

# Métodos de evaluación de la patogenicidad de hongos y oomycotas sobre *Aedes spp.* en laboratorio

Agudelo Maira Alejandra, Rodríguez Santiago María Camila<sup>1</sup>,  
Álvarez Aldana Adalucy<sup>2</sup>, Cardona Bustos Nadya Lorena<sup>3</sup>

## RESUMEN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de un billón de personas adquieren una infección por un arbovirus al año y cerca de un millón sufren consecuencias fatales. Muchas de estas enfermedades son transmitidas por mosquitos del género *Aedes*, convirtiéndose en problema mundial de salud debido a su gran impacto socioeconómico y a sus altas tasas de morbimortalidad. Las estrategias de control se han reducido al uso de agentes químicos, barreras físicas y control cultural para disminuir la población de vectores; sin embargo, los agentes químicos han traído consigo un problema de resistencia a los principios activos. Por eso, el control biológico se ha convertido en un excelente candidato para el control de plagas y vectores de importancia en la salud pública y el sector agrícola. La búsqueda de nuevos agentes de control dentro de estos grupos requiere una serie de estudios en laboratorio que determinen su patogenicidad, virulencia y otros aspectos de interés. En esta revisión, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los métodos de evaluación de la patogenicidad en laboratorio de hongos y oomycotas con potencial entomopatígeno sobre *Aedes spp.*

**Palabras clave:** hongos, oomycotas, patogenicidad, *Aedes spp.*

- 1 Semillero Microorganismos de Importancia en Salud Humana y Animal “Obvio Microbio”. Facultad Ciencias de la Salud, Exactas y Naturales. Universidad Libre Seccional Pereira. mayraa-agudelof@unilibre.edu.co, mariac-rodriquezs@unilibre.edu.co
- 2 Docente-investigador. Líder del Semillero Microorganismos de Importancia en Salud Humana y Animal “Obvio Microbio”. Grupo de Investigación MICROBIOTEC. Facultad de Ciencias de la Salud, Exactas y Naturales. Universidad Libre Seccional Pereira. adalucy.alvareza@unilibre.edu.co
- 3 Docente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. nadya.cardona@udea.edu.co

## INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Aedes*, en especial *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, representan una gran preocupación en el ámbito de la salud pública al ser los principales vectores de los virus del dengue, chikunguña, zika y otros arbovirus, como el de la fiebre amarilla (*Flavivirus*). Estos vectores suelen encontrarse en climas tropicales, subtropicales y templados extendiéndose por todo África, Oriente Medio, el Sudeste Asiático, Oceanía, las Américas y algunas islas del Índico y el Pacífico, por lo que tienen un gran impacto socioeconómico que afecta de manera desproporcionada a naciones en vías de desarrollo, de igual manera las tasas significativas de morbimortalidad representan grandes pérdidas humanas anualmente. Solo para dengue, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta un total anual de 2,5 billones de personas en riesgo de ser infectados, de las cuales aproximadamente 500.000 desarrollarán cuadros clínicos severos.<sup>1,2</sup>

Puesto que se cuenta con un número limitado de vacunas, la prevención de la transmisión de estas enfermedades virales se reduce al control de las poblaciones de vectores. Las principales estrategias corresponden al control por agentes químicos como insecticidas y larvicidas, la eliminación de sitios de cría, el uso de barreras físicas como mallas para evitar la entrada de estos dípteros en las casas y la alteración genética de las poblaciones mediante la introducción de machos estériles o hembras con fertilidad reducida.<sup>1-3</sup>

Desafortunadamente, un gran problema de resistencia a las fórmulas químicas se ha hecho evidente en poblaciones constantemente expuestas a fumigaciones como *A. aegypti*, para la que se ha reportado resistencia o reducciones significativas en la susceptibilidad a cuatro de los pesticidas más empleados: carbamatos, organoclorados, organofosforados y piretroides. Además, existe una preocupación creciente por el impacto ambiental y ecológico de estos agentes, en especial a largo plazo.<sup>13</sup> Por lo anterior, el uso de hongos y oomycotas entomopatógenos como bioinsecticidas se proyecta como una alternativa con gran potencial y un bajo impacto ambiental.<sup>4-10</sup>

Estos hongos y oomycotas son capaces de infectar a una gran diversidad de especies de insectos y pueden encontrarse de forma natural en suelos, restos de cultivos, en materia orgánica o sobre cadáveres de insectos. Su aplicación en el área del biocontrol se ha popularizado en las últimas décadas en Europa, Estados Unidos y, recientemente, en Latinoamérica y Asia, proyectándose como una herramienta global de biocontrol a la par de los productos químicos.<sup>11</sup>

Dentro del grupo de hongos entomopatógenos (HEP), encontramos géneros como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium* y *Paecilomyces* con un gran potencial para el biocontrol.

Y dentro del grupo de los oomycotas, se resaltan los géneros *Lagenidium*, *Leptolegnia* y *Pythium* con un amplio

espectro de infección en una gran diversidad de artrópodos.<sup>12-16</sup>

Es de suma importancia evaluar la capacidad de infección y el grado de virulencia de cada aislamiento de interés para determinar su verdadero potencial como biocontrolador. Para esto, se realizan bioensayos o pruebas de patogenicidad en las que se miden parámetros, como el rango de hospederos, su desempeño en condiciones ambientales, qué condiciones pueden mejorar o impedir la formación de epizootias y las barreras de infección. Es sumamente importante para el desarrollo de los bioensayos conocer los requerimientos de supervivencia y mantenimiento tanto del organismo patógeno como del hospedero.<sup>17-19</sup>

Son tres las pruebas generalmente utilizadas con este fin: a) la prueba de patogenicidad, que consiste en determinar si el microorganismo es capaz de causar enfermedad o no, con una sola dosis establecida; b) el intervalo de respuesta biológica, en la que se prueban de dos a cuatro dosis que permitan establecer una concentración mínima que mate a toda una población y otra que ocasione el 0 % de mortalidad; y c) la determinación de la concentración que logra ocasionar un 50 % de mortalidad en una población del organismo blanco (DL50) y el tiempo en el que se alcanza ese 50 % (TL50).<sup>13,17,20,21</sup> Tras determinarse el potencial de un organismo para infectar, enfermar o matar a un insecto diana en laboratorio, es de vital importancia evaluar su actividad en campo, puesto que las condiciones

ambientales y ecológicas pueden afectar su desempeño. Los factores externos que pueden resultar en la disminución de la actividad entomopatógena o afectación del propágulo infectivo, como los rayos UV, la humedad, la cantidad de oxígeno, etc., deben ser tenidos en cuenta a la hora de formular un producto biológico, ya que esto es lo que permitirá su aplicación y uso.<sup>18,22-24</sup>

Teniendo en cuenta lo anterior, esta revisión tiene como objetivo realizar una búsqueda bibliográfica sobre los métodos de evaluación de la patogenicidad en laboratorio de hongos y oomycotas con potencial entomopatógeno para *Aedes* spp.

## METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura sobre los métodos de evaluación de la patogenicidad y la producción de biomasa en laboratorio de hongos y oomycotas reportados como entomopatógenos para *Aedes* spp. haciendo uso de Google Académico, repositorios universitarios y ScienceDirect y PubMed. Para la búsqueda bibliográfica sobre evaluación de la patogenicidad se utilizaron los términos “entomopathogenic fungi pathogenicity” o “entomopathogenic oomycetes pathogenicity” usando el conector booleano AND para integrar en la búsqueda “*Aedes*”. Se restringió la bibliografía a artículos de investigación, revisiones y libros publicados en los últimos 20 años, y se seleccionaron aquellos en los que se describieran ensayos de patogenicidad en el laboratorio.

## RESULTADOS

En la búsqueda sobre evaluación de la patogenicidad se encontraron 4.552

documentos para hongos y 339 para oomycotas. En la Tabla 1 se relacionan algunos de los artículos encontrados de mayor relevancia:

**Tabla 1.** Principales resultados encontrados sobre bioensayos para hongos y oomycotas entomopatógenos

| Título del recurso<br>(artículo, tesis, libro)  | Autores                   | Revista/libro   | Año  | Cita |
|---|---------------------------|---|------|------|
| Evaluación de hongos entomopatógenos sobre estadios larvarios de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae).                      | Gandarilla Pacheco et al. | <i>Entomología Mexicana</i>                                 | 2020 | 25   |
| Bioassays of entomogenous fungi   | Butt y Goettel            | <i>Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes</i> | 2000 | 17   |
| <i>Leptolegnia chapmanii</i> como alternativa biológica para el control de <i>Aedes aegypti</i>   | Rueda et al.              | Biomédica   | 2019 | 5    |
| A new methodology to evaluate entomopathogenic fungi and formulated insecticides to control adults of <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) | Tejeda Reyes et al.       | <i>Florida Entomologist</i>                                 | 2018 | 26   |

## DISCUSIÓN

### ESTRATEGIAS DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Aedes* spp.

Tras su introducción en la región de las Américas, llegando como polizontes en barcos provenientes de África que llevaban esclavos y la posterior reinvasión en la década de 1960 después de haber sido erradicados en las décadas anteriores, los mosquitos de diferentes especies del género *Aedes* como *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. poliniensis*, *Ae. mediovittatus* y *Ae. nivalisse*, entre otros,

se han convertido en uno de los vectores de mayor relevancia médica.<sup>30</sup>

Estos dípteros son hospederos por excelencia de arbovirus pertenecientes a las familias *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae*, como el virus del dengue (DENV), el virus chikungunya (CHIKV), el virus del zika (ZIKV), el de la fiebre amarilla (YFV), todos agentes etiológicos de enfermedades con una alta incidencia en regiones tropicales y subtropicales afectando históricamente de manera significativa a comunidades vulnerables en países del Pacífico Sur, el Sudeste Asiático

co, África y Latinoamérica, y que ahora, como resultado de los fenómenos de globalización, urbanización, mejoras en los sistemas de transporte y resistencia a insecticidas, representan una problema global, cuyo control implica no solo la vigilancia y prevención de las enfermedades, sino también de sus vectores.<sup>31,32</sup>

Dados los limitados avances en el desarrollo de vacunas y tratamientos para estas enfermedades, las estrategias de control se han enfocado en la reducción de la población de mosquitos vectores mediante la aplicación de insecticidas de síntesis química, como organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides, uso de repelentes en las casas o empleo de análogos de hormonas juveniles reguladoras del crecimiento, como el metopreno y el piriproxifeno con propiedades biocidas sobre los instares larvales de estos artrópodos.<sup>10,33</sup> Este control químico suele ir acompañado de un control cultural en el que se implementa el uso de barreras físicas (p. ej., mosquiteras y toldillos), y se identifican y eliminan potenciales sitios de cría, como llantas, tanques y recipientes plásticos, lugares preferidos por *Ae. aegypti* como un organismo altamente antropofílico y urbano en comparación con los hábitats más naturales preferidos

por *Ae. albopictus*, como agujeros de los árboles, charcos yemas axilares de plantas y similares.<sup>34,35</sup>

La presión selectiva ejercida por el uso prolongado e indiscriminado de insecticidas en poblaciones de vectores, en especial de aquellas con alta ocurrencia en zonas urbanas como *Ae. aegypti*, han derivado en el desarrollo de resistencia a estos químicos, a lo que se suma la preocupación creciente por la afectación a organismos no blanco, al ambiente y a la salud humana<sup>(3,31)</sup>.

Por esta razón, en las últimas décadas, las estrategias de control biológico se han diversificado y enfocado no solo en el control de otros artrópodos que son plagas agrícolas sino también en vectores de enfermedades como *Aedes* spp. empleando organismos patógenos y depredadores naturales, alterando su comportamiento o liberando mosquitos estériles o no susceptibles a infección con estos arbovirus y, por tanto, sin potencial para ser vectores.<sup>11</sup> En la Tabla 2, se resumen las principales estrategias de biocontrol empleadas en los últimos años para el control de mosquitos pertenecientes a este género en especial de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* como los vectores de mayor distribución e importancia.

