

EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ESTADIOS LARVARIOS DE *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762(DIPTERA: CULICIDAE).

Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco¹, Carolina Elizabeth Pérez Garza¹, Erick de Jesús de Luna-Santillana², María Elizabeth Alemán-Huerta¹, Isela Quintero-Zapata¹✉

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas- Instituto de Biotecnología. Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México, C. P. 66450.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Laboratorio de Medicina de Conservación. Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C. P. 88710, Reynosa, Tamaulipas, México.

✉Autor de correspondencia: isela.quinterozp@uanl.edu.mx

RESUMEN. *Aedes aegypti* es un mosquito transmisor de enfermedades como el Chikungunya, Zika, dengue clásico y hemorrágico entre otras. El control biológico resulta ser una alternativa de menor impacto ecológico en comparación con el control químico. Dentro de los agentes más utilizados en el manejo de plagas se encuentran los hongos entomopatógenos. En el presente trabajo se evaluó la actividad de diferentes cepas nativas y de colección de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* sobre larvas de tercer estadio de *Ae. aegypti* a distintas concentraciones para evaluar su patogenicidad, así como su efecto en su ciclo de vida. Los resultados obtenidos muestran que los siete tratamientos provenientes de *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana* obtuvieron resultados positivos contra *Ae. aegypti*, arrojando una mortalidad promedio de 50 a 80% para larvas y de 9 a 30% para pupas. Los tratamientos más efectivos fueron Ma, HIB-11, HIB-12, ya que los tres tratamientos promediaron una mortalidad del 96% para larvas y 4% para pupas evitando así la metamorfosis y el desarrollo de *Ae. aegypti*. Los resultados indican que existe un incremento en la tasa de mortalidad proporcional a la concentración de los tratamientos.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, patogenicidad

Evaluation of entomopathogenic fungi on larval stages of *Aedes aegypti*

ABSTRACT. *Aedes aegypti* is a mosquito that transmits diseases such as Chikungunya, Zika, classic dengue, and hemorrhagic among others. Biological control turns out to be an alternative with less ecological impact compared to chemical control. Among the most commonly used agents in pest management are entomopathogenic fungi. In the present work the activity of different native and collectible strains of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Isaria fumosorosea* on larvae of *Ae. aegypti* third stage was evaluated at different concentrations to assess its pathogenicity, as well as its effect on its life cycle. The results obtained show that the seven treatments from *M. anisopliae*, *I. fumosorosea*, and *B. bassiana* obtained positive results against *Ae. aegypti*, yielding an average mortality of 50 to 80% for larvae and 9 to 30% for pupae. The most effective treatments were Ma, HIB-11, HIB-12, since the three treatments averaged a mortality of 96% for larvae and 4% for pupae thus avoiding metamorphosis and the development of *Ae. aegypti*. The results indicate that there is an increase in the mortality rate proportional to the concentration of the treatments.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, pathogenicity

INTRODUCCIÓN

La picadura de *Aedes aegypti* ocasiona problemas de salud y es considerado en las Américas como el principal transmisor de enfermedades como el dengue clásico y hemorrágico, Chikungunya, Zika, entre otras (Ardila *et al.*, 2005). El ciclo de desarrollo de *Ae. aegypti* abarca siete días o un poco más, dependiendo de la temperatura y de la disponibilidad del alimento. Las fases biológicas son de huevo, cuatro estadios larvales, un estadio de pupa y uno de adulto (Quispe *et al.*, 2015). Debido a distintos factores y cambios globales las enfermedades causadas por *Ae. aegypti* han incrementado en los últimos años y a través de distintas alternativas de control de especies plaga

y vectores de enfermedades como el control físico, químico y biológico se pretende evitar que se conviertan en epidemias. El control biológico resulta ser una alternativa de menor impacto ecológico, así como también permite un manejo seguro para la salud humana (Ardila *et al.*, 2005). Los microorganismos que se destacan principalmente en el control microbiano de insectos son los hongos, las bacterias, los virus, los nematodos y los protozoarios (Moreira *et al.*, 2012). De los diferentes microorganismos empleados, los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Charnley y Collins, 2007).

