

Entomonematodes como agentes de control biológico de mosquitos en Argentina

María F. Achinelly
María V. Micieli

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, (CEPAVE),
CCT La Plata (CONICET-UNLP).

fachinelly@cepave.edu.ar
victoria@cepave.edu.ar

Los culícidos constituyen uno de los grupos de insectos con mayor número de especies, siendo responsables de provocar numerosas enfermedades, la mayoría graves para el hombre. Ante este escenario, el uso de los enemigos naturales para su control es una alternativa segura para el ambiente, y específica, que puede ser eficaz a largo plazo.

Los nematodos constituyen un grupo de parásitos y patógenos comunes en insectos que pueden producir importantes epizootias naturales con elevadas prevalencias. Son capaces de regular las poblaciones de insectos y mantenerlas por debajo de los niveles de daño económico y/o transmisión de enfermedades.

Nematodos parasitoides (Mermithidae) como enemigos naturales de mosquitos

Mermithidae constituye la única familia de nematodos aislada a partir de culícidos (Petersen, 1985; Platzer, 2007).

Son parásitos obligados de la cavidad general de insectos, letales, que penetran activamente, presentando un importante sincronismo con el ciclo de su hospedador, ocasionando importantes epizootias. Su parasitismo ha sido reportado en al menos 100 especies hospedadoras (Petersen y Chapman, 1979; Becnel y Johnson, 1998).

En su ciclo de vida, ingresan activamente en un hospedador, cuando se encuentran en el estadio juvenil 2 (estado prepárasito o J2) que conforma la forma infectante, alimentándose y desarrollándose hasta juvenil 4 (estado postparásito o J4) el cual emerge al ambiente generando un efecto letal.

Los mermítidos son considerados potenciales agentes de control biológico debido a su ciclo de vida, su seguridad medioambiental, especificidad

de hospedador, facilidad de aplicación, letalidad, y el potencial de reciclado y establecimiento en el campo a largo plazo (Petersen, 1985; Chandhiran y Paily, 2015).

Entre los mermítidos más estudiados se encuentran el nematodo *Romanomermis culicivorax* Ross and Smith, *Romanomermis iyengari* Welch y *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, siendo este último aislado en Argentina.

R. culicivorax aislado originalmente de Estados Unidos, constituye el primer nematodo parásito de mosquitos considerado y evaluado como agente de control biológico, tanto en condiciones experimentales como naturales (Petersen y Chapman, 1979; Platzer, 2007). Ha sido producido masivamente en laboratorio en larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* y utilizado como agente de control biológico en poblaciones naturales para el control de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* y *Culex quinquefasciatus* (Petersen y Willis, 1972a; b; Santamarina et al., 1996). Inclusive el nematodo logró establecerse en criaderos en los que había sido introducido mediante la liberación de las formas infectivas (Petersen y Willis, 1975).

R. iyengari es una especie inicialmente aislada de anofelinos provenientes de la localidad de Bangalore, India, cuyos estados inmaduros crían en arrozales (Gajanana et al., 1978). Posteriormente, se evaluó y observó susceptibilidad de infección a este nematodo por un gran número de especies y géneros de mosquitos, tanto en condiciones de laboratorio y campo (Santamarina y Bellini, 2000; Pailey y Belaraman, 2000).

Mermítidos aislados de mosquitos en Argentina

En Argentina se han descrito hasta el presente solo dos especies parásitas de culícidos: *S. spiculatus*, en larvas del mosquito *Aedes albifasciatus* (Poinar y Camino, 1986), e *Hydromermis* sp., en larvas de *Psorophora ferox* (Camino, 1989), ambas en la provincia de Buenos Aires.

Strelkovimermis spiculatus

El mermítido *S. spiculatus* se halló por primera vez en el arroyo Miguelín, Punta Lara, partido de Ensenada, (Poinar y Camino, 1986) en *Ae. albifasciatus*, y posteriormente en otros hospeda-

dores culícidos en criaderos inundados por lluvias (García y Camino, 1990; García *et al.* 1994; Achinelly y Micieli, 2013) localizados en la Pcia. de Buenos Aires (Fig. 1). Recientemente López *et al.* (en prensa) registraron la presencia de este nematodo en poblaciones naturales de *Ae. albifasciatus*, *Ae. crinifer* y *Culex eduardoi* en la localidad de Mar del Plata, ampliando su distribución.

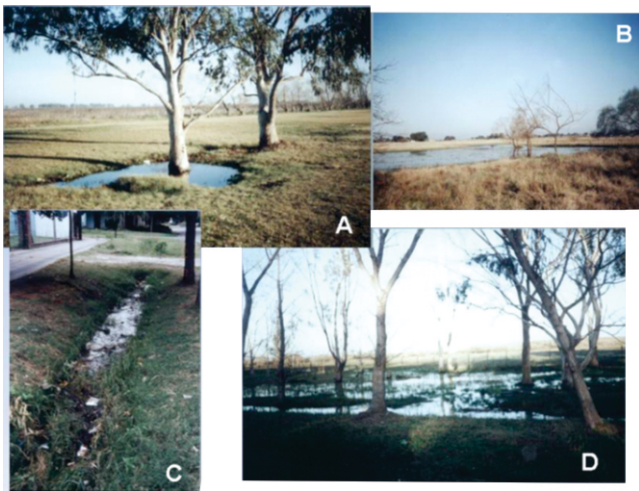


Fig.1. Sitios de cría de culícidos. A, B y D) Ambientes de inundación temporal. C) Ambiente de inundación semipermanente.

