

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

ESTIMACIÓN DE DOSIS DIAGNÓSTICO PARA EL MANEJO DE LA RESISTENCIA EN *Aedes aegypti* Y ALTERNATIVAS PARA SU MANEJO.

MANUEL ALEJANDRO TEJEDA REYES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

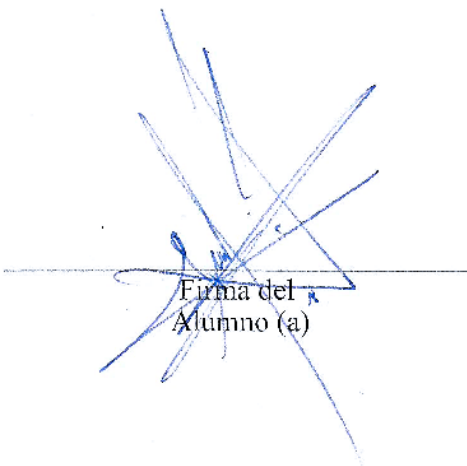
2018

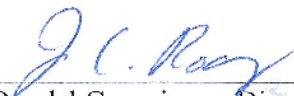
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe C. MANUEL ALEJANDRO TEJEDA REYES, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis ESTIMACIÓN DE DOSIS DIAGNÓSTICO PARA EL MANEJO DE LA RESISTENCIA EN Aedes aegypti Y ALTERNATIVAS DE MANEJO

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 08 de enero de 2018



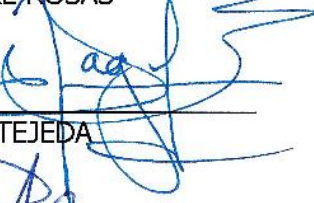
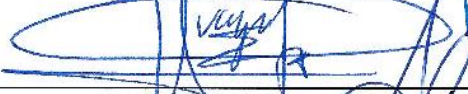
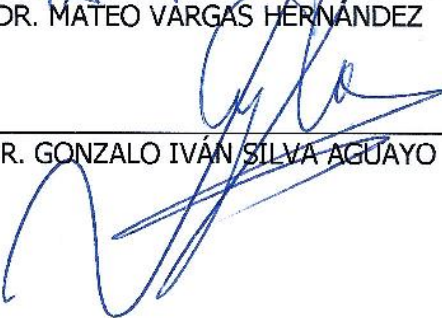

Firma del Alumno (a)


Vo. Bó. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: Estimación de dosis diagnóstico para el manejo de la resistencia en *Aedes aegypti* y alternativas de manejo. Realizada por el alumno: Manuel Alejandro Tejeda Reyes bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____
	DR. J CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL
ASESORA	 _____
	DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS
ASESOR	 _____
	DR. ÁNGEL LAGUNES TEJEDA
ASESOR	 _____
	DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ
ASESOR	 _____
	DR. GONZALO IVÁN SILVA AGUAYO

Montecillo; Texcoco, Estado de México, enero de 2018

ESTIMACIÓN DE DOSIS DIAGNÓSTICO PARA EL MANEJO DE LA RESISTENCIA EN *Aedes aegypti* Y ALTERNATIVAS PARA SU MANEJO

**Manuel Alejandro Tejeda Reyes, D. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018.**

RESUMEN

Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae), se considera una amenaza a la salud pública debido a que es transmisor de diversos agentes virales que provocan enfermedades como dengue clásico, dengue hemorrágico, fiebre amarilla, chikungunya, fiebre del Mayaro y Zika. Debido a esto, el control de este vector juega un papel imprescindible, situándose como uno de los pilares en la prevención y mitigación de estas enfermedades. El método de control más eficaz, en la lucha de este insecto, es el control químico. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a insecticidas a nivel nacional y mundial, pone en riesgo la continuidad en la utilización de esta valiosa herramienta. En este trabajo, determinamos la dosis diagnóstica para el monitoreo de la resistencia al insecticida bifentrina, utilizado en el control de este vector en México.

Los métodos actuales que se utilizan para evaluar el efecto insecticida en mosquitos requieren el uso del ingrediente activo y no son confiables para evaluar la toxicidad de productos formulados, y de insecticidas no convencionales, los cuales su uso está en aumento. Para solucionar este problema desarrollamos una metodología para determinar el efecto de estos insecticidas sobre mosquitos, la cual puede cubrir la necesidad de evaluar nuevas alternativas de manejo en estos insectos.

Los hongos entomopatógenos han adquirido gran interés como alternativa a los insecticidas convencionales, y de alguna forma, prolongarían la vida útil de estos, en este trabajo se evaluó la patogenicidad de aislamientos de *Beauveria* y *Metarhizium* en el control de larvas y adultos de *A. aegypti*. Los resultados obtenidos mostraron una variación en la

susceptibilidad de larvas y adultos, siendo las larvas más susceptibles. Los aislamientos GC03 (*B. pseudobassiana*), HTee165 (*Metarhizium spp.*) fueron los más virulentos en adultos, mientras que los aislamientos ARSEF2134 (*M. robertsii*), Ma129 y Ma130 (*M. anisopliae*) fueron los más efectivos en el control de larvas. Nuestros resultados ofrecen alternativas de manejo de *A. aegypti*, que además podrían prolongar la vida útil de los insecticidas utilizados en el control de este vector.

Palabras clave: mosquitos, resistencia, hongos entomopatógenos, manejo integrado de plagas.

ESTIMATION OF DIAGNOSTIC DOSE FOR THE MANAGEMENT OF RESISTANCE IN *Aedes aegypti* AND ALTERNATIVES OF CONTROL

**Manuel Alejandro Tejada Reyes, D. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018.**

ABSTRACT

Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae), is considered a threat to public health due to the transmission of various viral agents that cause diseases such as classic dengue, dengue hemorrhagic fever, yellow fever, chikungunya, Mayaro fever and Zika. Due to this, vector control plays an essential role, being one of the pillars in the prevention and mitigation of these diseases. The most effective control method, in the fight of this insect, is chemical control. However, the development of resistance to insecticides nationally and globally, puts at risk the continuity in the use of this valuable tool. In this work, we determine the diagnostic dose for monitoring the resistance to insecticide bifenthrin, used in the control of this vector in Mexico.

The current methods used to evaluate the insecticidal effect on mosquitoes require the use of the active ingredient and are not reliable to evaluate the toxicity of formulated products, and non-conventional insecticides, which are increasing in their use. To solve this problem we developed a methodology to determine the effect of these insecticides on mosquitoes, which can cover the need to evaluate new management alternatives in these insects.

The entomopathogenic fungi have acquired great interest as an alternative to conventional insecticides, and in some way, they would prolong the useful life of these, in this work the pathogenicity of *Beauveria* and *Metarhizium* isolates in the control of larvae and adults of *A. aegypti* was evaluated. . The results obtained showed a variation in the susceptibility of larvae and adults, with larvae being more susceptible. The isolates GC03 (*B. pseudobassiana*),

HTee165 (*Metarhizium spp.*) Were the most virulent in adults, whereas the isolates ARSEF2134 (*M. robertsii*), Ma129 and Ma130 (*M. anisopliae*) were the most effective in the control of larvae. Our results offer alternative management of *A. aegypti*, which could also prolong the useful life of the insecticides used in the control of this vector.

Keywords: mosquitoes, resistance, entomopathogenic fungi, integrated pest management.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado, y continuar con mi formación profesional.

Al Dr. J Concepción Rodríguez Maciel, por su apoyo, por sus consejos, sin lugar a duda una gran persona con la que estaré siempre agradecido. Gracias por su confianza y guía.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por su paciencia, por sus enseñanzas y sugerencias para la culminación de este trabajo, y sobre todo por sus palabras de ánimo cuando las cosas eran complicadas.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández, gracias por su amistad, confianza y su apoyo en la finalización de este trabajo.

Al Dr. Ángel Lagunes Tejeda, a quien me ha impartido desde la Licenciatura grandes enseñanzas, pero sobre todo por la manera tan sutil de alentar a sus estudiantes.

Al Dr. Gonzalo Iván Silva Aguayo, por sus aportaciones a este trabajo, ya que a pesar de la distancia, estuvo siempre pendiente de las dudas que surgieron.

A todos los profesores que me impartieron clases en mi estancia en el Colegio, en especial al M.C. Jorge Valdez Carrasco por las innumerables molestias que le ocasione, muchas gracias.

Al equipo de Toxicología: Maribel Rivero, Don Guillermo, Don Edmundo, y Adrián Botello.

A todos mis compañeros que hicieron amena mi estancia en esta Institución.

DEDICATORIA

A Laura y Alejandro
Por su apoyo y cariño
Los amo

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
LITERATURA CITADA.....	6
CAPÍTULO I. DETERMINACIÓN DE DOSIS DIAGNÓSTICA AL INSECTICIDA BIFENTRINA EN <i>Aedes aegypti</i> L.	10
1.1 Resumen.....	10
1.2 Abstract	10
1.3 Introducción	10
1.4 Materiales y Métodos	12
1.5 Resultados.....	13
1.6 Discusión.....	14
1.7 Literatura Citada.....	16
CAPÍTULO II. NUEVA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS E INSECTICIDAS FORMULADOS SOBRE ADULTOS DE <i>Aedes aegypti</i> L.	18
2.1 Resumen	18
2.2 Abstract	18
2.3 Introducción	19
2.4 Materiales y Métodos	20
2.5 Resultados.....	24
2.6 Discusión.....	25
2.7 Literatura Citada.....	27

CAPÍTULO III. SELECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE <i>Aedes aegypti</i> L.	29
3.1 Resumen	29
3.2 Abstract	29
3.3 Introducción	30
3.4 Materiales y Métodos	32
3.5 Resultados	37
3.6 Discusión	42
3.7 Literatura Citada	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Partes de la trampa “CPT” para mosquitos adultos en la Figura 1.....	21
Cuadro 2. Aislamientos de <i>Metarhizium spp.</i> evaluados contra larvas y adultos de <i>A. aegypti.</i>	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de mortalidad de hembras adultas de <i>Aedes aegypti</i> de la población susceptible New Orleans a diferentes concentraciones del insecticida bifentrina ($\mu\text{g}/\text{botella}$). Barras de error corresponden al error estándar de la media.	14
Figura 2. Fotografías de la trampa “CPT”. Los números tienen la secuencia mencionada en el Cuadro 1.....	21
Figura 3. Proporción of hembras muertas de <i>A. aegypti</i> muertas en los tratamientos con <i>Beauveria spp.</i> a los 20 días de la aplicación. Barras de error representan los límites de confianza al 95% de la transformación de la escala logística. *Con pase por <i>A. aegypti</i>	25
Figura 4. Proporción de mortalidad en larvas de <i>A. aegypti</i> por aislamientos de <i>Metarhizium spp.</i> a cinco días después de la aplicación (concentración of 2×10^6 conidios/mL). Barras de error representan los límites de confianza al 95% de la transformación de la escala logística.	38
Figura 5. Proporción de mortalidad en hembras adultas de <i>A. aegypti</i> por aislamientos de <i>Metarhizium spp.</i> a veinte días después de la aplicación con Torre de Potter (concentración of 2×10^6 conidios/mL). Barras de error representan los límites de confianza al 95% de la transformación de la escala logística.	39
Figura 6. Proporción de mortalidad en larvas de tercer y cuarto instar de <i>A. aegypti</i> producido por Ma129 y Ma130 de <i>M. anisopliae</i> a diferentes intervalos después de la aplicación. Barras de error representan el error estándar de la media.	40
Figura 7. Proporción de emergencia de pupas de <i>A. aegypti</i> tratadas con los aislamientos Ma129 y Ma130 de <i>M. anisopliae</i> a 3 días después dela aplicación. Barras de error representan el error estándar de la media.	41
Figura 8. Proporción de mortalidad a 3 días de la exposición de larvas de <i>A. aegypti</i> tratadas con los aislamientos Ma129 y Ma130 de <i>M. anisopliae</i> en recipientes con diferentes días después de la inoculación. Barras de error representan el error estándar de la media.	42

INTRODUCCIÓN GENERAL

Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae) es un insecto de gran importancia mundial, debido a su habilidad de transmitir diversos “agentes” que causan enfermedades severas como dengue clásico, dengue hemorrágico, fiebre amarilla, chikungunya, fiebre del Mayaro y Zika que son consideradas en todo el mundo una amenaza a la salud humana (CDC, 2006; Bhatt *et al.*, 2013; Howard, 2016; SNVE, 2016; WHO, 2009).

A nivel mundial se estima que las infecciones por el virus del dengue crecen constantemente. Se estima que ocurren 390 millones de infecciones con esta enfermedad al año (Bhatt *et al.*, 2013). En México, durante el 2015 se documentaron 5464 casos confirmados de dengue, 11577 casos de Chikungunya y 15 con infección por Virus del Zika (SNVE, 2016).

El método para prevenir la transmisión de los diversos tipos de virus consiste en la implementación de estrategias de manejo de sus vectores, las cuales incluyen la reducción de los sitios de cría (cubrir y limpiar recipientes donde se almacena agua y aplicación de insecticidas (larvicidas) en sitios de almacenamiento), protección en el hogar (mosquiteros, repelentes y materiales tratados con insecticidas), uso de insecticidas contra adultos en exteriores e interiores, en combinación con programas de monitoreo del vector (WHO, 2009; WHO, 2012).

