



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NIM
***Azadirachta indica* SOLO Y EN MEZCLA CON EL NEMATODO**
Romanomermis iyengari* EN LARVAS DE *Culex
quinquefasciatus

SABINO HONORIO MARTÍNEZ TOMÁS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2007

La presente tesis titulada: **EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NIM *Azadirachta indica* SOLO Y EN MEZCLA CON EL NEMATODO *Romanomermis iyengari* EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus***, realizada por el alumno **SABINO HONORIO MARTÍNEZ TOMÁS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

DR. CESÁREO RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:

DR. RAFAEL PÉREZ PACHECO

ASESOR:

DR. GUSTAVO RAMÍREZ VALVERDE

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, 2 de Agosto de 2007

PRESENTACIÓN

Con el propósito de difundir la información generada con la presente investigación, el contenido de esta tesis está estructurado en cuatro capítulos, el primero contempla Introducción general y Objetivos, el segundo está conformado como artículo con Resumen, Introducción, Materiales y métodos, Resultados y discusión, Conclusiones y Literatura citada, en donde se mencionan los resultados obtenidos de la actividad del extracto acuoso de la semilla de nim *Azadirachta indica* sobre los cuatro instares del mosquito *Culex quinquefasciatus*. En el tercer capítulo, con una estructura de artículo igual que el segundo capítulo, se presenta la información del efecto del extracto de nim solo y en mezcla con el nematodo parásito *Romanomermis iyengari* en larvas de segundo instar del mismo mosquito. En el cuarto capítulo las Conclusiones generales.

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NIM *Azadirachta indica*
SOLO Y EN MEZCLA CON EL NEMATODO *Romanomermis iyengari* EN LARVAS
DE *Culex quinquefasciatus*

Sabino Honorio Martínez Tomás, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2007

Se evaluó el efecto del extracto acuoso de semilla de nim *Azadirachta indica* en el crecimiento de los cuatro instares de *Culex quinquefasciatus* y el efecto de la mezcla del extracto de nim y el nematodo parásito *Romanomermis iyengari* sobre larvas de segundo instar de *Culex quinquefasciatus* para determinar las Concentraciones Efectivas (CE's) del extracto de nim y las Dosis Efectivas (DE's) del nematodo. Primero se realizaron experimentos para obtener los límites de respuesta (Ventana biológica) y luego se efectuaron varios experimentos para encontrar la mejor correlación entre las concentraciones de nim y las dosis del nematodo con el crecimiento de las larvas. Con los resultados obtenidos se determinaron las concentraciones de 4.6, 4.4, 4.1 y 5.5% de nim que inhibieron 50% el crecimiento de la población larval (CE₅₀) de 1º, 2º, 3º y 4º instar, y que afectan la duración y viabilidad larval y pupal al grado de evitar la formación de pupas y emergencia de adultos transmisores de encefalitis, fiebre del Nilo Occidental y filariasis. La aplicación del nematodo a dosis de 5.4:1 nematodos/larva en el 2º instar, inhibe en 50% el crecimiento de la población larval de mosquito. La mezcla nim-nematodo de 5.1 y 5:1 presentó mayor interacción al evitar la formación de pupas y tener el mínimo valor (0.42) de Índice de Crecimiento (IC). El extracto de nim a concentraciones \geq a 5 y 7% en larvas de 1º y 2º instar respectivamente evita la formación de pupas; y a concentraciones \geq a 7% en larvas de 4º instar inhibe la emergencia de adultos. El 100% de mortalidad de larvas de 2º instar se obtuvo con dosis \geq 10:1 nematodos/larva, en cambio a dosis \leq 5:1 no hubo parasitismo total en larvas y las larvas que pasan a pupas no son infestadas por nematodos.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, *Romanomermis iyengari*, *Culex quinquefasciatus*, nematodos, insecticidas vegetales.

EFFECT OF THE WATERY EXTRACT OF SEED DE NEEM *Azadirachta indica*
ALONE AND IN MIXTURE WITH THE NEMATODE *Romanomermis iyengari* IN
LARVAE OF *Culex quinquefasciatus*

Sabino Honorio Martínez Tomás, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2007

The effect of the aqueous extract of neem seed *Azadirachta indica* was evaluated in the growth of the four instars of *C. quinquefasciatus* and the effect of the mixture of the neem extract and the parasite nematode *Romanomermis iyengari* in second instar mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* to determine the effective concentrations (CE's) of the neem extract and the effective doses (DE's) of the nematode. First were carried out experiments to obtain the answer limits (biological window) and then several experiments were made to find the best correlation between the neem concentrations and the doses of nematodes with the growth of the mosquito larvae. With the obtained results was determined that the concentrations of 4.6, 4.4, 4.1 and 5.5 % of neem caused 50% of growth inhibition (CE₅₀) in the population's of 1^o, 2^o, 3^o and 4^o instar, and that they affect the duration and larval viability and pupal to the grade of avoiding the formation of pupae and emergency of adults mosquitoes transmitter of encephalitis, West Nile Virus and filariasis. The application of the nematode to dose of 5.4:1 nematodes/larva in the 2^o instar to inhibits in 50% the population's of mosquito larvae growth. The neem-nematode mixture of 5.1 and 5:1 presented bigger interaction caused inhibition the formation of pupae and to have the minimum value (0.42) of index of growth (IC).

The neem extract to concentrations \geq to 5 and 7% in mosquito larvae of 1^o and 2^o instar respectively avoids the formation of pupae; and to concentrations \geq to 7% in larvae of 4^o inhibits the emergency of adults mosquitoes. 100% of mortality of larvae of 2^o instar was obtained with dose \geq 10:1 nematodes/larva, and to dose \leq 5:1 didn't have total parasitism in larvae and the mosquito larvae that pass to pupae they are not infested by nematodes.

Words key: *Azadirachta indica*, *Romanomermis iyengari*, *Culex quinquefasciatus*, nematodes, vegetable insecticides.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico que permitió la realización de mis estudios de Maestría.

Al Instituto Politécnico Nacional y al CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca, por el apoyo otorgado y haberme permitido realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por permitir estar en sus instalaciones y darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández, por brindarme y seguir teniendo su amistad y permitirme aprender de su experiencia personal como académica, así como el apoyo brindado durante la investigación y durante mi estancia en esta Institución.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco, por su amistad y apoyo moral, que me permitió terminar la Maestría, además de la asesoría en el presente trabajo.

Al Dr. Gustavo Ramírez Valverde, por su asesoría y gran apoyo en los análisis estadísticos de las presentes investigaciones y por brindarme su amistad.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por su amistad, apoyo moral durante mi estancia como estudiante y haber aceptado ser sinodal en el examen de grado

Al Dr. José Antonio Sánchez García por brindarme su amistad como compañero y amigo y haber aceptado estar como sinodal en el examen de grado.

A los profesores del programa Entomología y Acarología por haber contribuido en mi formación académica, y al personal administrativo por su apoyo durante mi estancia.

Al Dr. Francisco Hernández por brindarme su amistad y apoyo.

Al Dr. Refugio Lomeli Flores y M. C. Alejandro Pérez Panduro por su amistad y permitirme trabajar en el laboratorio de Control biológico.

A la Dra. María Luisa Domínguez Hernández, ex-directora del CIIDIR Oaxaca por su apoyo durante mis estudios.

A la Dra. María del Rosario Arnaud Viñas, al Dr. Pastor Matadamas Ortiz y M. C. Martha Patricia Mora Flores, Directivos del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca, por su apoyo brindado durante la etapa final de mis estudios.

Al M. C. Manuel Rubio Espinosa, al Ing. Vicente Ríos y a la Sra. Lucia Méndez, por su amistad y haberme apoyado en los trámites académicos durante mis estudios de Maestría.

A los compañeros y amigos del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca por su apoyo y motivación durante mis estudios.

A mis compañeros y amigos: Gonzalo Flores Ambrocio por su apoyo en la realización de mis experimentos, Inocencio Rodríguez, Armando Castro, Jaime, Alanis, Cadesa y demás que me falten, gracias por su motivación y amistad.

Especialmente a los compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados; Ernesto López Pérez, Misael Martínez Bolaños, Martha Mendoza Lucas, Irene Velázquez, por compartir etapas divertidas y difíciles, durante los estudios. A Marco Antonio Reyes por su apoyo y motivación, a Jhony Enriquez, Carlos Bareto, Martha López, Alfonso Vásquez, Dante, Manuel Espinosa, Petra, Angélica, José, Verónica, Erika, Gaby, Katina, Caro, Mario, Juliana, Memo, Julio, por permitirme su amistad, y compartir durante la Maestría.

DEDICATORIA

A mi madre
Gudelia Tomás Pérez[†]
Que la llevo presente y es un ejemplo de lucha, para seguir adelante

A mi padre
Guillermo Martínez Martínez
Por su apoyo en mis estudios

A mis abuelos[†]
Que siempre los recordaré

A mis tías, primas y primos
Por contar con su apoyo

A mis hermanas
Carolina y Elena por su apoyo y motivación para terminar mis estudios.

A mis hermanos: Guillermo, Ricardo, Félix, Maximino y Miguel
Cuñados y cuñadas
Por sus motivaciones a seguir superándome

A sobrinos y sobrinas
Que son la alegría de la familia y lo tomen como un ejemplo a seguir

A mis amigos: Abad, Luís, Obed, Cheo, Memo
Por contar con su amistad

Y a todas las personas que de alguna manera me han apoyado.

CONTENIDO

Título	Página
ÍNDICE DE CUADROS	ix
CAPÍTULO 1 GENERALIDADES	1
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	2
CAPÍTULO 2 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NIM <i>Azadirachta indica</i> EN <i>Culex quinquefasciatus</i>	3
2.1. RESUMEN.....	3
2.2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.3.1. Obtención de larvas y semilla y elaboración de extractos.....	5
2.3.2. Bioensayos.....	6
2.3.3. Análisis estadístico.....	7
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
2.4.1 Inhibición de crecimiento en larvas de 1º y 2º instar.....	8
2.4.2. Inhibición de crecimiento en larvas de 3º y 4º instar.....	9
2.4.3. Efectos múltiples del nim.....	13
2.5. CONCLUSIONES.....	17
2.6. LITERATURA CITADA.....	18
CAPÍTULO 3 EFECTO DE LA MEZCLA DE EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NIM <i>Azadirachta indica</i> Y DEL NEMATODO <i>Romanomermis iyengari</i> EN LARVAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i>	21
3.1. RESUMEN.....	21
3.2. INTRODUCCIÓN.....	22
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

3.3.1. Material biológico.....	24
3.3.2. Bioensayos.....	25
3.3.2.1. Extracto de nim <i>A. indica</i> en larvas del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i>	25
3.3.2.2. Nematodo <i>R. iyengari</i> en larvas del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i>	26
3.3.2.3. Nim y nematodo en larvas del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i>	26
3.3.2.4. Análisis estadístico.....	26
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
3.4.1. Efecto del extracto de <i>A. indica</i> en el crecimiento de larvas de mosquito <i>C. quinquefasciatus</i>	29
3.4.2. Efecto del nematodo <i>R. iyengari</i> en el crecimiento larval del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i>	31
3.4.3. Efecto del nim y del nematodo <i>R. iyengari</i> en el crecimiento larval del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i>	37
3.5. CONCLUSIONES.....	44
3.6. LITERATURA CITADA.....	45
CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES GENERALES.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Título	Página
CAPÍTULO 2		
1	Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito (quien al momento en el que se formaron de 93 a 98% de pupas en el testigo), con la aplicación del nim <i>A. indica</i> en larvas de 1° y 2° instar.....	10
2	Duración y viabilidad larval y pupal de <i>C. quinquefasciatus</i> después de la aplicación de extracto acuoso de la semilla de <i>A. indica</i> en larvas de 1° y 2° instar.....	12
3	Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito (quien al momento en el que se formaron de 97 a 98% de pupas en el testigo), con la aplicación del nim <i>A. indica</i> en larvas de 3° y 4° instar.....	14
4	Duración y viabilidad larval y pupal de <i>C. quinquefasciatus</i> después de la aplicación de extracto acuoso de la semilla de <i>A. indica</i> en larvas de 3° y 4° instar.....	15
CAPÍTULO 3		
5	Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> con la aplicación del nim <i>A. indica</i> de 10 a 0.000001% en larvas de 2° instar.....	29
6	Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> con la aplicación del nim <i>A. indica</i> de 10 a 0.3% en larvas de 2° instar.....	30
7	Duración y viabilidad larval y pupal de <i>C. quinquefasciatus</i> después de la aplicación del extracto acuoso de la semilla de <i>A. indica</i> en larvas de 2° instar.....	31
8	Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito	

	<i>C. quinquefasciatus</i> con la aplicación de 35 a 1 nematodos de <i>R. iyengari</i> por larva de 2º instar.....	32
9	Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito <i>C. quinquefasciatus</i> con la aplicación de 5 a 0.5 nematodos de <i>R. iyengari</i> por larva de 2º instar.....	34
10	Duración de supervivencia larval, viabilidad larval y pupal de <i>C. quinquefasciatus</i> después de la aplicación del nematodo <i>R. iyengari</i>	35
11	Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito, con la aplicación del nim <i>A. indica</i> y del nematodo <i>R. iyengari</i> en larvas de 2º instar de <i>C. quinquefasciatus</i>	38
12	Duración y viabilidad larval y pupal de <i>C. quinquefasciatus</i> después de la aplicación del nim <i>A. indica</i> y del nematodo <i>R. iyengari</i> en larvas de 2º instar.....	42

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Dentro de los principales insectos de importancia medica y veterinaria se encuentran los mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* por ser vectores de patógenos de enfermedades al hombre. Entre éstos destaca *Culex quinquefasciatus* por transmitir encefalitis, filariasis y fiebre del Nilo Occidental. El control de estos vectores se ha efectuado con insecticidas organosintéticos, los cuales han provocado toxicidad en mamíferos, peces, aves y organismos benéficos, resistencia, eliminación de enemigos naturales, residuos en los alimentos y efectos adversos en el ambiente biológico.

