

EFFECTIVIDAD Y SUPERVIVENCIA DE *Romanomermis culicivorax* EN CRIADEROS NATURALES DE LARVAS DE MOSQUITOS

EFFECTIVENESS AND SURVIVAL OF *Romanomermis culicivorax* IN NATURAL BREEDING SITES OF MOSQUITO LARVAE

Rafael Pérez-Pacheco^{1*}, Alberto Santamarina-Mijares², Alfonso Vázquez-López¹, Sabino H. Martínez-Tomás¹, Javier Suárez-Espinosa³

¹CIIDIR-OAXACA, Instituto Politécnico Nacional, Calle Hornos 1003, Colonia Indeco Xoxocotlán. 68000. Oaxaca, México (rafaelperezpacheco@yahoo.com). ²Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Autopista Novia del Mediodía Km 6½ e/ Autopista Nacional y Carretera Central, La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba. ³Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco, Km 36.5. 56230. Montecillo, Estado de México.

RESUMEN

Los mosquitos (Diptera: Culicidae) son transmisores de agentes causales de paludismo, dengue y encefalitis del Nilo occidental y causan fuertes molestias a los humanos. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de aplicar 500 y 1000 nemátodos, *Romanomermis culicivorax* Ross y Smith, por metro cuadrado en poblaciones de larvas de *Anopheles albimanus* Wiedeman, *Culex nigripalpus* Theobald y *Uranotaenia sapphirina* Oster-Sacken, para su control en 13 criaderos naturales. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de dos factores (dos dosis de nemátodos y tres especies de mosquitos). La dosis de 500 nemátodos causó 74.3-87.8 % de parasitismo en larvas de las tres especies; la dosis de 1000 causó 77.2-96.9 % de parasitismo, con un incremento del parasitismo al aumentar la dosis de nemátodos ($p \leq 0.001$). Con ambas dosis las larvas de *A. albimanus* fueron significativamente ($p \leq 0.001$) más susceptibles de ser parasitadas por *R. culicivorax* (87.8-96.9 %) en comparación con las de *C. nigripalpus* (78-81.6 %) y *U. sapphirina* (74.3-77.2 %). Las poblaciones larvales de *A. albimanus*, *C. nigripalpus* y *U. sapphirina* se redujeron de 74 a 95 % 7 d después de la aplicación; además *R. culicivorax* se estableció y recicló biológicamente al menos durante tres meses. La capacidad infectiva de *R. culicivorax* no se correlacionó significativamente con las variables fisicoquímicas (pH, conductividad, oxígeno, temperatura, profundidad de los criaderos) y la vegetación.

Palabras clave: Control biológico, mermithid, nemátodo.

ABSTRACT

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) transmit causal agents of malaria, dengue and western Nile encephalitis, besides being extremely annoying for humans. The objective of this study was to determine the control effect of releasing 500 and 1000 *Romanomermis culicivorax* Ross and Smith nematodes per square meter into larval populations of *Anopheles albimanus* Wiedeman, *Culex nigripalpus* Theobald, and *Uranotaenia sapphirina* Oster-Sacken in 13 natural breeding sites. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement of two factors (two dosages of nematodes and three species of mosquitoes). The doses of 500 nematodes m^{-2} caused 74.3-87.8 % parasitism in larvae of the three species; the dose of 1000 nematodes m^{-2} caused 77.2-96.9 % parasitism; that is, parasitism was higher with the higher dose of nematodes ($p \leq 0.001$). With both doses the *A. albimanus* larvae were significantly ($p \leq 0.001$) more susceptible to parasitism by *R. culicivorax* (87.8-96.9 %) than those of *C. nigripalpus* (78-81.6 %) and *U. sapphirina* (74.3-77.2 %). The larval populations of *A. albimanus*, *C. nigripalpus* and *U. sapphirina* decreased 74 to 95 % 7 d after release of treatments. Moreover, *R. culicivorax* established and biologically recycled for at least three months. The infective capacity of *R. culicivorax* did not correlate significantly with physiochemical variables (pH, conductivity, oxygen, temperature, depth of breeding sites) or vegetation.

Key words: Biological control, mermithid, nematode.

INTRODUCTION

Entomophagous nematode species of the genus *Romanomermis* (Mermithidae) are an effective, specific and sustainable alternative

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Julio, 2008. Aprobado: Junio, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 861-868. 2009.

