

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL, UNIDAD OAXACA

Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales
(Protección y Producción Vegetal)

EFFECTO E INDUCCIÓN DE LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN NEMATODOS
PARÁSITOS DE MOSQUITOS

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias

Presenta:

M. en. C Ninfa Ruiz Santiago

Directores de Tesis:

Dr. Rafael Pérez Pacheco

Dr. Carlos A. Granados Echegoyen

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca Siendo las 11:00 horas del día 22 del mes de octubre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR UNIDAD OAXACA para examinar la tesis titulada:
"Efecto e inducción de la tolerancia a la salinidad en nematodos parásitos de mosquitos"

Presentada por el alumno:

Ruiz Santiago
Apellido paterno Apellido materno
Nombre(s) Ninfa

Con registro:

B	1	1	0	1	1	8
---	---	---	---	---	---	---

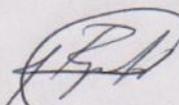
aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

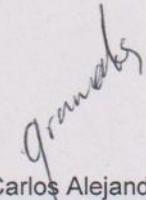
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



Dr. Rafael Pérez Pacheco



Dr. Carlos Alejandro Granados Echeгойen



Dr. Jaime Ruíz Vega



Dr. José Antonio Sánchez García



Dr. Gerardo Rodríguez Ortiz

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



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

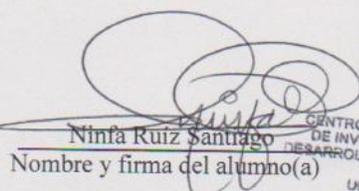


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 8 del mes de enero del año 2019, el (la) que suscribe Ninfa Ruíz Santiago alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales, con número de registro B110118, adscrito(a) al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. Rafael Pérez Pacheco y Carlos Alejandro Granados Echegoyen y cede los derechos del trabajo intitulado **“Efecto e inducción de la tolerancia a la salinidad en nematodos parásitos de mosquitos”**, 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 ninfasantiago@yahoo.com.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Ninfa Ruíz Santiago
Nombre y firma del alumno(a)


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

“A mis hijos: Josué Aquino Ruiz e Isaí Aquino Ruiz, porque ustedes son mi orgullo, una esperanza que vibra y un milagro eterno que alimenta mi alma.

Gracias por iluminar mi vida con la paz de sus sonrisas”

“A mi compañero de vida, Servio Tulio Aquino Olmedo por apoyarme a continuar, brindándome paciencia y espera para lograr este anhelo en mi vida”

“A mi mamá la Sra. Paulina Santiago Blas, porque me ha permitido tener la dicha de vivir y ser feliz”

AGRADECIMIENTOS

Al CIIDIR-IPN- Oaxaca, por ser una institución de investigación que me permitió el aprendizaje de conocimientos que me formaron profesionalmente con un sentido de ayuda para la solución de problemas que enfrenta de mi estado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado en mis estudios de Doctorado.

Es difícil agradecer a mi maestro, el Dr. Rafael Pérez Pacheco en unas líneas, todo su invaluable apoyo moral y guía en el proceso de investigación de este trabajo. Quiero agradecerle ampliamente todos sus conocimientos transmitidos, su preocupación hacia mi persona que siempre me sirvió de apoyo en momentos difíciles y su disponibilidad de tiempo que siempre me ofreció. Pero quiero agradecerle de forma muy especial, por su confianza, amistad y muy buenos y gratos momentos de trabajo que siempre recordaré.

Al Dr. Carlos Granados Echegoyen por su ayuda y apoyo en mi trabajo de investigación con sus observaciones y comentarios a mi trabajo.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega por su buena aptitud siempre, apoyo y observaciones realizadas a mi trabajo de investigación.

Al Dr. José Antonio Sánchez García por su disponibilidad de ayuda siempre, así como por sus observaciones y comentarios a mi trabajo de investigación.

Al Dr. Gerardo Rodríguez Ortiz, por su amistad, buena aptitud siempre, porque sus observaciones enriquecieron mi trabajo.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO	vi
INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
OBJETIVOS GENERALES	8
HIPÓTESIS	8
LITERATURA CITADA	9

CAPITULO I. Effects of Salinity and pH on the Infective Capacity of Romanomermis iyengari and Romanomermis culicivorax in Larvae of Culex quinquefasciatus Mosquito

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCION	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
LITERATURA CITADA	22

CAPITULO II. Generación de líneas puras de nematodos *Romanomermis iyengari* Welch parásitos de larvas de mosquitos tolerantes a la salinidad

RESUMEN	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUCCIÓN.....	28
OBJETIVOS.....	29
REVISIÓN DE LITERATURA.....	30
Mosquitos	30
Nematodos parásitos de mosquitos	31
<i>Romanomermis iyengari</i>	33
Ciclo biológico.....	34
Limitaciones ambientales de los nematodos.....	35
Factores físicos.....	35
Factores químicos.....	36
Limitaciones biológicas.....	38
Mejoramamiento genético de nematodos	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Material biológico.....	43
Cultivo del nematodo y mantenimiento.....	43
Cría masiva de mosquitos.....	43
Selección de nematodos hembras <i>R. iyengari</i> tolerantes a salinidad...	43
Proceso de selección de líneas puras de <i>R. iyengari</i> tolerantes a NaCl	44
Evaluación y comparación de la capacidad parasítica de dos líneas puras <i>R. iyengari</i> tolerantes a la salinidad y tres especies de nematodos parásitos de larvas de mosquitos.....	46

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
Capacidad parasítica de dos líneas puras <i>R. iyengari</i> tolerantes a la salinidad y tres especies de nematodos parásitos de larvas de mosquitos...	50
CONCLUSIONES	52
LITERATURA CITADA.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
CAPITULO I		
1	Effect of pH in the Infective Capacity of <i>Romanomermis iyengari</i> and <i>R. culicivorax</i> Nematodes against <i>Culex quinquefasciatus</i> Mosquito Larvae.....	17
2	Effect of Salinity (Sodium Chloride) on Infective Capacity by <i>Romanomermis iyengari</i> and <i>R. culicivorax</i> Nematodes against Larvae of <i>Culex quinquefasciatus</i> Mosquito.....	18
CAPITULO II		
1	Parasitismo e infestación de dos colonias puras F7 de nematodos <i>R. iyengari</i> y tres especies de nematodos parásitos de mosquitos, en larvas de <i>C. pipiens</i> usando vasos de plástico.....	50
2	Parasitismo e infestación de dos colonias puras F7 de nematodos <i>R. iyengari</i> y tres especies de nematodos parásitos de mosquitos, en larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> , usando platos de cultivo de tejidos....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
CAPITULO I		
1	Effect of pH in the infective capacity of nematodes <i>Romanomermis iyengari</i> and <i>R. culicivora</i> x against mosquito larvae <i>Culex quinquefasciatus</i> . PINF - percent infection. IINF - intensity of infection.....	17
2	Effect of salinity (sodium chloride) on the infective capacity of <i>Romanomermis iyengari</i> and <i>R. culicivora</i> x nematodes against <i>Culex quinquefasciatus</i> mosquito larvae. PINF = percent infection. IINF = Intensity of infection.....	19
CAPITULO II		
1	Ciclo vital del nematodo <i>R. iyengari</i> , parasito de larvas de mosquito.....	35
2	Diseño sistemático del plan de mejoramiento genético para nematodos entomopatogenos (Gaugler et al, 1989).....	42
3	Porcentajes de parasitismo %y media de infestación (MI) de líneas puras <i>R. iyengari</i> en el transcurso de siete generaciones sometidas a estrés salino 2000 mg L-1.....	48

RESUMEN

La búsqueda de alternativas no químicas al uso del control químico de mosquitos vectores de enfermedades en los humanos, emplea el uso de agentes de control biológico, técnicamente apropiado, económicamente viable y socialmente aceptable para el manejo de plagas. El control biológico con nematodos de la familia Mermithidae es una alternativa viable en el control de mosquitos. Los nematodos preparasiticos de las especies *Romanomermis culicivorax* Ross y Smith y *Romanomermis iyengari* (Welch) son los estados infectivos de las larvas de mosquito utilizados como forma de control biológico. Sin embargo esta etapa es afectada por factores abióticos (salinidad y pH) presentes en los criaderos naturales donde se aplican, reduciendo su viabilidad y capacidad infectiva, en consecuencia limitando su eficacia de uso como agentes de control biológico. Por tal razón, se determinó el efecto de la salinidad y pH en la capacidad infectiva de nematodos parásitos de mosquitos *R. culicivorax* (Ross y Smith) y *R. iyengari* (Welch), dos diferentes experimentos fueron establecidos. Para determinar el efecto del pH en nematodos parásitos de mosquito, trece niveles de pH fueron evaluados (3.6, 3.8, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.2, y 8.4). Para el efecto de la salinidad seis concentraciones de salinidad (NaCl) fueron evaluados (0.01 M (584 mgL⁻¹), 0.02 M (1169 mgL⁻¹), 0.03 M (1753) mgL⁻¹), 0.04 M (2338 mgL⁻¹), 0.05 M (2922 mgL⁻¹), y un testigo 0.00 M), por triplicado. Los datos de porcentaje de infección (PINF, porcentaje de larvas parasitadas) y la Intensidad de Infestación (IINF, promedio de nematodos parasitando una larva de mosquito) fueron registrados para dos factores. Los porcentajes de infección estadísticamente significativos en *R. iyengari* fueron entre pH de 5.0 a 7.5 niveles de 75 a 91.66% y los niveles de infestación en *R. culicivorax* fueron entre pH 6.0 a 7.0 con niveles de infección de 86.66 a 100%. Los niveles de intensidad de infestación fueron estadísticamente significativos en *R. iyengari* entre pH 4.5 a 8.0 con niveles de IINF 4.42 a 8.45. Y los niveles de infestación estadísticamente significativos para *R. culicivorax* fueron entre pH 5.0 a 7.5 con niveles de infestación de 3.07 y 3.63 nematodos por larva de mosquito. Concluyendo que la salinidad y pH es un factor limitante en el uso de las especies

R. iyengari y *R. culicivora* como agentes de control biológico de mosquitos. Se realizó la elección de la especie *R. iyengari* como una especie candidata para la mejora del rasgo tolerancia a la salinidad para mejorar su progenie y por ende su eficacia en el control de larvas de mosquitos. Esta limitación puede ser superada a través del mejoramiento genético. Por tal razón, fue sometido a un proceso de selección genética sucesiva a estrés salino 2 000 mgL⁻¹ en el transcurso de siete generaciones filiales (F7) en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. Al finalizar el proceso de presión de selección se obtuvieron dos líneas puras tolerantes a salinidad denominadas *R. iyengari* H3 y F8(1). Se realizó la evaluación de su capacidad parasítica al término del proceso de selección de las cepas de líneas puras *R. iyengari* H3 y F8(1) comparándola con las cepas *R. iyengari*, *R. culicivora*, *R. wuchangensis* en condiciones de estrés salino 1 400 mgL⁻¹. La cepa de la línea pura H3 registraron los porcentajes de parasitismo y medias de infestación más altos en condiciones de estrés salino 78.66 % y 1.6 MI. Lo que sugiere que estas técnicas de mejora genética utilizadas en nematodos entomopatógenos para mejorar su tolerancia a ambientes extremos puede ser un potencial para la mejora de factores ambientales que condicionan el uso de los nematodos parásitos de mosquitos. Este trabajo es el primer reporte de mejora genética por tolerancia al estrés en nematodos parásitos de mosquitos. Se concluye que las técnicas de mejora genética utilizadas en nematodos entomopatógenos pueden ser una herramienta viable en la mejora de rasgos benéficos de nematodos utilizados en el control biológico de mosquitos.

ABSTRACT

The search for non-chemical alternatives to the use of chemical control of mosquito vectors of diseases in humans, employs the use of biological control agents, technically appropriate, economically viable and socially acceptable for the management of pests. The biological control with nematodes of the Mermithidae family is a viable alternative in the control of mosquitoes. The preparasitic nematodes of the species *R. culicivorax* Ross and Smith and *R. iyengari* (Welch) are the infective stages of mosquito larvae used as a form of biological control. However, this stage is affected by abiotic factors (salinity and pH) present in the natural breeding places where they are applied, reducing their viability and infective capacity, consequently limiting their effectiveness of use as biological control agents. For this reason, the effect of salinity and pH on the infective capacity of mosquito parasitic nematodes *R. culicivorax* (Ross and Smith) and *R. iyengari* (Welch) was determined, two different experiments were established. To determine the effect of pH on mosquito parasitic nematodes, thirteen pH levels were evaluated (3.6, 3.8, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.2, and 8.4). For the effect of salinity six salinity concentrations (NaCl) were evaluated (0.01 M (584 mgL⁻¹), 0.02 M (1169 mgL⁻¹), 0.03 M (1753) mgL⁻¹), 0.04 M (2338 mgL⁻¹), 0.05 M (2922 mgL⁻¹), and a 0.00 M control, in triplicate. The data of percentage of infection (PINF, percentage of parasitized larvae) and Intensity of Infestation (IINF, average of nematodes parasitizing a mosquito larva) were recorded for two factors. The percentages of infection statistically significant in *R. iyengari* were between pH of 5.0 to 7.5 levels of 75 to 91.66% and the levels of infestation in *R. culicivorax* were between pH 6.0 to 7.0 with infection levels of 86.66 to 100%. Infestation intensity levels were statistically significant in *R. iyengari* between pH 4.5 to 8.0 with IINF levels 4.42 to 8.45. And the statistically significant infestation levels for *R. culicivorax* were between pH 5.0 to 7.5 with infestation levels of 3.07 and 3.63 nematodes per mosquito larva. Concluding that the salinity and pH is a limiting factor in the use of the species *R. iyengari* and *R. culicivorax* as agents of biological control of

mosquitoes. The choice of the species *R. iyengari* was made as a candidate species for the improvement of the salinity tolerance trait to improve its progeny and therefore its effectiveness in the control of mosquito larvae. This limitation can be overcome through genetic improvement. For this reason, a genetic selection process successive to saline stress 2 000 mgL⁻¹ was carried out over the course of seven daughter generations (F7) in *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. At the end of the selection pressure process, two pure saline tolerant lines called *R. iyengari* H3 and F8 (1) were obtained. The evaluation of its parasitic capacity was carried out at the end of the selection process of the strains of pure lines *R. iyengari* H3 and F8 (1) comparing it with the strains *R. iyengari*, *R. culicivora*, *R. wuchangensis* under saline stress conditions 1 400 mgL⁻¹. The strain of the pure line H3 registered the percentages of parasitism and higher infestation averages in conditions of salt stress 78.66% and 1.6 MI. This suggests that these genetic improvement techniques used in entomopathogenic nematodes to improve their tolerance to extreme environments may be a potential for the improvement of environmental factors that condition the use of parasitic mosquito nematodes. This work is the first report of genetic improvement due to stress tolerance in parasitic mosquito nematodes. It is concluded that genetic improvement techniques used in entomopathogenic nematodes can be a viable tool in the improvement of beneficial traits of nematodes used in the biological control of mosquitoes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los mosquitos transmiten algunas de las enfermedades parasitarias y virales más graves y potencialmente mortales del mundo como la malaria (*Anopheles*), filariasis (*Culex*, *Mansonia* y algunos *Anopheles* spp.) y dengue (principalmente *Aedes aegypti*). Estas enfermedades están aumentando en muchas áreas tropicales y subtropicales. Por lo tanto, los enfoques para reducir la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores mediante el control de las poblaciones de mosquitos son altamente justificados. El control de vectores es un medio esencial y efectivo para controlar la transmisión de enfermedades transmitidas por vectores, especialmente en áreas donde la resistencia del parásito a los productos químicos está creciendo (Poopathi y Tyagi, 2006).

