

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (MYCOTA: DEUTEROMYCETES) AISLADOS  
EN EL NOROESTE DE MÉXICO: IMPACTO SOBRE LA LONGEVIDAD,  
FECUNDIDAD, FERTILIDAD Y TASAS DE CÓPULA E INSEMINACIÓN EN *Aedes  
aegypti* (Diptera: Culicidae)**

**Por**

**M.C. ALBERTO MARGARITO GARCÍA MUNGUÍA**

**Tesis**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

**Mayo 2011**

**HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (MYCOTA: DEUTEROMYCETES) AISLADOS  
EN EL NOROESTE DE MÉXICO: IMPACTO SOBRE LA LONGEVIDAD,  
FECUNDIDAD, FERTILIDAD Y TASAS DE CÓPULA E INSEMINACIÓN EN *Aedes  
aegypti* (Diptera: Culicidae)**

**COMITÉ DE TESIS**

---

**Eduardo A. Rebollar Téllez Ph. D**  
PRESIDENTE

---

**Dr. Raúl Torres Zapata**  
SECRETARIO

---

**Ildelfonso Fernández Salas, Ph. D.**  
VOCAL

---

**Dr. Roberto Mercado Hernández**  
VOCAL

---

**Dr. Feliciano Segovia Salinas**  
VOCAL

---

**Hussein Sánchez Arroyo Ph. D**  
ASESOR EXTERNO

---

**Dr. Marcelo Acosta Ramos**  
ASESOR EXTERNO

# CONTENIDO

CONTENIDO.....	i
LISTA DE CUADROS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS .....	viii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. HIPÓTESIS.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo general .....	6
2.2 Objetivos específicos .....	6
3. ANTECEDENTES.....	7
3.1 Importancia de los mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	7
3.2 Enfermedades transmitidas por el género <i>Aedes</i> spp.....	8
3.2.1 Dengue .....	8
3.2.2 La enfermedad del dengue y dengue severo .....	9
3.3 Origen y distribución de <i>Ae. aegypti</i> .....	11
3.4 Morfología de <i>Aedes aegypti</i> .....	11
3.4.1 Etapa acuática .....	11
3.4.2 Etapa aérea .....	12
3.5 Biología y hábitos .....	12
3.6 Métodos de control de <i>Aedes aegypti</i> , principal vector del dengue .....	14

3.6.1	Control cultural.....	15
3.6.2	Control químico.....	15
3.6.3	Control genético.....	15
3.6.4	Control biológico.....	15
3.7	Uso de hongos entomopatógenos en el control de larvas de mosquitos transmisores del dengue.....	19
3.8	Uso de hongos entomopatógenos en el control de mosquitos adultos .....	21
3.9	Formulaciones de hongos entomopatógenos para su uso como controlador biológico.....	22
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1	Localización de los experimentos .....	25
4.2	Experimento 1. Evaluación de cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i> aislados en México. ....	25
4.2.1	Cría de <i>Aedes aegypti</i> .....	25
4.2.2	Aislamiento de los hongos <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	26
4.2.3	Obtención de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	28
4.2.4	Evaluación de cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	28
4.3	Experimento 2. Transmisión de <i>Metarhizium anisopliae</i> de mosquitos machos a hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	30
4.3.1	Cría del mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	30
4.3.2	Colecta de <i>M. anisopliae</i> .....	31
4.3.3	Diseño experimental .....	32
4.4	Experimento 3. Transmisión de <i>Beauveria bassiana</i> de mosquitos machos a hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	33

4.4.1	Cría de Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	33
4.4.2	Preparación de la suspensión conidial de <i>Beauveria bassiana</i> .....	33
4.4.3	Efecto de la Infección en mosquitos adultos.....	34
4.5	Análisis estadísticos.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1	Experimento 1. Evaluación de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> aislados en México. ....	37
5.2	Experimento 2. Transmisión de <i>Metarhizium anisopliae</i> de mosquitos machos a hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	41
5.3	Experimento 3. Transmisión de <i>Beauveria bassiana</i> de mosquitos machos a hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	42
6.	DISCUSIÓN.....	46
6.1	Experimento 1.Evaluación de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> aislados en México. ....	46
6.2	Experimento 2. Transmisión de <i>Metarhizium anisopliae</i> de mosquitos machos a hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	46
6.3	Experimento 3. Transmisión de <i>Beauveria bassiana</i> de mosquitos machos a hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	48
7.	CONCLUSIONES.....	51
8.	LITERATURA CITADA.....	52

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas aisladas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (H-M) y <i>Beauveria bassiana</i> (H-B) diferentes lugares de México, en distintas áreas. ....	27
Cuadro 2. Valores de TL <sub>50</sub> de ocho aislados de <i>Beauveria bassiana</i> donde se expusieron durante 48 hrs. hembras de <i>Aedes aegypti</i> . ....	37
Cuadro 3. Valores de TL <sub>50</sub> de aislados de <i>Metarhizium anisopliae</i> donde se expusieron durante 48 hrs. hembras de <i>Aedes aegypti</i> . ....	38
Cuadro 4. Tasa de infección (% ± ES1) en hembras de <i>Aedes aegypti</i> confinadas con un macho previamente contaminado por 6x10 <sup>8</sup> conidias ml <sup>-1</sup> de <i>Metarhizium anisopliae</i> y tiempo de confinamiento por tratamiento .....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cría de mosquito <i>Aedes aegypti</i> bajo condiciones de laboratorio, en Texcoco, Estado de México. ....	26
Figura 2. Larva de <i>Spodoptera</i> sp. se utilizó para aislar hongos entomopatógenos que se encontraron en el suelo de las diferentes localidades. ....	27
Figura 3. Cámara de infección, a) base invertida de una caja Petri, b) base de caja Petri c) papel filtro con conidias, d) mota de algodón impregnada con azúcar al 10%. ....	29
Figura 4. Recipientes cilíndricos estériles de 2000 cm <sup>3</sup> (12cm diámetro x 18cm. altura), donde se mantuvieron los mosquitos infectados y no infectados a) mota de algodón impregnado con sacarosa al 10% b) perforación cubierta con malla fina. ....	30
Figura 5. a) Recipiente con papel estraza y agua limpia usada para oviposición de huevecillos, b) Hamster para alimentar las hembras de <i>Aedes aegypti</i> y c) jaula de tul donde se criaron los mosquitos. ....	31
Figura 6. a) Huevos en papel estraza donde ovipositaron las hembras de <i>Aedes aegypti</i> , b) y c) desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> bajo condiciones de laboratorio y d) pupas en recipiente con agua dentro de la jaula. ....	31
Figura 7. Cámaras con filtro impregnado con conidias de <i>Metathizium anisopliae</i> bajo condiciones de laboratorio. ....	33
Figura 8. Cámara de exposición de <i>Aedes aegypti</i> a $6 \times 10^8$ conidias ml <sup>-1</sup> de <i>Beauveria bassiana</i> . ....	35
Figura 9. Análisis de sobrevivencia de <i>Aedes aegypti</i> expuestos durante 48 horas a ocho cepas diferentes de <i>Beauveria bassiana</i> bajo condiciones de laboratorio. ....	38
Figura 10. Análisis de sobrevivencia de <i>Aedes aegypti</i> expuestos durante 48 horas a ocho cepas diferentes de <i>Metharrizium anisopliae</i> bajo condiciones de laboratorio. ....	39

Figura 11. Mosquitos hembras con crecimiento de hongos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> a) 3 dde b) 4 dde c) 5 dde d) 6 dde e) 7 dde. dde: días después de exposición.....	40
Figura 12. Análisis de sobrevivencia en hembras de <i>Aedes aegypti</i> confinadas con un macho previamente contaminado por $6 \times 10^8$ conidias $\text{ml}^{-1}$ de <i>Metarhizium anisopliae</i> y tiempo de confinamiento por tratamiento .....	42
Figura 13. Supervivencia acumulativa proporcional dado por el modelo de Kaplan-Meier para cuarenta hembras (por tratamiento) de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a un macho virgen antes inoculado con los dos aislados de <i>Beauveria bassiana</i> a $6 \times 10^8$ conidia $\text{ml}^{-1}$ y el Control (macho sano).....	43
Figura 14. Tasa Media (%) del total de esporulados, total de inseminados, y hembras de <i>Aedes aegypti</i> esporuladas no inseminadas juntadas con un macho virgen expuesto a $6 \times 10^8$ conidias $\text{ml}^{-1}$ de dos aislamientos de <i>B. bassiana</i> más el control (macho limpio). .....	44
Figura 15. Media de huevos por hembra de <i>Aedes aegypti</i> , en hembras reunidas con un macho virgen expuesto a $6 \times 10^8$ conidia $\text{ml}^{-1}$ de dos aislados de <i>Beauveria bassiana</i> y el Control (macho sano). .....	45

## DEDICATORIA

A mis padres: Mi madre Sra. Argemila Munguía González y a mi padre Rutilio García Solís, por darme la vida, por su amor, apoyo y confianza que me dan para poder superarme y lograr mis objetivos. Gracias a ellos pude lograr lo que me propuse y ahora sé que sin su apoyo tal vez no hubiera podido alcanzar la meta que ahora se ha cumplido.

A mis hermanos: Carlos Alberto, Argelia, Efigenia, Otilio y Teresa, por el apoyo incondicional que siempre nos hemos brindado, tanto en los buenos como en los malos momentos, para lograr todas las metas que siempre nos hemos planteado.

A mis amigos por todos esos momentos alegres que pasamos juntos y que nunca podré olvidar, pues apoyos como los que los amigos dan no se encuentran donde quiera.

Quisiera mencionar uno por uno a mis amigos pero lamentablemente los renglones son pocos y los amigos verdaderos no se necesitan mencionar para saber que lo son.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y a mis padres por darme la oportunidad de vivir y hacer de mi alguien en la vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Becario 277384 por su apoyo para la realización de mis estudios de Doctorado con especialidad en Entomología Medica.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por darme la oportunidad de lograr una meta más.

Al Programa de Estudios de Postgrado en Entomología Médica, por los conocimientos compartidos a través de sus profesores e incentivarme en el área de la Entomología.

A los integrantes de mi comité de Tesis por las observaciones y apoyo en la realización de este manuscrito.

Al Dr. Eduardo A. Rebollar Téllez, por el apoyo desinteresado que me ha otorgado desde el inicio del posgrado en la UANL, por el apoyo para la realización del presente trabajo de Tesis y principalmente por la amistad y consejos que me ha brindado en todos estos años.

Al Dr. Ildfonso Fernández por la oportunidad de trabajar en el Laboratorio, su apoyo, su amistad y guía para terminar esta etapa de mi vida.

A la QBP Rosa María Sánchez Casas por su amistad y apoyo incondicional, y que siempre se conserven esos lazos.

Al Doctor Hussein Sánchez Arroyo por su apoyo incondicional brindado, para el desarrollo de los experimentos de este trabajo.

Al Doctor Marcelo Acosta Ramos por su amistad y apoyo incondicional en mi proyecto de vida.

A todas las personas que no he nombrado, pero que de una o de otra forma contribuyeron en mi formación y elaboración de este trabajo.

## RESUMEN

La resistencia a los insecticidas químicos ocasionada por los insectos, ha llevado al interés en los hongos como agentes de control biológico de mosquitos. La mayoría de los trabajos con entomopatógenos se han evaluado en relación a larvas, pero hace poco se han comenzado a evaluar infecciones de mosquitos adultos a través de la exposición de superficies tratadas con conidias de hongos. En el presente estudio se evaluaron cepas mexicanas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* contra *Aedes aegypti*, lo que demuestra que el comportamiento de los machos impregnados con los hongos causan una mortalidad y daños en las variables de fecundidad en hembras. Todas las cepas a  $6 \times 10^8$  conidias/ml<sup>-1</sup> fueron altamente virulentas con una TL<sub>50</sub> de 2.70(±0.29)–5.33(±0.53) días estimado en la exposición de hembras. Machos vírgenes de *Aedes aegypti* (Linneo) fueron expuestos durante 48h a la dosis de  $6 \times 10^8$  conidias ml<sup>-1</sup> de un aislado de *Metarhizium anisopliae* y luego fueron confinados con hembras vírgenes para examinar transmisión por conducta de cópula. En hembras expuestas a un macho contaminado con el aislado H-M5 hubo un 90% de mortalidad, una vida media de siete días, y fecundidad media de 0.52±0.32 huevos por hembra, la cual fue 99% más baja que la fecundidad en el control (35.35±8.3). Menos del 20% de las hembras infectadas resultaron inseminadas lo cual sugiere que la mayoría se infectaron por intentos de cópula.

De la misma forma la transmisión de dos cepas de *B. bassiana* (H-B2 y H-B4), probadas en el apareamiento, ambos mataron entre 80-90% de las hembras en 15 días confinados con machos previamente expuestos durante 48 horas a los hongos. De las tasas de mortalidad, 27 y 48% respectivamente, fueron las infecciones adquiridas por cópulas, donde se produjo la inseminación. La TL<sub>50</sub> para las hembras infectadas sexualmente fueron de 7.92(±0.46) y 8.82(±0.45) días para ambas cepas, mientras que el control fue de 13.92 (± 0.58). Del mismo modo, la fecundidad disminuyó entre 95% y 60% con ambos aislados en comparación con el control. El aislado H-M5 es un candidato prometedor para biocontrol vectorial del dengue, pero antes se debe estudiar el riesgo que el hongo implica para la salud pública. Para *B. bassiana* este es el primer reporte que se da contra *Ae. aegypti* a través de comportamiento de cópula de machos vírgenes hacia hembras.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* transmisión, comportamiento de cópula, fecundidad.

## ABSTRACT

Resistance to chemical insecticides plus high infestation levels have led to rising interest in fungi as candidates for biocontrol agents of mosquito vectors. In most early reports these pathogens were evaluated against immatures, but recently fungal infections have been tested against adults by exposure to surfaces treated with conidia. In the present study Mexican strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* were assessed against *Aedes aegypti*, demonstrating by first time that the polygamic behavior of fungus-impregnated males causing high mortality rates among females of the dengue vector. All strains to  $6 \times 10^8$  conidia/ml<sup>-1</sup> were highly virulent with an LT<sub>50</sub> of 2.70(±0.29)-5.33(±0.53) days estimated exposure of females. Virgin male *Aedes aegypti* (Linneo) were exposed for 48h  $6 \times 10^8$  conidia ml<sup>-1</sup> of anisolate of *Metarhizium anisopliae* and then were confined to virgin femalesto consider transmission through intercourse. In females one male exposed to contamination with the isolated H-M5 there was 90% mortality, an average life of seven days, and average fertility of 0.52±0.32 eggs per female, which was 99% lower than fertility in control (35.35±8.3). Less than 20% of infected females were inseminated suggesting that most were infected through intercourse attempts. Likewise the transmission of two strains of *B. bassiana* (H-B2 and H-B4), tested in mating, both killed 80-90% of females confined with males 15 days 48 hours previously exposed to fungi. Mortality rates, 27 and 48% respectively, were acquired infections copulations, where insemination took place.

The LT<sub>50</sub> for sexually infected females were 7.92 (±0.46) and 8.82 (±0.45) days for both strains, while the control was 13.92(±0.58). Similarly, fertility declined by 95% and 60% with both isolates compared with control. The isolated H-M5 is a promising candidate for biocontrol vector of dengue, but first you should consider the risk that the fungus poses to public health. For *B. bassiana* this is the first report given to *Ae. aegypti* through copulation behavior of males to virgin females.

**Key Words:** *Aedes aegypti*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, transmission, mating behavior, fecundity.

## INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad transmitida por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y actualmente se le considera como la arbovirosis de mayor impacto en salud pública a nivel mundial. *Ae. aegypti* ha sido una de las especies más estudiadas en entomología médica y lo seguirá siendo por muchos años, porque a pesar de la abundante información que existe sobre su biología y control, año tras año ocurren invariablemente los brotes de dengue en todas las zonas endémicas (Zarate, 1988).

El mosquito *Aedes aegypti* tiene una distribución cosmopolita, ha sido descrito como el principal vector para los flavivirus causantes del dengue, fiebre hemorrágica del dengue, fiebre amarilla urbana, que suelen presentarse en forma de grandes epidemias, que se propagan con gran rapidez afectando a un gran número de personas en el curso de cada epidemia y reduciendo considerablemente la productividad laboral pero, sobre todo, segando muchas vidas (Zarate, 1988).

