



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA Y VECTORES

“Efecto de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) sobre *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio y otras especies de culícidos en condiciones de campo”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

DIEGO ARGÜELLES PALOMINO

DIRECTOR

DR. JOSÉ LINO ZUMAQUERO RÍOS

H. Puebla de Zaragoza, agosto 2016



INDICE

1. INTRODUCCION

- 1.1. Generalidades del control biológico
- 1.2. *Beuaveria bassiana* (Bals) Vuillemin
- 1.3. Familia Culicidae
- 1.4. *Aedes aegypti* y el control biológico

2. JUSTIFICACIÓN

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

- 4.1. Objetivo general
- 4.2. Objetivos particulares

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- 5.1. Cría de *Ae. aegypti*
- 5.2. Obtención y aislamiento de *B. bassiana*
- 5.3. Determinación de la viabilidad de *B. bassiana*
- 5.4. Evaluación de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio
- 5.5. Efecto de *B. bassiana* sobre la oviposición de hembras infectadas sobrevivientes al tratamiento
- 5.6. Evaluación del efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de diferentes especies de culícidos en campo
- 5.7. Identificación de especies de culícidos en criaderos positivos
- 5.8. Análisis de datos

6. RESULTADOS

- 6.1. Evaluación en laboratorio
- 6.2. Efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*
- 6.3. Efecto de *B. bassiana* sobre la oviposición de hembras infectadas sobrevivientes al tratamiento
- 6.4. Ensayo en campo

7. DISCUIÓN

8. CONCLUSIONES

9. BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

Introducción: *Aedes aegypti* (Díptera:Culicidae) es un mosquito hematófago vector de enfermedades arbovirales. En México, las enfermedades de transmisión por vector (ETV's) son la octava causa asociada a salud pública. Las inadecuadas estrategias de control de *Ae. aegypti* además del abuso de los insecticidas químicos han ocasionado que las poblaciones de este organismo sean más densas. *Beauveria bassiana* (Ascomicota:Cordycipitaceae) es un hongo que ataca un amplio espectro de insectos por lo que han hecho formulaciones a base de sus esporas para el control de plagas e insectos vectores (Segura, 2004). Estudios avalan que esta especie es eficaz en el control de poblaciones densas de *Ae. aegypti* mediante la infección de adultos, sin embargo, no se han realizado estudios sobre formas larvianas. Se evaluó el efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de 3^{er} estadio de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio con la finalidad de evaluar el comportamiento de los ejemplares sobrevivientes posterior a la infección y determinar los efectos de *B. bassiana* sobre la oviposición de hembras infectadas. Material y métodos: Se buscaron alrededor del área y perímetro de Ciudad Universitaria criaderos artificiales y cuerpos de agua con presencia de larvas y pupas, una vez encontrados se calculó la aproximación del número de larvas en el criadero encontrado y se calculaba el índice de recipientes y la media de larvas por cucharón. El criadero se inoculaba el cuerpo de agua con *Beauveria bassiana* en tween 70 al 0.05% con una concentración de 1×10^{12} esporas en 15 ml. Posteriormente se muestreo cada 48 horas en los cuerpos de aguas inoculados la aproximación del número de larvas en el criadero inoculado y se calculó el índice de recipientes y la media de larvas por cucharón con el fin de comparar los datos y evidenciar que efectivamente el hongo está actuando y reduciendo la población. Resultados. Bioensayo en laboratorio: se obtuvo que *B. bassiana* presento una viabilidad final del 96%. Los resultados de la prueba Probit demuestran que *B. bassiana* tuvo una CL50 de 1×10^{10} esporas/ml y TL50 a las 48 horas. La concentración con mayor efecto en la mortalidad de larvas fue la de 1×10^{11} al generar una mortalidad del 74.6%. Las hembras sobrevivientes al bioensayo presentaron una baja ovoposición; los adultos muertos se sembraron

en medio PDA diferencial y se observó el micelio del hongo que momificó los cuerpos, lo que indica que el hongo es capaz de matar aún en etapa adulta a pesar de haber sido expuestas en los terceros estadios. Bioensayo en campo: se encontraron en general 4 especies de culícidos en los criaderos tratados: *Aedes epactius*, *Culex stigmatosoma*, *Culex salinarius* y *Culex restuans*. Se encontraron tres criaderos positivos de los cuales se calculó la densidad relativa inicial por medio del índice L/Cu. Los valores de los índices disminuyen conforme transcurre el tiempo después de la aplicación de la formulación de *B. bassiana*. Los criaderos presentaron una mortalidad final del 92% transcurrido 96 horas después de la inoculación. Las Pruebas de ANOVA y LSD arrojaron que estadísticamente ($P < 0.05$) la formulación de *B. bassiana* disminuye la población de larvas en los criaderos.

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades del Control Biológico

Los vectores de enfermedades representan un gran problema de salud a humanos y mamíferos, entre ellos, los mosquitos son los más conocidos. Por lo que el combate demanda de métodos efectivos, económicos y sin riesgo a la salud humana ni al medio ambiente. El control biológico como estrategia de combate ha tenido un avance significativo en el país, pues hay más de 60 organizaciones y empresas privadas que ofertan agentes antagonistas como: hongos, virus, bacterias y nematodos (Rodríguez y Arredondo, 2007). Esta técnica es una de las formas más antiguas de control de plagas y vectores, que se la atribuye a los antiguos agricultores chinos (Nicholls, 2008).

En el año 1919 Smith utilizó el término de control biológico para referirse a la supresión de poblaciones de insectos por la acción de enemigos naturales, manipulados por el hombre sean nativos o introducidos como son parásitos, depredadores y entomopatógenos (Infante, 2008). Es a partir del año 1930 cuando se realizan las primeras investigaciones con hongos, bacterias, protozoarios, nemátodos y virus desarrollando una variedad de bioinsecticidas.

En Francia e Italia, donde la producción de seda fue importante en los años 1466 y 1540, se perdieron las larvas de los gusanos de seda debido a la enfermedad anual de la “muscardina”. En la actualidad el término muscardina se refiere a la enfermedad causada por hongos en insectos. Más tarde Bálamo Crivelli en 1935, ubicó al hongo en el género *Botrytis*, nombrándolo *Botrytis bassiana*. Posteriormente algunos investigadores observaron que el hongo presentaba características diferentes a *Botrytis*, estableciendo nuevas especies (Ferrón, 1978).

El control de plagas se inició con el potencial de los hongos entomopatógenos a partir de estudios de Metchnikoff (1879) y Krassilstchick (1888), quienes lo usaron para controlar al escarabajo *Anisplia austriaca* y al picudo *Cleonus pun*. En 1888 y 1896 en Kansas Estados Unidos estableció una estación con el propósito de

producir *B. bassiana* y distribuirlo para el control de las chinches de los pastos *Blissus leucopterus* (Hemíptera: Blissidae). Las primeras investigaciones arrojaron informes favorables, reduciendo la población del insecto, lo que llevo a la conclusión de que una diseminación artificial apropiada de las esporas es crucial para un óptimo funcionamiento (Gallegos, 2004).

Estas características provocaron que se les considerara como alternativas poco fiables y difíciles de implementar. En el año de 1991 las especies que fueron más estudiados en programas de manejo integrado y en cooperación con la industria para el control de plagas de pastos, suelo y mosquitos, son *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lagenidium giganteum* (Alatorre 1991).

En el 2009, la micología en el biocontrol recibió mayor atención debido a la gran diversidad de especies, amplio rango de hospederos, y su crecimiento microscópico sobre la superficie de su huésped, empleando hongos entomopatógenos. En el caso de *B. bassiana* se ha comprobado que tienen rasgos de amplio espectro cubriendo diferentes órdenes de artrópodos (García *et al.*, 2012; Scholte *et al.*, 2004).

1.2. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin

En 1835, el científico italiano Augustino Bassi de Lodi (el padre de la patología de insectos) mostro que el problema que afectaba al gusano de seda era causado por un hongo que se multiplicaba en todo el cuerpo del insecto. El hongo fue llamado más tarde *Beauveria bassiana* en honor de su descubridor.

B. bassiana conocido como muscardina blanca está ampliamente distribuido en todas las regiones del mundo. Puede ser aislado en insectos, ácaros y muestras de suelo, donde forma parte normal de la flora microbiana y otros sustratos (Mata, 2008). Presenta un gran potencial como agente de control microbiano debido a la facilidad de producción masiva y especificidad a ciertos organismos blanco en sus

diferentes estadios (inmaduros, adultos) como son: lepidópteros, homópteros, coleópteros, hemípteros y dípteros (De Luna *et al.*, 2003).

Morfología

En condiciones naturales *B. bassiana* produce dos tipos de esporas: blastoporas y conidias, mientras que en condiciones de laboratorio se encuentran en tres formas: conidias aéreas, conidias sumergidas y blastoporas (Baños, 1999).