En lo que respecta al uso de insecticidas para el control de *A. aegypti*, éstos juegan un papel importante para lograr este objetivo. Sin embargo, uno de los principales problemas en el uso de insecticidas, es el desarrollo de resistencia, la cual se ha documentado en diferentes países y tema en el cual, se han realizado diversos estudios para conocer los mecanismos y genes involucrados en este fenómeno (WHO, 2009; Kamgang *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2013; Chino-Cantor *et al.*, 2013; Dusfour *et al.*, 2015).

En México, diversos estudios han demostrado la presencia de poblaciones de *A. aegypti* resistentes a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides (Flores *et al.*, 2005, 2006, 2009, 2013; Chino-Cantor *et al.*, 2014 y López *et al.*, 2014). Debido a la presencia de poblaciones resistentes, es fundamental la implementación de programas de monitoreo de la resistencia a insecticidas comúnmente usados en el control de este insecto, con la finalidad de medir los cambios en la frecuencia o grado de la resistencia en tiempo y espacio, así como evaluar si las tácticas que se implementan ayudan a disminuir o retrasar el desarrollo de resistencia (Brent, 1986).

Existen diversos métodos para la detección de resistencia basados en la exposición de insectos a dosis o concentraciones graduales de insecticidas, evaluando la mortalidad como la respuesta principal (Brogdon y McAllister, 1998; WHO, 2013; Wuosu *et al.*, 2015). Actualmente se cuentan con otros métodos de detección, los cuales aprovechan las características de cada tipo de resistencia. Método enzimático: La resistencia metabólica, se refiere al proceso mediado por un complejo de enzimas reguladas por el sistema de

detoxificación del insecto (Perry *et al.* 2011), estas enzimas regularmente se encuentran en niveles elevados en poblaciones sujetas a presión de selección de insecticidas en comparación con poblaciones que no han estado bajo este escenario. Entre los grupos de enzimas conocidos en el proceso de detoxificación de insecticidas se encuentran las monooxigenasas, esterasas y glutathion transferasas (Bergé *et al.* 1998; Hemingway y Ranson, 2000). Existen diversos protocolos para conocer la concentración de estas enzimas en poblaciones de mosquitos. Métodos moleculares: La modificación de la sensibilidad en el sitio de acción; es un tipo de resistencia recurrente a insecticidas, y se refiere a la modificación estructural del sitio de acción del insecticida, es decir se impide la unión a su sitio de acción, sin modificar la función primaria del sitio que ha sufrido el cambio (Hemingway y Ranson, 2000). Respecto a esto, se han documentado mutaciones que modifican el sitio de acción, las cuales pueden ser detectadas mediante pruebas moleculares de extracción de ADN (Ponce *et al.* 2009; WHO, 2013).

En lo que respecta a los bioensayos tradicionales donde se utilizan concentraciones graduales existe una gran variabilidad de resultados respecto a la susceptibilidad a un insecticida (Hertlein *et al.*, 2010). Para el caso de adultos de mosquitos existe el método propuesto por la Organización Mundial de la Salud denominado “WHO susceptibility test“, el cual analiza la respuesta a la exposición a diferentes concentraciones que ayuda a distinguir entre poblaciones resistentes y susceptibles a determinados insecticidas (WHO, 2013). Sin embargo, las limitantes de este bioensayo es la poca disponibilidad de adquirir el material y además de qué los insecticidas y las concentraciones disponibles son limitados (Perea *et al.*, 2009), además de que los resultados obtenidos solo nos indican “si” o “no” existe resistencia,

mas no el nivel en la población de interés (Wuosu *et al.*, 2015). En 1998, se propuso un nuevo bioensayo por parte del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) denominado “bottle assay” que debido a su bajo costo y facilidad de realización se ha convertido útil en un herramienta en el monitoreo de resistencia (Brogdon y McAllister, 1998; WHO, 2013). Este bioensayo se realiza a través de la impregnación de botellas de vidrio para exponer grupos de mosquitos para determinar mortalidad, la cual es dependiente del tiempo de exposición, este bioensayo ha resultado en una herramienta práctica en la determinación de la susceptibilidad de poblaciones de mosquitos. Sin embargo, las limitantes de este bioensayo es que no detecta niveles bajos de resistencia (Brogdon y McAllister, 1998), imprescindibles en el manejo de ésta (Roush and Miller, 1986); además, requiere exclusivamente de la utilización de insecticidas en grado técnico ya que cuando se utilizan formulaciones comerciales la respuesta es diferente dependiendo de la formulación (Perea *et al.*, 2009). Adicionalmente, entre las desventajas de este bioensayo se encuentra la utilización de insecticidas en grado técnico, en el que su costo es elevado, así como utilización de acetona, que en algunos países su uso se encuentra restringido (Perea *et al.*, 2009). Actualmente estos dos métodos de bioensayo son piezas clave en el manejo de la resistencia a vectores (WHO, 2013; Wuosu, 2015). Sin embargo, la generación de nuevos productos para el control de adultos de mosquitos (ingredientes activos, formulaciones comerciales, formulaciones comerciales con sinergistas, insecticidas naturales y hongos entomopatógenos) se encuentran limitados en el sentido de ser evaluados con estos métodos tradicionales.

Entre las alternativas al control químico que han mostrado potencial en el control de *A. aegypti*, se encuentran los hongos entomopatógenos (French-Constant, 2005). Estos agentes de control han despertado el interés en el manejo de vectores, realizándose diversos estudios para elucidar el efecto de estos sobre las diferentes etapas de desarrollo de mosquitos, principalmente en el control de larvas (Clark *et al.*, 1968; Silva *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009) y adultos mediante la utilización de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Scholte *et al.*, 2007; Darbro *et al.*, 2011).

Para hongos entomopatógenos, existe una gran diversidad de métodos para exponer a mosquitos adultos, regularmente se impregnan superficies con conidios de hongos y posteriormente se confinan mosquitos para que entren en contacto con estas superficies y adquieran los conidios vía contaminación tarsal (Scholte *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2008; García-Munguía *et al.*, 2011; Paula *et al.*, 2011; Valero-Jiménez *et al.*, 2014). Sin embargo, existen muchas limitaciones de los métodos de exposición ya que requieren de procesos adicionales antes de la exposición a los insectos, así como a una dependencia al tiempo de exposición.

Debido a lo anterior, existe la necesidad de diseñar nuevos métodos de bioensayo que coadyuven al monitoreo de la resistencia diferente a los métodos tradicionales con un enfoque en nuevas alternativas de control, así como la evaluación de aislamientos de hongos entomopatógenos que puedan servir como opciones en el manejo de *A. aegypti*, y contribuir en manejo integrado de este insecto. En las próximas secciones se describen algunas propuestas para que pueden aportar en el manejo integrado de *A. aegypti* y en el manejo de la resistencia a insecticidas.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, L. C., Ponce, G., Oviedo, M., López, B., & Flores, A. E. 2013. Resistance to malathion and deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 50 (5), 1031-1039.
- Bergé, J., Feyereisen, R., & Amichot, M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 353(1376), 1701-1705.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., William Wint, W. G. R., Simmons, C. P., Thomas W. Scott, T. S., Farrar, J. J. & Hay, S. I. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496 (7446): 504-507.
- Brent, K. J. 1986. Detection and monitoring of resistant forms: An overview. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. National Academy of Sciences. Washington, D.C. 298- 312 pp.
- Brogdon, W. G., and McAllister, J. C. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(2), 159-164.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Chikungunya fever diagnosed among international travelers--United States, 2005-2006. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 55 (38), 1040. DOI: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5538a2.htm>. Consultado en mayo de 2016.
- Chino-Cantor, A., Sánchez-Arroyo, H., Ortega-Arenas, L. D., & Castro-Hernández, E. 2014. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in Guerrero, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 39 (3): 601-612.
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., & Lindegren, J. E. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11(1), 1-7.
- Darbro, J. M., Graham, R. I., Kay, B. H., Ryan, P. A., & Thomas, M. B. 2011. Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Science and Technology*, 21(9), 1027-1047.

- Dusfour, I., Zorrilla, P., Guidez, A., Issaly, J., Girod, R., Guillaumot, L., Robello, C. & Strode, C. 2015. Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Negl Trop Dis*, 9 (11): e0004226. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004226
- Flores, A. E., Albeldaño-Vázquez, W., Salas, I. F., Badii, M. H., Becerra, H. L., Garcia, G. P., & Beaty, B. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1), 66-78.
- Flores, A. E., Grajales, J. S., Fernandez S., I., Ponce G., G., Loaiza B., M. H., Lozano, S., Brogdon, W., Black, W. C. & Beaty, B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(4), 672-677.
- Flores, A. E., Reyes S., G., Fernandez S., I., Sanchez R., F. J., & Ponce G., G. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 34(2), 167-177.
- Flores, A. E., Ponce, G., Silva, B. G., Gutierrez, S. M., Bobadilla, C., Lopez, B., Mercado, R. & Black, W. C. 2013. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Veracruz state Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 106 (2): 959-969.
- French-Constant, R. H. 2005. Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control?. *Trends in Ecology & Evolution* 20(11): 577-579.
- García-Munguía, A. M., Garza-Hernández, J. A., Rebollar-Téllez, E. A., Rodríguez-Pérez, M. A., & Reyes-Villanueva, F. (2011). Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit & Vectors*, 4(24), 1-6.
- Hemingway, J., & Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 371-391.
- Hertlein, M. B., Mavrotas, C., Jousseau, C., Lysandrou, M., Thompson, G. D., Jany, W., & Ritchie, S. A. 2010. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26 (1), 67-87.
- Howard, C. R. 2016. *Aedes* mosquitoes and Zika virus infection: an A to Z of emergence?. *Emerging Microbes and Infections* (2016) 5, e16; doi:10.1038/emi.2016.37
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Ntchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Corbel, V. & Paupy, C. 2011. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites & Vectors* 2011, 4:79.
- López, B., Ponce, G., González, J. A., Gutiérrez, S. M., Villanueva, O. K., González, G., Bobadilla, C., Rodríguez, I. P., Black, W. C. & Flores, A. E. 2014. Susceptibility to

- Chlorpyrifos in Pyrethroid-Resistant Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 51(3), 644-649.
- Owusu, H. F., Jančáryová, D., Malone, D., & Müller, P. 2015. Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology?. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-11.
- Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera, M. P., & Samuels, R. I. 2008. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*, 18(10), 1017-1025.
- Paula, A. R., Carolino, A. T., Paula, C. O., & Samuels, R. I. (2011). The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*, 4(8), 1-8.
- Perea, E. Z., León, R. B., Salcedo, M. P., Brogdon, W. G., & Devine, G. J. 2009. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malaria Journal*, 8(1), 208.
- Pereira, C. R., de Paula, A. R., Gomes, S. A., Pedra Jr, P. C. O., & Samuels, R. I. (2009). The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 19(8), 881-886.
- Perry, T., Batterham, P., & Daborn, P. J. 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 411-422.
- Ponce, G. G., Flores, A., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solís, G., Lozano-Fuentes, S., Bond, J. G., Casas-Martínez, M., Ramsey, J. M., García-Rejón, J., Domínguez-Galera, M., Ranson, H., Hemingway, J., Eisen, L. and Black IV, W. C. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(10), e531.
- Roush, R. T., and Miller, G. L. 1986. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *Journal of Economic Entomology*, 79(2), 293-298.
- Scholte, E. J., Takken, W., & Knols, B. G. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102(3), 151-158.
- Silva, R. O., Silva, H. H., & Luz, C. 2004. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Revista de Patología Tropical*, 33, 207-216.

- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNVE). 2016. Boletín Epidemiológico. Secretaria de Salud. Vol. 32. Semana 52. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem52.pdf>. Consultado en mayo de 2016.
- Valero-Jiménez, C. A., Debets, A. J., van Kan, J. A., Schoustra, S. E., Takken, W., Zwaan, B. J., and Koenraadt, C. J. 2014. Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria Journal*, 13(1), 1-8.
- World Health Organization (WHO). 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. DOI: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>. Consultado en mayo de 2016.
- World Health Organization (WHO). 2012. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. DOI: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf. Consultado en mayo de 2016.
- World Health Organization (WHO). 2013. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. DOI: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80139/1/9789241505154_eng.pdf. Consultado en enero de 2014.

CAPÍTULO I. DETERMINACIÓN DE DOSIS DIAGNÓSTICA AL INSECTICIDA BIFENTRINA EN *Aedes aegypti* L.

1.1 Resumen

Se determinó la dosis diagnóstica (DD) para el monitoreo de la resistencia al insecticida bifentrina en la población susceptible New Orleans de *Aedes aegypti*. Nuestros resultados muestran que la DD fue de 30 µg/botella, la cual se puede utilizar para el monitoreo de la susceptibilidad en poblaciones de campo de este vector. Algunas consideraciones adicionales para su implementación son discutidas.

1.2 Abstract

The diagnostic dose (DD) was determined for the monitoring of resistance to insecticide bifenthrin in the New Orleans susceptible population of *Aedes aegypti*. Our results show that the DD was 30 µg / bottle, which can be used to monitor the susceptibility in field populations of this vector. Some additional considerations for its implementation are discussed.