El uso intensivo de insecticidas químicos contra mosquitos, ha dado como resultado el desarrollo de resistencia, lo que ha creado la necesidad urgente de programas de control para adoptar enfoques de manejo de mosquitos más integrados que incluyan soluciones sostenibles y no químicas (Alavo *et al.*, 2015). A diferencia de los insecticidas, los agentes de control biológico son específicos para el huésped, seguros para el medio ambiente, fácil de aplicar en campo, su producción es rentable, carecen de infectividad y patogenicidad en mamíferos, incluido el hombre, y tienen poca evidencia del desarrollo de resistencia en las especies de mosquito objetivo. Muchas poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades han desarrollado resistencia a los insecticidas organosintéticos, utilizados principalmente durante la última mitad del siglo XX. Por lo tanto, aumentó el interés en estrategias alternativas así como en el control integrado (Poopathi y Tyagi, 2006).

La familia Mermithidae perteneciente al Phylum Nematoda ha sido reportada parasitando poblaciones naturales de mosquitos (Platzer, 1980), pueden ser semiterrestres o acuáticos, pero todos son endoparásitos obligados (Sanad *et al.*, 2013). Debido a que atacan a los mosquitos vectores de enfermedades de importancia médica, los mermitidos han recibido atención como una alternativa

biológica al uso de los insecticidas químicos (Sanad et al., 2013). Pérez-Pacheco et al. (2009), menciona que las especies de nematodos del género *Romanomermis* son una alternativa efectiva, específica y sostenible para el control biológico de mosquitos (Diptera: Culicidae). Al respecto Alavo et al. (2015) afirma que el nematodo mermitido *Romanomermis iyengari* Welch es una alternativa de control natural al uso de insecticidas sintéticos para la supresión de poblaciones de mosquitos.

Romanomermis iyengari, Welch 1964, originalmente colectado en arrozales en el área de Pondicherry, India, como parásito de larvas de *Anopheles vagus* Doenitz, *Anopheles subpictus* Grassi, *Anopheles barbirostris* Vander Wulp, *Culex* del grupo vishnui, *Culex tritaeniorhynchus* Gile y *Culex* (Lutzia) sp. Presenta una etapa de vida libre y otra de vida parásita. A partir del huevo eclosionan las etapas infectivas que penetra a través de la cutícula al hemocele del hospedador. Luego de desarrollarse y madurar emerge la etapa postparasítica que muda a adulto en el sustrato, donde se realiza la cópula y puesta de huevos. En este proceso de liberación de los preparasíticos, el insecto muere (Achinelly y Micieli, 2009). Los estados preparasíticos (Juvenile 2), son los estados infectivos de larvas de mosquitos. La capacidad infectiva de los estados infectivos es afectada por factores abióticos como el pH y la salinidad de los sitios de reproducción naturales de los mosquitos donde son aplicados (Petersen and Willis 1970; Brown y Platzer 1978; Petersen 1979; Pridantseva et al. 1990; Pérez et al. 2004, 2005). Gajanana et al., 1978 menciona que los estados preparasíticos de *R. iyengari* no pueden sobrevivir a un pH y salinidad mayores de 7,5 y 0,025 M (1,46 g/L), respectivamente, y los estados adultos no pudieran perpetuarse en un ambiente con un pH mayor que 8. La duración de la viabilidad y capacidad infectiva de los estados preparasíticos es vital para lograr el control exitoso de larvas de mosquitos en criaderos naturales y obtener eficacia como agentes de control biológico de larvas de mosquitos en criaderos naturales. Se evaluó el efecto de la salinidad y pH en la capacidad infectiva de *R. iyengari* y *R. culicivorax* en larvas de mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say.

La ingeniería genética es una herramienta prometedora para mejorar rasgos benéficos en nematodos entomopatógenos, pudiendo generar nematodos resistentes a condiciones ambientales extremas (Segal y Glazer, 1998). Se han utilizado con éxito diversas estrategias de mejoramiento genético para mejorar los rasgos deseados en muchas especies de cultivos u ganado. Estos han incluido la detención y aislamiento de poblaciones que exhiben rasgos deseados, selección artificial, hibridación cruzada y recientemente manipulación genética (Gaugler, 1987; Gaugler y Hashmi, 1996).

El efecto de la salinidad en la capacidad infectiva de los nematodos parásitos de mosquitos *R. iyengari* es una causa importante que le impide alcanzar el máximo potencial como agentes de control biológico. La intolerancia a la salinidad de los estados infectivos (preparasíticos) puede ser el factor más importante que restringe su capacidad de aplicación en criaderos naturales de mosquitos, afectando su motilidad, supervivencia e infectividad. Desafortunadamente el rango de salinidad para la actividad de los nematodos parásitos de mosquitos *R. iyengari* es estrecho. Nuestro estudio se ha centrado en *R. iyengari* porque es un buen candidato para estudios de mejoramiento genético. Platzer (2007), reconoció a esta especie como una de las mejores especies de mermitidos en el control biológico de mosquitos por su biología, debido a que presenta tolerancia a ambientes salinos y contaminados y puede tener diversidad genética para este rasgo, es un candidato ideal de inundación para mejora genética, tiene una generación corta y puede ser reproducido en grandes cantidades. Por lo tanto se realizó un proceso de presión de selección a salinidad en el transcurso de siete generaciones en el nematodo *R. iyengari* parásito de larvas de mosquito y generar líneas puras tolerantes a salinidad.

OBJETIVOS GENERALES

La presente investigación se realizó en dos fases experimentales para dar cumplimiento al objetivo de obtener líneas puras de nematodos *Romanomermis iyengari* parásito de larvas de mosquitos tolerantes a la salinidad en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*; de tal manera que los resultados se presentan en dos capítulos del presente escrito de acuerdo a los objetivos particulares planteados, siendo estos los siguientes:

- 1.- Determinar el efecto de la salinidad en la capacidad infectiva del nematodo *Romanomermis iyengari* y *Romanomermis culicivorax* parásito de larvas de mosquito.
- 2.- Obtener líneas puras de nematodos *Romanomermis iyengari* tolerantes a salinidad a través de la inducción de la tolerancia a través de un proceso de presión selectiva sucesiva a la salinidad.

HIPÓTESIS

Las líneas puras descendientes de la cepa base de *Romanomermis iyengari* presentan mayor capacidad infectiva en condiciones de salinidad.

LITERATURA CITADA

Alavo, T.B.C. Abagli, A.Z. Pérez-Pacheco, R. Platzer, E. 2015. Large-scale production of the malaria vector biocontrol agent *Romanomermis iyengari* (Nematoda:Mermithidae) in Benin, West Africa. *Malaria World Journal*. 6 (1): 1-5

Brown, B. J., and E. G. Platzer. 1978. Salts and the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. *J. Nematol.* 10: 53-61.

Gajanana *et al.*, 1978. Gajanana A, Kazmi SJ, Bheema Rao US, Suguna SG, Chandrahas RK. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp: Mermithidae) of mosquito larvae isolated in Pondicherry. *Indian J Med Res* 1978;68:242-7

Gaugler, R. (1987) Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvement. In: *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*. (MARAMOROSCH, K., ed.) Academic Press, San Diego, CA, 457-484

Gaugler, R. y Hashmi, S. 1996. Genetic engineering of an insect parasite. In: *Genetic Engineering* 18. (SETLOW, J. K. ed.) Plenum Press, New York, 135-155.

Pérez Pacheco, R., Rodríguez-Hernández, C., Lara-Reyna, J., Montes-Belmont, R., Ramírez-Valverde, G., Martínez-Martínez, L., 2004. Parasitism of *Romanomermis iyengari* in larvae of three species of mosquito in laboratory, and of *Anopheles pseudopunctipennis* in the field. *Agrociencia* 38, 413– 421.

Pérez-Pacheco R, Rodriguez-Hernandez C, Lara-Reyna J, Montes-Belmont R *et al.*: Control of the mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, Mexico. *Biol. Control* 2005, **32**:137-142.

Petersen, J. J., and O. R. Willis. 1970. Some factors affecting parasitism by mermithid nematodes in southern house mosquito larvae. *J. Econ. Entomol.* 63: 175-178.

Petersen, J. J. 1979. pH as a factor in parasitism of mosquito larvae by the mermithid *Romanomermis culicivorax*. *J. Nematol.* 11: 105-106.

Platzer, E. G. 2007. Mermithid nematodes. Pp. 58–64 in T. G. Floore, ed. Biorational control of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* (Suppl. 2), Bulletin No. 7

Poopathi, S. y Tyagi B. K. 2006. The challenge of mosquito control strategies: from primordial to molecular approaches. *Biotechnology and Molecular Biology Review.* 1(2):51-65.

Prindantseva, E. A., N. I. Lebedeca, Z. P. Sherherban, and M. K. Kadyrova. 1990. An evaluation of the possibility for mosquito control in Vzbekistan. *Med. Parasitol.* 1: 15-17.

Segal, D y Glazer, I. 1998. Genetic approaches for enhancing beneficial traits in entomopathogenic nematodes. *Japanese Journal of Nematology.* 28: 61-67.

Sanad, M.M., Shamseldean M.S.M., Elgindi, A.Y., Gaugler, R. 2013. Host penetration and emergence patterns of the mosquito-parasitic mermithids *Romanomermis iyengari* and *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda:Mermithidae). *Journal of Nematology* 45(1): 30-38.

CAPITULO I

Effects of Salinity and pH on the Infective Capacity of *Romanormis iyengari* and *Romanormis culicivorax* in Larvae of *Culex quinquefasciatus* Mosquito

RESUMEN

Se determinó el efecto de la salinidad y pH en la capacidad infectiva de nematodos parásitos de mosquitos *Romanormis culicivorax* (Ross & Smith) y *Romanormis iyengari* (Welch), dos diferentes experimentos fueron establecidos. Para determinar el efecto del pH en nematodos parásitos de mosquito, trece niveles de pH fueron evaluados (3.6, 3.8, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.2, y 8.4). Para el efecto de la salinidad seis concentraciones de salinidad (NaCl) fueron evaluados (0.01 M (584 mgL⁻¹), 0.02 M (1169 mgL⁻¹), 0.03 M (1753) mgL⁻¹), 0.04 M (2338 mgL⁻¹), 0.05 M (2922 mgL⁻¹), y un testigo 0.00 M), por triplicado. Los datos de porcentaje de infección (PINF, porcentaje de larvas parasitadas) y la Intensidad de Infestación (IINF, promedio de nematodos parasitando una larva de mosquito) fueron registrados para dos factores. Los porcentajes de infección estadísticamente significativos en *R. iyengari* fueron entre pH de 5.0 a 7.5 niveles de 75 a 91.66% y los niveles de infestación en *R. culicivorax* fueron entre pH 6.0 a 7.0 con niveles de infección de 86.66 a 100%. Los niveles de intensidad de infestación fueron estadísticamente significativos en *R. iyengari* entre pH 4.5 a 8.0 con niveles de IINF 4.42 a 8.45. Y los niveles de infestación estadísticamente significativos para *R. culicivorax* fueron entre pH 5.0 a 7.5 con niveles de infestación de 3.07 y 3.63 nematodos por larva de mosquito.

ABSTRACT

Effects of salinity and pH were assessed on the infective capacity of parasitic nematodes of mosquitoes *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith and *Romanomermis iyengari* (Welch), on larvae of southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. Thirteen pH levels (3.6, 3.8, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.2, and 8.4) were evaluated. Six salinity levels (NaCl concentrations) were evaluated, with values of 0.01 M (584 mg/L), 0.02 M (1,169 mg/L), 0.03 M (1,753 mg/L), 0.04 M (2,338 mg/L), 0.05 M (2,922 mg/L), and a 0.00 M check, with three replications. Percentage of infection (of parasitized larvae) and infestation intensity (average nematodes parasitizing a mosquito larva) were recorded for both factors. To determine effects of pH and salinity on percentage of infection and infestation intensity, a sample (n = 20, IV instar) of larvae surviving at high salinity levels was extracted 5 days after application. The greatest percentage of infection statistically significant in *R. iyengari* was 75 to 91.7 for pH 5.0 to 7.5, and 86.7 to 100 for *R. culicivorax* between pH 6.0 and 7.0. The greatest infestation intensity statistically significant in *R. iyengari* was 4.42 to 8.45 between pH 4.5 and 8.0. The greatest levels of infestation statistically significant in *R. culicivorax* were between pH 5.0 and 7.5 with 3.07 and 3.63 nematodes per mosquito larva.

INTRODUCTION

Non-chemical alternatives are needed to reduce the use of insecticides and develop an efficient system to manage mosquitoes. Insecticides have polluted the environment and enhanced development of insecticide-resistant mosquitoes. Mosquito biological control with nematodes in the family Mermithidae is a viable alternative to consider. Studies with *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith have demonstrated infection of more than 90 mosquito species (Petersen and Chapman 1979, Platzer et al. 2005), and *Romanomermis iyengari* (Welch) evaluated in numerous species of mosquitoes, has potential to control mosquito larvae (Chandras and Rajagopalan 1979; Pridantseva et al. 1990; Vladimirova et al. 1990; Santamarina et al. 1992, 1996; Paily and Balaraman 1990; Pérez et al. 2004, 2005, 2015). Preparasitic nematodes (Juvenile 2), are the infective stage for mosquito larvae. Infective capacity can be affected by abiotic factors such as pH and salinity where the nematodes are applied (Petersen and Willis 1970; Brown and Platzer 1978; Petersen 1979; Pridantseva et al. 1990; Pérez et al. 2004, 2005). The duration of viability and infectivity of preparasitic nematodes is vital to achieve large amounts of infestation of mosquito larvae and effectiveness of this alternative biological control of mosquito larvae. We evaluated the effect of salinity and pH on the infectivity of *R. iyengari* and *R. culicivorax* for larvae of southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say.

MATERIALS AND METHODS

R. culicivora and *R. iyengari* nematodes and larvae of *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes were obtained from the “Mass Production facility” at CIIDIR (Interdisciplinary Center of Investigation for Integrated Regional Development, Oaxaca City, Mexico). Nematode cultures in plastic containers (21 x 14 x 6 cm) containing river sand were stored for 6 weeks at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Pérez et al. 2003). As needed, the containers were filled with distilled water to induce hatching of eggs and emergence of preparasitic juveniles (J2).