Las colonias de *B. bassiana* alcanzan de 0.6-2.3 cm de diámetro en 8 días a 20° C, y son de apariencia polvosa debido a la presencia de gran cantidad de conidios, su crecimiento inicial es de color blanco, pero conforme madura puede cambiar a color amarillo o rosado. Los conidióforos presentan conidios hialinos, globosos y ovoides que miden de 2-3 micras de diámetro y se encuentran dispuestos en zigzag sobre el esterigma, la cantidad de conidios aumenta con el transcurso del tiempo a los 12-15 días de edad, la temperatura óptima para su crecimiento micelial se encuentra entre 10°C y 30 °C, sin embargo, la temperatura óptima para su crecimiento y esporulación es de 28° C, con humedad relativa de 92.5 % (Carrión *et al.*, 1996). Las esporas toleran la variación a altas temperaturas hasta 98° C durante cinco horas continuas en ambientes secos, pero expuestas a 40° C soportan solo 24 horas y las conidias pueden tolerar ambientes fríos (Mahr, 1997). Los conidióforos son simples con un raquis alargado agrupados de forma irregular o en racimos verticilados que pueden ser densos, la base del verticilo es más ancha que la porción terminal, el micelio es blanquecino con apariencia polvosa blanco-algodonoso con una esporulación abundante color crema (Segura, 2004).

Modo de acción de *B. bassiana*

B. bassiana causa la muerte del hospedero por diferencia nutricional, invasión o digestión de tejidos, y liberación de toxinas como la beauvericina (Calo *et al.*, 2003). Las fases en el que se desarrolla la micosis por conidias aéreas sobre sus hospedantes (Gutiérrez, 2009), se puede dividir en tres etapas:

I. *Adhesión y germinación.* La adhesión de las esporas sobre la cutícula del hospedero puede llevarse a cabo por un mecanismo pasivo, el cual involucra sustancias mucilaginosas y estructuras en la superficie de la espora el cual se relaciona con la agresividad o especificidad hacia el hospedero por fuerzas electrostáticas e interacciones moleculares (Tanada y Kaya, 1993). El reconocimiento del hospedero está regulado por sustancias que son importantes en la adhesión y germinación. La superficie epicuticular del insecto presenta aminoácidos libres y azúcares que sirven como señales de reconocimiento o sitios de adhesión para las esporas, o como estímulo para el crecimiento del tubo germinativo (Boucias *et al.*, 1988).

La germinación de la espora depende de la humedad y temperatura del ambiente, las condiciones de luz y el microambiente nutricional, las características de la espora y su morfología (Holder, 2005). Al germinar, desarrolla un tubo germinativo (hifa germinativa) y en algunos casos produce un apresorio. Estas estructuras a menudo se recubren con material mucilaginoso, que en conjunto fortalecen la adhesión de la espora a la cutícula (Gallegos, 2004).

II. *Penetración de la hifa.* La cutícula es una barrera del insecto que constituye el primer factor de resistencia a la infección, y es determinante a la patogenicidad del micelio, la penetración del tubo germinativo depende principalmente del grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales en la cutícula, este proceso involucra fuerzas enzimáticas y físicas (García *et al.*, 2009), al existir enzimas, la fuerza mecánica ejercida por el ápice del tubo germinativo es la acción producida por la presión osmótica del citoplasma de la célula hifal. Entre las enzimas involucradas en este proceso de penetración se encuentran las aminopeptidasas lipasas, esterases, quitinasas y proteasas que son las encargadas de la degradación de la cutícula.

III. *Desarrollo del micelio y cuerpos fructíferos.* Una vez que el tubo germinativo penetra la cutícula entra al hemocele y produce cuerpos hifales levaduriformes (blastosporas) que se multiplican rápidamente, los nutrientes en la hemolinfa y alrededor del cuerpo graso son agotados debido al crecimiento del micelio de tal

modo que muere el hospedero, después se finaliza el desarrollo parasítico y comienza el crecimiento saprofítico en el hemocele para formar una masa de micelio que invade todos los tejidos del insecto. En condiciones ambientales y de laboratorio apropiadas, el micelio sale del cuerpo a través de las regiones intersegmentales. Los propágulos infectivos se producen en el exterior del cadáver y se dispersan por diferentes condiciones o factores

Mecanismos de infección en organismos acuáticos

La micosis por conidias aéreas no es la única forma en la que *B. bassiana* puede germinar exitosamente sobre sus hospederos, hay múltiples formas de infección y se puede observar en organismos acuáticos como los estadios larvarios de mosquitos. Una forma particular es la ingestión de las esporas, la pared celular está conformada por polisacáridos, proteínas y lípidos, estos componentes son hidrofóbicos por lo que las esporas en ambientes acuáticos se conglomeran en la superficie del agua o quedan suspendidas, muchas veces las larvas tienden a alimentarse de las partículas nadantes y de forma accidental ingieren las esporas. Una vez en el intestino medio las conidias germinan y forman el tubo germinativo y los apresorios que provoca una septicemia en la larva y su muerte.

Otra forma son vía espiráculos, en forma directa por penetración del integumento, en caso de larvas de mosquitos pueden infectarse a través del sifón, esto sucede cuando la larva realiza el intercambio gaseoso en la superficie del agua y de forma mecánica succiona las esporas, una vez dentro del sifón el huésped realiza su germinación produciendo el tubo germinativo y los apresorios ejerciendo una presión mecánica por osmosis provocando asfixia o destrucción parcial del intestino y con ello su muerte (Baños, 1999).

1.3. Familia Culicidae

La familia Culicidae, incluye a los llamados “mosquitos zancudos” y es uno de los grupos más estudiados en México debido a su amplia distribución y sus hábitos hematófagos que los relacionan como principales parásitos hospedadores, y transmisores de enfermedades para el hombre.

Los culícidos son insectos que comprenden aproximadamente unas 1500 especies, separadas en dos grandes tribus: Anophelini y Culicini. Los primeros constituyen la tribu menos numerosa, pero son vectores de enfermedades como la filariasis y el paludismo en humanos, los huevos de anofelinos tienen flotadores característicos, las larvas carecen de tubo de aire y los adultos tienen palpos largos en los dos sexos. En México existen 154 especies divididos en 14 géneros; *Anopheles* (16), *Aedes* (7), *Ochlerotatus* (69), *Psorophora* (15), *Haemagogus* (1), *Culex* (29), *Deinocerites* (3), *Culiseta* (8), *Coquillettidia* (1), *Mansonia* (2) y *Orthopodomyia* (3) (Ibáñez & Martínez, 1995).

***Aedes aegypti* (Stegomyia) Linnaeus 1762**

Ae. aegypti es un organismo holometábolo y hematófago, cuya categorización taxonómica es la siguiente: pertenece al Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Díptera, Suborden Nematóceras, Familia Culicidae, Subfamilia Culicini, Género *Aedes*, Subgénero *Stegomyia*, Especie *Aedes aegypti* (Linneo, 1762).

Esta especie es originaria del continente Africano, tiene una distribución amplia y estable entre los trópicos y zonas subtropicales, su altitud promedio donde se encuentra es por debajo de los 1200 msnm, aunque se ha registrado a una altura de 2400 msnm (Herrera, 1989). En América Latina la mayor altitud es de Colombia con 2200 msnm y en México se registra hasta los 1700 msnm.

Estos organismos presentan rasgos biológicos específicos: son antropofágicos y se les asocia a ambientes urbanos, pero en el año 2000 se reportó la presencia de esta especie en áreas rurales. Las hembras prefieren criaderos artificiales como

recipientes oscuros o cacharros en lugar de lagos y aguas estancadas para la oviposición (Thiri3n, 2003).

Ae. aegypti al ser un organismo holomet3bolo, presenta dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acu3tica y a3rea. Durante la fase acu3tica o larvaria o de estadios inmaduros, existen tres formas evolutivas diferentes: huevo, larva y pupa. A la fase a3rea o de adulto corresponde el mosquito o imago que vuela.

Ciclo de vida de *Ae. aegypti*

Las hembras de los mosquitos necesitan alimentarse de sangre para lograr la maduraci3n de sus huevos y as3 reproducirse; en Am3rica esta parece ser la din3mica principal del ciclo de reproducci3n. Casi todas las especies necesitan alimentarse de sangre para la oviposici3n, pero algunas especies pueden desarrollar un n3mero limitado de huevos sin alimentarse de sangre. A este fen3meno se le conoce como autogenia (Trpis, 1977).

i. Huevo

Miden m3s de 1mm de longitud, su forma ovoide, alargada como un bast3n y su apariencia ligeramente afelpada es debida a sus formaciones reticulares geom3tricas. Recien puestos son claros y traslucidos y enseguida se oscurecen hasta un color azul-negro (CRAT, 1970). Estos son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario se completa en 48 horas tomando dependiendo de las condiciones medioambientales (humedad, temperatura), y en temperaturas m3s bajas se prolongan hasta cinco d3as. Los huevos son capaces de resistir la desecaci3n y temperaturas extremas con sobrevivencia de 7 meses hasta 1 a3o (Mar3n, 2009).

ii. Larva

La eclosi3n de larvas dura alrededor 2-3 d3as e inicia un ciclo que presenta 4 estadios larvales, entre cada uno las larvas tienen una ecdisis en la cual se desprende el exoesqueleto o exuvia, son acu3ticas y su desplazamiento es

serpenteante; se alimentan de materia orgánica para la cual utilizan sus cerdas bucales en forma de abanico. La posición de reposo es casi vertical, son fotosensibles, la duración del desarrollo larval depende de la temperatura, disponibilidad de alimento y densidad de la población. En condiciones óptimas con temperaturas de entre 25-29°C, desde el periodo de eclosión hasta la fase de pupación es de 5-7 días, pero regularmente de 7-14 días. La cuarta fase del estadio es lento caracterizado por aumento de tamaño y peso, y en condiciones adversas puede prolongarse hasta 7 meses; son incapaces de resistir temperaturas menores a los 10°C y superiores a los 45°C.