1.3 Introducción

La resistencia puede definirse como la disminución de la efectividad de un insecticida en una población que ha sido sometida a presión de selección (Tabashnik *et al.* 2014). Este fenómeno ha sido una de las limitantes en el uso de intensivo de insecticidas (Perry *et al.* 2011). En el caso de mosquitos, existe una gran diversidad de reportes de resistencia a las

cuatro clases químicas más importantes utilizadas en su control: organoclorados, carbamatos, organofosforados y piretroides (Moyes *et al.* 2017), comprometiendo la utilidad de las principales herramientas en el manejo de este vector, y propiciando la emergencia de enfermedades transmitidas por estos insectos. En México, existen diversos reportes de resistencia de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) a piretroides (Flores *et al.* 2009, Chino-Cantor *et al.* 2014), posiblemente debido a que el control de mosquitos estaba restringido en décadas pasadas al uso de permetrina y posteriormente resmetrina, deltametrina y lambda cyhalotrina (Ponce *et al.* 2009, Chino-Cantor *et al.* 2014), actualmente el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), restringe el uso de este grupo químico para algunas áreas del país, dada la evidencia de resistencia (CENAPRECE 2017).

Bifentrina, es un insecticida piretroide recomendado para el control de adultos mediante tratamientos espaciales a ultra bajo volumen en exteriores (CENAPRECE 2017), este insecticida se encuentra agrupado en el grupo 3 de la clasificación propuesta por el Comité de Acción para la Resistencia a Insecticidas (IRAC 2018), los cuales actúan como moduladores de los canales de sodio en el sistema nervioso de los insectos (Casida y Durkin 2013).

Parte del éxito del uso de insecticidas en programas de manejo integrado de plagas, es conocer la fluctuación de la susceptibilidad de las poblaciones de insectos objetivo, antes y durante su implementación de las estrategias, con la finalidad de tomar decisiones sobre mantener o modificar el programa de manejo (Roush y Miller 1986).

Aun cuando bifentrina es un insecticida recomendado para el control de vectores existe poca información sobre valores base de su dosis diagnóstica (DD), por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la DD para el monitoreo de la resistencia a bifentrina.

1.4 Materiales y Métodos

Insectos. Se utilizó la población New Orleans de *A. aegypti*, mantenida bajo condiciones controladas a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad $70\pm 5\%$ y fotoperiodo 12: 12. Grupos de aproximadamente 2000 huevos se depositaron en charolas de plástico que contenían 3 L de agua de la llave, posterior a su emergencia se alimentaron cada 2 días con croquetas molidas para perro Dog Chow®. Una vez que alcanzaron el estado de pupa, se colocaron en vasos de plástico de 255 mL de capacidad que contenían aproximadamente 130 mL de agua de la llave y se transfirieron a jaulas entomológicas de 70x60x60 cm para la emergencia de los adultos, mismos que se alimentaron *ad libium* con una solución azucarada al 10%. Para los bioensayos, las pupas se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad para que una vez emergidos los adultos se separaran según su sexo.

Insecticida. Se utilizó el insecticida bifentrina en grado técnico (99% de pureza, Chem Service, West Chester, PA). Las concentraciones requeridas se prepararon utilizando acetona (99.5% de pureza, Hycel de México, S.A. de C.V.).

Determinación de DD a bifentrina. Se realizó usando el bioensayo de botella propuesto por Brogdon y McAllister (1998), el cual consistió en la exposición de adultos hembra de 24 a

48 horas de edad a cinco concentraciones (15, 20, 25, 30 y 40 $\mu\text{g/ml}$) del insecticida bifentrina, por un periodo de 90 minutos y un testigo solo con la adición de acetona. Para la impregnación de las botellas 1 ml de cada concentración fue transferida a botellas Wheaton de 250 mL de capacidad, las cuales fueron invertidas, agitadas por 2 minutos y colocadas en posición horizontal sobre una máquina con rodillos giratorios (Star MFG International Inc.), las botellas se cubrieron para favorecer el secado por un periodo de al menos cuatro horas antes de ser utilizadas. Todos los tratamientos se repitieron cuatro veces. Un total de 20 a 25 hembras adultas se utilizaron en cada repetición. El testigo se impregnó de la misma manera pero solo usando 1 ml de acetona. La dosis diagnóstica fue determinada de acuerdo al método propuesto por Brogdon y McAllister (1998).

1.5 Resultados

La dosis diagnóstica obtenida para la población susceptible New Orleans de *A. aegypti*, fue de 30 $\mu\text{g/botella}$ de bifentrina para un período de 30 minutos, ya que esta concentración produjo consistentemente el 100% de mortalidad. Las dosis inferiores a 30 $\mu\text{g/botella}$ alcanzaron el 100 % de mortalidad posterior a los 45 minutos de exposición, mientras que la dosis de 40 $\mu\text{g/botella}$ alcanzó el 100% de mortalidad en un periodo menor al de 30 minutos (Figura 1).

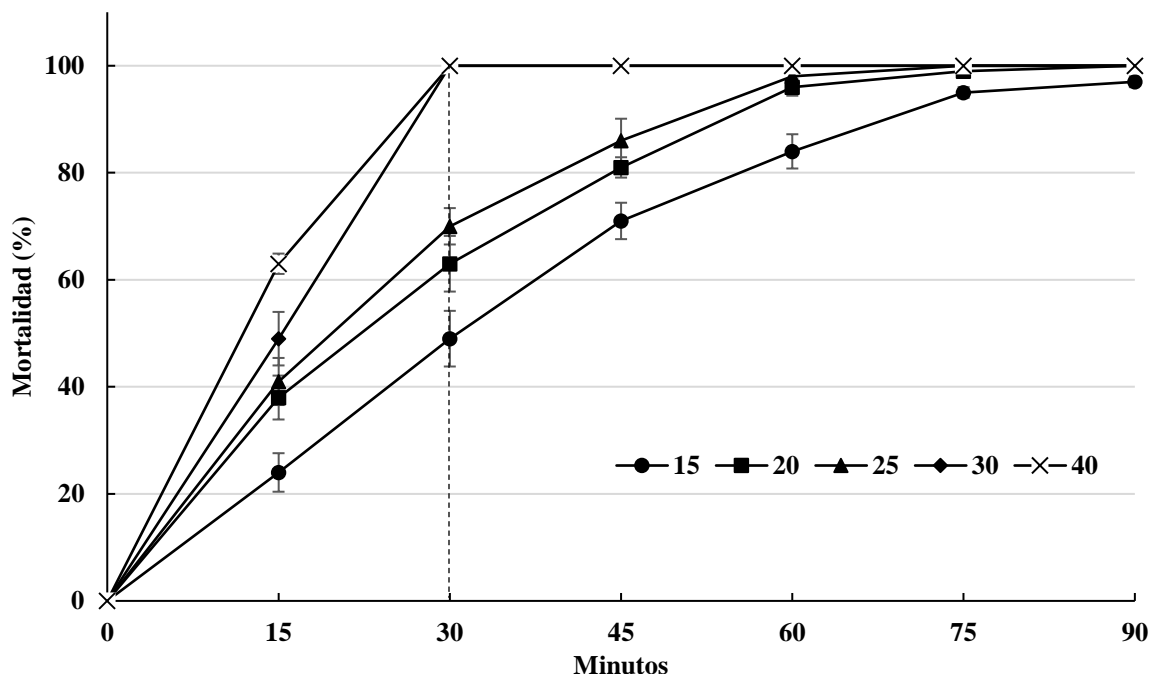


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de hembras adultas de *Aedes aegypti* de la población susceptible New Orleans a diferentes concentraciones del insecticida bifentrina ($\mu\text{g}/\text{botella}$). Barras de error corresponden al error estándar de la media.

1.6 Discusión

El éxito de los programas de manejo integrado de plagas, en donde uno de los componentes es la utilización de insecticidas, dependerá del conocimiento de la susceptibilidad de la plaga objetivo antes y durante la implementación de los programas de manejo, con la finalidad de detectar cambios que sugieran mantener o modificar tal estrategia (Roush y Miller 1986).

La dosis diagnóstica, determinada por el bioensayo de botella propuesto por Brogdon y McAllister (1998), ha sido una herramienta práctica en el monitoreo de la resistencia a insecticidas utilizados en el control de vectores (Perea *et al.* 2009; Owusu *et al.* 2015). La DD se utiliza como parámetro para realizar pruebas de detección de resistencia en poblaciones de campo.

En este estudio determinamos la DD al insecticida bifentrina, del cual existe poca información, que es crucial para establecer recomendaciones de utilización, en las diferentes regiones del país. Debido a la alta frecuencia de reportes de resistencia a piretroides (Flores *et al.* 2005; Flores *et al.* 2009; Ponce *et al.* 2009; Chino-Cantor *et al.* 2014), el CENAPRECE ha limitado el uso de este grupo de insecticidas en el control de mosquitos (CENAPRECE 2017), sin embargo, es de vital importancia evaluar la susceptibilidad a estos insecticidas, con la finalidad de poder volver a contar con estas herramientas en el manejo de vectores.

Resultados sobre determinaciones de DD han sido documentados en Pakistán con el mismo método de bioensayo, donde determinaron una DD de 20 µg/botella (Jahan y Sadiq, 2012). La variación mostrada entre estos resultados y los obtenidos en este estudio, los atribuimos a dos factores, a) la población que utilizan como referencia fue obtenida de campo y ha sido mantenida por 5 años sin presión de insecticidas, lo que significa un origen diferente a la población susceptible New Orleans utilizada en este estudio, y b) a que existe evidencia de que variaciones en las condiciones de cría, cambian la tasa de mortalidad, estos cambios pueden llevar a considerar a una misma población susceptible o resistente, dependiendo de las condiciones en las que se desarrollen (Owusu *et al.* 2017). Por lo que se recomienda que a la par de las evaluaciones que se realicen en poblaciones de campo, se considere un control adicional, en donde se traten insectos de la población de referencia New Orleans con la DD aquí determinada, para tener mayor certidumbre de los datos generados sobre la susceptibilidad de las poblaciones de campo.

Nuestros resultados muestran que la DD del insecticida bifentrina en la población susceptible New Orleans de *A. aegypti* fue de 30 µg/botella. La cual puede ser utilizada para el monitoreo de la susceptibilidad en poblaciones de campo de este vector.

1.7 Literatura Citada

- Brogdon, W. G., and McAllister, J. C. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(2), 159-164.
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58, 99-117.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2017. Productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2017. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/236439/Lista actualizada de productos recomendados por Cenaprece2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/236439/Lista_actualizada_de_productos_recomendados_por_Cenaprece2017.pdf), (last accessed 16 Jan 2018).
- Chino-Cantor, A., Sánchez-Arroyo, H., Ortega-Arenas, L. D., & Castro-Hernández, E. 2014. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in Guerrero, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 39 (3): 601-612.
- Flores, A. E., Albeldaño-Vázquez, W., Salas, I. F., Badii, M. H., Becerra, H. L., Garcia, G. P., & Beaty, B. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1): 66-78.
- Flores, A. E., Reyes S., G., Fernandez S., I., Sanchez R., F. J., & Ponce G., G. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 34(2), 167-177.
- IRAC. 2018. Mode of action classification scheme, v 8.3, July 2017, <http://www.irac-online.org/documents/moa-classification/?ext=pdf>, (last accessed 16 Jan 2018).
- Jahan, N., and Sadiq, A. 2012. Evaluation of resistance against Bifenthrin in dengue vector from Lahore, Pakistan. *Biologia: Pakistan*, 58(1-2), 13-9.
- Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V. David, J. P., & Weetman, D. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005625.
- Owusu HF, Jančáryová D, Malone D, Müller P. 2015. Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology?. *Parasites & Vectors* 8: 357.

- Owusu, H. F., Chitnis, N., & Müller, P. 2017. Insecticide susceptibility of *Anopheles* mosquitoes changes in response to variations in the larval environment. *Scientific Reports*, 7(1), 3667.
- Perea, E. Z., León, R. B., Salcedo, M. P., Brogdon, W. G., & Devine, G. J. 2009. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malaria Journal*, 8(1), 208.
- Perry, T., Batterham, P., & Daborn, P. J. 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 411-422.
- Ponce, G. G., Flores, A., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solís, G., Lozano-Fuentes, S., Bond, J. G., Casas-Martínez, M., Ramsey, J. M., García-Rejón, J., Domínguez-Galera, M., Ranson, H., Hemingway, J., Eisen, L. and Black IV, W. C. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(10), e531.
- Roush, R. T., and Miller, G. L. 1986. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *Journal of Economic Entomology*, 79(2), 293-298.
- Tabashnik, B. E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M. E., Hollingworth, R. M., & Carrière, Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 107(2), 496-507.

CAPÍTULO II. NUEVA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS E INSECTICIDAS FORMULADOS SOBRE ADULTOS DE *Aedes aegypti* L.

2.1 Resumen

Describimos una nueva metodología para la evaluación de insecticidas formulados y hongos entomopatógenos sobre adultos de mosquitos usando la torre de Potter. Nuestros resultados indican que este bioensayo es útil, con la finalidad de obtener información sobre la susceptibilidad de mosquitos a diferentes tipos de insecticidas convencionales y no convencionales, así como a hongos entomopatógenos. Se describen las características del bioensayo para su implementación.