En respuesta a estos problemas se proponen dos alternativas ecológicas para el control de larvas de mosquitos; nim *Azadirachta indica* y nematodo *Romanomermis iyengari*. La primera se basa en la utilización del extracto de la semilla nim, la cual se ha utilizado en 200 especies de plagas por presentar un amplio rango de efectos, como toxicidad, repelencia, inhibición de la alimentación, inhibición de la oviposición, inhibición de la reproducción e inhibición del crecimiento, por lo que presenta ventajas por ser un insecticida natural seguro para el ambiente. La segunda alternativa consiste en usar nematodos infestivos en combinación con el extracto de semilla de nim para encontrar las mejores condiciones de compatibilidad que permitan el manejo de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

No obstante que se ha evaluado la actividad de virus, bacterias, hongos y nematodos entomopatógenos, solos y en forma conjunta para el control de plagas, no se han efectuado investigaciones donde se mezcle el nematodo *Romanomermis iyengari* con insecticidas botánicos, para controlar larvas del mosquito, por tal razón se evaluó el efecto de la mezcla del extracto de nim con el nematodo *R. iyengari* para dilucidar el potencial de cada alternativa, por separado y en combinación, en el manejo del mosquito *C. quinquefasciatus*, y proporcionar información que permita realizar un control bioracional de estos transmisores de enfermedades.

1.2. OBJETIVOS

Los extractos vegetales y el nematodo parásito *R. iyengari* son dos alternativas bioracionales con amplias perspectivas para el control de mosquitos, por lo que en esta investigación se plantearon los objetivos siguientes:

- * Determinar la inhibición de crecimiento del extracto acuoso de semilla de nim *A. indica* en los cuatro instares larvales del mosquito *C. quinquefasciatus*.
- * Determinar el efecto de la mezcla del extracto acuoso de semilla de nim *A. indica* con el nematodo *R. iyengari* en larvas de 2º instar de *C. quinquefasciatus*.

CAPÍTULO 2

INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NIM *Azadirachta indica* EN *Culex quinquefasciatus*

2.1. RESUMEN

El nim *Azadirachta indica* ha mostrado efecto contra varias plagas, entre éstas los mosquitos; sin embargo, el extracto acuoso de la semilla no se ha evaluado en concentraciones subletales en los cuatro instares de *Culex quinquefasciatus*. En vasos de plástico con 100 mL de agua se colocaron 20 larvas y se aplicó 1 mL de extracto de nim y al momento de formarse de 93 a 98% de pupas en el testigo se registraron larvas (en cada instar) y pupas tanto vivas como muertas y se cuantificó el crecimiento, expresándolo en Concentración Efectiva media (CE_{50}). En la población superviviente se registró duración y viabilidad larval y pupal. Las concentraciones de 460, 440, 410 y 550 ppm inhibieron 50% el crecimiento de la población larval (CE_{50}) de 1º, 2º, 3º y 4º instar respectivamente; concentraciones \geq a 500 y 700 ppm en larvas de 1º y 2º instar respectivamente evitan la formación de pupas; y concentraciones \geq a 700 ppm en larvas de 4º instar evitan la emergencia de adultos. El uso de concentraciones subletales de extracto acuoso de la semilla de nim elimina a la población de mosquitos de manera gradual, disminuye la presión de selección, propicia un desarrollo lento de la resistencia, extiende el periodo útil de esta alternativa y es compatible con control biológico para el manejo de estos transmisores de encefalitis, fiebre del Nilo Occidental y filariasis en áreas urbanas,

periurbanas y rurales sin provocar intoxicaciones ni contaminación. Esta nueva visión de manejo de plagas con sustancias polares y concentraciones subletales consigue el mismo efecto que el control convencional al interrumpir la biología y no formar adultos que transmitan enfermedades.

Palabras claves: *Azadirachta indica*, *Culex quinquefasciatus*, insecticidas vegetales.

2.2. INTRODUCCIÓN

El control de mosquitos se ha realizado con insecticidas organosintéticos, desde 1939 con el DDT, causando contaminación, resistencia, intoxicaciones, eliminación de enemigos naturales y acumulación de residuos en productos orgánicos, por lo que es impostergable la implementación de alternativas que permitan manejar bioracionalmente a estos transmisores de enfermedades. Entre las opciones naturales destacan las sustancias orgánicas obtenidas de aproximadamente 344 especies de plantas que han mostrado actividad contra mosquitos (Sukumar *et al.*, 1991), sobresaliendo el nim *Azadirachta indica* (Meliaceae) (Obomanu *et al.*, 2006) por sus diversos efectos. La semilla es la más utilizada y donde se encuentran en mayor proporción las sustancias contra plagas. De ésta, los extractos acetónicos, acuosos, etanólicos y metanólicos ocasionan mortalidad larval y pupal, prolongan el desarrollo, inhiben la formación de pupas y adultos e inhiben la eclosión en mosquitos (Zebitz, 1984; Sagar y Sehgal, 1997; Elhag *et al.*, 2001). No obstante, no se ha investigado el efecto de las sustancias polares de la semilla en el crecimiento y desarrollo de la población de mosquitos, por

lo que en esta investigación se cuantificó el efecto de concentraciones subletales de extracto acuoso de la semilla de nim (EASN) en el crecimiento de los cuatro instares larvales de *C. quinquefasciatus*, así como en la duración y viabilidad larval y pupal.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se efectuó de abril de 2005 a agosto de 2006 en el Laboratorio de Insecticidas Vegetales del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México y en el laboratorio de la Bioplanta de Producción Masiva de Nematodos Parásitos de Larvas de Mosquitos, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional, en Indeco, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

2.3.1. Obtención de larvas y semilla y elaboración de extractos

Las larvas de *C. quinquefasciatus* se obtuvieron del insectario del CIIDIR-Oaxaca, IPN. El nim *A. indica* se adquirió en Santa Rosa de Lima Tututepec, Oaxaca, México, en agosto de 2005. Se despulpó 5 kg de fruto y la semilla se secó. De ésta se colocaron 20 g en 200 mL de agua destilada y se licuaron por un minuto y después de envasar en frasco de vidrio se dejó 24 h en reposo, para lograr la extracción de todas las sustancias hidrosolubles en la mayor cantidad posible. Luego se filtró con la ayuda de un pedazo de tela de manta; la parte sólida se desechó y la líquida (macerado acuoso a 10%) se utilizó para preparar las concentraciones subsecuentes. Se tomó 1 mL de esta preparación y se mezcló con 9

mL de agua destilada para preparar la concentración a 1%, en seguida se añadió 1 mL de esta última solución en 9 mL de agua y se conformó la concentración de 0.1% y así sucesivamente se prepararon las concentraciones 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 y 0.000001 para la primera evaluación. Posteriormente se elaboró otro macerado acuoso a 10% y se realizaron diluciones subsecuentes para preparar las concentraciones de 7, 5, 3, 2, 1.5, 1 y 0.3 que se evaluaron en la segunda fase.

2.3.2. Bioensayos

En un vaso de plástico de 125 mL, al que previamente se le añadieron 100 mL de agua destilada, se depositaron 20 larvas (de 1º, 2º, 3º o 4º instar) y 1 mL del EASN; conformándose así la unidad experimental, la cual se repitió cinco veces en cada concentración.

Se realizaron ocho bioensayos en dos fases, la primera para determinar los límites de respuesta de los cuatro instares larvales en seis ciclos logarítmicos, y la segunda para encontrar la mayor correlación entre crecimiento y concentración del EASN. El testigo, replicado cinco veces, consistió en adicionar 20 larvas en 100 mL de agua.

Al momento que en el testigo se formaron 93% o más de pupas se registró el número de larvas (en cada instar) y pupas vivas y muertas. Las larvas, acorde al tamaño se ubicaron en cada instar, considerándose muertas a las que no presentaron movimientos normales al ser perturbadas con una aguja de disección. Con esta información se cuantificó la inhibición de crecimiento (IC) con la formula de Zhang *et al.* (1993);

$$IC = \frac{\sum_{i=1}^5 (\text{No. insectos vivos} \times \text{Fase insecto}) + \sum_{i=1}^5 [\text{No. insectos muertos} \times (\text{Fase insecto} - 1)]}{(\text{No. total de insectos evaluados} \times \text{Total de fases del insecto})}$$

Donde las fases del insecto 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a instares I, II, III, IV y a pupa. Número de insectos evaluados: 100. Total de fases del insecto: 5 (cuatro larvales y una pupal).

Los datos de IC de las concentraciones se corrigieron con el IC del testigo, conformándose el Índice Relativo de Crecimiento (IRC):

$$IRC = \frac{IC \text{ del tratamiento}}{IC \text{ del testigo}}$$

Luego se correlacionó la concentración con el IRC y se obtuvo la Concentración Efectiva media (CE_{50}), concentración que inhibe 50% el crecimiento de la población.

El experimento se continuó con las larvas y pupas supervivientes, registrando duración y viabilidad larval y pupal; considerándose como duración larval y pupal el número de días transcurridos desde que la larva fue sometida al tratamiento hasta que terminó su fase y desde que se formó la pupa hasta la emergencia del adulto.

Las viabilidades larvales y pupales se obtuvieron en porcentaje con el número de pupas y adultos formados de la población inicial.

Con los datos de individuos muertos por concentración y día se obtuvieron Tiempo Letal medio (TL_{50}) y Concentración Letal media (CL_{50}) en los cuatro instares.

2.3.3. Análisis estadístico

El experimento se analizó como un diseño completamente al azar, donde a los datos se les realizaron pruebas para verificar los supuestos de normalidad de errores (Shapiro-Wilks) y de homogeneidad de varianzas (Prueba de Barlett); cuando se cumplieron, se utilizó el Análisis de Varianza y la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) en el programa JMP versión 5.0.1 (SAS Inc., 1989), y cuando no se cumplieron se efectuó el análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples de rangos para esta misma prueba en el programa Statistix 8.1 (1985) para Windows. Los datos de IRC de 1º y 2º instar se ajustaron a un modelo polinomial de cuarto orden con el programa JMP y a los de 3º y 4º instar se les realizó un análisis de regresión lineal simple con el programa JMP. Con este último programa se determinaron las CE_{50} para los cuatro instares larvales. A datos de mortalidad por concentración y tiempo se les aplicó Análisis Probit (SAS Inc., 2002).

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Inhibición de crecimiento en larvas de 1º y 2º instar.

El EASN a 10% evitó la formación de pupas cuando se aplicó a larvas de 1º y 2º instar, en cambio a 1% se formaron 73-89 y 63-94% de pupas; más de la mitad de la población larval se desarrolló en esta última concentración, lo que indica que una concentración mayor a 1% y menor a 10% inhibe 50% el crecimiento de la población (Cuadro 1). No obstante esta acotación, en la fase 2 se evaluó la concentración de 0.3% para lograr una mayor correlación entre concentración y crecimiento. El EASN a 7% también inhibió la formación de pupas cuando se trataron larvas de 1º y 2º

instar, con TL_{50} de 2.6 y 1.9 d con IC de 0.09 y 0.04% para ambas edades larvales. A 5% el EASN provocó alta mortalidad con inhibición de crecimiento; TL_{50} de 4.4 y 2.5 d con IC de 0.34 y 0.21 para 1º y 2º instar. Los EASN a concentraciones \leq a 3% provocaron leve crecimiento y nulo efecto cuando se aplicaron a larvas de las dos edades. La aplicación de los EASN a 4.6 y 4.4% en larvas de 1º y 2º instar inhibe 50% el crecimiento de la población (Cuadro 1), sin traslape en los límites fiduciales, indicando mayor susceptibilidad en el 2º instar.

