

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



ESTUDIO DEL EFECTO BIOCIDA DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae*
SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Tesis

Que presenta CINDY ALEJANDRA MINUTTI HERNÁNDEZ
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Junio 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ESTUDIO DEL EFECTO BIOCIDA DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae*
SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Tesis

Que presenta CINDY ALEJANDRA MINUTTI HERNÁNDEZ
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Dr. Sergio René Sánchez Peña
Director (UAAAN)

M.C. Benito Reyna Balderas
Director Externo

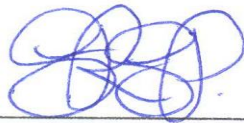
Saltillo, Coahuila

Junio 2019

ESTUDIO DEL EFECTO BIOCIDA DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae*
SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Tesis

Elaborada por CINDY ALEJANDRA MINUTTI HERNÁNDEZ como requisito para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y
aprobación del comité de asesoría



Dr. Sergio René Sánchez Peña

Asesor Principal



Dr. Oswaldo García Martínez

Asesor



M.C. Benito Reyna Balderas

Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente
Subdirector de Postgrado UAAAN

Agradecimientos

Principalmente agradezco a Dios por permitirme llegar a este día y haberme dado la fuerza para seguir adelante y no dejarme vencer ante la adversidad.

Gracias a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por la oportunidad de seguir desarrollándome profesionalmente, en especial al departamento de parasitología, por proveer las instalaciones para la realización de este proyecto. De la misma manera agradezco enormemente a CONACyT por el apoyo a través de su beca. Becario 816473.

A mis padres, sobre todo a mi madre María Guadalupe Hernández Zurita por ser un ejemplo de superación en todos los sentidos.

A mi asesor principal el Dr. Sergio René Sánchez Peña, por su confianza, por compartir sus conocimientos y el apoyo que me dio en el transcurso de mis estudios de maestría.

Al Dr. Oswaldo García Martínez por los conocimientos brindados y revisión de mi tesis.

Al M.C. Benito Reyna Balderas por sus consejos, palabras de aliento y por todo el apoyo para la realización de este proyecto, de la misma manera agradezco a su familia y a su hermano el Ing. Esteban Reyna Balderas.

A mis compañeros de generación en especial a Blanca Cardiel, Renato Villegas y Vanessa De Lira.

A la familia González Sánchez principalmente a Alain por el apoyo que se me brindo en tiempos de tanta adversidad.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi hijo Alejandro Michael quien es la fuente principal de felicidad y motivación en mi vida, gracias mi amor por entender que todo sacrificio es para mejorar y brindarte un buen presente y un futuro mejor, así como dedico todo esfuerzo y el empeño puesto en este proyecto a mi estrellita en el cielo que, aunque no se quedo conmigo dejo su huellita en este mundo, en mi vida y en mi corazón.

Resumen

ESTUDIO DEL EFECTO BIOCIDA DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae*
SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Por

CINDY ALEJANDRA MINUTTI HERNÁNDEZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. SERGIO RENÉ SÁNCHEZ PEÑA -ASESOR-

SALTILLO, COAHUILA

JUNIO 2019

Aedes aegypti es un mosquito invasor de lugares donde habitan los seres humanos. Las hembras son hematófagas y su alimento en mayor medida lo obtienen de las personas, lo que convierte a las hembras de estos mosquitos en vectores de varias enfermedades víricas de importancia para el sector salud. Año con año se intentan combatir poblaciones de estos dípteros que aumentan con el paso de las lluvias, pero su resistencia por el uso frecuente de insecticidas químicos y el ambiente favorable que se les presenta por el cambio climático, hace difícil mantener un control sobre estos. Los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tienen capacidad entomopatógena y su uso ha llevado al control de diversas plagas. En el presente trabajo se evaluaron tres cepas de *Beauveria bassiana* y tres cepas de *Metarhizium anisopliae* con lo que se seleccionó la más virulenta de cada hongo para preparar tres concentraciones de un polvo conidial donde se obtuvo para *B. bassiana* 1.8×10^6 , 1.8×10^7 y 1.8×10^8 conidias/gr mientras que para *M. anisopliae* se obtuvieron las concentraciones 1.3×10^6 , 1.3×10^7 y 1.3×10^8 conidias/gr con esto se realizaron bioensayos en laboratorio y semi campo sobre los cuatro estadios larvales que tiene *Aedes aegypti*. En el laboratorio se colocaron 10 repeticiones para cada estadio con 25 larvas cada una en 100ml de agua destilada, a cada repetición se le agregaron 88mg del polvo conidial en las tres concentraciones por separado. Las larvas con mortalidad se colocaron en cámaras húmedas y se observaron cada 24 horas por 7 días con lo que se confirmó la entomopatogenicidad de los hongos. La mayor mortalidad se presentó con las concentraciones más altas, esto es para el estadio I; 37.2%, estadio II; 46%, estadio III; 100% de mortalidad al 10° día y para el estadio IV; 84% con el uso de 1.8×10^8 conidias/gr de *B. bassiana* mientras que con la aplicación de *M. anisopliae* 1.3×10^8 conidias/gr. observamos una mortalidad aun mayor, para el estadio I la mortalidad fue de 88.4% mientras que para los estadios II, III y IV se obtuvo el 100% de mortalidad al 9°, 5° y 7° día respectivamente. Las concentraciones con las que se obtuvo una mayor mortalidad se sometieron a un nuevo análisis en condiciones de semi campo esto para comprobar su poder entomopatógeno en un ambiente más parecido a un criadero natural en donde se desarrollan las larvas, para este bioensayo se colocaron 10 repeticiones con 50 larvas cada una para cada uno de los cuatro estadios larvales, tanto las repeticiones a analizar con los entomopatógenos como los testigos se colocaron en 800 ml del agua donde se encontraron las larvas más 200ml de agua destilada, a cada repetición se le adicionaron 176mg del polvo conidial mientras que los testigos se manejaron con 176mg del excipiente en polvo con el que se prepararon las concentraciones. En el análisis de semi campo obtuvimos una mortalidad de 17.4% para el estadio I, 35.2 % para el estadio II, 75% en el estadio III y 50% en el estadio IV, esto con el uso de *B. bassiana*, mientras que con *M. anisopliae* las mortalidades fueron de 50% en el estadio I, 92.8% en el estadio II y 100% al 7° día en el estadio III así como el 98% en el estadio IV. La mortalidad en semi campo fue menor comparada con la observada en el laboratorio, pero aun así los porcentajes de mortalidad en esta prueba fueron altos. Con lo que confirmamos la alta capacidad entomopatógena que tienen ambos hongos sobre las larvas acuáticas y que a mayor concentración del polvo conidial mayor efecto larvicida se obtiene.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, efecto larvicida, control biológico.

Abstract

STUDY OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* BIOCIDAL EFFECT
OVER *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) LARVAE

BY

CINDY ALEJANDRA MINUTTI HERNÁNDEZ

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. SERGIO RENÉ SÁNCHEZ PEÑA -ADVISER-

SALTILLO, COAHUILA

JUNE 2019

Aedes aegypti is an invasive mosquito from places where humans live. The females are hematophagous and their food to a greater extent is obtained from people, which makes the mosquitoes' females, vectors of several viral diseases of importance to the health sector. Year after year they try to fight populations of these diptera that increase with the passage of rain. Their resistance to the frequent use of chemical insecticides and the favorable environment that is presented by climate change, makes it difficult to maintain control over them. The fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* have an entomopathogenic capacity and their use has led to the control of various pests. In the present work three strains of *Beauveria bassiana* and three of *Metarhizium anisopliae* were evaluated, with which the most virulent of each fungus was selected to be used at different concentrations in the bioassays, six concentrations of a conidial powder were prepared where it was obtained for *B. bassiana* 1.8×10^6 , 1.8×10^7 and 1.8×10^8 conidia/gr and for *M. anisopliae* the concentrations 1.3×10^6 , 1.3×10^7 and 1.3×10^8 conidia/gr were obtained. With this, laboratory bioassays were carried out on the four *Aedes aegypti*'s larval instars, 10 repetitions were placed for each instar with 25 larvae each one, in 100ml of distilled water, 88mg was added to each repetition, the conidial powder in the three concentrations separately. The larvae with mortality were placed in humid chambers and were observed every 24 hours for 7 days, which confirmed the fungi entomopathogenicity. The highest mortality occurred with the highest concentrations, this is for instar I; 37.2%, instar II; 46%, instar III; 100% mortality at day 10 and for instar IV; 84% with the use of 1.8×10^8 conidia/gr of *B. bassiana* while with the application of *M. anisopliae* 1.3×10^8 conidia/gr. we observed an even higher mortality, for instar I the mortality was 88.4% while for instars II, III and IV 100% mortality was obtained at 9th, 5th and 7th day respectively. The concentrations with which a greater mortality was obtained were subjected to a new bioassay under semi-field conditions, in order to check their entomopathogenic power in an environment more similar to a natural hatchery where the larvae develop. For this bioassay, 10 replications were placed with 50 larvae each for each of the four larval instars, both the replications to be analyzed with the entomopathogens and the controls were placed in 800 ml of the water where the larvae were found, adding 200ml of distilled water, 176 mg were added to each replication of the conidial powder while the controls were handled with 176 mg of the excipient powder with which the concentrations were prepared. In the semi-field analysis, we obtained a mortality of 17.4% for instar I, 35.2% for instar II, 75% at instar III and 50% at instar IV, this with the use of *B. bassiana*, while with *M. anisopliae* mortalities were 50% at instar I, 92.8% at instar II and 100% on the 7th day on instar III as well as 98% at IV instar. Semi-field mortality was lower compared to that observed in the laboratory, but still the mortality percentages in this experiment were high. This confirms the entomopathogenic capacity of both fungi on aquatic larvae and that a higher concentration of conidial powder has a greater larvicidal effect.

Key words: *Aedes aegypti*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, larvicidal effect, biological control.

Índice General

Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	ix
I- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
1.2 HIPÓTESIS.....	2
II- REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
<i>Aedes aegypti</i>	3
2.1 Ciclo de vida y biología.....	3
2.1.1 Huevecillos.....	5
2.1.2 Larvas.....	5
2.1.3 Pupas.....	7
2.1.4 Adultos.....	7
2.2 Distribución geográfica.....	8
2.3 Clasificación taxonómica.....	8
2.4 Métodos de control para <i>Aedes aegypti</i>	9
2.4.1 Control Químico.....	9
2.4.2 Control Genético.....	10
2.4.3 Control Cultural.....	10
2.4.4 Control Biológico.....	10

III-	MATERIALES	Y
MÉTODOS		13
PARTE 1. Elección de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> que se usaron contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> en laboratorio y semi campo		13
1.a Recolección de larvas de <i>Aedes aegypti</i> para el análisis de elección de cepas de los hongos entomopatógenos.....		13
1 b. Evaluación de cepas de los hongos entomopatógenos para su elección.....		14
PARTE 2. Evaluación del efecto biocida de tres concentraciones de los hongos <i>Beauveria bassiana</i> Y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre los cuatro estadios larvales de <i>Aedes aegypti</i>		15
2 a. Establecimiento de un criadero de <i>Aedes aegypti</i> para la obtención de larvas en sus cuatro estadios.....		15
2 b. Elección del excipiente para el preparado conidial en polvo.....		17
2 c. Preparación del polvo conidial de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>		17
2 d. Evaluación de polvo conidial de <i>Beauveria bassiana</i> en tres concentraciones sobre larvas I, II, III y IV de <i>Aedes aegypti</i>		18
2 e. Evaluación de <i>Metarhizium anisopliae</i> en tres concentraciones de un formulado en polvo sobre los cuatro estadios larvales de <i>Aedes aegypti</i>		19
PARATE 3. Evaluación del efecto biocida de <i>Beauveria bassiana</i> Y <i>Metarhizium anisopliae</i> en semi campo		20
3 a. Recolección de larvas <i>Aedes aegypti</i>		20
3 b. Análisis de semi campo.....		20
3 c. Confirmación de la mortalidad de las larvas por efectos de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> mediante cámaras húmedas.....		21

IV-	RESULTADOS	Y
DISCUSIÓN.....	22	
PARTE 1. Elección de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> que se usaron contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> en laboratorio y semi campo.....	22	
PARTE 2. Evaluación del efecto biocida de tres concentraciones de los hongos <i>Beauveria bassiana</i> Y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre los cuatro estadios larvales de <i>Aedes aegypti</i>.....	22	
2 a. Establecimiento de un criadero de <i>Aedes aegypti</i> para la obtención de larvas en sus cuatro estadios.....	22	
2 b. Elección del excipiente para el preparado conidial en polvo.....	22	
2 c. Preparación del polvo conidial de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	23	
2 d. Evaluación de polvo conidial de <i>Beauveria bassiana</i> en tres concentraciones sobre larvas I, II, III y IV de <i>Aedes aegypti</i>	23	
2 e. Evaluación de <i>Metarhizium anisopliae</i> en tres concentraciones de un formulado en polvo sobre los cuatro estadios larvales de <i>Aedes aegypti</i>	27	
PARATE 3. Evaluación del efecto biocida de <i>Beauveria bassiana</i> Y <i>Metarhizium anisopliae</i> en semi campo.....	31	
V- CONCLUSIONES.....	33	
VI- REFERENCIAS.....	34	

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Promedio del porcentaje acumulado de la mortalidad larval en *Aedes aegypti* estadios I, II, III y IV con el uso de *Beauveria bassiana*.....24

Cuadro 2. Promedio del porcentaje acumulado de la mortalidad larval en *Aedes aegypti* estadios I, II, III y IV con el uso de *Metarhizium anisopliae*.....28

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida. <i>Aedes aegypti</i>	4
Figura 2. Huevecillos de <i>Aedes aegypti</i>	5
Figura 3. Taxonomía de identificación para larvas de en los estadios III y IV.....	6
Figura 4. Pupa y Adulto emergiendo de <i>Aedes aegypti</i> (SSA 2015).....	7
Figura 5. A) Hembra de <i>Aedes aegypti</i> alimentándose, (CENAPRESE, 2016). B) Macho y hembra de <i>Aedes aegypti</i> (CENAPRESE, 2014).....	7
Figura 6. Países donde se han localizado ejemplares de <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 7. Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos sobre los insectos.....	11
Figura 8. Larvas recolectadas de una vivienda particular de la zona centro de la ciudad de Saltillo Coahuila.....	14
Figura 9. Evaluación de tres cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas del estadio III de <i>Aedes aegypti</i> más sus respectivos testigos...	14
Figura 10. Ovitrapas colocadas en la ciudad de Saltillo Coahuila.....	15
Figura 11. (a.) Jaula de dos niveles para pupas y emergencia de los mosquitos adultos; (b.) Aspirador manual con maya entre el popote plástico y la maguera para la permanencia de los adultos en la parte transparente a la hora de pasarlos a jaulas....	16
Figura 12. (a.) Alimentación sanguínea de las hembras <i>Ae. aegypti</i> por medio de una rata egipcia; (b.) ovitrampa dentro de jaula de mosquitos adultos, que se instaló dentro del departamento de parasitología UAAAN.....	16
Figura 13. (a.) Caldo papa-frijol inoculado con los hongos entomopatógenos; (b.) hongos entomopatógenos sembrados por extensión de vaciado del caldo inoculado con 21 días de crecimiento.....	17
Figura 14. (a.) BIONEX; coadyuvante con poder dispersante; (b.) Conteo de conidias mediante una cámara de Neubauer; (c.) Preparación de tres diferentes concentraciones de <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
Figura 15. (a.) Evaluación de tres concentraciones del polvo conidial de <i>Beauveria bassiana</i> sobre larvas I, II, III y IV de <i>Ae. aegypti</i> ; (b.) Preparación de cámaras húmedas	

para la confirmación de la mortalidad por *B. bassiana*.....19

Figura 16. (a.) Evaluación de polvo conidial de *Metarhizium anisopliae* en tres concentraciones sobre los cuatro estadios larvales de *Ae. aegypti*; (b.) Preparación de cámaras húmedas para el análisis de larvas con mortalidad.....20