2.2 Abstract

We describe a new methodology for the evaluation of formulated insecticides and entomopathogenic fungi on adults of mosquitoes using the Potter tower. Our results indicate that this bioassay is useful, in order to obtain information on the susceptibility of mosquitoes to different types of conventional and non-conventional insecticides, as well as to entomopathogenic fungi. The characteristics of the bioassay are described for its implementation.

2.3 Introducción

Tradicionalmente los estudios de susceptibilidad de poblaciones de mosquitos se basan en la utilización del bioensayo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO) propuesto en 1960, donde se realiza la exposición de mosquitos a concentraciones conocidas de un insecticida por un periodo de tiempo determinado (WHO, 1960; WHO, 2013). Sin embargo, es difícil adquirir el material y además de qué los insecticidas y las concentraciones disponibles son limitadas (Perea *et al.*, 2009). En 1998, Brogdon y McAllister, proponen el bioensayo de botella el cual ha resultado en una herramienta práctica en la determinación de resistencia, sin embargo, se usa exclusivamente con insecticidas en grado técnico ya que cuando se utilizan formulaciones comerciales la respuesta es diferente dependiendo del tipo de formulación (Perea *et al.*, 2009). Actualmente estas metodologías son piezas clave en el monitoreo de la resistencia a vectores (WHO, 2016; Wuosu, 2015). Sin embargo, nuevas alternativas para el control de adultos, en los que podemos encontrar a los insecticidas naturales, hongos entomopatógenos e insecticidas convencionales en formulaciones comerciales solos o en mezcla con sinergistas se encuentran limitados para ser evaluados con estos métodos tradicionales.

En el caso de hongos entomopatógenos, existen varias metodologías para evaluarlos contra mosquitos, las cuales consisten en la impregnación de superficies tales como papel filtro, cartulinas, telas, mediante el uso de “sprayers” (Mnyone *et al.* 2010; Darbro *et al.* 2011; Blanford *et al.* 2012), o barras K (Farenhorts & Knols 2010), o por inmersión (Paula *et al.* 2008). Posteriormente, estas superficies son sometidas a un periodo de secado, y finalmente los mosquitos son expuestos a los hongos entomopatógenos durante un determinado tiempo.

Otra manera de exposición consiste en la exposición de mosquitos al cultivo del hongo en desarrollo (Leles *et al.* 2010; García-Munguía *et al.* 2011).

Por lo que, es necesario desarrollar un método para evaluar insecticidas formulados y hongos entomopatógenos como insecticidas no tradicionales.

La torre de Potter es un aparato estandarizado que garantiza deposiciones homogéneas y continuas de sustancias (Potter, 1952; Hoskins y Craig, 1962). Esta se ha utilizado para evaluar insecticidas en grado técnico (Liang *et al.* 2007), productos formulados (Tucuch-Haas *et al.* 2010), insecticidas no convencionales (Liu y Stansly 1995) y hongos entomopatógenos (Cabanillas y Jones 2009). Adicionalmente los materiales probados pueden ser removidos fácilmente y evitar contaminación cruzada, desafortunadamente la desventaja es su alto costo (Mascarin *et al.*, 2013), el cual es solo asequible por agencias gubernamentales que realizan estudios para el manejo de la resistencia a insecticidas, no por investigadores independientes, que en general son los que realizan dichos estudios. El objetivo de este estudio es diseñar una metodología de bioensayo usando la torre Potter para determinar la susceptibilidad de los mosquitos adultos a las formulaciones comerciales, insecticidas botánicos y hongos entomopatógenos.

2.4 Materiales y Métodos

Descripción de la caja Petri cubierta con tul (CPT). La placa (base) de cajas Petri de plástico de 90 mm de diámetro son cubiertas con tul de 15 x 15 cm (Tul # 15, 100% Nylon, Modatelas S.A. de C.V., México, D.F.) con una perforación circular en la parte central de 5 mm de diámetro, que es sujeta con una liga de hule natural (Hércules No.64 B, Iberoamérica de Elásticos, S.A. de C.V., México, D.F.) para quedar completamente ajustada a la placa de la

caja Petri. Posteriormente son introducidos a través de la perforación los adultos de mosquitos a tratar, seguido a esto se bloquea la perforación para evitar la salida de los individuos colocando un trozo de popote de 2.0 cm de largo (Figura 2). Cada placa cubierta con tela de tul lista para usarse, tiene un costo de \$ 3.00 pesos.

Insectos. Para las evaluaciones se utilizaron hembras de 24 a 48 h de edad de la población New Orleans de *A. aegypti*, que ha sido criada bajo condiciones controladas a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad $70\pm 5\%$ y fotoperiodo 12:12.

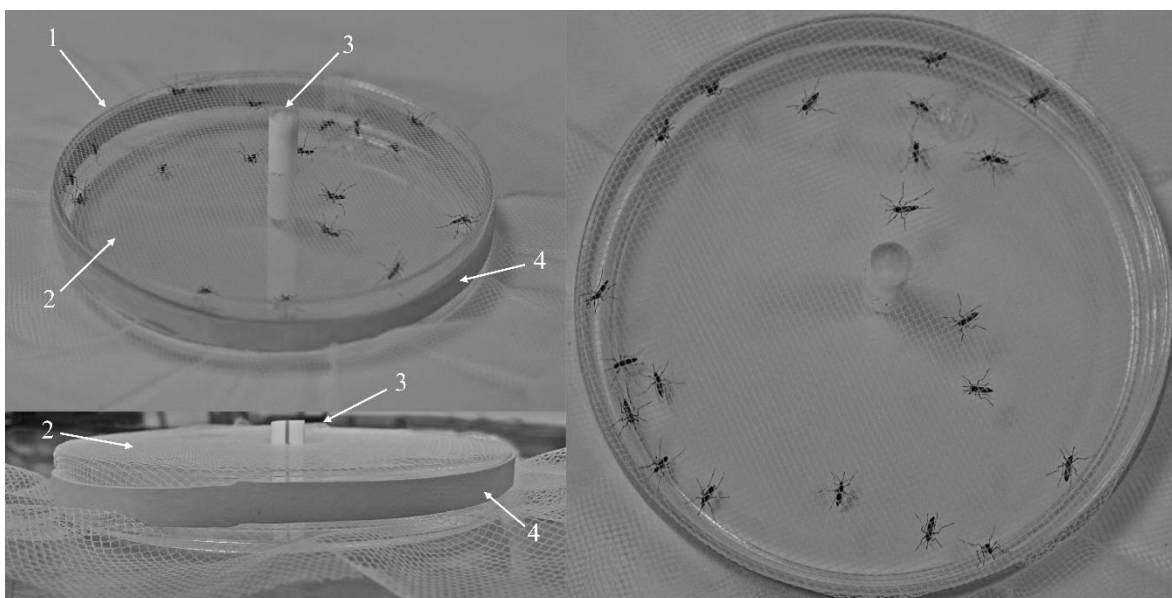


Figura 2. Fotografías de la trampa “CPT”. Los números tienen la secuencia mencionada en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Partes de la trampa “CPT” para mosquitos adultos en la Figura 1.

Parte	Producto	Dimensiones	Costo (pesos)
1	Caja Petri	9 x 1.5 cm	1.45
2	Tela	15 x 15 cm	0.45
3	Popote	2.0 cm	0.10
4	Liga	ND	1.00

Insecticidas. Se utilizaron cinco insecticidas formulados. Biflex® Pluss (bifentrina, 81.37 g ai/L, suspensión acuosa, FMC Agroquímica de México S. de R. L de C. V.); Cielo® (imidacloprid 3.0% + pralethrin 0.75%, solución oleosa, Clarke Mosquito Control Products Inc); Aqua Reslin® SUPER (permetrina 108.7 g ai/L + sbioaletrina 1.5 g ai/L, suspensión acuosa, Bayer de México S.A. de C.V.), MOSQUITOCIDA UNO U.L.V. (clorpirifos 122.8 g ai/L, insecticida liquido en aceite mineral, Public Health Supply and Equipment de México, S.A. de C.V.), y Green Control® ULV (Extracto de piretrinas naturales I y II at 17.5%, aceite extracto de canela 9.35% y aceite extracto de neem%, solución oleosa, Distribuidores Agrícolas Salamez S. de R.L. de C.V.).

Hongos entomopatógenos. En este estudio se utilizaron cuatro aislamientos GC03 (*Beauveria pseudobassiana* (Balsamo) Vuillemin (Cordycipitaceae), aislado de *Phyllophaga polyphylla* (Bates) (Coleoptera: Scarabeidae)), Bb88 (*B. bassiana* (Bals.) Vuill., aislado de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae)), y GHA con y sin pase a traves de *A. aegypti* (*B. bassiana*, Mycotrol, Laverlam Int. Corp.). Los cuales fueron sembrados en medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar y se incubaron en oscuridad por un periodo de 15 a 20 días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los conidios fueron suspendidos en Tween 80 al 0.02%. La cuantificación de conidios se realizó en una cámara de Neubauer para ajustar la concentración a 1×10^8 conidios por mL. En todos los hongos probados la viabilidad fue $\geq 90\%$.

Bioensayo. Se realizaron evaluaciones para determinar la eficacia de la CPT mediante la aplicación de formulaciones comerciales y hongos entomopatógenos. Donde grupos de 20

adultos hembra se confinaron en la CPT y fueron asperjados con un volumen de 1.5 mL de la concentración de 1×10^8 conidios/mL mediante el uso de una torre de Potter (Burkard Manufacturing Co Rickmansworth Herts England) usando una boquilla con una abertura de 0.275 mm de diámetro provista con el equipo a una presión de $0,703 \text{ kg.cm}^2$ (10 lb.pulgada²). El control fue tratado con 1.5 mL de Tween 80 al 0.02%. Tres repeticiones del experimento fueron realizadas en diferentes días, y cada repetición incluyo un control sin tratar. Los insectos tratados se colocaron en jaulas entomologicas conteniendo algodón impregnado con una solución azucarada al 10% para la alimentación de los adultos. Se registró diariamente el número de individuos muertos por un periodo de 30 días. Para verificar si los individuos muertos habían sido infectados con el entomopatógeno, los cadáveres fueron instalados en cámaras húmedas y se mantuvieron en incubación a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 días, después de este periodo fueron revisados para verificar el crecimiento micelial usando un microscopio estereoscópico.

Para las formulaciones comerciales, 1.5 mL de la concentración recomendada de cada insecticida fue aplicada vía torre de Potter, como describimos anteriormente. El control fue tratado con agua destilada. Los insectos tratados fueron confinados como mencionamos anteriormente. El porcentaje de mortalidad fue evaluado a los 15 minutos después de la aplicación. Cuatro repeticiones fueron realizadas, y cada repetición incluyo un control sin tratar.

Análisis estadístico. Se utilizó regresión logística para analizar la mortalidad producida por los hongos entomopatógenos a los 20 días de la aplicación. Primeramente se realizó un análisis comparando la mortalidad en el tratamiento testigo contra todos los tratamientos

donde se aplicó los aislamientos. Posteriormente se comparó el efecto de los aislamientos en los niveles de mortalidad. El análisis se realizó usando el paquete estadístico GenStat v 8.0 (Payne *et al.*, 2005). Los datos de mortalidad producida por los insecticidas formulados fueron sometidas a un análisis de varianza ($P \leq 0.05$) y a una prueba de comparación de medias (Tukey test, $P \leq 0.05$) usando el paquete estadístico SAS, versión 9.4 (SAS Institute 2016). Los datos fueron transformados a la función arcoseno $\sqrt{\% \text{ mortalidad}/100}$ antes del análisis.

2.5 Resultados

Para hongos entomopatógenos, se encontraron diferencias significativas en la proporción de hembras adultas muertas de *A. aegypti* al comparar el control contra los diferentes aislamientos evaluados de *Beauveria spp.* ($F_{1,28} = 23.0$, $df = 1,28$; $P < 0.001$). Al realizar una comparación entre aislamientos únicamente, se encontraron diferencias significativas ($F_{3,28} = 4.48$; $df = 3,28$; $P = 0.011$), donde la mayor mortalidad a los 20 días después de la aplicación fue producida por el aislamiento GC03 seguido por GHA (sin pase y con pase) y Bb88 (Figura 3). Así mismo, la mayor proporción de cadáveres con esporulación fue obtenida por el aislamiento GC03 con un 50%, mientras que en el control no se observó esporulación.

Para insecticidas formulados, la población New Orleans fue susceptible a los insecticidas evaluados a las dosis recomendadas, demostrando una alta eficiencia en la aplicación directa sobre adultos de *A. aegypti*, donde el 100% de mortalidad fue alcanzado en 15 minutos después de la aplicación ($P < 0.0001$), mientras que el control sin aplicación de insecticida mostró 0% de mortalidad.