Ciclo de vida

El ciclo biológico de *S. spiculatus* tiene una duración aproximada de 35 días siendo similar al de otros mermítidos acuáticos, aunque varía dependiendo de la temperatura (Camino y Reboredo, 1994). Los adultos colocan los huevos en el ambiente en el que se encuentran, lugar donde sucede el desarrollo embrionario con una duración aproximada de 8 días, a 20 °C (Camino y García, 1988), 7 días a 25 °C y 14 días a 16 °C (Micieli *et al.*, 2012b). Posteriormente, el estado infectante (J2) sale del huevo y penetra activamente en la larva del mosquito hospedador utilizando un estilete y alojándose en el hemocel. Allí muda a juvenil 3 (J3) y luego a juvenil 4 (J4) que abandona el hospedador, provocando su muerte. Finalmente, se entierra en el sustrato de los criaderos y muda al estado adulto donde copula y ovipone completando su ciclo (Fig. 2).

El período de oviposición comienza a los 12 días posteriores a la emergencia de los J4, y continúa hasta los 51 días a 16 °C y un fotoperíodo de 12:12 Luz: Oscuridad (L:O) (Micieli *et al.*, 2012b). Cada hembra tiene el potencial de producir un promedio de 6.500 huevos si los machos están continuamente presentes (Undeen *et al.*, 1996).

El mermítido *S. spiculatus* se adapta muy bien al ciclo de vida de sus hospedadores, tolera niveles elevados de salinidad, materia orgánica, y

temperaturas (4 a 27 °C) (Camino y García, 1991; Achinelly y García, 2003), y presenta una mayor tolerancia a permanecer latente por largos períodos de sequía del ambiente (Camino y García, 1991).

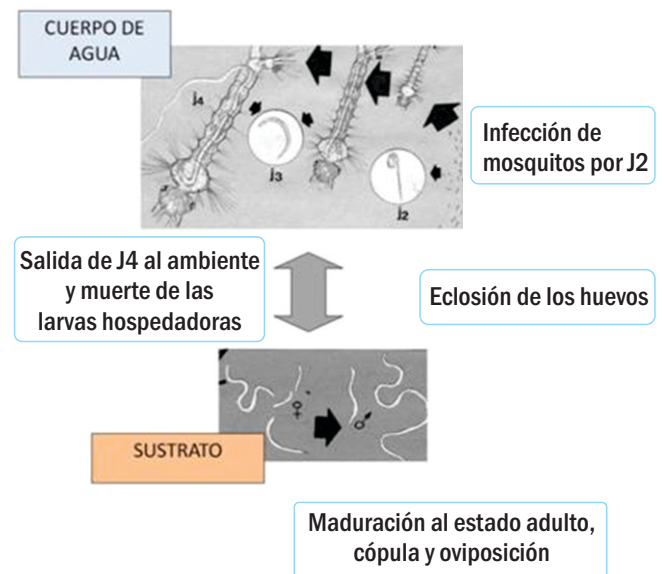


Fig. 2. Ciclo de vida del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* en sitios de cría de culícidos. J2: juvenil preparásito; J3: juvenil parásito; J4: juvenil postparásito.

Producción masiva

S. spiculatus puede ser mantenido en condiciones de cría en laboratorio utilizando una especie de mosquito como hospedador. Camino y Reboredo (1996) describieron un procedimiento para la producción *in vivo* de este mermítido utilizando *Cx. pipiens*, el cual fue optimizado posteriormente por Achinelly y Micieli, (2009). Los juveniles postparásitos emergidos de larvas de culícidos naturalmente infectados en laboratorio, o procedentes de campo, se colocan en recipientes de cría de 10 x 15 cm, con arena esterilizada (2 cm de espesor) y agua declorinada (3 cm de profundidad). Cuando los nematodos se internan en el sustrato, se elimina el exceso de agua y los recipientes de cría se cubren y conservan en la oscuridad, por un período mínimo de 5 semanas (Fig. 3). Durante este período los nematodos maduran sexualmente, copulan y las hembras depositan los huevos en el sustrato. El desarrollo embrionario tiene lugar durante ese tiempo y transcurrido ese período mínimo, las bandejas se inundan con agua declorinada para la eclosión de los estadios infectantes del nematodo (J2) en las 12 hs siguientes. Posteriormente el agua con las formas infectantes se colocan en una probeta graduada, y se cuantifica el número de J2 producidas por diluciones volumétricas. Las J2 del nematodo se exponen a larvas de estadio II de un hospedador culícido (entre 500 a 1000 larvas) en una relación entre 4 y 7:1 (J2/hospedador), dosis que aseguran

entre un 81 a 87.5% de parasitismo (Achinelly y Micieli, 2011). Las infecciones se realizan en recipientes plásticos de 21 cm de diámetro con 1000 mL de agua de clorinada durante 24 hs. Los nematodos se desarrollan en las larvas de culícidos durante 5 a 7 días (Fig. 3). Para detener la infección, se eliminan los preparásitos del nematodo, haciendo pasar el agua de los recipientes por una red que retiene las larvas y permite el paso de las J2. Las larvas del culícido se separan para su desarrollo en bandejas plásticas de 38 x 28 cm, con 1,5 litros de agua de clorinada y alimento para cobayos. Cuando las larvas de mosquito llegan a estadio IV, se colocan para la emersión de los postparásitos a partir de sus hospedadores sobre un tamiz superpuesto a una bandeja de 30 cm de largo x 17 cm de ancho x 8 cm de profundidad, que retiene las larvas de culícidos y permite el paso de los J4 del nematodo, los cuales se depositan sobre el fondo de la bandeja y se recolectan con una aguja de disección doblada en L.

El peso de los nematodos obtenidos en cada infección se determina en una balanza digital y se transportan a los recipientes de cría para completar su desarrollo (Fig. 3). Una vez que los nematodos postparásitos y/o adultos se entierran, se elimina el exceso de agua, los cultivos se tapan, y se almacenan nuevamente un mínimo de cinco semanas hasta ser inundados para la obtención de las formas infectantes (Fig. 3). Las colonias del nematodo pueden ser mantenidas correctamente en el laboratorio a una temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 85 % de humedad relativa.