El proceso de infección de los hongos entomopatógenos consiste en la producción de esporas que germinan al contacto con el hospedante, invadiendo su cuerpo y matándolo de cuatro a diez días posteriores a la infección. Después de la muerte de los insectos, se producen miles de nuevas esporas las cuales se dispersan y continúan su ciclo de vida en nuevos hospedantes (Moreira *et al.*, 2012). El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: **(1)** adhesión y germinación de la espора en la cutícula del insecto, **(2)** penetración en el hemocele y **(3)** desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto. La micosis produce síntomas fisiológicos anormales en el insecto como convulsiones, falta de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte se produce por una mezcla de efectos que ocasiona el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes. Una vez que los hongos se encuentran en el interior del insecto, estos deben enfrentarse con los mecanismos de respuesta del sistema inmune por lo cual han creado estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la elaboración de toxinas o cambios estructurales en su pared celular (Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

Se conocen varios géneros de hongos entomopatógenos que atacan al mosquito *Ae. aegypti* de los cuales destacan *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* (Ardila *et al.*, 2005). El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la capacidad biocontroladora de diferentes cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre larvas de tercer estadio de *Ae. aegypti* además de realizar bioensayos para evaluar la toxicidad de los aislados y/o cepas de los hongos entomopatógenos y analizar el efecto subletal post tratamiento sobre el ciclo de vida de los estadios larvarios sobrevivientes.

MATERIALES Y MÉTODO

Hongos entomopatógenos. Los hongos entomopatógenos se obtuvieron de la colección del laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología ubicado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (IB-FCB-UANL), y corresponden a los aislados nativos de *B. bassiana* (HEB1), *I. fumosorosea* (clave Y01) y *M. anisopliae* (HIB-11 y HIB-12). Así como para las cepas de colección GHA, Pfr-612 y Ma de los hongos *B. bassiana*, *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* respectivamente.

Preparación de las suspensiones. Cada uno de los hongos se activaron en placas con agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron bajo condiciones de laboratorio a 25 ± 2 °C; 12:12 L: O (Luz: Oscuridad), durante 14 a 21 días. Transcurrido el tiempo de incubación se prepararon las suspensiones de conidios a diferentes concentraciones (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 conidios/mL). A cada una de las placas se les agregó una solución estéril de Tween 80 al 0.1 % (v/v) y se raspó el micelio para desprender los conidios con ayuda de un asa Digralesky estéril. De las suspensiones se realizaron diluciones y se ajustaron hasta llegar a las concentraciones indicadas de los conidios en una cámara de Neubauer.

Obtención de larvas de *Ae. aegypti*. Los huevos de *Ae. aegypti* se obtuvieron del área de cría de insectos del laboratorio L6. Para la obtención de las larvas, se colocó una papeleta con huevos de *Ae. aegypti* en un recipiente plástico con 4L de agua templada y se adicionaron 0.5g de caldo nutritivo para estimular la eclosión.