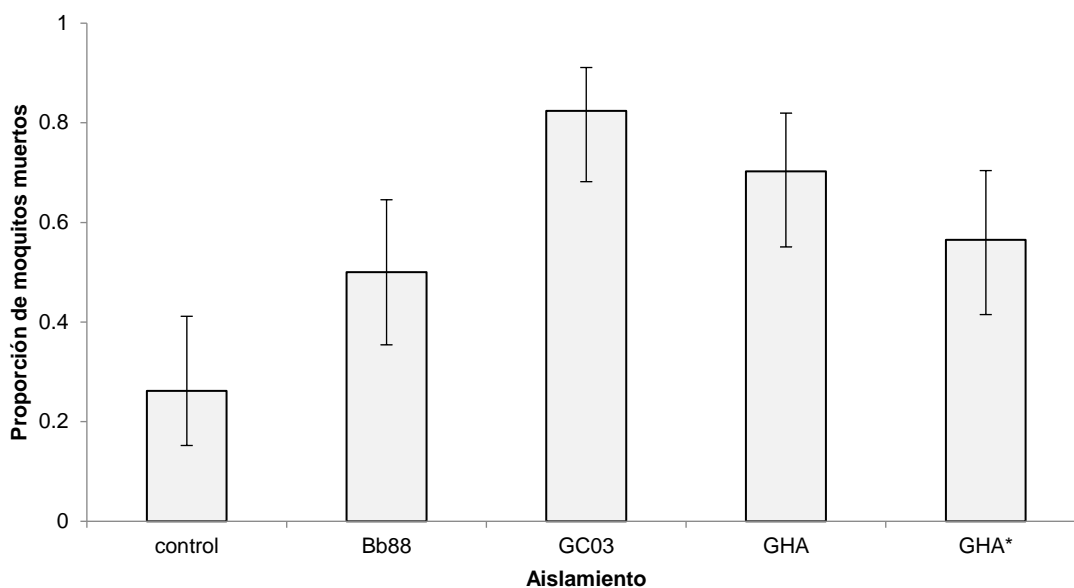


Figura 3. Proporción of hembras muertas de *A. aegypti* muertas en los tratamientos con *Beauveria spp.* a los 20 días de la aplicación. Barras de error representan los límites de confianza al 95% de la transformación de la escala logística. *Con pase por *A. aegypti*.

2.6 Discusión

Nuestros resultados indican que este bioensayo es útil para obtener información sobre la susceptibilidad de mosquitos hacia diferentes sustancias, como insecticidas convencionales y naturales en presentaciones comerciales, así como para hongos entomopatógenos. Cuando comparamos el efecto de hongos entomopatógenos con respecto a los insecticidas en presentaciones comerciales, un efecto lento fue observado en provocar una mortalidad mayor al 50%. Debido a que el hongo requiere penetrar la cutícula del insecto, con la finalidad de alcanzar el hemocele y desarrollarse, en algunos casos este proceso puede causar la muerte del hospedante en un periodo de 3 a 14 días después de la aplicación (Gillespie y Clayton 1989). Diferencias significativas en la proporción de mortalidad cuando comparamos los aislamientos de *Beauveria spp.*, podrían ser debidas a una variación natural en la virulencia

(Valero-Jiménez *et al.* 2014). Es de notar que el aislamiento GC03 aislado de gallina ciega, obtuvo la mayor proporción de mortalidad, mientras que el aislamiento Bb88 aislado de *H. hampei* la menor. Lo cual indica, que aunque hayan sido encontrados infectando insectos, no garantiza una alta tasa de mortalidad en insectos de otros órdenes, por lo que la adecuada selección de un aislamiento para el control de mosquitos es de vital importancia para el manejo de este vector. Similares resultados a los obtenidos del efecto de hongos entomopatógenos han sido observados en otros estudios (Scholte *et al.* 2007; Leles *et al.* 2010). Además, el control a los 20 días después de la aplicación mostró una proporción de mortalidad del ~20%, similar a lo reportado en otros métodos de selección de hongos entomopatógenos (Scholte *et al.* 2007; Leles *et al.* 2010). Por lo que, los resultados aquí obtenidos no son diferentes a lo que se ha reportado en la literatura. En el caso de hongos entomopatógenos, una ventaja del usar un equipo de aplicación como la torre de Potter permite una mayor estandarización del método de selección, evitando variación en los resultados, ya que otros métodos pueden presentar una alta variación en la adquisición de inóculo por parte de los mosquitos (Leles *et al.* 2010; García-Munguía *et al.* 2011). Así mismo, esta metodología no requiere el uso de sustratos impregnados que consumen tiempo en su preparación (Paula *et al.* 2008; Mnyone *et al.* 2010; Blanford *et al.* 2012). Así mismo, la mayoría de los métodos de selección requiere un tiempo variable de exposición a los sustratos tratados de 16 a 48 horas (Paula *et al.* 2008; Mnyone *et al.* 2010; Blanford *et al.* 2012), lo cual se reduciría con el método propuesto.

Debido a lo anterior, el método de bioensayo propuesto podría proveer información básica sobre el efecto de diferentes formulaciones de insecticidas y hongos entomopatógenos sobre adultos de mosquitos.

2.7 Literatura Citada

- Blanford S, Jenkins NE, Read AF, Thomas MB. 2012. Evaluating the lethal and pre-lethal effects of a range of fungi against adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Malaria Journal* 11: 365.
- Brogdon WG, McAllister JC. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14: 159–164.
- Cabanillas HE, Jones WA. 2009. Pathogenicity of *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the sweet potato whitefly B biotype, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Crop Protection* 28: 333–337.
- Darbro JM, Graham RI, Kay BH, Ryan PA, Thomas MB. 2011. Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Science and Technology* 21:1027-1047.
- Farenhorst M, Knols BG. 2010. A novel method for standardized application of fungal spore coatings for mosquito exposure bioassays. *Malaria Journal* 9: 27.
- García-Munguía AM, Garza-Hernández J A, Rebollar-Tellez, EA, Rodríguez-Pérez MA, Reyes-Villanueva F. 2011. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors* 4: 24.
- Gillespie AT, Claydon N. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science* 27: 203-215.
- Hoskins WM, Craig R. 1962. Uses of bioassay in entomology. *Annual Review of Entomology* 7: 437–464.
- Leles RN, Sousa NA, Rocha LFN, Santos AH, Silva HHG, Luz C. 2010. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 107: 1271–1274.
- Liang P, Cui JZ, Yang XQ, Gao XW. 2007. Effects of host plants on insecticide susceptibility and carboxylesterase activity in *Bemisia tabaci* biotype B and greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest Management Science* 63: 365–371.
- Liu TX, Stansly PA. 1995. Deposition and bioassay of insecticides applied by leaf dip and spray tower against *Bemisia argentifolii* nymphs (Homoptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science* 44: 317–322.
- Mascarin GM, Quintela ED, Da Silva EG, Arthurs SP. 2013. Precision micro-spray tower for application of entomopathogens. *BioAssay* 8: 1–4.
- Mnyone LL, Kirby MJ, Lwetoijera DW, Mpingwa MW, Simfukwe ET, Knols BG, Taken W, Russell TL. 2010. Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malaria Journal* 9: 246.

- Owusu HF, Jančárová D, Malone D, Müller P. 2015. Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology?. *Parasites & Vectors* 8: 357.
- 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 and Technology* 18: 1017-1025.
- Payne RW, Murray DA, Harding SA., Baird DB, Soutar DM. 2005 *GenStat for Windows* (8th Edition) Introduction. VSN International, Hemel Hempstead, UK.
- Perea EZ, León RB, Salcedo MP, Brogdon WG, Devine GJ. 2009. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malaria Journal* 8: 208.
- SAS Institute. 2016. *SAS User's Manual 9.4*. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- Scholte EJ, Takken W, Knols BGJ. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica* 102: 151–158.
- Tucuch-Haas JI, Rodríguez-Maciel JC, Lagunes-Tejeda Á, Silva-Aguayo G, Aguilar-Medel S, Robles-Bermudez A, Gonzalez-Camacho JM. 2010. Toxicity of spiromesifen to the developmental stages of *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). *Neotropical Entomology* 39: 436–440.
- Valero-Jiménez CA, Debets AJ, van Kan JA, Schoustra SE, Takken W, Zwaan BJ, Koenraadt CJ. 2014. Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria Journal* 13: 479.
- WHO. 2016. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Available at <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250677/1/9789241511575-eng.pdf>, (last accessed 28 Nov 2017).

CAPÍTULO III. SELECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* L.

3.1 Resumen

Los hongos entomopatógenos han adquirido gran interés como alternativa a los insecticidas convencionales. En este trabajo, se evaluó la patogenicidad de aislamientos de *Metarhizium* en el control de larvas y adultos de *Aedes aegypti*. Los resultados obtenidos mostraron una variación en la susceptibilidad de larvas y adultos, siendo las larvas más susceptibles. El aislamiento HTee165 (*Metarhizium spp.*) fue el más virulento en adultos, mientras que los aislamientos ARSEF2134 (*M. robertsii*), Ma129 y Ma130 (*M. anisopliae*) para larvas. Nuestros resultados ofrecen alternativas de manejo de *A. aegypti*.

3.2 Abstract

Entomopathogenic fungi have acquired great interest as an alternative to conventional insecticides. In this work, the pathogenicity of *Metarhizium* isolates in the control of larvae and adults of *Aedes aegypti* was evaluated. The results obtained showed a variation in the susceptibility of larvae and adults, with larvae being more susceptible. The HTee165 isolate (*Metarhizium spp.*) was the most virulent in adults, whereas the isolates ARSEF2134 (*M. robertsii*), Ma129 and Ma130 (*M. anisopliae*) for larvae. Our results offer an alternative for *A. aegypti* management.

3.3 Introducción

El mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), es el principal vector del dengue, enfermedad de importancia a nivel mundial, con alta incidencia de morbilidad y mortalidad (WHO, 2012; Bhatt *et al.*, 2013). En México esta enfermedad se considera un problema serio de salud pública. En 2015 se reportaron 26,665 casos y para 2016 17,795, lo que resultó en 42 y 34 defunciones, respectivamente (CENAPRECE, 2016), debido a ello se implementan campañas para difundir y aplicar estrategias encaminadas a la disminución de la incidencia de dicha enfermedad (NOM-032-SSA2-2014).

Una de las principales estrategias en el manejo de esta especie de insecto es mediante el uso de insecticidas (WHO, 2012) ya sea por la aplicación espacial o residual para el control de adultos o bien mediante la aplicación en contenedores de agua para el control de larvas (Santos *et al.*, 2016). Una evidente ventaja en el uso de insecticidas es su rápida efectividad, necesaria en la reducción de poblaciones de mosquitos, llevando a una menor probabilidad en la transmisión de virus asociados a este vector. Desafortunadamente, una limitante en el uso continuo de insecticidas, es el desarrollo de resistencia (Nauen, 2007), la cual se ha documentado, para la mayoría de los insecticidas usados en su control, en diversas poblaciones de *A. aegypti* en México. A la fecha se han documentado, con alta frecuencia, casos de resistencia a piretroides (Flores *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2009; Ponce *et al.*, 2009; Chino-Cantor *et al.*, 2014). Ante este panorama surge la necesidad de utilizar métodos alternativos en el control de mosquitos (Zaim y Guillet 2002; Morrison *et al.*, 2008) que puedan coadyuvar en el manejo de este vector.

Entre las alternativas al control químico convencional que han mostrado potencial en el control de este vector, se encuentran los hongos entomopatógenos (French-Constant, 2005).

Estos agentes de control han despertado el interés en el manejo de vectores, realizándose diversos estudios para elucidar el efecto de estos sobre las diferentes etapas de desarrollo de mosquitos, principalmente en el control de larvas (Clark *et al.*, 1968; Silva *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009) y adultos (Scholte *et al.*, 2007; Darbro *et al.*, 2011) figurando *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como especies promisorias.

Metarhizium es un hongo cosmopolita que infecta a una gran diversidad de insectos (Roberts y Leger, 2004) y se ha utilizado en el control de plagas de importancia agrícola, donde ha mostrado una gran versatilidad en su uso (Ibarra-Cortés *et al.*, 2013; Peña-Peña *et al.*, 2015). La patogenicidad de diversos aislamientos de *Metarhizium* contra *A. aegypti* ha sido promisorio contra huevos (Luz *et al.*, 2008), larvas (Riba *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009; Butt *et al.*, 2013; Abeer *et al.*, 2016) y adultos (Scholte *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2008; Leles *et al.*, 2010).

Estudios recientes han demostrado que la resistencia a insecticidas piretroides en *Anopheles gambiae* incrementa la susceptibilidad a hongos entomopatógenos (Howard *et al.*, 2010). Así mismo, se han observado efectos de potenciación de hongos entomopatógenos con insecticidas convencionales en el control de mosquitos (Farenhorst *et al.*, 2010; Paula *et al.*, 2011). Estas evidencias hacen atractivo investigar su potencialidad de uso contra *A. aegypti*. El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de ocho aislamientos de *Metarhizium* contra larvas y adultos de *A. aegypti*, y seleccionar al menos un aislamiento con potencial de utilizarse en programas de control biológico de este vector.

3.4 Materiales y Métodos

Insectos. Se utilizó la población New Orleans *A. aegypti*, mantenida bajo condiciones controladas a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad $70\pm 5\%$ y fotoperiodo 12:12. Grupos de aproximadamente 2000 huevos se depositaron en charolas de plástico que contenían 3 L de agua de la llave, posterior a su emergencia se alimentaron cada 2 días con croquetas molidas para perro Dog Chow®. Una vez que alcanzaron el estado de pupa, se colocaron en vasos de plástico de 255 mL de capacidad que contenían aproximadamente 130 mL de agua de la llave y transferidos a jaulas entomológicas de 70x60x60 cm para la emergencia de los adultos, mismos que se alimentaron *ad libitum* con una solución azucarada al 10%. Para los bioensayos, las pupas se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad para que una vez emergidos los adultos se separaran según su sexo.