Effect of pH. Thirteen solutions with different pH values (3.6, 3.8, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.2, and 8.4) were evaluated. The solutions used for each pH value were obtained by varying the proportions of a citric acid solution (pH 3.0) and another of sodium citrate (pH 9.5). Five-hundred milliliters of solution for each pH were added to polyethylene containers (21 x 13.5 x 5.5 cm) to which 100 second-instar mosquito larvae and 1,000 preparasitic nematodes (dose = 10 nematodes:one mosquito larva) were added. After 24 hours, the mosquito larvae were captured by pouring the tray contents into a #20 ($\phi = 0.84$ mm) sieve, washed with distilled water, and rinsed off the sieve into trays with 500 ml of distilled water. The larvae were fed daily, except on the day of infestation, with powdered fish food (Aпитilapia - Nutripec Purina®, Oaxaca, Mexico). Five days after infestation, 20 larvae from each tray (experimental unit) were dissected with entomological needles with the aid of a stereomicroscope to determine the number of nematodes in each mosquito larva (percentage infection: number of parasitized larvae per total number of larvae exposed to infection) (Pérez et al. 2004) and number of nematodes per infected larvae (intensity of infection). The bioassays were replicated three times at 25°C .

Effect of Salinity. Six treatments of different concentrations of NaCl 0.00 M (check, distilled water), 0.01 M (584.0 mg/L), 0.02 M (1,169 mg/L), 0.03 M (1,753 mg/L), 0.04 M (2,338 mg/L), and 0.05M (2,922 mg/L) were evaluated. Five-hundred milliliters of solution from each of the salt concentrations were added to polyethylene

trays (22 x 13 x 9.5 cm). One hundred second-instar larvae of *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes and 500 preparasitic *R. iyengari* or *R. culicivora* nematodes (dose = five nematodes:one mosquito larva) were added. The mosquito larvae were fed daily, except on the day of infection, with ground fish food (Aptilapia® level 1). When the mosquito larvae reached fourth instar, they were individually transferred into small plates and examined daily for the emergence of postparasitic nematodes (juvenile 4) to record the percentage of infestation (number of mosquito larvae parasitized by the total number of larvae exposed to the infection) and intensity of infestation (number of nematodes per larva infested). The experiments were replicated three times at 25°C.

Statistical Analysis. The experimental design was random with three replications. Analysis of variance and Tukey's test ($p < 0.05$) were used to determine differences among treatment means.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of pH. Variation in pH significantly ($\alpha = 0.05$, $p < 0.0001$) affected intensity and percentage of infection by *R. iyengari* and *R. culicivorax* nematodes in *Cx. quinquefasciatus* mosquito larvae in water with 13 pH values. Intensity of infection was 4.42 to 5.07 in *R. iyengari* at pH 4.5-8, and 3.07 to 3.63 in *R. culicivorax* with pH 5.0-7.5 (Table 1, Fig. 1).

R. iyengari caused greater intensity of infection, with a greater range of infectivity in the different pH solutions and was the species more efficient in parasitizing *Cx. quinquefasciatus*. The optimum range of infectivity with *R. iyengari* was between pH 4.5 and 8.0, where they averaged 4.41 to 10.23 nematodes per mosquito larva and percentage of infection of 63.3 to 100%.

The optimum range for infectivity by *R. culicivorax* was pH 5.0 to 7.5 where it caused averages of intensity of infection of 3.06 to 6.67 nematodes per larva and percentage of infectivity from 65 to 100% (Table 1). With pH of 7.0, *R. iyengari* had the greatest average intensity of infection by 10.23 nematodes per mosquito larva.

Effect of Salinity. Analysis of variance determined that different concentrations of NaCl in water caused very significant ($\alpha = 0.05$, $p < 0.0001$) statistical differences in intensity and percentage of infection by *R. iyengari* and *R. culicivorax* nematodes in *Cx. quinquefasciatus* mosquito larvae in water with six degrees of salinity (Table 2). Greatest capacity for infection by the two species of nematodes was in distilled water with no salt and 0.01 M (500 mg/L).

Table 1. Effect of pH in the Infective Capacity of *Romanomermis iyengari* and *R. culicivora* Nematodes against *Culex quinquefasciatus* Mosquito Larvae

pH	Intensity of infection ^a		% of infection	
	<i>R. iyengari</i>	<i>R. culicivora</i>	<i>R. iyengari</i>	<i>R. culicivora</i>
3.60	0.03 b	0.03 d	3.33 d	3.33 g
3.80	0.23 b	0.28 d	13.33 d	20.00 fg
4.00	0.83 b	0.92 cd	28.33 cd	35.00 ef
4.50	4.42 ab	1.95 bcd	63.33 bc	53.33 de
5.00	5.85 ab	3.07 abcd	75.00 ab	65.00 cd
5.50	7.20 a	4.07 abc	83.33 ab	76.66 bc
6.00	8.68 a	5.57 ab	91.66 ab	86.66 abc
6.50	9.73 a	6.62 a	98.33 ab	93.33 ab
7.00	10.23 a	6.67 a	100.00 a	100.00 a
7.50	8.45 a	3.63 abcd	91.66 ab	75.00 bcd
8.00	5.07 ab	1.03 cd	63.33 bc	36.66 ef
8.20	1.03 b	0.20 d	35.00 cd	15.00 fg
8.40	0.38 b	0.07 d	16.66 d	6.66 g

Means followed by different letters in a column are significantly different, $P < 0.05$.

^aIntensity of infection = nematodes per larva.

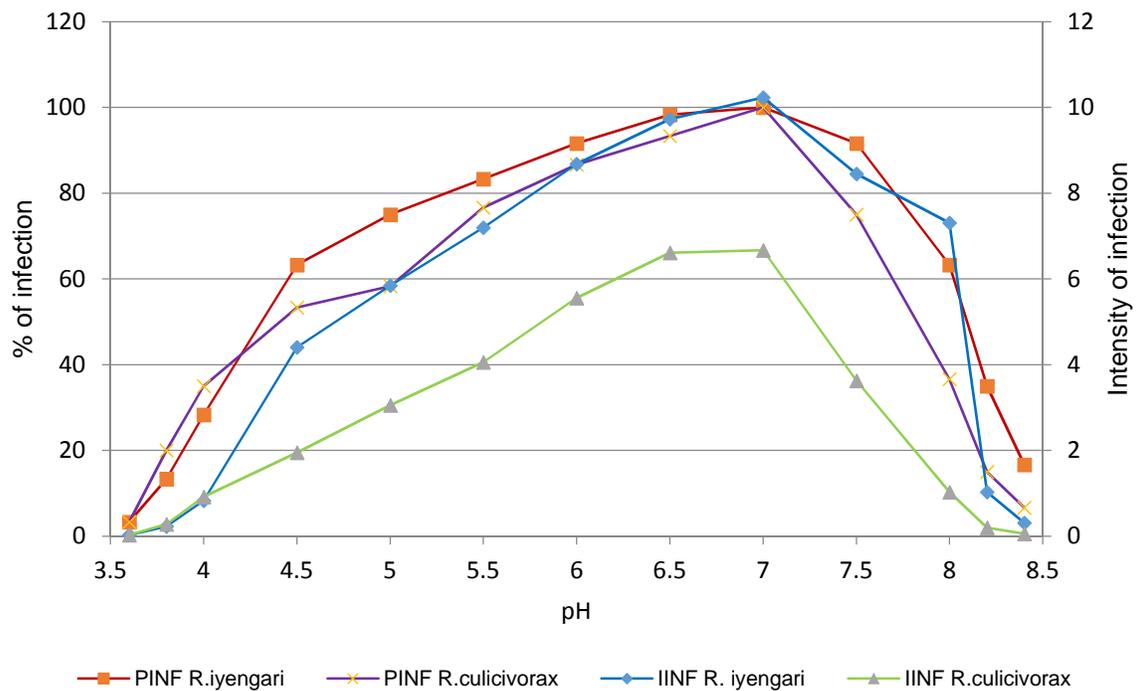


Fig. 1. Effect of pH in the infective capacity of nematodes *Romanomermis iyengari* and *R. culicivora* against mosquito larvae *Culex quinquefasciatus*. PINF - percent infection. IINF - intensity of infection.

Table 2. Effect of Salinity (Sodium Chloride) on Infective Capacity by *Romanomermis iyengari* and *R. culicivora* Nematodes against Larvae of *Culex quinquefasciatus* Mosquito

Concentration of NaCl	Intensity of infection ^a		% of infection	
	<i>R. iyengari</i>	<i>R. culicivora</i>	<i>R. iyengari</i>	<i>R. culicivora</i>
0.00 M (Testigo)	5.07 a	4.50 a	100.00 a	100.00 a
0.01 M (584 mg/l)	3.77 ab	3.05 b	86.67 a	81.67 b
0.02 M (1169 mg/l)	1.77 bc	1.30 c	56.67 b	53.33 c
0.03 M (1753 mg/l)	0.30 c	0.05 d	18.33 c	5.00 d
0.04 M (2338 mg/l)	0.10 c	0.01 d	10.00 c	1.67 d
0.05 M (2920 mg/l)	0.03 c	0.00 d	3.30 c	0.00 d

Means followed by different letters in a column are significantly different, $P < 0.05$.

^aIntensity of infection = nematodes per larva.

R. iyengari caused greater intensity of infection, greater infectivity in the different degrees of salinity evaluated, indicating it was the species more efficient in parasitizing *Cx. quinquefasciatus*. In distilled water, *R. iyengari* caused average intensity of infection of 5.07 and 3.77 nematodes per larva and percentage of infection of 100 and 86.7% (Table 2, Fig. 2). *R. culicivora* caused intensity of infection of 4.5 and 3.05 nematodes per larva and percentage of infection of 100 and 81.7%. At the dose used (five nematodes per larva), *R. iyengari* had slightly greater tolerance than *R. culicivora* in the different salt concentrations. The two species of nematode caused infection in *Cx. quinquefasciatus* larvae in a concentration range of NaCl from 0.0 M (distilled water) to 0.05 M (2,922 mg/L) that was minimal, with great reduction in intensity and percentage of infection with increasing amounts of salinity.

Results from percentage and intensity of infestation caused by *R. iyengari* and *R. culicivora* nematodes on *Cx. quinquefasciatus* mosquito larvae in water with different concentrations of salt (sodium chloride) and different amounts of pH, indicated the importance of the values (indices) of salinity and pH of water (water bodies) where parasitic nematodes (J2) were applied, because percentage and intensity of infection by nematodes on mosquito larvae are affected by physical and chemical characteristics of the water at the breeding site. Variability of *R. iyengari*

infection in the field against mosquito larvae has been related to high salinity adversely affecting nematode search and parasitic capacity (Vladimirova et al. 1990).

Several reports recorded the ability of *R. iyengari* nematode for field and laboratory control of mosquito larvae (Gajanana et al. 1978; Prindantseva et al. 1990; Vladimirova et al. 1990; Santamarina 1994; Santamarina et al. 1992, 1996, 1999; Pérez-Pacheco et al. 2003, 2004, 2005). However, there are few studies to determine the adverse effect of salinity on the infective capacity of parasitic nematodes of mosquito larvae in various environmental conditions. Salinity is a hydroecological factor that affects parasitism by *R. iyengari* in *Cx. quinquefasciatus* mosquito larvae and might be a determinant to predict its effect on larvae that develop under different conditions (Pérez et al. 1999).

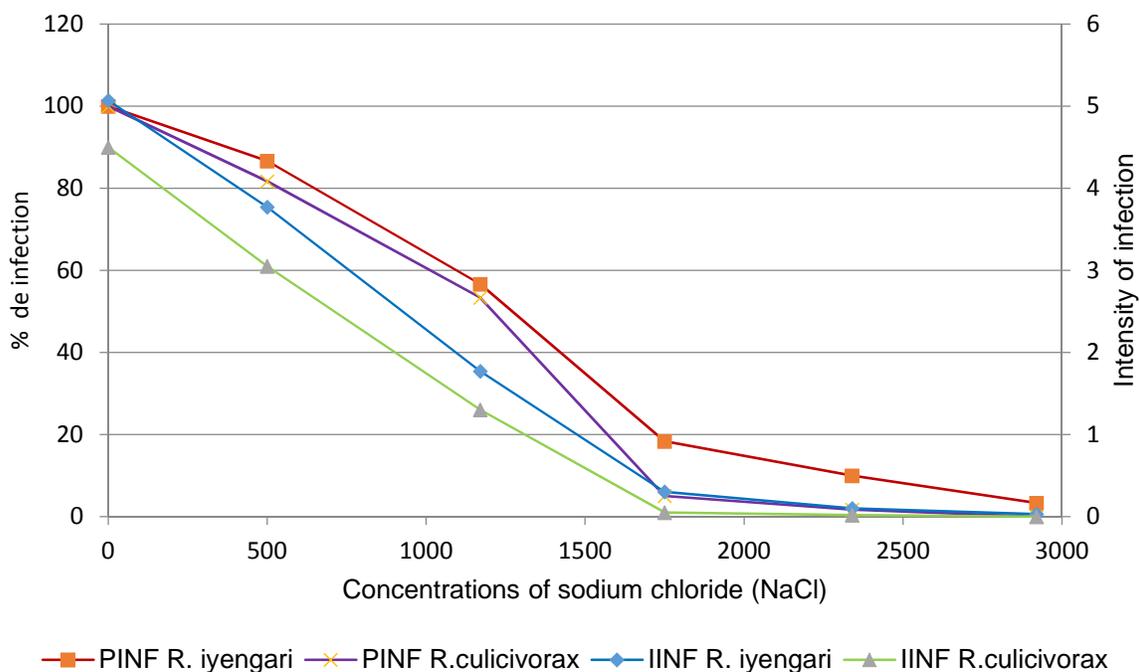


Fig. 2. Effect of salinity (sodium chloride) on the infective capacity of *Romanomermis iyengari* and *R. culicivora* nematodes against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. PINF = percent infection. IINF = Intensity of infection.

Petersen and Willis (1970) studied the effect of salinity on parasitic capacity by *R. culicivora* and found the nematode was not infective at salinities of 2,300 mg/L NaCl (0.04 M). This is in agreement with results from the present study.

Most available information on salt tolerance in freshwater animals involves arthropods and vertebrates. Pérez et al. (1999) found that mosquito larvae of the genus *Anopheles* that are vectors of the causal agent of malaria develop in breeding grounds with clean water with low salt content and neutral pH. Salinity ranges from 115 to 280 mg/L and 5.8 to 8.3 pH in the coastal region of the state of Oaxaca, which is one of the most important endemic areas of malaria in Mexico.

The mechanism by which ions affect infectivity by nematodes has yet to be determined. Toxicity at high ion concentrations might be 1) the result of increased osmotic pressure and subsequent water loss in nematodes, 2) imbalance in internal ion balance, 3) general toxic effects of nitrates and nitrites, 4) alteration of the internal balance of acid-base. It might be speculated that an increase in metabolic rate stimulated by salts can deplete energy resources of the infective stage before making contact with the host, reducing the infectious potential of the nematodes (Von Brand 1943). In addition, a decrease of water in the body of the nematodes in high concentrations of salt probably diminished its motility and consequently, infectivity. Ion imbalances in infective nematodes and consequently metabolic disorders interfere with infectious capacity of preparasitic agents (Brown and Platzer 1978).