Entre los resultados obtenidos para lograr la mayor eficiencia de producción de formas infectantes de *S. spiculatus*, Camino y Reboredo (1996) determinaron como densidad óptima 22 nematodos adultos por cm^2 de arena en los recipientes de cría (30 X 20 X 7 cm y arena de 2 cm de espesor) y una relación de sexos de 2 machos por hembra.

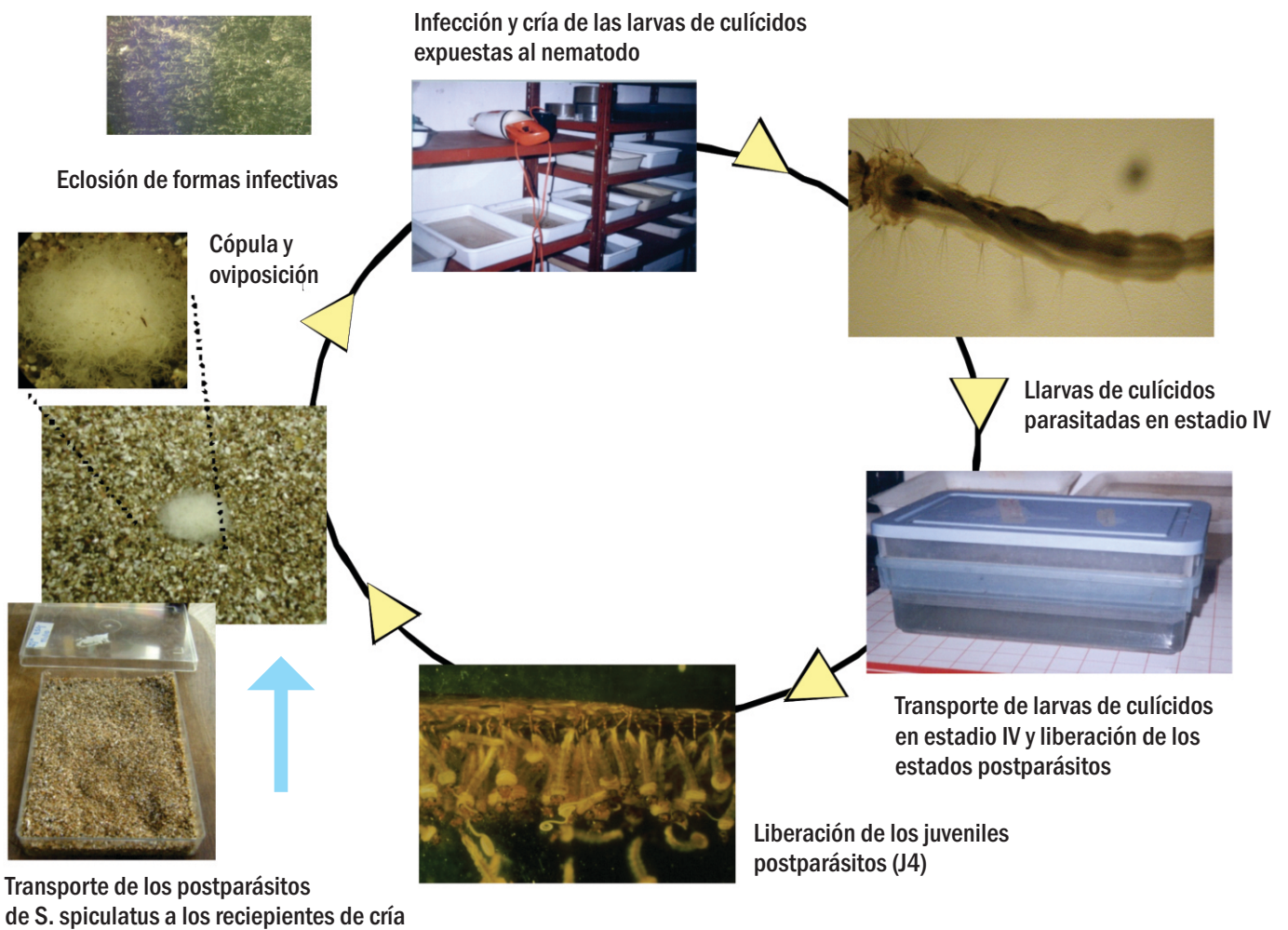


Fig. 3. Metodología de cría para el nematodo *Strelkovimermis spiculatus*.

Con el objetivo de optimizar la producción masiva de *S. spiculatus*, Achinelly y Micieli, (2011) probaron diferentes dosis (entre 1:1 y 10:1 J2/hospedador) para obtener una mayor eficiencia en las infecciones (N° postparásitos obtenidos/N° preparásitos iniciales). Los autores determinaron la mayor eficiencia (32 %) para una dosis de 1:1 (J2/hospedador). Por el contrario cuando la dosis se aumentó a 10:1 (J2/hospedador), la eficiencia disminuyó al 10 %. Los niveles elevados de infección por mermitidos pueden favorecer el parasitismo múltiple, incrementándose el número de machos y disminuyendo potencialmente la producción de J2 (Petersen, 1972; Camino y Reboredo, 1994). La utilización de la dosis 10:1, mostró un leve incremento en la producción de machos, lo que debería tenerse en cuenta ya que podría interferir en la producción de juveniles preparásitos. Por lo tanto una dosis de 4:1 (J2/hospedador) sería adecuada para la producción masiva de juveniles postparásitos en el laboratorio, ya que permitiría obtener un alto valor de infección, superior al 80 %, resultando en una producción de J4 más elevada, una adecuada relación de sexos y una eficiencia intermedia (16 %) respecto al resto de las dosis testeadas (Achinelly y Micieli, 2011). Si consideramos que los valores de producción de J2 registrados por Petersen y Willis (1972a), utilizando el nematodo *R. culicivora* ($0,1$ a 1×10^7), se obtuvieron a partir de 10 a 15 gramos de J4 por cultivo y los obtenidos por Camino y Reboredo (1996) con el nematodo *S. spiculatus* ($0,7$ a 1×10^6 J2) a partir de una densidad de 22 postparásitos por cm^2 (aproximadamente 3 gramos de nematodos por cultivo), los resultados registrados por Achinelly y Micieli (2011) mostraron valores más elevados en la producción de J2 de este nematodo ($0,2$ a $1,2 \times 10^6$) a partir de 1 gramo de estados postparásitos.

