



**Evaluación de la patogenicidad de hongos muestreados en Nuquí
(Chocó) sobre larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti***

Yisel Carolina Gómez Giraldo
Trabajo de grado para optar al título Biólogo

Asesor:
**Jessica Yasmin Sánchez Gutierrez, M.Sc., candidata Doctorado en
Biotecnología**

Coasesor:
Nadya Lorena Cardona Bustos, M.Sc., Ph.D

Universidad de Antioquia
Facultad de ciencias exactas y naturales
Instituto de Biología
Medellín, 2023

Cita

(Gómez Giraldo, 2023)

Referencia
Estilo APA 7 (2020)

Gómez Giraldo, Y. C. (2023). *Evaluación de la patogenicidad de hongos muestreados en Nuquí (Chocó) sobre larvas de Aedes (Stegomyia) aegypti*. [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia.



Fitopatología y Biotecnología de Hongos (FITOBIOL)



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.[A1]

Agradecimientos

Agradezco principalmente a mis padres, mi familia y mis compañeros de laboratorio, sin los cuales no hubiese sido posible cursar esta carrera. A mis asesoras Jessica Yasmin Sánchez Gutierrez y Nadya Lorena Cardona Bustos quienes fueron importantes guías en este proceso. También a Dairon Andres Machado Agudelo por estar siempre presto a ayudarme y brindarme toda la información que le solicitaba durante el desarrollo de este proyecto. Al Instituto de Biología y a la Universidad de Antioquia por crear un valioso espacio para la formación académica y científica.

Tabla de contenido

Introducción.....	7
Marco teórico.....	8
<i>Aedes aegypti.....</i>	<i>8</i>
<i>Enfermedades tropicales.....</i>	<i>10</i>
<i>Estrategias de control.....</i>	<i>12</i>
<i>Manejo integrado de vectores.....</i>	<i>13</i>
<i>Control biológico.....</i>	<i>14</i>
<i>Hongos entomopatógenos.....</i>	<i>15</i>
<i>Trichoderma spp.....</i>	<i>15</i>
Planteamiento del problema.....	17
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
Materiales y métodos.....	18
<i>Población de Ae. Aegypti.....</i>	<i>18</i>
<i>Eclosión y mantenimiento de las larvas.....</i>	<i>19</i>
<i>Aislamiento de los hongos.....</i>	<i>20</i>
<i>Selección de los hongos.....</i>	<i>20</i>
<i>Cultivo de los hongos.....</i>	<i>22</i>
<i>Producción de inóculo.....</i>	<i>23</i>
<i>Prueba de patogenicidad.....</i>	<i>24</i>
<i>Verificación de agentes causales por medio de prueba de koch.....</i>	<i>25</i>
<i>Prueba de concentración letal 50.....</i>	<i>25</i>
<i>Prueba de tiempo letal 50.....</i>	<i>26</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>27</i>
Resultados y análisis.....	28
Conclusiones.....	39
Recomendaciones.....	40
Referencias bibliográficas.....	40

Lista de figuras y tablas

Figura 1. Diferentes estados de desarrollo de <i>Aedes aegypti</i>	9
Figura 2. Distribución municipal de <i>Aedes Aegypti</i> y casos de fiebre Chikungunya.....	10
Figura 3. Modelamiento de la posible distribución mundial de <i>Ae. aegypti</i>	10
Figura 4. Distribución de serotipos de virus de dengue en América.....	12
Figura 5. Jaulas para cría de mosquitos.....	19
Figura 6. Recipiente para eclosión de los huevos y desarrollo de las larvas.....	20
Figura 7. Crecimiento macroscópico de los hongos.....	21
Figura 8. Observaciones microscópicas de los hongos.....	22
Figura 9. Cultivo de los hongos en arroz.....	23
Figura 10. Montaje para producción de inóculo.....	24
Figura 11. Montaje para la prueba de patogenicidad.....	25
Figura 12. Observación del crecimiento de los hongos en el cuerpo de las larvas.....	29
Tabla 1. Resumen del diseño experimental.....	27
Figura 13. Porcentaje de afectación larval en el tiempo.....	29
Figura 14. Prueba de patogenicidad. Análisis no paramétrico de Kruskal-wallis.....	31
Tabla 2. Porcentaje de afectación de las diferentes concentraciones.....	32
Tabla 3. Porcentaje de afectación de las diferentes concentraciones.....	32
Figura 15. Porcentaje de afectación larval por las diferentes concentraciones.....	35
Tabla 4. Concentración letal 50 de ENA1.....	37
Tabla 5. Porcentaje de afectación en los diferentes tiempos.....	37
Figura 16. Porcentaje de afectación larval tiempo letal 50.....	38