Al terminar el ciclo biológico, hasta emergencia de adultos, se observó que las concentraciones \geq a 5 y 7% inhibieron la formación de pupas cuando se aplicaron respectivamente a larvas de 1º y 2º instar. Las viabilidades larvales y pupales fueron normales con concentraciones \leq a 3%; no obstante, en algunas concentraciones la duración larval y/o pupal se prolongó y en otras se acortó (Cuadro 2).

Las CL_{50} del EASN aplicado a larvas de 1º instar a los 3 y 4 d fueron de 6.3 (5.7-7.3) y 5.2 (4.9-5.5%).

El EASN, aplicado a larvas de 1º y 2º instar inhibe 50% el crecimiento de la población con las concentraciones de 460 y 440 ppm y evita la formación de pupas a concentraciones de 5 y 7%.

2.4.2. Inhibición de crecimiento en larvas de 3º y 4º instar

La aplicación del EASN a 1 y 10% en larvas de 3^{er} instar provocó 25-41 y 86-93% de mortalidad y en 4º instar 0-15 y 52-100% de mortalidad, respectivamente, resultando en IC de 0.68-0.84 y 0.30-0.38 para las primeras larvas y de 0.9-1.0 y 0.14-0.26 para las segundas, lo que indica que entre estas concentraciones se encuentra la CE_{50} (Cuadro 3).

CAPÍTULO 2 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL EXTRACTO...

Cuadro 1. Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito (quien al momento en el que se formaron de 93 a 98% de pupas en el testigo), con la aplicación del nim *A. indica* en larvas de 1° y 2° instar.

Concent.	Tratamiento en 1° instar						Tratamiento en 2° instar							
	I	II	III	IV	Pupa	Rango ^P (IC)	ICR [§]	II	III	IV	Pupa	IC [¶]	Rango ^P (IC)	IRC [§]
Fase 1														
10	0 [†] /23 [¶]	0/70	0/7	0/0	0/0	3.0(0.17)	b	0/83	0/17	0/0	0/0	0/0	3.0(0.04)	b
1	0/0	0/13	0/5	0/9	65/8	8.0(0.81)	ab	0/7	0/9	13/8	55/8	0/0	8.0(0.77)	ab
0.1	0/0	0/0	0/0	2/0	96/2	25.1(0.99)	ab	0/0	0/0	0/0	100/0	0/0	33.5(1.00)	a
0.01	0/0	0/0	0/0	0/0	100/0	34.0(1.00)	a	0/1	0/0	2/0	97/0	0/0	22.9(0.98)	ab
0.001	0/0	0/1	0/0	0/0	99/0	29.8(0.99)	a	0/0	0/0	0/0	100/0	0/0	33.5(1.00)	a
0.0001	0/0	0/1	0/0	0/0	98/1	27.1(0.99)	ab	0/0	0/0	0/0	98/2	0/0	29.5(1.00)	ab
0.00001	0/0	0/1	0/1	0/1	97/0	25.9(0.98)	ab	0/0	0/0	1/0	98/1	0/0	27.3(1.00)	ab
0.000001	0/0	0/1	0/0	1/0	96/2	23.6(0.99)	ab	0/1	0/0	0/0	97/2	0/0	22.9(0.99)	ab
Testigo	0/0	0/0	0/0	2/0	98/0	30.5(1.00)	a	0/0	0/0	3/0	97/0	0/0	26.4(0.99)	ab
Fase 2														
10	0/53	0/47	0/0	0/0	0/0	6.2(0.09)	b	0/95	0/5	0/0	0/0	0/0	0.01	c
7	0/58	0/40	1/1	0/0	0/0	4.8(0.09)	b	0/84	0/16	0/0	0/0	0/0	0.04	c
5	0/27	0/19	1/10	0/43	0/0	13.0(0.34)	ab	0/63	0/2	8/25	2/0	0.21	b	0.21
3	0/4	0/1	0/0	24/0	71/0	21.4(0.90)	ab	0/2	0/0	4/3	90/1	0.95	a	0.95
2	0/0	0/2	0/0	16/1	81/0	30.0(0.95)	a	0/0	0/1	2/3	93/1	0.97	a	0.97
1	0/0	0/2	0/0	7/2	89/0	31.9(0.96)	a	0/0	0/0	1/5	94/0	0.97	a	0.97
0.3	0/1	0/2	0/0	34/1	62/0	21.1(0.90)	ab	0/1	0/0	5/1	92/1	0.97	a	0.97
Testigo	0/0	0/1	0/0	6/0	93/0	35.6(0.98)	a	0/0	0/0	2/1	97/0	0.99	a	4.4%
CE ₅₀	4.6% (4.5-4.7)													

Larvas y pupas vivas/muertas[¶] al momento de formarse de 93 a 98% de pupas en los testigos.

[§] El IRC no se calculó en la fase 1, debido a una deficiente correlación entre concentración y crecimiento para calcular la CE₅₀.

[¶] Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis (p<0.05).

[‡] Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey (p<0.05).

En la mayor correlación entre el EASN y su efectividad (fase 2 del Cuadro 3) las concentraciones \geq a 5% provocaron mortalidades de 52 a 86% e inhibieron en más de 50% el crecimiento de la población, dando IC \leq a 0.44, en contraste las concentraciones de 3 a 1% afectaron menos el desarrollo de la población; sobreviviendo de 44 a 85%, lo cual se reflejó en IC de 0.56 a 0.68 y de 0.67 a 0.90 en larvas de 3^o y 4^o instar. Las concentraciones \leq al 0.1% inhibieron levemente el crecimiento. Al momento de obtenerse 97-98% de pupas en el testigo, el EASN inhibió 50% el crecimiento de la población de larvas de 3^o y 4^o instar con las concentraciones de 4.1 y 5.5%, respectivamente; siendo más susceptible el 3^{er} instar.

Al terminar el ciclo biológico a emergencia de adultos se observó (Cuadro 4) que el EASN aplicado a larvas de 3^{er} instar a concentraciones \geq a 5% provocaron de 89 a 100% de mortalidad larval, en tanto que a concentraciones \leq a 3% sobrevivieron 30% ó más pupas y emergieron 36.7% ó más de adultos. En 4^o instar las concentraciones \geq a 7% ocasionaron de 72 a 96% de mortalidad larval y nula formación de adultos, mientras que a concentraciones \leq a 5% sobrevivieron 55% ó más pupas y emergieron 55% ó más de adultos. Además se constató que en 3^{er} instar las concentraciones de 5 y 7% prolongaron, y a 10% acortaron, la duración larval y pupal, mientras que cuando se trataron larvas de 4^o instar se acortó la duración larval con las concentraciones de 7 y 10% y la fase pupal con las concentraciones de 1 a 3% (Cuadro 4).

Cuadro 2. Duración y viabilidad larval y pupal de *C. quinquefasciatus* después de la aplicación de extracto acuoso de la semilla de *A. indica* en larvas de 1° y 2° instar.

Concent.	Tratamiento en 1° instar						Tratamiento en 2° instar					
	Duración (d)			Viabilidad (%)			Duración (d)			Viabilidad (%)		
	Larval ^a	Pupal ^a	Rango ^P (Larval)	Pupal ^a	Rango ^P (Pupal)		Larval ^a	Pupal ^a	Rango ^P (Larval)	Pupal ^a	Rango ^P (Pupal)	
Fase 1												
10	++	¶¶¶	3.0(0.0)	b	¶¶¶	++	¶¶¶	3.0(0.0)	b	¶¶¶	++	¶¶¶
1	10.5	e	12.6	d	8.1(73.0)	ab	16.6(86.3)	a	10.0	ab	11.1	bc
0.1	13.2	a	14.8	a	30.5(100.0)	a	17.2(96.0)	a	9.9	ab	11.4	ab
0.01	11.3	cde	13.2	cd	30.5(100.0)	a	30.0(100.0)	a	10.0	ab	11.6	ab
0.001	11.1	cde	13.1	cd	27.1(99.0)	ab	24.0(100.0)	a	9.6	ab	11.1	bc
0.0001	11.0	d	12.8	d	27.1(99.0)	ab	21.0(99.0)	a	9.2	b	10.6	c
0.00001	12.8	ab	14.5	ab	23.1(97.0)	ab	23.2(100.0)	a	9.7	ab	11.3	abc
0.000001	11.7	bcd	13.5	bcd	27.1(99.0)	ab	13.0(98.0)	a	9.6	b	10.9	bc
Testigo	12.3	abc	14.0	abc	30.5(100.0)	a	19.0(100.0)	a	10.5	a	12.1	a
Fase 2												
10	++	¶¶¶	8.0(0.0)	b	¶¶¶	++	¶¶¶	7.0(0.0)	b	¶¶¶	++	¶¶¶
7	++	¶¶¶	8.0(0.0)	b	¶¶¶	++	¶¶¶	7.0(0.0)	b	¶¶¶	++	¶¶¶
5	++	¶¶¶	8.0(0.0)	ab	¶¶¶	9.0	a	12.0	a	10.0(2.0)	b	8.0(50.0)
3	10.5	bc	12.1	bc	18.2(78.0)	ab	100.0	a	8.0	b	9.6	b
2	11.1	b	12.6	b	28.3(93.0)	ab	96.8	a	7.0	b	9.4	b
1	10.8	b	12.3	bc	31.6(96.0)	a	100.0	a	7.0	b	9.5	b
0.3	12.2	a	13.8	a	26.7(91.0)	ab	97.8	a	2.0	ab	9.9	ab
Testigo	9.9	c	11.6	c	35.2(99.0)	a	100.0	a	1.0	ab	9.9	ab

¶¶ Ningún individuo terminó su fase larval.

¶¶¶ No se formaron pupas.

^P Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis (p≤0.05). ^a Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey (p≤0.05).

Las CL_{50} del EASN aplicado a larvas de 3^{er} instar a los 2, 3 y 4 d fueron de 4.9, 3.2 y 2.6% y en 4^o instar a los 7 d fue de 5.1%. Los TL_{50} en 3^{er} instar a las concentraciones de 7, 5, 3 y 2% fueron de 1.9, 2.1, 4.1 y 4.4 d, respectivamente, y en 4^o instar a 7% fue de 5 d.

En general, el EASN aplicado a larvas de 3^o y 4^o instar inhibe 50% el crecimiento de la población con 410 y 550 ppm y evita la formación de 81.8-100 y 100% de adultos a las concentraciones respectivas de 7 y 10%.

2.4.3. Efectos múltiples del nim

Los TL_{50} a 10% en los cuatro instares larvas (2.6, 1.4, 1.8 y 4.8 d) denotan menor susceptibilidad en 4^o instar y que el EASN no es insecticida, es insectistático; inhibe el crecimiento hasta evitar la formación de pupas, inhibe el desarrollo hasta la no emergencia de adultos y disminuye la viabilidad larval y pupal. Otros efectos que provoca el nim, observados en más de 200 especies de artrópodos y que poco se han investigado en mosquitos, son: antialimentarios, repelentes o atrayentes de oviposición, disminución de la fecundidad y fertilidad, esterilización e inhibición de la reproducción (Mulla y Su, 1999; Elhag *et al.*, 2001).

La inhibición de crecimiento, mal llamada regulación de crecimiento o inhibición de desarrollo en la literatura, solo considera el efecto negativo (no positivo) en el crecimiento larval (no pupal) y además de acotarse como CE_{50} también puede clasificarse, según los efectos múltiples que la acompañen, como fuerte, moderada, leve o falsa (Rodríguez y Vendramim, 1999) y puede cuantificarse de diferentes maneras (Rodríguez, 2003).

Cuadro 3. Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito (quien al momento en el que se formaron de 97 a 98% de pupas en el testigo), con la aplicación del nim A. indica en larvas de 3° y 4° instar.