Entre los problemas que pueden presentarse en los sistemas de cría, podemos mencionar un amplio espectro de hongos capaces de atacar los nematodos, constituyendo una amenaza para la producción, ya que pueden llegar a destruir colonias enteras. En este sentido, el hongo *Catenaria anguillulae Sorokin*, fue citado sobre huevos, juveniles y adultos del nematodo *R. culicivora* provocando una importante disminución en la eclosión de los estados preparásitos (Stirling y Platzer, 1978). El agregado de

ácido acético a las bandejas de cría de las larvas expuestas al nematodo, puede disminuir la contaminación por *C. anguillulae* de las J4 emergidas. Sin embargo, la disminución brusca del pH, puede afectar a los diferentes estados del nematodo y consecuentemente a la producción de J2 en los cultivos (Platzer y Stirling, 1971).

El desarrollo de hongos nematófagos pertenecientes a los géneros *Myzocytiopsis* y *Catenaria*, se ha descrito sobre J4 y adultos de *S. spiculatus* entre las 48 a 72 hs postemergencia de los nematodos a partir de sus hospedadores (Achinelly, 2004). Por tal motivo, cuando se realiza la cría de estos organismos, es importante eliminar aquellos nematodos que no se hayan enterrado en los recipientes de cría durante las primeras 24 a 48 hs, a efectos de disminuir la contaminación de los cultivos.

Con el objetivo de simular sitios de cría de mosquitos sometidos a diferentes regímenes de inundación, y determinar la biología de *S. spiculatus* en estos ambientes, la producción masiva de J2 se analizó bajo dos sistemas diferentes de producción, con y sin períodos de desecación.

Cultivos sometidos a desecación produjeron el máximo de J2 en el primer ciclo de inundación (5 semanas de desecación), pero la emergencia continuó durante 10 semanas dando un total de $4,5 \times 10^5$ J2 por bandeja de cría. Cuando estos fueron sometidos a inundaciones permanentes, se observó una importante disminución en la producción, debida a la eclosión no simultánea de los huevos del nematodo, con valores inferiores a $6,2 \times 10^4$ por bandeja de cría después a las cinco semanas de permanecer inundado.

La eclosión no sincrónica o continua de los huevos del nematodo en ambientes permanentes como los sitios de cría de *Cx. pipiens*, impediría la presencia de elevados valores de J2, resultando en prevalencias bajas y tal vez dificultando el establecimiento del nematodo en estos sitios de cría. Sin embargo, los juveniles preparásitos eclosionados en cultivos inundados semanal y permanentemente conservaron en todo momento la capacidad de infectar, constituyendo un atributo positivo si se desea utilizar *S. spiculatus* como agente de control biológico de culícidos en ambos tipos de ambientes.

Biología de *Strelkovimermis spiculatus* en ambientes de cría de culícidos

Sitios de cría de inundación temporaria

Las epizootias producidas por este nematodo son comúnmente observadas en poblaciones naturales del mosquito plaga *Ae. albifasciatus* en la provincia de Buenos Aires (Micieli y García, 1999,

Campos y Sy, 2003, Micieli et al., 2012a). También se han registrado otras especies de mosquitos parasitadas en estos ambientes cuando han quedado inundados por períodos de tiempo más prolongados de lo habitual, pero siempre en niveles enzoóticos (García et al., 1994; Maciá et al., 1995; 1997;

Achinelly y Micieli, 2013). Inclusive, poblaciones de este nematodo presentaron variaciones en los valores de prevalencia en ambientes con similares características, cuyas causas se desconocen. Micieli *et al.* (2012a), determinaron tres comportamientos diferentes, al estudiar la dinámica poblacional de *S. spiculatus* en sitios de cría temporarios de mosquitos en diferentes barrios del partido de La Plata y Ensenada: un primer ambiente ubicado en Punta Lara (partido de Ensenada) con una reducción de larvas de mosquitos del 80,7 % debido a la presencia de este parásito, donde fueron infectadas el 100 % de las generaciones; una situación intermedia en el barrio de Los Hornos (partido de La Plata), con un 41,9 % de reducción, un menor porcentaje de parasitismo cercano y superior al 50 %, aunque la infección por nematodos se registró en el 92,9 % de las generaciones, y un tercer criadero, en otro sector de Punta Lara, con una reducción larval del 2,7 %, donde sólo el 46,0 % de las generaciones de mosquitos estaban parasitadas en niveles de infección por debajo del 50 %. En el mismo estudio, el área de inundación fue la única variable significativa asociada con los porcentajes de infección, los cuales se correlacionaron positivamente con el número medio de nematodos por larva emergidos, y con la proporción macho-hembra emergidos en cada generación a partir de las larvas de mosquito.