INTRODUCCIÓN

Las especies de nemátodos entomófagos del género *Romanomermis* (Mermithidae) son una alternativa efectiva, específica y sostenible para el control biológico de mosquitos (Diptera: Culicidae). La fase parásita se desarrolla en el interior de la larva de mosquito, la cual muere cuando el parásito emerge para continuar su ciclo vital. Las larvas infectivas (preparasíticos) producto de la eclosión de huevos son de vida libre y se concentran en la superficie del agua. Los preparasíticos penetran la pared cuticular de la larva de mosquito mediante un estilete, iniciando su fase parásita; al no encontrar una larva huésped mueren en 48 a 72 h (Pérez *et al.*, 2004).

Romanomermis culicivorax es la especie de nemátodo parásito de larvas de mosquitos más estudiada (Platzer *et al.*, 2005). Cuando se descubrió en Louisiana, EE.UU. en 1966, las especies de larvas de mosquito más parasitadas fueron *Psorophora columbiae*, *Uranotaenia sapphirina*, *Aedes atlanticus* y *Anopheles crucians* (Chapman *et al.*, 1967; Petersen *et al.*, 1968). Para evaluar su potencial en la reducción de poblaciones de larvas de mosquitos en Louisiana, se aplicó en criaderos naturales para controlar anofelinos (Petersen y Willis, 1972; Hoy y Petersen, 1973). Con la aplicación de preparasitos (J2) en 11 criaderos naturales de larvas de mosquitos anofelinos se encontraron elevados niveles de infestación y el nemátodo se estableció y recicló biológicamente por lo menos un año (Petersen y Willis, 1974). En California se aplicó *R. culicivorax* en tres criaderos naturales (706-25 000 nemátodos m^{-2}) y dos artificiales para control de larvas de mosquitos donde las cuatro especies de mosquitos presentes fueron infectadas. El porcentaje de parasitismo dependió de la subfamilia de mosquito y de la dosis de aplicación, observando que las larvas de Anopheline (*Anopheles franciscanus* McCracker y *A. freeborni* Aitken) fueron las más susceptibles al nemátodo que las de Culicine (*Culex tarsalis* Coquillett y *Culiceta inornata* Williston) (Brown y Platzer, 1977). De 1995 a 1996 se aplicaron 1000 nemátodos m^{-2} (*R. culicivorax*) en criaderos naturales de larvas de mosquitos anofelinos en Pochutla, Oaxaca, México. El parasitismo fue 84.7 % en larvas de mosquitos *Anopheles pseudopunctipennis* (Pérez *et al.*, 1996).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de dos dosis de nemátodos de la especie

for biological control of mosquitoes (Diptera: Culicidae). The parasitic stage of these nematodes develops inside the mosquito larva, which dies when the parasite emerges to continue its life cycle. The infective larvae (preparasites), product of eclosion, are free-living and concentrate on the surface of water. The parasites penetrate the cuticle of mosquito larvae with a stylet to begin their parasitic stage; if they do not find a host larva, they die within 48 to 72 h (Pérez *et al.*, 2004).

Romanomermis culicivorax is the most studied nematode species that parasitizes mosquito larvae (Platzer *et al.*, 2005). When it was discovered in Louisiana, USA, in 1966, the most parasitized mosquito larvae were those of the species *Psorophora columbiae*, *Uranotaenia sapphirina*, *Aedes atlanticus* and *Anopheles crucians* (Chapman *et al.*, 1967; Petersen *et al.*, 1968). To assess its potential in reducing mosquito populations in Louisiana, the nematode was introduced into natural anopheline breeding sites (Petersen and Willis, 1972; Hoy and Petersen, 1973). When parasites (J2) were released in 11 natural anopheline breeding sites, high levels of infestation were found and the nematode established and recycled biologically for at least one year (Petersen and Willis, 1974). In California *R. culicivorax* was released (706 to 25 000 nematodes m^{-2}) to control mosquitoes larvae in three natural and two artificial breeding sites, where the four mosquito species present became infected. The percentage of parasitism depended on the subfamily of mosquito and the dose applied. It was observed that the anopheline larvae (*Anopheles franciscanus* McCracker and *A. freeborni* Aitken) were more susceptible to the nematode than Culicine larvae (*Culex tarsalis* Coquillett and *Culiceta inornata* Williston) (Brown and Platzer, 1977). From 1995 to 1996, 1000 nematodes m^{-2} (*R. culicivorax*) were released in natural breeding sites of anopheline mosquitoes in Pochutla, Oaxaca, México. Parasitism was 84.7 % in *Anopheles pseudopunctipennis* mosquito larvae (Pérez *et al.*, 1996).

The objective of the present study was to determine the effect of two doses of nematodes of the species *R. culicivorax* against larvae of *Anopheles albimanus*, *Culex nigripalpus* Theobald and *U. sapphirina* Oster-Sacken, in natural breeding sites in Habana, Cuba.

