Romanermis iyengari* (Nematoda: *Mermithidae*) applied to anopheline breeding sites in Boa Vista (Roraima), Brazil. *Panamerican Journal of Public Health*, 7 (3), 155-161.
47. Santamarina, M. A. 1994. Actividad parasítica de *Romanermis iyengari* (Nematoda: *Mermithidae*) en criaderos naturales de larvas de mosquito. *Miscelanea zoológica*, 17 (1):59-65.
48. SAS. 2004. Statistical Analysis System
49. Savage, H. and B. Miller. 1995. House mosquitoes of the U.S.A, *Culex pipiens complex*. *Win Beats*, 6:8-9.
50. Vargas, P. T., J. Z. R. Castellanos, P. G. Sánchez, L. C. Tijerina, R. M. R. López, y J. L. A. Ojodagua. 2008. Caracterización física, química y biológica de sustrato de polvo de coco. *Rev. Fitotec. Mex. Vol. 31 (4):374-381*.
51. Warncke, D. D. 1986. Analyzing greenhouse growth media by the saturation extraction method. *Hort Sci.* 21:223-225.
52. Zárate, N. B H. 2007. *Producción de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) hidropónico con sustratos, bajo invernadero*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, México.



53. Zárate, N. B H. 2013. *Valorización de subproductos agrícolas y forestales como sustratos de cultivo en el estado de Oaxaca (México)*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid, España.
54. http://www.sphagnumshop.com/?page_id=11 consultado el 4 de noviembre de 2014
55. <http://www.agromatic.es/sustrato-de-fibra-de-coco/> consultado el 7 de octubre de 2014