Desafortunadamente, las opciones disponibles para la prevención y el control del dengue epidémico son poco favorables. En los últimos 30 años se ha dado demasiada confianza en el uso de insecticidas para el control de este insecto, subrayándose una eficacia baja y gran toxicidad al medio ambiente (WHO, 2008).

Debido a lo anterior se deben buscar nuevas alternativas de combate, como organismos que, además de ser eficaces, no dañen a otros organismos del ecosistema en el cual estén interactuando con los mosquitos.

En las últimas décadas se ha expandido grandemente la literatura sobre los agentes potenciales de control biológico de vectores de enfermedades humanas y animales (Sorokin, 1983). Aunado a los problemas que sigue presentando el combate de mosquitos, en muchas partes del mundo, es de crucial importancia hacer investigaciones que conduzcan a encontrar nuevos productos biológicos o alternativas con las que el presente trabajo se une, aportando sus resultados.

De Paula (2008) menciona que una de las alternativas es el uso de entomopatógenos, puesto que además de no contaminar, constituyen un método de control eficaz, ya que está comprobado que ataca a más de 200 especies de insectos y que ha demostrado tener potencial para infectar o matar insectos en alguna de sus fases de ciclo biológico; no produce efecto inmediato como los productos químicos, pero una vez que están en su ambiente dado, pueden sobrevivir, incrementarse e infectar a los insectos

Lo anterior refleja la importancia del presente trabajo donde se evaluó el impacto y la eficacia de cepas nativas del noroeste de México de hongos entomopatógenos contra *Aedes aegypti* y que culminado el experimento incluye variables competitivas como fecundidad, tasa de inseminación, fertilidad, longevidad y atracción al huésped se genere una alternativa de manejo de estos insectos y en un tiempo corto repercuta en la salud humana.

## 1. HIPÓTESIS

En la interacción huésped-patógeno formada por los cosmopolitas *Aedes aegypti*-hongos imperfectos, la variación genética inherente y aleatoria ha seleccionado poblaciones del vector más susceptible a las micosis pero también a hongos más virulentos, y esta asociación sigue patrones desconocidos. No obstante, la virulencia contra *Ae. aegypti*, evaluada por exposición directa o por transmisión sexual, si es mayor en aquellos hongos que están esporulando sobre (cadáveres) insectos que infectaron y mataron, en comparación a la de los hongos aislados del suelo; y esto es independiente de la geografía y población de *Ae. aegypti*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Determinar la virulencia de aislados nativos de México de *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* sobre adultos de *Aedes aegypti*, así como el grado de transmisión de las conidias entre adultos y su efecto en la fecundidad, fertilidad y sobrevivencia.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1.- Evaluar aislados de los hongos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre hembras nulíparas de *Aedes aegypti*.
- 2.- Determinar la cepa más virulenta de los diferentes hongos aislados a la dosis de  $6 \times 10^8$ , conidias/ml<sup>1</sup> en adultos de *Ae. aegypti*.
- 3.- Determinar el grado de transmisión de conidias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a través de cópulas entre adultos de *Ae. aegypti* y evaluar su impacto en fecundidad, fertilidad, tiempo de oviposición y sobrevivencia de ambos sexos.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Importancia de los mosquitos *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti* es un díptero de la familia Culicidae, subfamilia Culicinae, del subgénero *Stegomyia*, probablemente de origen Africano, y que actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo, principalmente en regiones tropicales, donde el mosquito está presente todo el año, aunque en época seca disminuyen las poblaciones y desaparecen en las regiones templadas (Chaverri, 2001; Fernández, 2009).

Las hembras ovipositan principalmente sobre el nivel del agua en superficies húmedas y las larvas emergen hasta que los huevos se encuentran sumergidos en agua, lo cual ocurre en condiciones óptimas entre 2 a 3 días. Esta etapa es el principal mecanismo a través del cual se ha dispersado el mosquito. Los huevos se conservan viables fuera del agua, durante la época seca y son resistentes a la desecación por varios meses (diapausa) (Luz, *et al.*, 2008). El desarrollo de las larvas y adultos pueden desaparecer cuando los criaderos se secan y aparecer nuevamente en cuanto se mojan. Se lleva a cabo en cuatro estadios (I, II, III y IV) durante las cuales crecen de 1 a 6 mm. La duración de los estadios larvarios en condiciones óptimas es de cinco días en promedio y la alimentación escasa no impide de que las larvas sobrevivan en ese ambiente, debido a que presentan un mecanismo especial de almacenamiento de nutrientes. Se alimentan con el plancton de los recipientes que habitan (Salvatella, 1996). Las pupas no se alimentan y de 28° - 32°C, completan su desarrollo entre 1 y 3 días. El ciclo completo de *Ae. aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, en 10 días (Salvatella, 1996).

La fase aérea inicia cuando éste emerge de la última fase acuática (pupa) y comienzan a alimentarse de secreciones sacarosas. Las hembras son hematófagas y realizan su primera ingestión de sangre 1 o 2 días después de su emergencia. Poseen hábitos de alimentación diurnos, en cercanía a los domicilios humanos, con gran afinidad a la alimentación sobre el hombre (Salvatella, 1996). El alimento natural

de hembras es la sangre de mamíferos, roedores y aves, así como néctares de las plantas que se encuentran en el hábitat doméstico durante un mismo ciclo gonotrófico lo que le da la capacidad importante como transmisor de enfermedades, estas requieren de las proteínas presentes en la sangre para llevar a cabo la ovogénesis. Una hembra puede poner entre 300 y 450 huevos en su vida, aproximadamente 25-100 en cada ovipostura (Hernández y García, 2000).

La eficiencia de *Ae. aegypti* como vector del dengue se debe a su alta susceptibilidad al virus, y a sus rasgos específicos en sus patrones de alimentación y comportamiento que son heredados y la preferencia para obtener sangre como alimento de los huéspedes humanos (antropofilia-antropofagia) y su hábitat preferencial dentro de las casas (endofilia). El horario de actividad de picadura y la capacidad de picar a varias personas, entra a etapa de viremia, con la capacidad de infectar al momento de alimentarse. La hembra permanece infectada de por vida. El comportamiento anterior permite el incremento de riesgo de transmisión del virus del dengue (Gubler, 1998).

### 3.2 Enfermedades transmitidas por el género *Aedes* spp.

Las enfermedades transmitidas por insectos afectan por igual a los países desarrollados y los que están en vías de desarrollo.

#### 3.2.1 Dengue

El dengue que es otra de las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* conocida también como quebrantahuesos, se presenta en regiones tropicales y subtropicales. Esta enfermedad también es de origen viral (Fernández, 2009).

El virus del dengue consiste de un subgrupo antigénico de cuatro virus muy relacionados, pero diferentes antigénicamente; estos son: DEN-1, 2, 3, y 4 dentro del género *Flavivirus*. Todos producen enfermedades humanas que van desde la fiebre del dengue que es relativamente moderada, hasta la severa fiebre hemorrágica del dengue (Reyes, 1993).

El dengue afecta a todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se ha señalado su presencia en más de cien países y unos 2000 millones de humanos están expuestos al contagio. Cada año se registran millones de infecciones y decenas de miles de muertes (OMS, 1997).

### 3.2.2 La enfermedad del dengue y dengue severo

El virus dengue corresponde al género *Flavivirus*, familia Flaviviridae. Es un virus de 40-50 nm de tamaño, ARN de cadena simple, cuyo genoma es de 11,000 pb el cual causa una enfermedad infecciosa aguda de etiología viral conocida como Dengue (Gubler, 1998).

El agente etiológico presenta cuatro serotipos del dengue, DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (WHO, 2008), los cuales se transmiten a los humanos a través de la picadura de los mosquitos vectores. La infección viral puede producir un cuadro asintomático, cuadros de fiebre indiferenciada, fiebre clásica de Dengue o Dengue Severo. El tiempo de incubación del virus en los mosquitos es de 8-12 días, luego de lo cual pueden transmitirlo a personas sanas, donde el periodo de incubación es de 3-14 días. Trascorrida la fase de incubación en el cuerpo humano, se manifiestan los síntomas, predominantemente fiebre aguda, debido a que el virus se encuentra circulando en la sangre periférica, de modo que otros mosquitos que piquen a una persona en esta condición, adquieren el virus (Gubler, 1998). Adicionalmente, se ha reportado que el virus se transmite verticalmente (transovarial) en los mosquitos y que también se amplifica en primates no humanos. (Gibbons y Vaughan, 2002).

La infección de una persona con uno de los cuatro serotipos confiere inmunidad contra ese serotipo y por corto tiempo contra los otros 3 serotipos. Infecciones secuenciales pueden predisponer el desarrollo del dengue severo (Anderson y Rico, 2006) y según la (WHO, 2008) es la enfermedad más común transmitida por artrópodos pues existen entre 30 y 60 millones de infecciones por año en el mundo, con miles de muertes en más de 100 países y más de 2 mil millones de personas en riesgo.

Muchas de las causas que ocasionaron la expansión y resurgimiento del dengue a nivel mundial no están completamente definidos. Sin embargo, se establece una relación estrecha con los cambios demográficos y sociales en la población, entre ellos, el aumento exponencial de la población correlacionado con una urbanización no planificada, deficiencia de viviendas, de infraestructura en alcantarillados, inadecuado manejo de aguas y desechos. Además se considera el aumento en el transporte aéreo, que facilita la movilización de personas infectadas, alrededor del mundo y la falta de recursos para prevención y métodos eficientes de control de los vectores del virus (Gubler, 1998). En México se reportaron en el periodo 2002-2007 más de 70,000 casos de Dengue (WHO, 2008).

La enfermedad se caracteriza por una fiebre repentina que se presenta después de un periodo de incubación de cuatro a siete días y se caracteriza por un cuadro febril que incluye dolor de cabeza, dolor corporal, náuseas, vómito, dolor de articulaciones, debilidad, salpullido y hemorragias. Puede presentarse anorexia, alteración de gusto, dolor de garganta, estreñimiento, diarrea y síntomas respiratorios. La presencia de esta forma clínica debe ser objeto de seguimiento exhaustivo para establecer su posible evolución a Dengue Hemorrágico. Es una enfermedad rara vez mortal y no se conocen secuelas de ésta (Gubler, 1998).

El Dengue severo presenta alta permeabilidad vascular y cambios hemostáticos que se relaciona con la presencia de hemoconcentración debida a la fuga de plasma al espacio extravascular. Dicha hemoconcentración se manifiesta por hematocrito elevado y con frecuencia por la presencia de hemorragias (epistaxis, gingivorragia, sangrado urogenital, sangrado en sitios de punción, hemoptisis y sangrado del tubo digestivo) y extravasación de líquidos (equimosis, hematomas o petequias). El cuadro hemorrágico puede presentarse dos o tres días después de haber desaparecido los síntomas y aun la fiebre. Este puede o no incluir el shock clínico, lo que se conoce como síndrome del shock dengue, el cual se produce debido a la fuga de plasma y que puede provocar la muerte (WHO, 2008). El aspecto importante de este cuadro es que se trata de un fenómeno auto limitado en donde los linfocitos no sensibilizados permiten establecer la homeostasis en el transcurso de 2-3 días. Los

cuatro serotipos del virus se han asociado con el Dengue Hemorrágico, sin embargo la severidad de la enfermedad varía dependiendo de la cepa y el serotipo (Gibbons y Vaughan, 2002).

### 3.3 Origen y distribución de *Ae. aegypti*

Estos mosquitos son probablemente originarios del continente Africano. Tienen una distribución muy amplia y estable en los trópicos, zonas tropicales y subtropicales. La altitud promedio en donde se encuentra es por debajo de los 1200 msnm, aunque se ha registrado a una altura de 2400 msnm (Herrera, 1989).

### 3.4 Morfología de *Aedes aegypti*

Estos mosquitos tienen dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fases acuática y aérea. Durante la fase acuática o larvaria o de estadios inmaduros, existen tres formas evolutivas diferentes: huevo, larva y pupa. A la fase aérea o de adulto corresponde el mosquito o Imago que vuela (Trpis, 1977).

#### 3.4.1 Etapa acuática

Esta etapa está representada por las formas evolutivas de huevo, larva y pupa. Las hembras de los mosquitos necesitan alimentarse de sangre para lograr la maduración de sus huevos y así reproducirse; en América esta parece ser la dinámica principal del ciclo de reproducción. Casi todas las especies necesitan alimentarse de sangre para la oviposición, pero algunas especies pueden desarrollar un número limitado de huevos sin alimentarse de sangre. A este fenómeno se le conoce como autogenia, este fenómeno parece ser más frecuente en *Ae. albopictus* que en *Ae. aegypti* (Trpis, 1977).

#### **Huevos**

Miden más de 1 mm de longitud, su forma es ovoide, alargada como un bastón y su apariencia ligeramente afelpada es debida a sus formaciones reticulares geométricas. Recién puestos son claros y traslúcidos y enseguida se oscurecen hasta un color azul-negro (CRAT, 1970).

## **Larva**

Tienen cuatro estadios o fases evolutivas inmaduras. Entre cada estadio las larvas tienen una ecdisis en la cual se desprende el exoesqueleto o exuvia cada vez. Las larvas tienen tres partes: cabeza, abdomen y aparatos respiratorio y excretor. Presenta un sifón corto y grueso por el que respira. Otra característica es la espina lateral prominente a cada lado del tórax (Méndez, 1994).

## **Pupa**

La larva del estadio IV se transforma en pupa, última fase evolutiva acuática o ecdisis, que se caracteriza por tener una forma de coma, está envuelta en un exoesqueleto queratinoso impermeable y corresponde a la maduración del nuevo adulto (CRAT, 1970).

### 3.4.2 Etapa aérea

## **Adulto**

*Ae. aegypti* es un mosquito negro con manchas de color plateado en diversas partes del cuerpo que en su conjunto dan la apariencia de una lira en la parte del mesonoto. La cabeza presenta mechones de escamas plateadas en los ápices de los palpos. Las hembras presentan antenas con pelos cortos y escasos (Méndez, 1994).

## 3.5 Biología y hábitos

Este mosquito es principalmente doméstico. Los recipientes artificiales son en gran medida el lugar de cría y son esenciales para la producción y conservación de grandes poblaciones. A las hembras las atraen los recipientes de colores oscuros, especialmente si se encuentran a la sombra. El agua oscura y la presencia de hojas en descomposición estimulan la postura de huevos (Reyes, 1993).

La postura la hacen principalmente en la tarde, los huevos son depositados uno por uno en las partes húmedas de cuerpos de agua. En un periodo de 2 a 3 días con

mucha humedad y a temperaturas entre 25 y 30 °C los huevos eclosionan (Cantón, 1996).

La larva emerge y el paso de una fase larval a otra se logra por el proceso de formación, durante el cual los insectos sueltan su viejo exoesqueleto (Cantón, 1996). La larva pasa la mayor parte del tiempo alimentándose, usando las cerdas en forma de abanico para atrapar los microorganismos y las partículas de materias que están fuera del agua. La pupa se forma a los siete días y esta no se alimenta. La pupa dura de 2-3 días y al emerger el adulto este se alimenta cada tres días subsecuentemente con el objeto de completar su ciclo gonotrófico. La hembra puede producir entre 50 y 100 huevos en cada ovipostura (Méndez, 1994).

Obras clásicas (Howard, 1912, Christophers, 1960;) en biología de mosquitos Culicidae mencionan que la posición de ambos sexos en cópula depende de si las hembras tienen uñas tarsales, lisas o dentadas; si son lisas, hembra y macho se colocan linealmente en direcciones opuestas como en *Culex* y *Anopheles*, pero si las uñas son dentadas, el macho con su tarsos se sujeta al cuerpo de la hembra y se posicionan ventralmente, como en *Aedes*.

La cópula en *Aedes aegypti* fue descrita por primera vez por el naturalista francés Godeheu De Riville en 1760 (Cabrera 2007). Landois, 1874 reportó que una hembra posada no atraía a machos, y se sugirió que estos eran atraídos por el sonido de las hembras al volar (Cabrera, 2007). Fue hasta 1948 cuando el entomólogo americano Louis M. Roth llevó a cabo el primer estudio integral sobre el comportamiento sexual y confirmó que los machos usan sus antenas plumosas para detectar y localizar a las hembras por su sonido alar. El comportamiento de cópula del macho de *Ae. aegypti* consiste de cuatro etapas: inicio del vuelo, orientación hacia la fuente acústica, captura de la hembra, y conexión de genitales para inseminación (Clements, 1963). En muchas especies el comportamiento incluye la formación de un enjambre sobre un objeto que funciona como “marcador” (Cabrera, 2007).