**Tabla 2.** Principales estrategias de biocontrol para *Aedes* spp.<sup>10,36</sup>

| Estrategia de control                       | Agente de control   | Organismo blanco  | Mecanismo   |
|---|---|---|---|
| <b>Biocontrol usando mosquitos</b>          | <i>Toxorhynchites</i> sp.   | <i>Ae. aegypti</i> (estados larvales I-IV)  | Las larvas de <i>Toxorhynchites splendens</i> se alimentan de los instares larvales de <i>Aedes</i> spp.  |
| <b>Biocontrol usando peces</b>              | <i>Gambusia</i> spp.,<br><i>Poecilia</i> spp.   | <i>Ae. aegypti</i> ,<br><i>Ae. albopictus</i> ,<br><i>Ae. vigilax</i> (estados larvales I-IV) | Introducción de especies de peces larvívoros como <i>G. affinis</i> , <i>P. reticulata</i> y <i>P. signifier</i> , etc. depredadores de las larvas de <i>Aedes</i> spp.   |
| <b>Biocontrol usando renacuajos</b>         | <i>Renacuajos de los géneros Bufo, Euphlyctis, Hoplobatrachus, Polypedates, Ramanella</i>   | <i>Ae. aegypti</i> ,<br><i>Ae. albopictus</i> (huevos y estados larvales I-II)                | Los renacuajos depredan activamente los huevos y larvas de mosquitos, sobre todo, del género <i>Aedes</i>   |
| <b>Biocontrol usando copépodos</b>          | <i>Mesocyclops</i> spp.,<br><i>Macrocyclus</i> spp.,<br><i>Cyclops</i> spp.   | <i>Ae. aegypti</i> ,<br><i>Ae. albopictus</i> (estados larvales I-II)                         | Algunos copépodos como <i>M. thermocyclopoides</i> , <i>C. vernalis</i> , <i>M. aspericornis</i> , <i>M. edax</i> , <i>M. guangxiensis</i> y <i>M. longisetus</i> se alimentan de los instares larvales I y II de <i>Aedes</i> spp. |
| <b>Biocontrol usando plantas</b>            | <i>Myracrodruon urundueva</i> , <i>Aegle marmelos</i> , <i>Limonia acidissima</i> ,<br><i>Sphaerenthus indicus</i> ,<br><i>Clusia flumiensis</i> ,<br><i>Syzygium lanceolatum</i> ,<br><i>E. coronaria</i> ,<br><i>Origanum scabrum</i><br><i>Glycosmis pentaphylla</i> | <i>Ae. aegypti</i> (huevos, larvas, pupas y adultos)  | Aplicación de extractos y metabolitos vegetales con actividad ovocida, larvicida, pupicida o adulticida sobre <i>Aedes</i> sp.  |
| <b>Biocontrol usando bacterias</b>          | <i>Wolbachia</i>  | <i>Ae. aegypti</i>  | La infección con <i>Wolbachia</i> sp. reduce la expectativa de vida de las hembras y ocasiona incompatibilidad citoplasmática entre machos infectados y hembras sanas impidiendo la reproducción de la población de vectores.       |
|   | <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>   | <i>Aedes</i> spp.   | Las toxina cry de <i>B. thuringiensis</i> es capaz de causar la muerte de mosquitos del género <i>Aedes</i> por inanición o parálisis total del insecto.  |
| <b>Biocontrol usando hongos y oomicotas</b> | <i>Metarhizium anisopliae</i><br><i>Beauveria bassiana</i><br><i>Aspergillus nomius</i><br><i>Leptolegnia chapmanii</i>   | <i>Aedes</i> spp. (estados acuáticos y adultos)   | Invasión sistemática del hospedero por ingestión o contacto con esporas.<br>Producción de toxinas fúngicas  |

## Hongos y oomycotas entomopatógenos en el control de *Aedes spp.*

Los hongos se han convertido en los microorganismos más estudiados y empleados en el biocontrol de artrópodos de importancia agrícola y, actualmente, de mosquitos vectores de enfermedades como *Aedes spp.* Estos hongos entomopatógenos pueden infectar y matar una gran variedad de hospedadores, regulando la población del insecto de interés casi siempre sin mayores afectaciones a organismos no blanco y al ambiente.<sup>4,36</sup>

El mecanismo de estos hongos empieza con la producción de conidios infectivos que ingresan a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto, o por adhesión a la cutícula. Una vez las esporas se han adherido al hospedero, los hongos producen una serie de enzimas lipasas, proteasas y quitinasas que le permiten destruir la epidermis del insecto y, a su vez, usarlo como sustrato para la formación de un tubo germinal y un apresorio que les permite penetrar la cutícula hasta llegar al hemocele.<sup>10,37</sup> Ya penetrado el hemocele, el hongo tendrá que evadir el sistema inmune del insecto; si es exitoso, se replicará formando micelio y produciendo una septicemia, que será manifestada por el insecto infectado con síntomas, como convulsiones, alteraciones en coordinación y comportamiento, parálisis y, finalmente, la muerte como consecuencia del daño físico producido por el crecimiento del hongo en su interior, la producción de toxinas fúngicas y la falta de nutrientes.<sup>38</sup>

La complejidad y variedad del mecanismo de patogenicidad de estos microorganismos hace que el desarrollo de resistencia sea un proceso mucho más lento y complicado para los mosquitos en comparación con la resistencia a insecticidas químicos. También implica un menor impacto en ecosistema que otros métodos en los que se usan bacterias como *Wolbachia* o depredadores no nativos y poco específicos como copépodos y peces.<sup>36,39</sup>

Entre todos los organismos estudiados como agentes de biocontrol de mosquitos y otros artrópodos, despiertan particular interés hongos de los órdenes *Blastocladales*, representado por *Coelomomyces*; *Entomophthorales* con géneros como *Conidiobolus*, *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Erynia*, reconocidos por su especificidad, e *Hypocreales*, en el que se destacan géneros como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Purpureocillium*, *Cordyceps*, *Nomuraea*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillium*. Entre ellos los órdenes *Entomophthorales* e *Hypocreales* son los más estudiados y algunas especies ya son ampliamente usadas en control biológico al ser menos selectivos y relativamente fáciles de aislar, masificar y formular.<sup>4,39</sup>

En un estudio realizado por Nunes Leles et al.,<sup>40</sup> se evaluó la patogenicidad de 19 aislamientos pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Gliocladium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* y *Pochonia* en mosquitos adultos de *Ae. aegypti* de 1 a 3 días de vida; todos los hongos estudiados fueron reportados como patógenos para

este artrópodo destacando los géneros *Metarhizium*, *Isaria*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* por su letalidad. Gandarilla-Pacheco et al.<sup>25</sup> también evaluaron algunos aislados nativos de *Beauveria bassiana* (HEB1), *Isaria fumosorosea* (clave Y01) y *Metarhizium anisopliae* (HIB-11 y HIB-12), esta vez en instares larvales del mosquito, reportando, al igual que Nunes Leles et al.,<sup>40</sup> que todas las cepas evaluadas tenían la capacidad de infectar las larvas con altas tasas de mortalidad (88-100 %) en el caso de las cepas nativas de *M. anisopliae*.

Son muchos los estudios encontrados en la literatura que demuestran el potencial de los hongos entomopatógenos como agentes de control de *Aedes* spp.,<sup>10,41-43</sup> distinguiéndose las especies *M. anisopliae* y *B. bassiana* empleados para la formulación de varios insecticidas biológicos actualmente en el mercado.<sup>22</sup>

Los oomycotas no se encuentran clasificados dentro del reino Fungi, sino que hacen parte del reino Chromista junto con las algas pardas y diatomeas, aunque por un largo tiempo fueron considerados hongos inferiores dadas sus tendencias de crecimiento filamentoso y hábitos de nutrición y reproducción por esporas muy similares a los hongos verdaderos; los avances en filogenética permitieron reclasificarlos como protistas bajo el filo *Heterokonta*. Estos organismos también han sido estudiados como potenciales agentes de biocontrol de los estados acuáticos *Aedes* spp.<sup>4,44</sup>

La mayor parte de las especies de interés pertenecen a los géneros *Leptolegnia*, *Phytium*, *Lagenidium* y *Crypticola*.