Las larvas constan de tres partes: cabeza, abdomen y aparato respiratorio y excretor. Presenta un sifón corto y grueso por el que respira. Otra característica es la espina lateral prominente a cada lado del tórax (Méndez y Montesano, 1994).

iii. Pupa

La larva de IV estadio se transforma en pupa, última fase evolutiva acuática o ecdisis, que se caracteriza por tener una forma de coma, envuelta en un exoesqueleto de queratina y corresponde a la maduración del nuevo adulto (CRAT, 1970). La fase de pupa (Figura 3), es un estadio de reposo donde se producen modificaciones morfo-fisiológicas y generalmente no se alimentan. Durante este periodo los organismos reaccionan a estímulos extremos tales como vibraciones provenientes del medio y se mantienen en la superficie debido a la capacidad que tienen para flotar en el agua. Esta fase de pupa dura entre 1-3 días en condiciones óptimas de temperatura (28-32°C) y se caracteriza por presentar un par de tubos respiratorios en la base del tórax y aletas natatorias en la base del abdomen.

iv. Adulto

El imago o adulto recién emergido permanece en reposo permitiendo el endurecimiento del exoesqueleto y alas, después de 24 horas de la emergencia puede aparearse iniciando la etapa reproductiva. *Ae. aegypti* es un culícido color negro que posee manchas de color plateado en diversas partes del cuerpo, que en

su conjunto dan la apariencia de una lira en la parte del mesonoto. La cabeza presenta mechones de escamas plateadas en los ápices de los palpos. Las hembras presentan antenas con pelos cortos y escamosos (Méndez y Montesano, 1994). El sonido de las alas del insecto hembra durante el vuelo sirve como una forma de cortejo hacia el mosquito macho. El apareamiento se realiza durante el vuelo, pero algunas veces se realiza en una superficie horizontal o vertical; en este caso las hembras son las únicas que succionan sangre y vuelan en sentido contrario al viento.

La alimentación sanguínea es necesaria para el desarrollo de los huevos, si la hembra completa su alimentación (2-3 mg de sangre) pondrá de 20-120 huevos en diferentes lugares lo que contribuye a asegurar la viabilidad de la especie; la oviposición es principalmente vespertina y en las partes húmedas de los cuerpos de agua (Marín, 2009).

Enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti* (*Stegomyia*) Linnaeus 1762 en México

Las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti* afectan por igual a los países desarrollados como en vías de desarrollo, la eficiencia de esta especie como vector del dengue se debe a su alta susceptibilidad al virus y a sus rasgos específicos en sus patrones de alimentación y comportamiento que son heredados y la preferencia para obtener sangre como alimento de los humanos (antropofilia-antropofagia) y su hábitat preferencial es dentro de las casas (endofilia) (Moran y Terrón, 1988).

México es un país con serios problemas de salud pública, según la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), las Enfermedades Transmitidas por Vector (ETV's) está posicionada en el 8° lugar de los principales problemas de salud pública en México, se estima que cerca de 60% del territorio nacional presenta condiciones que favorecen las ETV's, en donde residen más de 50 millones de personas y se localiza la mayor parte de los

centros agrícolas, ganaderas industriales, pesqueros, petroleros y turísticos de importancia para el país.

Dentro de las ETV's el Dengue es una enfermedad importante en México por estar asociada a un ambiente urbano, donde las tasas de morbilidad y mortalidad son altas. La Secretaria de Salud Pública (SSP) reporta que en diciembre del año 2015 se reportaron un total de 2,601 casos positivos donde 701 casos eran por Dengue hemorrágico. En abril de 2016 se registró un aumento del 30% en casos positivos con respecto a las cifras del año 2015 obteniendo un total de 3201 casos. Los estados con más defunciones registrados hasta el momento son Guerrero, Campeche, Jalisco y Sonora, mientras que Colima, Chiapas, Veracruz y Tabasco representan cerca del 58% de los casos totales. A pesar de los números el Dengue no es el único ETV's al que se enfrenta México.

El virus de Chikungunya (alfavirus) y Virus Zika (flavivirus) han producido estragos en los últimos años desde su llegada en el año 2014, la SSP revela que en Diciembre del 2015 se reportaron 1060 casos positivos de Fiebre Chikungunya en los estados de Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Colima, Coahuila, Sinaloa y Sonora, Con respecto al Virus Zika se reportaron 37 casos positivos en Diciembre del 2015 en los estados de Yucatán, Campeche, Chiapas, Jalisco, Nuevo León y Querétaro, el 18 de marzo de 2016 la Dirección General de Epidemiología de la Secretaria de Salud Publica reporta un total de 160 casos positivos, no obstante el 10 de mayo de 2016 el mismo departamento anuncia un total de 239 casos positivos y se anexan los estados de Nayarit, Michoacán, Sinaloa, Tabasco, Oaxaca, Guerrero y Veracruz como nuevas zonas de contagio.

El vector causante de las tres enfermedades *Aedes aegypti* ha incrementado su tasa de crecimiento poblacional según la Dirección de Vigilancia Epidemiológica también la misma agencia reporta una alta resistencia a insecticidas por lo que en el año 2014 las poblaciones crecieron exponencialmente, por este motivo la utilización de un agente natural para la disminución de las poblaciones sugiere ser una solución segura y viable para el control del mosquito y disminuir la propagación de las enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti*.

1.4. *Aedes aegypti* y control biológico

Debido a su eficiencia como vector de enfermedades y la peligrosidad latente hacia la salud pública se ha realizado en varios países campañas de fumigación y control del mosquito en zonas geográficas con presencia de agentes causales, sin embargo, el uso desmedido de plaguicidas e insecticidas químicos ha provocado que esta especie de mosquito obtenga mayor resistencia a estos químicos provocando que las poblaciones sean cada vez más difíciles de controlar, (Cañeda, et al.2004).

Estudios avalan que el control biológico ha sido una técnica muy eficaz para controlar poblaciones densas de *Aedes aegypti* dentro de los hongos más estudiados para esta especie es *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

2. JUSTIFICACION

El crecimiento de las poblaciones de *Aedes aegypti* en México a causa de los hábitos humanos y la llegada de nuevas enfermedades arbovirales al país, ha provocado que sea primordial mantener un control poblacional, sin embargo, el uso excesivo de insecticidas químicos provoco que este mosquito desarrollara resistencia haciendo su control un reto difícil. A pesar de que *B. bassiana* es un hongo ampliamente estudiado y ha sido aplicado sobre plagas agropecuarias obteniendo resultados positivos, en realidad no se han hecho estudios suficientes que demuestre su eficacia en insectos vectores, también los estudios sobre su eficacia en larvas de mosquitos son desconocidos. Si se pudiera demostrar que este hongo es eficaz sobre estas larvas se podría realizar un control completo para este problema que afecta al país y sus habitantes.

3. HIPÓTESIS

- Las larvas que llegasen a sobrevivir del bioensayo y se conviertan en adultos presentaran anomalías; en hembras las ovariolas estarán dañadas debido a la infección de la parte posterior mientras era larva, esto repercutirá en la oviposición de la hembra, en machos los testículos y demás órganos masculinos estarán dañados, esto hará que la calidad del esperma sea nulo.
- En condiciones de campo después de la infección en los criaderos encontrados, las larvas de mosquito se infectarán debido al efecto antes descrito, sin embargo, es posible que las condiciones del agua y sus propiedades fisicoquímicas provocaran alteraciones en el hongo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de *Beauveria bassiana* sobre la mortalidad de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller en condiciones de laboratorio y otras especies de culícidos en condiciones de campo.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad de *B. bassiana*
- Determinar el efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de 3er estadio de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio
- Determinar los efectos de *B. bassiana* sobre la oviposición de hembras infectadas sobrevivientes al tratamiento.
- Determinar el efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de diferentes especies de culícidos en condiciones de campo

5. MATERIAL Y METODOS

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Parasitología y Vectores de la Escuela de Biología, BUAP, donde se una colonia del vector *Ae. aegypti*. Los aislados del hongo *B. bassiana* se realizaron en el laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la Escuela de Biología, BUAP.

5.1. Cría de *Ae. Aegypti*

Se estableció una colonia de *Ae. aegypti* donada por el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Cuba, en el insectario del laboratorio de Parasitología y Vectores de la Escuela de Biología, BUAP.

La eclosión se huevos se indujo sumergiendo los huevos en agua pluvial previamente esterilizada contenidos dentro de recipientes cilíndricos blancos de 500ml a 29 °C.

Las larvas se alimentaron diariamente con 1g de comida para peces distribuida uniformemente en la superficie. Aproximadamente 12 días después de eclosionados los huevos emergieron los adultos. Machos y hembras fueron colocados en una jaula de 60X60x60 cm de tamaño y se mantuvieron a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 12 h y una humedad relativa de $55 \pm 70\%$. Durante 3-5 días los mosquitos machos se alimentaron con una solución de sacarosa y miel al 50% suministrada en cajas petri con algodón y gasas estériles, mientras que las hembras fueron alimentadas con sangre humana obtenida a través del banco de sangre estatal de libres colocadas en condones a una temperatura de 36.1°C durante 24 horas cubriendo el ciclo hematófago.