Aislamientos. Los hongos entomopatógenos (Cuadro 2) se sembraron en medio de cultivo SDA (Sigma®, Becton Dickinson de México) y se incubaron por 15 días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los conidios se suspendieron en una solución de Tween 80 al 0.02%. Las suspensiones de cada aislamiento a utilizar se ajustaron a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. La cuantificación de conidios se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de los hongos se determinó de acuerdo al procedimiento utilizado por Inglis *et al.* (2012). En todos los aislamientos evaluados la viabilidad se encontraba $\geq 90\%$.

Cuadro 2. Aislamientos de *Metarhizium spp.* evaluados contra larvas y adultos de *A. aegypti*.

	Especie	Clave	Aislado de	Lugar de colecta
1	<i>M. pingshaense</i>	MGC01	<i>P. polyphylla</i>	Guanajuato, México
2	<i>M. robertsii</i>	ARSEF2134	ND*	ND
3	<i>M. brunneum</i>	ARSEF1066	ND	ND
4	<i>M. anisopliae</i>	Nopal a2	Suelo con nopal	Estado de México, México
5	<i>M. anisopliae</i>	H6520	Suelo con maíz	Durango, México
6	<i>Metarhizium sp.</i>	Htee165	ND	ND
7	<i>M. anisopliae</i>	Ma129	<i>Tetranychus urticae</i>	Colima, México
8	<i>M. anisopliae</i>	Ma130	<i>T. urticae</i>	Colima, México

*ND= No disponible

Bioensayo con larvas. Se utilizó el bioensayo propuesto por Silva *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. A vasos desechables de 255 mL de capacidad se les agregaron 49 mL de agua destilada y posteriormente se introdujeron 10 larvas de tercer instar temprano (4-5 días de edad). Subsecuentemente se agregó 1 mL de suspensión de cada hongo entomopatógeno a una concentración de 1×10^8 conidios. El testigo se trató de la misma manera, solo que con la adición de 1 mL de Tween 80 al 0.02%. Se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento y se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, HR de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo 12:12. Se registró el número de larvas muertas cada 24 h por un periodo de 5 días. El experimento fue repetido en 4 ocasiones. Para verificar la mortalidad, a los cuatro días de haber sido considerado a un individuo como muerto, se colocaron, de manera individual, en cámaras húmedas consistentes de placas de cultivo celular de 12 cavidades (con un diámetro de cavidad de 22 mm) con papel filtro Whatman No.1 a las cuales se les añadió 200 μL de agua destilada y se mantuvieron en incubación a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 días. Después de este periodo, se revisaron para verificar el crecimiento de micelio usando un microscopio estereoscópico, y se registró el porcentaje de insectos con micosis (esporulación) por tratamiento.

Análisis estadístico de los bioensayos con larvas. Los datos obtenidos del número de larvas muertas a los 5 días se analizaron mediante regresión logística. Inicialmente se realizó un análisis entre las repeticiones del experimento para determinar si se requería analizar cada experimento de forma individual o se podían analizar de manera conjunta los cuatro experimentos. Posteriormente, se comparó mediante un contraste, la mortalidad en el control contra la mortalidad promedio de todos los aislamientos. La siguiente comparación fue un contraste entre el promedio de los cinco aislamientos de *M. anisopliae* contra el promedio de *M. pingshaense*, *M. robertsii*, *M. brunneum* Finalmente, se realizó una comparación entre los cinco aislamientos de *M. anisopliae*, y la comparación entre los tres aislamientos restantes (*M. pingshaense*, *M. robertsii*, *M. brunneum*). El análisis se realizó usando el paquete estadístico GenStat v 8.0 (Payne *et al.*, 2015).

Bioensayo con adultos. Se utilizaron adultos hembra de 24-48 h de edad. Grupos separados de 20 hembras, se colocaron en cajas Petri cubiertas con tul y se les aplicaron 1.5 mL de la suspensión 1×10^8 conidios ml^{-1} de cada hongo entomopatógeno, mediante el uso de una torre de Potter (Burkard Manufacturing Co Rickmansworth Herts England). Se utilizó una boquilla con una abertura de 0.275 mm de diámetro a una presión de 0,703 $\text{kg}\cdot\text{cm}^2$ (10 lb.pulgada²). Antes de la aplicación, con el uso del vórtex (Modelo 8294B30, Thomas Scientific) se agitó por 5 segundos cada concentración. Los individuos tratados se depositaron en jaulas entomológicas de 25x20x20 cm, los cuales tuvieron acceso *ad libitum* a una solución azucarada al 10% y se incubaron a una temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$, humedad $70\pm 5\%$ y fotoperiodo 12:12. El testigo se manejó de la misma manera, solo que sin la adición de

entomopatógenos y se les aplicaron 1.5 mL de Tween 80 al 0.02%. Se realizaron 4 repeticiones independientes del experimento. Se registró diariamente el número de individuos muertos para posteriormente determinar el porcentaje de mortalidad, por un periodo de 30 días. Para verificar si los individuos muertos habían sido infectados con el entomopatógeno estos se separaron de las jaulas y posteriormente se realizó el procedimiento descrito anteriormente.

Análisis estadístico de los bioensayos con adultos. Los datos obtenidos del número de hembras de *A. aegypti* muertas a los 20 días se analizaron mediante regresión logística. Inicialmente se compararon los experimentos, para determinar si se requería analizar cada experimento en forma individual o se podían analizar de forma conjunta los cuatro experimentos. Enseguida se realizó un análisis comparando mediante un contraste, la mortalidad promedio en el control contra la mortalidad promedio de los aislamientos evaluados. Posteriormente se comparó el efecto de las 4 especies: *M. anisopliae* (cinco aislamientos), *M. pingshaense*, *M. robertsii* y *M. brunneum*, cada uno con un solo aislamiento. Finalmente se compararon los cinco aislamientos de *M. anisopliae*. El análisis se realizó usando el paquete estadístico GenStat v 8.0 (Payne *et al.*, 2015).

Efecto sobre larvas de tercer y cuarto instares. El efecto de los aislamientos Ma129 y Ma130 fue evaluado de manera separada en larvas de 3er y 4to instar, exponiéndolas como se describió anteriormente. La mortalidad se evaluó cada 8 h por un intervalo de 3 días. Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento. El experimento fue repetido en dos ocasiones.

Análisis estadístico del efecto sobre larvas del tercer y cuarto instares. Los datos obtenidos se analizaron usando modelos lineales mixtos, considerando como efectos fijos las larvas de los dos instares (L3 y L4), los aislamientos (Ma129 y Ma130), y el tiempo. También se incluyeron como efectos fijos las tres interacciones dobles y la triple interacción, es decir, todos los términos resultantes de la estructura factorial obtenida de los tres factores mencionados. El análisis se realizó usando el paquete estadístico GenStat v 8.0 (Payne *et al.*, 2015).

Efecto sobre pupas. El efecto de los aislamientos Ma129 y Ma130 se evaluó de manera separada en pupas, donde se estimó el número de adultos que emergieron cada 24 h. Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento: los dos aislamientos más un testigo al cual se le agregó 1 mL de Tween 80 al 0.02%. El experimento completo se repitió dos veces. El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico GenStat v 8.0 (Payne *et al.*, 2015).

Análisis estadístico del efecto sobre pupas. Para el caso de las pupas, se tienen solo dos factores: aislamientos y tiempo. Por lo cual ahora el modelo lineal mixto solo incluyó como efectos fijos a los aislamientos (Ma129 y Ma130), el tiempo y la interacción aislamiento \times tiempo. En ambos casos, larvas y pupas se declararon como efectos aleatorios a los experimentos y las repeticiones. Los modelos se estimaron mediante máxima verosimilitud restringida (REML). El análisis se realizó usando el paquete estadístico GenStat v 8.0 (Payne *et al.*, 2015).

Persistencia en el control de larvas. Con la finalidad de evaluar la persistencia de los tratamientos Ma129 y Ma130, se utilizó el procedimiento descrito por Pereira *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. Se evaluó la mortalidad a los 0, 5, 10, 20 y 30 días después de la inoculación. Los tratamientos se prepararon como se mencionó anteriormente, aplicando 1 mL de la suspensión 1×10^8 conidios mL^{-1} de cada hongo. Cada dos días se aforó a 50 mL para compensar el agua evaporada. Se añadieron en cada intervalo de evaluación 10 larvas de tercer instar, a partir de que fueron agregadas, se evaluó la mortalidad por un periodo de 3 días.

Análisis estadístico de la persistencia en el control de larvas. Los datos obtenidos se analizaron usando un modelo lineal mixto similar al caso anterior descrito para las pupas, considerando como efectos fijos los aislamientos, el tiempo, y la interacción aislamiento \times tiempo. Se declararon como efectos aleatorios a los experimentos y las repeticiones. Los modelos se estimaron mediante máxima verosimilitud restringida (REML). Los análisis se realizaron usando el paquete estadístico GenStat v 8.0 (Payne *et al.*, 2005).

3.5 Resultados

Larvas. En el estudio de patogenicidad de larvas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los experimentos ($F_{3, 132} = 0.43$, $P = 0.729$), por lo que, el análisis se realizó de manera combinada. En el control la proporción de larvas muertas fue de 0.020 (límites fiduciales al 95%: 0.013-0.037), sin observarse esporulación al colocarlas en cámara húmeda. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el

testigo contra los diferentes aislamientos de *Metarhizium* ($F_{1, 132} = 492.85, P < 0.001$). Al realizar una comparación entre los diferentes aislamientos de *M. anisopliae* contra las otras especies, se encontraron diferencias significativas ($F_{1, 132} = 11.88, P < 0.001$). Los diversos aislamientos de *M. anisopliae* fueron estadísticamente diferentes ($F_{4, 132} = 29.35, P < 0.001$) donde la mayor proporción de mortalidad fue producida por los aislamientos Ma129 y Ma130, mientras que el aislamiento HTee165 obtuvo la menor proporción (Figura 4), de igual manera al comparar las otras especies de *Metarhizium* spp. utilizadas en este estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{2, 132} = 33.09, P < 0.001$) donde el aislamiento de *M. robertsii* (ARSEF2134) produjo la mayor proporción de larvas muertas y *M. pingshaense* (MGC01) la menor (Figura 4). Los aislamientos Ma129 y Ma130 a las 48 horas produjeron una mortalidad $>90\%$.

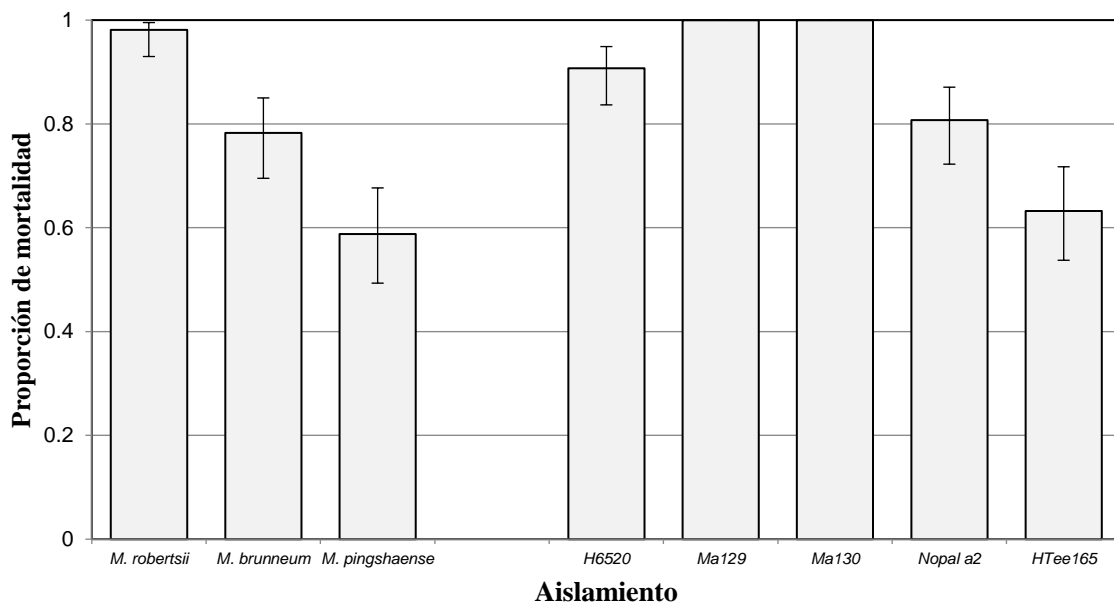


Figura 4. Proporción de mortalidad en larvas de *A. aegypti* por aislamientos de *Metarhizium* spp. a cinco días después de la aplicación (concentración de 2×10^6 conidios/mL). Barras de error representan los límites de confianza al 95% de la transformación de la escala logística.