In evaluations by Bheema et al. (1979) to determine the effect of salinity in preparasitic nematodes of *Romanomermis* sp. subjected preparasitic to a range of 580-7,590 mg/L of NaCl for 30 minutes in *C. fatigans* larvae, *Romanomermis* sp. could not tolerate concentrations greater than 1,750 mg/L. *R. iyengari* tolerated greater salinity and parasitized larvae of *C. quinquefasciatus* mosquitoes, coinciding with the findings of Pérez-Pacheco et al. (1999) who demonstrated infectivity capacity by *R. iyengari* nematodes in salinities of 2,920 mg/L of NaCl.

The difference in infectivity of the two species of nematodes indicated that with *R. iyengari*, it is possible to increase percentage and intensity of infection depending on the dose of nematodes applied or according to the assertion reported by Brown and Platzer (1978) by the type of salt dissolved in water. This is a promising result because a single nematode that penetrates a mosquito larva guarantees death.

Chen (1976) reported that the optimal pH for infection by *R. culicivorax* (reported as *Reesimermis nielsenii*) was 6.7-7.2. Brown and Platzer (1978) reported that parasitism occurred from 3.6-8.6 pH. Similarly, Petersen and Willis (1970) reported that hosts of mosquito larvae were easily infested between 5.4 and 7.9 pH. The values in the experiments resembled these results, with parasitism greater than 75%, and even 100% by the two species of nematodes at 7 neutral pH.

Salinity greater than 1,170 mg/L of NaCl adversely affected parasitic *R. iyengari* nematodes of mosquito larvae by generating osmotic stress that affected approximately 50% of the infectivity and survival capacity of the nematode to 1.77 and 1.30% parasitism in the laboratory for *R. iyengari* and *R. culicivorax*, respectively. The optimal range of infectivity by *R. iyengari* in NaCl concentrations was 500 to 1,000 mg/L. Parasitism was greater than 80% and mean infestation greater than 3.0 nematodes per *Cx. quinquefasciatus* larva parasitized by either species of nematode. Regarding tolerance to different pH, infestation of *Cx. quinquefasciatus* larvae by *R. iyengari* was possible between 3.6 and 8.4 pH and 3.6 to 8.6 pH by *R. culicivorax* nematodes.

Acknowledgment

To Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca (ciidiroaxaca@ipn.mx), Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Montecillo and to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for supporting this research.

References Cited

- Bheema, U. W., A. Gajananaand, and P. K. Rajagopalan. 1979. A note on the tolerance of the mermithid nematode, *Romanomermis* sp., to different pH and salinity. *Indian J. Med. Res.* 69: 423-427.
- Brown, B. J., and E. G. Platzer. 1978. Salts and the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. *J. Nematol.* 10: 53-61.
- Chandrabhas, R. K., and P. K. Rajagopalan. 1979. Mosquito breeding and the natural parasitism of larvae by a fungus *Coelomomyces* and mermithid nematode *Romanomermis* in paddy fields in Pondicherry. *Indian J. Med. Res.* 69: 63-70.
- Chen, P. S. 1976. A study of *Reesimermis nielsenii* for control of *Culex pipiens fatigans* in Taiwan. *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica* 15: 21-28.
- Gajanana, A., S. J. Kazmi, R. U. S. Bheema, S. C. Suguna, and R. K. Ahas. 1978. Studies on nematode parasite (*Romanomermis* sp: Mermithidae) of mosquitoes larvae isolated in Pondicherry. *Indian J. Med. Res.* 68: 242-247.
- Paily, K. P., and K. Balaraman. 1990. Effect of temperature and host-parasite ratio on sex differentiation of *Romanomermis iyengari* (Welch), a mermithid parasite of mosquitoes. *Indian J. Exp. Biol.* 28: 470-474.
- Pérez, P. R., G. Montesino, y H. C. Rodríguez. 1999. Salinidad y pH , factores que afectan el parasitismo de *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*, pp. 21-22. *Avances en la investigación. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.*

- Pérez, P. R., H.C. Rodríguez, R. J. Lara, B.R. Montes, y V. G. Ramírez. 2003. Susceptibilidad de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* Welch. Entomol. Mex. 42: 321-327.
- Pérez-Pacheco, R., H. C. Rodríguez, R. J. Lara, B. Monte, V. G. Ramírez, y M. L. Martínez. 2004. Parasitism of *Romanomermis iyengari* in larvae of three species of mosquito in the laboratory and in *Anopheles pseudopunctipennis* in the field. Agrociencia 38: 413-421.
- Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez-Hernández, J. Lara-Reyna, R. Montes-Belmont, y J. Ruiz-Vega. 2005. Control of the mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, Mex. Biol. Control. 32: 137-142.
- Pérez-Pacheco, R., E. G. Platzer, D. Woodward, and B. C. Hyman. 2015. Bioassays for comparative infectivity of mermithid nematodes (*Romanomermis iyengari*, *Romanomermis culicivorax* and *Strelkovimermis spiculatus*) for culicine mosquito larvae. Biol. Control 80: 113-118.
- Petersen, J. J. 1979. pH as a factor in parasitism of mosquito larvae by the mermithid *Romanomermis culicivorax*. J. Nematol. 11: 105-106.
- Petersen, J. J., and H. C. Chapman. 1979. Checklist of mosquito species tested against the nematode parasite *Romanomermis Culicivorax*. J. Med. Entomol. 15: 468-471.
- Petersen, J. J., and O. R. Willis. 1970. Some factors affecting parasitism by mermithid nematodes in southern house mosquito larvae. J. Econ. Entomol. 63: 175-178.

- Platzer, E. G., B. A. Mullens, and M. M. Shamseldean. 2005. Mermithid nematodes, pp. 411-418. *In* P. S. Grewal, R. U. Ehlers, and D. I. Shapiro-Ilan [eds.], *Nematodes as Biocontrol Agents*. CAB International, Wallingford, UK.
- Prindantseva, E. A., N. I. Lebedeca, Z. P. Sherherban, and M. K. Kadyrova. 1990. An evaluation of the possibility for mosquito control in Vzbekistan. *Med. Parasitol.* 1: 15-17.
- Santamarina, M. A. 1994. Actividad parasítica de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Misc. Zool.*17: 59-65.
- Santamarina, M. A., I. A. García, and R. B. González. 1992. Capacidad infestiva del nematodo parasito *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquitos en condiciones naturales. *Rev. Cubana Med. Trop.* 44: 92-97.
- Santamarina, M. A., G. M. Ruiz, A. E. Rodríguez, A. H. Bustamante, and R. P. Pacheco. 1996. Effectiveness of *Romanomermis culicivorax* in *Anopheles pseudopunctipennis* and *Culex quinquefasciatus* in México. *Misc. Zool.* 19: 33-37.
- Santamarina, M. A., P. R. Pérez, M. S. H. Tomas, C. L. Enrique, and A. G. Flores. 1999. The *Romanomermis iyengari* parasite for *Anopheles pseudopunctipennis* suppression in natural habitats in Oaxaca State, Mexico. *Revista Panam. Salud Pública* 5: 23-28.
- Vladimirova, V. V., E. A. Prindantseva, A. K. Gafurov, and M. E. Muratova. 1990. A trial of *Romanomermis iyengari* and *R. culicivorax* mermithids as a means for controlling blood-sucking mosquitoes in the Tadznik. *Med. Parasitol.* 3: 42-45.

Von Brand, T. 1943. Physiological observations upon a larval Eustrongylides. IV. Influence of temperature, pH and inorganics upon the oxygen consumption. Biol. Bull. 84: 148-156.

CAPITULO II

Generación de líneas puras de nematodos *Romanomermis iyengari* Welch parásitos de larvas de mosquitos tolerantes a la salinidad

RESUMEN

El nematodo parásito de mosquitos *Romanomermis iyengari*, es un usado como una forma de control biológico en criaderos naturales de larvas de mosquitos, ha sido estudiada y presenta capacidad de almacenamiento a gran escala. Sin embargo presenta limitaciones de uso en campo, debido a que una de los factores que condicionan su capacidad de infestación en campo es la salinidad presente en los criaderos. Esta limitación puede ser superada a través del mejoramiento genético, existen cuatro estrategias potenciales de manipulación genética: selección artificial, hibridación (uso de heterosis), mutación y técnicas de ADN recombinante (Glazer, 2015). Este nematodo se reproduce por anfimixis (mediante el apareamiento de machos y hembras) que permite el cruzamiento. La reproducción sucesiva para el rasgo tolerancia a salinidad 2000 mgL^{-1} del nematodo *R. iyengari* se realizó en el trascurso siete generaciones filiales. La evaluación de su capacidad parasítica al termino del proceso de selección de las cepas de líneas puras *R. iyengari* H3 y F8(1) comparándola con las cepas *R. iyengari*, *R. culicivorax*, *R. wuchangensis* en condiciones de estrés salino 1400 mgL^{-1} . La cepa de la línea pura H3 registraron los porcentajes de parasitismo y medias de infestación más altos en condiciones de estrés salino 78.66% y 1.6 MI . Lo que sugiere que estas técnicas de mejora genética utilizadas en nematodos entomopatogenos para mejorar su tolerancia a ambientes extremos puede ser un potencial para la mejora de factores ambientales que condicionan el uso de los nematodos parásitos de mosquitos.

ABSTRACT

The mosquito parasitic nematode *Romanomermis iyengari*, is used as a form of biological control in natural breeding sites of mosquito larvae, has been studied and has large-scale storage capacity. However, it has limitations of use in the field, because one of the factors that condition its infestation capacity in the field is the salinity present in the hatcheries. This limitation can be overcome through genetic improvement, there are four potential strategies for genetic manipulation: artificial selection, hybridization (heterosis), mutation and recombinant DNA techniques (Glazer, 2015). This nematode reproduces by amphimixis (through mating of male and female) that allows crossbreeding. The successive reproduction for the salinity tolerance trait 2000 mgL^{-1} of the nematode *R. iyengari* was made in the course of seven daughter generations. The evaluation of their parasitic capacity at the end of the selection process of the strains of pure lines *R. iyengari* H3 and F8 (1) comparing it with the strains *R. iyengari*, *R. culicivorax*, *R. wuchangensis* under conditions of salt stress 1400 mgL^{-1} . The strain of the pure line H3 registered the percentages of parasitism and higher infestation averages in conditions of salt stress 78.66% and 1.6 MI. This suggests that these genetic improvement techniques used in entomopathogenic nematodes to improve their tolerance to extreme environments may be a potential for the improvement of environmental factors that condition the use of parasitic mosquito nematodes.

INTRODUCCIÓN

El potencial de control biológico práctico y extensivo de los nematodos parásitos de mosquitos (Nematoda:Mermithidae) en campo, es afectado por su sensibilidad a condiciones ambientales extremas (Kaya y Gaugler, 1993; Pérez *et al.*, 1999). Los nematodos parásitos de mosquitos *Romanomermis iyengari* (Nematoda:Mermithidae) son sensibles a concentraciones altas de salinidad, temperatura y pH de los cuerpos de agua en donde se aplican, lo cual afecta su potencial de uso práctico y extensivo de control biológico (Pérez *et al.*, 1999) impidiendo que logren su máximo potencial como agentes de control. Al respecto se ha demostrado que los estados infectivos de *R. iyengari* no pueden sobrevivir a salinidades mayores de 0.025 M (1,46 g/L) (Santamarina *et al.*, 1998), además de una variabilidad en los niveles de infección entre 46%- 98% atribuidos a efectos de una elevada salinidad (Vladimirova *et al.*, 1990) y una reducción de hasta 38.1% debida a una variación en los intervalos de salinidad de los sitios de reproducción de los mosquitos de 115-280 mgL⁻¹ (Pérez-Pacheco *et al.*, 2005). Para superar estas limitaciones varios métodos biológicos, físicos y genéticos han sido sugeridos (Chen y Glazer, 2004). El mejoramiento genético de los nematodos ha sido sugerido y utilizado por varios expertos a lo largo de los años (Burnell, 2002; Segal y Glazer, 1998). El mejoramiento genético de nematodos para tolerar el calor y frío (Ehlers *et al.*, 2005); Grewal *et al.*, 1996), resistencia nematicida (Glazer *et al.*, 1997) o del comportamiento de búsqueda del hospedero (Gaugler *et al.*, 1989) se ha logrado principalmente por selección repetida dentro de regímenes definidos. Las estrategias de mejora genética incluyen la selección artificial, hibridación y manipulación genética (Gaugler, 1978), pudiendo ser la selección genética una poderosa herramienta para aumentar las características benéficas de agentes de control biológico (Mukuka *et al.*, 2010,a, b,c). La reproducción selectiva que consiste en realizar cruzamientos sucesivos para seleccionar caracteres deseables es un enfoque viable para aumentar la tolerancia de los nematodos al estrés (Ehlers, 2005). En esta investigación el potencial para el mejoramiento genético de la tolerancia a la salinidad se investigará a través de selección genética para aumentar

la tolerancia de los nematodos a la salinidad. El rasgo de tolerancia a la salinidad fue elegido debido al efecto adverso en la reducción de la capacidad parasítica del nematodo en condiciones de salinidades altas en los criaderos naturales donde se aplican y en consecuencia una reducción en su eficacia como agente de control biológico de larvas de mosquitos.

La reproducción selectiva que consiste en realizar cruzamientos sucesivos para seleccionar caracteres deseables es un enfoque viable para aumentar la tolerancia de los nematodos al estrés (Ehlers, 2005). En esta investigación el potencial para el mejoramiento genético de la tolerancia a la salinidad se investigará a través de selección genética sucesiva para aumentar la tolerancia de los nematodos a la salinidad y obtener líneas puras tolerantes a la salinidad.

OBJETIVOS

- 1.- Someter sucesivamente a presión de selección en condiciones de estrés salino al nematodo *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* durante ocho generaciones.
- 2.- Generar líneas puras de nematodos *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* resistentes/tolerantes a la salinidad a través de selección genética sucesiva a estrés salino.
- 3.- Evaluar la capacidad infectiva de las líneas puras de nematodos *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Mosquitos

Los mosquitos transmiten algunas de las enfermedades parasitarias y virales más graves y potencialmente mortales del mundo, incluida la malaria (*Anopheles*), filariasis (*Culex*, *Mansonia* y algunos *Anopheles spp.*) (Poopathi y Tyagi, 2006).

Estas enfermedades están aumentando en muchas áreas tropicales y subtropicales (OMS 1999). Por lo tanto, los enfoques para reducir la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores mediante el control de las poblaciones de mosquitos están altamente justificados (Poopathi y Tyagi, 2006).

El control biológico, basado en la utilización de agentes naturales para la reducción de los vectores de enfermedades humanas y animales, ha constituido en los últimos años una de las alternativas de mayor importancia en los programas de lucha antivectorial. Algunas especies de nemátodos de la familia Mermithidae han demostrado ser eficaces en el control de las larvas de mosquitos en condiciones de laboratorio y de campo (Brown et al, 1977; Petersen, 1978; Westerdahl et al., 1981).

El uso del control biológico involucra agentes como: bacterias entomófagas, hongos, microsporidianos, depredadores y parásitos contra vectores de mosquitos transmisores de enfermedades. A diferencia de los insecticidas, los agentes de biocontrol son específicos para los hospederos y seguros para el medio ambiente, fácil aplicación en el campo, bajo costo de producción, carecen de infectividad, baja patogenicidad en mamíferos, incluido el hombre, el desarrollo de resistencia en las especies de mosquitos es baja. Muchas poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades han desarrollado resistencia a los insecticidas orgánicos sintéticos, utilizados principalmente durante la última mitad del siglo XX (Poopathi y Tyagi, 2006).