En otro estudio a campo llevado a cabo en Buenos Aires, se construyeron tablas de vida durante seis cohortes de etapas inmaduras de *Ae. albifasciatus* con el objetivo de estudiar la mortalidad atribuible al nematodo. Dos cohortes fueron seleccionadas para comparar la incidencia de parásitos con bajo y alto parasitismo. Un valor de "K" (*Killing power*) alto se obtuvo cuando la prevalencia del parásito fue 86,9 %, y menor en una cohorte con bajo parasitismo. En este estudio el parasitismo ocurrió durante todas las estaciones, pero *S. spiculatus* persistió hasta el estado adulto en mosquitos, sólo en el verano y el otoño, cuando ocurrieron infecciones por el parásito a partir de larvas de tercero y cuarto estadio. La proporción de adultos parasitados fue de 14,2 % y 5,7 % en las dos cohortes comparadas (Campos y Sy, 2003). El tiempo medio de supervivencia de adultos de esta especie de mosquito infectados por el nematodo fue estimada en 16 días (Di Battista *et al.*, 2015) mientras que Camino y Reboredo (1994) determinaron que 4 días era el tiempo de supervivencia máximo de adultos parasitados.

Sitios de cría de inundación semipermanente

El parasitismo por *S. spiculatus* también fue observado en larvas de mosquito que crían en ambientes de inundación semipermanente. Valores

de infección menores al 50 % fueron observados en larvas de *Cx. pipiens* en zanjas de desagües domiciliarios (García y Camino, 1990; Muttis *et al.*, 2013).

Infecciones en laboratorio en agua proveniente de estos criaderos demostraron una prevalencia considerablemente inferior respecto de la obtenida en aguas provenientes de ambientes de inundación temporaria, con una marcada reducción de los porcentajes de parasitismo tanto en larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*. La viabilidad de las formas infectivas también fue evaluada, registrándose una supervivencia de las J2 del 1 % al transcurrir 48 hs de exposición en agua proveniente de las zanjas, respecto del 88 % en los controles proveniente de sitios de cría de inundación temporaria.

La mortalidad observada condujo a analizar las características físico-químicas de las aguas de los criaderos. Los resultados obtenidos, evidenciaron el alto nivel de fósforo y amonio en las zanjas de desagüe pluvio-domiciliario. La presencia de fósforo depende generalmente del aporte de detergentes provenientes de los desagües domiciliarios. El alto contenido de este ión podría disminuir la absorción de oxígeno atmosférico debido a la formación de una película superficial ocasionando la muerte de los nematodos en los criaderos. El alto contenido de amonio (superior a los 0,5 mg/L) permitieron considerar a las aguas provenientes de las zanjas como químicamente contaminadas (Achinelly, 2004).

S. spiculatus fue vinculado como vector de otros agentes infecciosos en larvas de mosquitos. Muttis *et al.* (2013) observaron que infecciones de un virus iridiscente de mosquito (MIV) en larvas de *Cx. pipiens* estaría asociado a la presencia de *S. spiculatus* en condiciones de campo. Experiencias en el laboratorio y observaciones al microscopio electrónico de transmisión (MET) de partículas virales en la cutícula del mermítido sugirieron que el nematodo funcionaría como un vector del MIV facilitando el ingreso del mismo en el hemocele de las larvas de mosquito evidenciando una asociación entre ambos patógenos en el mecanismo de infección de los estadios inmaduros de los insectos (Muttis *et al.*, 2015).

Estudios moleculares

La utilización de técnicas moleculares podría ser útil para la identificación de especies crípticas y para estudiar la variación de nucleótidos y su utilidad en la dinámica de la población de estos parásitos. En este sentido, Belaich *et al.* (2015) realizaron la caracterización molecular de poblaciones de *S. spiculatus* provenientes de ambientes temporarios (Micieli *et al.*, 2012a) y de zanjas de desagüe domiciliario, para identificar variaciones nucleotídicas responsables de las diferencias observadas en los niveles de infección entre aislamientos. Los autores deter-

minaron secuencias parciales del gen nuclear 18S RNAr (761 pb) y un locus mitocondrial ND4 (795 pb) obtenidas a partir de nematodos que infectaron larvas de *Cx. pipiens*, *Cx. dolosus* y *Ae. albifasciatus* provenientes de ambos criaderos. La alineación de secuencias de nucleótidos obtenidas reveló alta homología con el nematodo *S. spiculatus* tanto para el gen nuclear 18S y mitocondrial ND4, con porcentajes de identidad que oscilaron entre 97 a 100 % indicando que las poblaciones del nematodo podrían ser diferenciadas mediante este análisis.

En el mismo sentido poblaciones de *S. spiculatus* provenientes de larvas de *Ae. albifasciatus*, *Ae. crinifer* y *Cx. eduardoi* aisladas en las afueras de la ciudad de Mar del Plata, fueron identificadas de acuerdo a sus caracteres morfológicos y moleculares a través de la amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes COI y 18S RNAr-ITS1-5.8S RNAr-ITS2-28S RNAr (Lopez *et al.*, en prensa).

Aplicación a campo

El nematodo *S. spiculatus* fue introducido en sitios de cría de mosquitos. A partir de las liberaciones de estados infectivos en recipientes artificiales, habituales sitios de cría de culícidos, donde se demostró la capacidad del nematodo de infectar

poblaciones naturales de *Ae. aegypti*, *Culex apicinus* y *Cx. pipiens* (Achinelly y Micieli, 2009). Elevados porcentajes de parasitismo fueron obtenidos en larvas de *Ae. aegypti*, en criaderos artificiales de 500 mL de capacidad, al aplicar dosis del nematodo en relación 10:1 (J2/larva). Por otro lado, en recipientes de mayor volumen (90 litros), dosis de entre 40:1 y 300:1 (J2/hospedador) provocaron altos niveles de infección en las tres especies de culícidos evaluadas, a temperaturas entre 21 y 27 °C. Las larvas de *Cx. apicinus* fueron las más susceptibles donde se registró un parasitismo elevado (73,8 %) para estadios mezclados, con una dosis de 40:1 (J2/hospedador) a 27 °C. Las larvas de culícidos en estos ambientes se observaron parasitadas por el nematodo aproximadamente durante 10 días. Este estudio constituye la primera y única evaluación a campo de este parásito, como biorregulador de culícidos (Achinelly y Micieli, 2009).