R. culicivorax contra larvas de *Anopheles albimanus*, *Culex nigripalpus* Theobald y *U. sapphirina* Oster-Sacken, en criaderos naturales en la Habana, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el centro de recreación Parque Lenin, en la Habana, Cuba, se seleccionaron al azar 13 criaderos naturales temporales de larvas de mosquitos de las especies *A. albimanus*, *C. nigripalpus* y *U. sapphirina*, localizados en áreas bajas donde se forman numerosos cuerpos de agua en el período de lluvias (mayo a octubre) con altas densidades de larvas de mosquitos. Al inicio del estudio se determinaron los valores de tamaño de los criaderos (100-750 m²), profundidad (5-35 cm), pH (6.1-6.7), conductividad (100-130 ms cm⁻¹), concentración de oxígeno (6.1-7.8 mg L⁻¹) y temperatura (28-31 °C). En todos los criaderos se observó vegetación compuesta por algas verdes y detritus orgánico flotante.

En una evaluación pretratamiento se registraron poblaciones mezcladas de larvas de mosquitos de I a IV instar de tres especies: *A. albimanus*, *C. nigripalpus* y *U. sapphirina*. Las especies de mosquitos se identificaron usando claves de García (1977). Aproximadamente 80 % de larvas recolectadas fueron de I, II, y III instar (50 larvas examinadas por cada criadero). Antes de las aplicaciones de nemátodos en los criaderos no se observó parasitismo natural y se determinó la densidad larval pretratamiento (DLpre) usando un colector cónico (20 cm diámetro; 20 cm profundidad) con un mango (2 m longitud). Se recolectaron 10 muestras por criadero y se determinó el número de larvas por m² (Dubitsky, 1978).

Las DLpre fueron de 25 a 152 m⁻² en los 13 criaderos. En otros dos criaderos testigo, con áreas de 150 a 176 m², las densidades larvales fueron 71 a 131 m⁻². Se aplicó la dosis de 500 (criaderos 1, 2, 3, 4, 5, y 6) y 1000 (criaderos 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) nemátodos m⁻². Los nemátodos fueron producidos en el laboratorio del Instituto de Medicina Tropical usando la técnica de Santamarina (1996). Las dosis se aplicaron con un aspersor manual de aire comprimido con capacidad de 5 L (Holder-planta 5, Gebr. Holder) a una presión de 2 atm. Para determinar la efectividad de los tratamientos, 3 d después de la aplicación se tomaron muestras de 100 larvas al azar por cada criadero, que fueron examinadas para determinar los porcentajes de parasitismo (PP) y el número de nemátodos por larva (media de infestación, MI) por especie de larva de mosquito. Siete días después de las aplicaciones se determinó la densidad larval postratamiento (DLpos) con el método usado para DLpre; para calcular la diferencia entre las densidades larvales antes y después de los tratamientos, se utilizó la ecuación de porcentaje de reducción (Lacey y Mulla, 1972):

MATERIALS AND METHODS

In the recreational center Lenin Park, Havana, Cuba, 13 natural seasonal breeding sites of *A. albimanus*, *C. nigripalpus* and *U. sapphirina* mosquitoes were selected. These sites are located in low areas where numerous pools form during the rainy season (May to October) with high densities of mosquito larvae. At the beginning of the study, size (100-750 m²), depth (5-35 cm) pH (6.1-6.7) conductivity (100-130 ms cm⁻¹) oxygen content (6.1-7.8 mg L⁻¹) and temperature (28-31 °C) of the breeding sites were determined. In all of the breeding sites, vegetation composed of green algae and floating organic detritus was observed.

In a pre-treatment evaluation, mixed populations of mosquito larvae were recorded; these comprised I to IV instar larvae of three species: *A. albimanus*, *C. nigripalpus* and *U. sapphirina*. The mosquito species were identified using the keys of García (1977). Approximately 80 % of the collected larvae were I, II and III instar (50 larvae examined per breeding site). No natural parasitism was observed before releasing the nematodes into the breeding sites. Pre-treatment larval density (DLpre) was determined using a conical collector (20 cm diameter; 20 cm deep) with a handle (2 m long). Ten samples were collected at each breeding site and the number of larvae per m² was determined (Dubitsky, 1978).