Figura 17. Evaluación del efecto biocida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en semi-campo.....21

Figura 18. Los porcentajes de mortalidad para el estadio I con el uso de *Beauveria bassiana* en sus tres concentraciones fueron los más bajos no sobre pasando la mortalidad de 37.2 % que se obtuvo con la concentración más alta que es de 1.8×10^8 conidias/gr....25

Figura 19. La diferencia entre los porcentajes de mortalidad para el estadio II con el uso de *Beauveria bassiana* se representan en esta grafica donde podemos observar que las mortalidades finales a los 10 días del análisis no sobre pasan el 46% de mortalidad que se obtuvo con la concentración 1.8×10^8 conidias/gr.....25

Figura 20. Porcentajes de mortalidad para el estadio III con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Beauveria bassiana*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio sobre pasan el 50% con las tres concentraciones y llegan hasta el 100% con la concentración 1.8×10^8 conidias/gr.....26

Figura 21. Porcentajes de mortalidad para el estadio III con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Beauveria bassiana*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio sobre pasan el 50% con las tres concentraciones y llegan hasta el 100% con la concentración 1.8×10^8 conidias/gr.....26

Figura 22. Evidencias del daño y desarrollo de *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Ae. aegypti*. **A.** Coloración típica roja por las micotoxinas oosperein de *B. bassiana*. **B.** Cámara húmeda para el desarrollo del entomopatógeno sobre larvas muerta. **C.** y **E.** Larvas con mortalidad causada por *B. bassiana*, colocadas en cámaras húmedas. **D.** y **F.** Desarrollo de *B. bassiana* sobre larvas de *Ae. aegypti* 6 días después de la mortalidad de las larvas.....27

Figura 23. En esta grafica se muestran los porcentajes de mortalidad para el estadio I con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Metarhizium anisopliae*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio no alcanza el 50% con la concentración $1.3 \times$

10^6 pero está muy por encima del 50% con las concentraciones 1.3×10^7 y 1.3×10^8 conidias/gr...29

Figura 24. Porcentajes de mortalidad del estadio II de *Aedes aegypti* con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Metarhizium anisopliae*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio sobre pasa el 50% con las tres concentraciones y llega al 100% con la concentración 1.3×10^8 conidias/gr. desde el día 9.....29

Figura 25. Porcentajes de mortalidad del estadio III de *Aedes aegypti* con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Metarhizium anisopliae*. Se puede observar que las mortalidades son las más altas comparadas con los análisis realizados en los estadios I, II y IV. Llegando al 100 % de mortalidad en la concentración 1.3×10^8 desde el quinto día y 100% con 1.3×10^7 desde el día 8, la mortalidad con la concentración 1.3×10^6 no llega al 100% pero está por encima del 90%.....30

Figura 26. Los porcentajes de mortalidad del estadio IV de *Aedes aegypti* con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Metarhizium anisopliae* se representan en esta gráfica y se puede observar que las mortalidades son altas llegando al 100 % con la concentración 1.3×10^8 desde el día 7 y 100% con 1.3×10^7 desde el día 9 y 85.6% de mortalidad con la concentración 1.3×10^630

Figura 27. Evidencias del daño y desarrollo de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ae. aegypti*. **A.** Mortalidad de larvas al tercer día de su exposición al hongo. **B.** Desarrollo de hifas de *M. anisopliae* a las 24 horas de la mortalidad de la larva, visto en el microscopio eléctrico a 40X. **D.** Larvas con mortalidad después de 24 horas de exposición al hongo. **E.** y **F.** Crecimiento de *M. anisopliae* en el aparato bucal y sifón respirador de las larvas, 2 y 3 días después de la mortalidad de los individuos. **F.** Desarrollo de 5 días del entomopatógeno *M. anisopliae* después de provocar la muerte de la larva.....31

Figura 28. Representación de la diferencia entre los porcentajes de mortalidad total a los 10 días de análisis de las larvas *Aedes aegypti* en sus cuatro estadios, con el uso de *Beauveria bassiana* 1.8×10^8 y *Metarhizium anisopliae* 1.3×10^832

I- INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti es un díptero de la familia Culicidae, el cual tienen una distribución geográfica muy amplia, encontrándose frecuentemente en casi todo el mundo. (Trewin et al., 2017). Estos dípteros están adaptados a los entornos urbanizados, son invasores de zonas donde habitan los seres humanos y se encuentra de manera común en lugares domésticos donde tiene actividades de alimentación, reposo, apareamiento y ovoposición (Lambrechts et al., 2010; Morrison et al., 2008). Las hembras de estos mosquitos son hematófagas y obtienen su alimento de roedores, aves, mamíferos, aunque con una mayor predilección por la sangre humana, debido a sus hábitos alimenticios las hembras de estos dípteros son vectores de enfermedades como dengue, fiebre amarilla, chikungunya y zika que son de gran importancia para el sector salud. *Aedes aegypti* obtienen su alimento a la luz del día, lo cual provoca que los humanos estén enormemente expuestos a su picadura y con ello el contraer alguna enfermedad que estos vectores puedan transmitir. (Morrison et al., 2008). Las poblaciones de estos culícidos encuentran cada día un ambiente más propicio para su supervivencia a causa del aumento de temperatura por el calentamiento global (Jansen, C. C., & Beebe, N. W., 2010) y la resistencia que tiene a los insecticidas químicos. Debido a esto *Aedes aegypti* es una de las especies de dípteros con mayor número de estudios y es importante seguir buscando alternativas de eliminación (Morrison et al., 2008), porque a pesar de los conocimientos que se tienen sobre estos culícidos, las enfermedades que transmiten vuelven a hacerse presentes año con año. Mantener un control sobre estos mosquitos debe llevar a la disminución de casos de las enfermedades que transmiten. Una opción para esto, son los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* que no representan una contaminación en el medio ambiente además de no ser patógenos para los seres humanos ni otras especies y se encuentran dentro de un grupo de gran importancia en el control de carácter biológico de insectos considerados plagas y vectores de múltiples enfermedades en los seres humanos. Los insectos en general son susceptibles a alguna de las enfermedades causadas por estos hongos (García et al. 2011) y esto los convierte en un método eficaz de control. Se tiene comprobado que *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* actúan en alguna fase dentro del ciclo de vida de más de 200 especies de insectos, aunque no tienen un efecto inmediato como los insecticidas químicos, estos entomopatógenos son efectivos y se pueden reproducir en el ambiente sin necesidad de realizar varias aplicaciones (Paula, 2008). Estos microorganismos actúan contra los artrópodos de manera directa, mediante su introducción en la cutícula del individuo y ejerciendo en estos variados mecanismos de acción, lo que evita que el huésped desarrolle resistencia (Motta, P. & Murcia, B., 2011). Los hongos entomopatógenos son propágulos que se encuentran de manera normal en el suelo, infectan insectos y creando una simbiosis con las raíces de las plantas (Rodríguez et al., 2009), estos han sido encontrados en una variedad de cultivos de importancia agronómica y han sido formulados como productos para el control de

plagas (Vega *et al.*, 2008), su uso de manera comercial a aumentado en países como Brasil, China, México entre otros (Schränk, A., & Vainstein, M., 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biocida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre los diferentes estadios larvales de *Aedes aegypti*.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Determinar cuál es la cepa más virulenta de cada uno de los hongos, sobre los 4 estadios larvales de *Aedes aegypti*, bajo condiciones de laboratorio.
2. Determina la concentración de conidias con mayor infectividad para cada uno de los diferentes estadios larvales de *Aedes aegypti* y evaluar su impacto en la sobrevivencia de las larvas
3. Realizar pruebas en semi campo, utilizando la concentración de conidias, que se encontró tuvo un mejor efecto larvicida.

1.2 HIPÓTESIS

- Los hongos entomopatógenos que se aplican directamente sobre larvas de *Aedes aegypti* tienen un efecto significativo sobre las poblaciones larvales.
- Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* reducirán significativamente las poblaciones de larvas de *Aedes aegypti* que se encuentran en criaderos naturales.

II- REVISIÓN DE LITERATURA

Aedes aegypti

El mosquito *Aede aegypti* Linnaeus, 1762 que se encuentra normalmente en áreas urbanas es un díptero de la familia Culicidae, subfamilia Culicinae, del subgénero Stegomyia (Salvatella, 1996), es de origen africano (Christophers, 1960; citado por Rey, J. R. y Lounibos, P., 2015), pero actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales, Estallo y colaboradores mencionan que en estas zonas hay más de 2,500 millones de personas que corren el riesgo de contraer dengue por este vector que además es el principal transmisor de fiebre amarilla (Matthews *et al.*, 2016; MINSA, 2014) zika (Thangamani *et al.*, 2016) y chikungunya (Monaghan *et al.*, 2016). Las hembras de *Ae. aegypti* son las transmisoras de los virus y estas solamente son vectores si fueron previamente infectadas al succionar sangre de alguna persona que poseía ya la enfermedad. El virus se aloja en el intestino medio del mosquito y se extiende a las glándulas salivales de 8 a 12 días después de la infección, tras este periodo de incubación el mosquito puede transmitir el virus al alimentarse de la sangre de otras personas (OMS, 2019). Los programas de control de vectores enfrentan desafíos importantes contra estos mosquitos ya que se vuelven resistentes a los insecticidas de uso común (Kamgang *et al.*, 2011).

2.1 Ciclo de vida y biología

Los mosquitos *Aedes aegypti* son insectos holometábolos (Nelson, 1986), que viven en los entornos humanos dentro y en la periferia de sus viviendas (Domínguez *et al.*, 2000). Las hembras de estos dípteros son atraídas a ovipositar en el agua de recipientes de colores oscuros (Peña *et al.*, 2016) o que se encuentran a la sombra. Son tan variado los tamaños de los contenedores donde podemos encontrar huevos y larvas de *Aedes aegypti* que van desde toneles, llantas, cubetas, floreros, jarrones hasta taparrosas de botellas por lo que Carranza y Colaboradores mencionan que las crías de estos mosquitos pueden ser encontradas en diferentes hábitats. Aunque sus criaderos son difíciles de localizar ya que pueden ser muy pequeños y mantenerse dispersos por muchos lugares (Vontas *et al.*, 2012). Además, la calidad del agua influye para la ovipostura de estos dípteros ya que por lo general sus larvas se desarrollan en agua limpia, Marques y colaboradores afirman que las altas concentraciones de nitrato de amonio en el agua de los hábitats atraen a las hembras para ovipositar. *Ae. aegypti* pone sus huevecillos en las paredes húmedas de recipientes con agua que sirven para el desarrollo de las larvas, los huevecillos no eclosionan hasta que se encuentran sumergidos, lo cual en buenas condiciones ocurre de 2 a 3 días después de la oviposición, los huevos que se encuentran en lugares secos se pueden conservar viables por varios meses hasta que puedan estar en contacto con agua y de esta manera eclosionar (Luz *et al.*, 2008). Las larvas mudan 4 veces por lo que pasan por 4 estadios, esto depende de la temperatura del medio en el que se encuentran y en óptimas condiciones sucede en pocos días pasando a la pupación. Las larvas y las pupas son activas, pero solo las larvas se alimentan. La etapa pupal puede durar desde un

día hasta varias semanas dependiendo de las condiciones del medio (Otero *et al.*, 2006). Después de este periodo viene la emergencia de los adultos, el alimento principal de las hembras es la sangre de roedores, aves y mamíferos y es esencial para llevar a cabo la ovogénesis. Una hembra puede ovipositar de 300 a 450 huevos durante toda su vida a lo largo de varias oviposuras (Hernández y García, 2000).

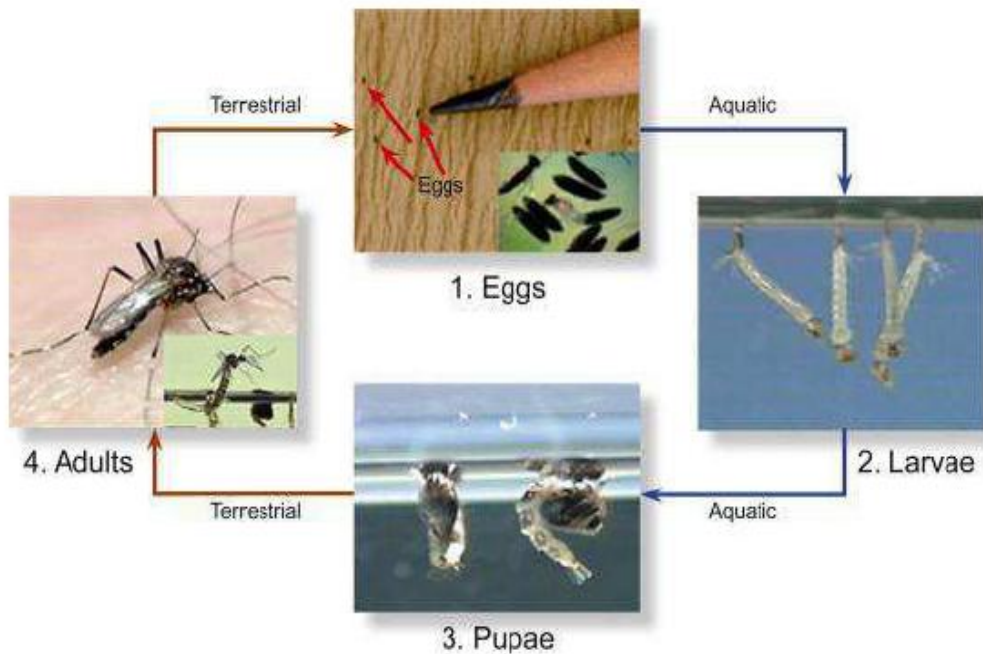


Figura 1. Ciclo de vida. *Aedes aegypti* pasa por 2 etapas: En la etapa acuática (línea azul) donde se encuentran 1. Eclosión de huevecillos, 2. Larvas y 3. Pupas. En la etapa terrestre o aérea (línea roja) se encuentran 4. Adultos (Urdaneta y Failloux, 2011).

2.1.1 Huevecillos

La forma de los huevecillos es semejante a la de un cigarro y poseen una longitud de aproximadamente 1 milímetro. Al momento de la postura son blancos, pero se tornan a un color negro brillante al poco tiempo. Los huevos son fecundados en el momento en que las hembras están ovipositando. Los huevos pueden resistir temperaturas extremas y sequías con una sobrevivencia de hasta más de un año después de su postura. (Nelson, 1986). En buenas condiciones de temperatura y con las óptimas concentraciones de oxígeno, la eclosión ocurre en cualquier momento. En cuanto los huevos son mojados, la acción de las bacterias que se encuentran en la materia orgánica del agua hace que disminuya la tensión del oxígeno lo cual es estimulante para la eclosión. Algunos huevecillos al contacto con el agua eclosionan dentro de los primeros 15 minutos, pero otros pueden no hacerlo hasta después de ser mojados en varias ocasiones (SSA, 2015).



Figura 2. Huevecillos de *Aedes aegypti*. Fotografía tomada por UIEB Morelos, (SSA, 2015).