Una de las especies más representativas es *Leptolegnia chapmanii*; desde su descubrimiento hace casi cinco décadas se ha estudiado su potencial en el control de mosquitos obteniendo resultados importantes. Según la revisión realizada por Gutiérrez et al.,<sup>45</sup> este oomycota alcanza una tasa de infección en poblaciones de larvas de mosquitos aedinos de hasta el 100 %, afectando principalmente los instares larvales más jóvenes (I y II); asimismo, algunos aislamientos pueden causar una mortalidad en larvas del 100 % tras escasas 24 h de exposición, según el estudio realizado por López Lastra et al.<sup>46</sup>

De manera similar a *L. chapmanii*, *Lagenidium giganteum* también ha sido reportado, siendo, incluso, desarrollados varios productos comerciales. En un estudio realizado por Merriam y Axtell<sup>47</sup> sobre larvas de *Ae. taeniorhynchus*, se reportó una tasa de infección del 96,5 % con este oomycota y un 100 % de mortalidad en larvas de *Aedes* spp. Como demostró McCray et al.,<sup>48</sup> ambos acotaron que este oomycota no era efectivo en aguas salobres o ricas en materia orgánica, lo que limitaba su uso en campo; a esto se suman los estudios recientes que identifican algunas cepas de esta especie potencialmente patógenas para algunos vertebrados, como perros, gatos e, incluso, humanos, lo que la convierte en una preocupación en ecosistema y de

salud pública. Otros oomycotas de interés son *Pythium carolinianum* y *Crypticola clavulifera*.<sup>4</sup> Autores como Misra et al.<sup>49</sup> y Carolino et al.<sup>50</sup> han estudiado la colonización del hongo *M. anisopliae* en mosquitos de *Aedes* en estados de larva, pupa o adultos.

Antes de que cualquiera de estos organismos pueda ser usado en campo como un producto comercial, son muchos los factores que deben considerarse, empezando por determinar que no represente un riesgo para el balance del ecosistema donde será liberado o en la salud pública. De igual forma, se debe evaluar su patogenicidad y virulencia (tanto en laboratorio como en campo o semicampo), su susceptibilidad a condiciones ambientales, especificidad y potencial para ser producido a gran escala, entre otros.<sup>17</sup> En los apartados siguientes, se abordarán varios aspectos sobre los bioensayos, componentes clave de cualquier estudio que busque determinar el potencial de biocontrol de estos hongos y oomycotas, o que convertirlo en un producto comercial viable.

### **Evaluación de la actividad entomopatógena**

Los bioensayos son un paso fundamental en el desarrollo de un micoinsecticida o en la simple determinación del potencial del hongo u oomycota como un agente de control para un insecto en particular, permitiendo precisar parámetros clave del hongo u oomycota, además de la patogenicidad (capacidad para enfermar

a un hospedero susceptible) y virulencia (grado en que produce enfermedad al hospedero), como el rango de hospederos (los organismos susceptibles de ser infectados), su desempeño en campo, la tasa de producción de conidia o del estado infectivo, las condiciones que afectan o mejoran la generación de epizootias y posibles barreras para el desarrollo de la infección en el insecto, como infección con otros microorganismos, estímulos ambientales y algunos hábitos de comportamiento o alimentación, etc.

Un correcto diseño y desarrollo de estos bioensayos es vital para la obtención de resultados certeros y confiables que soporten el desempeño del hongo como entomopatógeno tanto en condiciones de laboratorio como en campo.<sup>17,52</sup>

Dados los diversos parámetros que pueden determinarse, no existe un procedimiento único y estándar, sino muchos de ellos ajustados según las relaciones hospedero-patógeno y el objetivo de la investigación. Hajek et al.<sup>53</sup> plantean una serie de puntos clave que actúan como la columna vertebral de gran parte de los ensayos realizados en hongos y oomycotas, y de los que se derivan las metodologías específicas:

- Recolección de insectos enfermos, hospederos naturales del hongo u oomycota, o muestras ambientales de las que se pueda aislar el microorganismo.
- Obtención de un inóculo *in vivo* o *in vitro*.

- Exposición de insectos a diferentes dosis o concentraciones de estados infectivos del hongo o de la formulación.
- Incubación de los insectos, favoreciendo el desarrollo de la infección o simulando ambientes específicos.
- Monitoreo de los insectos evaluados y registro de parámetros propios del efecto del hongo de acuerdo con el objetivo del bioensayo, como el tiempo en el que mueren, la cantidad de infectados y muertos en un tiempo determinado, susceptibilidad a estímulos ambientales, cambios en el comportamiento de los sujetos, etc.
- Analizar y verificar la información y los resultados obtenidos mediante herramientas matemáticas, estadísticas y de bioinformática según el objetivo propuesto.

Es de suma importancia que los investigadores conozcan en profundidad tanto el patógeno como el hospedero, sus requerimientos de desarrollo y supervivencia, y las relaciones entre ambos, para evitar mortalidad por factores ajenos a la infección tanto en los grupos de estudio como en los controles, y una subsecuente evaluación poco precisa de la patogenicidad, virulencia o cualquiera que sea el parámetro investigado.<sup>17,54</sup>

El diseño experimental debe contemplar todos los factores que puedan potencialmente incidir en los resultados y establecer los procesos que se seguirán,

empezando con aquellas fases que no son propias del desarrollo del bioensayo, sino de preparación, como el aislamiento y almacenamiento del microorganismo, las condiciones de cría, la etapa de desarrollo y el estado fisiológico de los mosquitos seleccionados como sujetos de estudio, la viabilidad y estabilidad del propágulo infectivo (conidia, blastosporas, microesclerotia, etc.), el método de inoculación y las condiciones de incubación de los sujetos, y las metodologías para la evaluación de la infectividad y mortalidad, así como el análisis de estos datos.<sup>17,27</sup>

### **Aislamiento de hongos entomopatógenos**

Una de las prácticas más comunes para el aislamiento de hongos y oomycotas entomopatógenos es la recolección de especímenes que manifiesten síntomas de infección, como cambios en la forma o textura (licuefacción, momificación, prolapso rectal), color, olor o comportamiento (convulsiones, inapetencia, ausencia de coordinación); que se sospeche o que hayan muerto como resultado de una micosis, cuyos cadáveres normalmente se encuentran cubiertos por el hongo; o insectos vivos reportados como hospederos naturales o potenciales de estos organismos.<sup>55</sup> Es frecuente que los insectos que se buscan recolectar de ambientes terrestres y acuáticos para aislar estos agentes sean los mismos artrópodos que se pretenda controlar a partir de la premisa de que el hongo es un patógeno natural de este organismo y, por

tanto, su potencial como biocontrolador es mayor. Por eso, cuando se trata de control de mosquitos, se suelen aislar cepas directamente de estados acuáticos, dada su abundancia y facilidad para colectarlos, y en menor medida, de mosquitos adultos mediante el uso de trampas.<sup>56</sup>

En el caso de cadáveres de insectos en los que se puede observar esporulación, es posible aislar al patógeno directamente de la superficie mediante un suave raspado del micelio u homogeneizando el cadáver en agua destilada o algún *buffer* para posteriormente sembrar en un medio nutritivo suplementando con alguna sustancia antibiótica de amplio espectro y, en ocasiones, un fungicida, para evitar el crecimiento de hongos y bacterias saprótrofos. Si los especímenes colectados aún no presentan crecimiento vegetativo o se trata de insectos vivos, es común el uso de cámaras húmedas para fomentar su desarrollo y posterior aislamiento.<sup>17,56</sup> En el aislamiento de oomycotas, es frecuente el uso de trampas empleando instares larvales o la pupa de los mosquitos y otros insectos como cebo considerando la naturaleza acuática de estos organismos.<sup>5,57</sup>