DLpre were between 25 and 152 m⁻² in the 13 breeding sites. In two other breeding sites used as controls, with areas between 150-176 m², the larval densities were 71 to 131 m⁻². The dose of 500 nematodes m⁻² was released in breeding sites 1, 2, 3, 4, 5 and 6, and 1000 nematodes m⁻² were released in sites 7, 8, 9, 10, 11, 12 and 13. The nematodes were produced in the laboratory of the Instituto de Medicina Tropical using the technique of Santamarina (1996). The doses were applied with a manual compressed-air sprayer with a 5 L capacity (Holder-planta 5, Gebr. Holder) at a pressure of 2 atm. To determine the effectiveness of the treatments, 3 d after application random samples of 100 larvae per breeding site were collected and examined to determine percentages of parasitism (PP) and number of nematodes per larva (infestation mean, MI) per mosquito larvae species. Seven days after application, post-treatment larval density (DLpos) was determined with the method used for DLpre. To calculate the difference between larval densities before and after treatment, the reduction percentage equation (Lacey and Mulla, 1972) was used:

$$\% \text{ Reduction} = 100 - (T_2 / T_1 \times C_1 / C_2) \times 100$$

where, C₁=DLpre in the control; C₂=DLpos in the control; T₁=DLpre treatment; T₂=DLpos treatment.

$$\% \text{ Reducción} = 100 - (T_2 / T_1 \times C_1 / C_2) \times 100$$

donde, C_1 =DLpre en el testigo; C_2 =DLpos en el testigo; T_1 =DLpre en el tratamiento; T_2 =DLpos en el tratamiento.

Para determinar el establecimiento y reciclaje biológico de *R. culicivora* en los 13 criaderos, se tomaron muestras de 50 larvas de mosquitos cada 15 d en agosto y septiembre; en octubre en 10 de los 13 criaderos, debido a que tres se secaron 30 d después de los tratamientos en el 2003. Las larvas fueron evaluadas con un microscopio estereoscópico y disectadas con agujas entomológicas.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2×3 : factor A, las dos dosis de nemátodos; factor B, las tres especies de mosquitos. Se realizaron pruebas en los datos de PP y MI para verificar los supuestos de normalidad de errores (Shapiro-Wilks) y de homogeneidad de varianzas (prueba de Barlett). Cuando se cumplieron, se usó el análisis de varianza y la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa JMP versión 7 (SAS Inc., 2008).

Para determinar el efecto de las aplicaciones de nemátodos en la reducción poblacional de larvas de mosquitos se compararon los datos de DLpre con los de DLpos mediante la prueba rangos con signo de Wilcoxon ($p \leq 0.05$) (SAS, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

R. culicivora se estableció en las tres especies de mosquitos en todos los criaderos donde se aplicaron. Los promedios de PP fueron 77.2 a 96.9 % y MI 1.8 a 4.2 nemátodos por larva causados por *R. culicivora* al aplicar 1000 nemátodos m^{-2} . Usando 500 nemátodos m^{-2} , PP fue de 74.3 a 87.8 % y MI de 1.5 a 3.0.

El análisis de varianza del PP y MI indicó que el efecto de las dosis, de las especies de mosquitos y la interacción de las mismas fue estadísticamente significativo (Cuadros 1 y 2). Entonces el efecto de nemátodos en la infestación depende de la dosis y la especie de mosquito. El tratamiento con 1000 nemátodos m^{-2} en *A. albimanus*, causó el máximo grado de infestación (PP 96.9 %; MI 4.2) que fue estadísticamente diferente de los otros tratamientos ($\alpha = 0.05$, $p \leq 0.001$).

Con ambas dosis aplicadas, las larvas de *A. albimanus* (PP 87.8-96.9 %; MI 3.0-4.2) fueron más susceptibles que las de *C. nigripalpus* (PP 78.0-

To determine establishment and biological recycling of *R. culicivora* in the 13 breeding sites, samples of 50 mosquito larvae were taken every other week in August and September; in October samples were taken in 10 of the 13 breeding sites since three had dried up 30 d after treatment in 2003. The larvae were examined with a stereoscopic microscope and dissected with entomological needles.

Statistical analyses

The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement of 2×3 : factor A, the two doses of nematodes; factor B, the three mosquito species. Tests were conducted on PP and MI data to verify the assumptions of error normality (Shapiro-Wilks) and variance homogeneity (Barlett test). When these were satisfied, an analysis of variance and a Tukey comparison of means ($p \leq 0.05$) were performed using JMP version 7 software (SAS Inc., 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of *R. culicivora* occurred in the three mosquito species in all of the breeding sites where released. The average PP was 77.2 to 96.9 % and average MI 1.8 to 4.2 nematodes per larvae caused by *R. culicivora* in breeding sites where the treatment was 1000 nematodes m^{-2} . With 500 nematodes m^{-2} , PP was 74.3 to 87.8 % and MI was 1.5 to 3.0.