Concentr. %	Tratamiento en 3° instar				Tratamiento en 4° instar					
	III	IV	Pupa	Rango ^P (IC)	ICR [§]	IV	Pupa	Rango ^P (IC)	IRC [§]	
Fase 1										
10	0 [†] /0 [†]	0/84	7/9	3.0(0.38)	c	0/72	0/28	3.0(0.14)	b	
1	0/0	3/20	72/5	10.8(0.84)	bc	0/0	100/0	35.0(1.00)	a	
0.1	0/0	8/2	89/1	27.0(0.96)	abc	3/0	97/0	26.3(0.99)	ab	
0.01	0/0	5/3	90/2	26.2(0.96)	abc	2/0	98/0	28.2(0.99)	ab	
0.001	0/0	4/1	94/1	33.2(0.98)	ab	4/0	95/1	19.5(0.98)	ab	
0.0001	0/0	3/7	88/2	20.5(0.94)	abc	3/0	97/0	24.8(0.99)	ab	
0.00001	0/1	10/2	86/1	20.6(0.94)	abc	3/1	96/0	21.0(0.98)	ab	
0.000001	0/0	4/3	90/3	26.8(0.96)	abc	3/1	96/0	19.5(0.98)	ab	
Testigo	0/0	1/0	98/1	38.9(0.99)	a	2/0	98/0	29.7(0.99)	a	
Fase 2										
10	0/25	14/61	0/0	5.1(0.30)	c	0.30	48/49	0/3	4.1(0.26)	d
7	0/24	21/55	0/0	6.6(0.32)	bc	0.32	37/43	4/16	6.9(0.31)	cd
5	0/3	22/73	2/0	13.4(0.41)	bc	0.41	14/34	22/30	13.2(0.44)	bcd
3	0/0	22/54	22/2	22.6(0.56)	abc	0.56	8/23	57/12	18.8(0.67)	abcd
2	0/3	13/51	30/3	23.9(0.58)	abc	0.58	1/20	72/7	23.8(0.76)	abcd
1.5	0/6	16/45	33/0	25.0(0.59)	abc	0.59	1/13	75/11	28.0(0.81)	abc
1	0/2	11/39	48/0	29.5(0.68)	ab	0.68	1/5	84/10	31.4(0.90)	ab
Testigo	0/0	3/0	97/0	38.0(0.99)	a	2/0	98/0	37.8(0.99)	a	
CE ₅₀					4.1% (3.4-4.8)	5.5% (5.0-6.0)				

Larvas y pupas vivas[†]/muertas[†] al momento de formarse de 93 a 98% de pupas en los testigos.

[§] El IRC no se calculó en la fase 1, debido a una deficiente correlación entre concentración y crecimiento para calcular la CE₅₀.

^P Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis (p<0.05).

[‡] Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey (p<0.05).

CAPÍTULO 2 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL EXTRACTO...

Cuadro 4. Duración y viabilidad larval y pupal de *C. quinquefasciatus* después de la aplicación de extracto acuoso de la semilla de *A. indica* en larvas de 3° y 4° instar.

Concent.	Tratamiento en 3° instar				Tratamiento en 4° instar											
	Duración (d)	Viabilidad (%)		Duración (d)	Viabilidad (%)											
%	Larval ^a	Pupal ^a	Rango ^b (Larval)	Rango ^b (Pupal)	Larval ^a	Pupal ^a	Rango ^b (Larval)	Rango ^b (Pupal)								
Fase 1																
10	5.1	c	5.0	c	3.0(11.0)	b	3.8(18.2)	b	2.6	b	¶¶¶	3.0(28.0)	a	3.0(0.0)	b	
1	6.7	bc	8.9	b	10.6(78.0)	ab	16.6(89.7)	ab	3.8	a	6.2	a	27.5(100.0)	a	25.5(100.0)	a
0.1	7.8	ab	10.4	a	29.8(97.0)	a	27.3(97.9)	ab	4.2	a	6.2	a	27.5(100.0)	a	21.8(99.0)	a
0.01	8.0	ab	10.1	ab	28.7(97.0)	ab	27.3(97.9)	ab	4.8	a	6.7	a	23.5(99.0)	a	28.0(99.0)	a
0.001	7.6	ab	10.1	ab	29.8(98.0)	a	30.3(99.0)	a	4.2	a	6.3	a	27.5(100.0)	a	18.1(98.0)	a
0.0001	8.0	ab	10.1	ab	21.0(93.0)	ab	24.1(96.8)	ab	4.1	a	6.4	a	27.5(100.0)	a	25.5(100.0)	a
0.00001	8.3	a	10.5	a	20.5(94.0)	ab	26.7(98.9)	ab	4.2	a	6.5	a	23.5(99.0)	a	34.0(100.0)	a
0.000001	7.8	ab	9.9	ab	28.7(97.0)	ab	23.4(95.9)	ab	4.0	a	6.3	a	19.5(98.0)	a	25.6(98.9)	a
Testigo	7.5	ab	9.8	ab	34.9(99.0)	a	27.7(99.0)	ab	4.3	a	6.3	a	27.5(100.0)	a	25.5(25.5)	a
Fase 2																
10	††	¶¶¶	¶¶¶	c	7.0(0.0)	c	¶¶¶	b	5.9(3.8)	b	¶¶¶	e	4.0	e	7.0(0.0)	c
7	6.0	a	¶¶¶	bc	8.4(1.0)	bc	5.0(0.0)	b	7.6(3.1)	b	¶¶¶	e	20.0	e	7.0(0.0)	c
5	6.0	a	8.0	a	9.0(3.0)	bc	11.0(100.0)	b	14.5(3.8)	ab	6.3	a	55.0	d	10.0(5.5)	bc
3	5.2	ab	6.7	ab	22.2(30.0)	abc	16.0(36.7)	ab	22.6(3.8)	ab	5.6	b	72.0	cd	18.0(33.3)	abc
2	5.1	b	6.6	ab	20.3(38.0)	abc	21.0(55.3)	ab	27.6(4.0)	ab	5.5	bc	79.0	bc	23.6(60.8)	abc
1.5	5.1	b	6.1	b	25.8(42.0)	abc	20.0(52.4)	ab	24.0(3.9)	ab	5.3	bc	86.0	abc	31.6(82.6)	ab
1	5.1	b	6.3	b	29.1(55.0)	ab	22.0(63.6)	ab	19.4(3.7)	ab	5.1	c	95.0	ab	28.8(76.8)	abc
Testigo	4.9	b	6.3	b	38.0(100.0)	a	31.0(100.0)	a	37.2(4.3)	a	6.1	a	100.0	a	38.0(100.0)	a

†† Ningún individuo terminó su fase larval.

^a Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis (p<0.05).

^b Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey (p<0.05).

¶¶¶ No se formaron pupas.

Al no formarse pupas ni emerger adultos no habrá hembras que transmitan encefalitis y filariasis (Singh, 1996) ni fiebre del Nilo Occidental (Hayes y Gubler, 2005).

La prolongación en la duración de la fase larval, como se observó con la aplicación de algunas concentraciones del EASN, refleja una inhibición de crecimiento, en cambio la prolongación en la duración de la fase pupal denota una inhibición de desarrollo. La prolongación de las fases larval y pupal, también provocada por el extracto acetónico (Sagar y Sehgal, 1997) y solamente larval por el metanólico de la semilla de nim, un extracto enriquecido con azadiractina y un extracto acuoso de la hoja de nim (Singh, 1996), probablemente se deba al efecto de uno o varios aleloquímicos tóxicos en baja concentración en el extracto (Tanzubil y McCaffery, 1990), como azadiractina, meliantriol o salanina (El-Ela *et al.*, 1998), o porque se provoque un desbalance nutricional u hormonal o a la combinación de estas situaciones. La azadiractina interfiere en la síntesis y liberación de la hormona de la muda (Murray, 2005), por lo que retarda las mudas y prolonga la duración larval, inhibiendo así el crecimiento. En el caso de la pupa, ésta prolonga su duración para desintoxicarse, regularse metabólicamente y normalizarse.

En contraste algunas concentraciones del EASN acortaron la duración larval y pupal, probablemente porque utilizaron energía de reserva para liberarse del efecto tóxico de extracto o porque el extracto causó un desbalance hormonal que estimuló el crecimiento (Reniprabha *et al.*, 1999) e incentivó el desarrollo para evadir la intoxicación o éste provocó la carencia de algún nutriente y obligó a la larva a ingerir más alimento y a desarrollarse más rápido. Cumplir el ciclo biológico en menos

tiempo del normal, lo cual no se había reportado previamente en mosquitos, propiciará que haya adultos más rápido, se desarrollen más generaciones en un tiempo determinado y se intensifique la transmisión de enfermedades.

El uso de concentraciones subletales en el manejo de mosquitos, además de ocasionar la misma efectividad (viabilidad larval de 0%), propiciará menor presión de selección, desarrollo lento de la resistencia y un periodo más extenso de efectividad. Mya *et al.* (2002) consignaron mortalidad total de larvas de 1º y 2º instar con la aplicación del EASN a 20% a las 4 h, mientras que en esta investigación se logró el mismo resultado con la concentración (final) de 0.1% (1000 ppm) del mismo extracto a los 6 d. Incluso la concentración puede bajarse hasta 62.5 ppm con el extracto acuoso de semilla desengrasada de nim, la cual provoca 100% de mortalidad en larvas de 2º instar a los 8 d (Singh, 1984); en todo caso no se completa el desarrollo y no hay adultos que transmitan enfermedades (Shalan *et al.*, 2005).

Esta alternativa bioracional, que permite manejar en forma natural y orgánica las poblaciones de mosquitos en áreas urbanas, periurbanas y rurales, no elimina drásticamente la población, actúa gradualmente sobre larvas evitando que completen su desarrollo, no se formen pupas y no emerjan adultos. Al prolongar la fase inmadura, larvas y pupas quedan más tiempo expuestas a enemigos naturales, por lo que esta opción de manejo de mosquitos es compatible con control biológico.

2.5. CONCLUSIONES

EL extracto acuoso de la semilla de nim *A. indica* inhibe 50% el crecimiento de la población (CE₅₀) de larvas de 1º, 2º, 3º y 4º instar de *C. quinquefasciatus* con 460,

440, 410 y 550 ppm respectivamente, y afecta la duración y viabilidad larval y pupal al grado de evitar la formación de pupas y emergencia de adultos.

2.6. LITERATURA CITADA

- El-Ela, N.A., M. Talha, and A.A. El-Aziz. 1998. Response and effect of two plant crude extracts on mosquito larvae *Culex pipiens*. J. Egypt Public Health Assoc. LXXIII(5,6):649-665.
- Elhag, E.A., A. El Rahman, H. El Nadi, and A.A. Zaitoon. 2001. Effects of methanolic extracts of neem seeds on egg hatchability and larval development of *Culex pipiens* mosquitoes. Indian Vet. J. 78:199-201.
- Hayes, B.E., and D.J. Gubler. 2005. West Nile Virus: Epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. Annu. Rev. Med. 57:181-94.
- Mulla, S.M., and T. Su. 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15(2):133-152.
- Murray, B.I. 2005. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51:45-66.
- Mya, M.M., A. Singh, S. Sharma, P. Vasudevan, and R.K. Saxena. 2002. Biological control of mosquitoes. Intl. Pest Control 44(2):90-94.
- Obomanu, F.G., O.K. Ogbalu, U.U. Gabriel, G.K. Fekarurrhobo, and B.I. Adediran. 2006. Larvicidal properties of *Lepidagathis alopecuroides* and *Azadirachta*

- indica* on *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. Afr. J. Biotechnol. 5(9):761-765.
- Reniprabha, A., S. Muralidharan, and M.A. Subramanian. 1999. Impact of plant extracts on molting in the larvae of mosquito *Culex* sp. Environment & Ecology 17(4):1022-1024.
- Rodríguez H., C. 2003. Cuantificación de la inhibición de crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales. In: Agricultura, Ambiente y Desarrollo Sustentable. Tornero, C.M.; J.F. López O., y A. Aragón G. (ds). Publicación especial de la BUAP. Puebla, México. p.223-242.
- Rodríguez H., C., y J.D. Vendramim. 1999. Efecto insectistático de *Melia azedarach* y *Trichilia pallida* (Meliaceae) en el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). In: Memorias de IV Simp. Internal y V Reunión Nal sobre Agricultura Sostenible. SOMAS y CP. Morelia, Mich., México. pp: 295-306.
- Sagar, S.K., and S.S. Sehgal. 1997. Toxicity of neem seed coat extract against mosquitoes. Indian J. Entomol. 59(2):215-223.
- SAS Institute Inc. 1989. JMP[®] versión 5.0.1. for Windows.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS version 9.1.3. para Windows.
- Shalan, E.A., D. Canyon, M.W. Faried, H. Abdel-Wahab, and A. Mansour. 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environ Int. 31(2005):1149-1166.
- Singh, R.P. 1984. Effect of water extract of deoiled neem kernel on second instar larvae of *Culex fatigans* Wiedemann. Neem Newslett. 1:16.

- Singh, S. 1996. Growth regulatory effects of neem extracts on *Culex quinquefasciatus*. Indian J. Entomol. 58(1):22-26.
- Statistix 8.1 for Windows. 1985. Copyright 1985-2005. Analytical Software. www.statistix.com.
- Sukumar, K.M., J. Perich, and L.R. Boombar. 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. J. Am. Mosq. Control Assoc. 7(2):210-237.
- Tanzubil, P.B., and A.R. McCaffery. 1990. Effects of azadirachtin on reproduction in the African armyworm (*Spodoptera exempta*). Entomol. Exp. Appl. 57(2):115-121.
- Zebitz C., P. W. 1984. Effect of some crude and azadirachtin-enriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. Entomol. Exp. Appl. 35: 11-16.
- Zhang, M., S.K. Chaudhuri, and I. Kubo. 1993. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. J. Chem. Ecol. 19(6):1109-1118.