Para la recolección de huevos se utilizaron vasos de 250 ml con agua libre de cloro y paletas de madera envueltas en papel de estraza, posteriormente se retiraron del agua y se colocaron en una superficie plana a temperatura ambiente por 48 horas para la desecación y maduración del huevo, posteriormente se guardaron en sobres de papel de estraza y se mantuvieron en un lugar fresco y libre de humedad.

5.2. Obtención y aislamiento de *B. bassiana*.

La cepa evaluada se aisló de muestras de suelo en la localidad de Chiautla de Tapia ubicada al suroeste del Estado de Puebla. Para extraer los conidios del suelo se utilizó como cebo larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyraloidae) que después de desarrollar la micosis y muerte del insecto se pasaron a cajas petri con medio diferencial de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) con penicilina para la purificación y proliferación de la cepa hallada. Los cultivos se incubaron a 25 °C por 20 días. Las esporas fueron resembradas en medio diferencial PDA hasta que el hongo estuviera aislado de otras especies de hongos y bacterias. Los aislados se observaron y determinaron según los criterios de García (2003). Una vez obtenidas las cepas aisladas, cultivadas en PDA y se incubaron a 25°C durante 20 días para la producción de conidios.

5.3. Determinación de la viabilidad de *B. bassiana*

Para medir la viabilidad de las esporas de cada aislamiento se midió como porcentaje de germinación en medio PDA. Se realizaron diluciones, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , del stock, se tomaron 10 μ l de esporas y se sembraron en medio PDA, las muestras se incubaron durante 20 y 36 horas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Al término de cada incubación se contaron 100 esporas con la ayuda del microscopio compuesto para determinar el porcentaje de las esporas germinadas y no germinadas. Se consideró conidio germinado aquel cuyo tubo germinativo fue mayor o igual a su diámetro de la espóra. (Vélez *et al.*, 1997).

5.4. Evaluación del efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de *Ae. Aegypti* en condiciones de laboratorio

Una vez sembrados los conidios para la producción masiva en cajas petri grandes con medio PDA se incubaron durante 28 días. Tras el tiempo de incubación, se colectaron los conidios de las cajas petri usando Tween 80 al 0.05% y con la ayuda de una espátula triangular, después se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml. Se realizaron diluciones: 1×10^{11} , 1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 para la concentración del stock y se realizó el conteo de esporas por medio de la cámara

de Neubauer a una dosis letal de 1×10^{12} esporas por ml. En las pruebas de laboratorio se tomaron de forma azarosa 900 larvas de *Ae. aegypti* en tercer estadio de su desarrollo larval del criadero del laboratorio de Parasitología y Vectores de la Escuela de Biología. Las larvas se depositaron en recipientes plásticos de 400 ml de capacidad. Una vez colectado el material se distribuyó en 6 grupos de 50 larvas y cada grupo a su vez en 3 réplicas de 50 larvas, se colocaron en recipientes con 200 ml de agua libre de pirógenos. Otro grupo de 50 larvas el cual se tomó como control para la comparación de los resultados que se obtendrán al finalizar cada prueba. Se procedió a la cuantificación de individuos muertos después de la aplicación de esporas cada 24, 48 y 72 horas. Todos los cadáveres recolectados en los diferentes tiempos se colocaron en cajas petri con medio PDA a temperatura de 28°C para observar la esporulación y confirmar la muerte por el hongo.

5.5. Efectos de *B. bassiana* sobre la oviposición de hembras infectadas sobrevivientes al tratamiento

Las pupas sobrevivientes que se convirtieron en adultos fueron colocadas en jaulas de 30 x 30 cm, los machos se alimentación de azúcar y miel al 50% y las hembras se les proporciono hematofagia cada 48 horas; también se colocó una ovitrampa en el interior de las jaulas. Al iniciar una nueva hematofagia las ovitrampas fueron retiradas y se realizó el conteo de huevos.

5.6. Evaluación del efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de diferentes especies de culícidos en campo

Área de estudio. La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se localiza en la prolongación 24 Sur S/N. Ciudad Universitaria colonia San Manuel. Sus coordenadas geográficas son de 18°59'56.8" latitud norte y 98°11'57". Tiene una superficie de 102 hectáreas y cuenta con todos los servicios públicos y calles pavimentadas. En el interior de Ciudad Universitaria presenta áreas

verdes abundantes y se localizan dos cuerpos de agua, donde uno de ellos es para fines recreativos.

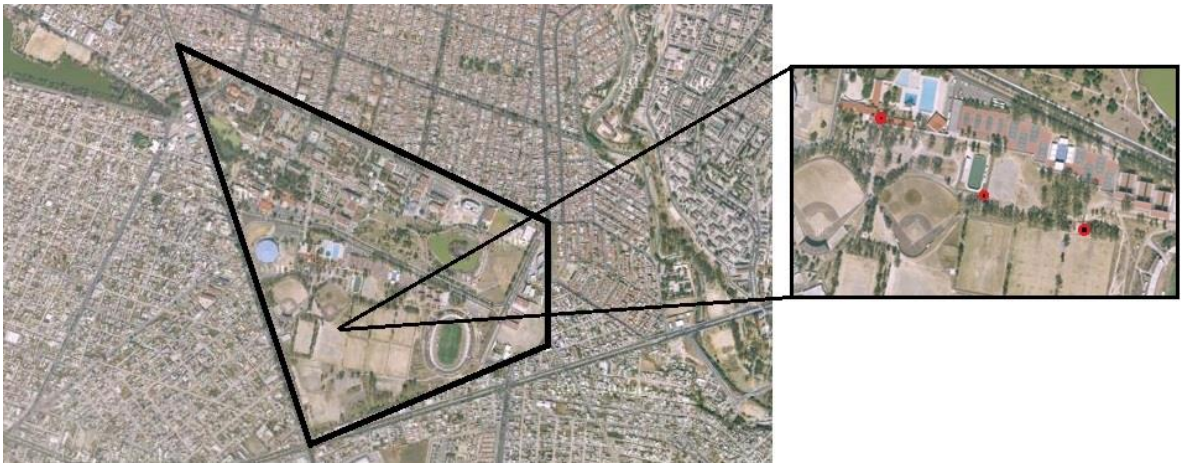


Figura 1. Localización de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la zona de muestreo (Google Earth 2016).

Diseño de muestreo

El muestreo se llevó cabo durante los meses de agosto, septiembre y octubre del año 2015. Se buscaron alrededor del área y perímetro de Ciudad Universitaria criaderos artificiales y cuerpos de agua con presencia de larvas y pupas de mosquito, una vez encontrados se calculó la aproximación del número de larvas en el criadero encontrado con el índice de recipientes y la media de larvas por cucharón.

Si el criadero era de tipo artificial según la clasificación de Fernández (2005) y las dimensiones eran pequeñas se procedía a la eliminación mecánica del criadero vaciando su contenido, se localizaron tres criaderos que se inocularon con *B. bassiana* en tween 80 al 0.05% a una concentración de 1×10^{12} esporas en 15 ml. Posterior a la inoculación se muestreo cada 48 horas el número de larvas en cada criadero y la media de larvas por cucharón con el fin de obtener la densidad relativa y comparar los datos antes y después de la inoculación de cada criadero.

5.7. Identificación de especies de culícidos en criaderos positivos

Se colectaron algunos ejemplares en cada criadero encontrado, estos fueron sacrificados por medio de la técnica de choque térmico y preservado en alcohol al 70%, después de ser preservadas se identificaron de acuerdo a las claves taxonómicas de Ibáñez & Martínez (1994).

5.8. Análisis de datos

Estimación de la Concentración Letal Medio (CL50) y Tiempo Letal Medio (TL50)

Se realizó una prueba Probit para estimar la concentración letal (CL) y el tiempo letal (TL) en el cual el hongo mata el 50% de las larvas en el ensayo. Para lograr ajustar los datos se transformó la concentración usada en los bioensayos a su valor logarítmico. La prueba se realizó en el programa estadístico Statgraphics Versión 16.1.02.

Índice de larvas sobre cucharón (L/Cu)

Se determinó la densidad relativa por medio del Índice de larvas sobre cucharón. Se obtuvo considerando el número de larvas capturadas por un cucharón en los extremos y centro del criadero, promediando el número total de larvas entre la cantidad de tomas obtenidas durante 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Para determinar normalidad en los datos se aplicó una prueba de Shapiro-Wilk con 95% de confianza, se realizó una ANOVA para determinar diferencias estadísticas entre la cantidad de larvas por muestra en relación al tiempo y una Prueba de Fisher para observar los rangos entre las medias evaluadas. Se usó el programa estadístico SPSS versión 15.0.1

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación el laboratorio

Determinación de la viabilidad de *B. bassiana*

Las esporas presentan una viabilidad del 85% a las 24 horas, en la lectura final la viabilidad fue del 96% (Figura 2). Esta cepa evaluada posee una buena virulencia para poder ser usado en los bioensayos. En la Figura 3 es posible apreciar las esporas con los tubos germinativos demostrando la viabilidad mencionada.