The analyses of variance of PP and MI indicated that the effects of dosage, mosquito species and the interaction between these two factors were statistically significant (Tables 1 and 2). Therefore, the effect of nematodes on the infestation of mosquito populations depends, therefore, on dosage and the mosquito species. The treatment of 1000 nematodes m^{-2} caused the highest degree of infestation in *A. albimanus* (PP 96.9 %; MI 4.2), which was statistically different from the other treatments ($\alpha = 0.05$, $p \leq 0.001$).

With both nematode densities applied, *A. albimanus* larvae (PP 87.8-96.9 %; MI 3.0-4.2) were more susceptible than those of *C. nigripalpus* (PP 78.0-81.6 %, MI 1.8-2.4), which had an intermediate value of susceptibility. The lower levels of infestation were observed in *U. sapphirina* (PP 74.3-77.2 %; MI 1.5-1.8), indicating that it is slightly less susceptible (Table 3).

The results showing that *A. albimanus* larvae are more susceptible to infestation by *R. culicivora* than the other two mosquito species are in line with the

Cuadro 1. Análisis de varianza de las medias de infestación.

Table 1. Analysis of variance of infestation means.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados Tipo 1	Cuadrado medio	Valor-F	†Sig.
Especie	2	25.11	12.56	1452.65	<0.0001
Dosis	1	4.51	4.51	521.44	<0.0001
Especie×dosis	2	1.15	0.58	66.66	<0.0001

†Sig.=Significancia.

Cuadro 2. Análisis de varianza del parasitismo.

Table 2. Analysis of variance of parasitism.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados Tipo 1	Cuadrado medio	Valor-F	†Sig.
Especie	2	1785.60	892.80	398.60	<0.0001
Dosis	1	257.07	257.08	114.77	<0.0001
Especie×dosis	2	66.55	33.28	14.86	<0.0001

†Sig.=Significancia.

81.6 %; MI 1.8-2.4) que presentaron un valor intermedio de susceptibilidad. Los menores niveles de infestación se observaron en *U. sapphirina* (PP 74.3-77.2 %; MI 1.5-1.8) indicando que es ligeramente menos susceptible (Cuadro 3).

Los resultados de mayor susceptibilidad en las larvas de *A. albimanus* a la infestación de *R. culicivorax* con respecto a las otras dos especies de mosquitos, concuerdan con los datos de William *et al.* (1987) y Pérez-Pacheco *et al.* (2003, 2004) quienes en otras especies de anofelinos reportan mayor susceptibilidad a las aplicaciones de *R. culicivorax* y *R. iyengari*. El mayor grado de susceptibilidad a los anofelinos se atribuye a la conducta de las larvas que se alimentan

data of William *et al.* (1987) and Pérez-Pacheco *et al.* (2003, 2004), who report greater susceptibility of other anopheline species to applications of *R. culicivorax* and *R. iyengari*. The anopheline's greater susceptibility is attributed to larval behavior. The larvae feed at the water's surface with their bodies in a horizontal position parallel to the surface in order to breathe because they have no respiratory siphon. This behavior makes them vulnerable to attack by nematodes, which also live on the water surface. In contrast, the *Culex* larvae, and most of the mosquito genera, breathe at the water surface through a respiratory siphon with their bodies at an oblique angle relative to the water surface, and they

Cuadro 3. Medias de infestación y parasitismo (%) de *R. culicivorax* en larvas de tres especies de mosquitos en criaderos naturales, en Cuba.

Table 3. Infestation means and parasitism (%) of *R. culicivorax* in larvae of three mosquito species in natural breeding sites in Cuba.

Especie de mosquito	Parasitismo (%)†		Media infestación (nematodos por larva)†	
	1000	500	1000	500
<i>A. albimanus</i>	96.9 a (0.565)‡	87.8 b (0.610)‡	4.2 a (0.035)‡	3.0 b (0.037)‡
<i>C. nigripalpus</i>	81.6 c (0.565)‡	78.0 d (0.610)‡	2.4 c (0.035)‡	1.8 d (0.037)‡
<i>U. sapphirina</i>	77.2 d (0.669)‡	74.3 e (0.748)‡	1.8 d (0.041)‡	1.5 e (0.046)‡

†Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) ($F^5_{29} = 2.545$); ‡Error estándar de la media.

en la superficie del agua y para respirar adoptan una posición paralela al plano superficial del agua porque carecen de sifón respiratorio. Esas conductas los hacen más vulnerables al ataque de los nemátodos que viven en la superficie del agua. En cambio, las larvas de *Culex* y la mayoría de los géneros de mosquitos, respiran en la superficie del agua mediante un sifón respiratorio, con una posición oblicua a la superficie del agua y se alimentan del sustrato en el fondo de los criaderos (Ross y Smith, 1976; Pérez *et al.*, 2004).