Independiente del organismo a aislar y el método empleado, se recomienda mantener condiciones de asepsia estrictas y conservar tan bien como sea posible las muestras recolectadas en el caso de no ser procesadas inmediatamente. Es probable que se deban realizar subcultivos a partir de los aislamientos primarios para obtener cultivos axénicos que permitan

la identificación morfológica o del entomopatógeno previo al desarrollo de los bioensayo.<sup>17,56</sup>

### **Propágulos infectivos y preparación del inóculo**

La identificación del hongo u oomycota entomopatógeno es seguida de la producción de propágulos infectivos estables que serán usados en el desarrollo de los bioensayos. La cantidad de inóculo necesaria para llevarlos a cabo es fácilmente obtenida en laboratorio en medios artificiales o naturales (huevo, arroz, semillas, etc.) mediante fermentación líquida, sólida o bifásica o, en algunos casos, por simple siembra en superficie en medio sólido; y si esto no es posible, puede cultivarse *in vivo*. El método de siembra dependerá del tipo de propágulo que se busque producir (conidia, micelio, blastosporas, protoplastos, zoosporas, etc.).<sup>17,56</sup>

Con algunas excepciones, el estado infectivo por excelencia de los hongos pertenecientes al orden *Hypocreales* son los conidios aéreos. En la naturaleza, estas esporas se producen en el exterior de cadáveres de insectos que han muerto como consecuencia de una micosis, en contacto permanente con la atmósfera. En el laboratorio, estos propágulos son producidos principalmente mediante fermentación en sustratos sólidos, como arroz, trigo, medios microbiológicos comerciales o sustratos inertes. En condiciones de fermentación líquida, también pueden obtenerse blastosporas,

esporas que corresponden a estados proliferativos unicelulares de algunas especies de importancia, como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, pero suelen ser de vida corta y más susceptibles a condiciones de estrés.<sup>23,58,59</sup>

La obtención de propágulos infectivos de Entomophthorales implica que se realicen esfuerzos mayores, puesto que la producción *in vitro* de esporas aéreas resulta extremadamente difícil de llevar a cabo de manera eficiente y sin costos elevados, y los conidios obtenidos *in vivo* son de muy corta duración, por lo que las endosporas (zygosporas y azygosporas) producidas por algunas especies, como *Zoophthora radicans* y *Entomophaga maimaiga*, actualmente son los propágulos más viables para su aplicación en control biológico y pueden ser producidas mediante fermentación líquida limitando las fuentes de carbono y nitrógeno.<sup>23,60</sup> Los protoplastos y esporangios también pueden ser usados como propágulos infectivos, pero, al igual que en los Hypocreales, estos son realmente intermediarios para la liberación de verdadera conidia infectiva.<sup>61</sup>

En cuanto a lo que de oomycotas se trata, estos organismos tienen zoosporas móviles capaces de buscar de manera activa a hospederos susceptibles. Estas zoosporas pueden ser obtenidas directamente del micelio o a partir de sus estructuras de resistencia conocidas como oosporas si las condiciones son adecuadas; sin embargo, la obtención de oosporas *in vitro* se ha probado como una difícil tarea, por lo

que la estructura infectiva por excelencia en el control biológico sigue siendo las zoosporas.<sup>5,23,62</sup>

Para la preparación de los inóculos a ser usados en los bioensayos, se filtran los cultivos líquidos o se realizan raspados de los cultivos en medio sólido. La mayoría de los propágulos pueden ser suspendidos en agua destilada estéril con algún surfactante como el *tween*, dada la naturaleza hidrofóbica de la mayoría de los propágulos.<sup>53</sup> Conocer la concentración exacta a la que estarán expuestos los mosquitos durante los bioensayos es vital para determinar parámetros como la  $CL_{50}$ , que permitan evaluar la relación entre la mortalidad del hospedero y la concentración del agente patógeno, lo cual puede realizarse mediante el uso de herramientas, como la cámara de Neubauer o hemocitómetro.<sup>58</sup>

Los hongos son organismos proclives a sufrir atenuación de su virulencia y alteraciones morfológicas cuando son subcultivados sucesivamente en medios artificiales. Esta tasa de disminución de la virulencia es específica de cada especie e, incluso, cepa; la virulencia puede ser restaurada exponiéndola una o más veces al insecto hospedero, alternando el medio de cultivo o adicionando aceites potenciadores de su virulencia o persistencia, como el aceite de nim, girasol, coco, etc.<sup>63,64,65</sup> La estrategia por excelencia es conservar de manera correcta el genotipo original, ya sea usando sílica gel, agua estéril, o métodos como la

liofilización, el ultracongelamiento y la criopreservación, entre otros.<sup>63,66</sup>

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante que todos los procesos llevados a cabo para la obtención del inóculo se encuentren estandarizados, puesto que los más mínimos cambios en las condiciones de cultivo pueden afectar la virulencia, viabilidad y resistencia ambiental de los propágulos resultantes.<sup>17</sup>

Una vez obtenido el inóculo, el paso siguiente es llevar a cabo los bioensayos. En general, los bioensayos realizados para la búsqueda de nuevos agentes de control biológico tienen alguno de los siguientes objetivos: a) determinación de la patogenicidad (p. ej., ensayos de susceptibilidad del hospedero, determinación del rango de hospederos, efectos sobre organismos no blanco o efectos de factores bióticos o abióticos, como temperatura o fase del ciclo de vida en el que se encuentra el insecto), o b) determinación de la virulencia (p. ej., ensayos de concentración-mortalidad, comparación entre aislamientos).<sup>17</sup>

### **Bioensayos de patogenicidad y de virulencia**

Los ensayos de patogenicidad determinan la susceptibilidad de los hospedadores a desarrollar enfermedad como consecuencia de la infección con un hongo u oomycota. Estos suelen ser los ensayos iniciales en la búsqueda de nuevos agentes de control, cuyos resultados determinan si es necesario

llevar a cabo otros estudios en laboratorio como los estudios de virulencia. Este tipo de experimentos permiten determinar parámetros clave en la selección de cepas eficaces para el control microbiano, como la susceptibilidad de una sola especie o género hospedero frente a una o más especies de hongos u oomycotas o algún bioformulado de interés (ensayos de susceptibilidad), el rango de especies que pueden ser afectadas (rango hospedero), el mecanismo de infección del patógeno o como se ve afectada la patogenicidad de un agente de interés según la fase biológica del hospedero o las condiciones ambientales como temperatura y nutrición.<sup>17,26,53</sup>

Son diversas las metodologías empleadas en ensayos de susceptibilidad; los investigadores deben seleccionar la más apropiada según su conocimiento del patógeno fúngico y la especie blanco. En laboratorio, lo más común es someter a los mosquitos a contacto directo con los conidios infectivos, puesto que el principal mecanismo de infección de los hongos y oomycotas es la adhesión y penetración del integumento. esta inoculación puede realizarse mediante técnicas simples, muchas de estas consisten en depositar el mosquito sobre papel filtro, tela o cartón impregnado con esporas viables, o, en su defecto, hacerlo caminar en cultivos fúngicos.