Figura 2. Diluciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} después de 24 horas

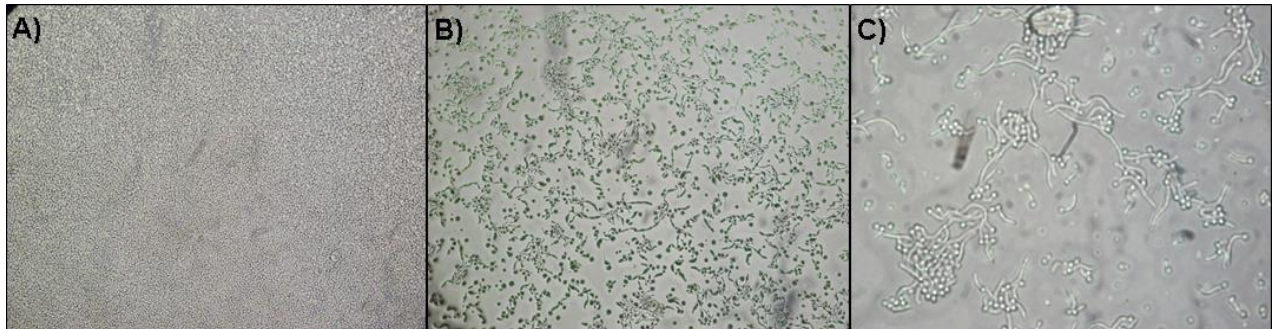


Figura 3. A) Muestra las esporas totales en el bioensayo, B) Viabilidad a las 24 hora, C) Esporas viables a las 48 horas

Tiempo Letal Medio (TL50)

Tras realizar la prueba Probit, *B. bassiana* presenta TL50 a las 48 horas posterior a la aplicación de la formulación (Figura 5), esto demuestra que las esporas al estar suspendidas en el agua, la aleatoriedad y la interacción con las larvas no se expresa de forma inmediata pero transcurrido este tiempo se da la mortalidad del 50% de la población. Por lo tanto, es tiempo suficiente para que una larva promedio pueda ser infectada antes de convertirse en pupa.

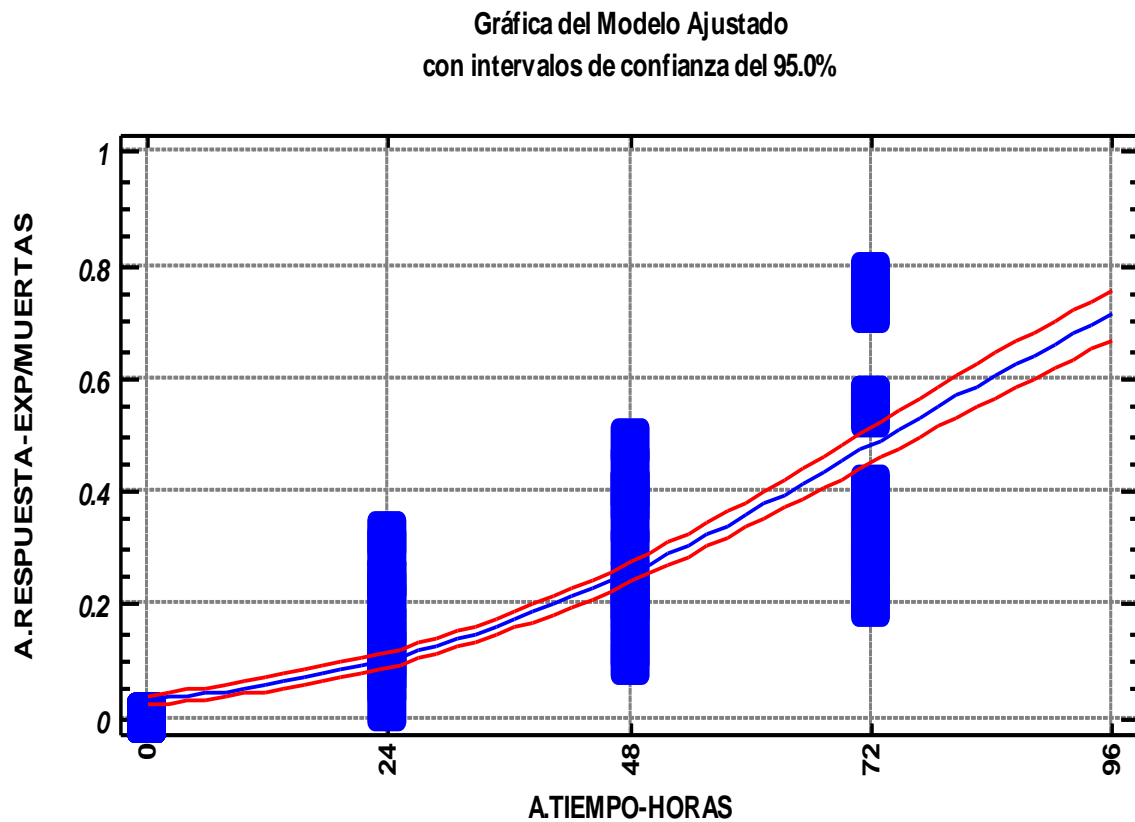


Figura 5. Curva Tiempo-Respuesta obtenida de los bioensayos en larvas de *Ae. aegypti*

6.3. Efecto de *B. bassiana* sobre la oviposición de hembras infectadas, sobrevivientes al tratamiento

En la tabla 2 se puede apreciar la cantidad de pupas sobrevivientes y la cantidad de hembras que emergieron de los criaderos. La cantidad de huevos de mosquitos aumenta conforme disminuye la concentración de esporas (Figura 6).

Tabla 2. Numero de adultos sobrevivientes a los bioensayos que completaron el ciclo y afectación en la oviposición antes de su muerte

TRATAMIENTOS	PUPAS	ADULTOS	HEMBRAS	NO. DE HUEVOS
Control	150	150	80	2600
1X10 ¹¹	38	38	30	0
1X10 ¹⁰	67	67	33	0
1X10 ⁹	95	95	51	15
1X10 ⁸	103	103	60	27
1X10 ⁷	114	114	63	33

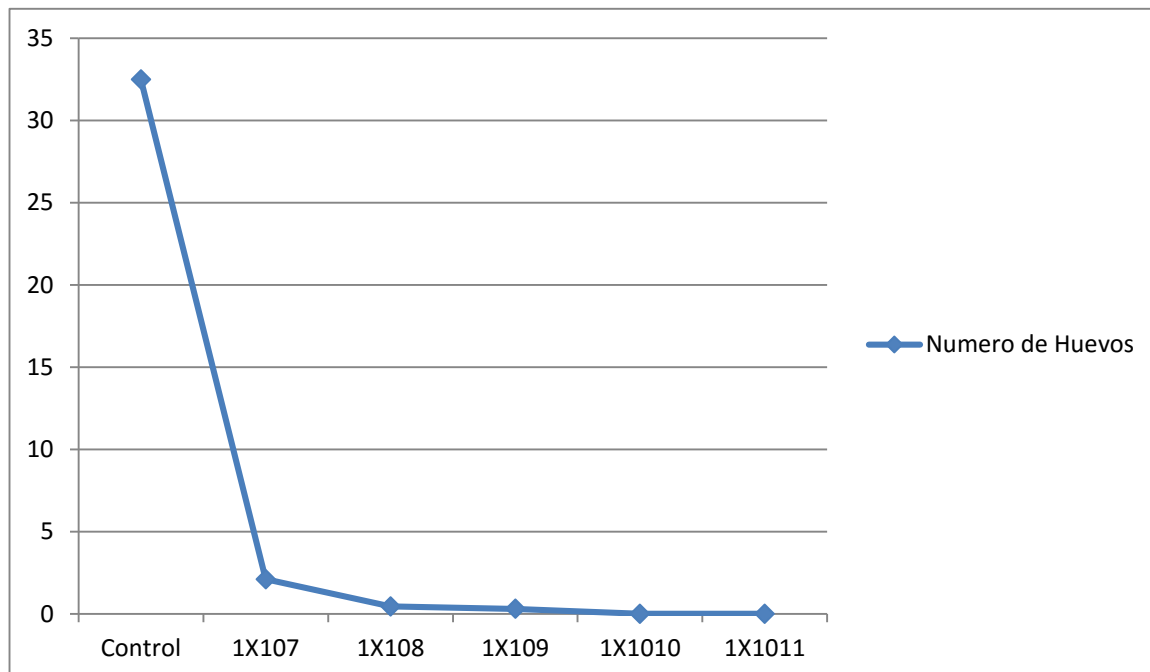


Figura.6 Media de huevos por hembra de *Ae. aegypti* expuestos a distintas concentraciones de *B. bassiana*.