Adultos. No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes repeticiones del experimento ($F_{3, 23} = 0.28, P=0.840$), por lo que se asume que no fueron diferentes. A los 20 días después de la aplicación se observó en el control una proporción de adultos muertos de 0.21 (límites fiduciales al 95%: 0.07-0.33), sin presentarse esporulación. Se encontraron diferencias significativas en la proporción de hembras adultas muertas de *A. aegypti* al comparar el control contra los diferentes aislamientos evaluados de *Metarhizium* ($F_{1, 23} = 31.47, P < 0.001$). Al realizar una comparación entre las diferentes especies evaluadas, no se encontraron diferencias significativas ($F_{3, 23} = 0.29, P=0.834$), oscilando en una proporción de mortalidad de 0.54 a 0.61 a los 20 días después de la aplicación.

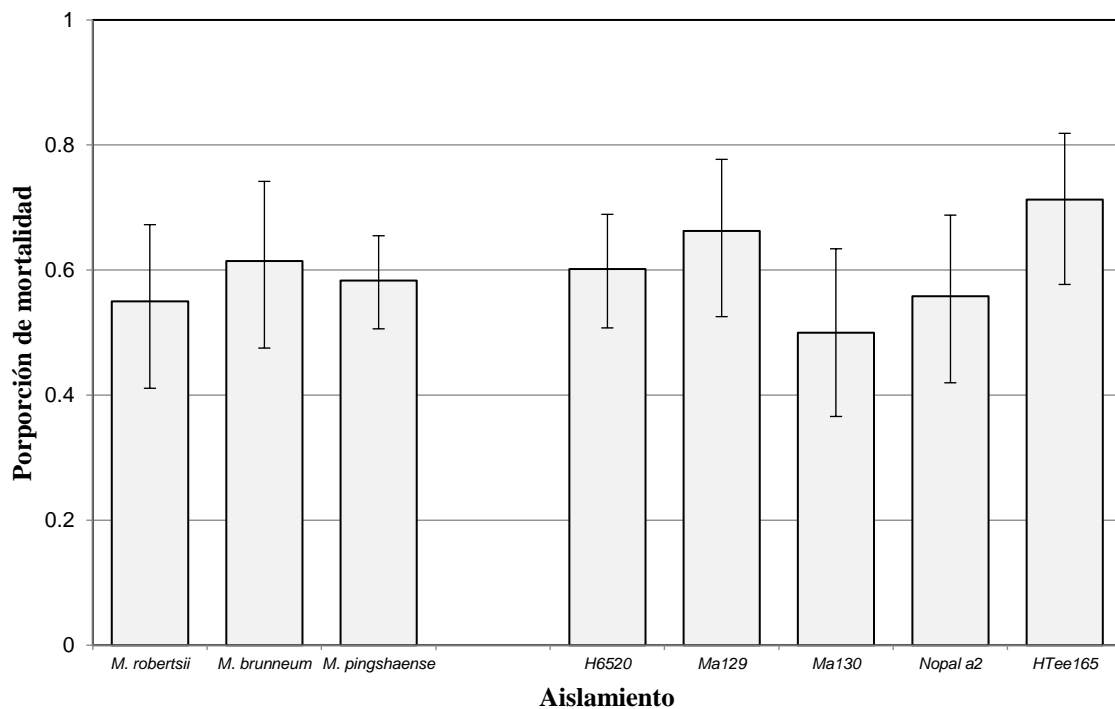


Figura 5. Proporción de mortalidad en hembras adultas de *A. aegypti* por aislamientos de *Metarhizium* spp. a veinte días después de la aplicación con Torre de Potter (concentración de 2×10^6 conidios/mL). Barras de error representan los límites de confianza al 95% de la transformación de la escala logística.

Al realizar una comparación entre los aislamientos de *M. anisopliae*, no se encontraron diferencias significativas ($F_{3, 23} = 1.71, P=0.182$) (Figura 5). Numéricamente la mayor proporción de cadáveres con esporulación se obtuvo por el aislamiento HTee165 con un 50%.

Efecto sobre larvas de tercer y cuarto instares. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de larvas de 3er y 4to instar a los aislamientos Ma129 y Ma130 ($F_{1, 208} = 2.37, P= 0.126$). A medida que aumentó el tiempo de exposición a los hongos entomopatógenos se observó un incremento en la proporción de mortalidad, encontrando diferencias significativas entre las evaluaciones a diferentes tiempos ($F_{7, 208} = 194.66, P= < 0.001$). A las 40 horas de exposición, las larvas de tercer instar fueron ligeramente más susceptibles que las de cuarto instar, pero es una diferencia apenas perceptible, ya que a las 64 horas de exposición alcanzaron el 100 % de mortalidad y el comportamiento fue similar para los dos aislamientos ($F_{7, 208} = 0.23, P=0.977$) (Figura 6).

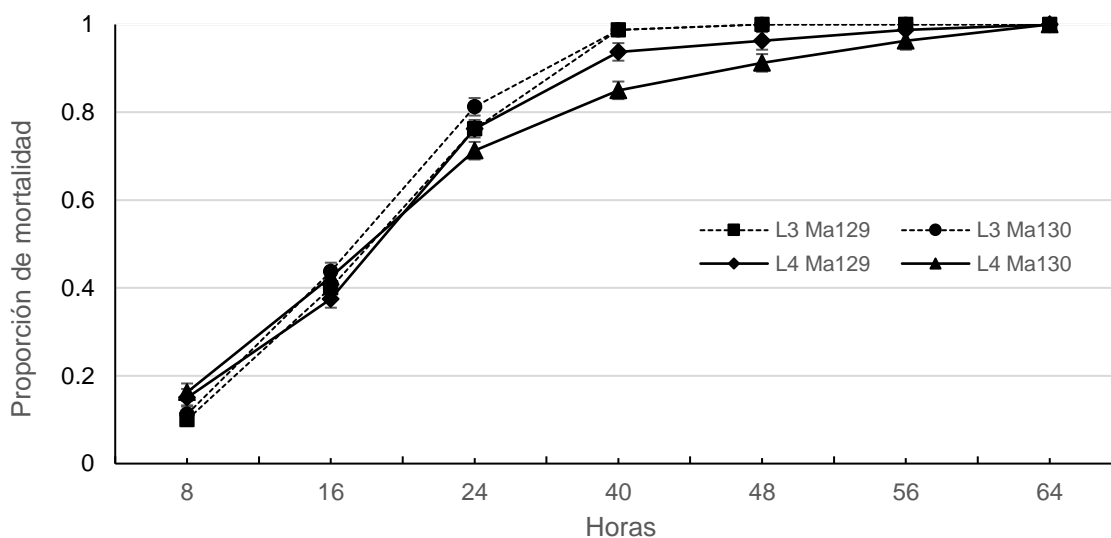


Figura 6. Proporción de mortalidad en larvas de tercer y cuarto instar de *A. aegypti* producido por Ma129 y Ma130 de *M. anisopliae* a diferentes intervalos después de la aplicación. Barras de error representan el error estándar de la media.

Efecto sobre pupas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los aislamientos Ma129 y Ma130 con el control (Figura 7) mostrando patrones de emergencia similares ($F_{2, 56} = 0.35, P= 0.841$). La variable tiempo presentó diferencias altamente significativas entre los diferentes días de evaluación ($F_{2, 56} = 278.33, P<0.001$), aumentando la proporción de emergencia a medida que se incrementa el tiempo, alcanzando el 100% de emergencia en el control a los 3 días de exposición. Mientras que el comportamiento entre los tratamientos Ma129, Ma130 y el control fueron similares a través de las evaluaciones ($F_{4, 56} = 0.42, P=0.794$) (Figura 7).

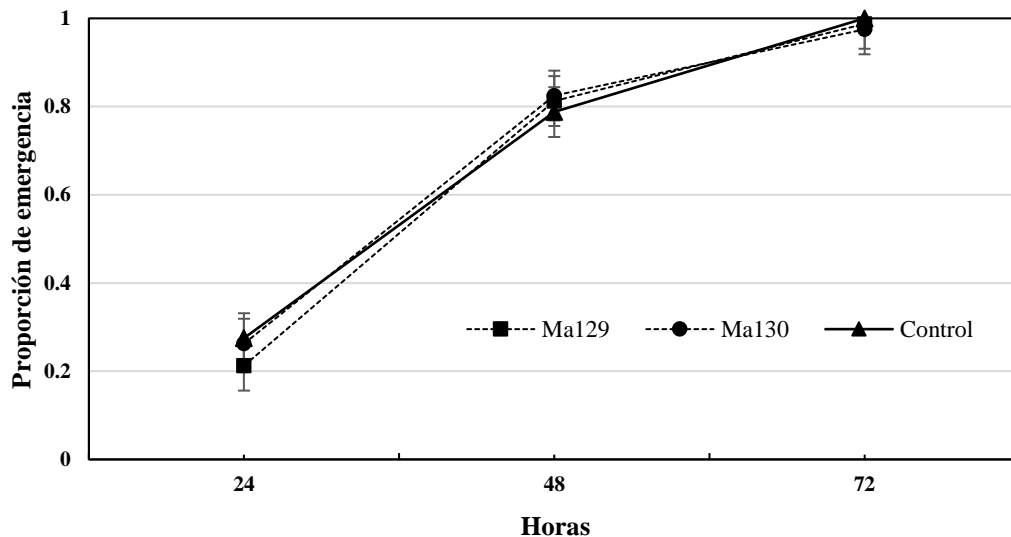


Figura 7. Proporción de emergencia de pupas de *A. aegypti* tratadas con los aislamientos Ma129 y Ma130 de *M. anisopliae* a 3 días después de la aplicación. Barras de error representan el error estándar de la media.

Persistencia. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los aislamientos Ma129 y Ma130 (Figura 8) mostrando un patrón de mortalidad similar ($F_{1, 63} = 0.20, P= 0.654$). Para la variable tiempo existieron diferencias significativas entre los diferentes días de evaluación ($F_{4, 63} = 399.66, P<0.001$), disminuyendo la proporción de mortalidad al paso de éste, alcanzando una proporción de mortalidad de 0.1 para el

aislamiento Ma129 y de 0.15 para el aislamiento Ma130 a los 30 días después de la inoculación y este comportamiento fue similar entre los dos aislamientos ($F_{4, 63} = 1.83$, $P=0.134$) (Figura 8).

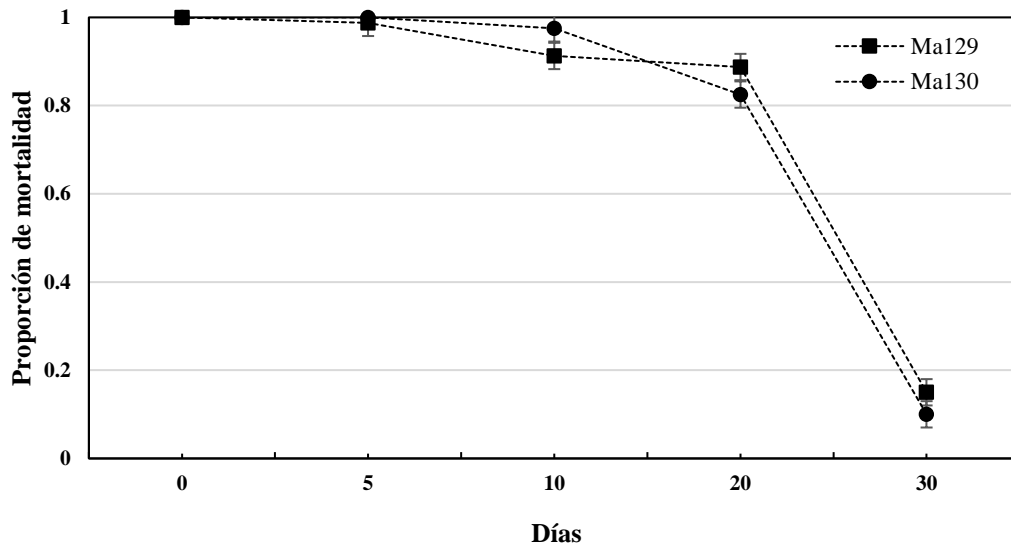


Figura 8. Proporción de mortalidad a 3 días de la exposición de larvas de *A. aegypti* tratadas con los aislamientos Ma129 y Ma130 de *M. anisopliae* en recipientes con diferentes días después de la inoculación. Barras de error representan el error estándar de la media.

3.6 Discusión

Uno de los factores importantes en el proceso de infección de entomopatógenos es el estado de desarrollo del insecto, ya que existe una variación en la susceptibilidad a ser infectados, recurrentemente los estados inmaduros son más susceptibles (Inglis *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2017), sin embargo, hay excepciones ya que adultos de *Frankliniella occidentalis* han mostrado ser más sensibles que larvas y pupas a *M. anisopliae* (Vestergaard *et al.* 1995).

Nuestros resultados demuestran una variación entre los aislamientos evaluados y en su efecto en los estados de desarrollo de *A. aegypti*, siendo el estado de larva más susceptible que el adulto, aunque el método de exposición es diferente, las larvas al encontrarse en medio acuático están más expuestas al efecto de hongos entomopatógenos, ya sea por medio de ingestión o adhesión a la cutícula; por lo que el uso de hongos entomopatógenos en el control de mosquitos debe de estar soportado por información certera del efecto de estos sobre el estado de desarrollo a controlar.