CAPÍTULO 3

EFFECTO DE LA MEZCLA DE EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NIM *Azadirachta indica* Y DEL NEMATODO *Romanomermis iyengari* EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus*

3.1. RESUMEN

Para el control de mosquitos se han utilizado virus, bacterias, hongos, nematodos, peces larvívoros por separado y en combinación, como también extractos de plantas que presentan diferentes efectos sobre los mismos, sin embargo a la fecha no se ha evaluado la interacción del extracto acuoso de semilla de nim con el nematodo *Romanomermis iyengari* en larvas de 2º instar de *Culex quinquefasciatus*. La unidad experimental consistió de un vaso de plástico con 100 ml de agua destilada con 20 larvas de 2º instar donde se aplicó un ml de extracto de nim y nematodos infestivos, solos y en mezcla. Mediante una correlación del Índice Relativo de Crecimiento (IRC) con las concentraciones de nim y dosis de nematodos se calcularon las Concentración Efectivas (CE's) tanto del nim como del nematodo resultando con valores de 4.0% del extracto de nim y 5.4:1 nematodos/larva, ambas inhiben en 50% el crecimiento de la población larval. Se calcularon y mezclaron cinco Concentraciones Efectivas del nim con cinco del nematodo. Las 25 mezclas de nim-nematodo presentaron una moderada inhibición de crecimiento con valores de IC de 0.42 a 0.52, con 87 a 100% de mortalidad. La mezcla nim-nematodo de 5.1 y 5:1 fue

la que presentó mayor compatibilidad al evitar la formación de pupas y tener el mínimo valor de IC de 0.42. En el presente estudio se demuestra el efecto del extracto de nim y el nematodo solos y en mezcla en 2º ínstar, por lo resultados obtenidos presentan un potencial para el control del mosquito *C. quinquefasciatus*, transmisor de enfermedades como la encefalitis y fiebre del río nilo occidental, por lo que la combinación de estas alternativas naturales pueden ser implementadas en programas de manejo integrado de mosquitos.

Palabras clave: *Romanomermis iyengari*, *Azadirachta indica*, *Culex quinquefasciatus*, nematodo, extractos vegetales.

3.2. INTRODUCCIÓN

Actualmente para el combate de plagas agrícolas existen diferentes alternativas biológicas, como el uso de virus, bacterias, hongos y nematodos entomopatógenos, a pesar de que presentan su propia efectividad al aplicarlos en forma individual, y con la finalidad de incrementar el efecto en las plagas, ahora se busca su compatibilidad con otras alternativas ecológicas. Se ha evaluado la mezcla de nematodos entomopatógenos con productos biológicos y químicos para el combate de plagas y manejo de cultivos agrícolas (Prabhuraj y Viraktamath, 2004). Para el control de larvas de mosquitos, de igual manera se han utilizado virus, bacterias, hongos, peces larvívoros y nematodos parásitos del género *Romanomermis spp.* y se han en forma conjunta en condiciones de laboratorio y campo.

El nematodo *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae), un parásito específico de larvas de mosquitos, ha demostrado alta capacidad parasítica para reducir poblaciones de larvas tanto en laboratorio como en criaderos naturales (Gajanana *et al.*, 1978; Chandrahas y Rajagopalan, 1979; Pridantseva *et al.*, 1990; Vladimirova *et al.*, 1990; Santamarina *et al.*, 1992 y 1996; Santamarina, 1994, Pérez *et al.*, 2003); sin embargo, no se cuenta con registros de compatibilidad con productos químicos o naturales.

Se ha reportado que los juveniles infestivos de *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) y *Steinernema feltie* son tolerantes en tiempos cortos (2-6 h) de exposición a agroquímicos como herbicidas, fungicidas, acaricidas e insecticidas químicos (Rovesti y Deseo, 1990); sin embargo, algunos insecticidas químicos pueden afectar la viabilidad y virulencia (Zimmerman y Cranshaw, 1990). Los componentes de los productos químicos pueden ocasionar diferente efecto en nematodos debido a su variada composición química, asimismo las diferentes especies de nematodos pueden diferir en sensibilidad a diferentes compuestos de los agroquímicos, como es el caso del efecto del extracto acuoso de semilla de nim *Azadirachta indica* (Meliaceae), el cual en altas concentraciones afecta más a *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) que a *Steinernema* (Rovesti y Deseo, 1990). Por lo tanto, es importante investigar la compatibilidad entre los nematodos entomopatógenos y otras alternativas biológicas, para establecer sistemas de manejo integrado de plagas sustentables que disminuyan o eviten la contaminación de productos químicos, que son los más usados en el control de vectores y plagas agrícolas.

Por lo que en este estudio se realizaron diferentes experimentos con el objetivo de determinar el efecto del extracto acuoso de la semilla de nim *A. indica* y del nematodo *R. iyengari*, en forma independiente y mezclados, en el crecimiento de la población larval del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en la planta de producción masiva de nematodos parásitos de larvas de mosquitos del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca y en el Área de Insecticidas vegetales del Campus Montecillos, Colegio de Postgraduados, durante septiembre de 2006 a febrero de 2007. Primero se evaluó el efecto del extracto acuoso de la semilla de nim, luego del nematodo *R. iyengari* y al final la interacción nim-nematodo en larvas de 2º instar del mosquito *C. quinquefasciatus*.

3.3.1. Material biológico

Las larvas de 2º instar del mosquito *C. quinquefasciatus* se obtuvieron del insectario de la planta de producción masiva de nematodos del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca.

El extracto acuoso de semilla se preparó en una licuadora en la que se depositaron 20 g de semilla seca de nim y 200 mL de agua destilada. Después de moler por 1 min la mezcla se colocó en un frasco de vidrio y se dejó reposar por 24 h. Posteriormente se procedió a separar sólido y líquido, usando éste último (extracto al 10%) en los bioensayos.

Los nematodos juveniles se obtuvieron de medios de cultivo (cajas plásticas con arena y huevos de nematodos), a los cuales previamente se les agregaron 500 mL de agua destilada y se dejaron reposar durante 3 h para promover la eclosión de los huevos. Posteriormente se procedió a realizar el conteo de juveniles en agua por el método de dilución volumétrica (Petersen y Willis, 1972), para determinar el número de nematodos en el inoculo y preparar la cantidad de inoculo a aplicar en los tratamientos.

3.3.2. Bioensayos

La unidad experimental fue un vaso de plástico (125 mL) con 100 mL de agua destilada y 20 larvas de mosquito de 2º instar en el cual se agregó 1 mL del extracto acuoso de la semilla de nim al 10% o nematodos infestivos de acuerdo a cada dosis; cuando se aplicaron los dos en un mismo tratamiento, primero se aplicó 1 mL del extracto de nim e inmediatamente se aplicaron los nematodos. El experimento se estableció en un diseño completamente aleatorio y cada tratamiento se repitió cinco veces al igual que el testigo.

3.3.2.1. Extracto de nim *A. indica* en larvas del mosquito *C. quinquefasciatus*.

El primer bioensayo consistió en la aplicación de las concentraciones 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 y 0.000001% del extracto acuoso de semilla de nim en larvas de 2º instar de *C. quinquefasciatus* para determinar el rango de respuesta. En el segundo bioensayo se aplicaron las concentraciones de 10, 7, 5, 3, 2, 1 y 0.3%

para determinar la Concentración Efectiva (CE) que inhibe en 50% el crecimiento de la población del mosquito.

3.3.2.2. Nematodo *R. iyengari* en larvas del mosquito *C. quinquefasciatus*.

En un bioensayo preliminar se aplicaron nematodos a dosis de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, y 1:1 nematodos por larva de mosquito para determinar el rango de respuesta que afecta el crecimiento de las larvas de mosquitos y en otro bioensayo se probaron las dosis del nematodo de 5, 3.4, 3.1, 2.8, 2.5, 2.2, 1.9, 1.6, 1.3, 1, y 0.5:1 nematodos/larva para calcular la Dosis Efectiva (DE) que causa 50% de inhibición de crecimiento de la población larval del mosquito.

3.3.2.3. Nim y nematodo en larvas del mosquito *C. quinquefasciatus*.

Las concentraciones efectivas de 5.1, 4.3, 4.0, 3.8 y 3.2% del extracto de nim que inhibieron respectivamente en 20, 40, 50, 60 y 80% el crecimiento de la población larval de *C. quinquefasciatus* se combinaron con las dosis efectivas de 5.0, 2.5, 2.2, 1.9 y 0.9:1 nematodos/larva que inhibieron 53, 70, 72, 74 y 83% el crecimiento de la población del mosquito, además se evaluaron tres testigos; el primero a concentración de 4% el extracto del nim que inhibe 50% el crecimiento de la población, el segundo a dosis de 2.2:1 nematodos/larva que es el punto medio entre las dosis de 5:1 y 0.5:1 nematodos/larva que inhibe en 72% el crecimiento de la población, y el tercero que consistió solo de larvas sin tratamiento.

Las variables evaluadas fueron: índice de crecimiento, duración y viabilidad tanto larval como pupal. En la primera se determinó el número de individuos vivos y

mueritos en cada instar cuando en el testigo se registró el 90% o más de pupas. Con estos datos se cuantificó la inhibición de crecimiento mediante el procedimiento de Zhang *et al.* (1993):

$$IC = \frac{\sum_{i=1}^4 (\text{No. insectos vivos} \times \text{Fase insecto}) + \sum_{i=1}^4 [\text{No. insectos muertos} \times (\text{Fase insecto} - 1)]}{(\text{No. total de insectos evaluados} \times \text{Total de fases del insecto})}$$

Donde:

IC= Índice de crecimiento.

Fase del insecto: 1, 2, 3 y 4 correspondientes a 2º, 3º y 4º instar y pupa.

Total de insectos evaluados=100

Total de fases del insecto=4; tres instares larvales y pupa.

El IC oscila de 0 a 1; 0 indica crecimiento nulo en la población indica, muere toda la población en 2º instar y 1 refleja el crecimiento normal de la población larval (Rodríguez y Vendramim, 1999).

El IC del tratamiento se corrige con el IC del testigo para obtener el Índice Relativo de Crecimiento (IRC) a través de la siguiente relación:

$$IRC = \frac{\text{IC del tratamiento}}{\text{IC del testigo}}$$

Posteriormente, mediante análisis de regresión de los IRC con las concentraciones del extracto de nim y las dosis del nematodo se determinaron las Concentraciones Efectivas (CE's) que inhibieron el crecimiento de larvas de mosquito.

La duración de supervivencia se refiere al número de días promedio transcurridos desde la aplicación del tratamiento hasta que duró con vida la población larval, en el caso de aplicación de nematodos. La duración larval y pupal indican el número de días transcurridos desde la aplicación del tratamiento a larvas de 2º instar hasta su formación a pupa y adulto. La viabilidad larval y pupal se refiere al número de individuos tratados (expresados en porcentaje), que llegaron al estado de pupa y adulto, respectivamente.

3.3.2.4. Análisis estadístico.

El experimento se analizó como un diseño completamente al azar, utilizando el programa JMP versión 5.0.1 (SAS Inc., 1989). A los datos obtenidos se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la normalidad y para análisis de homogeneidad de varianzas se aplicó la Prueba de Barlett; cuando se cumplieron estos parámetros, se realizó el Análisis de Varianza y la comparación de medias por medio de Tukey ($p \leq 0.05$), cuando los datos no cumplieron con los parámetros de normalidad y homogeneidad de varianzas se aplicó análisis no paramétrico usando la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples de rangos con el programa Statistix 8.1 para Windows (1985). Los datos de los IRC's, producto de la aplicación del nim en 2º instar del mosquito se ajustaron al modelo Harris con el programa Curve Expert versión 1.38 (Hyams, 1995) y a los datos de IRC's obtenidos por la aplicación de nematodos en 2º instar del mosquito se les realizó un análisis de regresión lineal simple para encontrar las Concentraciones Efectivas 53, 70, 72, 74 y 83 con el programa JMP.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Efecto del extracto de *A. indica* en el crecimiento de larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*.

En Cuadro 5, se presentan los resultados de larvas y pupas, vivas y muertas así como del índice de crecimiento del mosquito, ocasionados por la aplicación del extracto acuoso de semilla de *A. indica* nim en larvas de 2° instar de *C. quinquefasciatus*. El extracto de nim a 10% evitó la formación de pupas, a 1% se formaron 63% de pupas y a concentraciones inferiores a 1% se formaron 97-100% de pupas, indicando que entre las concentraciones de 10 y 1% se causa un efecto en las larvas de *C. quinquefasciatus*.