Levy y Miller (1977) aplicaron preparasíticos de *R. culicivora* en poblaciones mezcladas de *C. nigripalpus* (vector potencial de encefalitis en el sur de Florida, EE.UU.), *Psorophora columbiae* Dyar y Knab, *P. ciliata* y *Aedes taeniorhynchus* Wiedemann. Ellos reportan que *C. nigripalpus* presentó mayor susceptibilidad, por lo que sus poblaciones pueden ser controlados con *R. culicivora*.

En los 13 criaderos tratados con nemátodos hubo altas reducciones de las poblaciones larvales de mosquitos (Cuadro 4), determinadas al comparar DLpos con DLpre según Lacey y Mulla (1972). El análisis estadístico con la prueba de rangos de Wilcoxon indicó una diferencia significativa ($p \leq 0.001$) entre las DLpre y DLpos en cada criadero, las cuales tuvieron un valor promedio final de 63.2 y 10.8 larvas, con un promedio total de reducción de población de 84.7 % en los 13 criaderos.

Los muestreos realizados en los testigos mostraron un ligero incremento de las densidades larvares que se atribuye a la emergencia de nuevas generaciones de larvas provenientes de huevos que depositan las hembras en el criadero. La reducción poblacional varió de 74 a 95 % en los 13 criaderos, indicando la efectividad de los nemátodos para reducir las poblaciones de larvas (Cuadro 4).

La comparación de los resultados obtenidos con ambas dosis de nemátodos indica que el nivel de infestación en larvas fue mayor con la dosis más alta (1000 nemátodos m^{-2}). pH, conductibilidad, oxígeno, temperatura de agua y otras características ecológicas de los criaderos tratados, como el área, la profundidad y la vegetación, no interfirieron en la viabilidad y capacidad infectiva del parásito.

La capacidad de supervivencia de los nemátodos se registró desde el primer mes después de las aplicaciones. En el análisis de muestras mensuales de larvas de mosquitos, se registraron PP de 77 a 91 % y MI de 1.6 a 3.4 nemátodos por larva de mosquito en los

feed on the substrate at the bottom of the breeding sites (Ross and Smith, 1976; Pérez *et al.*, 2004).

Levy and Miller (1977) released preparasites of *R. culicivora* in mixed populations of *C. nigripalpus* (potential vector of encephalitis in southern Florida, USA), *Psorophora columbiae* Dyar and Knab, *P. ciliata* and *Aedes taeniorhynchus* Wiedemann. They report that *C. nigripalpus* was more susceptible, and thus their populations can be controlled by *R. culicivora*.

In the 13 breeding sites treated with nematodes, there were large reductions of mosquito larval populations (Table 4). This was determined by comparing DLpos with DLpre, following Lacey and Mulla (1972). The statistical analysis with the Wilcoxon test of ranges revealed significant difference ($p \leq 0.001$) between DLpre and DLpos in all of the breeding sites, which had a final average value of 63.2 and 10.8 larvae, with a total average of 84.7 % reduction in populations in the 13 breeding sites.

The samples taken in the control sites showed a slight increase in larval densities, attributed to the emergence of new generations of larva since females continuously deposit eggs in the breeding sites. The percentages of population decrease varied from 74 to 95 % in the 13 breeding sites, indicating the

Cuadro 4. Reducción de densidad de larvas en 13 criaderos 7 d después de aplicar *R. culicivora*, en Cuba.

Table 4. Reduction of mosquito larval density 7 d after releasing *R. culicivora* in 13 breeding sites in Cuba.

Criadero	Área m^2 [§]	†DLpre m^2 [§]	‡DLPos m^2 [§]	Reducción, %
1	375	54 a	10 b	82
2	200	130 a	25 b	81
3	192	97 a	20 b	80
4	100	152 a	30 b	82
5	750	25 a	6 b	77
6	300	36 a	10 b	74
Testigo	150	71 a	79 b	
7	240	43 a	7 b	85
8	225	51 a	5 b	91
9	575	42 a	6 b	95
10	270	38 a	4 b	90
11	330	36 a	6 b	84
12	182	62 a	5 b	92
13	231	56 a	7 b	88
Testigo	176	131	142	

†Densidad larvaria pretratamiento. ‡Densidad larvaria postratamiento. §Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

criaderos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13, en el período de tres meses (Cuadro 5). En los criaderos 3, 4, y 12 no se encontró reciclaje biológico del parásito debido a una prematura desecación de los mismos.