Bioensayos de *Ae. aegypti*. Una vez obtenidas las larvas se realizaron los ensayos evaluando cada una de las suspensiones de conidios de los hongos. Cada tratamiento se realizó con seis repeticiones, además, se agregó un testigo absoluto y uno con la solución de Tween 80 al 0.1 %. En cada bioensayo se incluyó un testigo con Tween 80 al 0.1 % (control Tween) y un testigo absoluto que contenía solamente agua bidestilada (control agua). Cada repetición consistió en un vaso plástico translúcido de 300 mL de capacidad, con un volumen final de 200 mL el cual consta de 185 mL de agua bidestilada previamente esterilizada más 15 mL de tratamiento. Los tratamientos corresponden a las suspensiones de conidios de cada hongo (HEB1, Y01, HIB-11, HIB-12, GHA, Pfr-612 y Ma) en las diferentes concentraciones de 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 conidios/mL. A cada vaso se le adicionaron 25 larvas de tercer estadio de *Ae. aegypti*. Los recipientes se mantuvieron a 25 ± 2 °C, 12:12 L: O (Luz: Oscuridad), bajo condiciones de laboratorio. La mortalidad se observó cada 24 horas durante 10 días. El porcentaje de mortalidad se registró a los diez días, tiempo establecido para el bioensayo, y se continuó con el seguimiento del ciclo de vida de los estadios larvarios sobrevivientes. A partir del día 11 las larvas que sobrevivieron al bioensayo se revisaron diariamente para observar cambios morfológicos de su ciclo de vida, de estado larvario, pupa o adulto, con estos datos se determinó la sobrevivencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de 70 a 100 % para larvas de *Ae. aegypti*. En la figura 1, se observa que los tratamientos que obtuvieron las tasas de mortalidad más altas (88-100 %) fueron Ma, HIB-11 y HIB-12 correspondientes a *M. anisopliae*. Por otra parte, los tratamientos con las tasas más bajas de mortalidad (25-60 %) fueron Pfr-612 y Y01 ambos corresponden a *I. fumosorosea*. En cada bioensayo se incluyó un testigo con Tween 80 al 0.01 % (control Tween) y un testigo absoluto que contenía solamente agua bidestilada (control absoluto) los cuales no registraron mortalidades.

Una vez concluido el tiempo de incubación del bioensayo (10 días) las larvas sobrevivientes en cada tratamiento se mantuvieron bajo las mismas condiciones para registrar su desarrollo. En el caso de los tratamientos Ma, GHA, HIB-12 y HEB1 el periodo de seguimiento fue de 29 días y de 21 días para los tratamientos Pfr-612, Y 01 y el HIB-11. Durante estos tiempos, diariamente se revisaron los ejemplares de *Ae. aegypti* para observar cambios morfológicos en el ciclo biológico, es decir, del estadio de larva a pupa o de pupa a adulto. Considerando adulto a los individuos que concluyeron su ciclo de vida.

El efecto de los tratamientos sobre *Ae. aegypti* se observa en el cuadro 1, en los tratamientos Ma, HIB-12, HEB1 y GHA el periodo de seguimiento del bioensayo fue de 29 días. Para el tratamiento Ma, se observa un porcentaje de mortalidad del 91 al 100 % en el estado larvario para las cuatro concentraciones. Con respecto al estadio pupal la mortalidad se presentó del 3 al 9 %, y no se registró ningún mosquito que concluyera su ciclo de vida a adulto en las cuatro concentraciones. Por otra parte, en el tratamiento HIB-12 (*M. anisopliae*) se observó un porcentaje de mortalidad del 100 % en las concentraciones 107 y 108. Sin embargo, la concentración 105 presentó un 96 % de mortalidad y la 106 presentó un porcentaje más bajo (85 %). La concentración 105 obtuvo un 4% en la fase pupal, mientras que la concentración 106 presentó el mayor porcentaje con un 15%. Ninguna concentración presentó índice de sobrevivencia ya que no se registraron mosquitos en desarrollo adulto.