2.1.2 Larvas

La anatomía de las larvas de *Aedes aegypti* consta de tres secciones, cabeza, tórax y abdomen. El abdomen está dividido en nueve segmentos. El segmento posterior anal se compone de cuatro branquias lobadas que sirven para la regulación osmótica, las cuales se encuentran de un lado y del otro hay un sifón respiratorio por donde las larvas captan el oxígeno del medio ambiente, este sifón es corto y ancho, lo que la diferencia en gran medida de otras especies. La forma de reposo de las larvas es de manera vertical en la superficie del agua y su movimiento al momento de nadar es parecido al de las serpientes lo cual es característico de esta especie. Las larvas son sensibles a los cambios de intensidad de luz. Para su identificación se toman en cuenta dos espinas prominentes

laterales en cada lado del metatórax las cuales asemejan unas uñas de gato. En el octavo segmento abdominal se ubica una hilera de 7 a 12 escamas del peine, cada escama posee una espina y dientes laterales (Nelson, 1986), lo cual se puede observar en la Figura 3. Las larvas pasan por tres mudas lo que divide sus cuatro estadios de crecimiento. El tamaño de las larvas desde el estadio I es de 1 milímetro hasta 6 o 7 milímetros en el estadio IV. La alimentación larval consta de zoo y fitoplancton que se acumula en el agua de los contenedores donde habitan (Mora *et al.*, 2010).

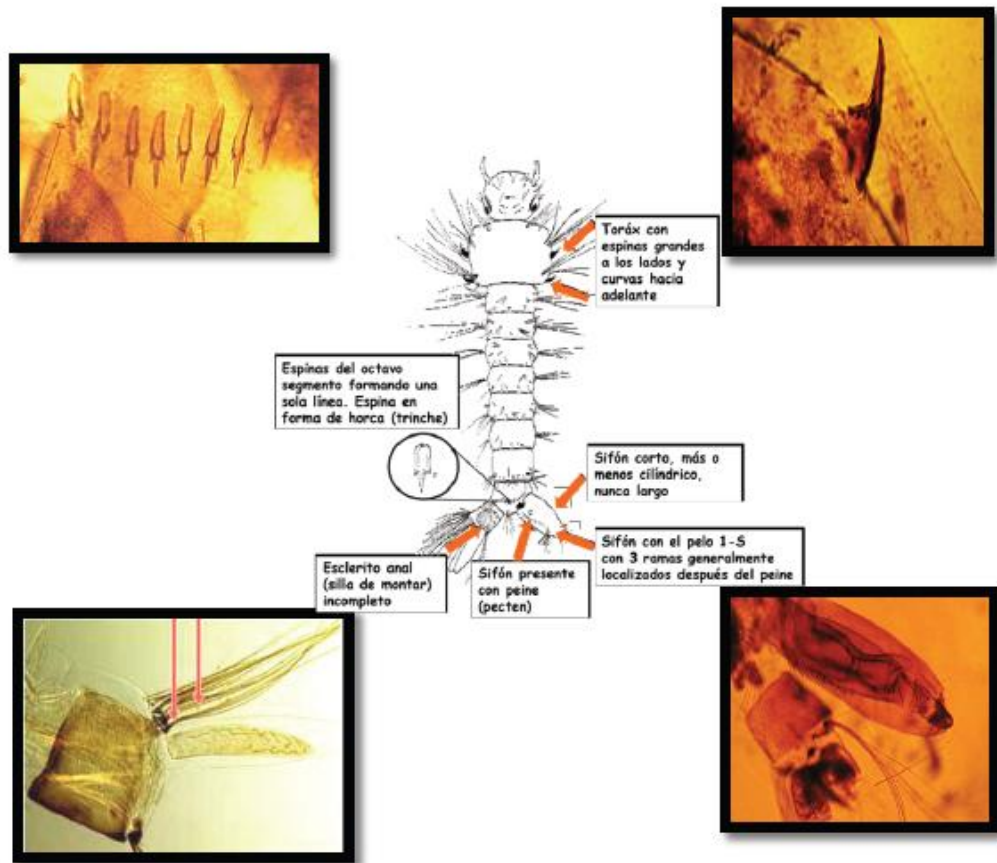


Figura 3. Taxonomía de identificación para larvas en los estadios III y IV (SSA, 2015).

2.1.3 Pupas

Las pupas de los mosquitos *Aedes aegypti* son activas, pero no requieren alimento (Otero *et al.*, 2006). Por lo general se encuentran en la superficie del agua de los contenedores ya que toman oxígeno del ambiente mediante un par de estructuras en forma de trompetas que se encuentra en la base del tórax. Al final del abdomen tienen un par de paletas o remos los cuales les son de utilidad a la hora de desplazarse en el agua (Nelson, 1986).

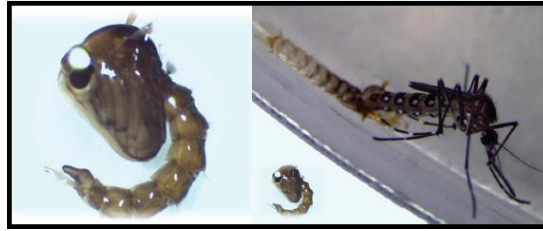


Figura 4. Pupa y emergencia de un adulto de *Aedes aegypti* (SSA 2015).

2.1.4 Adultos

En las hembras las antenas se presentan con pelos cortos y escasos mientras que en los machos sus antenas son grandes con pelos largos y abundantes de apariencia plumosa. Los palpos en las hembras son de menor longitud comparados con la proboscis y en los machos los palpos son al tamaño de la proboscis. Además, las hembras son hematófagas y sus actividades de alimentación, copulación y oviposición lo realizan en entornos humanos mientras que los machos se alimentan del néctar de las plantas que pueden encontrar a su alrededor, pero se encuentran cerca de las hembras para poder realizar su actividad de apareamiento (CENAPRESE, 2014). Su radio de vuelo indica que las hembras pueden pasar su vida en el interior y alrededor de las casas donde se criaron y se convirtieron en mosquitos adultos y suelen volar alrededor de unos 400 metros (OMS, 2019). Aunque hay estudios que indican que las hembras de *Aedes aegypti* pueden volar hasta 3 km. Si no encuentran un lugar para la ovipostura.

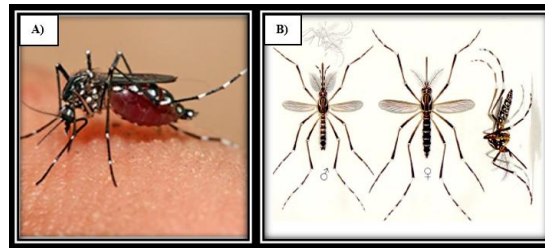


Figura 5. A. Hembra de *Ae. aegypti* alimentándose, (CENAPRESE, 2016). y B. Macho y hembra de *Ae. aegypti* (CENAPRESE, 2014).

2.2 Distribución geográfica

Se han ubicado mosquitos de *Aedes aegypti* en Argentina, Australia, Brasil, Camboya, Camerún, Colombia, Costa de Marfil, Cuba, Estados Unidos, Filipinas, Gabón, India, Indonesia, Kenia, Madagascar, Malasia, Mayotte, México, Nigeria, Perú, Puerto Rico, Tanzania, Senegal, Sierra Leona, Singapur, Taiwán, Tailandia, Trinidad y Tobago, Vietnam y Venezuela (Duane, 1998; Kramer, 2015).

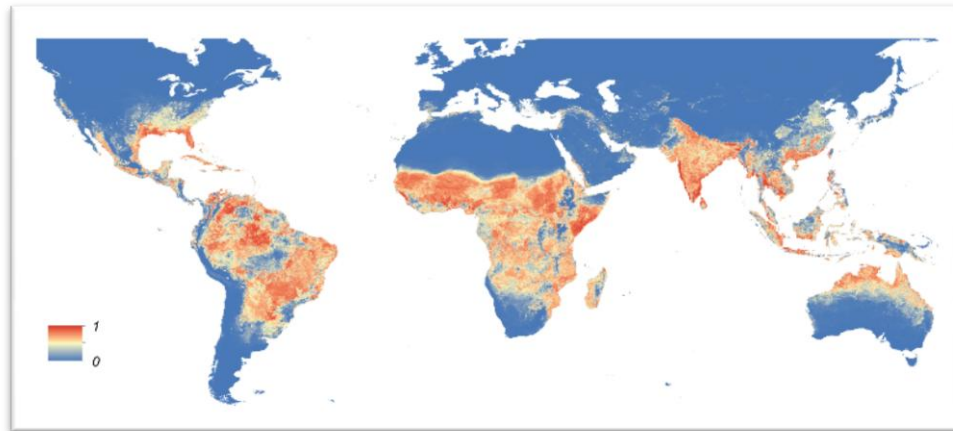


Figura 6. 1 (Rojo) Países donde se han localizado ejemplares de *Aedes aegypti*, 0 (Azul) Países donde las poblaciones de *Aedes aegypti* no han colonizado (Kramer, 2015).

2.3 Clasificación taxonómica

La clasificación dentro de la taxonomía de *Aedes aegypti* (Matthews, 2019).

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Culicidae

Género: *Aedes*

Subgénero: *Stegomyia*

Especie: *Aegypti*

2.4 Métodos de control para *Aedes aegypti*

Aunque solo las hembras adultas de *Ae. aegypti* son las transmisoras de diversos virus, la vigilancia entomológica se ha basado en la reducción de los índices larvales, ya que su control es más efectivo en esta etapa, al solo encontrarse en recipientes con agua y no dispersarse más allá como lo hacen los mosquitos adultos, que gracia a su vuelo es más difícil mantener un control sobre estos (Sánchez, 2006). A continuación, se presentan algunos métodos para el control de larvas y mosquitos de *Ae. aegypti*.

2.4.1 Control Químico

Cuando existen casos de enfermedades transmitidas por los mosquitos vectores, se hacen aplicaciones de insecticidas químicos para la fase adulta ya que se utiliza para obtener una reducción rápida de las poblaciones de insectos infectados (Bisset, 2002). Desde su descubrimiento, los plaguicidas químicos han sido el método mas empleado para el control de mosquitos transmisores de enfermedades (Bourguet *et al.*, 2000; Bouvier *et al.*, 2001). Aunque hay numerosos productos químicos efectivos que se usan como insecticidas (Sha-llan *et al.* 2005) o larvicidas estos suelen ser tóxicos para los pájaros, peces e invertebrados acuáticos (Rose, 2001). Además, Scholte y colaboradores mencionan que el uso de productos químicos genera una resistencia en los insectos blanco.

- Adulticidas

Los adulticidas químicos tienen por objeto reducir la densidad y tiempo de vida de los mosquitos. Los tratamientos deben ser de efecto residual o como tratamiento de espacios. Se deben aplicar junto a larvicidas para obtener óptimos resultados y disminuir las poblaciones de mosquitos lo más posible y por más tiempo (OMS, 2019). Los insecticidas químicos más utilizados son, Clorpirifós, Deltametrina, Etofenprox, Fentión, Malatión, Naled, Permetrina, Praletrina, Piretrina, Resmetrina y Sumitrina por lo que comúnmente se realizan bioensayos para observar el efecto de resistencia que los mosquitos desarrollan hacia estos productos (CDC, 2017).

- Larvicidas

La Secretaria de Salud en México maneja la NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Donde nos explica como debe de realizarse el uso de larvicidas químicos en toda la entidad. Para ello menciona que el control más adecuado contra las larvas se debe realizar con temefos a la dosis de una parte por millón. Los cuales cuentan con tres presentaciones: líquidos al 50%, cápsulas al 5% y granos de arena al 1%. El uso de temefos se debe realizar en criaderos positivos es decir en recipientes que contienen agua y se han visto larvas, evitando su uso en recipientes negativos o donde no se han localizado larvas. Menciona además que ante la presencia de situaciones de emergencia como es el caso de los desastres naturales debe aplicarse el producto larvicida con un rociado espacial a VUR varias veces en periodos menores a tres semanas (NOM-032-SSA2-2002).

2.4.2 Control Genético

El control genético está basado en la reducción de huevecillos fecundados, esto mediante la quimio-esterilización de machos y la competencia de estos contra los individuos silvestres no tratados, por el apareamiento y la fecundación de las hembras. Ya que las hembras al aparearse con un macho tratado quedan imposibilitadas para el apareamiento y la fecundación de un macho silvestre (Wise de Valdez *et al.*, 2011).

2.4.3 Control Cultural

Los principales factores que regulan los niveles de poblaciones de *Ae. aegypti* en las zonas urbanas son las condiciones del clima en él área y la disponibilidad de recipientes con agua que sirven como criaderos para larvas (Rodhain y Rosen, 1997). Por lo que los programas de control para vectores se basan en la reducción y eliminación de los hábitats larvales y los lugares de oviposición de mosquitos en los entornos domésticos esto con la participación de la comunidad en general (Costa *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2006).

2.4.4 Control Biológico

Se basa en la utilización de los enemigos naturales, como entomopatógenos, depredadores o parasitoides de una especie en particular. Para el control de carácter biológico del género *Aedes* en las dos fases de su ciclo de vida se han estudiado; insectos, bacterias, virus, hongos, nematodos, protozoarios e incluso peces (Service, 1986). Además de esto también se han llevado a estudio extractos de plantas y aceites esenciales sobre Adultos y larvas de los mosquitos (Enan, 2001; Lucia, 2007).

Los hongos entomopatógenos son de gran importancia dentro del control biológico de insectos considerados plagas y vectores de enfermedades, en su mayoría los insectos son

susceptibles a estos hongos, los cuales les pueden causar enfermedad (García, 2011). Van Der Geest y colaboradores mencionan que, debido al evidente crecimiento macroscópico de los hongos en la superficie de los huéspedes, estos fueron los primeros microorganismos en ser observados causando enfermedad en insectos. Los hongos entomopatógenos se encuentran comúnmente en la naturaleza como simbioses en las plantas y pueden actuar como saprofitos en la rizosfera (Vieira, 2014), por lo que son una opción óptima para evitar el uso del control químico. Los residuos de estos hongos no afectan a las plantas, animales ni al medio ambiente en general (Sevim *et al.*, 2012). Su estudio comenzó a inicios de 1800, después de que Angostino Bass demostrara que un hongo era el causante de la enfermedad muscardina del gusano de seda y por lo cual el hongo después se conoció como *Beauveria bassana*, tiempo después en Rusia fue descubierto el hongo *Metarhizium anisopliae* (Vega *et al.*, 2009), por Metchnikoff el cual causaba la enfermedad de la muscardina verde y por lo tanto lo sugirió como agente biológico para el control de insectos (Ojeda *et al.*, 2011). Desde entonces estos hongos han sido objeto de muchos estudios ya que actúan sobre los insectos en general durante alguna etapa de su ciclo de vida (Vega *et al.*, 2009). Hoy se sabe que, alrededor de doscientas especies de insectos, en aproximadamente nueve órdenes son susceptibles a los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, estos se pueden aislar del suelo y de casi todos los cadáveres de insectos con los que tuvieron contacto (Maurer *et al.* 1997; Zimmermann, 1993). Incluso se han estudiado estos hongos en ejemplares que viven en ambientes acuáticos como en el caso de las larvas del mosquito *Anopheles* y sobre los cuales se han tenido muy buenos resultados (Bukhari *et al.*, 2011). Este hongo puede actuar mediante la ingesta por parte del individuo o por contacto, cuando las conidias de estos microorganismos se ponen sobre la cutícula de los insectos forman un apresorio y secretan quitinasa y proteasas que junto con la presión del tubo germinal provocan la perforación de la estructura de la cutícula lo que le permite al microorganismo introducirse en el cuerpo del insecto. En el hemocele el micelio crece formando cuerpos hifales (Fig. 7). La acción de las toxinas de los hongos como destruxinas, swainsonina y citocalasina C, provocan degeneración del tejido por pérdida de la estructura de las membranas y deshidratación de las células, lo que provoca la muerte de los insectos (Pucheta *et al.*, 2006).