La capacidad para sostener poblaciones de *R. culicivorax* en criaderos naturales también fue estudiada por Kerwin y Washino (1985) quienes aplicaron *R. culicivorax* en campos de arroz en California, EE.UU., y reportaron la supervivencia de los nemátodos con niveles variables de infestación de larvas. Pérez-Pacheco *et al.* (2005) también registraron reciclaje biológico por cuatro meses después de aplicar *R. iyengari* en criaderos de larvas de mosquito *A. pseudopunctipennis*, indicando que los nemátodos encontraron las condiciones adecuadas para reproducirse en los cuerpos de agua estudiados.

CONCLUSIONES

Romanomermis culicivorax infestó más de 75 % de *A. albimanus*, *C. nigripalpus* y *U. sapphirina*. Las larvas de *A. albimanus* fueron más susceptibles al parasitismo. Los niveles de parasitismo aumentaron significativamente con la dosis más alta de nemátodos aplicada. El número de larvas muertas por tratamiento aplicado fue debido a que las larvas infestadas mueren antes de pasar al estado de pupa. La aplicación de *R. culicivorax* en los criaderos redujo la densidad de larvas de las tres especies de mosquitos, indicando

effectiveness of the nematodes in reducing larval populations (Table 4).

Comparison of results obtained with the two dosages of nematodes shows that the infestation levels in larvae were higher with the higher dosage (1000 nematodes m^{-2}). pH, conductivity, oxygen content, water temperature, and other ecological characteristics of the treated breeding sites, such as area, depth and vegetation, did not interfere with the parasites' viability and infective capacity.

The nematode's capacity for survival was assessed as of the first month after application of the treatments. In the monthly analysis of mosquito larva samples, a PP of 77 to 91 % was recorded, and MI was 1.6 to 3.4 nematodes per mosquito larva in breeding sites 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 13 over the three month period (Table 5). In breeding sites 3, 4 and 12, no biological recycling of the parasite was found because the pools dried up early.

The ability of *R. culicivorax* to sustain their population in natural breeding sites was also studied by Kerwin and Washino (1985) who released *R. culicivorax* in rice fields in California, USA, and reported nematode survival with varying levels of larval infestation. Pérez-Pacheco *et al.* (2005) also observed biological recycling for four months after releasing *R. iyengari* in breeding sites of *A. pseudopunctipennis*, evidencing that the nematodes

Cuadro 5. Evaluación del establecimiento y supervivencia de *R. culicivorax* en 10 de los 13 criaderos tratados en Cuba.
Table 5. Evaluation of establishment and survival of *R. culicivorax* in 10 of the 13 treated breeding sites in Cuba.

Criadero	Julio			Agosto			Septiembre		
	[†] DLm ²	[‡] PP %	[§] MI	DLm ²	PP %	MI	DLm ²	PP %	MI
1	4	78	1.7	5	79	2.0	3	80	1.9
2	5	80	2.1	6	79	1.8	5	81	2.2
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	6	81	2.2	4	77	2.0	3	79	1.6
6	7	80	2.2	5	78	1.8	2	78	1.7
7	8	89	3.4	7	88	2.9	6	90	3.0
8	5	91	3.0	8	87	3.1	5	89	2.9
9	6	88	2.7	7	87	2.9	9	88	2.8
10	10	90	2.8	8	89	2.5	7	86	2.7
11	9	85	2.7	6	87	2.4	6	89	2.9
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	8	89	2.9	5	86	2.6	6	88	2.8

[†]DL=densidad larvaria; [‡]PP=porcentaje de parasitismo; [§]MI=media de infestación.

que este nemátodo tiene potencial para controlar y reducir poblaciones de larvas de estos mosquitos. Hubo evidencia de la capacidad de reproducción y permanencia de *R. culicivora* en los criaderos evaluados por tres meses, hasta la desecación de los mismos.