El uso excesivo de insecticidas eficaces contra larvas y mosquitos adultos, como los organofosforados, carbamatos y piretroides, ha tenido como consecuencias la toxicidad para los humanos, la persistencia en el ambiente y la aparición de resistencia en los insectos vectores. Por ello se hace necesaria la búsqueda de

nuevas alternativas ecológicamente más asimilables para el control de las plagas de vectores y cuyas acciones sean más efectivas y duraderas (Santamarina y Bellini, 2000).

Nematodos parásitos de mosquitos

Nematodos de la familia Mermithidae (Enoplea: Mermithida) parasitan invertebrados terrestres y acuáticos, incluyendo especies de insectos vectores de enfermedades. Muchos insectos vectores de enfermedades son parasitados por nematodos mermitidos, durante su estado larval acuático, incluyendo moscas negras y mosquitos (Kobylnski *et al.*, 2012).

Los nematodos mermitidos son generalmente largos, blancos, delgados y traslucidos que varían en longitud desde 10 a 100 mm y son parásitos del Phylum Arthropoda (Platzer, 2007).

Los nematodos son de origen antiguo y constituyen uno de los filos de animales más específicos. Las estimaciones de los números de especies varían de 100, 000 a 100 millones aunque puede exagerados, quizás diez veces, quizás diez veces, se han descrito aproximadamente 25, 000 nematodos (Hugot *et al.* 2001; Blaxter 2003).

Los nematodos han generado un interés particular en su población y biología evolutiva porque son notablemente adaptables a prácticamente todos los hábitats ecológicos, lo que resulta en una distribución cosmopolita de vida libre y obligada en plantas y animales (Hyman *et al.*, 2011).

La biología de los mermitidos en las poblaciones de insectos acuáticos involucra estados infectivos juveniles (preparasiticos) que ingresan al hemocele mediante la penetración directa del integumento del hospedero. La etapa parasítica crece en el interior de la larva hospedera, llevando a cabo una muda. El nematodo almacena energía/sustento para la fase adulta y posteriormente mata al hospedero emergiendo como postparasitico. El desarrollo posterior de la etapa adulta y reproducción se lleva a cabo fuera del hospedero en el medio ambiente. En la etapa postparasitica los nematodos mermitidos parásitos de mosquitos se localizan en el fondo de los criaderos naturales de los mosquitos. La muerte de hospedero

parasitado es un factor importante para el desarrollo del control biológico (Platzer, 2007)

Trabajos del control biológico con nematodos parásitos de mosquitos han sido amplios, donde se han enumerado atributos como: la facilidad de aplicación, seguridad ambiental, especificidad de hospedero, manipulación en laboratorio del ciclo de vida, parasitismo letal, reproducción masiva y potencial para reciclarse en el ambiente por largo plazo (Platzer, 2007). Aunque algunos autores presentan estos atributos de forma positiva, algunos indican que la producción masiva de mermitidos es costosa y la dinámica de la población no es compatible con las características de un organismo de control ideal.

Las especies de *Romanomermis* han sido evaluadas como agentes de control biológico para combatir plagas transmitidas por insectos como la malaria y el dengue (Platzer, 1981; Petersen, 1985; Perez Pacheco et al., 2005).

Las especies *Romanomermis iyengari* y *R. culicivorax* muestran una especificidad muy alta en larvas de mosquitos. Parte de su ciclo biológico lo transcurren dentro de las larvas de mosquitos, se reciclan e infectan larvas de mosquitos temporada tras temporada en la naturaleza. Sin embargo, dado que no pueden tolerar el pH y la contaminación extremos, aún no se han desarrollado para su uso en hábitats contaminados. *R. iyengari* y *R. culicivorax* tienen un amplio rango de hospedantes y son agentes de control biológico prometedores de varias especies de mosquitos (Petersen, 1982, 1985). Ross (1906), reportó nematodos mermitidos parasitando *Cx. Quinquefasciatus* y registros posteriores muestran que las larvas de varias especies de *Anophelines* eran susceptibles al parasitismo.

El nematodo *R. iyengari* fue encontrado parasitando larvas de mosquitos en arrozales (Chandrasah y Rajagopalan, 1979), ha sido cultivado con éxito en laboratorio. Utilizado en hábitats de agua dulce, los hábitats con alto pH y salinidad afectan su capacidad infectiva (Bheema Rao et al., 1979). También se descubrió que el nematodo *Strelkovimermis spiculatus* es un agente de control biológico prometedor contra el *Cx. quinquefasciatus* en Cuba (Rodríguez et al., 2003).

Se han realizado aplicaciones en campo de *R. culicivorax* y *R. iyengari* para el control de poblaciones de Anopheles. *R. iyengari* ha sido utilizado para reducir poblaciones de vectores de malaria en *An. albimanus* en Cuba (Santamarina, 1993), *Anopheles pseudopunctipennis* en el estado de Oaxaca, México (Santamarina et al, 1999) y *Anopheles albitarsis* y *Anopheles rondoni* en el estado de Roraima, Brasil (Santamarina, 2000). *R. culicivorax* se ha utilizado para suprimir poblaciones de vectores de malaria de *Anopheles freeborni* en California, EE. UU. (Levy et al, 1979; Brown-Westerdahl et al., 1982); *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* en El Salvador (Petersen et al., 1978); *An. albimanus* en Mella Isla de la Juventud, Cuba (Santamarina et al., 1997) y *An. albimanus* en el Valle, Colombia (Rojas et al., 1987). La publicación de Rojas et al. (1987) es notable porque la liberación de *R. culicivorax* pudo haber suprimido la población de vectores y reducido la prevalencia de malaria en niños locales hasta por dos años después de la liberación de los mermítidos. El éxito de control de *A. albimanus* con *R. culicivorax*, se vio facilitado por el hecho de que las larvas de *An. albimanus* se encuentran presentes en grandes cuerpos de agua de forma vertical facilitando el uso de mermítidos (Rojas, 1987). Esta evidencia demuestra que los nematodos mermítidos pueden usarse exitosamente como agentes de control biológico de mosquitos.

Romanomermis iyengari

De los siete géneros actualmente reconocidos (*Culicimermis*, *Empidomermis*, *Hydromermis*, *Octomyomermis*, *Perutilimerms*, *Romanomermis* and *Strelkovimermis*) en la Familia Mermithidae que son parásitos de mosquitos (Poinar, 2001) el género mejor conocido es *Romanomermis* Coman.

Estudios realizados con la especie *R. iyengari* Welch han evidenciado que este nemátodo es capaz de reducir las altas densidades poblacionales de larvas de mosquitos de los géneros Anopheles, Culex y Aedes en condiciones de campo (8–10) (Santamarina y Bellini, 2000)

R. iyengari ha sido utilizado con éxito contra varias especies de anofelinos. Los resultados de algunas investigaciones han mostrado elevadas tasas de parasitismo (85 a 100%) con dosis de aplicación de 2 000 preparásitos/m² (Petersen, *et al.*, 1973). Otros estudios de campo han permitido comprobar la efectividad de *R. iyengari* para regular las poblaciones de larvas de mosquitos de diversas especies (12) y su capacidad de establecimiento y reciclaje después de la aplicación (Kerwin y Washino, 1985).

Ciclo biológico

El estado infectivo (preparasitico) de este mermithido es de vida corta y debe encontrar un hospedero adecuado (larva de mosquito) en las 72 horas a 96 horas siguientes a la eclosión de los huevos. El preparasitico penetra en la larva perforando la cutícula con su estilete. Después de un desarrollo parasitario de cinco a seis días a una temperatura de 29 oC en el interior del hospedero, emergen de las formas posparasitarias, que mata a las larvas hospederas en estadio IV de desarrollo (Santamarina y Bellini, 2000). Esta emergencia natural es necesaria para el desarrollo del adulto ya que el nematodo muda dentro del insecto antes de salir. Esta muda predispone fisiológicamente al nematodo para la vida al exterior (Nick, 1972). Las etapas postparasiticas están equipadas con un diente similar a una lanza que es utilizada para perforar al insecto desde el interior. La cavidad originada por la emergencia del posparasitico es la causa de la muerte del hospedero, debido a la pérdida de fluidos corporales. Después de que el nematodo abandona el huésped, no se alimenta y depende de los alimentos almacenados en el trofosoma (Nick, 1972). Las formas posparasitarias solo requieren un sustrato húmedo para mudar y reproducirse (Santamarina y Bellini, 2000).

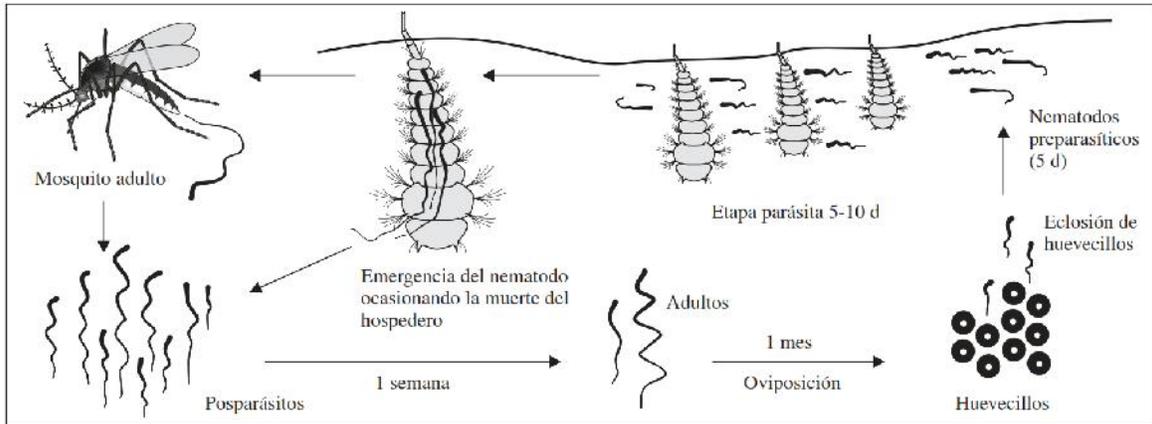


Figura 1.- Ciclo vital del nematodo *R. iyengari*, parasito de larvas de mosquito

Limitaciones ambientales de los nematodos

Con algunas excepciones, el conocimiento de las limitaciones ambientales que restringen el desarrollo de *R. culicivora*, primero porque es un parasito es fácilmente manipulado y puede aplicarse en campo y segundo otras especies de nematodos no se han investigado, sin embargo esta información es importante para su uso como agentes de control biológico.

Factores físicos

El efecto de la temperatura en el desarrollo y parasitismo para algunas especies de nematodos mermitidos está bastante documentada. Sin embargo, las limitaciones de temperaturas específicas se vuelven críticas cuando se utiliza un nematodo para controlar poblaciones de mosquitos. *R. culicivora*, naturalmente solo se encuentra en el Sur de Estados Unidos, es activo solo cuando la temperatura es superior a 15 C (Petersen, 1973). Brown y Platzer (1977) reportaron parasitismo en laboratorio a 12C; y Galloway y Brust (1977) reportaron como límite de parasitismo en campo temperaturas de 10°C, concluyendo que el uso de *R. culicivora* para el control de mosquitos en temperaturas frías es limitada. Existe variación en la tolerancia a bajas temperaturas debido a que existen especies parasitando mosquitos cerca al Círculo Polar Ártico.

El efecto de la fotoperiodicidad en el parasitismo de *R. culicivora* es controversial. Brown y Platzer (1974) reportaron que las larvas de mosquitos fueron más susceptibles al parasitismo cuando se mantuvieron en oscuridad continua. Sin embargo, Galloway y Brust (1977) reportaron que la fotoperiodicidad no tuvo efectos significativos en la infectividad. También observaron que no había interacción entre la temperatura y el fotoperiodo. En un estudio más reciente de Sharma y Gupta (1982) determinó que había una interacción definitiva entre el fotoperiodo y la temperatura en contraste con Brown y Platzer (1974), informó una alta infección larvaria en condiciones de luz continua a temperatura ambiente.

Para mermitidos acuáticos, el movimiento del agua puede ser un factor importante. Aplicaciones de *R. culicivora* contra mosquitos en pastos de California fueron ineficaces debido a que el agua fluía de forma constante en el campo, lo que provocó la eliminación de los nematodos antes de hacer contacto con el huésped (Hoy and Petersen, 1973). Intentos de parasitar larvas de simulidos con *R. culicivora* en aguas con corriente fueron inefectivos. Estas limitaciones fueron observadas en aplicaciones de *R. culicivora* en aguas con corriente realizadas en un lago en El Salvador. Las aplicaciones realizadas antes de la acción de las olas en el lago mostraron aproximadamente la mitad de parasitismo que aquellas que se efectuaron después de la actividad de las olas (Petersen et al., 1978).

La desecación no es un factor limitante para los mermitidos acuáticos. Aunque el nematodo y los huevos no pueden tolerar la desecación ni siquiera por unos pocos minutos, existe suficiente humedad incluso cuando el hábitat se seca para mantener las poblaciones de parásitos hasta que el hábitat se inunde nuevamente. En contraste, la humedad es un factor importante para los mermitidos terrestres. Los altos niveles de parasitismo de *A. decaudata* and *M. nigrescens* están asociados con ambientes persistentemente húmedos (Mongkolkiti y Hosford, 1971; Christie, 1936).

Factores químicos

Petersen y Willis (1970) reportan que *R. culicivora* fue inhibido en niveles de salinidad (0.04M NaCl). Esto fue confirmado por Brown y Platzer (1978) indicando

la toxicidad iónica para *R. culicivora* para los siguientes iones: cationes, sodio<potasio<calcio; aniones cloruro <carbonato=sulfato<nitrato<nitrito<fosfato. Por lo tanto, *R. culicivora* es ineficaz para el control de mosquitos en hábitats bajo condiciones altas de salinidad en el agua. Una similar tolerancia presenta *R. iyengari* (Bheema Rao *et al.*, 1979). En contraste, el nematodo *O. muspratti* ha mostrado que es tolerante al agua de mar diluida (3000-4000 Amhos cm⁻¹) y aguas de los agujeros de árboles (10, 000 timhos cm⁻¹) (Petersen, 1981). El mermitido *Perutilimermis culicis* en *Aedes sollicitans*, un mosquito de marisma se ha adaptado para tolerar salinidades altas de este ecosistema en el que se encuentra su hospedero.

Chen (1976) reportó que el pH óptimo para la infección de *R. culicivora* fue de 6.7-7.2. En contraste estudios recientes muestran que los mermitidos acuáticos toleran un amplio rango de pH. Brown y Platzer (1978) reportaron parasitismo en rangos de pH de 3.6-8.6. Datos similares reportados por Petersen (1979) mencionan que los mosquitos fueron infectados fácilmente en todas las concentraciones de pH evaluadas (5.4-7.9), aumentando la capacidad infectiva del nematodo en los rangos de pH más bajos. Recientemente Sharma y Gupta (1982) cita la existencia de limitaciones en los niveles de parasitismo a pH altos, concluyendo que *R. culicivora* no es adecuado para el control de *Culex quinquefasciatus* debido al pH alto característico de los hábitats de este mosquito.