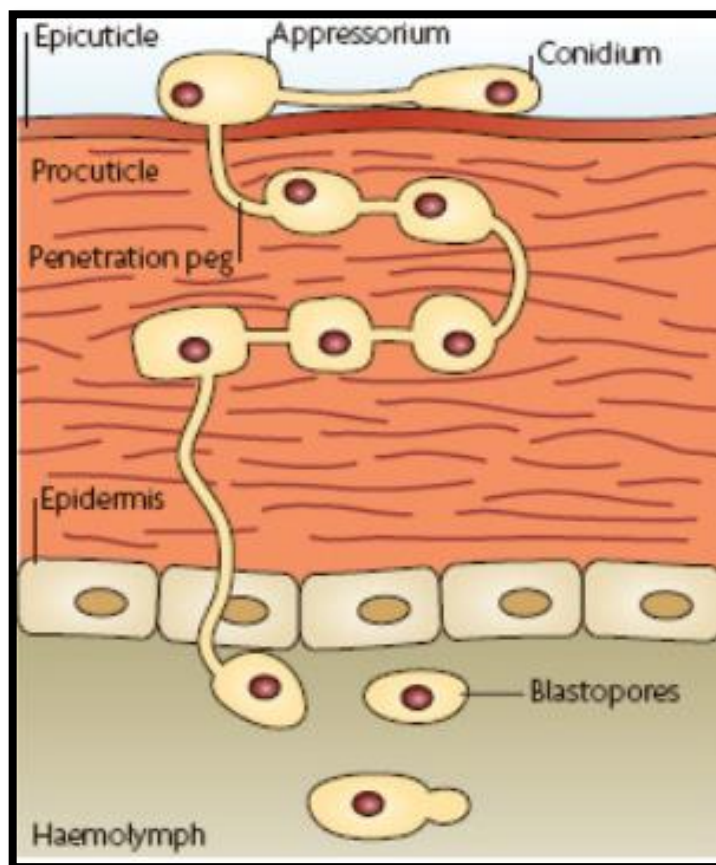


Figura 7. Proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos sobre los insectos; la imagen muestra como las conidias aéreas que se adhieren a la cutícula de los insectos y pasan al interior de su estructura anatómica. Thomas y Read, 2007.

Cuando los insectos mueren, las hifas se desarrollan en el cadáver y al momento de que el hongo esporula, las conidias se dispersan por medio del aire y la lluvia (Goettel, 2000), lo que hace que otros insectos se puedan infectar. Debido al alto rango de hospederos los hongos entomopatógenos son óptimos para usarse en el campo (Roy y Peli, 2002). La efectividad de un entomopatógeno se puede medir mediante la virulencia que presenta y por la rapidez de la germinación y esporulación en los individuos que murieron a causa de estos microorganismos (Butt y Goettel, 2000). La esporulación y germinación de conidias de estos hongos depende en gran medida de las condiciones de humedad y temperatura (Pucheta, et al., 2006). Keller (1989) Menciona que para muchos hongos la temperatura óptima para su desarrollo va de 20 a 25°C, con un máximo de hasta 35°C y un mínimo entre 5 y 10°C. Estas diferentes temperaturas van relacionadas con el número de hospederos que pueden infectar y la rapidez con la que estos pueden desarrollar la enfermedad. La temperatura óptima para el desarrollo de *Beauveria bassiana* es de 25°C (Hallsworth y Magan, 1999). Mientras que según Fernández (2005), para *Metarhizium anisopliae* la temperatura optima va de los 25 a los 30°C.

Estos hongos entomopatógenos se pueden formular mediante la mezcla de sus conidias como ingredientes activos y materiales inertes los cuales ayudan a evitar la sedimentación y la formación de grumos del hongo lo cual puede dificultar su aplicación (Careño, 2003). El uso de estos hongos de manera comercial ha aumentado en países como Brasil, China, México entre otros (Schrank, A., & Vainstein, M., 2010).

III- MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de experimentación

La experimentación en laboratorio del presente trabajo se realizó dentro del departamento de parasitología agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro que se encuentra ubicada en la ciudad de Saltillo Coahuila, donde se colocó un criadero de mosquitos *Aedes aegypti* para la obtención de sus larvas en los cuatro estadios y se realizaron siembras de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

La experimentación de semi campo se realizó en una vivienda particular al norte de la ciudad de Saltillo Coahuila.

PARTE 1. Elección de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* que se usaron contra larvas de *Aedes aegypti* en laboratorio y semi campo

Se seleccionaron al azar 3 cepas de *Beauveria bassiana* y 3 de *Metarhizium anisopliae* de un grupo de cepas proporcionadas por el Dr. Sergio René Sánchez Peña y las cuales pertenecen a su cepario de trabajo, estos hongos fueron aislados de los campos de cultivos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro a finales de año 2016, y están clasificadas como *Beauveria bassiana* #201, #207 y #302, así como *Metarhizium anisopliae* #338, #441 y #457. Cada cepa fue inoculada con un asa bacteriológica estéril en 5 cajas Petri que contenían agar papa dextrosa y extracto de levadura en polvo al 1%. Las cajas con los hongos se dejaron incubar por 20 días a temperatura ambiente y con luz natural difusa.

1 a. Recolección de larvas *Aedes aegypti* para el análisis de elección de cepas de los hongos entomopatógenos

En agosto del 2017 se colocaron recipientes plásticos de diferentes tamaños con agua purificada más 0.5 gr. de alimento para peces en el balcón de una vivienda particular ubicada en la zona centro de saltillo Coahuila. De donde después de 10 días pudimos recolectar larvas de mosquitos, las cuales fueron llevadas al laboratorio e identificadas por medio de quetotaxia larval como *Aedes aegypti* según Ibañez, S. y Martínez, C. (1994) de donde se seleccionaron solamente las que se encontraban en el estadio III.



Figura 8. Larvas recolectadas de una vivienda particular de la zona centro de la ciudad de Saltillo Coahuila.

1 b. Evaluación de cepas de los hongos entomopatógenos para su elección

Se colocaron 10 larvas del estadio III de *Aedes aegypti*, para la observación del efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre ellas (Alcalde *et al.*, 2014, esto en 5 repeticiones para la evaluación de cada cepa de *Beauveria bassiana* #201, #207 y 302, y 5 repeticiones para *Metarhizium anisopliae* #338, #441 y #457 respectivamente. Las repeticiones se colocaron en contenedores plásticos de 50ml con agua destilada, en cada contenedor se espolvorearon 10mg. de polvo conidial de los hongos a evaluar más 10 mg. de alimento para peces (SSA, 2015). A los testigos solo se les colocaron 10 mg. de alimento para peces por repetición.

Se realizaron observaciones cada 24 horas por 10 días.

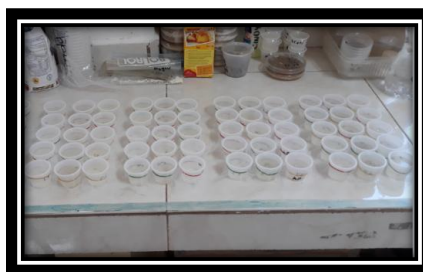


Figura 9. Evaluación de tres cepas de *Beauveria bassiana* y tres cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas del estadio III de *Aedes aegypti* más sus respectivos testigos.

PARTE 2. Evaluacion del efecto biocida de tres concentraciones de los hongos *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* sobre los cuatro estadios larvales de *Aedes aegypti*

2 a. Establecimiento de un criadero de *Aedes aegypti* para la obtención de larvas en sus cuatro estadios

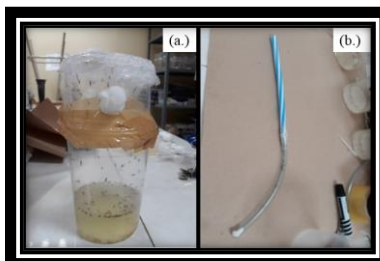
En mayo del 2018 se recolectaron larvas y huevecillos de 50 ovitrampas que se colocaron en 4 puntos de la ciudad de Saltillo, 20 de las cuales estaban en el parque ecológico el Chapulín y 30 en 3 viviendas particulares ubicadas al norte, centro y sur de la ciudad. Estas ovitrampas estuvieron conformadas por botes plástico de 1 litro de capacidad, forradas por dentro con pellón blanco y por fuera con papel cartoncillo negro, a cada una de estas se le adicionaron 500 ml de agua purificada en donde se esparcieron 100 mg. de alimento para pez y se observaron por 3 semana cada 2 días agregando agua para contrarrestar la perdida por la evaporación. Los huevecillos y larvas que se pudieron recolectar aquí se llevaron al departamento de parasitología agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, manipulándose según la GUÍA PARA LA INSTALACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL INSECTARIO DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) de la secretaria de salud (SSA, 2015), Las larvas se identificaron mediante un microscopio estereoscópico por quetotaxia larval según Ibañez, S. y Martinez, C. (1994), descartando las larvas de otras especies.



Figura 10. Ovitrampas colocadas en la ciudad de Saltillo Coahuila.

Las pupas de las larvas que se identificaron como *Aedes aegypti* se fueron colocando en jaulas conformadas con dos recipientes plásticos (**Fig. 11**), esto para tener dos niveles y mantener a las pupas en el agua y a los adultos recién emergidos en la parte superior

para su mejor manipulación, los recipientes plásticos fueron sellados y unidos con cinta adhesiva y se les colocó una malla en la parte superior que permitió una ventilación y la alimentación de los adultos. Los adultos de *Aedes aegypti* que emergieron se pasaron por medio de un aspirador manual a una jaula de madera con medidas de 50cm x 50cm cubierta con malla y un lateral de cristal, en esta se colocaron 100 mosquitos machos y



100 hembras.

Figura 11. (a.) Jaula de dos niveles para pupas y emergencia de los mosquitos adultos; (b.) Aspirador manual con maya entre el popote plástico y la maguera para la permanencia de los adultos en la parte transparente a la hora de pasarlos a jaulas.

Los machos se alimentaron mediante una solución de sacarosa al 10% la cual se colocó en torundas de algodón sobre la jaula, mientras que las hembras recibieron alimentación sanguínea tres días a la semana, colocando una rata egipcia dentro de la jaula por 20 minutos diarios, dejando a las hembras cuatro días a la semana sin alimentación, en tres de los cuales se colocaron dos ovitrampas dentro de la jaula. Este procedimiento de alimentación y oviposición se repitió cuatro veces. La recolección, identificación, crianza de larvas y adultos para la oviposición y obtención de una generación F1 en laboratorio se repitió dos veces más los meses de junio y julio del mismo año, los huevecillos obtenidos en esta práctica se dividieron en cuatro grupos y se colocaron en diversos recipientes que contenían agua destilada a 30°C con 24 horas de diferencia para obtener larvas de diferentes estadios, la alimentación de esta generación F1 se manejó según SSA, 2015.

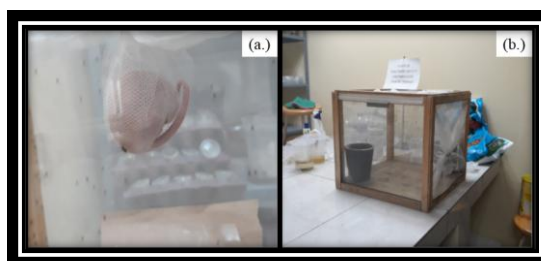


Figura 12. (a.) Alimentación sanguínea de las hembras *Ae. aegypti* por medio de una rata egipcia; (b.) ovitrampa dentro de jaula de mosquitos adultos, que se instaló dentro del departamento de parasitología UAAAN.

2 b. Elección del excipiente para el preparado conidial en polvo

Para poder realizar el conteo de esporas de los hongos entomopatógenos se buscó un producto en polvo que a su vez sirviera como alimento para las larvas. Se realizó el análisis de tres productos; Harina de trigo, Harina de arroz y fécula de maíz. Se utilizaron cinco repeticiones con siete larvas para cada estadio, colocándolas en recipientes plásticos de 50 ml. con agua destilada, a cada recipiente se le adicionaron 24.70 mg de cada producto por separado que es lo que corresponde al peso de materia orgánica con el que se alimentan las larvas de *Aedes aegypti* toda su vida (SSA, 2015). Se realizaron observaciones cada 24 horas por 10 días.

2 c. Preparación del polvo conidial de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Se preparo caldo papa-frijol al 5% para la inoculación y desarrollo de los entomopatógenos, esto hirviendo 200gr de papa en 900 ml de agua purificada para obtener un caldo el cual fue colado, a este caldo se le adicionaron 5 gr. de extracto de levadura, 20 gr de dextrosa, 50 ml de caldo de frijol y se aforo a 1 litro con agua purificada, esto se dividió en cuatro matraces de 250 ml posteriormente se esterilizaron. Una vez hecho lo anterior el caldo que contenían los matraces fue inoculado por medio de un asa bacteriológica, dos de los matraces con la cepa de *Beauveria bassiana* y los otros dos con *Metarhizium anisopliae* que se eligieron en la PARTE 1, estos matraces se colocaron en un shaker a 150 revoluciones por minuto a temperatura ambiente y con luz difusa durante tres días. El caldo preparado se sembró por extensión de vaciado en 80 cajas Petri que contenían agar PDA más levadura al 1%, 40 de estas cajas con *B. bassiana* y las otras 40 con *M. anisopliae*. Las cajas se sellaron y se incubaron por 17 días a temperatura ambiente, con luz natural difusa, al 18° día se retiró el sello de las cajas y por cuatro días se conservaron sin sello, esto para permitir el secado del agar y obtener conidias de consistencia polvosa.

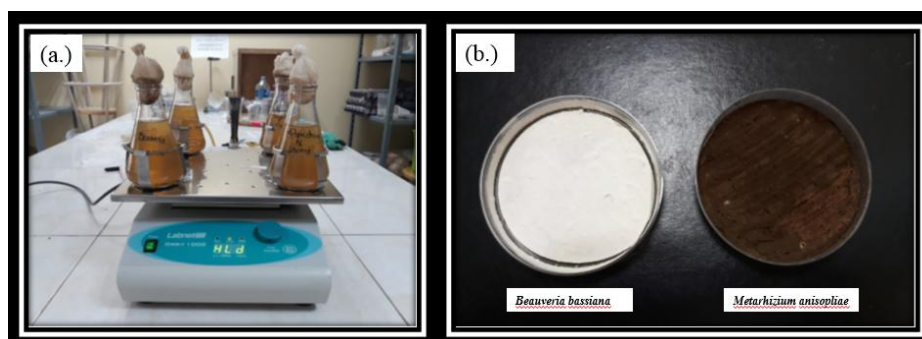


Figura 13. (a.) Caldo papa-frijol inoculado con los hongos entomopatógenos; (b.) hongos entomopatógenos sembrados por extensión de vaciado del caldo inoculado con 21 días de crecimiento.

A los 21 días de la siembra de los hongos, se recolecto el polvo que se formó sobre el PDA de las cajas Petri, esto por medio de raspado. El polvo que se obtuvo de cada hongo se pesó y se tomó como $\frac{1}{4}$ del peso de la concentración 1 y se mezcló con el excipiente seleccionado anteriormente añadiendo de este tres veces lo que peso cada hongo y se mezcló bien. Se tomo 1 gr. del polvo de las concentraciones 1 de cada hongo y se preparó una solución con BIONEX para cada concentración, posteriormente se realizaron 5 diluciones de cada solución para poder realizar el conteo de esporas por medio de una cámara de Neubauer® (CATIE, s.f.) Después de esto se obtuvo una concentración menor para cada hongo, tomando por separado 0.1gr. de la concentración inicial y adicionándole 0.9gr del excipiente para obtener una concentración 2 y para obtener la concentración 3 se volvieron a tomar 0.1gr. de las concentraciones 2 y se añadieron 0.9 gr. del excipiente (tanto la preparación del caldo de papa-frijol como las porciones para preparación de las concentraciones fueron recomendadas por Sánchez-Peña, S. R. Comunicación personal).