Los adultos que murieron fueron colocados en cajas Petri con PDA diferencial y se obtuvo crecimiento del micelio en los cuerpos

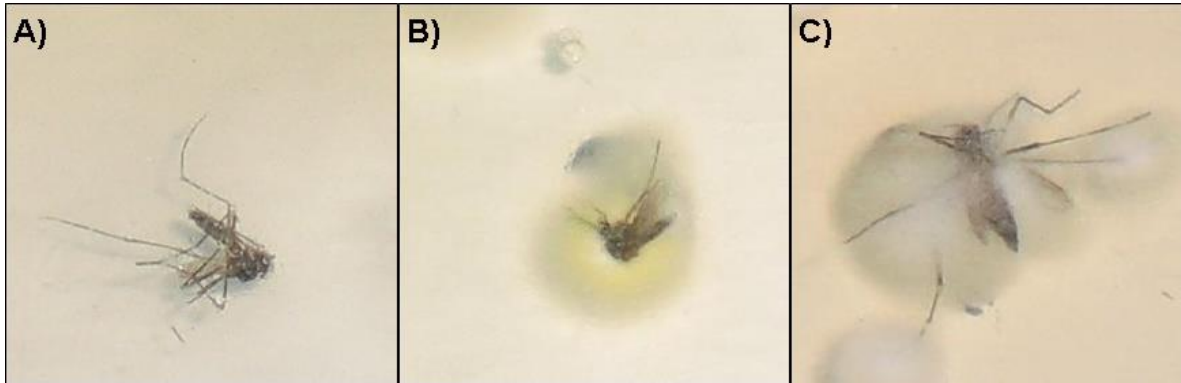


Figura 7. Mosquitos hembras con crecimiento de hongos *B. bassiana*

6.4. Ensayo en campo

Determinar el efecto de *B. bassiana* sobre la mortalidad de larvas de diferentes especies de culícidos

Se encontraron tres criaderos positivos de los cuales se identificaron cuatro especies de culícidos según las claves taxonómicas de Ibáñez y Martínez (1994) en los criaderos tratados:

Criadero	Especies
1	<i>Ae. epactius</i> <i>Cx. stigmatosoma</i>
2	<i>Ae. epactius</i> <i>Cx. stigmatosoma</i> <i>Cx. salinarius</i>
3	<i>Cx. stigmatosoma</i> <i>Cx. salinarius</i> <i>Cx. restuans</i>

Larvas sobre cucharon (L/Cu)

De cada criadero se calculó la densidad relativa inicial por medio del índice L/Cu. En la figura 8 se observan los valores de los índices que disminuyen conforme transcurre el tiempo después de la aplicación de la formulación de *B. bassiana*.

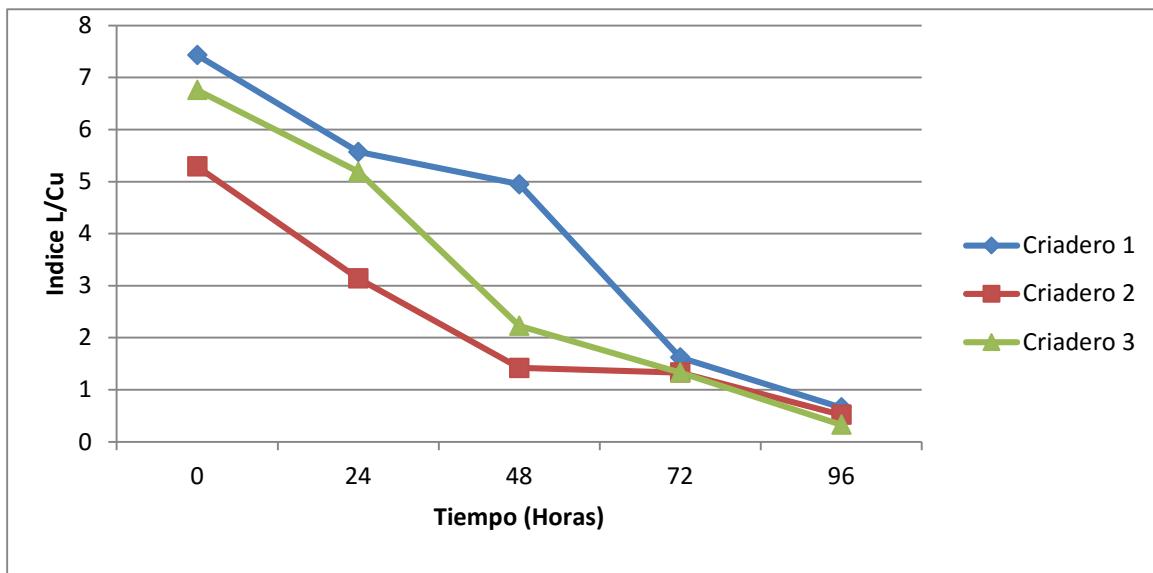


Figura 8. Curvas de densidad relativa de los criaderos encontrados obtenidas a través del Índice L/Cu

En la figura 9 se observan los porcentajes de mortalidad de larvas de culícidos tratados con *B. bassiana*. Después de 96 horas de la inoculación se alcanzó una mortalidad final del 92%.

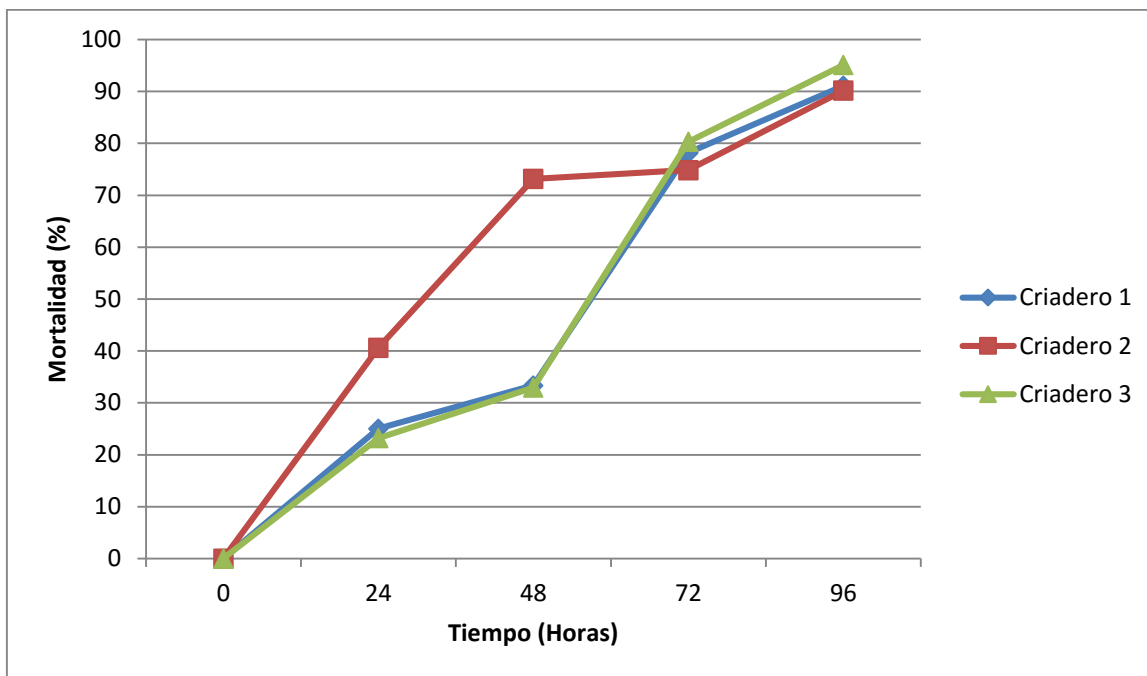


Figura 9. Curvas del porcentaje de mortalidad de larvas de diferentes especies de Culícidos en los criaderos tratados.

Los índices una vez calculados se sometieron a una evaluación preliminar, con la finalidad de obtener medidas de tendencia central y determinar si existía normalidad en los mismos; así mismo, se empleó la prueba de Shapiro-Wilk (significancia del 5%), que indicó una distribución normal, por lo que se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una comparación de medias aplicando la prueba de Fisher, puesto que el ANOVA indicó diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tabla para índice de L/Cu. Medias con misma letra no presentan diferencias significativas (Prueba de Fisher, $p \leq 0.05$)

Concentración 1X10 ¹¹	Media ± E.E.
0 horas	6.49±0.44 a
24 horas	4.63±0.75 b
48 horas	2.86±1.06 c
72 horas	1.42±0.09 d
96 horas	0.50±0.09 e
Total	3.390.62

Con los resultados del ANOVA se realizó la prueba de Fisher el cual arrojó que se presenta semejanza entre el grupo control y el tratamiento 1; por lo tanto, la formulación de *B. bassiana* disminuye la población de larvas en los criaderos.

7. DISCUSIÓN

Se demostró que la cepa de *B. bassiana* es capaz de reducir la sobrevivencia de larvas de *Ae. aegypti* hasta un 92 % en siete días después de la exposición al hongo, en las larvas que sobrevivieron y completaron su ciclo gonodotrófico se observa que al menos un 15 % de los organismos presentaron micosis y que repercutieron en la ovoposición reduciendo los niveles normales de huevos puestos en hembras sanas que tienen todas las condiciones medioambientales y morfológicas para poner entre 20 -120 huevos por hembra.

García *et al.* (2011), demostró que su estudio es similar al trabajo realizado ya que comprobó que *B. bassiana* es capaz de reducir la sobrevivencia de una población del vector del dengue hasta un 90% en siete días después de la exposición al hongo. Esto significa que si es factible que la micosis trunque la incubación extrínseca del virus en el vector.

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

Scholte *et al.* (2007), evaluaron a *M. anisopliae* sobre *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* donde encontraron resultados similares al aplicar una dosis de 1.6×10^{10} conidias/m² sobre una manta de color negro como sitio de reposo para los adultos en jaulas. Estos resultados indicaron que ambas especies de mosquitos son altamente susceptibles a la infección por estos hongos. En un segundo estudio sobre hongos contra vectores del dengue De Paula *et al.* (2008), demostraron que *M. anisopliae* tiene un tiempo de 3 días y *B. bassiana* de 5 días, respectivamente. Esto es de gran relevancia debido a que demostró que *M. anisopliae* es capaz de reducir la sobrevivencia de *Ae. aegypti* vector del dengue en un alto porcentaje en siete días después de la exposición al hongo de manera experimental en laboratorio.