Los mermithidos tienen una alta tolerancia para muchos productos químicos utilizados en la agricultura. Mitchell *et al.* (1974) reporta que la presencia de Abate, Dieldrin y GammaHCH, usados para el control de mosquitos, no afectó el parasitismo de las larvas por *R. culicivora*. Levy y Miller (1977) cita tolerancias similares para *R. culicivora* para cuatro productos pesticidas y un regulador de crecimiento. Finnet *et al.* (1977) encontró que Altosid 5E, un regulador del crecimiento de los insectos, no interfirió con el desarrollo del parasitismo. Citando que la mortalidad del hospedero en laboratorio se incrementó con la combinación de Altosid y *R. culicivora*. Los algicidas orgánicos formulados con cobre y sulfato

de cobre no afectaron la capacidad infectiva de *R. culicivora* en concentraciones utilizadas en el control de algas y malezas (Platzer y Brown, 1976).

Brown y Platzer (1978) demostraron que la exposición temporal a baja tensión de oxígeno aumento la supervivencia y la capacidad infectiva de *R. culicivora*. Sin embargo Platzer (1981) menciona que el nematodo ceso su movimiento a las ocho horas de tiempo de exposición en agua con presencia de materia orgánica y bajo contenido de oxígeno. Esto explica, al menos en parte, porque *R. culicivora* ha demostrado ser ineficaz contra mosquitos en ambientes contaminados. *Octomyomermis muspratti* tolera niveles mas altos de presencia de materia orgánica en los orificios de árboles que *R. culicivora* (Petersen, 1981), con ello se demuestra nuevamente la tolerancia de las especies de nematodos mermitidos acuáticos.

Limitaciones biológicas

Los mermitidos, con pocas excepciones, parasitan las etapas inmaduras de sus hospederos. La etapa del huésped influye en la susceptibilidad del huésped al ataque de algunas especies de mermitidos. Petersen y Wills (1970) señalan que el segundo instar de las larvas de *Cx. Quiquefasciatus* fueron más fácilmente parasitadas por *R. culicivora* el tercer instar fue menos susceptible que el primer instar y se presentó una limitación del parasitismo en larvas de cuarto instar. El tiempo de desarrollo del huésped puede influir en el control de mosquitos de rápido crecimiento, debido a que algunas especies de mosquitos de aguas de inundación se desarrollan rápidamente en la época de verano, ocasionando que el nematodo sea ineficaz dentro de las 48 horas posteriores a su eclosión.

Investigaciones realizadas citan que los depredadores y parásitos de los mermitidos reducen su efectividad, especialmente en ambientes acuáticos. Mitcheel et al. (1974) fueron los primeros en reportar la depredación de nematodos preparasiticos de *R. culicivora* por ostrácodos. Platzer y MacKenzie-Graham (1978) reportaron copépodos, gamáridos, escarabajos acuáticos, libélulas, ninfas de caballitos del diablo y cangrejos de rio pequeños. En el laboratorio, las poblaciones de nematodos parásitos fueron reducidas significativamente por densidades de copépodos de 20-

100 L⁻¹ (Platzer y MacKenzie-Graham, 1978). Estos autores concluyeron que los copépodos pueden jugar un rol significativo en el éxito o fracaso de las aplicaciones en campo de los nematodos.

Los patógenos también pueden limitar las poblaciones de mermitidos acuáticos y terrestres. Nolan (1977) reportaron la presencia de Phycomycetes y Hyphomycetes en *M. fluminalis* y sugirió que la presencia de hongos puede afectar el éxito de los mermitidos para el control de simulidos. Una alta virulencia de hongos Chytridiomycetes *Cantenaria anguillulae*, se presentó en cultivos de *R. culicivora* en laboratorio. Este problema se eliminó a través de la cría del mosquito en agua acidificada (Sterling y Platzer, 1978). Recientemente se reportó Hyphomycetes del suelo atacando huevos de *O. muspratti* en laboratorio (Platzer, 1982). El impacto de patógenos y parásitos de nematodos mermitidos en la naturaleza aun es desconocido.

Mejoramiento genético de nematodos

La genética es un medio poderoso para mejorar los cultivos y el ganado. En los últimos años, se ha utilizado una variedad de enfoques genéticos destinados a mejorar los rasgos benéficos de los nematodos entomopatógenos (EPN) (Segal y Glazer, 1998). Estos han incluido la detección y el aislamiento de poblaciones que exhiben los rasgos deseados, la selección artificial, la hibridación cruzada y, más recientemente, las manipulaciones genéticas como la mutagénesis y la ingeniería genética (Gaugler, 1987; Gaugler y Hashmi, 1996). Sin embargo, hasta hace poco, para los nematodos entomopatógenos (EPN), la idea general era que "la genética puede ser el área más descuidada", y que "un obstáculo importante para el esfuerzo de mejora genética es la falta de comprensión fundamental de la base genética de rasgos relevantes para la eficacia, y su arquitectura genética subyacente (Kaya y Gaugler, 1993).

La selección genética exitosa depende de la presencia de variación genética para el rasgo en la población sometida a presión (Segal y Glazer, 1998).

El mejoramiento genético se ha descuidado como un medio para aumentar la tolerancia ambiental de los nematodos (Gaugler, 1981). Aunque este método se usa

comúnmente para mejorar cultivos, ganado y gusanos. La cría selectiva también se ha aplicado a los agentes de control biológico, para aumentar la tolerancia a los insecticidas de los ácaros depredadores (Hoy, 1975; 1979). La manipulación genética, sin embargo, sigue siendo controvertida.

Las estrategias de mejoramiento genético incluyen la selección artificial, hibridación y manipulación genética (Gaugler 1987). La hibridación es un enfoque muy atractivo debido a su relativa facilidad y su velocidad en la transferencia de genes deseados (Legner, 1972). Sin embargo es una técnica poco utilizada para mejorar rasgos de los agentes de control biológico (Hoy, 1985), permaneciendo sin ser evaluado en nematodos entomopatógenos (Gaugler, 1987). En trabajos relacionados con este enfoque podemos citar a los realizados por Shapiro et al, (1996) quienes utilizaron el enfoque de hibridación para el mejoramiento genético del nematodo entomopatógeno *Heterorthabditis bacteriophora* al calor.

Los nematodos entomopatógenos presentan ventajas atractivas para el mejoramiento genético: tiempos entre generaciones cortos (7-10 días), facilidad de cultivo y manejo. De particular importancia es el hecho de que estos parásitos están destinados principalmente para el control por inundaciones (es decir, como insecticidas biológicos). Debido a que el mejoramiento genético se ha centrado previamente en los enemigos naturales como agentes inoculadores, donde las propiedades "salvajes" involucradas en el apareamiento, la dispersión, la selección del hábitat y la diapausa, deben ser caracteres que se conserven en el agente mejorado, para su establecimiento y reciclaje. Hoy (1986) señala que las características mencionadas aumenta en gran medida la dificultad de mejorar a los enemigos naturales y especula que los programas de selección que usan agentes inundativos podrían ser más exitosos, debido a que la disminución de las condiciones físicas no es una desventaja seria (Gaugler, 1989).

El marco para diseñar un programa de reproducción selectiva para enemigos naturales se originó con DeBach (1958) y fue revisado y ampliado posteriormente por Messenger *et al.* (1976) y Hoy (1979). Gaugler (1989) adaptado el diseño de Hoy (1979) como un plan sistemático para mejorar genéticamente los nematodos

entomopatógenos (Fig. 2). El punto uno es la elección de la especie para el mejoramiento genético (Fig. 2, no. 1). El siguiente paso es determinar los rasgos del nematodo que limitan su eficacia en campo para realizar el proceso de manipulación genéticamente (Fig.2, no2). En seguida se realiza una recolección de poblaciones ecológicamente diversas y por lo tanto genéticamente diversas (Fig 2, no3) y evaluar su potencial genético para los rasgos deseados (Fig. 2, no4). Si existen pequeñas diferencias fenotípicas para el rasgo deseado, no es práctico proceder a la cría selectiva. Sin embargo si las diferencias fenotípicas son sustanciales, entonces uno o más de los aislamientos podría contener el fenotipo deseado, y no sería necesario llevar a cabo la cría selectiva. En tal situación se realizaría la estabilidad del fenotipo dentro de un aislamiento por endogamia. Finalmente si existe diferencias genéticas, pero ninguno de los aislamientos tiene el fenotipo deseado, los aislamientos (o un subconjunto) se pueden utilizar para crear una cepa de base con un alto grado de heterocidad (Fig. 2, no5) antes de continuar la cría para el fenotipo deseado (Fig. 2, no 6).

Segal y Glazer (1998) establecieron un proceso de selección genética para la tolerancia al calor y nematicidas en *Heterorhabditis bacteriophora*, demostrando que el proceso de selección al calor fue efectivo, pero lo asociaron con el deterioro del potencial reproductivo. La selección de resistencia a nematicidas fue muy efectiva, manteniéndose aun cuando se eliminó la presión de selección y no afecto otros aspectos de la eficacia del agente de control.

Durante los últimos años se ha emprendido un esfuerzo sistemático para mejorar genéticamente a los nematodos entomopatogenos, utilizando diferentes enfoques de selección con el afán de rasgos benéficos (Segal y Glazer, 1998).

El deterioro en aspectos de la condición física que no se han seleccionado es una observación común en los experimentos de selección. Se ha sugerido que evitar los cuellos de botella durante el régimen de selección, al asegurar una gran población de sobrevivientes en cada ciclo de selección, podría reducir este problema (Hopper *et al.*, 1993; Kaya y Gaugler, 1993). En un estudio posterior destinado a mejorar la

resistencia al nematocida (Glazer *et al.*, 1997), estas consideraciones se tuvieron en cuenta y podríamos demostrar mejor el poder de la selección.

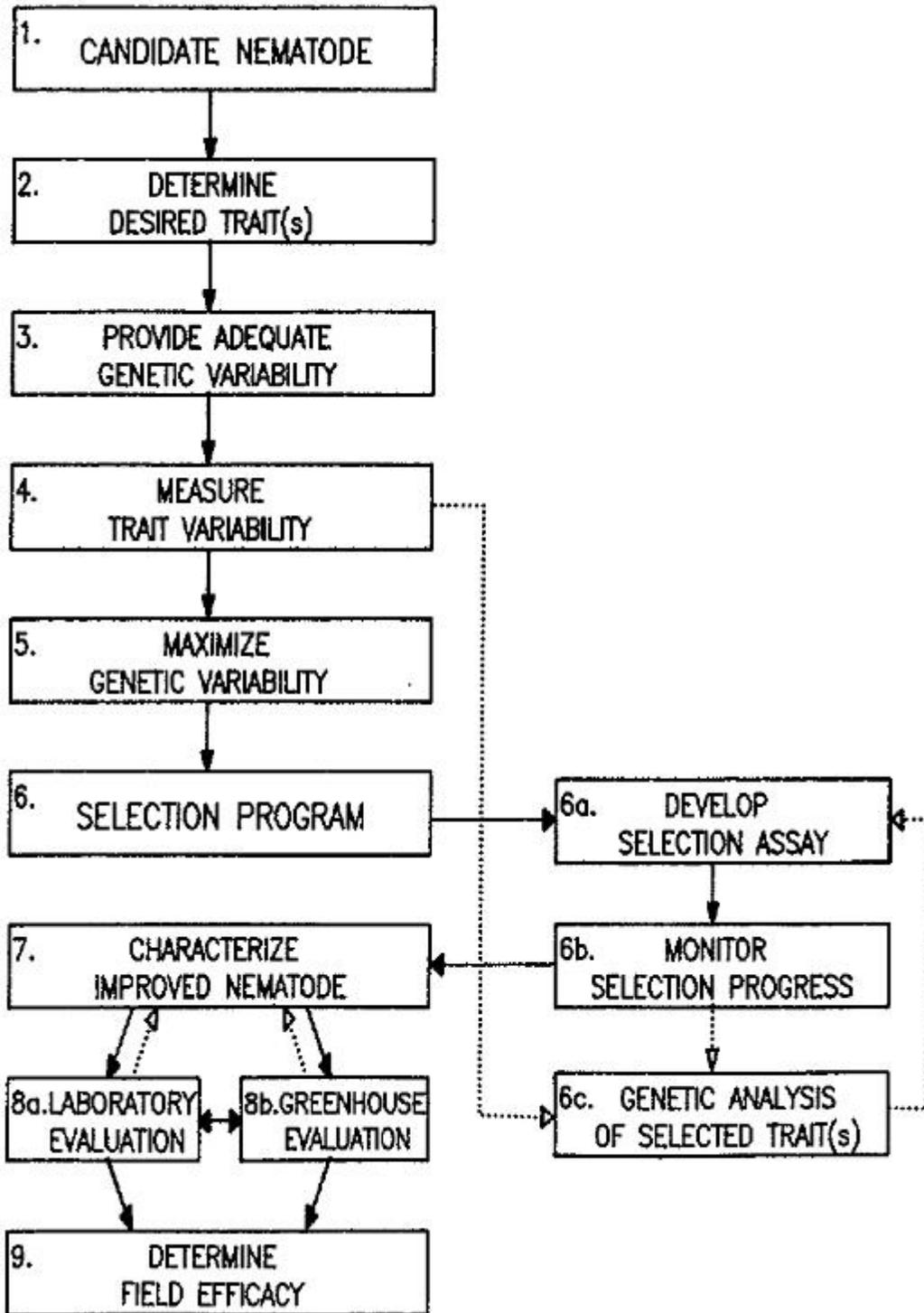


Figura 2. Diseño sistemático del plan de mejoramiento genético para nematodos entomopatógenos (Gaugler *et al.*, 1989)

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se consideró como base la metodología sugerida por Gaugler *et al.* (1989), para el mejoramiento genético de nematodos entomopatogenos con algunas adaptaciones para nematodos parásitos de mosquitos.

Material biológico

Cultivo del nematodo y mantenimiento

El nematodo parasito de mosquitos *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) es una especie tropical originalmente encontrada en el hemocele de larvas de *Anopheles subpictus* en la India (Welch 1964, WHO 1980). Esta especie fue empleada por primera vez en México en el estado de Oaxaca (Pérez *et al.*, 1996). Desde entonces, esta cepa se ha reproducido en condiciones no selectivas en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* según la metodología de Pérez *et al.* (2003) en las instalaciones de la planta de producción masiva de nematodos parasitos de larvas de mosquitos (Bioplanta), perteneciente al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Oaxaca del Instituto Politecnico Nacional.

Cría masiva de mosquitos

El ciclo de vida del mosquito *Culex quinquefasciatus* utilizado como hospedero en el proceso de selección de las líneas puras del nematodo *Romanomermis iyengari*, fue reproducido de forma constante en el laboratorio de la Bioplanta para disponer de material biológico para los bioensayos y cría del nematodo, siguiendo la metodología de Pérez *et al.* (1996).