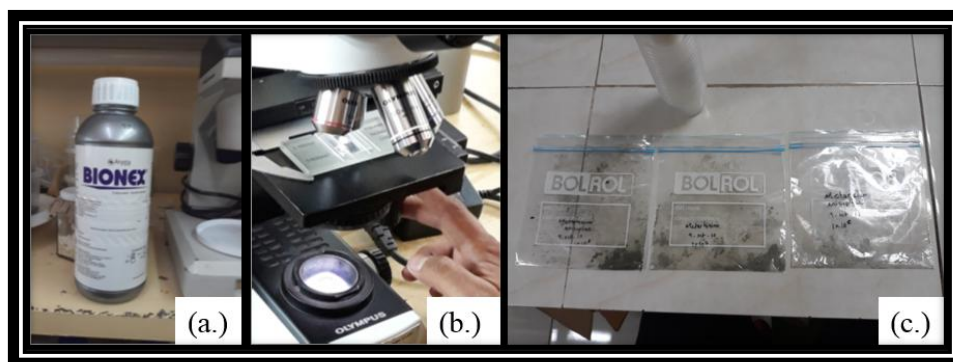


Figura 14. (a.) BIONEX; coadyuvante con poder dispersante; (b.) Conteo de conidias mediante una cámara de Neubauer; (c.) Preparación de tres diferentes concentraciones de *Metarhizium aisopliae*.

2 d. Evaluación de polvo conidial de *Beauveria bassiana* en tres concentraciones sobre larvas I, II, III y IV de *Aedes aegypti*

Se realizaron 3 tratamientos de 10 repeticiones con 25 larvas, para cada uno de los cuatro estadios larvales en 100 ml. de agua destilada. A cada repetición se le adicionaron 88mg. del preparado en polvo según el tratamiento dado de cada una de las tres concentraciones. Se observo y se registró la mortalidad larval cada 24 horas por 10 días.

En los testigos se colocaron 25 larvas en 9 repeticiones para cada estadio, a cada una se les agregaron 88 mg. de maicena, y estuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y húmeda que los tratamientos. Se observaron a la par de los tres tratamientos anteriores.

Las larvas que presentaron mortalidad fueron recolectadas y sumergidas en hipoclorito de sodio al 0.5 % para evitar el crecimiento de bacterias o hifas y esporas de hongos oportunistas con los que pudieron haber tenido contacto antes o después de su mortalidad, disminuyendo el tiempo de sumersión que utilizaron Alcalde y cols. en el 2014, a 1 minuto para no dañar las larvas, posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada estéril 2 veces. Para facilitar su observación en el microscopio estereoscópico y microscopio eléctrico, las larvas se colocaron sobre portaobjetos dentro de cámaras húmedas, las cuales se elaboraron con cajas Petri que contenían algodones empapados de agua destilada estéril, el exceso de agua en las larvas de los porta objetos fue retirado con la punta de un hisopo estéril, estas cajas se sellaron para mantener la humedad y se dejaron a temperatura ambiente con luz natural, se examinaron diariamente hasta la aparición de hifas y esporas con lo cual se confirmó la muerte de las larvas por el efecto de *B. bassiana*.

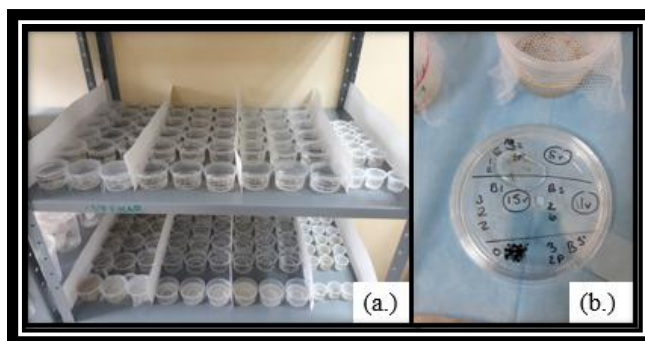


Figura 15. (a.) Evaluación de tres concentraciones del polvo conidial de *Beauveria bassiana* sobre larvas I, II, III y IV de *Ae. aegypti*; (b.) Preparación de cámaras húmedas para la confirmación de la mortalidad por *B. bassiana*.

2 e. Evaluación de *Metarhizium anisopliae* en tres concentraciones de un formulado en polvo sobre los cuatro estadios larvales de *Aedes aegypti*

En esta parte se probaron tres concentraciones de un preparado en polvo conidial donde se colocaron 10 repeticiones para cada uno de los estadios larvales con 25 individuos en 100 ml de agua destilada estéril, a cada repetición del primer tratamiento se le adicionaron 88mg. del preparado en polvo de la concentración 1 y se repitió lo mismo

para los otros dos tratamientos con las otras dos concentraciones. Se observó y se registró la mortalidad de las larvas cada 24 horas por 10 días.

Se colocaron 9 repeticiones de testigos con 25 larvas cada una para cada estadio larval, en cada repetición se agregaron 88 mg. del excipiente con el que se preparó el polvo de las tres concentraciones de conidias y se mantuvieron bajo las mismas condiciones que las larvas analizadas en los tratamientos.

Para confirmar la muerte de las larvas por efectos de *Metarhizium anisopliae*, estas se separaron de las larvas vivas y fueron sumergidas en hipoclorito al 0.5 % por 1 minuto para evitar el crecimiento de microorganismos oportunistas y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en porta objetos y se les retiró el exceso de agua con la punta de un hisopo estéril, los porta objetos con las larvas fueron colocados dentro de cámaras húmedas conformadas con cajas Petri y algodones humedecidos con agua destilada estéril, las cámaras húmedas se sellaron con film transparente y fueron observadas cada 24 horas hasta la aparición de hifas y esporas de *M. anisopliae*.

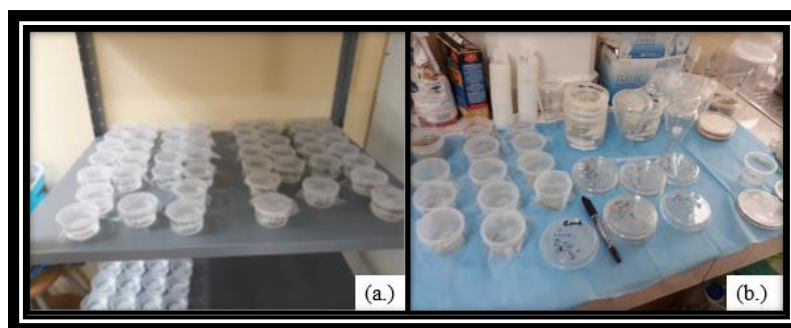


Figura 16. (a.) Evaluación de polvo conidial de *Metarhizium anisopliae* en tres concentraciones sobre los cuatro estadios larvales de *Ae. aegypti*; (b.) Preparación de cámaras húmedas para el análisis de larvas con mortalidad.

PARATE 3. Evaluación del efecto biocida de *Beauverria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* en semi campo

Para esta evaluación en semi campo se utilizó la concentración de conidias de cada hongo entomopatógeno con la que se obtuvo la mayor mortalidad en la PARTE 2.

3 a. Recolección de larvas *Aedes aegypti*

Se trabajó con larvas de *Aedes aegypti* que se recolectaron mediante ovitrampas y criaderos naturales de las zonas norte y centro de la ciudad de Saltillo Coahuila en el año 2018 el mes de septiembre, que es cuando precisamente estos dípteros encuentran las condiciones propicias para su proliferación porque es el final de la temporada de lluvias en la ciudad. Las larvas se identificaron por medio de quetotaxia larval según Ibañez, S. y Martínez, C. (1994) en laboratorio.

3 b. Análisis de semi campo

Este análisis se realizó en el patio de una vivienda particular ubicada al norte de la ciudad de Saltillo Coahuila. Aquí se colocaron 10 repeticiones por estadio larval con 50 larvas cada una, en recipientes que contenían 750 ml. del agua donde fueron encontradas las larvas. Estas se colocaron en recipientes plásticos forrados con papel cartoncillo negro para asemejar su hábitat.

Se añadieron a cada repetición 176 mg. del polvo preparado en la concentración que se eligió del análisis de la PARTE 2 de *Beauveria bassiana* y lo mismo se repitió para *Metarhizium anisopliae*.

Este análisis se llevó a cabo durante 10 días en donde se observó y se registró la mortalidad larval cada 24 horas después de su exposición a los hongos.



Figura 17. Evaluación del efecto biocida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en semi-campo.

3 c. Confirmación de la mortalidad de las larvas por efectos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Las larvas muertas en este bioensayo de semi campo fueron recolectadas y sumergidas en hipoclorito al 0.5 % por 1 minuto y posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada estéril 2 veces, para facilitar la observación del crecimiento de los entomopatógenos en las larvas muertas, estas se colocaron sobre portaobjetos dentro de cámaras húmedas, que se elaboraron con cajas Petri como en los bioensayos que se realizaron en laboratorio de la PARTE 2, separando a las larvas por tratamiento para evitar la contaminación de estas por los entomopatógenos utilizados. Las cajas se

sellaron y se llevaron al departamento de parasitología agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro donde se dejaron a temperatura ambiente la cual fue de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y luz natural. Las larvas de las cámaras húmedas se observaron cada 24 horas por 7 días hasta la aparición de hifas y esporas con lo cual se confirmó la muerte de las larvas por el efecto de *B. bassiana* o *M. anisopliae* según fue el análisis.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE 1. Elección de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* que se usaron contra larvas de *Aedes aegypti* En laboratorio y semi campo

Este análisis se realizó sobre larvas en estadio III de *Ae. aegypti* como lo hicieron Alcalde y colaboradores en el año 2014.

De este análisis se seleccionaron las cepas *Beauveria bassiana* #201 y de *Metarhizium anisopliae* #441 ya que con estas obtuvimos una mayor y más rápida mortalidad larval.

PARTE 2. Evaluación del efecto biocida de tres concentraciones de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre los cuatro estadios larvales de *Aedes aegypti*

2 a. Establecimiento de un criadero de *Aedes aegypti* para la obtención de larvas en sus cuatro estadios

La alimentación de mosquitos en el criadero artificial que se instaló, se basó en solución azucarada al 10% en torundas de algodón para los machos mientras que para las hembras la alimentación fue sanguínea por medio de una rata egipcia (SSA, 2015). González y colaboradores (2019), mencionan que la alimentación para las hembras de *Ae. aegypti* por medio de rata egipcia favorece la producción de huevecillos aumentando su número en comparación con la alimentación de fuente humana o de conejo de Nueva Zelanda.

El procedimiento de alimentación para las hembras y de ovipostura que se describió anteriormente en Materiales y Métodos, se repitió 4 veces obteniéndose de este primer criadero un total de 2,403 huevecillos.

La recolección, identificación y crianza de larvas y adultos de *Ae. aegypti* para la obtención de una generación F1 en laboratorio, se repitió dos veces más para obtener un total de 7,611 huevecillos.

2 b. Elección del excipiente para el preparado conidial en polvo

De este análisis se seleccionó la fécula de maíz como excipiente ya que el tamaño de las partículas de ésta facilitó la alimentación de las larvas, no se observó canibalismo entre

ellas por falta de alimento, ni mortalidad y estas siguieron su desarrollo normal en su mayoría hasta la etapa adulta dentro de los 10 días de evaluación, además pudimos observar que la alimentación con fécula de maíz actúa en las larvas retardando su desarrollo en todos los estadios de cuatro a cinco días en comparación con los testigos y las larvas alimentadas con los otros dos productos.

2 c. Preparación del polvo conidial de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

A los 21 días se recolectó el hongo en bolsas ziploc: una para *Beauveria bassiana* y otra para *Metarhizium anisopliae* previamente pesadas. Obtuvimos de *B. bassiana* 9.6 gr. del polvo de conidias y se le adicionaron 3.2 gr. de maicena que es lo que corresponde a $\frac{1}{4}$ del peso de *B. bassiana*, mientras que con *M. anisopliae* obtuvimos 11.2 gr. del polvo conidial y se le adicionaron 3.73 gr. de maicena. Se prosiguió con la preparación de una solución de cada hongo y BIONEX para el conteo de conidias una vez obtenida la solución se realizó un conteo con una cámara de Neubauer obteniendo de esto las concentraciones 1.8×10^8 conidias/gr. para *B. bassiana* y 1.3×10^8 conidias/gr. de *M. anisopliae*. Para obtener la concentración de 1.8×10^7 y 1.3×10^7 se colocó por separado en bolsas 0.8 gr. del polvo conidial de cada hongo más 7.2 gr. de maicena, de estos preparados se tomaron otros 0.8 gr. y se colocaron en otras bolsas adicionándole 7.2 gr. de maicena a cada una para obtener las concentraciones *B. bassiana* 1.8×10^6 y para *M. anisopliae* 1.3×10^6 .

2 d. Evaluación de polvo conidial de *Beauveria bassiana* en tres concentraciones sobre larvas I, II, III y IV de *Aedes aegypti*

En este análisis sé observo que la concentración de conidias con mejor efecto biocida contra las larvas de *Ae. aegypti* en los 4 estadios larvales fue *B. bassiana* 1.8×10^8 . La mortalidad más alta se observó en larvas de estadio III esto puede ser ya que los ejemplares en este estadio consumen una mayor cantidad de alimento y con esto aumenta la probabilidad del consumo de conidias de los entomopatógenos, además al aumentar su tamaño en los cambios de estadios se encuentran más expuestas a tener contacto con las conidias del hongo a la hora de nadar cerca de la superficie y sacar su sifón para respirar. La mortalidad en el estadio III es comparable con la mortalidad observada por Miranpuri y Khachatourians (1990), quienes en su análisis obtuvieron una mortalidad del 50% al octavo día con el uso de conidias de *B. bassiana*. De la misma manera es comparable con el trabajo de Pereira y colaboradores quienes en el 2009 observaron una mortalidad por encima del 50% con una concentración mayor que la usada por Miranpuri y Khachatourians.

Cuadro 1. Promedio del porcentaje acumulado de la mortalidad larval en *Aedes aegypti* estadios I, II, III y IV con el uso de *Beauveria bassiana*.