En el vector del dengue, el enjambre es una fase “facultativa” porque un solo macho, puede perseguir y copular con una hembra que pase volando cerca (Zwiebel 2004). No obstante el enjambre sí aumenta el éxito reproductivo. La antropofilia ha moldeado la conducta sexual de *Ae. aegypti*, porque una persona funciona como marcador al atraer a hembras con el CO<sub>2</sub> y ácido láctico (Clements, 1999), pero también atrae a machos y aunque el enjambre esté formado por dos o tres, en ese espacio se facilitan los encuentros sexuales, con cópulas exitosas (inseminación) o intentos (Foster, 1975). Roth (1948) también observó que el macho es poligámico e insemina entre 5 y 7 hembras cuando es confinado por 30 minutos con 30 hembras vírgenes. En otro estudio se reportó un promedio de seis cópulas con inseminación para un macho en un periodo de tres días (Lacey, 2001). La hembra tiende a ser monógama; cuando es inseminada por primera vez, una hormona llamada “matrona” producida en las glándulas accesorias del macho, induce la formación de un “tapón” en el oviducto que bloquea la inseminación por un macho subsecuente (Foster, 1975).

### 3.6 Métodos de control de *Aedes aegypti*, principal vector del dengue

El control de mosquitos atraviesa hoy en día una situación de crisis. En los últimos 40 años, los humanos han dependido casi por completo de insecticidas sintéticos orgánicos. Actualmente, las mismas propiedades que confirieron utilidad a estos productos químicos, han ocasionado graves trastornos ambientales debido a su larga acción residual y a sus efectos tóxicos en una gran diversidad de organismos (Anónimo, 1998).

Una de las principales formas para el control de adultos de *Ae. aegypti* consiste en la aplicación de insecticidas químicos (malatión, fenetion, entre otros) en sitios de descanso en la dirección del vector. Para el control de larvas se realiza el tratamiento del agua con productos químicos con efecto larvicida como el temefos granular a fin de proporcionar mayor rendimiento e impacto contra los mosquitos en sus etapas larvarias (Andrade, 1993). Sin embargo, el uso de estos, por aspersión no es eficiente, a menos que se realice en áreas cerradas (Gubler, 1998).

Adicionalmente, el uso de estos químicos implica problemas ambientales en cuanto a contaminación, toxicidad en los seres humanos y otros organismos no-blanco, así como la generación de resistencia por parte de los insectos, por lo cual se ha intensificado la búsqueda de otras alternativas para control de vectores (Scholte *et al.*, 2007).

### 3.6.1 Control cultural

Se basa en la reducción de focos de infección, dirigidas a prevenir, eliminar, reducir o modificar convenientemente los hábitats acuáticos hechos por el hombre. La utilización integra de las medidas para reducir los focos aminora grandemente la necesidad de aplicar repetidas veces sustancias químicas para el control de los mosquitos (Arredondo *et al.*, 1991).

### 3.6.2 Control químico

El uso de insecticidas para el control de mosquitos ha sido evaluado desde hace más de 50 años. Se ha utilizado la deltametrina, permetrina, además del diflubenzuron, metropeno, fenoxicarb y piroproxifen, los cuales son reguladores de crecimiento (Arredondo *et al.*, 1991).

### 3.6.3 Control genético

Consiste en realizar alteraciones cromosómicas de los mosquitos, ya sea mediante la quimioesterilización de machos, la doble translocación en machos heterocigotos o la distorsión en la doble translocación, entre otros. Las pruebas para evaluar la eficiencia en el control de mosquitos se basan principalmente en la competitividad del apareamiento con respecto a los organismos no tratados (Curtis *et al.*, 1976).

### 3.6.4 Control biológico

El control biológico es una de las formas más antiguas de control de plagas y este consiste en utilizar a sus enemigos naturales como los son los parasitoides, depredadores y entomopatógenos. Entre los organismos que de manera natural

atacan a *Aedes spp.* y que han sido más estudiados están los virus, bacterias, hongos, protozoarios, nematodos, insectos, peces y crustáceos (Service, 1986).

En estudios recientes se han implementado hongos entomopatógenos para el control de adultos de mosquitos obteniendo buenos resultados (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *etal.*, 2005, 2006). En algunos estudios se describe que existen dos formas de implementar hongos como agentes de control biológico de mosquitos. El método de colonización-inoculación que consiste en inocular el patógeno en el ambiente y que este se disperse naturalmente. La otra forma consiste en utilizarlo como un bioinsecticida, de modo que el hongo no es capaz de reinfectar insectos o de multiplicarse en condiciones naturales, además depende de las aplicaciones realizadas por el hombre y puede provocar la eliminación total de la población de mosquitos (Andrade, 1993).

Una de las ventajas del uso de hongos entomopatógenos sobre otros microorganismos controladores es que estos no requieren ser ingeridos para infectar al insecto, de modo que la infección se puede dar solamente por contacto con la cutícula u otras partes del insecto (Pucheta *et al.*, 2006).

La efectividad de un hongo como controlador microbial, se mide por la virulencia que presenta y por los factores ambientales como, luz, temperatura, salinidad, humedad relativa, velocidad de germinación y esporulación sobre el cadáver del hospedero (Butt y Goettel, 2000). Scholte y colaboradores (2004a) mencionan ciertas características para implementar un hongo como controlador de mosquitos, entre las que se indican que debe inducir la muerte tanto en estadio de larva como adulto en una única aplicación por etapa de desarrollo, dispersión a través de las hembras a posibles sitios de confinamiento, mostrar actividad residual y persistencia en los mosquitos u otros organismos, selectividad, tolerancia a condiciones adversas, producción en masa de bajo costo y que se pueda realizar una formulación que mantenga su viabilidad aún durante el almacenamiento y que no sea dañino para el ser humano ni otros organismos distintos al que sea desea controlar.

Aun no se tiene conocimiento de que todas las características anteriormente señaladas de los hongos conocidos y utilizados para controlar mosquitos se presenten. Adicionalmente, para implementar un hongo como agente microbial de mosquitos se deben tomar en cuenta otros factores como son, la biología del insecto blanco, su distribución, viabilidad y virulencia del hongo, métodos de aplicación, costos, almacenamiento, posibilidad de producción masiva y disponibilidad o registro en el mercado (Scholte *et al.*, 2004a).

En los últimos 40 años, el combate de mosquitos se ha hecho casi exclusivamente con insecticidas, provocando graves trastornos ambientales debido a su larga acción residual y sus efectos tóxicos en una gran diversidad de organismos; así mismo se ha desarrollado resistencia a gran cantidad de estos productos. En las últimas décadas se ha impulsado la investigación y estudio de alternativas de control que no incluyan químicos, debido a todas las consecuencias negativas correlacionadas con su uso (Andrade, 1993).

Los primeros microorganismos que se encontraron causando enfermedad en insectos, fueron los hongos por su crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos, gracias a que tienen un rango amplio de insectos huéspedes (Van Der Geest *et al.*, 2000). Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas en particular, alta humedad y temperatura adecuada para la esporulación y germinación de conidios (Pucheta, *et al.*, 2006). Los hongos entomopatógenos consideran una asociación entre insectos y se han convertido en una estrategia importante dentro de los esquemas actuales de manejo de plagas insectiles (Samson, 1988).

Lo anterior pone de manifiesto el potencial de estos hongos en el control vectorial, porque en entomología médica no se requiere matar a la población de insectos como ocurre en el caso de una plaga agrícola (Samson, 1988). Se considera que aún una mortalidad baja puede hacer que el hongo afecte y reduzca los ciclos de transmisión viral y que por lo tanto, bajo este esquema habría vectores sin que se presente la enfermedad que transmiten. Uno de los efectos más visibles de una micosis es la deshidratación de los tejidos del huésped. La falta de agua en

los tejidos puede evitar que el virus del dengue se replique y que finalmente no llegue a infectar glándulas salivales; esto es que se interrumpa la incubación extrínseca y esto puede suceder antes de los 10 días que en promedio dura este periodo (Scholte *et al.*, 2004).

Aunque no está muy desarrollado el campo de la implementación de hongos entomopatógenos en el control de mosquitos vectores de enfermedades, se ha demostrado que existe un alto potencial en el uso de estos para este fin, de ahí la importancia en la investigación de metodologías de aplicación y formulación que incrementen su eficacia (Scholte *et al.*, 2004). El control biológico presenta alto potencial y debe ser implementado como parte del manejo integrado del mosquito vector del dengue, lo cual puede lograr un mayor impacto en el control de estos.

Los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* son entomopatógenos con amplia distribución a nivel mundial. Estas especies están presentes en el suelo, por lo que infectan principalmente insectos del orden coleóptera, aunque entre sus hospederos se encuentran también arácnidos y aproximadamente 200 especies de insectos (Scholte *et al.*, 2003, Sorokin, 1983). Los mosquitos no se consideran hospederos naturales de este hongo, aunque se reportan algunas cepas con actividad contra mosquitos (Scholte *et al.*, 2003).

La infección por estos hongos ocurre cuando las conidias entran en contacto con la cutícula, forman un apresorio y la perforan secretando quitinasa y proteasas más la presión del tubo germinal. En el hemocele el micelio crece formando cuerpos hifales. La muerte del insecto se produce por la acción de las toxinas del hongo (destruxinas, swainsinona, citocalasina C) que provocan la degeneración del tejido por la pérdida de la integridad estructural de las membranas y la deshidratación de las células (Pucheta *et al.*, 2006). Cuando el insecto muere, las hifas emergen del cadáver y bajo condiciones de alta humedad, el hongo esporula sobre el hospedero y las conidias se dispersan mediante el viento o el agua (Goettel, 1997). Producen destruxinas que causan la parálisis del insecto e inhiben la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Se ha relacionado específicamente la dimetildextruxina con la virulencia de estos hongos (Pucheta *et al.*, 2006). Paralelamente se ha logrado producir de

forma masiva conidias de estos hongos y se han realizado diferentes formulaciones como granulados, polvos y suspensiones en polvo (Daoust *et al.*, 1982).

Algunas cepas se encuentran actualmente disponibles en el mercado y más de diez compañías producen y comercializan *Metarhizium* y *Beauveria* (Scholte *et al.*, 2004a). Los productos comerciales se utilizan contra cucarachas, termitas, gorgojos, plagas de la caña de azúcar, pero no se reporta su uso contra mosquitos (Khetan, 2001). Sin embargo, se deben considerar ciertas dificultades, como la baja capacidad de auto-diseminación, ya que las conidias solamente germinan en los hospederos (Roberts, 1970), cuando se implementa para el control de larvas de mosquitos, aquellas que murieron por la infección y aún se encuentran sumergidas no esporulan. La especificidad, en algunos casos, así como el costo de producción en comparación con los insecticidas sintéticos se debe tomar en cuenta, ya que para que se dé la infección debe haber contacto físico, por lo cual es necesario promover esto (Scholte *et al.*, 2004a).

En general según estudios realizados en organismo distintos a insectos, se considera que *Metarhizium* no es dañino para el ser humano ni para el ambiente (Genther *et al.*, 1998). Aunque en un estudio realizado por De García y colaboradores (1997) se reporta que el hongo puede causar queratitis en los humanos. En otro estudio se demostró que un extracto de cloruro de metileno y conidióforos de *M. anisopliae*, pueden provocar mortalidad en ranas, camarones y embriones de peces expuestos, aunque no se evidenció mortalidad inducida por Destruxinas, las cuales son las que causan el efecto de muerte en los mosquitos (Genther *et al.*, 1998).

### 3.7 Uso de hongos entomopatógenos en el control de larvas de mosquitos transmisores del dengue

En estudios anteriores se ha demostrado que el uso de hongos entomopatógenos es de alta potencialidad, ya que inducen la muerte por la producción de múltiples toxinas, lo que reduce la posibilidad de desarrollo de resistencia (Zimmerman, 1993; Scholte, *et al.*, 2004). Por lo anterior, el control

biológico o microbial del vector se presenta como una alternativa viable para disminuir la propagación de la enfermedad, al igual que es eficiente y amigable ecológicamente (Scholte *et al.*, 2004, Mittal, 2003).

Existen muchos reportes en la literatura respecto a enemigos naturales que se han usado en el biocontrol de mosquitos; sin embargo, son muy contados los hongos que se han empleado para el control del vector del dengue, *Aedes aegypti* (Scholte *et al.*, 2004). En general, los hongos más usados contra mosquitos Culicidae son el Oomiceto *Lagenidium giganteum*, el cual incluso ya se maneja comercialmente. También Chytridiomiceto *Coelomomyces* y Deuteromicetos *Culicinomyces*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se han usado contra larvas de varias especies de mosquitos, incluyendo *Ae. aegypti* (Seymour, 1984). La clase Deuteromycetes (=Hyphomycetes), es la más importante en patología de insectos pues contiene a los entomopatógenos más relevantes para el control de insectos nocivos al humano, tanto en el ámbito agrícola como en el médico-veterinario. Los géneros más importantes para el control de mosquitos vectores son: *Culicinomyces*, *Beauveria*, *Metarhizium* y *Tolypocladium* (Scholte *et al.*, 2004). Sweeney (1981) obtuvo mortalidades del 100% en 24 horas de larvas de *Ae. aegypti* de primer y segundo instar utilizando *Leptolegnia chapmanii* y *Culicinomyces clavisporus*.

En una revisión realizada por Scholte y colaboradores (2004a) se menciona que *Leptolegnia chapmanii*, *Phythium* sp., *Lagenidium giganteum*, *Crypticola clavulifera*, *C. stegomyiae* var. *stegomyiae*, *Entomophthora culicis*, *Entomophthora musca*, *Erynia conica*, *Zoophthora radicans*, *Smittium* spp, *Beauveria tenella*, *Culicinomyces clavisporus*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Tolypocladium cylindrosporum*, se han probado o encontrado en larvas y adultos de *Ae. aegypti*.

McInnis y Zattau (1982) utilizaron al hongo *Leptolegnia chapmanii* contra larvas de primer y segundo estadio de *Aedes aegypti*, logrando un 100% de mortalidad 24 horas después de exposición. Por otro lado Sweeney (1981) trabajó con *Culicinomyces clavisporus* y mostró ser efectivo contra larvas de *Ae. aegypti*, a altas concentraciones de conidias, por lo tanto, resultó poco conveniente usarlo de manera comercial.

*Beauveria* sp. es uno de los hongos entomopatógenos más comunes y con un amplio rango de hospederos con el cual se han obtenido buenos resultados contra larvas de *Ae. aegypti* (Pinnock *et al.*, 1973; Roberts, 1974; Stolz, 1999). Contra adultos, Clark y sus colegas (1968) reportaron una mortalidad del 100% a los 5 días. Además, en el mercado se encuentran varios productos cuyo ingrediente activo es *B. bassiana*, sin embargo, no se reporta que ninguno de ellos haya sido probado para control de Culícidos (Scholte *et al.*, 2004a).

Roberts (1970) reporta en laboratorio larvas de *Ae. aegypti* susceptibles a conidias de *M. anisopliae* y Scholte y colaboradores (2007) encontraron una cepa del mismo hongo infectando a hembras de *Ae. aegypti* a una concentración de  $1.6 \times 10^{10}$  conidias/m<sup>2</sup>, obteniendo una TL<sub>50</sub> de 4.2 días. De igual forma Luz y colaboradores (2008), determinaron una alta mortalidad de huevos de *Ae. aegypti* infectados con conidias a alta humedad relativa.

### 3.8 Uso de hongos entomopatógenos en el control de mosquitos adultos

Por otro lado, el ascomiceto *Metarhizium anisopliae*, es uno de los patógenos más usados en biocontrol de insectos (Roberts, 1970). Sin embargo, no es patógeno natural de mosquitos; su virulencia fue reportada sobre larvas de *Ae. aegypti* desde hace tiempo, pero contra mosquitos adultos vectores se ha explorado sólo en estudios recientes (Scholte, 2003). Un aislado Africano de este hongo fue evaluado versus *Culex quinquefasciatus* y el vector de la malaria *Anopheles gambiae* (Scholte, 2004; Scholte, 2005; Scholte, 2006; Scholte, 2007), luego al mismo aislado lo evaluaron contra adultos de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* con resultados alentadores (De Paula, 2008).