LITERATURA CITADA

- Brown, B. J., and E. G. Platzer. 1977. Field trials with the mermithid nematode *Romanomermis culicivora* in California. Mosq. News 37: 603-608.
- Chapman, H. C., D. B. Woodard, and J. J. Petersen. 1967. Nematode parasites of Culicidae and Chaoboridae in Louisiana. Mosq. News 27: 490-492.
- Dubitsky, A. M. 1978. Métodos de Control Biológico de los Dípteros Hematófagos en la URSS. Tomo 1. Acad. Csikaz SSR. Alma Atá, Ed. 11265 HC. 225 p.
- García, A. I. 1977. Fauna cubana de mosquitos y sus criaderos típicos. Instituto de zoología. Publicaciones ACE, La Habana, Cuba. pp: 1-84.
- Hoy, J. B., and J. J. Petersen. 1973. Fish and nematodes current status of mosquito control techniques. Calif. Mosq. Control 41: 49-50.
- Ignoffo, C. M., K. D. Biever, W. W. Johnson, H. O. Sanders, H. C. Chapman, J. J. Petersen, and D. B. Woodard. 1973. Susceptibility of aquatic vertebrates and invertebrates to the infective stage of the mosquito nematode *Reesimermis nielsenii*. Mosq. News 33(4): 599-602.
- Kerwin, J. L., and R. K. Washino. 1985. Recycling of *Romanomermis culicivora* mermithidae nematoda in rice fields in California USA. Med. Entomol. 22(6): 637-643.
- Lacey, L. A., and M. S. Mulla. 1972. Field evaluation of difluobenzuron (Dimilin) against Simulium larvae. Mosq. News 39: 86-90.
- Levy, R., and T. W. Miller. 1977. Experimental release of *Romanomermis culicivora* (Mermithidae: Nematoda) to control mosquitoes breeding in Southwest Florida. Mosq. News 37(3): 483-468.
- Pérez-Pacheco, R., A. Santamarina M., y Martínez T. S. 1996. Control biológico de larvas de mosquitos transmisores del paludismo con nemátodos parásitos en Oaxaca, México. Revista Investigación Hoy. Instituto Politécnico Nacional. pp: 8-14.
- Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., Montes B., y G. Ramírez V. 2003. Susceptibilidad de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE) al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari*. Rev. Folia Entomol. Mex. 42(3): 321-327.
- Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., Montes B., G. Ramírez V., y L. Martínez M. 2004. Parasitism of *Romanomermis iyengari* in larvae of three species of mosquito in the laboratory and in *Anopheles pseudopunctipennis* in the field. Agrociencia 38(4): 413-421.
- Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., Montes B., y J. Ruíz V. 2005. Control of the mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, México. Biol. Control. 32: 137-142.
- found suitable conditions for reproduction in the sites studied.

CONCLUSIONS

Romanomermis culicivora infested more than 75% of the *A. albimanus*, *C. nigripalpus* and *U. sapphirina* larvae. *A. albimanus* larvae were more susceptible to parasitism. The levels of parasitism was significantly higher with the higher density of nematodes released. The number of dead larvae per treatment was due to the fact that infested larvae die before pupation. Application of *R. culicivora* in breeding sites reduced larval density of the three species of mosquitoes, indicating that this nematode has the potential to control and reduce larval populations of these mosquitoes. There was evidence that *R. culicivora* can reproduce and remain in the breeding sites evaluated for the three months before the pools dried up.

—End of the English version—



- Petersen, J. J., and O. R. Willis. 1972. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. Mosq. News 32: 226-230.
- Petersen, J. J., and O. R. Willis. 1974. Experimental release of mermithid nematode to control anopheles mosquitoes in Louisiana. Mosq. News 34: 316-319.
- Petersen, J. J., H. C. Chapman, and D. B. Woodard. 1968. The bionomics of a mermithid nematode of larval mosquitoes in southwestern Louisiana USA. Mosq. News 28(3): 346-352.
- Platzer, E. G., B. A. Mullens, and M. M. Shamseldeen. 2005. Mermithid Nematodes. In: Grewal, P., R. Ehlers, D. Shapiro-Ilan (eds). Nematodes as Biocontrol Agents. Wallingford, United Kingdom. CABI Publishing. pp: 411-419.
- Ross, J. F., and S. M. Smith. 1976. A review of the mermithid parasites (Nematode: Mermithid) described from North America mosquitoes (Diptera: Culicidae) with description of three new species. Can. J. Zool. 54: 1084-102.
- Santamarina, M. A. 1996. Cría masiva de *Romanomermis culicivora* (Nematoda: Mermithidae) en las condiciones tropicales de Cuba. Rev. Cub. Med. Trop. 48(1): 26-33.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SAS Institute Inc. 2008. JMP® versión 7 for Windows.
- William, R., J. Northup, O. Gallo, A. E. Montoya, F. Montoya, M. Restrepo, G. Nimnich, M. Arango, and M. Echavarría. 1987. Reduction of malaria prevalence after introduction of *Romanomermis culicivora* (Mermithidae: Nematoda) in larval *Anopheles* habitats in Colombia. Bull. World Health Organ 65(3): 331-337.