Selección de nematodos hembras *R. iyengari* tolerantes a salinidad

Se eligió la cepa de la especie *Romanomermis iyengari* (nematoda:mermithidae) en *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) debido a que ha sido utilizada con éxito contra varias especies de anophelinos, demostrando su capacidad de infestación.

Sin embargo en evaluaciones anteriores en condiciones de salinidad ha registrado reducción en su capacidad parasítica debido a la influencia de este factor físico-químico.

Para seleccionar hembras tolerantes a salinidad, se evaluó la capacidad infectiva de los nematodos preparasíticos (Juvenil 2) de *R. iyengari* expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) (Sodium Chloride S271-500®) en el experimento descrito en el capítulo 1.

Las hembras postparasíticas tolerantes a la salinidad que infectaron larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus* en niveles salinos 1600 mg L⁻¹, 1800 mg L⁻¹ y 2000 mg L⁻¹, fueron seleccionadas por su tolerancia que les permitió la sobrevivencia e infectividad en condiciones adversas. Estas hembras fueron consideradas la población base a lo largo del estudio. Se obtuvo un total de diez hembras tolerantes, denominadas: 1600 mg L⁻¹ (T8) (H1, H2, H3 y H4); 1800 mg L⁻¹ (T9) (H1, H2, H3) y 2000 mg L⁻¹ (T10) (H1, H2, H3). A estas hembras se les consideró como la generación filial cero (F0).

Proceso de selección de líneas puras de *R. iyengari* tolerantes a NaCl

El proceso de selección para obtener líneas puras tolerantes a altos niveles de salinidad se desarrolló durante cinco años (2010-2015). Las hembras obtenidas en cada generación fueron reproducidas y evaluadas en soluciones salinas 2000 mg L⁻¹, para continuar induciendo la tolerancia a la salinidad y el nivel de capacidad infectiva en cada generación filial.

La progenie de cada una de las hembras emergidas de soluciones salinas 1600 mg L⁻¹, 1800 mg L⁻¹ y 2000 mg L⁻¹ se evaluaron como líneas tolerantes a salinidad. Los postparasíticos emergidos se depositaron de forma independiente machos y hembras en pocillos individuales de platos de cultivo de tejidos de doce pocillos con tapa de baja evaporación donde previamente se depositó agua destilada y arena esterilizada.

Para determinar la fecundidad de cada una de las hembras emergidas, se realizó la cruce de los nematodos adultos, depositando una hembra y dos machos en cada

pocillo de cultivo celular que contenía agua destilada y arena, este procedimiento se repitió para cada una de las hembras en cada generación filial.

Se realizaron observaciones de acercamiento entre hembras y machos, copula y oviposición de los nematodos cada 15 minutos durante las primeras 5 horas y posteriormente las observaciones continuaron cada 24 horas. Al inicio de la copula se realizaron observaciones cada día hasta observar la oviposición, posteriormente cada tercer día las parejas se cambiaron a pocillos diferentes para facilitar el conteo de huevos durante el periodo de oviposición. Se descartaron las hembras que no ovipositaron.

Para evaluar la capacidad infectiva de la descendencia de cada una de las hembras, los preparasiticos fueron extraídos con una pipeta pasteur en cada una de las cruzas. En cada pocillo se depositó 5 mL de solución salina 2000 mg L^{-1} , una larva de II instar de *Cx. quinquefasciatus* y diez nematodos preparasiticos. Las larvas de *Cx. quinquefasciatus*, se alimentaron diariamente a partir de la infestación depositando una gota de alimento en el segundo día posterior a su infestación y se incrementó durante su desarrollo hasta la emergencia del nematodo postparasitico o se convirtiera en pupa. Al término del parasitismo se registró el Porcentaje de Parasitismo (Porcentaje de larvas parasitadas por nematodos) y la Media de Infestación (número promedio de nematodos parasitando una larva de mosquito).

La misma metodología se usó en las siete generaciones filiales F1,F2, F3,F4,F5,F6 y F7. En la generación filial ocho (F8) se determinó finalizar el proceso de selección y se evaluó la capacidad infectiva de las líneas puras. Para la evaluación se realizó la reproducción sucesiva de las líneas puras en agua destilada para obtener medios de cultivo suficientes para las evaluaciones.

Evaluación y comparación de la capacidad parasítica de dos líneas puras *R. iyengari* tolerantes a la salinidad y tres especies de nematodos parásitos de larvas de mosquitos

Para evaluar y comparar la capacidad parasítica de las cepas puras F7 (T1600H2F8(3) y T1800H1(2)F8(1) obtenidas de proceso de selección genética a estrés salino que presentaron mayor capacidad infectiva al finalizar el proceso de selección y comparó con tres especies de nematodos (*R. iyengari*, *R. culicivorax* y *R. wuchangensis*).

Para determinar la capacidad parasítica de las líneas puras se realizaron dos evaluaciones: en la primera se utilizaron dos tipos de agua (agua destilada y agua salina a una concentración de 1,400 mg L⁻¹). Se utilizó como unidad experimental un vaso de plástico de 150mL de capacidad, con 50mL de agua destilada o 50mL de agua salina a una concentración de 1,400 mg L⁻¹ de NaCl donde se depositaron 25 larvas de mosquitos *Culex pipiens* de II instar y 250 nematodos preparasíticos que representa una dosis de 10:1 (10 nematodos por larva) y se colocó un testigo, compuesto por 25 larvas de II instar que no fueron infestadas con nematodos. Cuando las larvas llegaron al III instar, las larvas se transfirieron a placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos en las que se depositaron de forma individual para cuantificar el número de larvas con y sin nematodos, así como el número de nematodos en las larvas parasitadas, para determinar respectivamente el Porcentaje de Parasitismo (PP, porcentaje de larvas parasitadas) y las Medias de Infestación (MI, promedio de nematodos parasitando una larva).

En la segunda evaluación se usaron dos tipos de agua (agua destilada y agua salina a una concentración de 1,400 mg L⁻¹). Por cada unidad experimental se utilizó un plato de cultivo de tejidos de 12 pocillos, donde de forma individual se depositaron inicialmente 2 mL de agua estilada o de agua salina a una concentración de 1,400 mg L⁻¹ de NaCl, posteriormente se depositó una larva de mosquito *C. pipiens* de II instar y usando un microscopio estereoscopio con una micropipeta de vidrio se depositaron 10 nematodos preparasiticos que representa una dosis de 10:1 (10 nematodos por larva) y como testigo se puso un plato de cultivo con los tipos de

agua evaluad con larvas que no fueron infestadas con nematodos, con el objetivo de determinar la influencia de cualquier factor ajeno a los tratamientos.

Cuando las larvas murieron a causa de la emergencia de los nematodos, se cuantifico el número de larvas con y sin nematodos, así como el número de nematodos en las larvas parasitadas, para determinar respectivamente el Porcentaje de Parasitismo (PP) y las medias de infestación (MI).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los datos obtenidos apoya lo que sugiere Gaugler et al (1989) respecto a que una capacidad inadecuada para encontrar al huésped puede limitar la eficacia de campo de los nematodos, lo que aumenta aún más la importancia de este rasgo como objetivo para la mejora genética.

Se determinó que la capacidad infectiva de la especie de nematodo *R. iyengari* parasito de larvas de mosquito está limitada por su tolerancia a la salinidad, por lo que esta especie es un buen candidato para selección.

Doutt y DeBach (2) consideran que una alta capacidad de búsqueda del hospedero es el atributo más importante de un enemigo natural efectivo. Para superar esta limitación, el potencial de mejoramiento genético de la tolerancia a salinidad para este rasgo fue elegido a partir de la población base tolerante y a través de selección genética sucesiva generar líneas puras.

En la figura (3), se presenta la secuencia filogenética desarrollada durante siete generaciones. Como resultado del proceso de selección de líneas puras de *R. iyengari* tolerantes a NaCl se obtuvieron dos líneas puras F7 denominadas: T8H2F8(3)F7(1)=H3 y F8T9H1(2)F8(1)= F8(1) (Figura).

Figura 3. Porcentajes de parasitismo %y media de infestación (MI) de líneas puras *R. iyengari* en el transcurso de siete generaciones sometidas a estrés salino 2000 mg L⁻¹

F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
200010	2000H2	2000H2B	2000	2000	1600	1600H2	1600H2	1600H2F8(3)
1.2%	35%	51%	63.6%	76.2%	79%	81%	97%	100%
(MI=1)	(MI=2.3)	(MI=1.3)	(MI=2)	(MI=1.5)	MI= 1.1	MI=1.1	MI=1	MI=2
					1800	1800H1	1800H1(2)	1800H1(2)F8(1)
					74%	83%	91%	100%
					MI=1	MI=2.4	MI=2.4	MI=3.8

*(%) Porcentaje de Parasitismo y (MI) Media de Infestación.

La línea pura H3, es el resultado de un proceso de selección en el transcurso de siete generaciones. Procede de la exposición inicial a 2000 mg L⁻¹ de NaCl. En la F1 esta línea pura fue denominada T10H2 con 4913 huevos ovipositados. A la emergencia de los estados preparasiticos fueron sometidos a un proceso de estrés salino (2000 mg L⁻¹) durante su proceso de parasitismo, del cual se obtuvieron cinco hembras. En la F2 se denominó T10H2B, ovipositando 2512 huevos, de los cuales se obtuvieron ocho hembras postparasiticas del proceso de parasitismo en estrés salino. En F3 debido a la cantidad de cruza (43) se agruparon las hembras que presentaron una menor cantidad de huevos ovipositados (T10H2B1, T10H2B5 y T10H2D2) formándose una sola línea denominada T10 sometida a estrés salino. En F4 fue reproducida en solución salina como línea T10. En F5 esta línea fue evaluada con la cepa 0 R.I a una concentración de 1600 mg L⁻¹ obteniendo cinco hembras postparasiticas. En F6 se denominó T8H2 y se sometio a salinidad 2000 mg L⁻¹ en el parasitismo. En F7 esta hembra se denominó T8H2F8(3). En la siguiente generación F9 esta línea pura se realizó su reproducción sucesiva para obtener cultivos de la línea pura y poderla evaluar.

La línea pura F8(1), es el resultado de un proceso de selección a estrés salino 2000 mg L⁻¹ en el transcurso de siete generaciones. Inicialmente fue tolerante a 2000 mg L⁻¹ de NaCl. En la F1 esta línea pura fue denominada T10H2 con 4913 huevos ovipositados, los estados preparasiticos fueron sometidos a un proceso de estrés salino de 2000 mg L⁻¹ en su proceso de parasitismo obteniendo cinco hembras. Para la F2 se denominó T10H2B, con 2512 huevos ovipositados, del parasitismo se obtuvieron ocho hembras. En F3 y F4 se denominó T10, en F5 se obtuvo una descendencia de seis hembras. En F6 se denominó T9H1 y su parasitismo fue realizado en solución salina. En F7 se denominó T9H1(2) y su parasitismo fue realizado en solución salina.

Se estableció un marco de referencia para diseñar un programa de reproducción selectiva para mejorar genéticamente el nematodo *Romanormis iyengari* parasito de larvas de mosquitos.

Los resultados obtenidos evidencian que la selección es un medio eficaz para mejorar la tolerancia a la salinidad en *Romanomermis iyengari*.

Los resultados obtenidos a lo largo de siete generaciones filiales de estrés salino a 2000 mg L⁻¹ de nematodos *Romanomermis iyengari* apoyan la hipótesis de que los rasgos funcionales a lo largo de una variable ambiental de distribución continua están correlacionados genéticamente (Figura 3) (Grewal et al., 1996).

La tolerancia en las líneas seleccionadas en comparación con la población base fue estable y se mantuvo después del proceso de selección, sin deterioro en rasgos relevantes determinantes en su capacidad de parasitismo como agente de control, incluida la virulencia, tolerancia a la salinidad y potencial reproductivo, coincidiendo con lo mencionado por Glazer et al (1997).

Capacidad parasítica de dos líneas puras *R. iyengari* tolerantes a la salinidad y tres especies de nematodos parásitos de larvas de mosquitos

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de PP y MI ocasionados por la aplicación de dos colonias puras de nematodos *R. iyengari* F7 H3 y F8H1 y tres especies de nematodos parásitos de mosquitos *R. iyengari*, *R. culicivorax* y *R. wuchangensis*.

Cuadro 1. Parasitismo e infestación de dos colonias puras F7 de nematodos *R. iyengari* y tres especies de nematodos parásitos de mosquitos, en larvas de *C. pipiens* usando vasos de plástico.

Especie	Agua destilada		Agua salina 1,400 mg L ⁻¹	
	Parasitismo (%)	Media Infestación	Parasitismo (%)	Media Infestación
<i>R. iyengari</i>	26.66	1.0	0.00	0.00
<i>R. culicivorax</i>	77.77	3.66	2.66	0.33
<i>R. wuchangensis</i>	67.15	2.85	1.33	0.33
Colonia H3 de <i>R. iyengari</i>	70.66	2.4	78.66	1.6
Colonia F8 de <i>R. iyengari</i>	34.00	1.2	0.0	0.0

En los tratamientos en agua destilada *R. Culicivorax*, *R. Wuchangensis* y la colonia F8H3 de *R. iyengari* se observaron Medias de infestación de más de dos nematodos por larva 3.66, 2.85 y 2.4 respectivamente y valores de PP 77.77, 67.15 y 70.66.

En los tratamientos donde se evaluó la capacidad parasítica de los nematodos en agua salina 1,400 mg L⁻¹, la colonia F8H3 de *R. iyengari* causó 78.66% de parasitismo y una media de de infestación de más 1.6 nematodos por larva resultados muy diferentes a los obtenidos con las otras especies de nematodos evaluadas, indicando su potencial para parasitar larvas de mosquito en aguas con altos niveles de salinidad.

Cuadro 2. Parasitismo e infestación de dos colonias puras F7 de nematodos *R. iyengari* y tres especies de nematodos parásitos de mosquitos, en larvas de *Cx. quinquefasciatus*, usando platos de cultivo de tejidos.

Nematodo	Agua destilada		Agua salina 1,400 mg L ⁻¹	
	Parasitismo (%)	Media infestación	Parasitismo (%)	Media Infestación
<i>R. iyengari</i>	58.33	2.0	0.00	0.00
<i>R. culicivorax</i>	100.00	3.08	0.00	0.00
<i>R. wuchangensi</i>	83.33	3.1	0.00	0.00
Colonia H3 de <i>R. iyengari</i>	83.33	1.7	0.00	0.00
Colonia F8(1) de <i>R. iyengari</i>	91.66	3.18	0.00	0.00

CONCLUSIONES

La genética clásica proporciona un enorme potencial para mejorar los rasgos benéficos del agente de control biológico *Romanomermis iyengari* nematodo parasito de mosquitos.

Las líneas puras obtenidas después del proceso de presión de selección a salinidad en siete generaciones, presentaron una tendencia de tolerancia al estrés salino en su filogenia lo que permitió la obtención de líneas puras resistentes a salinidad.

La presión de selección favoreció el desarrollo y evolución de la resistencia en las hembras expuestas a estrés salino.

La selección por tolerancia es un medio eficaz para mejorar la tolerancia a la salinidad en los nematodos parásitos de mosquitos *R. iyengari*, que no afecta la capacidad reproductiva de las hembras expuestas a estrés.