Hongo	Tratamientos	Días post inicio					
		2	4	6	8	10	
estadio larval	(esporas/gramo)						
	<i>Beauveria bassiana</i>	1.8x10 ⁶	0.4 ^a	2.8 ^{ab}	5.6 ^{ab}	10.4 ^a	14.8 ^{ab}
		1.8x10 ⁷	2.8 ^a	6.8 ^{ab}	12.4 ^a	18 ^a	22 ^b
		1.8x10 ⁸	4.8 ^a	11.6 ^a	22.4 ^a	31.2 ^a	37.2 ^{ab}
I	Testigo		0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
estadio larval	(esporas/gramo)						
	<i>Beauveria bassiana</i>	1.8x10 ⁶	2 ^a	6 ^a	12 ^a	18.8 ^b	24 ^b
		1.8x10 ⁷	3.6 ^a	10.4 ^b	19.2 ^b	27.2 ^c	32.8 ^{ab}
		1.8x10 ⁸	5.2 ^a	12.4 ^{ab}	23.6 ^{ab}	38 ^b	46 ^b
II	Testigo		0 ^a	0 ^a	0 ^b	0 ^b	
estadio larval	(esporas/gramo)						
	<i>Beauveria bassiana</i>	1.8x10 ⁶	7.6 ^a	19.2 ^a	35.6 ^{ab}	46.4 ^a	55.2 ^a
		1.8x10 ⁷	12.8 ^b	30.8 ^a	53.6 ^a	68.4 ^a	80.8 ^a
		1.8x10 ⁸	29.2 ^b	64.8 ^{ab}	84.8 ^a	95.2 ^a	100 ^a
III	Testigo		1.2 ^b	1.2 ^b	2 ^a	2 ^a	
estadio larval	(esporas/gramo)						
	<i>Beauveria bassiana</i>	1.8x10 ⁶	2.4 ^a	10 ^a	22.8 ^{bc}	34 ^a	40.8 ^{ab}
		1.8x10 ⁷	5.2 ^a	16.4 ^{ab}	33.6 ^b	52 ^b	62.4 ^{bc}
		1.8x10 ⁸	10.8 ^a	41.2 ^a	63.2 ^{ab}	75.2 ^a	84 ^a
IV	Testigo		0 ^a	0 ^b	0 ^c	0 ^b	

Las medias en columnas con la misma letra, no son diferentes significativamente (Análisis de varianza con prueba Tukey, p<0.05)

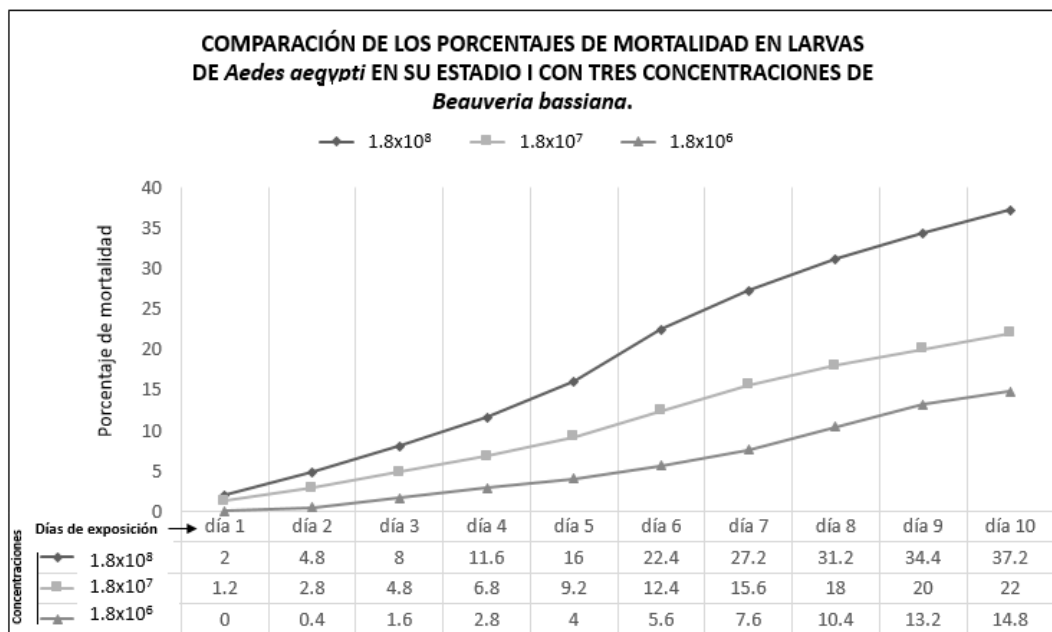


Figura 18. Los porcentajes de mortalidad para el estadio I con el uso de *Beauveria bassiana* en sus tres concentraciones fueron los más bajos no sobre pasando la mortalidad de 37.2 % que se obtuvo con la concentración más alta que es de 1.8×10^8 conidias/gr

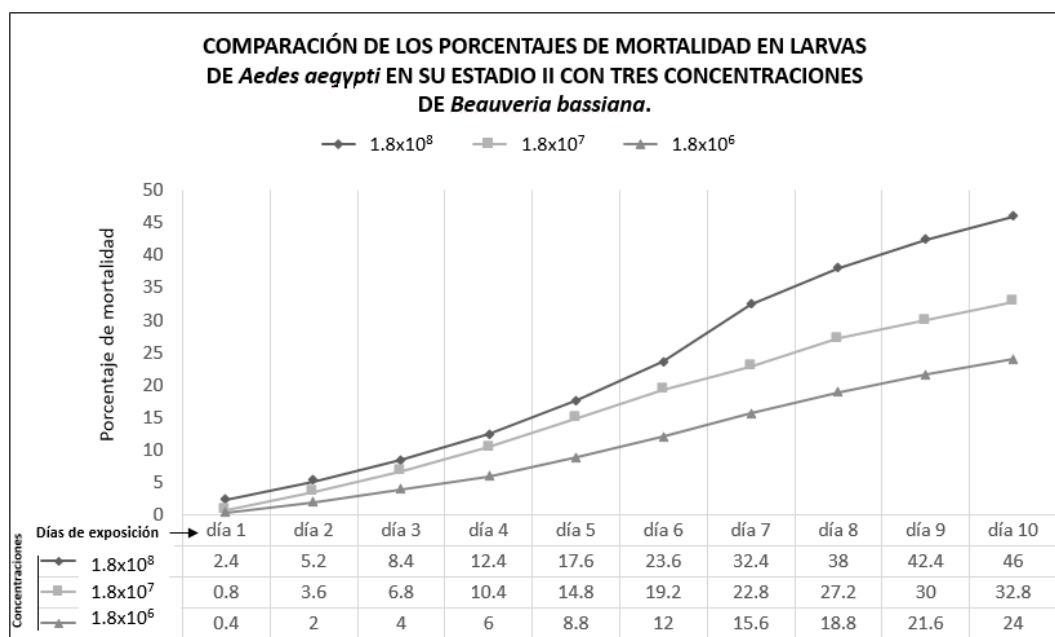


Figura 19. La diferencia entre los porcentajes de mortalidad para el estadio II con el uso de *Beauveria bassiana* se representan en esta grafica donde podemos observar que las mortalidades finales a los 10 días del análisis no sobre pasan el 46% de mortalidad que se obtuvo con la concentración 1.8×10^8 conidias/gr

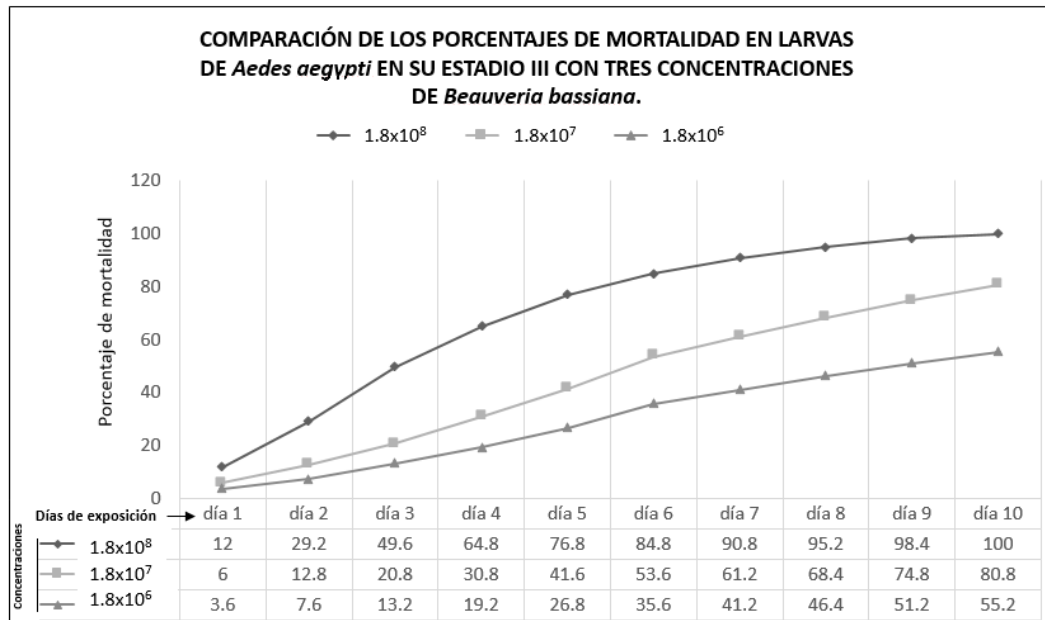


Figura 20. Porcentajes de mortalidad para el estadio III con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Beauveria bassiana*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio sobre pasan el 50% con las tres concentraciones y llegan hasta el 100% con la concentracion 1.8×10^8 conidias/gr

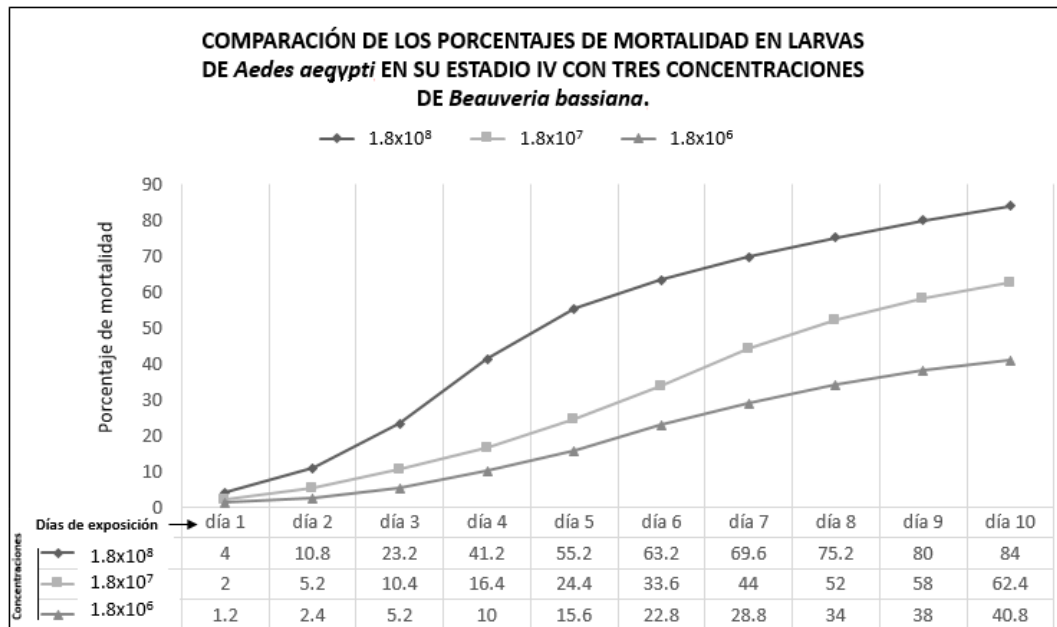


Figura 21. Porcentajes de mortalidad para el estadio III con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Beauveria bassiana*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio sobre pasan el 50% con las tres concentraciones y llegan hasta el 100% con la concentracion 1.8×10^8 conidias/gr

Las cámaras húmedas nos ayudaron en la confirmación de la muerte de las larvas por *B. Bassiana*, el crecimiento de hifas en las larvas se comenzó a observar en el microscopio eléctrico a 40x a partir de las 48 horas de la muerte larval y macroscópicamente el hongo se observó hasta el día 5 después de la muerte de las larvas, para su identificación se tomó en cuenta el color, forma de la colonia, así como las formas y color de estructuras morfológicas, esto según las claves y descripciones de Subramanian, (1971).



Figura 22. Evidencias del daño y desarrollo de *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Ae. aegypti*. **A.** Coloración típica roja por las micotoxinas oosperein de *B. bassiana*. **B.** Cámara húmeda para el desarrollo del entomopatógeno sobre larvas muerta. **C.** y **E.** Larvas con mortalidad causada por *B. bassiana*, colocadas en cámaras húmedas. **D.** y **F.** Desarrollo de *B. bassiana* sobre larvas de *Ae. aegypti* 6 días después de la mortalidad de las larvas.

2 e. Evaluación de *Metarhizium anisopliae* en tres concentraciones de un formulado en polvo sobre los cuatro estadios larvales de *Aedes aegypti*

En este análisis se observó que la concentración de conidias con mejor efecto biocida en los cuatro estadios larvales de *Ae. aegypti* fue 1.3×10^8 conidias/gr. La mortalidad más alta se registró en larvas de estadio III esto se puede deber a que las larvas en esta etapa consumen una mayor cantidad de alimento y con esto aumenta la probabilidad del consumo de conidias de los entomopatógenos. La mortalidad con este hongo fue mucho mayor y más rápida, comparada con la mortalidad obtenida por el uso de *B. bassiana*. Por lo que se puede decir que *M. anisopliae* es mejor larvicida, y esto se confirma con el trabajo de Alcalde y colaboradores (2014) quienes registraron en su estudio una mortalidad larval mayor en *Aedes aegypti* con el uso de *M. anisopliae* en comparación con su análisis de *B. bassiana* y mencionan el estudio realizado por Bukhari y colaboradores en el 2010 quienes aseguran que *M. anisopliae* posee un desarrollo

vegetativo acelerado aunque una esporulación baja, mientras que *B. bassiana* posee un crecimiento vegetativo lento con una esporulación más alta; señalando que el crecimiento vegetativo lento se puede asociar a una liberación más lenta de endotoxinas en la larva, lo que hace que disminuyan los porcentajes de mortalidad en los individuos. Aun así, la actividad patogénica de este hongo depende de la calidad infectiva de sus conidias y del tiempo de vida que tienen, es por esto que antes del análisis sobre los cuatro estadios larvales de *ae. aegypti* se realizó una elección previa de una cepa que nos diera buenos resultados, Silva y colaboradores realizaron un análisis en el año 2004 sobre larvas de mosquitos con 80 aislados de *M. anisopliae* donde obtuvieron mortalidades desde el 10 hasta el 100% a los 10 días de su estudio.

Cuadro 2. Promedio del porcentaje acumulado de la mortalidad larval en *Aedes aegypti* estadios I, II, III y IV con el uso de *Metarhizium anisopliae*.