Cuadro 5. Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito *C. quinquefasciatus* con la aplicación del nim *A. indica* de 10 a 0.000001% en larvas de 2° instar.

Conc. (%)	II	III	IV	Pupa	Rango [§] (IC)
10	0 [†] /83 ^{††}	0/17	0/0	0/0	3.0 (0.04) b
1	0/7	0/9	13/8	55/8	8.0 (0.77) ab
0.1	0/0	0/0	0/0	100/0	33.5 (1.00) a
0.01	0/1	0/0	2/0	97/0	22.9 (0.98) ab
0.001	0/0	0/0	0/0	100/0	33.5 (1.00) a
0.0001	0/0	0/0	0/0	98/2	29.5 (1.00) ab
0.00001	0/0	0/0	1/0	98/1	27.3 (1.00) ab
0.000001	0/1	0/0	0/0	97/2	22.9 (0.99) ab
Testigo	0/0	0/0	3/0	97/0	26.4 (0.99) ab

Registro de larvas y pupas vivas[†]/muertas^{††} cuando se formó el 97% de pupas en el testigo; [§]Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$).

Considerando los resultados observados en el rango de 10 a 1%, en otro experimento se evaluaron las concentraciones 7, 5, 3, 2 y 0.3% para determinar la

correlación entre concentraciones de nim y crecimiento. Los extractos de nim a concentraciones \leq a 3% causaron leve crecimiento y nulo efecto. La aplicación de los extractos de nim a concentraciones de 5.1, 4.3, 4.0, 3.8 y 3.2% a larvas de 2º instar inhiben el crecimiento en 20, 40, 50, 60 y 80% el crecimiento de la población (Cuadro 6).

Cuadro 6. Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito *C. quinquefasciatus* con la aplicación del nim *A. indica* de 10 a 0.3% en larvas de 2º instar.

Conc. (%)	II	III	IV	Pupa	IC ^a	IRC
10	0 [†] /95 ^{††}	0/5	0/0	0/0	0.01 c	0.01
7	0/84	0/16	0/0	0/0	0.04 c	0.04
5	0/63	0/2	8/25	2/0	0.21 b	0.21
3	0/2	0/0	4/3	90/1	0.95 a	0.95
2	0/0	0/1	2/3	93/1	0.97 a	0.97
1	0/0	0/0	1/5	94/0	0.97 a	0.97
0.3	0/1	0/0	5/1	92/1	0.97 a	0.97
Testigo	0/0	0/0	2/1	97/0	0.99 a	
CE ₅₀						4.0

Registro de larvas y pupas vivas[†]/muertas^{††} cuando se formó el 97% de pupas en el testigo; ^aLas medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuando la población de larvas llegó hasta la emergencia a adultos, las concentraciones de extracto de nim a 10 y 7% inhibieron la formación de pupas y no se formaron adultos, a 5% se prolongó las duraciones larvales y pupales, solamente se formó el 2% de pupas y el 50% pasó a formarse como adultos. Las duraciones y viabilidades tanto larvales como pupales fueron normales con concentraciones \leq 3% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Duración y viabilidad larval y pupal de *C. quinquefasciatus* después de la aplicación del

extracto acuoso de la semilla de *A. indica* en larvas de 2° instar.

Conc. (%)	Duración (d)		Viabilidad (%)	
	Larval ^a	Pupal ^a	Rango [§] (Larval)	Rango [§] (Pupal)
10	-	*	7.0 (0)	b *
7	-	*	7.0 (0)	b *
5	9.0 a	12.0 a	10.0 (2)	b 8.0 (50.0) a
3	7.8 b	9.6 b	24.7 (92)	ab 17.6 (97.8) a
2	7.7 b	9.4 b	26.6 (94)	ab 14.2 (94.7) a
1	7.7 b	9.5 b	28.1 (94)	ab 18.2 (97.9) a
0.3	8.2 ab	9.9 ab	26.6 (95)	ab 15.2 (96.8) a
Testigo	8.1 ab	9.9 ab	34.0 (99)	a 19.8 (100.0) a

-Ningún individuo terminó su fase larval; *No se formaron pupas; [§]Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$); ^aLas medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

La aplicación del extracto de nim a concentración de 400 ppm a larvas de 2° instar inhiben el crecimiento en 50% el crecimiento de la población y evita la formación de pupas y adultos a concentraciones > 5%.

3.4.2. Efecto del nematodo *R. iyengari* en el crecimiento larval del mosquito *C. quinquefasciatus*

En Cuadro 8 se muestra la disposición de larvas y pupas, vivas y muertas, y el Índice de Crecimiento del mosquito en el momento de obtenerse el 93% de pupas en el testigo, con la aplicación de diferentes dosis de nematodos *R. iyengari* sobre larvas de 2° instar de *C. quinquefasciatus*. Las dosis $\geq 5:1$ nematodos/larva provocaron inhibición de crecimiento con $IC \leq 0.49$, en tanto que con las dosis de $\leq 1:1$ el IC fue ≥ 0.69 . El 100% de mortalidad larval se obtuvo con dosis $\geq 10:1$ nematodos/larva con moderada inhibición de crecimiento.

Cuadro 8. Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito *C. quinquefasciatus* con la aplicación de 35 a 1 nematodos de *R. iyengari* por larva de 2° instar.

Nema: larva	II	III	IV	Pupa	IC ^a	IRC
35:1	0 [†] /0 ^{††}	0/65	0/35	0/0	0.34 f	0.35
30:1	0/0	0/50	0/50	0/0	0.38 ef	0.39
25:1	0/1	0/35	0/64	0/0	0.41 def	0.42
20:1	0/0	0/27	0/73	0/0	0.43 cde	0.45
15:1	0/1	0/24	0/75	0/0	0.44 cde	0.45
10:1	0/0	0/9	0/91	0/0	0.48 cd	0.49
5:1	0/0	0/5	0/94	1/0	0.49 c	0.51
1:1	0/0	0/0	0/63	37/0	0.69 b	0.71
Testigo	0/0	0/0	5/2	90/3	0.97a	

Registro de larvas y pupas vivas[†]/muertas^{††} cuando se formó el 93% de pupas en el testigo; ^aLas medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

A dosis de 5:1 se registró la mortalidad de cinco larvas de 3er instar, 94 de 4° instar; 99% de mortalidad larval final, indicando que el nematodo entró y siguió con su desarrollo biológico normal hasta su emergencia en larvas de 4° instar causándoles la muerte, con la formación de 1% de pupa. A dosis de 1:1 hubo 37% de viabilidad larval, datos que indican que en estas dosis no se infestó a toda la población de 2° instar.

En la fase parásita, se observó el nematodo a lo largo del abdomen de la larva, ocurriendo la emergencia de los postparásitos por el abdomen de la misma. Con las dosis de 35:1 y 30:1 las larvas parasitadas tuvieron un periodo de vida corto de 3.1 y 3.7 d, debido a que las larvas no soportaron la cantidad de nematodos en su interior. A una dosis $\geq 5:1$ se acortó el periodo de vida larval desde 3.1 a 6.3 d en comparación con el testigo que fue de 7.6 d. Con las dosis de 1:1 nematodos/larva, el periodo de vida de larvas parasitadas fue de 7.5 d. Paily y Balaraman (2000),

reportaron que con la dosis de 3:1 la larva de *C. quinquefasciatus* tardó de 5 a 7 d; resultados similares a este estudio. La mayoría de las larvas muertas quedaron en la superficie del agua y en el fondo del vaso se observaron los nematodos postparásitos emergidos de éstas.

Con los resultados del periodo de supervivencia larval de *C. quinquefasciatus* causado por la aplicación del nematodo *R. iyengari* en larvas de 2º instar de mosquito se observó que al aumentar las dosis del nematodo disminuye el periodo de supervivencia larval.

Al terminar el ciclo biológico, hasta emergencia de adultos, a dosis de 5 y 1:1 sobrevivió el 1 y 45% de pupas, las cuales tuvieron 100% de viabilidad.

En Cuadro 9 se observa una correlación más estrecha entre las dosis de 5:1 a 0.5:1 nematodos/larva a través de los resultados de larvas y pupas tanto vivas como muertas y el índice de crecimiento ocasionados por el nematodo *R. iyengari* en larvas de *C. quinquefasciatus*. En éste se observa que con la aplicación del nematodo a dosis de 5:1 y 3.4:1 se obtuvo 100 y 97% de mortalidad larval con un IC de 0.49, indicando moderada inhibición de crecimiento, en tanto que a dosis de 3.1:1 a 1:1 se tuvo un rango de 58 a 88% de mortalidad, y leve inhibición de crecimiento (0.55-0.71). La dosis de 0.5:1, con 5% de mortalidad, presentó insignificante inhibición de crecimiento (0.96).

Se observó que con las dosis evaluadas no hubo mucha variación entre una y otra, se esperaba que la mortalidad larval aumentará en forma proporcional con las dosis; sin embargo a dosis de 2.2 y 1.3:1 se registraron 88 y 58% de mortalidad de larvas, y no se mostró este comportamiento. Esta variación se debe probablemente a

que los nematodos no tuvieron la misma capacidad parasítica y a que hubo variación en sus movimientos, quizá debido a que en la cría masiva la eclosión del huevo no fue uniforme por diferente efecto de temperatura, cantidad de agua, calidad del sustrato y tiempo de almacenamiento de los medios de cultivo. En lo subsecuente se debe realizar tres veces el conteo de nematodos y seleccionar los nematodos infestivos con movimiento normal.

Cuadro 9. Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito *C. quinquefasciatus* con la aplicación de 5 a 0.5 nematodos de *R. iyengari* por larva de 2° instar.

Nema: larva	II	III	IV	Pupa	Rango [§] (IC)	IRC
5:1	0 [†] /2 ^{††}	0/1	0/97	0/0	8.20 (0.49) b	0.50
3.4:1	0/5	0/0	0/92	3/0	9.30 (0.49) b	0.50
3.1:1	0/2	0/0	4/82	12/0	20.30 (0.55) ab	0.56
2.8:1	0/3	0/0	0/79	18/0	26.20 (0.58) ab	0.59
2.5:1	0/4	0/0	1/76	18/1	26.50 (0.58) ab	0.59
2.2:1	0/3	0/0	0/85	12/0	19.90 (0.55) ab	0.56
1.9:1	0/4	0/0	0/72	24/0	30.70 (0.60) ab	0.62
1.6:1	0/2	0/0	0/75	23/0	31.60 (0.61) ab	0.62
1.3:1	0/1	0/0	0/57	42/0	44.20 (0.71) ab	0.72
1:1	0/0	0/0	10/60	30/0	38.10 (0.65) ab	0.67
0.5:1	0/2	0/1	2/2	93/0	54.50 (0.96) a	0.98
Testigo	0/1	0/0	1/2	95/1	56.50 (0.98) a	

Registro de larvas y pupas vivas[†]/muertas^{††} al momento de formarse el 96% de pupas en el testigo; [§]Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$).

La aplicación del nematodo a dosis de 5.4 (con límites fiduciales de 4.7 y 6.5:1), por larva de 2° instar inhibe en 50% el crecimiento de la población del mosquito.

En Cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos del periodo de supervivencia larval, y viabilidad larval y pupal de *C. quinquefasciatus* ocasionados

por la aplicación del nematodo *R. iyengari*. Durante el periodo larval y hasta la emergencia de adultos las dosis de 5:1 y 3.4:1 del nematodo aplicadas a larvas de 2° instar, que causaron 97 a 100% de mortalidad de larval, tuvieron una duración de vida de 9.1 d. A dosis de 3.1:1 hasta 1.3:1 nematodos/larva, con mortalidad larval de 58 a 88%, el periodo de supervivencia de larvas parasitadas fue de 9.4 a 9.8 d, en cambio a dosis de 0.5:1 y 1:1 la supervivencia de larvas fue diferente al testigo, debido al porcentaje de larvas parasitadas y no parasitadas.

Cuadro 10. Duración de supervivencia larval, viabilidad larval y pupal de *C. quinquefasciatus* después de la aplicación del nematodo *R. iyengari*.