En otro estudio se reportó buen potencial de aislados Brasileños de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* contra *Ae. aegypti* (Thomas, 2005). Sin embargo, en estos estudios la virulencia fue estimada por mosquitos expuestos a una superficie (tela negra) impregnada con conidias; en África la tela fue colocada sobre el techo dentro de las casas, con impacto significativo en las poblaciones de *Ae. gambiae*, pero el método fue criticado porque además de controlar la malaria también

era un riesgo para alergias y enfermedades respiratorias (EPA, 2003). No obstante, la Agencia de Protección Ambiental de EEUU ha aprobado bioinsecticidas en base a *M. anisopliae* (Khan, 2003). Además, las alergias pueden tener también un origen natural porque normalmente existen cargas altas de conidias de estos hongos en el aire dentro de casas rurales y urbanas (Adhikari, 2004, Spielman, 1964).

Aun así, es necesario buscar alternativas para inocular y diseminar estas micosis en las poblaciones del vector del dengue, con un riesgo mínimo para la salud pública. Hasta donde se sabe, sólo existe un estudio sobre la diseminación de conidias de *M. anisopliae* por cópula en mosquitos vectores, pero fue de hembras infectadas a machos sanos del vector de la malaria *An. gambiae*; reportaron que una sola hembra expuesta a una dosis alta de conidias se impregnó con un máximo de 25 esporas (Scholte, 2005). Por la poligamia masculina en *Ae. aegypti*, la liberación en campo de machos vírgenes impregnados con conidias de *M. anisopliae*, las pueden diseminar hacia las hembras por comportamiento de cópula y matarlas, pero esto sería la meta final después de estudios de laboratorio y campo.

Se reporta de igual manera la transmisión horizontal de *M. anisopliae* en otros insectos (Kaaya y Okech, 1990; Butt *et al.*, 1998) y en Dípteros (*Anopheles gambiae*) (Scholte *et al.*, 2004b), lo que indica la capacidad de diseminación del hongo, una gran ventaja de los controladores biológicos sobre los sintéticos.

Por estas razones la importancia de profundizar el estudio del impacto de infección fúngica, en el ciclo de vida y la reproducción de los mosquitos vectores, para determinar de esta forma la potencialidad de su uso no sólo para matar a un segmento poblacional, sino también para evaluar el efecto en las cadenas de transmisión.

### 3.9 Formulaciones de hongos entomopatógenos para su uso como controlador biológico

Una formulación consiste en lograr homogeneidad y distribución del ingrediente activo para una mejor manipulación y aplicación, de modo que se incremente su eficiencia. Para lograr esto se adicionan materiales inertes, emulsificantes,

protectores UV, solventes, vehículos entre otros (Butt y Goettel, 2000; Monzón, 2001).

En el caso de las formulaciones usadas en hongos, estas pueden modificar algunas de sus características como controladores biológicos para poder prolongar la vida de anaquel (Monzón, 2001) y aumentar la eficiencia en el campo y se puedan proteger contra la desecación y la radiación UV, algunas formulaciones incrementan la virulencia al facilitar la adhesión de las conidias a la cutícula del insecto y estimulan la germinación (Blutt y Goettel, 2000).

En algunos estudios se han realizado formulaciones de *M. anisopliae* en aceites vegetales, y se ha demostrado que se incrementa el tiempo de viabilidad y la actividad en comparación con las conidias secas no formuladas (Batta, 2003). Los entomopatógenos pueden crecer en medios artificiales muy simples como en peptonas. El triptófano y el ácido glutámico estimulan el crecimiento y la esporulación de estos (Sorokin, 1983). El crecimiento y la esporulación de los hongos de forma masiva y prolongada hacen que las conidias se propaguen de un individuo a otro dentro de una población, por lo que hace a la cepa virulenta y con capacidad de transmitirse. La virulencia se mide mediante el uso de un bioensayo que en el caso de entomopatógenos se emplean tres pruebas (Sorokin, 1983):

**Prueba de patogenicidad:** la cual se determina si un agente biológico es capaz de causar enfermedad o no, en el insecto a una dosis establecida.

**Intervalo de respuesta biológica:** en este generalmente se prueban de dos a cuatro dosis que permiten establecer o determinar la concentración mínima que mate al 100 % de la población y la que ocasione 0 % de mortalidad.

**Experimento:** en el ensayo se toman los insectos vivos como objeto de medición y se establece el parámetro biológico que se utilizará o las variables de competencia vectorial (mortalidad, longevidad, fecundidad, fertilidad, tasa de inseminación); esto permite determinar la  $CL_{50}$  (concentración que representa el 50% de mortalidad de los insectos tratados) y la  $TL_{50}$  (tiempo en que se alcanza el 50 %

de mortalidad de los insectos tratados a una dosis determinada) y además permite definir la concentración o dosis a aplicar en campo.

El dengue es causado por cuatro serotipos de un flavivirus del mismo nombre, lo que dificulta la creación de una vacuna eficiente contra los cuatro serotipos. Por ello, el control biológico del vector se presenta como una alternativa viable para disminuir la propagación de la enfermedad. Impulsada además por el creciente interés en la búsqueda de alternativas para control de plagas, que sean más eficientes y amigables ecológicamente. Otra ventaja del biocontrol, es que exhibe una baja o nula probabilidad de que los organismos blanco desarrollen resistencia y que los enemigos naturales usados sean inocuos para el hombre y otros organismos no blanco (Scholte *et al.*, 2004a).

De esta forma, se utilizan virus, bacterias, protozoarios, nematodos, hongos, e insectos, para disminuir la expansión de plagas de insectos (Scholte *et al.*, 2004a). En estudios anteriores se ha demostrado que el uso de hongos contra insectos es de alta potencialidad, ya que inducen la muerte por la producción de múltiples toxinas, lo que reduce la posibilidad del desarrollo de resistencia (Zimmerman, 1993; EPA, 2001; Scholte *et al.*, 2004a). De ahí parte la importancia de profundizar el estudio del impacto de la infección fúngica, en el ciclo de vida y la reproducción de los mosquitos vectores, para determinar de esta forma la potencialidad de su uso no sólo para matar a un segmento poblacional, sino también para evaluar el efecto en las cadenas de transmisión en las poblaciones humanas endémicas para dengue.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Localización de los experimentos

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Entomología Urbana del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, donde se estableció una colonia de mosquitos de *Ae. aegypti*. Los aislados de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* se realizaron en el laboratorio de micología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

### 4.2 Experimento 1. Evaluación de cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* aislados en México.

#### 4.2.1 Cría de *Aedes aegypti*

Se utilizó una colonia de *Aedes aegypti* originaria de Monterrey, Nuevo, León, establecida en el laboratorio en septiembre del 2008. En julio de 2009, huevos de esta colonia fueron transportados al Insectario de Entomología Urbana del Colegio de Postgraduados, en Texcoco, Estado de México, para establecer el pie de cría utilizado en los tres experimentos de este estudio. La eclosión de huevos se indujo, sumergiendo los huevos en agua tibia (35°C) y se les adicionó 0.5 g de extracto de levadura. Las larvas se alimentaron diariamente con 0.5g de comida para peces distribuida uniformemente en la superficie. Aproximadamente 12 días después de eclosionados los huevos, emergieron los adultos, los cuales se identificaron como *Ae. aegypti*. Machos y hembras se confinaron de manera separada en una jaula de 60x60x60 cm de tamaño y se mantuvieron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo de 12 h. y una humedad relativa de  $55 \pm 10\%$ . Durante 3-5 días, los mosquitos se alimentaron con una solución de sacarosa al 10%, suministrada en algodón colocado en un vial de 500 mL. (Figura 1).



**Figura 1. Cría de mosquito *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio, en Texcoco, Estado de México.**

#### 4.2.2 Aislamiento de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*

Las cepas evaluadas se aislaron de diferentes localidades (Cuadro 1), principalmente de suelo y de insectos micosados. Para extraer las conidias del suelo se utilizó como cebo a larvas de *Spodoptera sp.* (Figura 2) y pasándolas después a cajas Petri con medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Una vez que se obtuvieron las cepas aisladas de insectos, éstas se crecieron directamente en medio de PDA, las cajas se incubaron en oscuridad y a una temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Las colonias se purificaron por la técnica de cultivos monospóricos, tomando una pequeña porción del medio con conidios con una aguja de disección y se diluyó en tubos de ensaye de 18x150, conteniendo 10 mL de agua destilada esterilizada, y se agitó durante cinco segundos (tres veces para cada tubo). Del tubo se tomó una muestra de 1 mL de solución y se pasó a cajas Petri con medio PDA. Para obtener una colonia pura de cada hongo, a las 24h se tomó un conidio germinado con ayuda de un microscopio estereoscópico (American Optical®) y con la punta de una aguja fina, se transfirió a un nuevo medio PDA, y se incubó en laboratorio. Los hongos se identificaron, preparando montajes para su observación en microscopio compuesto (American Optical®), para lo cual se puso una gota de lactofenol azul al 50% en un portaobjetos y se colocó una pequeña porción de micelio con una aguja de disección, posteriormente se depositó el cubreobjetos para su observación al microscopio. 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).

**Cuadro 1. Cepas aisladas de *Metarhizium anisopliae* (H-M) y *Beauveria bassiana* (H-B) diferentes lugares de México, en distintas áreas.**

#	Lugar de colecta	Cepa ( clave)	Fecha	Aislado de
1	Chapingo, Edo. Méx.	H-B8	23/julio/2009	Suelo, pasto-jardín
2	Chapingo, Edo. Méx.	H-M6	23/julio/2009	Suelo, pasto-jardín
3	Cuernavaca, Mor.	H-B6	15/agosto/2009	Suelo, alfalfa
4	Cuernavaca, Mor.	H-M8	15/agosto/2009	Suelo, pasto
5	La Ceiba, Pue.	H-B7	22/agosto/2009	Suelo, pasto
6	Marín, NL	H-B3	25/abril/2009	Suelo, malezas
7	Marín NL	H-B5	25/abril/2009	Suelo, pasto
8	Metztitlan, Hgo.	H-B4	08/agosto/2009	Suelo, pasto
9	Metztitlan, Hgo.	H-M3	08/agosto/2009	Suelo, en pasto con nogal
10	Sahuayo, Mich.	H-M1	05/septiembre/2009	Suelo agrícola
11	Sahuayo, Mich.	H-M2	05/septiembre/2009	Coleóptera ( <i>Calosoma</i> )
12	Tepetlixpa, Edo. Méx.	H-M4	15/agosto/2009	Suelo, malezas
13	Texcoco, Edo. Méx.	H-B1	24/julio/2009	Suelo, pasto
14	Texcoco, Edo. Méx.	H-M5	24/julio/2009	Suelo, hortalizas
15	Tulancingo, Hgo.	H-M7	22/agosto/2009	Suelo, pasto
16	Zuazua, NL.	H-B2	25/abril/2009	Coleóptera ( <i>Aphodius sp.</i> )



**Figura 2. Larva de *Spodoptera sp.* se utilizó para aislar hongos entomopatógenos que se encontraron en el suelo de las diferentes localidades.**

#### 4.2.3 Obtención de conidias de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*

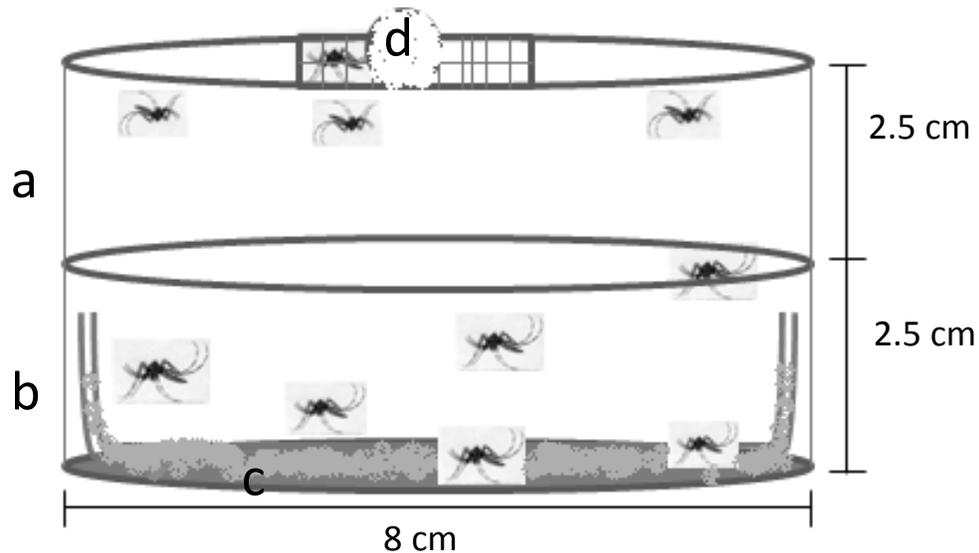
La cosecha de conidias de cada cepa se realizó adicionando 5 mL de solución salina 0.85% (0.85% NaCl más 0.25% Tween 20) a cada caja Petri y removiendo las conidias con una espátula de vidrio. El material removido se transfirió a tubos de centrifugación de 50mL y la suspensión de conidias resultante se centrifugó a 5000 rpm durante 3 min. Se removió parte del sobrenadante y la suspensión de conidias se homogenizó agitando 5 min en un Vortex. La concentración de conidias se determinó realizando conteos en una cámara de Neubauer® y un microscopio de luz a 40X, y esta fue utilizada como solución madre. A partir de esta solución madre, se realizó una dilución de  $6 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup> en solución salina 0.85% Tween 20 al 0.25%, de cada una de las cepas.

Para obtener conidias secas para infectar a los mosquitos, se realizaron filtraciones utilizando un sistema de filtración al vacío Corning® de 500 mL, con filtro de acetato de celulosa de 0.22µm, al cual se le adaptó un papel filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm Whatman de 38 cm<sup>2</sup> estéril. Se filtraron 5 mL de la dilución. Como control se filtraron 5 mL de la solución salina. Los papeles filtro se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. para luego ser utilizados en el bioensayo de patogenicidad.

#### 4.2.4 Evaluación de cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*

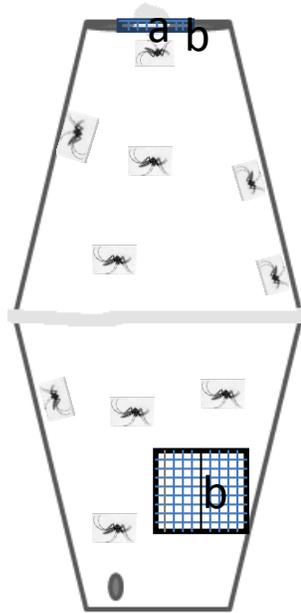
Los papeles filtro impregnados con las conidias secas, se colocaron en la cámara de infección, la cual consistió de la unión de dos bases de cajas Petri estériles de plástico selladas con parafilm, de 8 cm de diámetro y 2.5 cm de alto, para dar un volumen experimental total de 251.3 cm<sup>3</sup> (Figura 3). En el centro de la parte superior se realizó una perforación de 2.5 cm de diámetro, la cual fue cubierta con una malla fina (tul). En la cámara de infección se introdujeron 10 hembras *Ae. aegypti* nulíparas de 3-5 días de edad con ayuda de un aspirador bucal, las cuales permanecieron en contacto con las conidias durante 48 h bajo un régimen de 12:12 luz:oscuridad. En el centro de la tapa se colocó una mota de algodón impregnado

con solución azucarada al 10% (Figura 3a), para que las hembras se alimentaran durante el tiempo de exposición. Después de 48 h los mosquitos se transfirieron a recipientes cilíndricos estériles de 2000 cm<sup>3</sup> (Figura 4), donde se les proporcionó una solución de sacarosa al 10%.



**Figura 3. Cámara de infección, a) base invertida de una caja Petri, b) base de caja Petri c) papel filtro con conidias, d) mota de algodón impregnada con azúcar al 10%. En el centro de la parte superior se realizó una perforación de 2.5 cm de diámetro, la cual fue cubierta con una malla fina.**

Los bioensayos se realizaron con tres repeticiones por tratamiento, donde la mortalidad se registró diariamente. A partir de las 24 h post-exposición, los mosquitos muertos se retiraron de los recipientes utilizando pinzas estériles y se colocaron sobre cajas Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se sellaron e incubaron a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y después de 5 días se observaron al microscopio estereoscópico para evidenciar cualquier crecimiento fúngico.