Cabe resaltar que el periodo de incubación extrínseca del serotipo 2 (el común) del virus dengue en *Ae. aegypti* es de 10 días en promedio (Kaaya, 1990); García *et al.* (2011) demostró que la cepa H-47M5 transmitido de machos a hembras, mata al 50% de ellas en siete días, es factible que en las hembras infectadas con el virus dengue la micosis trunque la propagación del patógeno para que no llegue a infectar glándulas salivales y se tornen infecciosas. Además, demostró que en las hembras confinadas con el macho contaminado con H-M5, sólo un promedio de tres logró poner huevos, por lo que el hongo impacto severamente la fecundidad con una media de 0.52 ± 0.30 huevos/hembra. La alta virulencia de H-M5 prácticamente esterilizó las hembras. La fecundidad fue reducida en 99% en comparación a las hembras del control ($X = 35.35 \pm 8.3$). La tasa del 15% de inseminadas infectadas con H-M5 es similar al 16% de inseminación reportada para hembras sanas (cinco inseminaciones en 30 hembras copuladas) por Halsted (2008). Ahora bien, el 75% de infectadas no inseminadas sugiere que la alta virulencia del H-M5 probablemente activó un comportamiento más agresivo en los machos; quizás las primeras fases de la germinación de conidios sobre la cutícula provocaron esta activación, porque los machos contaminados con este aislado murieron a los tres y seis días de confinamiento con las hembras; vivieron poco e inseminaron pocas hembras, pero infectaron a muchas quizás por intentos de cópula. Además, la tasa de hembras no inseminadas no infectadas fue apenas del 10%, y esta tasa fue seis veces menor para las mismas hembras (50%) del control. La información sobre diseminación por cópula de hongos patógenos en insectos hematófagos es muy escasa y hasta donde sabemos sólo hay dos reportes en la literatura. El primero es de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, en la mosca *Glossina morsitans morsitans* en África, donde las moscas fueron expuestas a 2×10^7 conidias ml⁻¹ y después de confinarse por 14 días con insectos del sexo opuesto, los hongos causaron una mortalidad de 90-100% en ambos sexos (Nnakumusana, 1985).

Respecto al impacto de este grupo de hongos sobre la fecundidad de mosquitos vectores, sólo existen dos reportes pero la micosis en los mosquitos fue inducida por contacto directo con las esporas sobre una superficie, y no por infecciones

adquiridas por cópula. En el primero, larvas de *Ae. aegypti* fueron infectadas con 2×10^5 conidias ml⁻¹ de *Aspergillus parasiticus*; donde la mortalidad larval fue de 97% pero la fecundidad de las hembras sobrevivientes se redujo en 56% respecto al grupo control (Boucias 1998). Otro estudio se realizó sobre el mosquito *An. gambiae*, en este las hembras expuestas a dosis de 10^6 y 10^7 conidia mL⁻¹ de *M. anisopliae* tuvieron una fecundidad media de 23.6 ± 7.9 y 17.7 ± 7.2 de huevos para hembras grandes (>3.1 mm de extensión alar) y pequeñas (<3.1 mm), mientras que las medias del control fueron 64.6 ± 4.7 y 42.2 ± 2.9 , respectivamente; esto implica una reducción del 63 y 57% en fecundidad (Scholte *et al.*, 2007). En nuestro estudio, la fecundidad fue reducida en 86-90%.

El proceso invasivo de hongos dentro del huésped consume rápidamente agua y reservas nutritivas (Scholte *et al.*, 2005). Es probable que el crecimiento del hongo dentro de los mosquitos redujera su nivel nutricional a un grado crítico en el que no hubo síntesis de vitelina para ovogénesis. Entre las infectadas con el H-M5, sólo seis de 40 lograron poner apenas 21 huevos.

En otros estudios realizados donde la experimentación era la transmisión de machos a hembras de *Ae. Aegypti*

García *et al.* (2011), es uno de los primeros que demuestra la transmisión de *B. bassiana* por el comportamiento de cópula de machos vírgenes impregnados de conidias secas a hembras sanas de *Ae. aegypti*. De importancia particular para nuestro estudio es el número de hembras que fueron infectadas por el comportamiento de cópula, pero no inseminadas, ya que estos podrían representar una medida indirecta de transmisión de *B. bassiana* por intentos de cópula, como un componente en este tipo de transmisión horizontal. La tasa para hembras esporuladas fue del 90 % mientras que para el total de inseminadas fue del 28%. Esta diferencia podría implicar que había al menos una posibilidad del 60% de infección como consecuencia del intento de cópula.

La reducción de la fecundidad es un efecto secundario dado por infecciones fungosas en insectos; además hay pocos datos para mosquitos. A nuestro conocimiento, el primer informe donde se observó una reducción de la viabilidad de huevo de *Ae. aegypti* infectados por el hongo entomopatógeno, *Aspergillus*

parasiticus (Nnakumusana, 1985). En otro caso Scholte *et al.* (2006) infectó a adultos de *Ae. aegypti* con *M. anisopliae* pero no por transmisión a través de cópula; de todos modos los autores observaron que la disminución en la capacidad de poner huevos, se vio marcado al igual que la capacidad de ingerir sangre durante su alimentación.

8. CONCLUSIONES

Beauveria bassiana presento una viabilidad final del 96%. Esta cepa evaluada posee una buena virulencia para poder ser usado en los bioensayos.

Los resultados de la prueba Probit demuestran que *Beauveria bassiana* tuvo una CL50 de 1×10^{10} esporas/ml La concentración que más muertes provoco fue la de 1×10^{11} al generar una mortalidad del 74.6 %.

B. bassiana presenta un TL50 a las 48 horas después de la aplicación de la formulación, esto demuestra que la mortalidad del 50% de larvas causada por el hongo se da mientras las esporas están suspendidas en el agua, la aleatoriedad y la interacción con las larvas en este periodo de tiempo. Por lo tanto es tiempo suficiente para que una larva promedio pueda ser infectada antes de convertirse en pupa.

Las hembras sobrevivientes al bioensayo presentaron baja oviposición; después de que machos y hembras murieron y fueron sembrados en medio PDA diferencial, el micelio del hongo momifico los cuerpos. Esto indica que el hongo es capaz de matar aún en etapa adulta, a pesar de haber sido expuestos en el tercer estadio.

Se encontraron en general 4 especies de culícidos en los criaderos tratados: *Aedes epactius*, *Culex stigmatosoma*, *Cx. salinarius* y *Cx. restuans*.

Se identificaron tres criaderos positivos, de los cuales se calculó la densidad relativa inicial por medio del índice L/Cu. Los valores de los índices disminuyen conforme transcurre el tiempo después de la aplicación de la formulación de *B. bassiana*, además presentaron una mortalidad final del 92% transcurridas 96 horas después de la inoculación.

Las Pruebas de ANOVA y de Fisher comprobaron estadísticamente la formulación de *B. bassiana* que disminuye la población de larvas en los criaderos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, A.; Sen, M.M.; Gupta, S. y Chanda, S. (2004). Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor cattle shed. *Environment International*. Vol. 29. Pp.1071–1078.
- Baños G. P. (1999). Evaluación de arroz entero y residual como sustratos para la producción de esporas de *Beauveria bassiana*. Ed Universidad Autónoma de Chapingo; México.
- Burgess L.; 1959; Techniques to give better, hatches of the eggs of *Ae. Aegypti* L. (Diptera: Culicidae); Mosquito News 19:25-259.
- But T. M., Jackson C. W., Magon N; Prospects for strain Improvement of fungal Pathogens of insect and Weed; pp.224-228.
- Butt, TM.; Carreck, NL.; Ibrahim, L.; Williams, IH. 1998. Honey -bee mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 8(4): 533, 538.
- Cañedo V., Ames T.; Manual para el Manejo de Hongos Entomopatogenos; Centro Internacional; Perú, 2004.
- Carballo V. M, Rodríguez L., Duran J.; Evaluación de *Beauveria bassiana* para el Control del Picudo de Chile en Laboratorio; CATIE; Costa Rica, 2001.
- Celly Trujillo, A. I. y Villamil Jiménez, L. C. (2014). El virus *chikungunya*: una enfermedad emergente en América. *Revista Ciencia Animal* (8), 85-93.
- Clark TB, Kellen WR, Fukuda T, Lindgren JE. Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal Invertebrate Pathology*. 11(1): 1–7.
- Centro Regional de Ayuda Técnica (CRAT). (1970). Claves para la identificación de mosquitos comunes de Estados Unidos. *Guía instructivo: Lucha contra insectos*. Departamento de salud, educación y bienestar de E.U.A. México. Pp. 43.