Una metodología así fue utilizada por Scholte et al.<sup>43</sup> quienes depositaron adultos de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en recipientes cilíndricos donde previamente

habían dispuesto papel filtro impregnado de conidias viables de *M. anisopliae* por 24 h.<sup>53,58</sup>

Sin embargo, realizar ensayos con mosquitos adultos representa un trabajo más arduo y más difícil de trasladar a su aplicación en campo. Los mosquitos adultos del género *Aedes* solo alcanzan tamaños entre los 1,80 y 3,23 mm,<sup>67</sup> por lo que este tipo de herramientas invasivas podrían conllevar la destrucción de sus **órganos** o daños tisulares que le causen la muerte, así, lo más común es el uso de los estados acuáticos de este insecto con los que se pueden usar técnicas de exposición, que, aunque no siempre permitan conocer la concentración exacta de propágulos, sí facilitan la obtención de resultados reproducibles y certeros.<sup>53,58</sup>

Los huevos, las larvas y pupas de mosquitos pueden ser inoculados de manera directa por vía tópica, ya sea sumergiéndolos en una suspensión de esporas, roseándolos con ayuda de un *spray*, o depositando pequeñas gotas directamente sobre el cuerpo usando micropipetas o hisopos.<sup>53,58</sup> Si se quiere trabajar con insectos adultos, puede incorporarse una solución de esporas o un filtrado de metabolitos fúngicos en la dieta de los zancudos. Este método fue utilizado por Accoti et al.<sup>68</sup> para determinar si la muerte de mosquitos de las especies *Anopheles gambiae* y *Ae. aegypti* estaba asociada **únicamente** a la infección con los aislamientos fúngicos obtenidos por ellos en zonas rurales y urbanas de Maryland y Puerto Rico, o

también a metabolitos tóxicos producidos por estos hongos.

Posterior a la inoculación, es imperativo proporcionarles a los sujetos condiciones óptimas para su supervivencia, pero que favorezcan el proceso de infección. Con este objetivo, suelen usarse cabinas o cámaras húmedas que permitan mantener un control de factores ambientales, como temperatura, humedad, fotoexposición, nivel de interacción con el ambiente exterior o la nutrición, etc.<sup>17,64</sup> Algunos de estos, como la temperatura y la humedad, son particularmente críticos en la germinación de las conidias y el desarrollo de colonias en hongos, como lo demostraron Pratibha et al.<sup>69</sup> en un estudio reciente. Pueden usarse todo tipo de materiales para las cámaras o cabinas, incluso recipientes de plástico desechable o de poliestireno, cartones, o recipientes de vidrio como frascos o cajas de Petri, siempre y cuando hayan sido correctamente desinfectados para evitar contaminación cruzada.

Los bioensayos de patogenicidad deben llevarse a cabo por periodos mayores de las dos semanas dada la acción lenta de patógenos como los hongos u oomycotas. Es recomendable que los conteos de mortalidad sean realizados diariamente, disponiendo siempre de los mosquitos encontrados muertos en nuevos recipientes individuales que permitan un reaislamiento del patógeno, para así confirmarlo como la causa de muerte. Asimismo, el bioensayo deberá repetirse

en el tiempo manteniendo las condiciones del primer ensayo para asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Todos los bioensayos deben incluir un control negativo que permita la supervivencia de insectos bajo las mismas condiciones de inoculación e incubación a la que fueron sometidos los sujetos tratados, para asegurar que no sean estos factores los causantes de la mortalidad en lugar del patógeno. La mortalidad en estos grupos de control deberá mantenerse por debajo del 10%; los porcentajes superiores pueden significar resultados poco precisos y reproducibles.<sup>17,53,58</sup>

En los ensayos de virulencia, se busca conocer y cuantificar la capacidad de ciertos microorganismos,<sup>17</sup> en este caso, de los hongos entomopatógenos, de generar enfermedad a los organismos diana. En estos bioensayos, se evalúa el factor dosis-mortalidad (CL50 o DL50); en los hongos, por ejemplo, se mide la concentración de esporas capaz de causar la muerte del insecto. En estos ensayos, además de cuantificar la concentración letal, también se tienen en cuenta factores como la capacidad de supervivencia, la actividad y el número de esporas, infecciones originadas a partir de los cadáveres de los insectos.<sup>17,53</sup>

Zuharan et al.<sup>70</sup> realizaron este tipo de ensayos, midiendo la capacidad infectiva del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* en larvas de mosquitos de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*. En este ensayo, se utilizaron 20 larvas de cada uno de los mosquitos sumergiéndolos en suspensiones de conidios a diferentes concentraciones, prueba

que se realizó por triplicado, con cepas de los mosquitos tanto de laboratorio como de campo.

Los resultados demostraron que este hongo entomopatógeno tiene una mayor letalidad frente a las larvas de *Ae. aegypti* que en las larvas de *Ae. albopictus*. Las cepas de *Ae. aegypti* de campo y de laboratorio fueron más susceptibles a la infección fúngica con una concentración letal 50 de  $9,6 \times 10^3$  ml/conidia y  $1,3 \times 10^3$  ml/conidia, y una concentración letal 95 de  $1,2 \times 10^6$  y  $5,5 \times 10^5$  ml/conidia.<sup>70</sup>

## CONCLUSIONES

El interés por la bioprospección de hongos y oomycotas entomopatógenos y su uso como biocontroladores ha venido en aumento en los últimos años, por lo cual el estudio de su capacidad infectiva y la producción de propágulos infectivos, ya en masa, ya en laboratorio, también lo ha hecho. Aunque en la actualidad son muchas las metodologías que se han desarrollado para llevar a cabo bioensayos de patogenicidad y virulencia, y asimismo de producción de propágulos infectivos, es necesario seguir estudiando estos microorganismos, sus mecanismos de acción, sus requerimientos de crecimiento y esporulación, y los factores directamente asociados a la disminución o aumento de su virulencia, para que en un futuro su uso contra vectores de enfermedades, como las especies del género *Aedes* se convierta en una herramienta verdaderamente extendida reemplazando de manera progresiva, total o parcialmente, el control químico.