**Figura 4. Recipientes cilíndricos estériles de 2000 cm<sup>3</sup> (12 cm de diámetro x 18 cm. de altura), donde se mantuvieron los mosquitos infectados y no infectados a) mota de algodón impregnado con sacarosa al 10% b) perforación cubierta con malla fina.**

#### 4.3 Experimento 2. Transmisión de *Metarhizium anisopliae* de mosquitos machos a hembras de *Aedes aegypti*

##### 4.3.1 Cría del mosquito *Aedes aegypti*

Para este experimento se criaron los mosquitos como se menciona en el experimento 1 y como se muestra en la figura 5 y en la figura 6. Machos y hembras adultos de 3 a 5 días de edad fueron utilizados para exponerlos al hongo *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio.



Figura 5. a) Recipiente con papel estroza y agua limpia usada para oviposición de huevecillos, b) Hamster para alimentar las hembras de *Aedes aegypti* y c) jaula de tul donde se criaron los mosquitos.

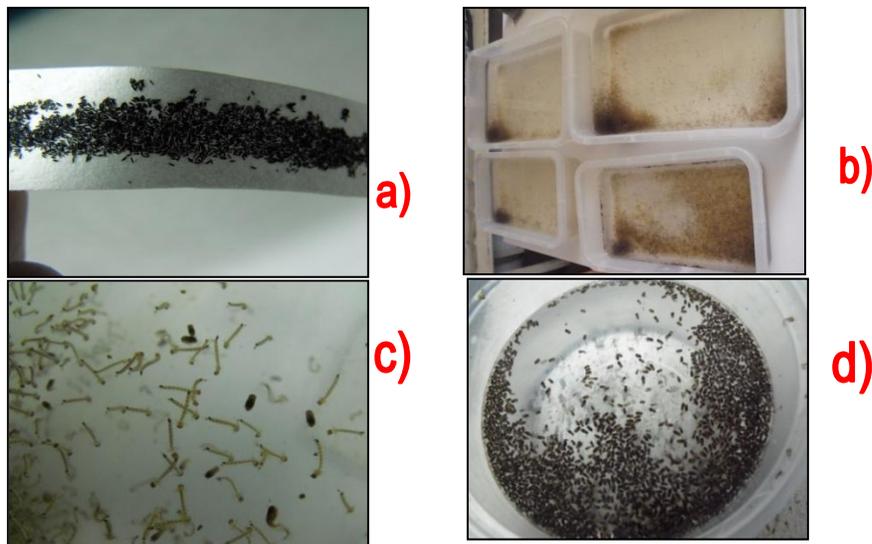


Figura 6. a) Huevos en papel estroza donde ovipositaron las hembras de *Aedes aegypti*, b) y c) desarrollo de larvas de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio y d) pupas en recipiente con agua dentro de la jaula.

#### 4.3.2 Colecta de *M. anisopliae*

Se trabajó con el aislado H-M5 colectado en Texcoco, México, el cual resultó el más virulento al ser pasado en medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA), y luego por un huésped vivo que en este caso fueron hembras de *Ae. aegypti*. La incubación fue a 24°C en oscuridad durante 15 días (tiempo de esporulación). Después de la esporulación, fueron pasados nuevamente en PDA y de ahí se cosecharon las conidias para el estudio usando 5 ml de Tween 20 al 0.25% en solución salina al 0.85% en cada caja Petri y con una espátula se agitó la solución sobre el hongo para

desprender las conidias y después la suspensión se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Una vez cosechadas 25 cajas Petri, se contaron las conidias con una cámara de Neuvauer. Se hicieron diluciones hasta una concentración de  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ , luego se centrifugó a 5,000 rpm por 5 minutos, el pellet se resuspendió en 10ml de la misma solución de Tween, y se vertió sobre un filtro Whatman de 9 micras; con un extractor Corning se removió el líquido y la capa de conidias sobre el filtro, se secó en laboratorio a  $25^{\circ}\text{C}$  y 70% H.R. durante 48 horas.

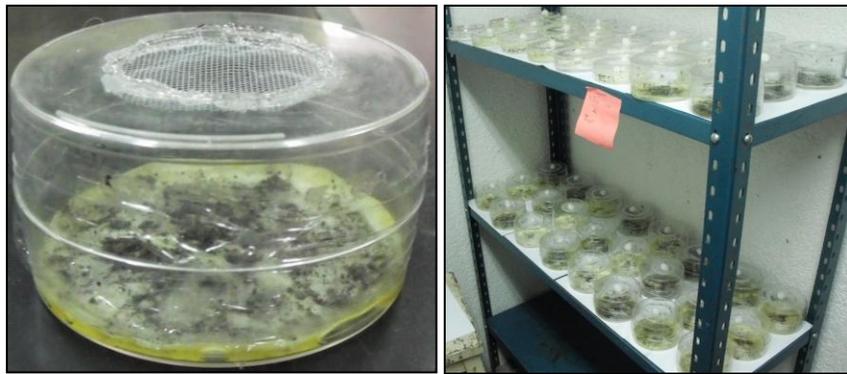
#### 4.3.3 Diseño experimental

El bioensayo fue para estimar la diseminación de la cepa H-M5 de *Metharizium anisopliae* por comportamiento copulatorio de machos a hembras. Se usó un diseño en bloques al azar con dos tratamientos y dos repeticiones. Se preparó un filtro con  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  del aislado H-M5. Posteriormente 10 machos vírgenes de 5 días de edad fueron confinados en una cámara para el aislado por 48 horas. Luego se prepararon cuatro cámaras de exposición con 20 hembras vírgenes de 5-8 días de edad en cada una. Dos machos previamente expuestos al H-M5, fueron introducidos individualmente en dos cámaras (Figura 7). El control comprendió dos cámaras con un macho sano de 5 días de edad en cada una. El bioensayo se corrió hasta que murió la última hembra. Para cada una, inmediato a su muerte, las espermatecas fueron disecadas para registrar inseminación y distinguir hembras copuladas exitosamente. Después los cadáveres fueron puestos en cámara húmeda para confirmar esporulación. Las variables dependientes fueron: tasa media de infección total (% de hembras esporuladas por tratamiento), tasa media de infección por cópula (% de esporuladas e inseminadas), tasa media de infección por otros contactos físicos como intentos de cópula (% de esporuladas no inseminadas), y la longevidad expresada por la media en días del tiempo de vida por tratamiento.

También se examinó el efecto del hongo transmitido por comportamiento de cópula sobre fecundidad. Las 20 hembras de cada tratamiento fueron confinadas por 48h con el macho en vasos de plástico de 1 L tapado con tul; luego a través de la

tela las hembras fueron alimentadas con sangre a las 12h del confinamiento sobre el antebrazo del mismo voluntario.

A las 48 h, fueron transferidas individualmente a vasos de plástico de 250 ml cubiertos con tul, que ya tenían un vaso de vidrio de 20 ml con agua destilada y un cartoncillo blanco de 10x3cm para ovoposición. En total fueron 80 vasos en el bioensayo, 40 por tratamiento, y se trabajó hasta la muerte de la última hembra. Los ovarios fueron disectados para contar huevos retenidos, aparte de los puestos en el cartón blanco, para cada hembra. La fecundidad se calculó a partir de los huevos retenidos más los puestos.



**Figura 7. Cámaras con filtro impregnado con conidias de *Metathizium anisopliae* bajo condiciones de laboratorio.**

#### 4.4 Experimento 3. Transmisión de *Beauveria bassiana* de mosquitos machos a hembras de *Aedes aegypti*

##### 4.4.1 Cría de Mosquitos *Aedes aegypti*

Una colonia de *Ae. aegypti* colectada en Monterrey, N.L., México fue establecida bajo condiciones de laboratorio para su reproducción, bajo el mismo procedimiento que se describe en el experimento 1 y 2.

##### 4.4.2 Preparación de la suspensión conidial de *Beauveria bassiana*

Ocho cepas de *B. bassiana* descritos en la tabla 2 fueron colectadas en diferentes localidades (Estados) en México y cultivadas en PDA y luego pasadas a hembras de *Ae. aegypti* para evaluar su virulencia. La cepa más virulenta y la cepa

menos virulenta fueron evaluadas en este experimento. Las dos cepas fueron cultivadas en PDA y se incubaron a 25°C durante 20 días para la producción de conidios. Una vez realizado lo anterior se cosecharon conidias para el estudio usando Tween 20 al 0.25% y cloruro de sodio al 0.85% con agua destilada esterilizada (5 ml de Tween 20 en 1 litro de solución salina) en cada caja Petri y usando una espátula pequeña se removieron las conidias, para después pasar la dilución en un matraz Erlenmyer de 250 ml. En total se utilizó el micelio de 15 cajas Petri el cual fue contado con un hemacitometro (Fisher®). Las diluciones fueron a una concentración de  $6 \times 10^8$  conidias/ml<sup>-1</sup>, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, el pellet se resuspendió en 10 ml de solución Tween, y se pasó sobre un filtro Whatman de 9 micras el cual se secó en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25 °C y una H.R del 70 %, durante 48 horas.

#### 4.4.3 Efecto de la Infección en mosquitos adultos

Se evaluó el impacto de los conidios transmitidos por el comportamiento de cópula sobre la supervivencia, infección (inseminación), mortalidad y fecundidad de las hembras por el efecto de la cópula de los machos.

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, los cuales eran la cepa más virulenta (H-B2) y la cepa menos virulenta (H-B4) que fue resultado del ensayo 1, más el control (papel filtro impregnado con agua destilada esterilizada); cada uno con dos repeticiones (20 hembras por repetición). Se preparó un filtro con  $6 \times 10^8$  conidias ml<sup>-1</sup> de cada cepa, y posteriormente 10 machos vírgenes de 5 días de edad fueron expuestos durante 48 horas en una cámara. Así, cuatro machos contaminados (dos de cada cepa) fueron transferidos individualmente en dos cámaras hechas con dos vasos de plástico de 1 litro de capacidad (Figura 8), que contenían una torunda de algodón con solución de sacarosa al 10% sobre una abertura cubierta con tul, donde estuvieron expuestas 20 hembras de 6-8 días de edad. Machos sin ser expuestos a ninguna cepa se colocaron con veinte hembras cada uno en una cámara los cuales funcionaron como control. Las hembras de cada cámara, fueron expuestas durante 48 horas con el macho y en las seis primeras horas de confinamiento se alimentaron con sangre de hámster. Después las

hembras fueron transferidas individualmente a viales con una torunda de algodón con solución azucarada al 10% y con una tira de papel húmedo para la oviposición (en total fueron 120 vasos en el bioensayo). Todas las hembras inmediatamente después de su muerte se disecaron para comprobar la presencia de esperma en las espermatecas y poder registrar inseminación y distinguir hembras copuladas exitosamente y ver la retención de huevos totalmente desarrollados en los ovarios, también se contaron los huevos puestos en la tira de papel húmedo. La fecundidad fue considerada como la suma de huevos puestos y los conservados en el primer ciclo gonotrófico (huevos retenidos) para cada hembra. Después de la disección los cadáveres fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 1% durante 20 segundos y luego se lavaron dos veces en agua destilada esterilizada durante 20 segundos. Todos los cadáveres fueron colocados en cámara húmeda (caja Petri) para ver la esporulación y confirmar la muerte por el hongo. Las variables dependientes fueron: tasa media de infección total (% de hembras esporuladas por tratamiento), tasa media de infección por cópula (% de esporuladas e inseminadas), tasa media de infección por otros contactos físicos como intentos de cópula (% de esporuladas no inseminadas), y la longevidad expresada por la media en días del tiempo de vida por tratamiento.



**Figura 8.** Cámara de exposición de *Ae. aegypti* a  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  de *B. bassiana*. Un pedazo de algodón mojado con sacarosa al 10% fue colocado sobre la red para que se alimentaran.

#### 4.5 Análisis estadísticos

Para el experimento 1, se utilizó el programa estadístico SAS versión 9.1 para análisis de las variables dependientes de sobrevivencia y mortalidad. Las variables de mortalidad y micosidad fueron usadas para comparar las curvas de sobrevivencia y para determinar el tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ), analizándolos mediante la comparación del modelo de Kaplan-Meier.

En el experimento 2 y 3, cada curva fue calculada reuniendo los datos de cada tratamiento, utilizando el análisis de discrepancia (ANVA). La mortalidad y tasa de infección por cópula (hembras inseminadas y esporuladas), intento de cópula (hembras no inseminadas y esporuladas), media de huevos por hembra y la fecundidad fueron analizados por ANVA y comparadas por prueba multiple de Ryan.

Todos los análisis estadísticos se hicieron con el programa SAS versión 9.1. (SAS, 1985).

## 5. RESULTADOS

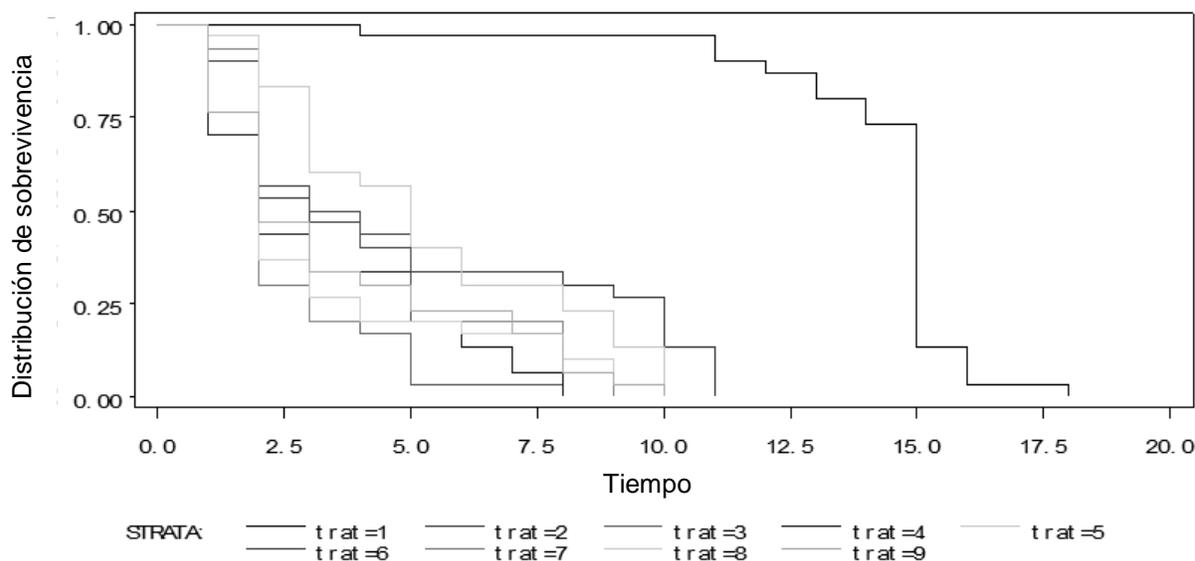
### 5.1 Experimento 1. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* aislados en México.

Se evaluaron ocho aislados de *B. bassiana* de los cuales se seleccionaron los tres mejores. La concentración empleada fue de  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  por aislado, impregnadas en papel filtro. Se usaron 30 hembras de *Ae. aegypti* confinadas por 48 h en cajas Petri. Para los bioensayos con papel filtro, los aislados más virulentos fueron tres de *B. bassiana* con un  $\text{TL}_{50}$  de 2.7, 3.2 y 3.3 días respectivamente, comparado con el control que mostró una  $\text{TL}_{50}$  de 14.2 días (Cuadro 2.), (Figura 9).

**Cuadro 2. Valores de  $\text{TL}_{50}$  de ocho aislados de *Beauveria bassiana* donde se expusieron durante 48 hrs. hembras de *Ae. aegypti*.**

<b>Aislado</b>	<b><math>\text{TL}_{50} \pm \text{E.E}</math></b>	<b>P</b>
Control	14.26 $\pm$ 0.43	<0.0001
H-B1	5.03 $\pm$ 0.69	<0.0001
H-B2	2.70 $\pm$ 0.29	<0.0001
H-B3	3.20 $\pm$ 0.42	<0.0001
H-B4	5.33 $\pm$ 0.53	<0.0001
H-B5	4.0 $\pm$ 0.46	<0.0001
H-B6	3.30 $\pm$ 0.47	<0.0001
H-B7	3.46 $\pm$ 0.47	<0.0001
H-B8	3.60 $\pm$ 0.51	<0.0001

P: (P<0.0001), análisis de significancia de acuerdo a la prueba de Kaplan-Meier, utilizada.