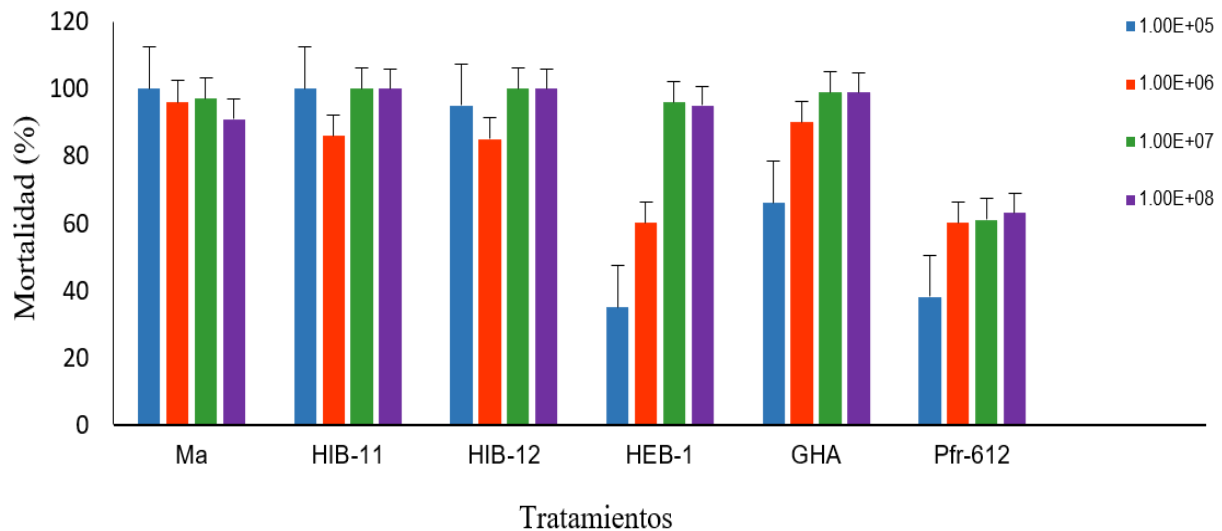


Figura 1. Efecto de los diferentes tratamientos provenientes de los hongos *M. anisopliae* (HIB-11, HIB-12 y Ma), *I. fumosorosea* (Y01 y Pfr 612) y *B. bassiana* (HEB1 y GHA) contra larvas de *Ae. aegypti*. 25 \pm 2 $^{\circ}$ C bajo condiciones de laboratorio.

Con el tratamiento HEB1 (*B. bassiana*) se observa un porcentaje de mortalidad alto en las concentraciones 107 y 108 (95-96 %). Por el contrario, las concentraciones 105 y 106 mostraron porcentajes de mortalidad de 35 % y 60 % respectivamente y en la fase pupal porcentajes del 56 % y 24 %. El índice de sobrevivencia se presentó en casi todas las concentraciones, 105 y 106 presentan un 9 y 16 % sin embargo, las concentraciones 107 y 108 presentaron el índice más bajo con un 0 % y 1 % respectivamente. Para el tratamiento GHA (*B. bassiana*) se observa un alto porcentaje de mortalidad en las concentraciones 106, 107 y 108 (90-99 %). Por el contrario, la concentración 105 mostró un porcentaje de mortalidad relativamente bajo de 66 % y un porcentaje de 34 % en la fase pupal. El índice de sobrevivencia se presentó en la concentración 106 con un porcentaje de 6 %.

Con respecto a los tratamientos HIB-11, Pfr-612 y Y01, el periodo de seguimiento fue de 21 días. En el estadio larvario del tratamiento HIB-11 se observa un 100 % de mortalidad para las concentraciones 105, 107 y 108. En la concentración 106 se observa un 86 % en el estadio larvario y un 14 % en la fase pupal. En los ejemplares en estadio adulto no se observó ningún mosquito que concluyera su ciclo de vida a adulto para las cuatro concentraciones. El tratamiento Pfr-612 presenta un porcentaje de mortalidad relativamente bajo en comparación con los otros tratamientos, siendo el tratamiento 105 el de menor porcentaje con un 38 % y por ende el mayor porcentaje en la fase pupal (61 %). El índice de sobrevivencia se presentó en todas las concentraciones con un porcentaje de 1 a 11 %. Finalmente, para el tratamiento Y01 se observa un porcentaje de mortalidad bajo 25-45 %. La concentración 105 presentó el mayor porcentaje en la fase pupal (70 %). El índice de sobrevivencia se presentó en las concentraciones 106 y 107 con un porcentaje de 15-21 %. En los siete tratamientos provenientes de *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana* se obtuvieron resultados positivos contra *Ae. aegypti*, arrojando una mortalidad promedio de 50 a 80 % para larvas y de 9 a 30 % para pupas. Los tratamientos más efectivos fueron Ma, HIB-11, HIB-12, provenientes