Resumen

El incremento de la población humana durante los últimos años, ha desencadenado una serie de problemas de salud pública como la proliferación de insectos que afectan la salud humana; tal es el caso de los vectores, organismos que transmiten patógenos como el virus del dengue, el cual es propagado por el díptero *Aedes aegypti* que anualmente genera aproximadamente 50 millones de infecciones, encontrándose en casi todos los países de América del sur incluyendo Colombia. En la búsqueda de alternativas para disminuir la dispersión de estos vectores se han propuesto diferentes estrategias físicas, químicas y culturales, sin embargo, éstas resultan no ser tan efectivas. Es por esto que se propone estrategias como el control biológico, el cual consiste en la manipulación de los enemigos naturales del organismo de interés y dentro de este, los hongos entomopatógenos son de gran importancia por su habilidad para parasitar diferentes órdenes de insectos. En este trabajo se evaluó la actividad patogénica *in vitro* de 4 aislamientos del género *Trichoderma* (ENA1, ENA2, M1A5, HNA1), provenientes de Nuquí (Chocó) sobre estadios larvales del díptero *Aedes aegypti*. Se realizaron pruebas de patogenicidad probando una concentración estandarizada sobre larvas L2-L3 de *Ae. aegypti* y el aislamiento más patogénico fue sometido a pruebas de concentración letal 50 y tiempo letal 50. Finalmente, se comprobaron los postulados de Koch y se realizó un análisis estadístico no paramétrico. Se encontró que el aislamiento ENA1 presentó mayor actividad patogénica que los otros aislamientos, con una CL50 de 2.4628×10^7 y 1.0450×10^7 con/ml y un TL50 de 9.45 horas. Con los resultados se propone ampliar las investigaciones respecto a los metabolitos secundarios que produce este hongo.

Palabras clave: entomopatógenos, control biológico, vectores, dengue, díptero, *Trichoderma* spp

1. Introducción

El incremento de la población humana durante los últimos años, ha desencadenado problemas de salud pública, promoviendo la proliferación de insectos perjudiciales para la salud humana, convirtiéndose en una preocupación en muchos países, igualmente las precarias condiciones de higiene de algunas viviendas, generan espacios para el crecimiento y la propagación de vectores, lo que ha conllevado a que las enfermedades de transmisión vectorial representen más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, provocando más de 700.000 muertes por año (Organización Mundial de la Salud, 2020). Estos vectores, gran parte hematófagos, transmiten patógenos al huésped y pueden causar diversas enfermedades (Organización Mundial de la Salud, 2014). Dentro de los microorganismos transmitidos se encuentran los *Flavivirus*, el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue, el cual es considerado como la enfermedad viral transmitida por mosquito más importante a nivel global (Evans et al., 2018), y es transmitido por el díptero *Aedes aegypti* que se encuentra ampliamente distribuido en Colombia, desde el Atlántico hasta la frontera con Ecuador y desde el Pacífico hasta los Llanos orientales (Bello-García et al., 1987). Anualmente se estima que hay hasta 390 millones de infecciones a nivel mundial (Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018).

En la búsqueda de alternativas para disminuir la dispersión de estos vectores se han propuesto diferentes estrategias que ayuden en el descenso de la tasa de contagio como controles culturales y estrategias de origen sintético o químico (Ranson et al., 2008). Sin embargo, su uso indiscriminado ha causado que los insectos desarrollen resistencia y se afecte la salud humana (Bassil et al., 2007) y la de los ecosistemas (Devine et al., 2008). Dado lo anterior, se han desarrollado métodos alternativos en la búsqueda del manejo integrado de vectores como el control biológico, que consiste en la manipulación de los enemigos naturales del organismo de interés para lograr su control, generando poco o nulo efecto nocivo colateral hacia otros organismos, baja resistencia y la ausencia de problemas con intoxicaciones; pueden ser a base de microorganismos como hongos, bacterias, oomycetes entre otros (Virginia-Padilla, 2017).