Las características bioecológicas de *S. spiculatus* y la capacidad de provocar altos niveles de parasitismo en el campo, así como la especificidad para las larvas de mosquitos sin constituir un riesgo para otros organismos benéficos lo convierten en un excelente candidato biorregulador de las densidades poblacionales de culícidos para nuestra región.

Nematodos entomopatógenos en mosquitos (Steinernematidae y Heterorhabditidae)

Si nos referimos a los nematodos entomopatógenos como enemigos naturales, podemos mencionar a dos grupos, la familia *Steinernematidae* y la familia *Heterorhabditidae*. Estos nematodos introducen una bacteria simbiote en el hemocele del insecto, que se multiplica rápidamente produciendo la muerte por septicemia dentro de las 48 hs (Vega y Kaya, 2012). La bacteria destruye los tejidos internos, produciendo sustancias nutritivas de las que se alimentan los nematodos y sustancias antibióticas que impiden la contaminación de los cadáveres por otros microorganismos.

La etapa juvenil (J3) o juvenil infectivo (JI) es la única de vida libre. Durante esta etapa penetra en el hospedador (insecto) a través de los espiráculos, boca, ano o en algunas especies a través de las membranas intersegmentarias de la cutícula, pudiendo ser activamente por la presencia de un diente en el género *Heterorhabditis*. Una vez en el hemocele libera la bacteria, la cual se multiplica rápidamente provocando la muerte del insecto dentro de las 24 a 48 hs. Luego de la muerte del hospedador, el nematodo se alimenta de los tejidos en descomposición del insecto, y las sustancias generadas por

las bacterias que ayudan al desarrollo de los nematodos. Estos pasarán a través de 4 etapas juveniles hasta llegar a adultos siendo la primera generación de adultos hermafrodita (*Heterorhabditis spp*) o anfimíctica (*Steinernema spp.*) mientras que la segunda es anfimíctica en ambos géneros (Vega y Kaya, 2012). Dependiendo de los recursos disponibles, se pueden presentar una o más generaciones dentro del cadáver del hospedador y un gran número de J3, las cuales se liberan del insecto al ambiente para infectar otros hospedadores y continuar su ciclo. El color del cadáver es indicativo de los pigmentos producidos por el monocultivo de bacterias mutualistas que crecen en los hospedadores, rojizo/violeta oscuro en el caso de *Heterorhabditis spp.* o amarillo/marrón oscuro en *Steinernema spp.*

Debido a los elevados índices de mortalidad ocasionados y efectividad en un amplio número de plagas de importancia sanitaria y agrícola, se utilizan como enemigos naturales y se comercializan con diferentes formulaciones, siendo una estrategia alternativa al uso de insecticidas.

Existen en la actualidad, más de 90 empresas dedicadas a la producción y comercialización de

nematodos entomopatógenos, ya que son relativamente fáciles de usar y son aplicados de modo similar a los pesticidas convencionales.

Si bien estos nematodos son parásitos naturales de insectos terrestres, su potencialidad fue considerada sobre larvas de mosquitos. La infectividad y ciclo de vida de un aislado argentino del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* se evaluó en larvas de *Ae. aegypti* por primera vez en condiciones de laboratorio (Peschiutta *et al.*, 2014). *H. bacteriophora* completó con éxito su ciclo de vida dentro de este hospedador hasta la etapa adulta observándose la aparición de juveniles infectivos del nematodo en pocos días. El parasitismo resultante alcanzó

un porcentaje de mortalidad de 84 % a una dosis de 750/1 (Juveniles infectivos/ larva de mosquito).

Cagnolo y Almirón (2010) reportaron parasitismo por primera vez en larvas de *Cx. apicinus* y demostraron que la forma infectiva del nematodo *Steinernema rarum* (IJs), es capaz de buscar activamente a las larvas de mosquitos. Este trabajo demostró la presencia de infectividad en los juveniles emergidos siendo la primera generación la de mayor virulencia. Los autores consideraron que estas diferencias generacionales podrían ser explotadas con fines de control biológico mediante el uso de una generación específica de juveniles infectivos para liberaciones inoculativas.

Perspectivas

El creciente interés por la calidad del medio ambiente ha generado un incremento en los últimos años de la búsqueda de nuevas herramientas para el control de insectos de importancia agrícola y sanitaria que sean más seguros y compatibles con el medio ambiente.

En Argentina el estudio de parásitos y patógenos comenzó en los años 80, existiendo en la actualidad cada vez mayor demanda de bioinsecticidas basados en entomopatógenos para el control de plagas agrícolas y vectores de enfermedades. Sin embargo, el desarrollo de estos productos en nuestro país sigue siendo incipiente, incluso sin existir hasta el momento registros de productos a base de nematodos. Las limitaciones se deben a los altos costos de producción en comparación con los insecticidas químicos, la falta de legislación en relación con los requisitos de regulación y registro de los diferentes grupos, el desarrollo de criterios o recomendaciones de políticas para los estudios de campo o lanzamientos de nuevos productos biológicos, la identificación de mecanismos para promover el desarrollo, la comercialización y el uso por los productores o agentes sanitarios, así como el control de los relevamientos, introducción, uso y / o tránsito de dichos productos.