Nema: larva	Supervivencia larval ^a (d)	Viabilidad (%)	
		Rango [§] (Larval)	Rango [§] (Pupal)
5:1	9.1 ab	6.5 (0.0) d	*
3.4:1	9.1 ab	11.0 (3.0) c d	31.3 (100.0) a
3.1:1	9.4 ab	19.1 (12.0) a b c d	23.8 (100.0) a
2.8:1	9.3 ab	26.8 (18.0) a b c d	30.9 (100.0) a
2.5:1	9.6 ab	29.3 (22.0) a b c d	25.8 (95.5) a
2.2:1	9.2 ab	18.9 (12.0) b c d	27.0 (100.0) a
1.9:1	9.4 ab	32.4 (24.0) a b c d	25.6 (100.0) a
1.6:1	9.8 ab	31.3 (23.0) a b c d	29.2 (100.0) a
1.3:1	9.8 ab	44.0 (42.0) a b c	25.2 (100.0) a
1:1	10.3 a	35.7 (30.0) a b c d	25.4 (100.0) a
0.5:1	3.5 c	54.9 (95.0) a b	32.4 (98.9) a
Testigo	8.8 b	56.1 (97.0) a	31.4 (97.9) a

-Ningún individuo terminó su fase larval; *No se formaron pupas; [§]Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$); ^aLas medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En estos dos experimentos se demostró que *R. iyengari* parasita el 100% de larvas en 2° instar con una dosis de 10 nematodos/larva. Los resultados de IC indican que a dosis $\geq 5:1$ se presenta una moderada inhibición de crecimiento (IC=0.49-0.34) con mortalidades larvales de 99 a 100%, en tanto que a dosis $\leq 3.4:1$

se obtiene leve inhibición de crecimiento (0.50-0.67) con 58 a 88% de mortalidad de larvas sin contar la dosis de 0.5:1 donde se registró insignificante inhibición de crecimiento (0.98) y de mortalidad larval (5%).

Con la aplicación de las diferentes dosis de nematodos a larvas de 2º instar se observó que una vez formadas las pupas, éstas no fueron afectadas en su desarrollo.

Con los resultados obtenidos en este estudio de laboratorio se evidencia que *R. iyengari* es un agente efectivo que puede inhibir el crecimiento de larvas y reducir las poblaciones de mosquito de *C. quinquefasciatus*.

El nematodo *R. iyengari* a diferentes concentraciones inhibe el crecimiento de larvas de 2º instar de *Culex quinquefasciatus*.

El nematodo *R. iyengari* a dosis $\geq 10:1$ nematodos/larva causa parasitismo total en larvas de 2º instar de *C. quinquefasciatus*. Esta efectividad coincide con lo reportado por Pérez *et al.* (2002 y 2003); dosis de 10 y 20 nematodos por larva 2º instar en diferente tipos de agua ocasionaron mortalidad total. Además interrumpe la metamorfosis, evita que la larva se convierta en pupa y no emergan hembras que transmitan agentes causantes de enfermedades como la filariasis, encefalitis equina y virus de la fiebre del nilo occidental (Salazar y Moncada, 2004). En las dosis de 35 y 30 nematodos/larva, más del 50% de la población larval murió en 3er instar por la competencia de espacio y nutrientes provocada por el superparasitismo y en el resto de la población hubo un subdesarrollo dentro la larva de mosquito.

Cuando se incrementa la dosis de 10 nematodos por larva ocasiona que se disminuya el tiempo de vida larval.

Las dosis $\leq 5:1$ no provocan parasitismo total en larvas de 2º instar de *C. quinquefasciatus*.

Las dosis evaluadas del nematodo en larvas de 2º instar de *C. quinquefasciatus* no permiten que las larvas parasitadas se conviertan en pupas.

La aplicación del nematodo a dosis de 5.4 (4.7-6.5:1) nematodos/larva en el 2º instar inhibe en 50% el crecimiento de la población del mosquito.

3.4.3. Efecto del nim y del nematodo *R. iyengari* en el crecimiento larval del mosquito *C. quinquefasciatus*

En Cuadro 11 se presentan los resultados del efecto de la aplicación de la mezcla de nim y nematodos *R. iyengari* en el crecimiento de larvas de mosquitos, observando mortalidad en el rango de 8 a 32% en larvas de 3er instar y en el testigo con solo la aplicación de nim 16% de mortalidad. En los testigos con aplicación de nematodos y sin aplicación de tratamientos no se registró mortalidad, información que indica un mayor efecto del nim en estas condiciones de mezcla con nematodos. Cuando las larvas llegaron a 4º instar se incrementó lentamente la mortalidad de larvas (67-91%) en la mezcla de tratamientos, en el testigo con nim 59%, en el testigo con nematodos 51% y en el testigo sin tratamiento solo 3%; resultados que reflejan la influencia del efecto de interacción del nim y nematodos por el efecto insectistático causado por el nim y el efecto fisiológico y letal que causan los nematodos en larvas de 4º instar cuando son infectadas en 2º instar, debido a que en el tiempo de desarrollo de 2º a 4º instar de las larvas, el nematodo completa su fase parasítica y emerge de la larva antes de llegar a pupa, causando la muerte de la

misma por los daños fisiológicos ocasionados en su desarrollo parasítico y físicos al emerger de la larva.

Cuadro 11. Larvas y pupas (vivas y muertas) e índice de crecimiento del mosquito, con la aplicación del nim *A. indica* y del nematodo *R. iyengari* en larvas de 2º instar de *C. quinquefasciatus*.

Nim y Nema	II	III	IV	Pupa	IC ^a	IRC
5.1 y 5:1	0 [†] /1 ^{††}	0/32	0/67	0/0	0.42 e	0.43
5.1 y 2.5:1	0/0	0/25	3/72	0/0	0.45 e	0.45
5.1 y 2.2:1	0/1	0/25	0/73	0/1	0.44 e	0.45
5.1 y 1.9:1	0/1	0/24	2/71	2/0	0.45 de	0.46
5.1 y 0.5:1	0/2	0/15	0/79	3/1	0.47 cde	0.48
4.3 y 5:1	0/1	0/18	0/81	0/0	0.45 de	0.46
4.3 y 2.5:1	0/1	0/17	1/79	1/1	0.46 de	0.47
4.3 y 2.2:1	0/0	0/23	1/73	3/0	0.46 de	0.47
4.3 y 1.9:1	0/1	0/19	1/76	3/0	0.47 cde	0.48
4.3 y 0.5:1	0/0	0/16	2/77	3/2	0.49 cde	0.49
4.0 y 5:1	0/2	0/11	0/83	4/0	0.48 cde	0.50
4.0 y 2.5:1	0/1	0/19	0/78	2/0	0.46 de	0.47
4.0 y 2.2:1	0/0	0/11	0/88	0/1	0.48 cde	0.49
4.0 y 1.9:1	0/1	0/14	1/79	4/1	0.49 cde	0.50
4.0 y 0.5:1	0/2	0/13	2/81	1/1	0.47 cde	0.48
3.8 y 5:1	0/0	0/8	0/91	1/0	0.49 cde	0.50
3.8 y 2.5:1	0/1	0/14	0/83	1/1	0.47 cde	0.48
3.8 y 2.2:1	0/3	0/10	2/81	3/1	0.48 cde	0.49
3.8 y 1.9:1	0/0	0/17	0/81	1/1	0.47 cde	0.48
3.8 y 0.5:1	0/0	0/9	2/81	7/1	0.52 cd	0.53
3.2 y 5:1	0/2	0/16	0/82	0/0	0.45 de	0.46
3.2 y 2.5:1	0/0	0/19	1/76	4/0	0.48 cde	0.49
3.2 y 2.2:1	0/1	0/18	0/77	4/0	0.47 cde	0.48
3.2 y 1.9:1	0/0	0/20	0/75	3/2	0.47 cde	0.48
3.2 y 0.5:1	0/0	0/25	0/62	10/3	0.50 cde	0.51
T1 (4.0)	0/1	0/16	1/59	12/11	0.55 c	0.56
T2 (mosquito)	0/0	0/0	4/3	92/1	0.97 a	
T3 (2.2:1)	0/0	0/0	1/51	45/3	0.74 b	0.75

Registro de larvas y pupas vivas[†]/muertas^{††} al momento de formarse el 93% de pupas en el testigo; ^aLas medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En los resultados del IC se observan tres niveles importantes con diferencia estadística significativa. En el testigo sin tratamiento el desarrollo de la población de larvas hasta llegar a adultos presentó un IC de 97%, seguido por el testigo con solo la población de nematodos con un IC de 74% que básicamente está determinado por la mortalidad de larvas de mosquito en 4º instar causada por la emergencia de los nematodos que infectaron larvas de mosquitos y las no parasitadas continuaron su desarrollo hasta mosquito adulto que es lo normal con el uso de estos organismos parásitos. El tercer nivel de significancia está determinado por el efecto del nim y la interacción de nim-nematodos, debido a que el IC de 0.55 causado por el testigo es con solo nim y el IC de 0.47 a 0.55 en diferentes tratamientos de la mezcla de nim-nematodos con las concentraciones de 3.2, 3.8, 4.0 y 4.3% con las dosis diferentes de nematodos evaluadas.

Con la aplicación de la mayoría de las mezclas evaluadas nim-nematodo a larvas de 2º instar se registró una leve inhibición de crecimiento con IC de 0.43 a 0.50 y una moderada inhibición con mezclas de 3.8 y 3.2% de extracto de nim con las dosis de 0.5:1 nematodos/larva, con mortalidad larval y pupal de 90 a 100%. Mezclas de 5.1, 4.3, y 3.2% con la dosis de 5:1; 5.1% con 2.5:1 y 2.2:1; y de 4% con 2.2:1 evitaron la formación de adultos, y las que permitieron la formación de 1% de pupas fueron las mezclas de 5.1 y 2.2:1 al igual que 4 y 2.2:1, en cambio las que permitieron la mínima supervivencia de 1% de individuos fueron las combinaciones de 3.8% con 5:1, 2.5:1, y con 1.9:1 nematodos/larva, mientras la máxima supervivencia de 9 y 10% de individuos resultó con las combinaciones de 3.8 y 0.5:1, 3.2 y 0.5:1. Las mezclas que presentaron mayor mortalidad de 2, 2 y 3 pupas fueron

de 4.3 y 0.5:1, 3.2 y 1.9, 3.2 y 0.5:1, con las cuales se indica que hubo mayor efecto del nim, porque por sí solo el nematodo no afecta a pupas.

El extracto de nim aplicado solo a concentración de 4.0% (testigo 1) en larvas de mosquito se obtuvo leve inhibición de crecimiento con 0.55 y cuando se mezcló con las diferentes dosis del nematodo se registró un rango de IC de 0.46 a 0.49, indicando moderada inhibición de crecimiento, lo que se observa que el extracto de nim en mezcla con el nematodo tiene leve efecto sobre el 2º instar con estas combinaciones. En cambio el nematodo aplicado solo, a dosis de 2.2:1 (testigo 2) en larvas de mosquito resultó con una leve inhibición de crecimiento con 0.74, en cambio cuando se mezcló con diferentes concentraciones del extracto de nim se obtuvieron valores de IC de 0.44 a 0.48, indicando moderada inhibición de crecimiento, lo cual quiere decir que el nematodo en mezcla con el extracto de nim tiene moderado efecto sobre larvas de 2º instar con estas combinaciones.

En este experimento, las mezclas nim-nematodo provocaron de 8 a 32% de mortalidad de 3er instar y de 62 a 91% de 4º instar, además se formaron de 1 a 13% de pupas. Sin embargo, las mezclas mayores de nim-nematodo de 5.1 y 5:1, y 5.1 y 2.5:1 causaron 100% de mortalidad larval con un IC de 0.43 a 0.45, en cambio las mezclas menores nim-nematodo de 3.2 y 1.9:1, 3.2 y 0.5:1 ocasionaron 95 y 87% de mortalidad larval con un IC de 0.48 a 0.51 y formación de 5 a 13% de pupas.

En Cuadro 12 se muestran los resultados de duración y viabilidad larval y pupal de *C. quinquefasciatus* obtenidos de la aplicación de la mezcla de *A. indica* y del nematodo *R. iyengari* en larvas de 2º instar. Al terminar el ciclo del mosquito hasta la emergencia de adultos con la aplicación de las mezclas nim-nematodo no se

mostró prolongación del periodo larval y pupal, debido a que se consideraron las larvas que no fueron parasitadas por el nematodo, y tuvieron una duración larval y pupal similar a los testigos, para el caso del testigo 3 (solo nematodos) también se consideró la duración larval y pupal de larvas no parasitadas. Los tratamientos nim-nematodo de 5.1 y 5:1, 5.1 y 2.5:1, 4.3 y 5:1, 3.2 y 5.0:1 evitaron la formación pupas, en cambio con los tratamientos 5.1 y 2.2:1, 4.0 y 2.2:1 evitaron la formación de adultos, con la aplicación de estas mezclas de nim-nematodo se evitaría la formación de adultos de *C. quinquefasciatus*, no habría molestias de adultos hacia las personas y se evitaría la picadura de hembras y por ende la transmisión de enfermedades al hombre y a los animales.