Los hongos entomopatógenos son considerados de gran importancia dentro del control biológico, algunos de los hongos más comúnmente estudiados son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* ahora (*Akhantomycetes lecanii*) (Sahayaraj & Namasivayam, 2008), entre otros, además, el género *Trichoderma* spp. podría tener efectos patogénicos sobre algunos insectos. Este hongo es antagonista y ha sido utilizado principalmente en el control biológico de enfermedades de plantas producidas por hongos. La actividad insecticida de este hongo ha sido probado en huevos, larvas y adultos de *Xylotrechus*

arvicola, una importante peste de Viñedos, al igual que en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* presentando porcentajes significativos de afectación (Vallejos-Sirpa et al., 2014). En general, los hongos son una buena alternativa para el biocontrol, presentando baja afectación a los ecosistemas y una actividad patogénica muy prometedora. Sin embargo, aún falta mucha información referente al potencial de estos biocontroladores, por lo tanto, en el presente estudio, se evaluó la actividad patogénica *in vitro* de 4 aislamientos del género *Trichoderma* spp. provenientes de Nuquí (Chocó) sobre estadíos larvales de *Aedes aegypti*.

2. Marco teórico

2.1. *Aedes (Stegomyia) aegypti*

Aedes aegypti clasificado tradicionalmente dentro del orden Díptera, familia Culicidae, subfamilia Culicinae (Patiño-Beltran, 2001), que en clasificaciones más recientes pasó del género *Aedes* al género *Stegomyia* y subgénero *Stegomyia* (Reinert et al., 2009), se ubica predominantemente en entornos periurbanos, en estanques naturales o recipientes artificiales en las viviendas o sus alrededores (Nelson, 1986). Presenta cuatro estadíos metamórficos, divididos en una fase acuática: huevo, larva y pupa (pasando por 4 estadíos larvales) y la fase terrestre que es el mosquito adulto. La hembra oviposita sobre la línea de agua entre 50 y 500 huevos por postura (Rueda-Páramo, 2015). Pueden formar larvas de 12-24 horas, el periodo de pupa dura de 48-72 horas y el estado adulto dura aproximadamente 4 semanas, siendo las hembras las que ingieren la sangre humana y transmiten la enfermedad (Patiño-Beltran, 2001). Asimismo, los mosquitos pueden infectarse a partir de personas con el virus del dengue (Organización Mundial de la Salud, 2022).

Una característica importante es que sus huevos son resistentes a la desecación lo que les confiere la ventaja de sobrevivir en ambientes inhóspitos (Rey & Lounibos, 2015) y pueden permanecer viables por meses en sequía. El desarrollo de las larvas se ve influenciado por la temperatura (siendo temperaturas altas inductoras de este), el alimento disponible, la densidad larval y la salinidad (Nelson, 1986). Las larvas se alimentan de material particulado que puede ser detritos en suspensión, bacterias, algas, entre otros (Laird, 1988).

Esta especie es originaria de África (Rey & Lounibos, 2015) y actualmente se encuentra en casi todos los países de América (Patiño-Beltran, 2001), siendo considerada una especie

invasora debido a que ha colonizado muchos sitios fuera de su distribución nativa (Organización Mundial de la Salud, 2022). En Colombia se encuentra ampliamente distribuido, desde la costa Atlántica hasta la frontera con Ecuador y desde la costa Pacífica hasta los Llanos orientales. Se ubica desde el nivel del mar hasta 2200 metros de altura aproximadamente (Bello-García et al., 1987). Este mosquito es vector de los virus de la fiebre chikungunya, la fiebre amarilla, el Zika y el dengue (Rueda-Páramo, 2015).