		Días post inicio				
		2	4	6	8	10
Hongo	Tratamientos					
estadio larval	(esporas/gramo)					
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1.3×10^6	3.6 ^a	10.4 ^b	23.2 ^a	33.2 ^b	40 ^b
	1.3×10^7	6 ^{ab}	15.2 ^{ab}	28.8 ^a	46.8 ^a	60.4 ^a
	1.3×10^8	10 ^b	29.6 ^b	54 ^b	75.6 ^a	88.4 ^a
	Testigo	0 ^b	0 ^c	0 ^b	0 ^b	0 ^b
I	1.3×10^6	6.4 ^a	17.2 ^{ab}	36.4 ^a	55.2 ^{ab}	69.2 ^b
	1.3×10^7	9.2 ^{ab}	24.4 ^a	50.8 ^a	71.2 ^a	82.8 ^a
	1.3×10^8	18.8 ^b	50.8 ^b	80.8 ^a	94.8 ^a	100 ^a
	Testigo	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^a
II	1.3×10^6	12.4 ^b	36.4 ^b	68.8 ^b	84.8 ^a	92.8 ^a
	1.3×10^7	26.8 ^{ab}	58.4 ^b	83.2 ^a	100 ^a	100 ^a
	1.3×10^8	39.6 ^c	88.8 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	Testigo	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
III	1.3×10^6	8.8 ^b	25.6 ^b	50.8 ^a	70.4 ^a	85.6 ^a
	1.3×10^7	15.6 ^a	46.8 ^a	82.4 ^a	96.4 ^a	100 ^a
	1.3×10^8	21.6 ^a	60.4 ^a	89.6 ^a	100 ^a	100 ^a
	Testigo	0 ^a	0 ^{ab}	0 ^a	0 ^a	0 ^a
IV	1.3×10^6	8.8 ^b	25.6 ^b	50.8 ^a	70.4 ^a	85.6 ^a
	1.3×10^7	15.6 ^a	46.8 ^a	82.4 ^a	96.4 ^a	100 ^a
	1.3×10^8	21.6 ^a	60.4 ^a	89.6 ^a	100 ^a	100 ^a
	Testigo	0 ^a	0 ^{ab}	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Las medias en columnas con la misma letra, no son diferentes significativamente (Análisis de varianza con prueba Tukey, $p < 0.05$)

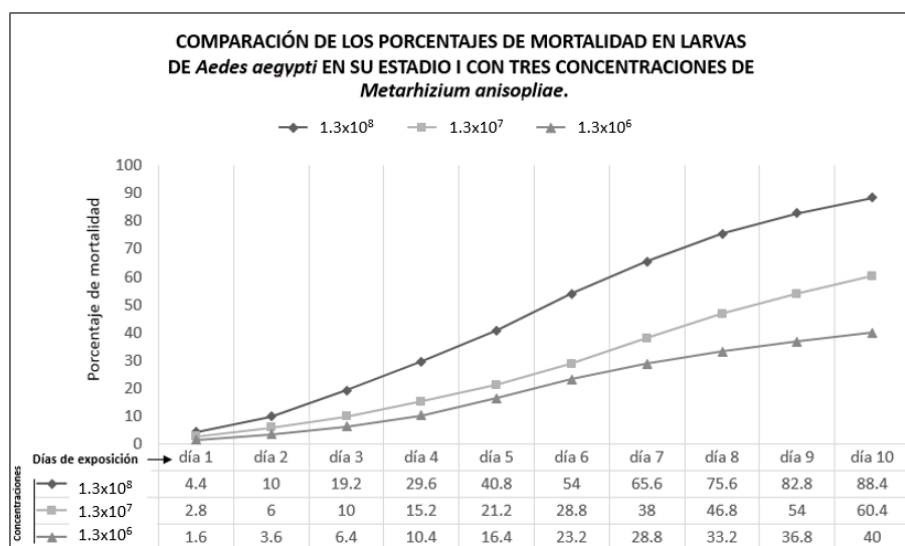


Figura 23. En esta grafica se muestran los porcentajes de mortalidad para el estadio I con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Metarhizium anisopliae*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio no alcanza el 50% con la concentración 1.3×10^6 pero está muy por encima del 50% con las concentraciones 1.3×10^7 y 1.3×10^8 conidias/gr.

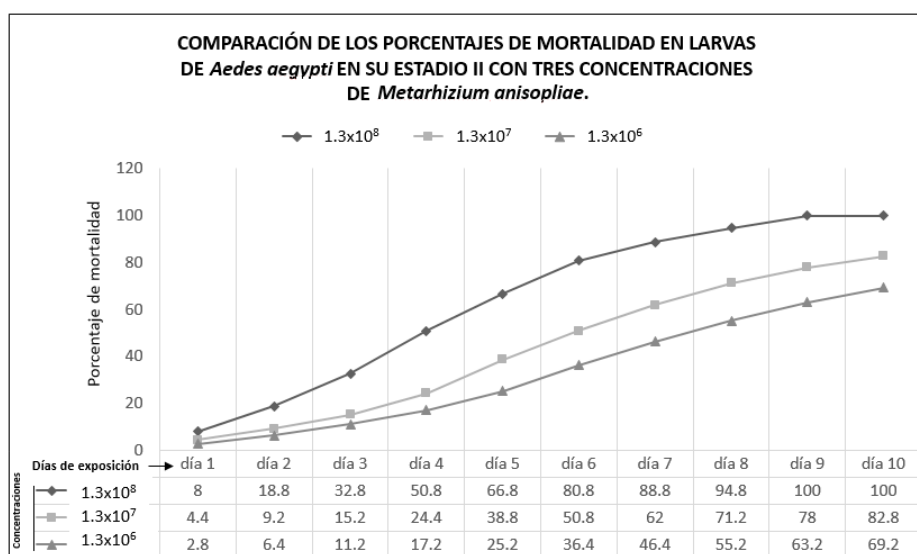


Figura 24. Porcentajes de mortalidad del estadio II de *Aedes aegypti* con el uso de tres concentraciones conidias/gr de *Metarhizium anisopliae*. Se puede observar que la mortalidad en este estadio sobre pasa el 50% con las tres concentraciones y llega al 100% con la concentración 1.3×10^8 conidias/gr desde el día nueve.

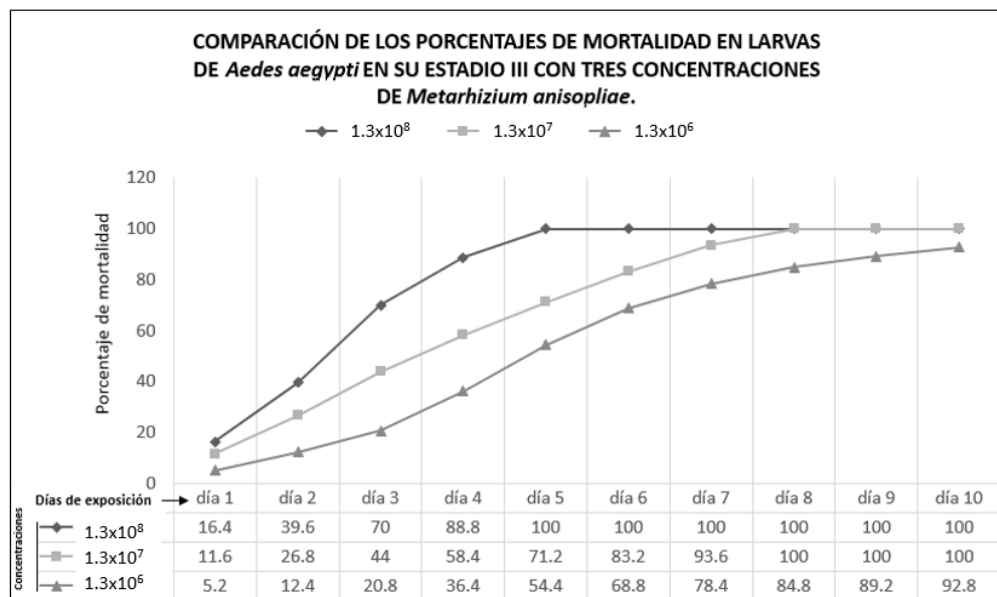


Figura 25. Porcentajes de mortalidad del estadio III de *Aedes aegypti* con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Metarhizium anisopliae*. Se puede observar que las mortalidades son las más altas comparadas con los análisis realizados en los estadios I, II y IV. Llegando al 100 % de mortalidad en la concentración 1.3×10^8 desde el quinto día y 100% con 1.3×10^7 desde el día 8, la mortalidad con la concentración 1.3×10^6 no llega al 100% pero esta por encima del 90%.

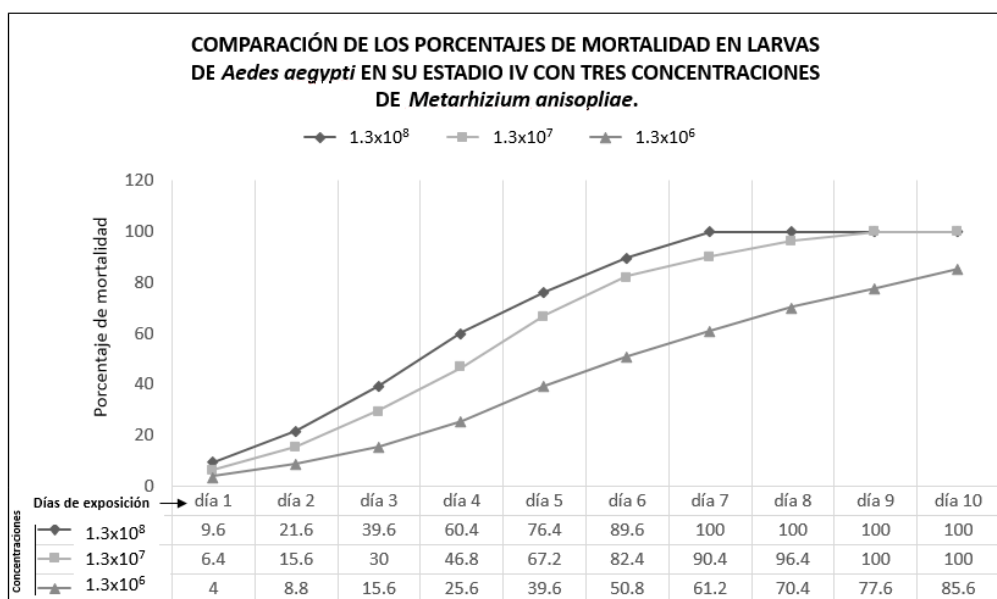


Figura 26. Los porcentajes de mortalidad del estadio IV de *Aedes aegypti* con el uso de tres concentraciones conidias/gr. de *Metarhizium anisopliae* se representan en esta gráfica y se puede observar que las mortalidades son altas llegando al 100 % con la concentración 1.3×10^8 desde el día 7 y 100% con 1.3×10^7 desde el día 9 y 85.6% de mortalidad con la concentración 1.3×10^6 .

Las larvas con mortalidad se colocaron en cámaras húmedas y se observaron cada 24 horas por 7 días con lo que se confirmó el óptimo efecto biocida de *M. anisopliae*.

En el microscopio eléctrico a 40X se apreciaron sobre los cuerpos larvales un crecimiento de hifas desde las primeras 24 horas de mortalidad y macroscópicamente el hongo se pudo observar hasta el tercer día, para la identificación de *M. anisopliae* se tomó en cuenta el color y forma de la colonia, así como formas y color de estructuras morfológicas, esto según las claves y descripciones de Subramanian, (1971).



Figura 27. Evidencias del daño y desarrollo de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ae. aegypti*. **A.** Mortalidad de larvas al tercer día de su exposición al hongo. **B.** Desarrollo de hifas de *M. anisopliae* a las 24 horas de la mortalidad de la larva, visto en el microscopio eléctrico a 40X. **D.** Larvas con mortalidad después de 24 horas de exposición al hongo. **E.** y **F.** Crecimiento de *M. anisopliae* en el aparato bucal y sifón respirador de las larvas, 2 y 3 días después de la mortalidad de los individuos. **F.** Desarrollo de 5 días del entomopatógeno *M. anisopliae* después de provocar la muerte de la larva.

PARATE 3. Evaluación del efecto biocida de *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* en semi campo

Las concentraciones 1.8×10^8 conidias/gr de *B. bassiana* y 1.3×10^8 conidias/gr. de *M. anisopliae* con las que observamos la mayor mortalidad de los cuatro estadios larvales en la PARTE 2, se sometieron a un nuevo bioensayo en condiciones de semi campo esto para comprobar su poder entomopatógeno en un ambiente más parecido a un criadero natural donde se desarrollan las larvas,

En este estudio con *B. bassiana* obtuvimos el 50 % de mortalidad en el estadio larval IV al 10° día de análisis y el 75% en el estadio III, para el estadio I solamente se presentó el 17.4% de mortalidad. Mientras que con el uso de *M. anisopliae* observamos una mortalidad del 50% en el estadio I y 100 % en el estadio III desde el séptimo día.

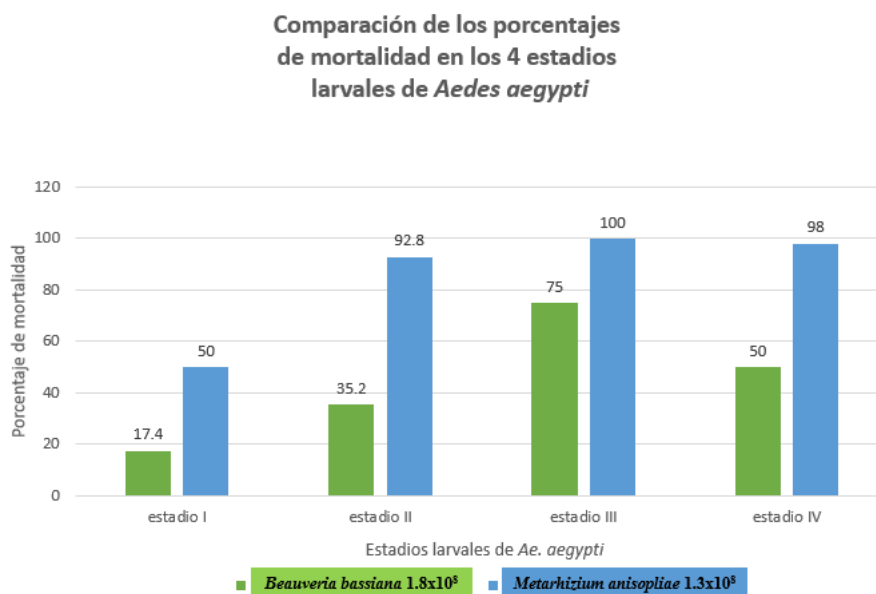


Figura 28. Representación de la diferencia entre los porcentajes de mortalidad total a los 10 días de análisis de las larvas *Aedes aegypti* en sus cuatro estadios, con el uso de *Beauveria bassiana* 1.8x10⁸ y *Metarhizium anisopliae* 1.3x10⁸

Este análisis se comparó con los testigos los cuales constaban de 10 repeticiones de 50 larvas para cada estadio, tanto las repeticiones a analizar con los entomopatógenos como los testigos se colocaron en 800 ml. del agua donde se encontraron las larvas más 200 ml. de agua destilada a cada repetición se le adicionaron 176 mg. del polvo conidial mientras que los testigos se manejaron con 176 mg. del excipiente en polvo con el que se prepararon las concentraciones. En el análisis de semi campo obtuvimos una mortalidad menor que la que observamos en laboratorio, pero aun así los porcentajes de mortalidad en esta prueba fueron altos.

Las larvas con mortalidad se colocaron en cámaras húmedas y se observaron cada 24 horas por 7 días con lo que se confirmó la mortalidad de estos culícidos por causa de los hongos aquí utilizados. Para su identificación se tomó en cuenta el color, forma de la colonia, formas y color de estructuras morfológicas, según las claves y descripciones de (Subramanian, 1971).

V- CONCLUSIONES

Beauveria bassiana y *Metarhizium anisopliae* son hongos que tienen mucha importancia en la naturaleza, ya que controlan poblaciones de insectos sin provocar en ellos resistencia, por lo que de esta manera se pueden utilizar sobre plagas que son difíciles de manejar por su tolerancia a insecticidas químicos, además de que sus residuos no representan una contaminación en el medio ambiente, ni un riesgo para la salud de seres humanos, animales o plantas con las que pudieran tener contacto y debido al alto rango de hospederos para estos hongos, es que, su aplicación puede recomendarse año con año sobre los insectos que representan un problema en la agricultura y en la salud pública.

Con este trabajo de investigación y evaluación se puede considerar que los hongos aquí analizados son efectivos en ambientes acuáticos sobre larvas de *Aedes aegypti* en sus cuatro estadios, los resultados más óptimos se obtuvieron sobre los últimos dos estadios larvales, esto se puede deber a que las larvas de mayor tamaño requieren más cantidad de alimento, por lo que la ingesta de las conidias de los hongos resulta más probable, así como también aumenta la probabilidad de que el tórax, abdomen o sifón de las larvas tenga contacto con las conidias a la hora de nadar hacia la superficie para tomar oxígeno, esto porque sus estructuras son de mayor tamaño. A través del uso de estos hongos es posible el combate contra la transmisión de virus por parte de *Aedes aegypti*, ya que, al disminuir las poblaciones de estos dípteros, disminuyen también las picaduras de estos al alimentarse y por lo tanto la probabilidad de adquirir una infección por los virus que puedan llevar consigo estos vectores también disminuyen.