de *M. anisopliae* ya que como se observa en la figura 1, los tres tratamientos promediaron una mortalidad del 96 % para larvas y 4 % para pupas evitando así la metamorfosis y el desarrollo de *Ae. aegypti* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Mortalidad presentada por los distintos estadios de *Ae. aegypti* en el seguimiento de su ciclo biológico, por el efecto de los tratamientos a diferentes concentraciones bajo condiciones de laboratorio (25 ± 2 °C; 12:12 L:O).

Tratamiento	Concentración	Estadio		
		Larva	Pupa	Adulto
Ma	1.00E+05	100	0	0
	1.00E+06	96	4	0
	1.00E+07	97	3	0
	1.00E+08	91	9	0
HIB-11	1.00E+05	100	0	0
	1.00E+06	86	14	0
	1.00E+07	100	0	0
	1.00E+08	100	0	0
HIB-12	1.00E+05	96	4	0
	1.00E+06	85	15	0
	1.00E+07	100	0	0
	1.00E+08	100	0	0
HEB-1	1.00E+05	35	56	9
	1.00E+06	60	24	16
	1.00E+07	96	4	0
	1.00E+08	95	14	1
GHA	1.00E+05	66	34	0
	1.00E+06	90	4	6
	1.00E+07	99	1	0
	1.00E+08	99	1	0
Pfr-612	1.00E+05	38	61	1
	1.00E+06	60	38	2
	1.00E+07	61	28	11
	1.00E+08	63	24	3
Y01	1.00E+05	30	70	0
	1.00E+06	25	54	21
	1.00E+07	45	40	15
	1.00E+08	nd	nd	nd

Los tratamientos que obtuvieron la menor tasa de mortalidad fueron Y01 y Pfr-612 provenientes de *I. fumosorosea* debido a que presentaron una mortalidad promedio de 30 a 55 % para larvas y 30 a 60 % para pupas, así como también se obtuvo un promedio del 5 al 17 % en el índice de sobrevivencia el cual resultó en el desarrollo normal del mosquito hasta llegar a la etapa de adulto. Por otra parte, la concentración que obtuvo mayor tasa de mortalidad en los siete tratamientos aplicados fue la 10^8 seguida de la 10^7 . Cabe destacar que no existe gran diferencia entre las distintas concentraciones, sin embargo, si existe un pequeño incremento en la tasa de mortalidad proporcional a la concentración de los tratamientos.

En los bioensayos descritos en el presente documento los resultados obtenidos muestran que *Ae. aegypti* es susceptible en su estadio larvario a *B. bassiana* ya que induce una virulencia en su insecto huésped. Darbro *et al.* (2012) observaron los efectos sobre la supervivencia, el comportamiento de alimentación de la sangre y la fecundidad en condiciones ambientales realistas en *Ae. aegypti* infectados con *B. bassiana*. Estos resultados apoyan aún más el uso de *B. bassiana* como agente potencial de control biológico contra *Ae. aegypti*.

La supervivencia de los mosquitos en condiciones de semicampo se redujo en un 59 a 95 %. Por lo tanto, *Beauveria bassiana* puede matar y puede reducir la mordedura de *Ae. aegypti* en condiciones de semicampo y en el laboratorio.