Sin embargo, la creación en el 2015 de la Comisión Consultiva en Bioproductos de Uso Agrícola (CABUA), en el área de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología (CONABIA) constituye un importante estímulo para el crecimiento de bioinsumos en nuestro país. Dicha comisión surgió con el objetivo de proporcionar asesoramiento técnico en los requisitos de calidad, eficacia y bioseguridad que deben presentar los bioinsumos a utilizar, así como establecer un marco normativo adecuado para su uso, manipulación y eliminación en el ecosistema. De

esta manera se espera generar un mayor crecimiento de las líneas de investigación de enemigos naturales y tomar conciencia de la importancia de una buena búsqueda, uso y producción de bioproductos, preparación de planes de control, gestión integrada de plagas como asimismo la necesidad de la producción e instalación de mercados a nivel nacional y regional.

En resumen, aunque numerosos estudios sobre entomonematodos han sido realizados en Argentina, el futuro de estas investigaciones deberá involucrar mayor número de ensayos a campo y refinamientos en las técnicas de producción en masa, conjuntamente con estudios a largo plazo para determinar la dinámica y el desarrollo de estos entomoparásitos dentro de las poblaciones naturales de insectos que son relevantes para la salud humana. Numerosos son aún los desafíos que enfrentan los equipos de investigadores/extensionistas para ser emprendidos en los próximos años.

En nuestra opinión, algunos de los que deberían recibir atención prioritaria son:

- Lograr la infraestructura necesaria para el establecimiento y mantenimiento de los aislamientos.
- Empezar el desarrollo de formulaciones de entomonematodos para facilitar las aplicaciones e incrementar su viabilidad.
- Continuar estudios relacionados con las aplicaciones a campo referidos a dosis, frecuencia y momento de aplicación, biología y ciclo de los hospedadores, selección de plagas, equipos de aplicación y compatibilidad con otros insecticidas.
- Difundir el conocimiento y potencial de entomonematodos a la sociedad, incluyendo la preparación de profesionales, técnicos, empleados e instituciones.