## REFERENCIAS

1. Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. *Aedes* spp. and their microbiota: a review. *Front Microbiol.* 2019;10:2036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02036>
2. Weeratunga P, Rodrigo C, Fernando SD, et al. Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *The Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2017(8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012759>
3. Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, et al. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Phys.* 2012;104(2):126-131. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.008>
4. Scholte EJ, Knols BG, Samson RA, et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J Insect Sci.* 2004;4(1):19. <https://doi.org/10.1093/jis/4.1.19>
5. Rueda ME, Tavares I, López CC, et al. *Leptolegnia chapmanii* como alternativa biológica para el control de *Aedes aegypti*. *Biomédica.* 2019;39(4):798-810. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4598>
6. Sani I, Ismail SI, Abdullah S, et al. A review of the biology and control of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi. *Insects.* 2020;11(9):619. <https://doi.org/10.3390/insects11090619>
7. Ferron, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu Rev Entomol.* 1978;23(1):409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>
8. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell.* 2009;139(7):1268-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
9. Labaude S, Griffin CT. Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. *Insects.* 2018;9(2):72. <https://doi.org/10.3390/insects9020072>
10. Singh RK, Dhama K, Khandia R, et al. Prevention and control strategies to counter Zika virus, a special focus on intervention approaches against vector mosquitoes: current updates. *Front Microbiol.* 2018;9:87. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00087>

11. Van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*. 2018;63:39-59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
12. Gómez Ramírez H, Zapata Granja A, Torres del Águila E, et al. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Lima: Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú; 2014. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producción-y-Uso-de-Hongos-Entomopatógenos.pdf>
13. García Munguía AM. Hongos entomopatógenos (Mycota: deuteromycetes) aislados en el noroeste de México: impacto sobre la longevidad, fecundidad, fertilidad y tasas de cópula e inseminación en *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae) [tesis doctoral]. [Nuevo León]: A Universidad Autónoma de Nuevo León; 2011. <https://cd.dgb.uanl.mx/bitstream/handle/201504211/16304/20075.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. Litwin A, Nowak M, Różalska S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2020;19(1):23-42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>
15. Gutiérrez AC, Páramo MR, Falvo ML, et al. *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) as a future biorational tool for the control of *Aedes aegypti* (L.). *Acta tropica*. 2017;169:112-118. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.021>
16. Wang C, Shen D, Wang J, et al. An AGC kinase, PgAGC1 regulates virulence in the entomopathogenic oomycete *Pythium guiyangense*. *Fungal Biology*. 2019;123(1):87-93. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.006>
17. Butt TM, Goettel MS. Bioassays of entomogenous fungi. En: *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*; 2000. p. 141-195. <https://doi.org/10.1079/9780851994222.0141>
18. Mascarin GM, Kobori NN, Quintela ED, et al. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control*. 2013;66(3):209-218. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.05.001>
19. Cañedo V, Ames T. Manual de Laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima: Centro Internacional de la Papa; 2004. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

20. Trujillo Ruiz PA, Zapata Restrepo LN, Hoyos Sánchez RA, et al. Determinación de la dl50 y tl50 de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. *Rev Fac Nac Agron*. 2008;61(2):4564-4575. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24784/25335>
21. Butt TM, Barrisever M, Drummond J, et al. Pathogenicity of the entomogenous, hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae* against the chrysomelid beetles *Psylliodes chrysocephala* and *Phaedon cochleariae*. *Biocontrol Sci Technol*. 1992;2(4):327-334. <https://doi.org/10.1080/09583159209355248>
22. Bautista EJ, Mesa L, Gómez Álvarez MI. Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y el Caribe. *Scientia Agropecuaria*. 2018;9(4):585-604. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.15>
23. Jaronski ST. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. En: JA Morales-Ramos, M Guadalupe Rojas, DI Shapiro-Ilan, editores. *Mass production of beneficial organisms invertebrates and entomopathogens*. 2.<sup>a</sup> ed. Ámsterdam: Elsevier; 2022. p. 317-357. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822106-8.00017-8>
24. Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, et al. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 2008;112(5):583-591. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.12.004>
25. Gandarilla Pacheco FL, Pérez Garza CE, de Luna Santillana E de J, et al. Evaluación de hongos entomopatógenos sobre estados larvarios de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae). *Entomol Mex*. 2020;7:105-111. <https://www.researchgate.net/publication/344168987>
26. Tejeda-Reyes MA, Rodríguez-Maciel JC, Alatorre-Rosas R, et al. A new methodology to evaluate entomopathogenic fungi and formulated insecticides to control adults of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Florida Entomologist*. 2018;101(3):511-514. <https://doi.org/10.1653/024.101.0311>
27. Jaronski ST, Mascarin GM. Mass production of fungal entomopathogens. En Lacey LA, editor. *Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice*. Ámsterdam: Elsevier; 2017. p. 141-155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00009-3>

28. Bartleu MC, Jaronski ST. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. *Fungi Biol Control Syst.* 1988;61-85. [https://www.researchgate.net/publication/313675350\\_Mass\\_production\\_of\\_entomopathogenous\\_fungi\\_for\\_biological\\_control\\_of\\_insects](https://www.researchgate.net/publication/313675350_Mass_production_of_entomopathogenous_fungi_for_biological_control_of_insects)
29. Kumar S, Thakur M, Rani, A. Trichoderma: mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *Afr J Agric Res.* 2014;9(53):3838-3852. <http://doi.org/10.5897/AJAR2014.9061>
30. Evans HC, Elliot SL, Barreto RW. Entomopathogenic fungi and their potential for the management of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113:206-214. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170369>
31. Huang YJS, Higgs S, Vanlandingham DL. Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. *Insects.* 2017;8(1):21. <https://doi.org/10.3390/insects8010021>
32. Arredondo-García L., Méndez-Herrera A, Medina-Cortina H. Arbovirus en latinoamérica. *Acta Pediatr Méx.* 2016;37(2):111-131. <https://www.scielo.org.mx/pdf/apm/v37n2/2395-8235-37-02-00111.pdf>
33. Manjarres-Suárez A, Olivero-Verbel J. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Rev Costarric Salud Pública.* 2013;22(1):68-75. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rcsp/v22n1/art12v22n1.pdf>
34. Rao BB, Harikumar PS, Jayakrishnan T, et al.. Characteristics of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) breeding sites. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011;42(5):1077-1082. <https://www.thaiscience.info/journals/Article/TMPH/10828976.pdf>
35. Abílio AP, Abudasse G, Kampango A, et al. Distribution and breeding sites of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in 32 urban/peri-urban districts of Mozambique: implication for assessing the risk of arbovirus outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(9):1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006692>
36. Benelli G, Jeffries CL, Walker T. Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. *Insects.* 2016;7(4):52. <https://doi.org/10.3390/insects7040052>

37. Shahid AA, Rao QA, Bakhsh A, et al. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Arch Biol Sci.* 2012;64(1):21-42. <https://doi.org/10.2298/ABS1201021S>
38. Téllez Jurado A, Cruz Ramírez MG, Mercado Flores Y, et al. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev Mex Micol.* 2009;30:73-80. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802009000200007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007)
39. Baron, N. C., Rigobelo, E. C., & Zied, D. C. (2019). Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research*, 79(2), 307-315.
40. Leles RN, Sousa NA, Rocha LFN, et al. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2010;107:1271-1274. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1991-y>
41. De Paula AR, Brito ES, Pereira CR, et al. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Sci Technol.* 2008;18(10):1017-1025. <https://doi.org/10.1080/09583150802509199>
42. Darbro JM, Graham RI, Kay BH, et al. Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Sci Technol.* 2011;21(9):1027-1047. <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.597913>
43. Scholte EJ, Takken W, Knols BG. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop.* 2007;102(3):151-158. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.04.011>
44. Fry WE, NJ Grünwald. Introduction to Oomycetes. *The Plant Health Instructor.* 2010. DOI:10.1094/PHI-I-2010-1207-01
45. Gutiérrez AC, Rueda Páramo ME, Falvo ML, et al. *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) as a future biorational tool for the control of *Aedes aegypti* (L.). *Acta Trop.* 2017;169:112-118. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.021>
46. López Lastra C, Steciow M, García J. Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquitos

- (Diptera: Culicidae). Rev Iberoam Micol. 1999;16:143-145. <http://www.reviberoammicol.com/1999-16/143145.pdf>
47. Merriam TL, Axtell RC. Evaluation of the entomogenous fungi *Culicinomyces clavosporus* and *Lagenidium giganteum* for control of the salt marsh mosquito, *Aedes taeniorhynchus*. Mosq News. 1982;42(4):594-602. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19832902934>
48. Mccray EM, Umphlett CJ, Fay RW. Laboratory studies on a new fungal pathogen of mosquitoes. Mosq News. 1973;33(1):54-60. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19732902328>
49. Misra K, Deka A, Haque A, et al. Biocontrol potentiality of entomopathogenic fungi against larvae of dengue fever vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Bioresour. 2015;2(1):16-22. [http://jbr.rgu.ac.in/img/pdf/16 to 22 2nd.pdf](http://jbr.rgu.ac.in/img/pdf/16%20to%2022%202nd.pdf)
50. Carolino AT, Gomes SA, Pontes Teodoro TB, et al. *Aedes aegypti* pupae are highly susceptible to infection by *Metarhizium anisopliae* blastospores. J Pure Appl Microbiol. 2019;13(3):1629-34. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.36>
51. Tercero Padilla NG, Medrano Guerrero SX. Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti*, UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA, octubre 2017-abril 2018. [tesis de grado]. [Managua]: Instituto Politécnico de la Salud Luis Felipe Moncada; 2019. <https://repositorio.unan.edu.ni/11992/>
52. Choi CJ, Lee JY, Woo RM, et al. An effective entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults. J Asia Pac Entomol 2020;23(2):585-590. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.04.007>
53. Hajek AE, Papierok B, Eilenberg J. Methods for study of the Entomophthorales. En: Lacey LA, editor. Manual of techniques in invertebrate pathology. 2.<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 302-309. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00009-9>
54. Táborsky V. General introduction to process of microbial pesticide. En: Small-scale processing of microbial pesticides. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1992. <http://www.fao.org/3/t0533E/t0533e00.htm#con>

55. Dar SA, Rather BA, Kandoo AA. Insect pest management by entomopathogenic fungi. *J Entomol Zool Stud.* 2017;5(3):1185-90. <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue3/PartQ/5-3-151-179.pdf>
56. Lacey LA, Solter LF. Initial handling and diagnosis of diseased invertebrates. En: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in invertebrate pathology.* 2.<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 1-13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00001-4>
57. Santos K, Montalva C, Rueda Páramo ME, , et al. Atividade de fungos isolados de Dípteros coletados em Goiás e Tocantins em *Aedes aegypti* e *Musca domestica*. *Rev Patol Trop.* 2016;45(1):1-115. [https://www.researchgate.net/publication/309548651\\_Atividade\\_de\\_fungos\\_isolados\\_de\\_Dipteros\\_coletados\\_em\\_Goias\\_e\\_Tocantins\\_em\\_Aedes\\_aegypti\\_e\\_Musca\\_domestica](https://www.researchgate.net/publication/309548651_Atividade_de_fungos_isolados_de_Dipteros_coletados_em_Goias_e_Tocantins_em_Aedes_aegypti_e_Musca_domestica)
58. Inglis GD, Enkerli J, Goettel MS. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. En: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in invertebrate pathology.* 2.<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 189-253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00007-5>
59. Das Chagas Bernardo C, Pereira Junior RA, Luz C, et al. Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. *Fungal Biol.* 2020;124(8):714-22. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.003>
60. Hajek AE, Steinkraus DC, Castrillo LA. Sleeping beauties: horizontal transmission via resting spores of species in the Entomophthoromycotina. *Insects.* 2018;9(3). <https://doi.org/10.3390/insects9030102>
61. Sánchez Pena SR. In vitro production of hyphae of the grasshopper pathogen *Entomophaga grylli* (Zygomycota: Entomophthorales): Potential for production of conidia. *Florida Entomol.* 2005;88(3):332-334. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2005\)088\[0332:IVPOHO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2005)088[0332:IVPOHO]2.0.CO;2)
62. Pelizza S, Scorsetti A, Lastra C, et al. Production of oogonia and oospores of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Straminipila: Peronosporomycetes) in *Aedes aegypti* (L.) larvae at different temperatures. *Mycopathologia.* 2010;169(1):71-74. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9224-6>
63. Hussain A, Tian MY, He YR, et al. In vitro and in vivo culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *J Food, Agric Environ.* 2010;8(3-4):481-487. <https://doi.org/10.1234/4.2010.3215>

64. Shah FA, Wang CS, Butt TM. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;251(2):259-266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
65. Paula AR, Ribeiro A, Alves Lemos FJ, et al. Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasites and Vectors.* 2019;163(2019):1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3415-x>
66. Ayala-Zermeño MA, Gallou A, Berlanga-Padilla AM, et al. Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. *Fungal Biol.* 2017;121(11):920-928. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.007>
67. Schneider JR, Morrison AC, Astete H, et al. Adult size and distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Associated with larval habitats in Iquitos, Peru. *J Med Entomol.* 2004;41(4):634-642. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.634>
68. Accoti A, Engdahl CS, Dimopoulos G. Discovery of novel entomopathogenic fungi for mosquito-borne disease control. *Front Fungal Biol.* 2021;2. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.637234>
69. Pratibha J, S P. Influence of temperature and humidity on conidial germination and colony growth of entomopathogenic fungi. *J Entomol Zool Stud.* 2021;9(4):201-206. <https://www.entomoljournal.com/archives/2021/vol9issue4/PartC/9-4-7-408.pdf>
70. Zuharah WF, Rohaiyu MR, Azmi WA, et al. Pathogenicity of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* MET-GRA4 isolate on dengue vectors, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *J Asia Pac Entomol.* 2021;24(2):24-29. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.04.008>
71. Pascual García AA. Formulación con hongos entomopatógenos para el control de plagas. 2015. <https://patentimages.storage.googleapis.com/18/b1/f8/2b8ffc71cea7/WO2015080545A1.pdf>
72. Grace J, Jaronski S. Solid substrate fermentation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Sidney: USDA-ARS Northern Plains Agricultural Research Laboratory; 2005. [https://www.ars.usda.gov/ARSPUserFiles/30320505/The Art of Fermentation 4-06.pdf](https://www.ars.usda.gov/ARSPUserFiles/30320505/The%20Art%20of%20Fermentation%204-06.pdf)