Scholte *et al.* (2007) describe una investigación sobre el uso de *M. anisopliae* contra *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en donde encontraron que *Ae. aegypti* se infectó con el hongo y la vida útil de los mosquitos contaminados con hongos de ambas especies se redujo significativamente en comparación con los mosquitos no infectados. Estos resultados coinciden con los del presente estudio, ya que indican que ambas especies de mosquitos son altamente susceptibles a la infección con el entomopatógeno *M. anisopliae*. Como se pudo observar, ninguna larva expuesta con este hongo pudo alcanzar a desarrollar la metamorfosis total.

Cabe destacar que en el presente trabajo se presentó un índice de mortalidad relativamente alto, sin embargo, esto fue favorecido a que la mayor parte de los individuos no lograron completar su ciclo de vida, y algunos que completaron su ciclo biológico murieron a causa de la micosis, siendo esta forma otra manera de controlar la plaga (Scholte *et al.*, 2004). Con el presente trabajo se reafirma el potencial que tienen los hongos entomopatógenos, como agentes controladores de plagas, siendo alrededor de 750 especies diseminadas en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos (Pucheta-Díaz *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El empleo de conidios de diversos hongos entomopatógenos es efectivo para llevar a cabo el control larvario de *Ae. aegypti*, los siete tratamientos causaron una mortalidad promedio de 50 a 80 % para larvas y de 9 a 30 % para pupas. Se encontró que la más alta tasa de mortalidad de larvas *Ae. aegypti* se logró con los tratamientos de *M. anisopliae* (96 %) principalmente con el aislado HIB-11 (96 %). Las cepas que produjeron la mayor inhibición del ciclo biológico de *Ae. aegypti* fueron los tratamientos Pfr-612 y Y01 de *I. fumosorosea* a una concentración de 1×10^5 . Los tratamientos con menor impacto sobre larvas *Ae. aegypti* fueron Pfr-612 y Y01, ya que el 12 % de los individuos lograron llegar a la etapa adulta. La concentración que obtuvo mayor tasa de mortalidad en los siete tratamientos aplicados fue la 10^8 seguida de la 10^7 . Los tratamientos que obtuvieron el mayor índice de sobrevivencia fueron Pfr- 612 y Y01 (5-17 %).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo financiero para la realización del proyecto PAICYT N°. CT 593-18, así como a la Secretaría de Investigación y Postgrado del Instituto Politécnico por el apoyo financiero para la realización del proyecto SIP 201906440.

LITERATURA CITADA

- Ardila, A., Escovar, J., y Bello, F. 2005. Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biomédica*. 25(1): 65-75. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i1.1328>
- Charnley A. K. and Collins S.A. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek CP, Druzhinina S (eds.), *Environmental and Microbial Relationship*. The Mycota IV. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 159-187. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_10
- Darbro J. M., Johnson P. H., Thomas M. B., Ritchie S. A., Kay B. H. and Ryan P. A. 2012. Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 86(4): 656-664. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0455>
- Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE. 2012. Hongos y nematodos entomopatógenos. En A. Moino, RS. Cavalcanti. *Manual de biología de suelos tropicales*. 10: 287-288. ISBN 978-607-790-831-9
- Pucheta Díaz M., Flores Macías A., Rodríguez Navarro S. y De la Torre M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31(12): 856-860. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/339/33901204.pdf>
- Quispe E., Carbajal A., Gozzer J. y Moreno B. 2015. Ciclo biológico y tabla de vida de *Aedes aegypti*, en laboratorio: Trujillo (Perú). *Revista Rebiolest*. 3(1): 91-101. Recuperado de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/download/899/828>
- Scholte E. J., Knols B. G., Samson R. A. and Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*. 4(1). 5-15. DOI: 10.1093/jis/4.1.19
- Scholte E. J., Takken W. and Knols B. G. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trópica*. 102(3): 151-158. DOI: 10.1016/j.actatropica.2007.04.011
- Téllez-Jurado A., Cruz Ramírez M. G., Mercado Flores Y., Asaff Torres A. y Arana-Cuenca A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. 30: 73-80. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007