Este estudio sobre el mejoramiento genético de la tolerancia a la salinidad en *R. ieyengari*, ilustra la viabilidad de este enfoque para mejorar rasgos benéficos en nematodos parásitos de mosquitos como agentes de control biológico. Constituyendo un punto de partida para la aplicación sistemática de técnicas genéticas para mejorar la eficacia de nematodos parásitos de mosquitos.

R. iyengari es un candidato ideal de inundación para la mejora genética. Tiene una generación corta y puede ser reproducido en grandes cantidades.

El aumento de la tolerancia de los nematodos al factor salinidad, sugiere una mejora directamente en su desempeño en el campo.

LITERATURA CITADA

Bheema Rao US, Gajanana A, Rajagopalan PK. 1979. A note on the tolerance of the mermithid nematode *Romanomermis* sp. to different pH and salinity. Indian J Med Res;69:423-7.

Blaxter ML. 2003. Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. Advances in Parasitology 54: 101–195.

Burnell, A. 2002. Genetics and genetic improvement. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI. Publishing, Oxon, Uk, pp. 241-263.

Brown, B.J. y Plazer, E. G. 1977. The effects of temperature on the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. J. Nematolo. 9: 166-172.

Brown, B. J., y E. G. Platzter. 1974. The effect of temperature, light, larval age and exposure time on the infectivity of preparasitic larvae of *Reesimermis nielsenii*. J. Nematol. 6:137 .

Brown, B.J. y Plazer, E. G. 1978. Salts and the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. J. Nematol. 9. 10: 110- 113.

Brown-Westerdahl, B., R. K.Washino, y E. G. Platzter. 1982. Successful establishment and subsequent recycling of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) in a California rice field following post parasite applications. J. Med. Entomol. 19: 34- 41.

Chen, P. S. 1976. A study of *Reesimermis nielsenii* for control of *Culex pipiens fatigans* in Taiwan. Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. (Taipei), 15: 21-28.

Chen, S. y Glazer. I. 2004. Effect of rapid and Gradual Increase of Osmotic Stress on Survival of Entomopathogenic Nematodes. Phytoparasitica 32(5): 486-497.

Chen S., Glazer I. 2005. A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control*, 32: 104–110.

Christie, J. R. 1936. Life history of *Agamermis decaudata*, a nematode parasite of grasshoppers and other insects. *Journal of Agricultural Research* 52:161–198.

DeBach, P. 1958. Selective breeding to improve adaptations of parasitic insects. *Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology* 4: 759-768.

Ehlers, R-U., Oestergaard, J., Hollmer, S., Wingen, M., and Strauch. O. 2005. Genetic selection for heat tolerance and low temperature activity of the entomopathogenic nematode-bacterium complex *Heterorhabditis bacteriophora-Photorhadus luminescens*. *BioControl*. 50:699-716.

Galloway, T. D., y R. A. Brust. 1977. Effects of temperature and photoperiod on the infection of two mosquito species by the mermithid, *Romanomermis culicivorax*. *J. Nematol.* 9:218-221.

Gaugler, R. 1981. Biological control potential of neoaplectanid nematodes. *Journal of Nematology* 13:1-13.

Gaugler, R. 1987. Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvement. In K. Maramorosch (Ed.), *Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture* (pp. 457–484). San Diego, CA: Academic.

Gaugler, R., McGuire, T., and Campbell, J. 1989. Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematode *Sternema feltiae*. *Journal of Nematology*. 21:247-253.

Gaugler, R. y Hashmi, S. 1996 Genetic engineering of an insect parasite. In: *Genetic Engineering* 18. (SETLOW, J. K. ed.) Plenum Press, New York, 135-155.

Gaugler, R., Campbell, J. F. y McGuire, T. R. 1989. Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *J. Invertebr. Pathol.* 54, 363-372.

Gaugler, R., y Boush, G. M. 1978. Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32:291–296.

Gaugler, R., y Campbell, J. F. 1989. Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54, 363–372.

Glazer, I. 2015. Improvement of Entomopathogenic Nematodes: A Genetic Approach. *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. 29-55

Glazer, I., Salame, L. y Segal, D. 1997. Genetic enhancement of nematicide resistance in entomopathogenic nematodes. *Biocont. Sci. Technol.* 7 , 499-512.

Grewal, P. S., Gaugler, R., y Wang, Y. 1996. Enhanced cold tolerance of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* through genetic selection. *Annals of Applied Biology*, 129, 335–341.

Hopper K. R., RousH, R. T. y POWELL, W. 1993. Management of genetics of biological-control introductions. *Annu. Rev. Entomol.* 38, 27-51.

Hoy, M. 1975. Forest and laboratory evaluations of hybridized *Apanteles melanoscelus* (Hym.: Braconidae), a parasitoid of *Porthetria dispar* (Lep.: Lymantriidae). *Entomophaga* 20:261-268.

Hoy, M. A. 1979. The potential for genetic improvement of predators for pest management programs. Pp. 106-115 in M. A. Hoy and J.J. McKelvey, Jr., eds. *Genetics in relation to insect management*. New York: Rockefeller Press.

Hoy, M. A. 1986. Use of genetic improvement in biological control. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 15, 109–119.

Hoy, M. A. 1985. Improving establishment of arthropod natural enemies. In: M. A. Hoy & D. C. Herzog (Eds.). *Biological control in agricultural IPM systems* (pp. 151–166). Orlando, FL: Academic Press.

Hoy, M. A. 1985. Integrated mite management for California almond orchards. In: W. Helle & M. W. Sabelis (Eds.), *Spider mites, their biology, natural enemies and control*, Vol. IB (pp. 299–310). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publ.

Hoy, J. B., y J. J. Petersen. 1973. Fish and nematodes current status of mosquito control techniques. *Calif. Mosq. Control* 41: 49-50.

Hugot J-P, Baujard P, Morand S .2001 Biodiversity in helminthes and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology* 3:199–208

Hyman BC, Lewis SC, Tang S, Wu Z. 2011. Rampant gene rearrangement and haplotype hypervariation among nematode mitochondrial genomes. *Genetica* 139: 611–615.

Kaya, H.K. y Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38, 181–206.

Kerwin, J. L., y R. K. Washino. 1985. Recycling of *Romanomermis culicivorax* mermithidae nematoda in rice fields in California USA. *Med. Entomol.* 22(6): 637-643.

Kobylnski K. C, Sylla M, Black IV W. and Foy B.D. (2012). Mermithid nematodes found in adult *Anopheles* from southeastern Senegal. *Para. Vectors.* 5: 131.

Legner, E. F. 1972. Observations on hybridization and heterosis in parasitoids of synanthropic flies. *Annals of the entomological Society of America* 65:254-263.

Levy, R., B. C. Hertlein, J. J. Peterson, D. W. Doggett, y T. W. Miller, Jr. 1979. Aerial application of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) to control *Anopheles* and *Culex* mosquitoes in southwest Florida. *Mosq. News* 39: 20- 25.

Levy, R., y T. W. Miller. 1977. Experimental release of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) to control mosquitoes breeding in Southwest Florida. *Mosq. News* 37(3): 483-468.

Messenger, P. S., F. Wilson, and M.J. Whitten.1976. Variation, fitness, and adaptability of natural enemies. Pp. 68-92 in C. B. Huffaker and P. S. Messenger, eds. *Theory and practice of biological control*. New York: Academic Press.

Mitchell, C.J. Chen, P. y Chapman, H.C. 1974. Exploratory trals utilizing a mermithid nematode as a control agent for *Culex* mosquitoes in Taiwan. *J. Formosan Med. Assoc.* 73:241-254.

Mongkolkiti, S. and Hosford, R.M., 1971. Biological Control of the Grasshopper *Hesperotettix viridis pratensis* by the Nematode *Mermis nigrescens*. *Journal of Nematology*, vol. 3, no. 4, pp. 356-363. PMID:19322391.

Mukuka, J., Strauch, O., y Ehlers, R.-U. 2010a. Variability in desiccation tolerance among different strains of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematology* 12:711–720.

Mukuka, J., Strauch, O., Hoppe, C., y Ehlers, R.-U. 2010b. Improvement of heat and desiccation tolerance in *Heterorhabditis bacteriophora* through cross-breeding of tolerant strains and successive genetic selection. *BioControl* 55:511–521.

Mukuka, J., Strauch, O., Hoppe, C., y Ehlers, R.-U. 2010c. Fitness of heat and desiccation tolerant hybrid strains of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidomorpha: Heterorhabditidae). *Journal of Pest Science* 83:281–287.

Mukuka, J., Strauch, O., Al Zainab, M. H., y Ehlers, R.-U. 2010d. Effect of temperature and desiccation stress on infectivity of stress tolerant hybrid strains of *Heterorhabditis bacteriophora*. *Russian Journal of Nematology* 18:111–116.

Nolan, R.A., 1977. *Asteromyces cruciatus* from North America. *Mycologia* 64, 430-433.

Pérez, P. R., Montesino, G., and Rodríguez, H. C. 1999. Salinidad y pH, factores que afectan el parasitismo de *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. *Avances en la investigación*. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 21-22.

Pérez, P.R., Rodríguez, H.C., Lara, R.J., Montes, B.R., Ramírez, V.G., 2003. Susceptibilidad de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) al parasitismo del nemátodo *Romanomermis iyengari* Welch. *Folia Entomol. Mex.* 42, 321–327.

Pérez-Pacheco, R., Rodríguez-Hernández, C., Lara-Reyna, J., Montes-Belmont, R., Ruiz-Vega, J. 2005. Control of the mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, Mexico. *Biological Control*. 32:137-142.

Petersen, J. J. 1973. Role of mermithid nematodes in biological control of mosquitoes. *Experimental Parasitology* 33:239–247

Petersen, J. J. 1981. Observations on the biology of *Octomyomermis musprani*, a nematode parasite of mosquitoes. *J. Invert. Pathol.*, in press.

Petersen JJ.1982. Current status of nematodes for biological control of insects. Parasitol. 84: 177-204.

Petersen JJ.1985. Nematodes as biological control agents: Pt I, Mermithidae. Adv. Parasitol. 14: 307-34.

Petersen, J.J. 1979. pH as a factor in parasitism of mosquito larvae by the mermithid *Romanomermis culicivorax*. J. Nematol. 11: 105-196.

Petersen, J. J., H. C. Chapman, O. R. Willis, y T. Fukuda. 1978. Release of *Romanomermis culicivorax* for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. II. Application of the nematode. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 27:1268-1273.

Petersen, J. J., y R. Levy. 1981. Effects of culture age on the shipment survival of the mosquito parasite *Romanomermis culicivorax*. J. Nematol. 13:229-231.

Petersen, J.J. y Willis, O.R. 1970. Some factors affecting parasitism by mermithid nematodes in Southern house mosquito larvae. J. Econ, Entomol. 63: 175- 178.

Platzer, E. J., 1982. Biology of mermithid and Steinernematidae with vector control potential. Proceedings of the IIIrd International Colloquium on Invertebrate Pathology, 6-10 September 1982: 374-379. Brighton, Sussex, U. K.

Platzer, E.G., 1981. Biological control of mosquitoes with mermithids. J. Nematol. 13, 257–262.

Platzer, E. G. 2007. Mermithid nematodes. Pp. 58–64 in T. G. Floore, ed. Biorational control of mosquitoes. Journal of the American Mosquito Control Association (Suppl. 2), Bulletin No. 7.

Platzer, E.G. y MacKenzie-Graham, L.1978. Predators of *Romanomermis culicivorax*. Proc.Calif. Mosq.Vect.Cont Assoc.46:93.

Poinar, G.O. JR. 2001. Nematoda and Nematomorpha. // Thorp J.H. y Covich A.P. (eds). Ecology and clasidication of North American freswather invertebrates. Second edition. New York: Acedmic Press. P 255-295.

Poopathi, A. y Tyagi, B.K. 2006. The challenge of mosquito control strategies: from primordial to molecular approaches. Biotechnology and Molecular Biology Review. 1.(2): 51-65

Rodriguez J, Garcia IG, Diaz M, Avila IG, Sanchez JE (2003) Pathogenic effect of the parasite nematode *Strelkovimermmis spiculatus* (Nematoda Mermithidae) in larvae of mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions in Cuba. J. Med. Ent. 55 : 124-5.

Rojas, W., Northup, J., Gallo, O., Montoya, A. E., F. Restrepo, M., Nimnich, C., Arango, M. y Echavarría, M., 1987. Reduction of malaria prevalence after introduction of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) in larval *Anopheles* habitats in Colombia. Bull. WHO, 65(3): 331-337.

Ross R. (1906) Notes on parasites of mosquitoes found in India between 1895-1899. J. Hyg 6:101.

Ruiz-Vega, J., F. Ruiz-Carballo, R. Pérez-Pacheco, and S. H. Martínez-Tomás. 2011. Improvement of heat and desiccation tolerance of three entomopathogenic nematodes. *Nematropica* 41(2): 264-270.

Santamarina, A. M. 1993. Actividad parasitaria de *Romanomermis iyengari* (Nematoda, Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. Misc. Zool. 17: 59-65.

Santamarina A, y Bellini A. 2000. Producción masiva de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) y su aplicación en criaderos de anofelinos en Boa Vista (Roraima), Brasil. Rev Panam Salud Pública.7(3):155-61.

Santamarina, A. M., y R. P. Perez. 1997. Reduction of mosquito larval densities in natural sites after introduction of *Romanomermis eulicivorax* (Nematoda: Mermithidae) in Cuba. Journal of Medical Entomology 34:1-4.

Santamarina, M. A., y Pérez-Pacheco, R. 1998. Efecto patogénico del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio en el Estado de Oaxaca, México. Rev Cubana Med Trop. 50:8-11

Santamarina, M.A., Pérez, P.R., Tomas, M.S.H., Cantón, L.E., Flores, A.G., 1999. The *Romanomermis iyengari* parasite for *Anopheles pseudopunctipennis* supresión in natural habitats in Oaxaca State, México. Pan-American J. Public Health 5, 23–28.

Segal, D., y Glazer, I. 1998. Genetic approahes for enhancing beneficial traits in entomopathogenic nematodes. Japanese Journal of Nematology, 28, 101-107.

Shapiro D.I., Glazer I. 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. Environmental Entomology, 25: 1455–1461

Sharma, G.K. y Gupta, LN. 1982: Role of pH factor in biological control of *Culex fatigans* by a mermithid, *Romanomermis culicivorax* Ross and Smith. Zeitschrift fur Angewandlt Entomologie 93 (4): 326- 328.

Stirling, A.M. y Plazer, E.G. 1978. *Cotenaria anguillulae* in the mermithid nematode *Romanomermis culicivorax* . J. In.vert.Pathol. 32:348-354.

Westerdahl, B. B., R. K. Washino y E. G. Platzer. 1982. Successful establishment and subsequent recycling of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) in a California rice field following postparasite application. J. Med. Entomol. 19:34-41.

Vladimirova, V. V., E. A. Pridantseva, A. K. Gafurov, and M. E. Muratova. 1990. A trial of *Romanomermis iyengari* and *R. culicivorax* mermithids as a means for controlling blood-sucking mosquitoes in the Tadznik. Med. Parazitol. (Mosk) 3: 42-5.