**Figura 9. Análisis de sobrevivencia de *Ae. aegypti* expuestos durante 48 horas a ocho cepas diferentes de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio. En el eje de las X se muestra el tiempo de sobrevivencia de los mosquitos hembra expuestos al hongo y en el eje Y se muestra la distribución en función de la sobrevivencia de los mosquitos hembra.**

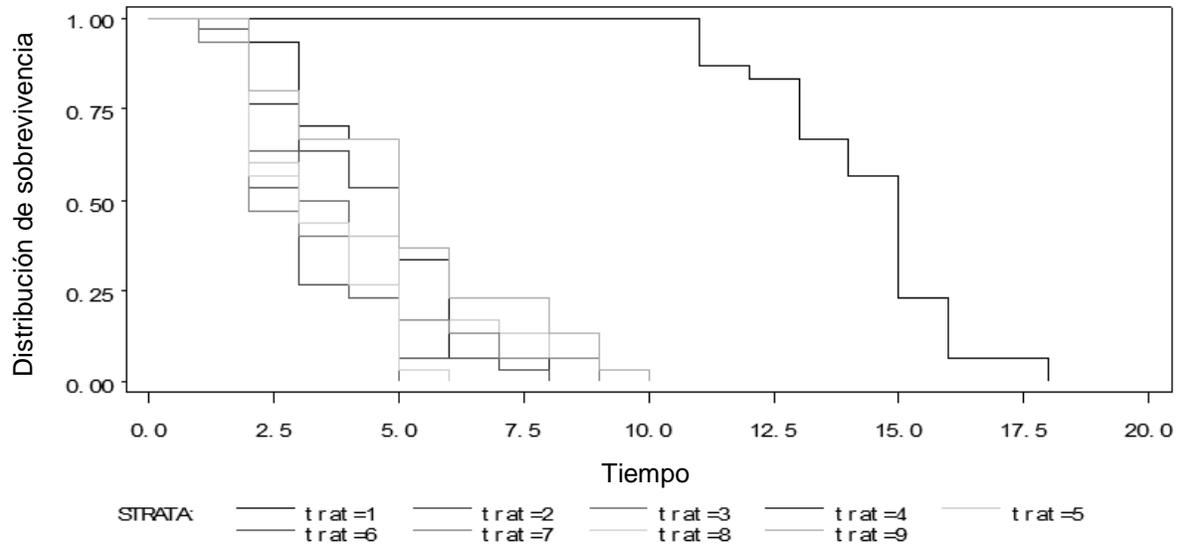
Del mismo modo ocho aislados de *M. anisopliae* fueron evaluados y cuatro fueron seleccionados como mejores. La concentración usada fue de  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  por aislado. Se usaron 30 hembras de *Ae. aegypti* confinadas por 48h en cajas Petri. Para los bioensayos con papel filtro, los aislados más virulentos fueron cuatro de *M. anisopliae* con una  $TL_{50}$  de 3.3, 3.2, 3.5 y 3.3 días respectivamente, comparado con el control que mostró una  $TL_{50}$  de 14.3 días (Cuadro 3) (Figura 4).

**Cuadro 3. Valores de  $TL_{50}$  de aislados de *M. anisopliae* donde se expusieron durante 48 hrs. hembras de *Ae. aegypti*.**

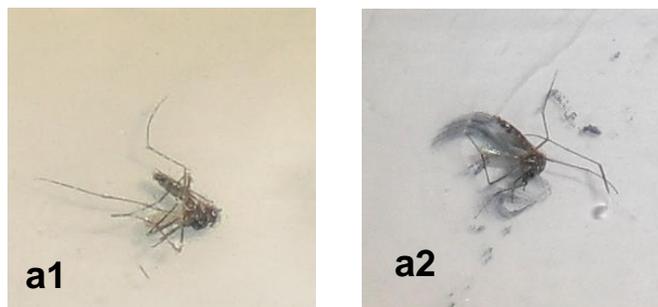
Aislado	$TL_{50} \pm E.E$	P
Control	$14.3000 \pm 0.3462$	<0.0001
H-M1	$4.6000 \pm 0.4057$	<0.0001
H-M2	$3.3667 \pm 0.2222$	<0.0001
H-M3	$4.7667 \pm 0.2864$	<0.0001
H-M4	$4.0000 \pm 0.4315$	<0.0001
H-M5	$3.2000 \pm 0.3048$	<0.0001

H-M6	3.5000±0.4061	<0.0001
H-M7	3.3000±0.2452	<0.0001
H-M8	5.1333±0.4465	<0.0001

**P: (P<0.0001), análisis de significancia de acuerdo a la prueba de Kaplan-Meier, utilizada.**



**Figura 10. Análisis de supervivencia de *Ae. aegypti* expuestos durante 48 horas a ocho cepas diferentes de *Metharizium anisopliae* bajo condiciones de laboratorio. En el eje de las X se muestra el tiempo de supervivencia de los mosquitos hembra expuestos *M. Anisopliae* y en el eje Y se muestra la distribución en función de la supervivencia de los mosquitos hembra.**



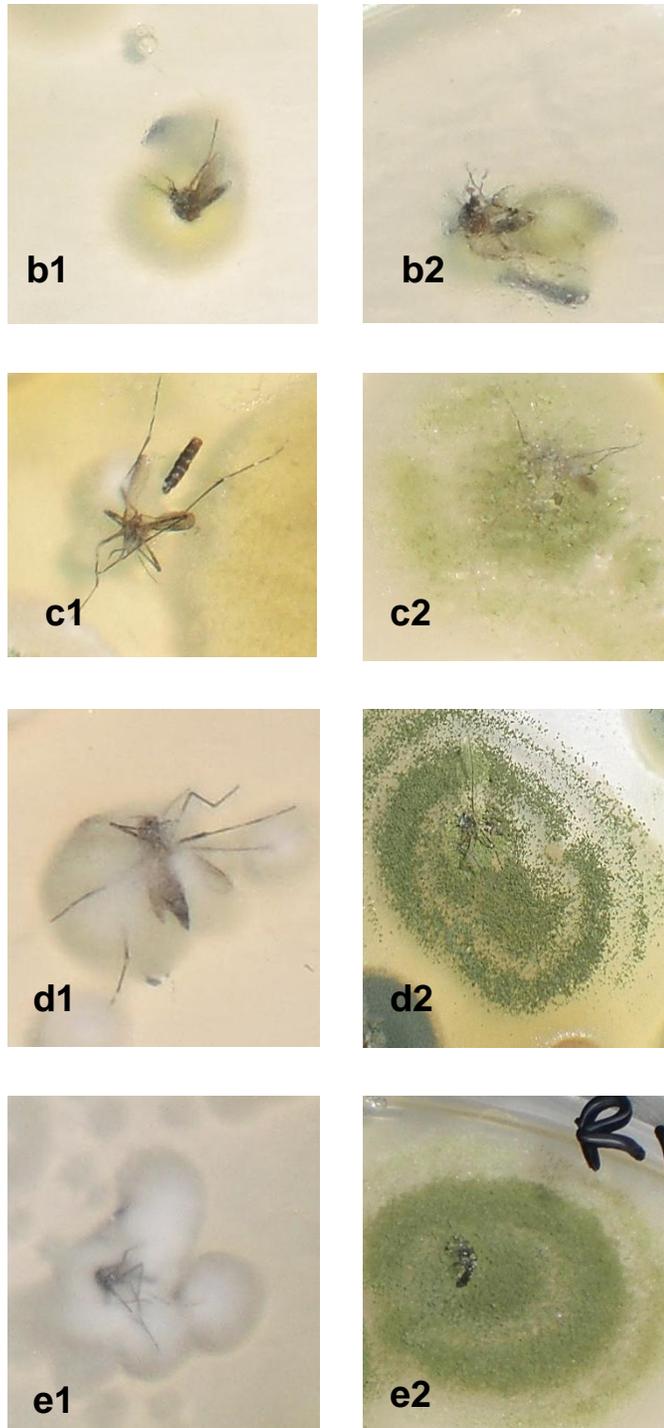


Figura 11. Mosquitos hembras con crecimiento de hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a) 3 dde b) 4 dde c) 5 dde d) 6 dde e) 7 dde. dde: días después de exposición.

## 5.2 Experimento 2. Transmisión de *Metarhizium anisopliae* de mosquitos machos a hembras de *Aedes aegypti*

Con el primer bioensayo se determinó la virulencia de los aislados de *M. anisopliae* por exposición directa de hembras de *Ae. aegypti* a  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ . El H-M5 resultó altamente virulento con un  $\text{TL}_{50}$  fue de  $3.20 \pm 0.70$  días y el del control fue de  $24.50 \pm 0.93$  días (Figura 12). En este experimento se demuestra que *M. anisopliae* es transmitido por comportamiento copulatorio de machos a hembras de *Ae. aegypti*. El Cuadro 4 muestra que la tasa de infección de hembras confinadas con el macho contaminado con el H-M5 fue del 90%. En las hembras con machos tratados, no hubo ninguna inseminada sana, la mayoría de las infectadas no fueron inseminadas y también hubo una tasa muy baja de no inseminadas no infectadas. Sólo una sexta parte de las infectadas con dicho hongo fueron inseminadas (15%); la tasa de infección fue menor a la de inseminación (50%) del control ( $F = 30.17$ ,  $p=0.01$ ). El mismo Cuadro 1 muestra la duración de cada tratamiento; en el H-M5 se observó que las hembras murieron en 14 días, con un tiempo mediano de siete. Este tiempo corto contrasta con los días que duraron las hembras expuestas al macho del control (Figura 12).

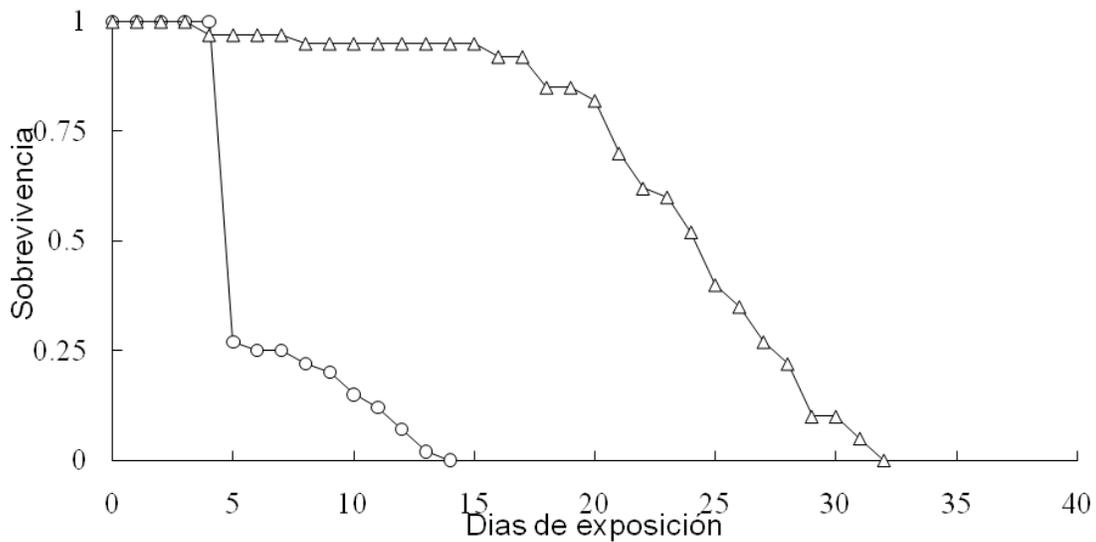
**Cuadro 4. Tasa de infección (%  $\pm$  ES1) en hembras de *Aedes aegypti* confinadas con un macho previamente contaminado por  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  de *Metarhizium anisopliae* y tiempo de confinamiento por tratamiento (dos repeticiones por tratamiento y 20 hembras por repetición).**

Trat. <sup>2</sup>	Esporuladas infectadas		No inseminadas sanas	Infección Total	Con. (días) <sup>3</sup>
	Inseminadas	No inseminadas			
H-M5	0.15 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	14
Control	0.50 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0.50 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	50

<sup>1</sup>ES = Error estándar.

<sup>2</sup>Trat = tratamiento: Las medias con la misma letra son iguales significativamente ( $P > 0.05$ ) dentro de la misma columna, de acuerdo a una prueba de Ryan de comparación múltiple. En el control el macho fue sano.

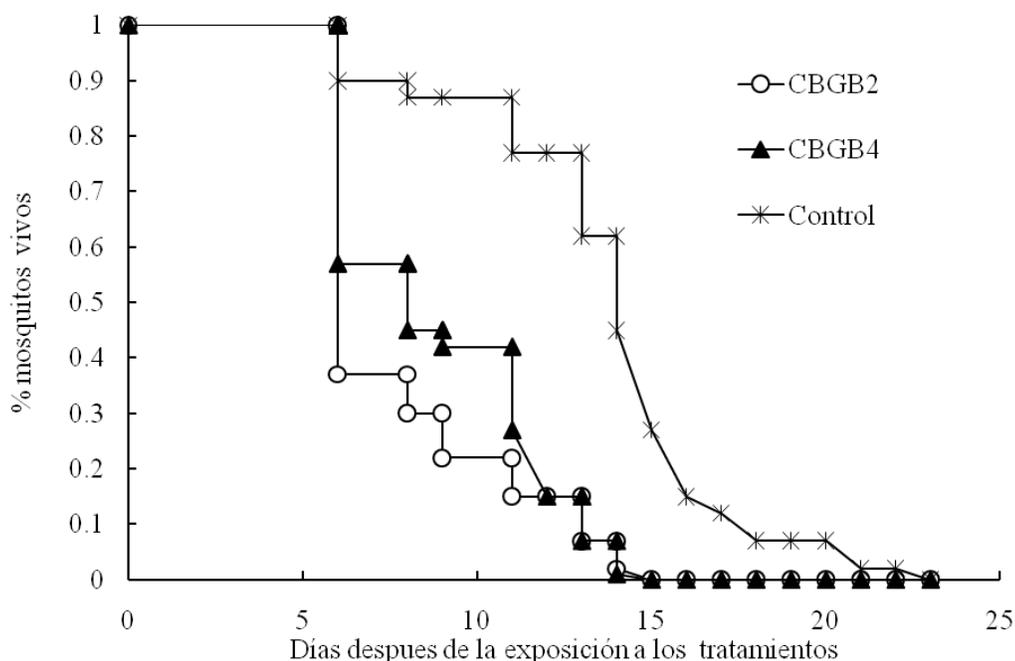
<sup>3</sup>Con.=confinamiento: Es el tiempo total en que las hembras se mantuvieron confinadas con el macho impregnado de conidias, hasta la muerte de la última hembra.