Para evitar la formación de adultos, con la mezcla nim-nematodo de 3.2 y 5:1 en 2º instar se aplicaría menor concentración de extracto de nim y la mayor dosis de nematodo, de esta manera menor gasto de extracto de nim y los nematodos presentarían menor daño en caso de ser afectados en su comportamiento por el extracto de nim. Por otra parte, sí se quiere utilizar más cantidad de extracto como de nematodos para que no se formen adultos, se aplicaría las mezclas de 5.1 y 5:1, 5.1 y 2.5:1, 5:1 y 2.2:1, y 4.3 y 5:1, en tanto que la mezcla 4.0 y 2.2:1 se utilizaría menor número de nematodos y menor cantidad de nim. La mezcla nim-nematodo de 5.1 y 5:1 fue la que presentó mayor efecto al evitar la formación de pupas y tener el mínimo valor de IC con un valor de 0.42, en cambio la combinación nim-nematodo de 3.8 y 0.5:1 es la que tuvo menor efecto al presentar un IC de 0.52.

Cuadro 12. Duración y viabilidad larval y pupal de *C. quinquefasciatus* después de la aplicación del nim *A. indica* y del nematodo *R. iyengari* en larvas de 2º instar.

Nim y nema	Duración (d)		Viabilidad (%)	
	Rango [§] (Larva)	Rango [§] (Pupal)	Rango [§] (Larval)	Rango [§] (Pupal)
5.1 y 5:1	-	-	36.0 (0.0) b	*
5.1 y 2.5:1	-	-	36.0 (0.0) b	*
5.1 y 2.2:1	15.0 (6.0) a	-	46.8 (1.0) a b	32.5 (0.0) a
5.1 y 1.9:1	15.0 (6.0) a	18.5 (8.0) a	57.6 (2.0) a b	64.9 (100.0) a
5.1 y 0.5:1	40.0 (6.8) a	10.5 (7.5) a	73.3 (4.0) a b	61.2 (75.0) a
4.3 y 5:1	-	-	36.0 (0.0) b	*
4.3 y 2.5:1	55.5 (7.0) a	18.5 (8.0) a	51.7 (2.0) ab	48.7 (50.0) a
4.3 y 2.2:1	15.0 (6.0) a	18.5 (8.0) a	68.4 (3.0) ab	75.1 (100.0) a
4.3 y 1.9:1	42.0 (6.7) a	39.5 (8.7) a	68.4 (3.0) ab	75.1 (100.0) a
4.3 y 0.5:1	35.3 (6.5) a	18.5 (8.0) a	84.1 (5.0) ab	52.3 (40.0) a
4.0 y 5:1	24.0 (6.2) a	9.8 (7.5) a	64.3 (4.0) ab	61.2 (75.0) a
4.0 y 2.5:1	15.0 (6.0) a	18.5 (8.0) a	51.7 (2.0) ab	49.9 (100.0) a
4.0 y 2.2:1	55.5 (7.0) a	-	46.8 (1.0) ab	32.5 (0.0) a
4.0 y 1.9:1	21.1 (6.1) a	25.8 (8.2) a	84.1 (5.0) ab	67.3 (80.0) a
4.0 y 0.5:1	35.3 (6.5) a	18.5 (8.0) a	57.6 (2.0) ab	48.7 (50.0) a
3.8 y 5:1	69.0 (9.0) a	55.0 (10) a	46.8 (1.0) ab	49.9 (100.0) a
3.8 y 2.5:1	40.3 (7.0) a	18.5 (8.0) a	57.6 (2.0) ab	48.7 (50.0) a
3.8 y 2.2:1	35.3 (6.5) a	39.5 (8.7) a	79.2 (4.0) ab	70.0 (75.0) a
3.8 y 1.9:1	15.0 (6.0) a	18.5 (8.0) a	57.6 (2.0) ab	48.7 (50.0) a
3.8 y 0.5:1	35.8 (6.5) a	29.5 (8.3) a	95.7 (8.0) ab	77.3 (87.5) a
3.2 y 5:1	-	-	36.0 (0.0) b	*
3.2 y 2.5:1	50.2 (6.8) a	29.5 (8.3) a	73.3 (4.0) ab	61.2 (75.0) a
3.2 y 2.2:1	28.5 (6.3) a	29.0 (8.3) a	73.3 (4.0) ab	73.7 (100.0) a
3.2 y 1.9:1	28.5 (6.3) a	34.3 (8.5) a	78.2 (5.0) ab	57.4 (60.0) a
3.2 y 0.5:1	31.6 (6.4) a	26.0 (8.2) a	115.8 (13.0) ab	71.0 (69.2) a
T1 (4.0)	38.8 (6.5) a	20.4 (8.1) a	126.7 (23.0) ab	64.3 (47.8) a
T2 mosquito	48.9 (7.1) a	44.0 (9.1) a	138.0 (97.0) a	80.8 (99.0) a
T3 (2.2:1)	45.5 (6.8) a	40.0 (8.5) a	133.0 (48.0) ab	79.6 (93.8) a

- Ningún individuo terminó su fase larval; *No se formaron pupas; [§]Medias obtenidas del análisis no paramétrico con Kruskal-Wallis (p≤0.05).

En este estudio de interacción nim-nematodo, a pesar de que en la mayoría de los tratamientos se presentó una moderada inhibición de crecimiento, hubo

mezclas en diferentes niveles que no permitieron la formación de pupas y las mezclas pueden utilizarse tanto para ahorrar extracto de nim como del nematodo.

Se demuestra el potencial de las mezclas nim-nematodo para el control de larvas de mosquito *C. quinquefasciatus*, por lo que es importante considerar esta alternativa natural en los programas de control de mosquitos.

Estos resultados dan pauta a que se realicen otras evaluaciones, por un lado sería conveniente aplicar primero las concentraciones altas de nim que puedan perjudicar al nematodo y dejar que se degrade el efecto del extracto de nim y enseguida aplicar el nematodo *R. iyengari*, por otro lado sí se aplican primero los nematodos, estos requieren por lo menos 3 d para localizar a su huésped y después de esto, aplicar las concentraciones de extracto de nim, para conocer más a fondo la interacción nim-nematodo y obtener mejores resultados para el combate de *C. quinquefasciatus*. Todo esto enfocado a evitar que las larvas de mosquitos terminen su desarrollo, no se formen pupas y no emerjan adultos y así controlar las poblaciones de mosquitos que causan molestias al picar como las hembras que transmiten agentes de enfermedades, sin causar efecto negativo al ambiente o a la fauna benéfica. Con este estudio se demuestra que el uso de extractos vegetales es compatible con el nematodo parásito y puede utilizarse ésta mezcla como una alternativa dentro del control biológico de mosquitos.

3.5. CONCLUSIONES

- * Las concentraciones de extracto de nim *A. indica* a 10 y 7% aplicadas en 2° instar del mosquito *C. quinquefasciatus* inhiben la formación de pupas y no se formaron adultos.
- * La aplicación del extracto de nim al 4% a larvas de 2° instar inhibe en 50% el crecimiento de la población del mosquito.
- * El 100% de mortalidad de larvas de 2° instar del mosquito se obtiene con dosis ≥ 10 nematodos de *R. iyengari* por larva.
- * La aplicación del nematodo a dosis de 5.4 por larva de 2° instar inhibe en 50% el crecimiento de la población del mosquito.
- * Con las dosis evaluadas del nematodo en larvas de 2° instar del mosquito no se afectan las pupas.
- * Las dosis del nematodo $\leq 5:1$ no provocan parasitismo total en larvas de 2° instar del mosquito.
- * Las 25 mezclas de nim-nematodo presentan una moderada inhibición de crecimiento con valores de 0.42 a 0.52 y con mortalidades de 87 a 100%.
- * La mezcla nim-nematodo de 5.1 y 5:1 es la de mejor compatibilidad por evitar la formación de pupas del mosquito y ocasionar el mínimo valor de IC con 0.42.
- * La mezcla del extracto de semilla de nim al 4% con la dosis de 2.2 nematodos por larva de 2° instar del mosquito, menor cantidad de extracto de nim y del nematodo, evita la formación de pupas de mosquito.

3.6. LITERATURA CITADA

- 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 Wields in Pondicherry. Indian J. Med. Res. 69:63–70.
- Gajanana, A., S.J. Kazmin; U.S. Bheema Rao; S.G. Suguna, and R.K. Chandrabhas. 1978. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: Mermithidae) of mosquito larvae isolated in Pondicherry. Indian J. Med. Res. 68:242–247.
- Hyams, D. 1995. Curve Expert Version 1.38. A curve fitting system for Windows. Double-precision/32-bit package. Copyright 1995-2001. Microsoft corporation, 1993.
- Paily, K. P., & Balaraman K. 1994. Effect of temperature on different stages of *Romanomermis iyengari*, a mermithid nematode parasite of mosquitoes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 89 (4):635-642.
- Petersen, J.J., and O. R. Willis. 1972. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. Mosquito News 2: 226–230.
- Pérez, P. R., G. Flores A., J. Salinas C., S. Martínez T. y C. Ramírez L. 2002. Efectividad de nematodos parásitos *Romanomermis spp.* para el control biológico de larvas de mosquitos en Tampico, Tamaulipas. XXXVII Congreso Nacional de Entomología y 50th Annual Meeting of the SWBESA. Guanajuato, Gto. p:479-482.
- 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.
- Prabhuraj, A., and C. A. Viraktamath. 2004. Compatibility of *Steinernema glaseri* with two inorganic and one neem based insecticide. Indian J. Entomol. 66 (4): 377-379.
- Pridantseva, E.A., N.I. Lebedeca, Z.P.Sheherban, and M.K. Kadyrova. 1990. An evaluation of the possibility for mosquito control in Vzbekistan. Medic. Parazitol. (Mosk) 1: 15–17.
- Rodríguez H., C., y J.D. Vendramim. 1999. Efecto insectistático de *Melia azedarach* y *Trichilia pallida* (Meliaceae) en el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). In: Memorias de IV Simp. Internal y V Reunión Nal sobre Agricultura Sostenible. SOMAS y CP. Morelia, Mich., México. pp: 295-306.
- Rovesti, L., and K.V. Deseo. 1990. Compatibility of chemical pesticides with entomopathogenic nematodes, *Steirnerema carpocapse* Weiser and *S. feltie* Filipzev (Nematoda: Steinernematidae). Nematologica. 36 (4): 237-245.
- Santamarina, M.A., 1994. Actividad parasitaria de *Romanomermis iyengari* Nematoda: Mermithidae en criaderos naturales de larvas de mosquitos. Misc. Zool. 17: 59–65.
- Santamarina, M.A., García, A.I., González, B.R., 1992. Capacidad infestiva del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* en larvas de mosquitos en condiciones naturales. Revis. Cubana Med. Tropical 49: 92–97.

- Santamarina, M.A., García, A.I., Rivera, R.J., Solís, M.A., 1996a. Release of *Romanomermis iyengari* to control *Aedes taeniorhynchus* in Punta del Este, Isla de la juventud, Cuba. J. Med. Entomol. 33: 680–682.
- SAS Institute Inc. 1989. JMP® versión 5.0.1. for Windows.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS version 9.1.3. para Windows.
- Salazar M. J., y L. I. Moncada. 2004. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. Biomédica 24:385-392.
- Statistix 8.1 for Windows. 1985. Copyright 1985-2005. Analytical Software. www.statistix.com.
- Zhang, M., S.K. Chaudhuri, and I. Kubo. 1993. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. J. Chem. Ecol. 19(6):1109-1118.
- Zimmerman, R. J., and W. S. Cranshaw. 1990. Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhaditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. J. Economic Entomol. 83:97-100.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES GENERALES

- * EL extracto acuoso de la semilla de nim *Azadirachta indica* inhibe en 50% el crecimiento de la población (CE_{50}) de larvas de 1º, 2º, 3º y 4º instar de *Culex quinquefasciatus* a las concentraciones de 4.6, 4.4, 4.1 y 5.5% y afecta la duración y viabilidad larval y pupal al grado de evitar la formación de pupas y emergencia de adultos. Las concentraciones \geq a 5 y 7% en larvas de 1º y 2º instar respectivamente evitan la formación de pupas; y \geq a 7% en larvas de 4º instar inhibe la emergencia de adultos.
- * La aplicación de *Romanomermis iyengari* a 5.4:1 nematodo por larva del 2º instar inhibe en 50% el crecimiento de la población de mosquito. 100% de mortalidad de larvas de 2º instar se obtuvo con dosis a \geq 10 nematodos por larva, en cambio a \leq 5:1 no parasitan y las larvas que pasan a pupas no son afectadas. Cuando se incrementa la dosis de 10 nematodos por larva se disminuye el tiempo de supervivencia larval. Las dosis \leq 5:1 no provoca parasitismo total en larvas de 2º instar del mosquito. La mezcla nim-nematodo de 5.1 y 5:1 presentó mayor interacción al evitar la formación de pupas y tener el mínimo valor (0.42) de Índice de Crecimiento.