Los aislamientos que tuvieron la mayor proporción de mortalidad en larvas, Ma129 y Ma130 obtuvieron un efecto contrastante en el control de adultos y de manera inversa el aislamiento HTee165 que produjo la menor proporción de mortalidad de larvas, en adultos presentó la mayor proporción de mortalidad con este aislado. Resultados similares los documentaron Paula *et al.* (2008) y Pereira *et al.* (2009) al evaluar los aislamientos LPP133 y CG 144 de *M. anisopliae* en *A. aegypti*. Son de relevancia estos resultados ya que en gran medida muchas investigaciones son conducidas sobre un estado de desarrollo, (Silva *et al.* 2004, Paula *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2009, Leles *et al.* 2010), existen muy pocos casos en donde se evalúen los mismos aislamientos en diferentes estados de desarrollo (Paula *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2009, Leles *et al.* 2010, Leles *et al.* 2012), esto trae como consecuencia que se descarten aislamientos que pudieran ser eficaces en el control de otro estado de desarrollo.

La respuesta en la mortalidad de larvas producida por las diferentes especies de *Metarhizium* mostró variabilidad entre ellas, así como en los cinco aislamientos de *M. anisopliae*, estos

resultados son similares a los encontrados por Silva *et al.* (2004) y Pereira *et al.* (2009) que de igual manera obtuvieron una variación en la respuesta en larvas de *A. aegypti* a diversos aislamientos de *Metarhizium* spp. Tres aislamientos (ARSEF 2184, Ma129 y Ma130) mostraron un gran potencial para ser usados en el control de larvas, en lo que respecta a los aislamientos Ma129 y Ma130 en los diferentes experimentos mostraron una respuesta similar, que se atribuye a que estos dos aislamientos se encontraron infectando *Tetranychus urticae* en la misma localidad (Ibarra *et al.*, 2013), así mismo presentan una gran similitud genética (Carrillo-Benítez *et al.*, 2013).

La velocidad para matar a larvas de estos dos aislamientos podría ser comparable con la de un insecticida químico, ya que a las 16 horas se observaba una mortalidad mayor al 50% a una concentración de 2×10^6 conidios por mL, tanto en larvas de tercer como del cuarto instar. No se observaron diferencias entre un estado de desarrollo temprano y tardío, contrastante a lo documentado por Geetha y Balaraman (1999) quienes mencionan que existe una mayor susceptibilidad en estados tempranos. Esta eficacia para disminuir la población de larvas de mosquitos es una característica deseable con el objeto de reducir la posibilidad de transmisión de virus por este insecto.

Las larvas afectadas por Ma129 y Ma130 muestran una disminución de la movilidad y en algunas ocasiones la presencia de excretas que quedaban adheridas a la cauda de la larva, lo que hace suponer que alguna sustancia (toxina) estuviese involucrada en la rápida mortalidad

producida por estos aislamientos, síntomas similares han sido observados por Silva *et al.* (2004).

Aunque no determinamos con exactitud el mecanismo de acción de los aislamientos Ma129 y Ma130, asumimos que el proceso que ocasiona la muerte de larvas es vía ingestión ya que al evaluar estos aislamientos en el estado de pupa, no existió ningún efecto, debido a que la mayor proporción de pupas tratadas pasaron a la fase adulta; ya que se conoce que el estado de pupa no ingiere alimento (Nelson, 1986), por lo que se considera que esta vía de adquisición del hongo es nula o baja. Sin embargo, el estado de pupa ha mostrado mayor tolerancia que larvas a insecticidas que actúan vía ingestión (Santos *et al.* 2016). O bien el estado fisiológico (altamente esclerosado) no permite que exista algún tipo de perturbación externa y por ende no exista efecto de los hongos entomopatógenos.

Algunas observaciones mostraron que cuando se dejaban en recipientes con agua a larvas tratadas con los aislamientos Ma129 y Ma130, en un periodo de siete días se encontraban algunos ejemplares con la esporulación típica de *Metarhizium* (Fig. 3), principalmente aquellos que se encontraban flotando, consideramos que al encontrar las condiciones aeróbicas, el hongo aun viable en el intestino medio o en la superficie de la larva, completo su proceso de infección como saprofito. La mayor frecuencia en donde se presentaba la esporulación era en la cabeza (cerca de la cavidad bucal) y sifón, que coincide con lo reportado por Geetha (1999) y Lacey (1988) donde observaron una mayor acumulación de conidios de los HE. Esta característica saprofita permitiría al hongo persistir en el medio y

posiblemente una forma de transmisión horizontal, contrastante a lo que comenta Butt *et al.* (2013) que *M. anisopliae* no podría transferirse de esta manera.

Se encontró una alta persistencia de los aislamientos Ma129 y Ma130, disminuyendo su efectividad a partir de los 20 días después de ser suspendidos en agua; la mayor persistencia de un HE no formulado reportado había sido de 10 días (Pereira *et al.*, 2009), razón por la cual el escenario de su posible uso en campo hacen desfavorable su utilización (Vieira *et al.* 2013), por lo que, los resultados obtenidos, son interesantes desde el punto de vista de manejo, ya que al realizarse alguna formulación con estos aislamientos posiblemente se podría aumentar la duración de su efecto.

En el caso de adultos a los 20 días de la aplicación, se encontró al igual que en larvas variación en la respuesta, esto posiblemente a la variabilidad genética encontrada en hongos entomopatógenos (Carrillo-Benítez *et al.*, 2013). Esta variación en la mortalidad en adultos es similar a la encontrada por Paula *et al.* (2008) y Leles *et al.* (2010). Así mismo, este es el primer reporte de *M. pingshaense* afectando adultos de *A. aegypti*. Bajo el esquema de selección utilizado, consideramos al aislamiento HTee165 como prometedor en el control de *A. aegypti*, ya que a los 20 días ocasionó la mayor proporción de mortalidad, aunque el tiempo de efecto es amplio no tenemos referencias de comparación debido a la diversidad de métodos experimentales utilizados en la selección de HE, sin embargo, se ha reportado que tienen otros efectos en mosquitos como una reducción de fecundidad y alimentación sanguínea (Scholte *et al.*, 2006) y una mayor virulencia en poblaciones resistentes a

insecticidas (Howard *et al.*, 2010), condiciones que pueden explotar su uso en programas de manejo de la resistencia a insecticidas.

La selección de aislamientos en el manejo de insectos es un tema complejo debido al cúmulo de interacciones de estos con factores bióticos y abióticos (Inglis *et al.* 2001). Regularmente la virulencia es un factor determinante en la elección de un candidato a utilizar, sin embargo es importante evaluar otras características como lo sugieren Ibarra *et al.* (2013), en su respuesta a condiciones en las que *A. aegypti* se reproduce eficientemente, así mismo, evaluar interacciones con insecticidas o sustancias sinergistas que ayuden a la penetración del hongo, que pudieran acelerar la infección de los insectos tratados.

3.7 Literatura Citada

- Alkhaibari, A. M., Carolino, A. T., Yavasoglu, S. I., Maffei, T., Mattoso, T. C., Bull, J. C.,... & Butt, T. M. (2016). *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. *PLoS Pathog*, 12(7), e1005715.
- Alves, S. B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R. M., & Vieira, S. A. (2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 126(9), 504-509.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Williams, W. G. R., Simmons, C. P., Thomas W. Scott, T. S., Farrar, J. J. & Hay, S. I. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496 (7446): 504-507.
- Butt, T. M., Greenfield, B. P., Greig, C., Maffei, T. G., Taylor, J. W., Piasecka, J., ... & Quesada-Moraga, E. (2013). *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. *PLoS One*, 8 (12), e81686. doi:10.1371/journal.pone.0081686.

- Carrillo-Benítez, M. G., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., & Enríquez-Vara, J. N. 2013. Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microbial Ecology* 65: 437-449.
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., & Lindegren, J. E. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11(1), 1-7.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2016. Lista de productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2016. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ListaActualizadaProductoRecomendadosCENAPRECE2016_1.pdf. Consultado en julio de 2016.
- Chino-Cantor, A., Sánchez-Arroyo, H., Ortega-Arenas, L. D., & Castro-Hernández, E. 2014. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in Guerrero, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 39 (3): 601-612.
- Darbro, J. M., Graham, R. I., Kay, B. H., Ryan, P. A., & Thomas, M. B. 2011. Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Science and Technology*, 21(9), 1027-1047.
- Díaz-Martínez, S., Rodríguez-Maciel, J. C., Lagunes-Tejeda, Á., Tejeda-Reyes, M. A., & Silva-Aguayo, G. (2016). Susceptibilidad Diferencial a Spinosad en Huevo, Instares Larvales, Pupa, y Hembra de *Aedes aegypti* (L.). *Southwestern Entomologist*, 41(4), 1111-1120.
- Farenhorst, M., Knols, B. G. J., Thomas, M. B., Howard, A. F. V., Takken, W., Rowland, M. and N'Guessan, R. 2010. Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *PLoS ONE* 5(8): e12081. doi:10.1371/journal.pone.0012081
- Ffrench-Constant, R. H. 2005. Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control?. *Trends in Ecology & Evolution* 20(11): 577-579.
- Flores, A. E., Albeldaño-Vázquez, W., Salas, I. F., Badii, M. H., Becerra, H. L., Garcia, G. P., & Beaty, B. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1): 66-78.
- Flores, A. E., Reyes S., G., Fernandez S., I., Sanchez R., F. J., & Ponce G., G. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 34(2), 167-177.
- García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solís G. 2009. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Negl Trop Dis* 3(10): e531. doi:10.1371/journal.pntd.0000531

- Geetha, I., & Balaraman, K. 1999. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. *Indian Journal of Experimental Biology*, (37): 1148-1150.
- Howard, A. F., Koenraadt, C. J., Farenhorst, M., Knols, B. G., & Takken, W. 2010. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malaria Journal*, 9(1), 1-9.
- Ibarra-Cortés, K. H., Guzmán-Franco, A. W., González-Hernández, H., Suarez-Espinosa, J. & Baverstock, J. 2013. Selection of a fungal isolate for the control of the pink hibiscus mealybug *Maconellicoccus hirsutus*. *Pest Management Science*, 69(7), 874-882.
- Ibarra-Cortés, K. H., González-Hernández, H., & Guzmán-Franco, A. W. 2017. Susceptibility of nymphs and adults of *Diaphorina citri* to the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(3), 433-438.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. (Eds.). *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential*. CABI. pp. 23-69.
- Inglis, G.D., Enkerli, J. & Goettel, M.S. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, second ed. Academic Press, USA, pp. 189–253.
- Lacey, C. M., Lacey, L. A., & Roberts, D. R. 1988. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(1), 108-118.
- Leles, R. N., Sousa, N. A., Rocha, L. F. N., Santos, A. H., Silva, H. H. G., & Luz, C. 2010. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 107(5), 1271-1274.
- Leles, R. N., D'Alessandro, W. B., & Luz, C. 2012. Effects of *Metarhizium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, 110(4), 1579-1582.
- Morrison, A. C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T. W., & Rosenberg, R. (2008). Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Med*, 5(3), e68.
- Nauen, R. 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science*, 63(7), 628-633.
- Nelson, M. J. 1986. *Aedes aegypti*: Biology and ecology. Pan American Health Organization. Washington, D.C. 50 p.
- NOM-032-SSA2-2010. 2010. Norma Oficial Mexicana de Emergencia Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (D.O.F. 1 Jun. 2011) México. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015
- Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera, M. P., & Samuels, R. I. 2008. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae*

and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*, 18(10), 1017-1025.

- Paula, A. R., Carolino, A. T., Paula, C. O., & Samuels, R. I. 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*, 4(8), 1-8.
- Payne, R.W., Harding, S.A., Murray, D.A., Soutar, D.M., Baird, D.B., Welham, S.J., Kane, A.F., Gilmour, A.R., Thompson, R., Webster, R., Tunnicliffe, W.G., 2005. The Guide to Genstat Release 8: Statistics Part 2. VSN International, Oxford, UK.
- Pereira, C. R., de Paula, A. R., Gomes, S. A., Pedra Jr, P. C. O., & Samuels, R. I. (2009). The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 19(8), 881-886.
- Peña-Peña, A. J., Santillán-Galicia, M. T., Hernández-López, J., & Guzmán-Franco, A. W. (2015). *Metarhizium pingshaense* applied as a seed treatment induces fungal infection in larvae of the white grub *Anomala cincta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 9-12.
- Riba, G., Keita, A., Soares Jr, G. G., & Ferron, P. 1986. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2(4), 469-473.
- Roberts, D. W., & Leger, R. J. S. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1-70.
- Scholte, E. J., Knols, B. G., Samson, R. A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*, 4(1), 19.
- Scholte, E. J., Takken, W., & Knols, B. G. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta tropica*, 102(3), 151-158.
- Silva, R. O., Silva, H. H., & Luz, C. (2004). Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Rev Pat Trop*, 33, 207-216.
- Vestergaard, S., Gillespie, A. T., Butt, T. M., Schreiter, G., & Eilenberg, J. 1995. Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5(2), 185-192.
- Vieira, L. P., Paula, A. R., Paula, C. O., DaMatta, R. A., & Samuels, R. I. 2013. Infection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and Adults by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. *British Microbiology Research Journal* 3(3): 309-317.

World Health Organization (WHO). 2012. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. DOI:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf.

Consultado en mayo de 2016.

Zaim, M., & Guillet, P. 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in parasitology*, 18(4), 161-163.