**Figura 12. Análisis de supervivencia en hembras de *Aedes aegypti* confinadas con un macho previamente contaminado por  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  de *Metarhizium anisopliae* y tiempo de confinamiento por tratamiento (dos repeticiones por tratamiento y 20 hembras por repetición).**

### 5.3 Experimento 3. Transmisión de *Beauveria bassiana* de mosquitos machos a hembras de *Aedes aegypti*

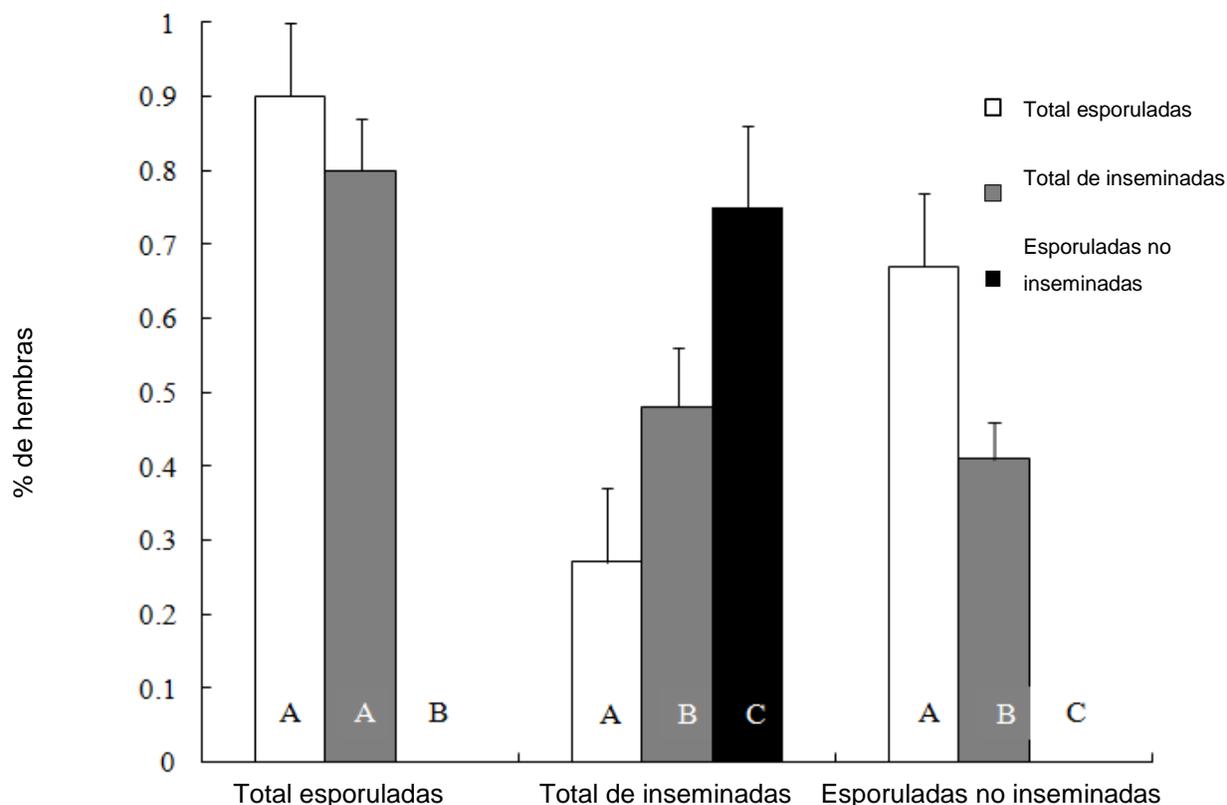
La figura 13 muestra las curvas de supervivencia de las hembras expuestas a un macho inoculado con cada uno de los aislados de *Beauveria bassiana* (virulencia alta: H-B2 y virulencia baja: H-B4) y el control. Cada curva describe la probabilidad diaria de muerte para todos los individuos por tratamiento, dado por el modelo Kaplan-Meier. La  $TL_{50}$  fue de  $7.92 (\pm 0.46)$ ,  $8.82 (\pm 0.48)$ , y  $13.92 (\pm 0.58)$  días para el H-B2, H-B4, y el control, respectivamente ( $g.l = 2$ ,  $p < 0.0001$ ). En promedio, entre los cuarenta mosquitos hembra colocados con el macho contaminado con el H-B2, resultaron 36 hembras contaminadas (9 con huevos y 27 sin huevos) mientras que las hembras que no contaminadas, dos pusieron huevos y las otras dos no pusieron. De las cuarenta hembras que se expusieron con el macho inoculado con el H-B4, resultaron 31 micosadas (15 con huevos y 16 sin huevos) y 9 no micosadas, de las cuales tres pusieron huevos y seis no pusieron huevos.



**Figura 13. Supervivencia acumulativa proporcional dado por el modelo de Kaplan-Meier para cuarenta hembras (por tratamiento) de *Ae. aegypti* expuestas a un macho virgen antes inoculado con los dos aislados de *B. bassiana* a  $6 \times 10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  y el Control (macho sano). La mortalidad por el hongo fue demostrada por esporulación en cadáveres de mosquitos hembra.**

Las hembras muertas mostraron micosidad, y pusieron huevos antes de su muerte causada por la infección del hongo adquirida por la cópula donde ocurrió la inseminación. Mientras aquellos que esporularon sin poner huevos comprendió el sector de hembras muertas por el patógeno, pero donde las infecciones fueron transmitidas por intentos de cópula u otros contactos físicos realizados por el macho contaminado. La figura 14 muestra los resultados del bioensayo donde tanto H-B2 como H-B4 causaron el 80-90% (36, 31/40) de la mortalidad (mosquitos micosados) en hembras expuestas a un macho inoculado con la cepa de *B. bassiana*, sin embargo, esta mortalidad fue registrada a los 15 días, comparado con el control que mostró una vida de 22 días ( $gl = 3$ ,  $F = 157.39$ ,  $p < 0.0001$ ). En base a los resultados obtenidos, el 27 y el 48 % de mosquitos muertos por las cepas de *B. bassiana* fueron infectados durante la cópula y que fueron inseminadas (cópula verdadera). La tasa de mortalidad para hembras que fueron infectadas, pero no inseminadas fue de 75

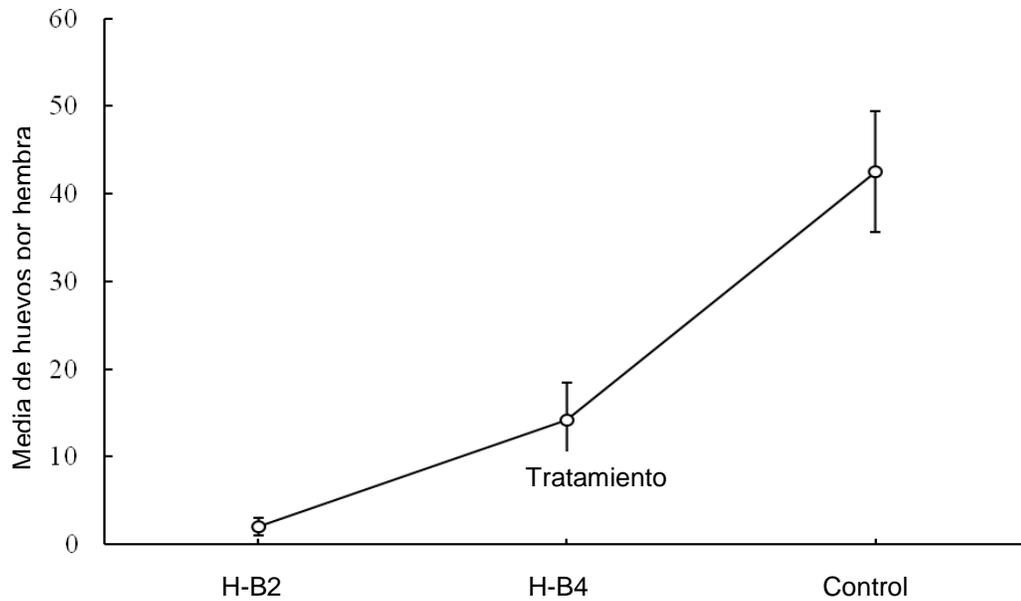
(27/36) y 52 % (16/31), respectivamente. Finalmente, ambas cepas de *B. bassiana* fueron transmitidas por el comportamiento de cópula ejerciendo un impacto negativo sobre la producción de huevos.



**Figura 14. Tasa Media (%) del total de esporulados, total de inseminados, y hembras de *Ae. aegypti* esporuladas no inseminadas juntas con un macho virgen expuesto a  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  de dos aislamientos de *B. bassiana* más el control (macho limpio). Las barras con la misma letra no son consideradas diferentes según una prueba de Ryan.**

La figura 15 muestra que la fecundidad de hembras expuestas al macho con la cepa virulenta H-B2 tenía un promedio de 2.05 ( $\pm 1.02$ ) huevos por hembra; esta tasa fue el 95 % más bajo que el observado en hembras sanas expuestas con el macho sano (control) que fue de 42.56 ( $\pm 6.90$ ) huevos por hembra. De la misma manera, la cepa menos virulenta (H-B4) disminuyó la fecundidad en el 67 % en comparación con el control ( $F=165.30$ , g.l.=3,  $p < 0.0001$ ). El efecto patogénico secundario en *Ae. aegypti* también fue observado en el número de ovoposición de las hembras (con

esporulación) por tratamiento donde fueron 9 y 15 para el H-B2 y H-B4 respectivamente, y 31 huevos en el control. Además, en ambos aislamientos hubo hembras no infectadas que pusieron huevos. En general, 4 y 9 de 40 hembras no fueron infectadas (sin conidiogénesis), y de estos, pusieron 2 y 3 huevos respectivamente, antes de la muerte.



**Figura 15. Media de huevos por hembra de *Ae. aegypti*, en hembras reunidas con un macho virgen expuesto a  $6 \times 10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  de dos aislados de *B. bassiana* y el Control (macho sano). Dos repeticiones por tratamiento,  $n = 20$  hembras.**

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Experimento 1. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* aislados en México.

Con los resultados de este experimento se demostró que *B. bassiana* es capaz de reducir la sobrevivencia de una población del vector del dengue hasta un 90% en siete días después de la exposición al hongo (Figura 11 a1, b1, c1, d1 y e1). Esto significa que si es factible que la micosis trunque la incubación extrínseca del virus en el vector.

De igual forma con esto se demostró que *M. anisopliae* es capaz de reducir la sobrevivencia de individuos vectores del dengue hasta un 87% en siete días después de la exposición al hongo. Esto significa que al menos experimentalmente existe evidencia de la factibilidad que la micosis trunque la incubación extrínseca del virus en el vector.

Scholte *et al.* (2007), evaluaron a *M. anisopliae* sobre *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* donde encontraron resultados similares al aplicar una dosis de  $1.6 \times 10^{10}$  conidias/m<sup>2</sup> sobre una manta de color negro como sitio de reposo para los adultos en jaulas. Estos resultados indicaron que ambas especies de mosquitos son altamente susceptibles a la infección por estos hongos. En un segundo estudio, también muy reciente, sobre hongos contra vectores del dengue, De Paula, *et al.* (2008), demostraron que *M. anisopliae* tiene una TL<sub>50</sub> de 3 días y *B. bassiana* de 5 días, respectivamente. Este estudio es de gran relevancia ya que demostró que *M. anisopliae* es capaz de reducir la sobrevivencia de *Ae. aegypti* vector del dengue en un alto porcentaje en siete días después de la exposición al hongo de manera experimental en laboratorio.

### 6.2 Experimento 2. Transmisión de *Metarhizium anisopliae* de mosquitos machos a hembras de *Aedes aegypti*

Cabe resaltar que el periodo de incubación extrínseca del serotipo 2 (el común) del virus dengue en *Ae. aegypti* es de 10 días en promedio (Kaaya, 1990), y si el H-

M5 transmitido de machos a hembras, mata al 50% de ellas en siete días, es factible que en las hembras infectadas con el virus dengue, la micosis trunque la propagación del patógeno para que no llegue a infectar glándulas salivales y se tornen infecciosas. Además, se demostró que en las hembras confinadas con el macho contaminado con el H-M5, sólo un promedio de tres lograron poner huevos, por lo que el hongo impactó severamente la fecundidad con una media de  $0.52 \pm 0.30$  huevos/hembra. La alta virulencia del H-M5 prácticamente esterilizó las hembras. La fecundidad fue reducida en 99% en comparación a las hembras del control ( $\bar{X} = 35.35 \pm 8.3$ ).

La tasa del 15% de inseminadas infectadas con el H-M5 es similar al 16% de inseminación reportada para hembras sanas (cinco inseminaciones en 30 hembras copuladas) por (Halsted, 2008). Ahora bien, el 75% de infectadas no inseminadas sugiere que la alta virulencia del H-M5 probablemente activó un comportamiento más agresivo en los machos; quizás las primeras fases de la germinación de conidias sobre la cutícula provocaron esta activación, porque los machos contaminados con este aislado murieron a los tres y seis días de confinamiento con las hembras; vivieron poco e inseminaron pocas hembras, pero infectaron a muchas quizás por intentos de cópula. Además, la tasa de hembras no inseminadas no infectadas fue apenas del 10%, y esta tasa fue seis veces menor para las mismas hembras (50%) del control

La información sobre diseminación por cópula de hongos patógenos en insectos hematófagos es muy escasa y hasta donde sabemos sólo hay dos reportes en la literatura. El primero es de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana*, en la mosca tsetse *Glossina morsitans morsitans* en África, donde las moscas fueron expuestas a  $2 \times 10^7$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  y después de confinarse por 14 días con insectos del sexo opuesto, los hongos causaron una mortalidad de 90-100% en ambos sexos (Nnakumusana, 1985).

El segundo es el único estudio sobre diseminación de *M. anisopliae* por conducta sexual en un mosquito y fue en el vector de la malaria *Anopheles gambiae* en África, pero desafortunadamente los resultados son confusos y la transmisión fue

evaluada erróneamente de hembras a machos, cuando debe ser lo opuesto (Scholte, 2006). Respecto al impacto de este grupo de hongos sobre la fecundidad de mosquitos vectores, también sólo existen dos reportes pero fueron estudios donde la micosis en los mosquitos fue inducida por contacto directo con las esporas sobre una superficie, y no por infecciones adquiridas por cópula. En el primero, larvas de *Ae. aegypti* fueron infectadas con  $2 \times 10^5$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  de *Aspergillus parasiticus*; la mortalidad larval fue de 97% pero la fecundidad de las hembras sobrevivientes se redujo en 56% respecto al grupo control (Boucias 1998). Otra investigación sobre el mosquito *An. gambiae*, cita que las hembras expuestas a dosis de  $10^6$  y  $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  de *M. anisopliae* tuvieron una fecundidad media de  $23.6 \pm 7.9$  y  $17.7 \pm 7.2$  huevos para hembras grandes ( $>3.1$  mm de extensión alar) y pequeñas ( $<3.1$  mm), mientras que las medias del control fueron  $64.6 \pm 4.7$  y  $42.2 \pm 2.9$ , respectivamente; esto implica una reducción del 63 y 57% en fecundidad (Scholte, 2007). En nuestro estudio, la fecundidad fue reducida en 99% cuando las hembras fueron confinadas con el macho expuesto al hongo H-M5.

El proceso invasivo de hongos dentro del huésped consume rápidamente agua y reservas nutritivas (Scholte, 2007). Es probable que el crecimiento del hongo dentro de los mosquitos redujera su nivel nutricional a un grado crítico en el que no hubo síntesis de vitelina para ovogénesis. Entre las infectadas con el H-M5, sólo seis de 40 lograron poner apenas 21 huevos.

### 6.3 Experimento 3. Transmisión de *Beauveria bassiana* de mosquitos machos a hembras de *Aedes aegypti*

Este estudio es el primero que demuestra la transmisión de *B. bassiana* por el comportamiento de cópula de machos vírgenes impregnados de conidias secas a hembras sanas de *Ae. aegypti*. De importancia particular para nuestro estudio es el número de hembras que fueron infectadas por el comportamiento de cópula, pero no inseminadas, ya que estos podrían representar una medida indirecta de transmisión de *B. bassiana* por intentos de cópula, como un componente en este tipo de transmisión horizontal. Además, es probable que un número desconocido de hembras entró en contacto con conidias pegadas a las superficie del frasco de

plástico durante su exposición con el macho infectado, y no evaluamos la tasa de infección de este medio. Quince días de exposición es bastante tiempo en la cual, en algún punto, algunas hembras podrían adquirir conidias de las superficies de los frascos de plástico.

De igual manera, la tasa del total de hembras esporuladas y el total de inseminadas en la Figura 2 se diferencian notablemente en la cepa H-B2, que fue el hongo más virulento. La tasa para hembras esporuladas fue del 90 % mientras que para el total de inseminadas fue del 28%. Esta diferencia podría implicar que había al menos una posibilidad del 60% de infección como consecuencia del intento de cópula.

Lamentablemente no hay un estudio que reporte las medidas exactas de intentos de cópula en machos vírgenes de *Ae. aegypti*. Solamente hay un artículo reciente (Ponlawat, 2009) donde menciona que la tasa de inseminación fue determinada en hembras expuestas con machos vírgenes sanos, que muestra que es de 69 a 89% de inseminación y que es similar a nuestro estudio (el 80-90%). Para el H-B4 la tasa de hembras infectadas sin inseminación fue del 48% mientras el total de hembras infectadas fue del 80%, esto conduce a una diferencia de casi el 30% dada por intentos de cópula, sin embargo este aislamiento es el menos virulento. Es importante mencionar que los machos que se inocularon con el H-B2 murieron dentro de los 4-6 días después de la exposición al hongo mientras aquellos que se inocularon con el H-B4 murieron entre 5-8 días. Puede ser que los machos sean capaces de detectar un proceso patogénico grave en ellos y cambiar a un comportamiento sexual más agresivo, lo cual aún sigue siendo desconocido; sin embargo un macho infectado por una cepa virulenta es invadido más rápidamente por el hongo, y la parálisis producida por metabolitos secundarios como las dextrusinas es uno de los efectos causados (Goettel, 1997). Quizás los machos infectados por el H-B2 fueron incapaces de inseminar a la mayoría de hembras a las que ellos se acercaron debido a su debilidad y movimientos o vuelo lentos. Aunque las hembras también pudieran rechazar a los machos infectados con el hongo, es

necesario hacer investigaciones para determinar el impacto de virulencia en el intento de cópula en la transmisión horizontal de hongos en *Ae. aegypti*.