- De la Rosa R. W., Alatorre R. R.; 2008; Insecticidas microbianos en el manejo integrado de plagas; México.
- De Paula, A.R.; Brito, E.S.; Pereira, C.R.; Carrera, M.P. y Samuels, R.I. (2008). Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for dengue vector control. *Biocontrol Science & Technology*. Vol. 18. Pp. 1017-1025.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak, French Polynesia. 14 February 2014. Stockholm: ECDC; 2014.
- Fernández S. I.; 1999; Biología y Control de *Ae. aegypti*; Manual de operaciones; Universidad Autónoma de Nuevo León; México; pp. 80.
- Fernández, S. I., 2009. Biología y control de *Aedes aegypti*, Manual de Operaciones. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2da. Edición, México.
- Fernández, W. F. e Iannacone, J. (2005). Variaciones de tres índices larvarios de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) y su relación con los casos de dengue en Yurimaguas, Perú, 2000-2002. *Revista de Parasitología Latinoamericana*. Vol. 60, pp. 3-16.
- Ferrera E. R., Alarcón A.; 2007; Microbiología agrícola, hongos, bacterias micro y macro fauna, control biológico; Planta-microorganismos; Trillas; México; pp. 568.
- Franklin R. H., Jullus J. M.; 1999 Biopesticides use an Delivery; Humana press; Totowa New Jersey; pp.553-573.
- Gallegos M.G.; Cepeda, S. y Olayo, P.R. (2004). Entomopatógenos. Ed. Trillas, México. Pp.148.
- García, G.C.; Gómez, P.R.; López, A.C. y León V.A. (2012). Insecticidas Biorracionales para el Control de Mosquitos y Moscas negras en Sinaloa. *Ra Ximhai*. Vol. 8 (3), pp. 47-55.

- García, G.C.; Lezama G.R. (2009). Manual de Técnicas para el Aislamiento, Identificación y Caracterización de Hongos y Nematodos Entomopatógenos. Instituto Politécnico Nacional, México.
- García, G.M. (2003). Hongos Entomopatógenos como Control Biológico. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- García, G.M.; Capello, G.S.; Leshner, G.J. y Molina, M.R. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Gay, B., Bernard, E., Solignat, M., Chazal, N., Devaux, C. y Briant, L. (2012). pH-dependent entry of Chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (6), 1275-1281.
- Gómez V. M., Jiménez C. M.; patogenicidad de *Beauveria bassiana* Sobre Adultos del Picudo del Chile (*Anthonomus eugenii*) como Control Biológico; 1995.
- Gómez V. M., Jiménez C. M.; Uso de Hongos Entomopatógenos para el Manejo del Picudo del Algodón; Centro Nacional de Diagnóstico Fitosanitario; 1991.
- Granados S. D., López R. G.; 1996; Agroecología; Universidad Autónoma de Chapingo; México.
- Gubler, DJ. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinic Microbiology Reviews*.11(3): 480-496.
- Henderson L. S., Stage H. H., Knipling E. F.; 1963; Insectos hombre y hogares; insectos plagas de la agricultura y sistemas para combatirla; United States Department of Agriculture Washington.
- Herrera B. E.1989. situación actual del dengue en México; IV simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria SME. Oaxtepec, Morelos.
- Hoop M., Foley J.; 2000; Global-scale relationships Between Climate and the dengue fever vector *Ae. Aegypti*.

- Ibáñez B.S.; Martínez C.C. (1995). Clave para la identificación de larvas de mosquito (Díptera: Culicidae). *Folia Entomológica Mexicana*. Vol. 92. Pp. 43-73.
- Ibáñez, B.S. y Gómez, D.H., (1995). Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. *Salud Publica, Mexico*. Vol. 37, pp. 53-63.
- Infante, F. (2008). Uso de parasitoides y depredadores en el manejo integrado de plagas, México.
- Kaaya, G.P. y Okech, M.A. (1990). Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitansmorsitans*. *Entomophaga*. Vol. 35, pp. 589-600.
- Khan NN, Wilson BL. 2003. An environmental assessment of mold concentrations and potential mycotoxin exposures in the greater southeast Texas area. *Journal Environment Science Health Part A*. A38: 2759–2772.
- León G. M. y Clark J. K. (2007). Control de plagas y enfermedades de los cultivos; Grupo Latino Editores; pp.33-52.
- Luz, C.; Tai.; M.; Santos, A.; Silva, H. 2008. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Memoria Instituto Oswaldo Cruz*. 103(2): 214-215.
- Marín, R. (2009). Especies de Mosquitos (Díptera: Culicidae) y sus Sitios de cría. *Revista Biomédica*. Vol. 20 (1), pp. 15-23.
- Mark S. G., Douglas G. I.; Fungi: hyphomycetes; Agriculture, Canada Research Center, PO Box Main; Canada.
- Mcinnis, JR.; Zattau, WC. 1982. Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Leptolegnia*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 39: 98-104.
- Méndez, G.J. y Montesano, C. (1994). Manual para vigilancia Epidemiológica del Dengue. *Secretaría de Salud*; México. Pp. 34-41.
- Moran, M. A. y Terrón, R: A. (1988). Entomología práctica. *Instituto de Ecología A. G.* 1° edición, México. Pp.401.

- Mulla M. S.; Biological Control of Mosquitoes with Entomopathogenic Bacteria; Proceedings of the IV th National Vector Control Symposium; USA, 1991.
- Muñoz C. L., Ibañez B. S., Corona V. M; Los Mosquitos (Diptera: Culícidae) de Tlaxcala México. I: Lista Comentada de Especies; Folia Entomológica Mexicana; México, 2006.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1997. Prevención del dengue y de la fiebre hemorrágica del dengue. Prontuario para dirigentes municipales y comunitarios. División de lucha contra las enfermedades tropicales. Ginebra.Suiza.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2015. Alerta epidemiológica: Infección por virus Zika. Organización Panamericana de la Salud. Oficina regional para las Americas
- Orduño C. N.; Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre Picudo del Nopal *Metamasius Spinolae* ; Campus Montecillo Entomología y Acaralogia; México, 2009
- Perez P. R., Santamarina M. A., Susceptibilidad de las larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae), Estado de Oaxaca, México; Revista Cubana Medicina Tropical; México, 1998.
- Pinnock, De Garcia, R.; Cubbin, CM. 1973. *Beauveria tenella* as a control agent for mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology.22: 143-147.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., De la Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia. 31:12-15.
- Roberts, D. W. 1970. *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Beauveria*, and *Metarrhizium* as parasites of mosquitoes.Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America7: 140-155.
- Roberts, DW. 1974. Fungal infections of mosquitoes. In: Aubin A, Belloncik S, Bourassa JP, LaCoursière E, Pélissier M, editors. Le

contrôle des moustiques/Mosquito control: 143-193. Presses de l'Université du Québec.

- Rodríguez, L.A. y Arredondo B. C. (2007). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. *Folleto técnico. Vol. 1 (23)*, pp. 303.
- Sánchez A. H.; Procedimiento para la cría de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say, *Anopheles albimanus* (Wied) y *AE. aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae); Cría de insectos plaga y organismos benéficos; Instituto de Fitosanidad; México.
- Sánchez, J.J. (2003). Localización de criaderos temporarios y permanentes de dípteros hematófagos (Diptera: Culicidae) en el municipio de Puebla, México. Tesis de licenciatura pp.5-6
- Scholte, E.J.; Knols, B.; Samson, R. y Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal Insect Science. Vol. 4*. Pp. 19.
- Scholte, E.J.; Knols, B. y Takken, W. (2004). Autodissemination of the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal. Vol. 3*. Pp. 45-50.
- Scholte, E.J.; Knols, B. y Takken, W. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal Invertebrate Pathology. Vol. 91*. Pp. 43-49.
- Scholte, E.J.; Nghabi, K.; Kihonda, J.; Takken, W.; Paaijmans, K.; Abdulla, S.; Killeen, G.F. y Knols, B. (2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science. Vol. 308*. Pp. 1641–1642.
- Scholte, E.J.; Njiru, B.N.; Smallegange, R.C.; Takken, W. y Knols, B.G. (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culexquinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal. Vol. 2*. Pp.29-35.

- Scholte, E.J.; Takken, W. y Knols, B. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae.albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. Vol. 102. Pp. 151-158.
- Stoner K.; Approaches to the Biological control of the Insects; Vegetable entomologist; Connecticut Agricultural Experiment Station; 1914.
- Sweeney, AW. 1981. An undescribed species of *Smittium*(Trichomycetes) pathogenic to mosquito larvae in Australia. *Transactions of the British Mycological Society*. 77: 55-60.
- Thiri6n I.J. (2003). El Mosquito *Aedes aegypti* y el Dengue en M6xico; *Environmental Science*, M6xico.
- Thomas MB, Blanford S, Jenkins NE, Killeen GF, Knols BGJ, Read AF, Scholte E-J, Takken W. 2005. Benefits and risks in malaria control. *Science*. 310: 49-51.
- Toledo J., Infante F; 2008 Manejo integrado de plagas, Trillas; M6xico; pp. 327.
- Tomasello, D. y Schlagenhauf, P. (2013). Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 11 (5), 1-11.
- Trpis, M. (1977). Autogeny in diverse population of *Aedes aegypti* from East Africa. *Tropical Medicine and Parasitology*, 28:77-82.
- V6lez, A.P.; Posada, F.J.; Mar6n, M.P.; Gonz6lez, M.T. y Osorio, V. (1977). T6cnica para el control de calidad de formulaciones de Hongos Entomopat6genos. *Bolet6n T6cnico, CENICAFE*. Vol. 1 (17).
- World Health Organization, 2008. Dengue dengue hemorragico fever. Fact sheet. N6 117.
- Zapata P. A., Manrique S. P., Che M. A.; identificaci6n de larvas de Mosquito (Diptera-Culicidae) de M6rida Yucat6n, M6xico y sus principales criaderos; *Revista Biomedica*; M6xico, 2007.
- Zarate A. M. 1988. Dengue virus activity in Mexico International congresses of Virology Edmonton Canada.