Bibliografía

1. Achinelly MF. 2004. Estudios referentes a la utilización del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) como agente de control biológico de culicidos (Diptera: Culicidae). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
2. Achinelly MF, García JJ. 2003. Efecto de la temperatura sobre la longevidad e infectividad de los juveniles preparásitos de *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) parásito de culicidos. Rev Biol Trop. 51: 753-758.
3. Achinelly MF, Micieli MV. 2009. Experimental releases of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) against three mosquito species in Argentina. Nematology. 11: 151-154.
4. Achinelly MF, Micieli MV. 2011. Optimizing laboratory production of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) with a discussion of potential release strategies for mosquito biological control. Biol Control. 57: 31-36.
5. Achinelly MF, Micieli MV. 2013. Host range of the parasite *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Argentina mosquitoes. J Vector Ecol. 1: 1-
6. Achinelly MF, Micieli MV, Marti G, García JJ. 2004. Susceptibility of neotropical mosquito larvae (Diptera: Culicidae) and non-target aquatic organisms to the entomopathogenic nematode *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino 1986 (Nematoda: Mermithidae). Nematology. 6: 299-302.
7. Becnel JJ, Johnson MA. 1998. Pathogenicity test on nine mosquito species and several non-target organisms with *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). J Nematol. 30: 411-414.
8. Belaich MN, Buldain D, Ghiringhelli PD, Hyman B, Micieli MF, Achinelly MF. 2015. Nucleotide sequence differentiation of argentine isolates of the mosquito parasitic nematode *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). J Vector Ecol. 40: 415-418.
9. Cagnolo SR, Almirón WR. 2010. Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). Rev Soc Entomol Argent. 69: 141-145.
10. Camino NB. 1988. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en larvas de *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828. Iheringia Ser Misc. 2: 93-97.
11. Camino NB. 1989. Primer registro de culicidos (Diptera: Culicidae) parasitados por *Hydromermis* sp. (Nematoda: Mermithidae). Neotrópica 35: 67-70.
12. Camino NB, García JJ. 1988. Crecimiento larval de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828, como hospedador alternativo. Iheringia, Ser Misc. 2: 93-97.
13. Camino NB, García JJ. 1991. Influencia de la salinidad y el pH en el parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en larvas de *Culex pipiens* Wied. (Diptera: Culicidae). Neotropica. 37: 107-112.
14. Camino NB, Reboredo GR. 1994. Biology of *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) parasite of mosquitoes (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. Neotrópica 40: 45-48.
15. Camino NB, Reboredo GR. 1996. Producción de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae). Neotropica. 42: 47-50.
16. Campos RE, Sy VE. 2003. Mortality in immatures of the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and effects of parasitism by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Buenos Aires province, Argentina. Mem Inst Osw Cruz. 98: 199-208. Chandhiran
17. K. Paily P. 2015. Natural parasitism of *Romanomermis iyengari* (Welch) (Nematoda: Mermithidae) on various species of mosquitoes breeding in rice fields in Pondicherry, India. Biol Control 83: 1-6.
18. Di Battista CM, Fischer S, Campos RE. 2015. Parasitism prevalence and survival time of adult *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) parasitized by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). J Vector Ecol. 40: 393-397.
19. Dong L, Sanad M, Wang Y, Xu Y, Shamseldean MS, Gaugler R. 2014. Mating clusters in the mosquito parasitic nematode, *Strelkovimermis spiculatus*. J Invertebr Pathol. 117: 19-25.
20. Gajananana A, Kazmi S J, Bheema Rao US, Suguna SG, Chandahas RK. 1978. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: *Mermithidae*) of mosquito larvae in Pondicherry. Indian J Med Res. 68: 242-247.
21. García JJ, Camino NB. 1990. Primera cita para la Argentina de infecciones naturales en larvas de *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae). Neotropica. 36: 83-86.
22. García JJ, Campos RE, Maciá A. 1994. Prospección de enemigos naturales de *Culicidae* (Diptera) de la Selva Marginal de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, República Argentina. Rev Acad Colombiana Ciencias Exactas Nat. 19: 209-215.
23. Lopez R, Díaz-Nieto LM, Berón CM. 2016. New host and distribution for the mosquito parasite *Strelkovimermis spiculatus*. Rev Soc Entomol Argent, en prensa.
24. Maciá A, García JJ, Campos RE. 1995. Bionomía de *Aedes albifasciatus* y *Ae. crinifer* (Diptera: Culicidae) y sus enemigos naturales en Punta Lara, Buenos Aires. Neotrópica. 41: 43-50.
25. Maciá A, García JJ, Campos RE. 1997. Seasonal variation of the three *Culex* species (Diptera: Culicidae) and its parasite and pathogens in Punta Lara, Buenos Aires province, Argentina. Rev Biol Trop. 44: 267-275.
26. Micieli MV, García JJ. 1999. Estudios epizootológicos de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda, Mermithidae) en una población natural de *Aedes albifasciatus* (Diptera, Culicidae) en la Argentina. Misc Zool. 22: 31-37.
27. Micieli MV, Rizzo P, Achinelly MF, Villar M, Muttis E. 2012a. Population dynamics between the mermithid *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) and the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) over time. Biol Control. 61: 55-63.
28. Micieli MV, Rizzo P, Achinelly MF, Tarquini J. 2012b. Effect of temperature, photoperiod and flooding-desiccation cycles on *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) preparasites under culture conditions. J Invert Pathol. 110: 114-117.
29. Muttis E, Micieli MV, García JJ. 2013. *Culex pipiens* affected by joint infection of a Mosquito Iridescent Virus and *Strelkovimermis spiculatus*. J Invert Pathol. 114: 295-297.
30. Muttis E, Micieli MV, Urrutia ML, García JJ. 2015. Transmission of a pathogenic virus (Iridoviridae) of *Culex pipiens* larvae mediated by the mermithid *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda). J Invert Pathol. 129: 40-44.
31. Pailey KP, Balaraman K. 1994. The effect of temperature on different stages of *Romanomermis iyengari*, a mermithid nematode parasite of mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 89: 635-642.
32. Pailey KP, Balaraman K. 2000. Susceptibility of ten species of mosquito larvae to the parasitic nematode *Romanomermis iyengari* and its development. Med Vet Ent. 14: 426-429.
33. Perez-Pacheco R, Rodríguez-Hernández C, Lara-Reyna J, Montes-Belmont R, Ruiz-Vega J. 2005. Control of the mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, Mexico, Biol Control. 32: 137-14.
34. Perez-Pacheco R, Santamarina-Mijares A, Vásquez-López, A, Martínez-Tomás SH, Suárez-Espinosa J. 2009. Efectividad y supervivencia de *Romanomermis culicivorax* en criaderos naturales de larvas de mosquitos. Agrociencia. 43: 861-868.
35. Peschiutta M, Cagnolo SR, Almirón WR. 2014. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) al nematodo entomopatogénico *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae). Rev Soc Entomol Argent. 73: 99-108.
36. Petersen JJ. 1972. Factors affecting sex determination in a mermithid parasite of mosquitoes. Mosquito News. 32: 226-230.
37. Petersen JJ. 1985. Nematode parasites. En: Chapman, H. C. (Ed.). Biological Control of Mosquitoes, American Mosquito Control Association, Bulletin N° 6, California, pp. 110-122.
38. Petersen JJ, Chapman HC. 1979. Checklist of mosquito species tested against the nematode parasite *Romanomermis culicivorax*. J Med Entomol. 15: 468-471.
39. Petersen JJ, Willis OR. 1972a. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. Mosquito News. 32: 226-230.
40. Petersen JJ, Willis OR 1972b. Results of preliminary field applications of *Roesimermis nielsenii* (Mermithidae: Nematoda) to control mosquito larvae. Mosquito News. 32: 312-316.
41. Petersen JJ, Willis OR. 1974. Experimental release of a mermithid nematode to control *Anopheles* mosquitoes in Louisiana. Mosquito News. 34: 316-319.
42. Petersen JJ, Willis OR. 1975. Establishment and recycling of a mermithid nematode for the control of mosquito larvae. Mosquito News. 35: 526-532.
43. Petersen JJ, Chapman HC, Willis OR, Fukuda T. 1978. Release of *Romanomermis culicivorax* for the control of *Anopheles albimanus* en El Salvador. II. Application of the nematode. Am J Trop. Med. Hyg. 27: 1268-1273.
44. Platzer EG. 2007. Mermithid nematodes, En: TG Floore Ed. Biorational Control of Mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc Bull. 7: 58-64.
45. Platzer EG, Stirling AM. 1971. Improved rearing procedures for *Romanomermis culicivorax*. Annual Conference n° 39, California Mosquito and Vector Control Association.
46. Poinar GO Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects, CRC Press, Boca Raton.
47. Poinar GO Jr, Camino N. 1986. *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitizing *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. J Nematol. 18: 317-319.
48. Santamarina Mijares A, Bellini AC. 2000. Producción masiva de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) y su aplicación en criaderos de anofelinos en Boa Vista (Roraima), Brasil. Rev Panam Salud Pública. 7: 155-161.49. Santamarina Mijares A, Ruiz Michael G, Rodríguez Esperanza A, Bustamante Hernández A, Pérez Pacheco R. 1996. Effectiveness of *Romanomermis culicivorax* (Nematoda: Mermithidae) in *Anopheles pseudopunctipennis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) in Mexico. Miscel Zool 19: 33-37.
49. Undeen AH, White SE, Fukuda T. 1996. Egg production by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). J Am Mosq Control Assoc. 12: 736-738.
50. Vega FE, Kaya HK. 2012. Insect Pathology, Elsevier, UC Davis.