Sólo hay dos reportes relacionados con la transmisión de hongos entre mosquitos durante la cópula, pero sus resultados no se pueden comparar con nuestro estudio debido a que son diferentes las metodologías utilizadas. En un estudio (Scholte *et al.*, 2004) encontró que hubo una mortalidad sólo del 34.0% en machos después del apareamiento con hembras del mosquito *Anopheles gambiae* inoculadas con un aislado de *M. anisopliae* expuestas durante una hora: el estudio anterior es muy diferente al nuestro debido a que nosotros inoculamos machos en lugar de hembras, los cuales se expusieron a cepas de *B. bassiana* durante 48 h. Además, otro estudio realizado en la mosca *Glossina morsitans morsitans* (Kaaya, 1990) se reporta una mortalidad del 55.0 % de hembras que se aparearon durante dos semanas con machos que fueron rociados con una suspensión fúngica de *M. anisopliae* o *B. bassiana*.

La reducción de la fecundidad es un efecto secundario dado por infecciones fungosas en insectos; además hay pocos datos para mosquitos. A nuestro conocimiento, el primer informe donde se observó una reducción de la viabilidad de huevo de *Ae. aegypti* infectados por el hongo entomopatógeno, *Aspergillus parasiticus* (Nnakumusana, 1985). En otro caso (Scholte *et al.*, 2006) infectó a adultos de *Ae. aegypti* con *M. anisopliae* pero no por transmisión a través de cópula; de todos modos los autores observaron que la disminución en la capacidad de poner huevos, se vio marcado, al igual que la capacidad de ingerir sangre durante su alimentación. Se pretenden hacer investigaciones en campo con el fin de explorar más detalladamente el proceso de transmisión de *B. bassiana* de machos hacia hembras trasmisoras del dengue en México.

## 7. CONCLUSIONES

1.- En México existen cepas de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* que son capaces de matar a *Aedes aegypti*, lo que trae como conclusión que se tienen alternativas favorables que ayudan a disminuir la contaminación ambiental y daños a la salud, a bajos costos. Estos aislados son los más prometedores porque demostraron actividad de matar al 50% de la población expuesta de mosquitos en menos de tres días o en tres días.

2.- La cepa H-M5 de *M. anisopliae* fue diseminada por conducta copulatoria de machos a hembras de *Ae. aegypti* con un tasa alta de infección (90%); la mayoría de las infecciones ocurrieron en encuentros sexuales sin inseminación, y la vida media de las hembras fue de siete días similar al periodo de incubación extrínseco del serotipo 2 del virus dengue. Por lo tanto, el aislado H-M5 es un buen candidato para un biocontrol vectorial del dengue, porque diseminado entre las hembras por comportamiento copulatorio del macho, ejerce niveles altos de mortalidad y reduce drásticamente la fecundidad. Ocho cepas mexicanas de *B. bassiana* fueron sumamente patogénicas contra hembras de *Ae. aegypti* con un  $TL_{50}$  máxima de cinco días, por la exposición de estas a una concentración de  $6 \times 10^8$  conidias  $ml^{-1}$ .

3.- Este es el primer informe de transmisión de *B. bassiana* por el comportamiento de cópula de machos vírgenes, contaminados por dicho hongo a hembras de *Ae. aegypti*, causando una mortalidad del 90% en 15 días. Las cepas H-B2 y H-B4 transmitidas sexualmente de machos contaminados disminuyeron la fecundidad en un 95 y 67 % en hembras expuestas, respectivamente. Lo anterior concluye que antes de la liberación de los machos virgen contaminados por los hongos: *M. anisopliae* y *B. bassiana* para contaminar a hembras de *Ae. aegypti*, es necesario hacer más investigaciones sobre el efecto que puede causar de manera indirecta o directa al humano.

## 8. LITERATURA CITADA

- Adhikari A, Sen MM, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S. 2004. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor cattle shed. *Environment International*; 29:1071–1078.
- Anderson, J.; Rico, R. 2006. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of Dengue virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75(5): 886-892.
- Andrade, C.F. 1993. Mosquito entomopathogenic fungi- an overview regarding a possible integration in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* control programs in Brazil. Reporte de Tesis Ph.D. Ithaca, USA. Boyce Thompson Institute, Cornell University. 25p.
- Arredondo, J. I.; M. H. Rodríguez; D. N. Bown y G. Loyola. 1991. Indoor low-volume insecticide spray as a new method for the control of *Anopheles albimanus* in southern México. Mosquito vector Control and Biology in Latin America a Symposium. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7 (4): 633-645.
- Batta, Y. 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*. 22(2): 415-422.
- Blanford, S, Read AF, Thomas MB. 2005. Thermal behavior of *Anopheles stephensi* in response to infection with malaria and fungal entomopathogens. *Malaria Journal*. 8: 72.
- Boucias, DG, Pendland JC. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers. 1998.
- Butt, T.; Goettel, M. 2000. Bioassays of entomopathogenic microbes & nematodes; Bioassays of Entomogenous fungi. Editado por: Navon, A.; Ascher, K.R.S. New York, USA. CABI. 325p.
- Butt, TM.; Carreck, NL.; Ibrahim, L.; Williams, IH. 1998. Honey-bee mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 8(4): 533, 538.
- Cabrera M, Jaffe K. 2007. An aggregation pheromone modulates lekking behavior in the vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal American Mosquito Control Association*. 2007; 23:1-10.
- Cantón, M. L. 1996. Capacidad biorreguladora del parásito *Romanomermis culicivorax* (Nematoda: mermithidae) en larvas de *A. aegypti* (Dip: culicidae) en laboratorio. Tesis de licenciatura. Parasitología Agrícola. UACH. Chapingo, México. 46 p.
- Chaverri, G. 2001. *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Mosquito del dengue, Zancudo del Dengue). Especies disponibles. INBIO.Sp.
- Christophers R. 1960. *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press. 738 pp.
- Clark TB, Kellen WR, Fukuda T, Lindgren JE. Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal Invertebrate Pathology*. 11(1): 1–7.
- Clements AN. 1999. The biology of mosquitoes. Volume 2. London: Chapman & Hall.
- Clements AN. 1963. The Physiology of Mosquitoes. Pergamon Press Ltd. 393 pp.
- CRAT (Centro Regional de Ayuda Técnica). 1970. claves para la identificación de mosquitos comunes de Estados Unidos. Guía instructivo: Lucha contra insectos. Departamento de salud, educación y bienestar de E.U.A. México. 43 p.
- Curtis, C. F.; N. Lorimer; K.S Rai, K. Dietz. 1976. Comparative field cage tests of the population suppressing efficiency of three genetic control systems for *Aedes aegypti*. *Heredity* 36 (1): 11-29.

- Daoust, RA.; Ward, MG.; Roberts, DW. 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*.40: 228- 236.
- De Garcia, MCC.; Arboleda, ML.; Barraquer, F.; Grose, E. 1997. Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*.35: 361-363.
- De Paula AR, Brito ES, Pereira CR, Carrera MP, Samuels RI.2008.Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for dengue vector control. *Biocontrol Science& Technololy*. 18: 1017-1025.
- Environmental Protection Agency. 2007. *Metarhizium anisopliae* strain F52 (029056) BiopesticideFactSheet.2003.Availableat:[http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_029056.htm](http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_029056.htm).Accessed November 5.
- Fernández S. I. 2009. Biología y control de *Aedes aegypti*, Manual de operaciones. Universidad Autonoma de Nuevo León. 2da. Edición. Monterrey, Nuevo León, México. 131 pp.
- Foster WA, Lea OA.1975. Renewable fecundity of male *Aedes aegypti* following replenishment of seminal vesicles and accessory glands.*Journal Insect Physiology*. 21: 1085-1090.
- Genthner, FJ.; Chancy, CA.; Couch, JA.; Foss, SS.; Middaugh, DP.; George, SE.; Warren, MA.; Bantle, JA. 1998. Toxicity and pathogenicity testing of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.35: 317-324.
- Gibbons, R.V.; Vaughan, D.W, 2002. Dengue: an escalating problem. *Biological Medicine Journal*.324: 1563-1566.
- Goettel MS, Inglis GD. 1997.Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic, San Diego CA.pp. 213–248.
- Gubler, DJ. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinic Microbiology Reviews*.11(3): 480-496.
- Halsted, SB. 2008.Dengue virus-mosquito interactions.*Annual Review Entomology*.53: 1-19.
- Hernández, F.; García, J. 2000. *Aedes*, Dengue y la posibilidad de un enfoque diferente de lucha. *Revista Costarricense de Salud pública*. 9(16): 32-38.
- Herrera, B. E. 1989. Situación actual del dengue en México. En: Memoria 1, IV Simposio nacional de entomología médica y Veterinaria. SME. Oaxtepec, Morelos. pp. 1-13.
- Howard LO, Dyar HG, Knab F. 1912.The Mosquitoes of North and Central America and the West Indies.Vols.I-IV.
- Kaaya GP, Okech MA.1990.Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitansmorsitans*.*Entomophaga*.35: 589-600.
- Khan NN, Wilson BL. 2003.An environmental assessment of mold concentrations and potential mycotoxin exposures in the greater southeast Texas area.*Journal Environment Science Health Part A*. A38: 2759–2772.
- Khetan, SK. 2001. *Microbial Pest Control*, 1st edition. Marcel Dekker.
- Lacey LA, Frutos R, KayaHK, Vails P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological Control*. 21: 230-248.
- Luz, C.; Tai.; M.; Santos, A.; Silva, H. 2008. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovidical activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions.*Memory Institute Oswaldo Cruz*. 103(2): 214-215.
- Mcinnis, JR.; Zattau, WC. 1982. Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Leptolegnia*. *Journal of Invertebrate Pathology*.39: 98-104.
- Méndez, G. J. y C. Montesano. 1994. Manual para la vigilancia epidemiológica del dengue. Secretaria de salud. México. pp. 34-41.

- Metcalf, L. C. 1978. Insectos destructivos e insectos útiles. 4ª edición. C.E.C.S.A. 1187 p.
- Mittal, P.K. 2003. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *Journal Vector Borne Disease*. 40: 20-32.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 63: 95-103.
- Nnakumusana ES. 1985. Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *Aspergillus parasiticus* and its effect on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to conidial infections in larval stages. *Current Science*.54: 1221–1228.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1997. Prevención del dengue y de la fiebre hemorrágica del dengue. Prontuario para dirigentes municipales y comunitarios. División de lucha contra las enfermedades tropicales. Ginebra.Suiza.
- Pinnock, De Garcia, R.; Cubbin, CM. 1973. *Beauveria tenella* as a control agent for mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*.22: 143-147.
- Ponlawat A., Harrington LC. 2009. Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*.80: 395–400.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., De la Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31:12-15.
- Reyes, V. F. 1993. Biología de vectores. UANL. Monterrey Nuevo León. México.110 p.
- Roberts, D. W. 1970. *Coelomomyces, Entomophthora, Beauveria, and Metarrhizium* as parasites of mosquitoes. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*7: 140-155.
- Roberts, DW. 1974. Fungal infections of mosquitoes. In: Aubin A, Belloncik S, Bourassa JP, LaCoursière E, Pélissier M, editors. *Le contrôle des moustiques/Mosquito control*: 143-193. Presses de l'Université du Québec.
- Roth L M. 1948. A study of mosquito behavior. An experimental laboratory study of the sexual behavior of *Aedes aegypti* (Linneus). *American Midland Natural*.40: 265-352.
- Salvatella, A. 1996. *Aedes aegypti, Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Revista Médica de Uruguay*. 12: 28-36.
- Samson, A.R., C.H. Evans y P.Y. Latge. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag. New York-Berlin.187 p.
- SAS. 1985. SAS Procedures Guide, Release 6.03 Edition. Cary, NC, SAS Institute Inc. 441 pp.
- Schaper, S.; Hernández, F.; Soto, I. 1998. La lucha contra el dengue: control biológico de larvas de *Aedes aegypti* empleando *Mesocyclops thermocyclopoides* (crustácea). *Revista Costarricense Ciencias Médicas*.19(1-2): 119-125.
- Scholte EJ, BGL Knols, RA Samson & Takken, W. 2004a. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal Insect Science*. 4: 19.
- Scholte EJ, BGL Knols, RA Samson & W Takken. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes with the Entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae*. *Acta Tropica* 30: 45-57.
- Scholte E-J, Knols BGJ, Takken W. 2004b. Autodissemination of the pathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae*s.s. *Malaria Journal*. 3: 45-50.
- Scholte E-J, Knols BGJ, Takken W. 2006. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal Invertebrate Pathology* 91: 43-49.

- Scholte E-J, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BGJ. 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*.308: 1641–1642.
- Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BG. 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*.2:29-35.
- Scholte E-J, Takken W, Knols BGJ. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. 2007. 102: 151-158.
- Service, M.W. 1986. Blood – sucking insects: vector of diseases *Studies in Biology*. No. 167. Camelot Press. P.c. 7-28.
- Seymour RL & Briggs JD. 1984. Occurrence and control of *Aphanomyces* (Saprolegniales: Fungi) infections in laboratory colonies of larval *Anopheles*. *Journal American Mosquito Control Association*. 1: 100-102.
- Sorokin, 1983. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff). Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México, D.F. 13 pp.
- Spielman A. The mechanics of copulation in *Aedes aegypti*. *Biological Bulletin*, 1964; 127: 324-352.
- Stolz, I. 1999. The effect of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (=flavoviride) Gams and Rozsypal var. *acidum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on non-target Hymenoptera. PhD thesis University of Basel.
- Subramanian, C. V. 1971. Hyphomycetes. University of Madras. Madras, India. 479 pp.
- Sweeney, AW. 1981. An undescribed species of *Smittium* (Trichomycetes) pathogenic to mosquito larvae in Australia. *Transactions of the British Mycological Society*.77: 55-60.
- Thomas MB, Blanford S, Jenkins NE, Killeen GF, Knols BGJ, Read AF, Scholte E-J, Takken W. 2005. Benefits and risks in malaria control. *Science*. 310: 49-51.
- Trpis, M. 1977. Autogeny in diverse population of *Aedes aegypti* from East Africa. *Tropical Medicine and Parasitology*, 28:77-82.
- Van Der Geest, L. P. S., S. L. Elliot, J. A. J. Breuwer y E. A. M. Beerling. 2000. Disease of mites. *Experimental and Applied Acarology* 24 : 497-560.
- World Health Organization. 2008. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact Sheet. N°117.
- Zarate, A. M. 1988. Dengue virus activity in México. Abstracts of the International Congress of virology, Edmonton, Canada.
- Zimmerman, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*. 37: 375-379.
- Zwiebel LJ, Takken W. 2004. Olfactory regulation of mosquito–host interactions. *Insect Biochemical Molecular Biology*.34:645–652.

## RESUMEN CURRICULAR

M.C. Alberto Margarito García Munguía

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Entomología Médica

### **Tesis:**

HONGOS ENTOMOPATOGENOS (MYCOTA: DEUTEROMYCETES) AISLADOS EN EL NOROESTE DE MÉXICO: IMPACTO SOBRE LA LONGEVIDAD, FECUNDIDAD, FERTILIDAD Y TASAS DE CÓPULA E INSEMINACIÓN EN *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Campo de Estudio: Fitopatología y Entomología.

Datos Personales: Nacido en Huehuetla, Hidalgo, México.

### **Educación:**

Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola. Egresado del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, (2007).

Maestría en Protección Vegetal, en la Universidad Autónoma Chapingo. (2008).

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

García, M. A. M., Garza, H, J. A., Rebollar, T. E. A., Rodriguez, P. M. A., Reyes, V. F. 2010. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites and vectors*. 4:24

F. Reyes-Villanueva, J.A. Garza-Hernández, A.M. García-Munguía, A.I. Ortega-Morales, P. Tamez-Guerra, A.F.V. Howard, and M.A. Rodríguez-Pérez. Dissemination of *Metarhizium anisopliae* by mating behavior in *Aedes aegypti*. Enviado a *Parasites & Vectors*.