Dependiendo de la especie del hongo y la concentración de la formulación, puede variar la virulencia y patogenicidad, esto se puede decir porque, aunque se obtuvieron buenos resultados con ambos hongos, fue evidente la diferencia entre los porcentajes de mortalidad obtenidos con el uso de los dos entomopatógenos en sus tres concentraciones.

Aunque en la prueba de semi campo se obtuvo una mortalidad menor que la observada en el análisis de laboratorio, estos resultados también fueron buenos y no se deben minimizar, por lo que el uso de estos hongos se puede recomendar sobre criaderos que se encuentran dentro y fuera de las viviendas humanas. Pero debido a los diferentes resultados que aquí se obtuvieron, se puede considerar que la virulencia de estos hongos varía según las condiciones del medio en que se encuentran las larvas y por esto es necesario seguir realizando investigaciones sobre el uso, formulación y efecto de estos hongos sobre larvas de *Aedes aegypti*.

VI- REFERENCIAS.

- Alcalde, J. G., Roldán, J. E., Saravia, V., & Collantes, L. (2014). The Biocidal effect of diferente concentracions of *Metarhizium anisopliae* CCB-LE302 and *Beauveria Bassiana* CCB-LE265 on larvae III of *Aedes aegypti*. *UCV Scientia*, 6 (1): pp. 37-39.
- Alves, S. B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R. M., and Vieira, S. A. (2002). *Potential of Some Metarhizium anisopliae Isolates for Control of Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae)', *Journal of Entomology*, 126: pp.504-509.
- Bisset, J. (2002). Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54 (3): pp. 202-219.
- Bourguet, D., Genissel, A. & Raymond, M. (2000). *Insecticide resistance and dominance levels*. *Journal of Economic Entomology*, 93 (6): pp.1588-1595.
- Bouvier, J. C., Bues, R., Boivin, L. B., Beslay, D. & Sauphanor, B. (2001). Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87: pp.456-462.
- Bukhari, T., Takken, W., Koenraadt, C. (2011). *Development or Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana formulations for control of malaria mosquito larvae*. *Parasites and Vectors*, BMC, 4 (23).
- Butt, T. & Goettel, M. (2000). Bioassays of entomopathogenic microbes and Bioassays of Entomogenous fungi. Editado por, Navon, A., Departament of Entomology, Agricultural Research. Estados Unidos. CABI, p.325.
- Careño, A. I. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis (Microbiología Agrícola y Veterinaria) Facultad de Ciencias Basicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C. Colombia.
- Carranza, M. C., Marquetti, M., Vásquez, A., Montes, J. L. (2010). Dinámica Estacional y Temporal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en el Municipio Cienfuegos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*; 62 (2): pp.98-106.
- CATIE, (sin fecha). Producción y usos de hongos ENTOMOPATOGENOS, Nicaragua. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiLtIGyjKviAhVCaq0KHQhtAmwQFjABegQIAhAC&url=https%3A%2F%2Ffunica.org.ni%2Findex%2Fbiblioteca%2Fresultados->

[de-investigacion%2Fcategory%2F85-Bioplaguicidas.html%3Fdownload%3D436%3AProduccion%2520y%2520uso%2520hongos&usg=AOvVaw1pGCUD_bdpI-3rsnL2rFLO](https://www.cdc.gov/zika/es/vector/insecticide-resistance.html) , 2018, mayo 21

CDC, Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2017). Resistencia a los insecticidas. Recuperado de <https://www.cdc.gov/zika/es/vector/insecticide-resistance.html>

CENAPRESE, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2014). Enfermedades transmitidas por vectores. Recuperado de <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector.html>

CENAPRESE, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2016). Enfermedades transmitidas por vectores. Recuperado de <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue.html>

Costa, F., Fattore, G., & Abril, M. (2012). *Diversity of containers and buildings infested with Aedes aegypti in Puerto Iguazú, Argentina. Cadernos de Saúde Pública*, 28(9): pp.1802–1806.

De Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera, M. P., Samuels, R. I., (2008). Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera; Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for dengue vector control. *Biocontrol Science & Technology*. 18: pp.1017-1025.

Dominguez, M. C., Ludeña, F. F. & Almirón, W. R. (2000). Dinámica poblacional *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) en Córdoba capital. *Rev. So Co Entomol. Argent.* 59 (1-4): pp.41-50.

Duane, J. G. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol. Rev.* 11 (3): pp.480- 496.

Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology & Pharmacology* 130 (3): pp.325-337

Estallo, E. L., Ludueña, F., Scavuzzo, C. M., Zaidenberg, M., Introini, M. V., & Almirón, W. R. (2011). *Oviposición diaria de Aedes aegypti en Orán, Salta, Argentina. Saúde Pública*, 45(5): pp.977–980.

Fernández, M., Elyes, Z. & García, Z. (2005). Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de garrapatas *Boophilus microplus* sensibles y resistentes a los organofosforados. *Revista Técnica Pecuaria en México*, 43 (3): pp.433-440.

- García, M. A., García, S., Leshner, J. M., y Molina, R. F., (2011, julio 14). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*. *Revista Horizonte sanitario*, 10 (2): pp.21-23.
- Goettel, M. S. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L.A. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic, San Diego CA. pp.213-248.
- González, M. I., Vázquez, M. J., Sesma, E., Falcón, J., A., González, C., Correa, F. (2019). Efecto de diferentes fuentes de alimentación sanguínea sobre *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) en condiciones de insectario. *Horizonte Sanitario*, 18 (2): pp.177-182.
- Hallsworth, J. & N. Magan, 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces Farinosus*, *J. Invertebr. Pathol* 74: pp.261-266.
- Hernández, F., & García, J. D. (2000). Aedes, Dengue y la posibilidad de un enfoque diferente de lucha. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 9(16): pp.32-38.
- Ibañez, S. Martínez, C. (1994). CLAVE PARA LA IDENTIFICACION DE LARVAS DE MOSQUITOS COMUNES EN LAS AREAS URBANAS Y SUBURBANAS DE LA REPUBLICA MEXICANA (DIPTERA: CULICIDAE). *Folia Entomol. Mex.*, 92: 43-63.
- Jansen, C. C., & Beebe, N. W. (2010). *The dengue vector Aedes aegypti: what comes next*. In *Microbes and Infection*. Australia: Elsevier: pp. 272, 273 y 276
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Paupy, C. (2011). *Insecticide susceptibility of Aedes aegypti and Aedes albopictus in Central Africa. Parasites & Vectors*, 4(1): p.79.
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho G. E., Bortel, W. V., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., Wint, G. R., Golding, N. & Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*, 4: pp.3-5.
- Keller, S. & Zimmermann, G. (1989). Mycopathogens of soil insects, pp. 240-265. En: N. Wilding, P. Collins, and P. M. Hammond (eds.) *Insects-Fungus interactions*, 14th Symposium of the Royal Entomological Society of London in collaboration with the British Mycological Society. Academic Press. San Diego.

- Lambrechts, L., Scott, T. W., & Gubler, D. J. (2010). *Consequences of the Expanding Global Distribution of Aedes albopictus for Dengue Virus Transmission*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(5), e646.
- Lucia, A., Audino, P. G., Seccacini, E., Licastro, S., Zerba, E., & Masuh, H. (2007). *Larvicidal effect of Eucalyptus grandis essential oil and turpentine and their major components on Aedes aegypti larvae*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23 (3): pp.299-303.
- Luz, C., Tai. M., Santos, A., & Silva, H. (2008). *Impact of moisture on survival of Aedes aegypti eggs and ovicidal activity of Metarhizium anisopliae under laboratory conditions*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103(2): pp.214-215.
- Marqués, G. R. A., Chaves, L. S., Serpa, L. L., Arduíno, M. de B., & Chaves, F. J. (2013). *Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de Aedes aegypti*. *Saúde Pública*. 47(3): pp.1-8.
- Matthews, B. J. (2019). *Aedes aegypti. Trends in Genetics, Genome of the Month*. Laboratory of Neurogenetics and Behavior, The Rockefeller University and Howard Hughes Medical Institute, New York, NY, USA.
- Matthews, B. J., McBride, C. S., DeGennaro, M., Despo, O., & Vosshall, L. B. (2016). *The neurotranscriptome of the Aedes aegypti mosquito*. *BMC Genomics*, 17(1): pp.1-4
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P. A., Brigde, P. D., & Ribba, G. (1997). *Genetic diversity of Beauveria bassiana and relatedness to host insect range*. *Mycological Research*, 101 (2): pp.159-164.
- MINSA. (2014) *Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a la Fiebre de Chikungunya – Perú*.
- Miranpuri, G.S. & Khachatourians, G. G. (1990). *Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of Beauveria bassiana (strain GK 2016) against age groups of Aedes Aegypti*. *Journal Veterinary Parasitology*, 37: pp. 155-162.
- Monaghan, A. J., Morin, C. W., Steinhoff, D. F., Wilhelmi, O., Hayden, M., Quattrochi, D. A., Reiskind, M., Lloyd, A. L., Smith, K., Schmidt, C. A., Scalf, P. E., Ernst, K. (2016, marzo 16). *On the Seasonal Occurrence and Abundance of the Zika Virus Vector Mosquito Aedes Aegypti in the Contiguous United States*. *PLOS Currents Outbreaks*. Edition 1
- Mora, A., Jimenez, F. & Treviño, S. M. (2010). *Distribucion geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos Aedes (Stegomyia) aegyptide Ciudad Juarez, Chihuahua, México*. *Salud Publica Méx*. 52 (2): pp.127-133.

- Morrison, A. C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T. W., & Rosenberg, R. (2008). *Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector Aedes aegypti*. *PLoS Medicine*, 5(3), e68.
- Motta, P. A., & Murcia, B. (2011, junio 06). *Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas*. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*., 6 (2): pp.78-80. 2019, enero 05, De Medline.
- Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti: Biología y Ecología*. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC. pp.50.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos.
- Ojeda, M. M., Rodríguez, R. I., Galindo, E., Ledezma, R. & Cruz, C. (2011). Control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista de Ciencias Pecuarias*. México, 2 (2): pp.177-192.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2019). Lucha contra el dengue; El mosquito. Recuperado de <https://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2019). Lucha contra el dengue; Control químico. Recuperado de https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/chemical_control/es/
- Otero, M., Solari, H. G., & Schweigmann, N. (2006). *A Stochastic Population Dynamics Model for Aedes Aegypti: Formulation and Application to a City with Temperate Climate*. *Bulletin of Mathematical Biology*, 68(8): pp.1945-1974.
- Peña, J., Navarro, M., Parra, H. J., Duque, J. E. (2016). Design and construction of a trap for the surveillance of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 48(3): pp.286-287
- Pereira, C. R., Rodríguez, A., Azevedo, S., Oliveira, P. C., & Samuels R. I. (2009) *The potential of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana isolates for the control of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) larvae*. *Biocontrol Science and Technology*. 19 (8): pp.883-886.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodriguez, S. & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31: pp.12-15.

- Rey, J. R., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. *Biomédica*, 35(2).
- Rodhain, F. & Rosen. L. (1997). Mosquito vectors and dengue virus vector relationships, En Gubler, D. J. & Kuno, G. (eds.), Dengue and dengue hemorrhagic fever. Cambridge University, U.K. pp.45-61.
- Rodríguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). *Fungal endophytes: diversity and functional roles*. *New Phytologist*. 182: pp.314-330.
- Rose, R. I. (2001). Pesticide and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (1): pp.17-23.
- Roy H. E., & Pell, R. (Sin fecha). Interactions between entomopathogenic fungi and predators In: International Colloquium on Invertebrates Pathology and Microbial Control (8: 2002/Foz do Iguacu, PR). pp.28-30.
- Salvatella, A., R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vector en las Américas. La situación de Uruguay. *Revista Médica de Uruguay 1996*; 12 (1): pp.28-36.
- Sanchez, L., Vanlerberghe, V., Alfonso, L., Marquetti, M. del C., Guzman, M. G., Bisset, J., & Stuyft, P. V. (2006). *Aedes aegypti* larval Indices and Risk for Dengue Epidemics. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (5): pp.800-802.
- Scholte, E. J., Knols, B. G., Samson, R. A. & Takken, W. (2004). *Entomopathogenic fungi for mosquito control*. *Journal Insect Science*. 4: p.19.
- Scholte, E. J., Takken, W. & Knols, B. G. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102 (3): pp.151-158.
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7): pp.1267-1274.
- Service, M. W. (1986). Blood-sucking insects: vector of diseases, *Studies in Biology*. Camelot Press. (167).

- Sevim, A., Donzelli, B. G. G., Wu, D., Demirbag, Z., Gibson, D. M., & Turgeon, B. G. (2012). Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Current Genetics* 58: pp.79-92.
- Shalan, E. A., Canyon, D., Younes, M. W., Abdel-Wahab, H. & Mansour, A. H., (2005). A review of botanical phyto_chemicals with mosquitocidal potential. *Environment Internacional* 31 (8): pp.1149-1166.
- Silva, R. O., Silva, H. H. G., & Luz, C. (2004). *EFFECT OF METARHIZIUM ANISOPLIAE ISOLATED FROM SOIL SAMPLES OF THE CENTRAL BRAZILIAN CERRADO AGAINST AEADES AEGYPTI LARVAE UNDER LABORATORY CONDITIONS*. *Tropical Pathology*, 33 (2): 209-211.
- SSA, Secretaria de Salud. (2015). Guía para instalación y mantenimiento del insectario de *Aedes aegypti* (DIPTERA CULICIDAE), México. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/documentos/guia-para-la-instalacion-y-mantenimiento-del-insectario-de-aedes-aegypti-diptera-culicidae> 2017, abril 15.
- Thangamani, S., Tesh, R. B., Guzman, H., Hart, C. E., & Huang, J. (2016). *Vertical Transmission of Zika Virus in Aedes aegypti Mosquitoes*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5): pp.1169-1173.
- Thomas, M., Read, A. (2007). Can fungal biopesticides control malaria. *Nature Reviews Microbiology*. 5(5): pp.377-382.
- Trewin, B. J., Darbro, J. M., Jansen, C. C., Schellhorn, N. A., Zalucki, M. P., Hurst, T. P., & Devine, G. J. (2017). *The elimination of the dengue vector, Aedes aegypti, from Brisbane, Australia: The role of surveillance, larval habitat removal and policy*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11: p.1.
- Urdaneta, L. & Failloux, A. B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: p.254.
- Van Der Geest, L. P. S., Elliot, S. L., Breuwer, J. A. J., & Beerling, E.A.M. (2000). Disease of mites. *Experimental and Applied Acarology* 24: pp.497-560.
- Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava, R. M., Infante, F., & Rehner, S. A. (2008) *Entomopathogenic fungal endophytes*. *Biological Control*. 46: pp.72-82.
- Vega, F. E., Gottel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzón, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D.

- E. N. & Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2: pp.149-159.
- Vieira, P., Tinti, N., & Alves, E., A., de L. (2014). Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular and ecological aspects. *Ciência Rural*, 44(4): pp.645-651.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Torre, A., & Ranson, H. (2012). *Insecticide resistance in the major dengue vectors Aedes albopictus and Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2): p.126.
- Wise de Valcez, M. R., Nimmo, D., Betz, J., Gong, H. F., James, A.A., Alphey, L. & Black, W. C. (2011). Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (12): pp.4772-4775.
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* as its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*. 37: pp.375-379.