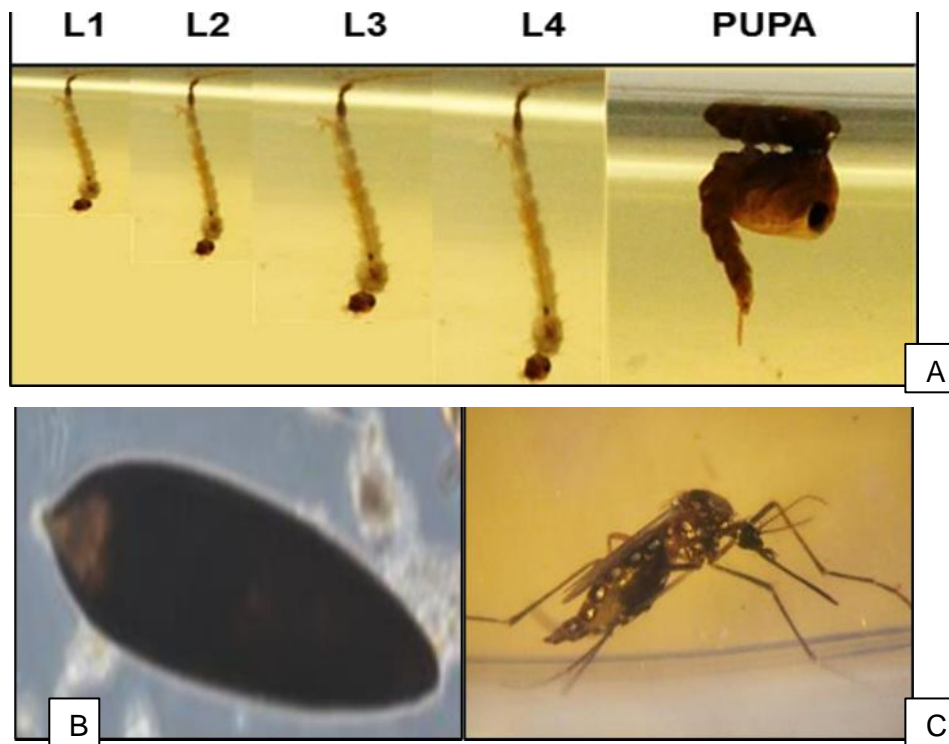


Figura 1. *Diferentes estados de desarrollo de Aedes aegypti. (A) Larvas y pupa. (B) Huevo. (C) Adulto (Tomado de Rueda-Páramo, 2015).*

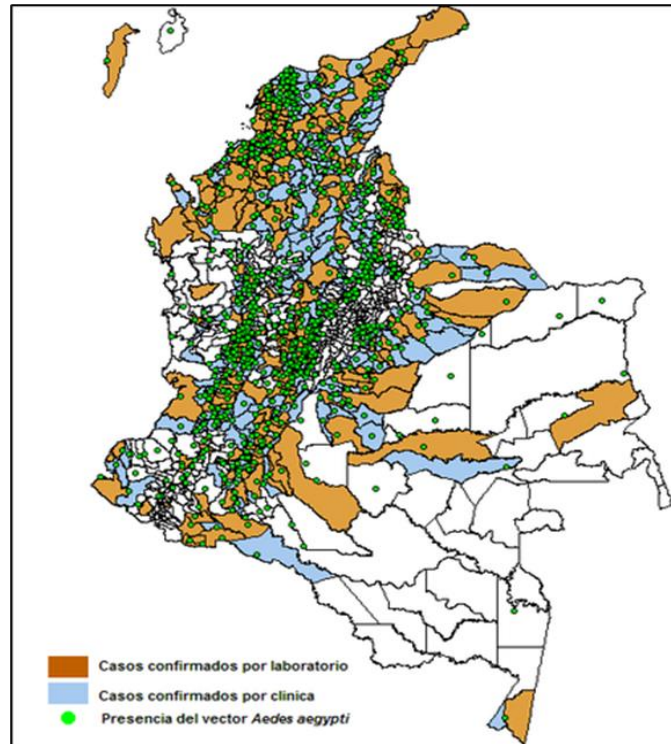


Figura 2. Distribución municipal de *Aedes Aegypti* y casos confirmados de fiebre Chikungunya durante el año 2015 en Colombia (Laiton-Donato et al., 2016).

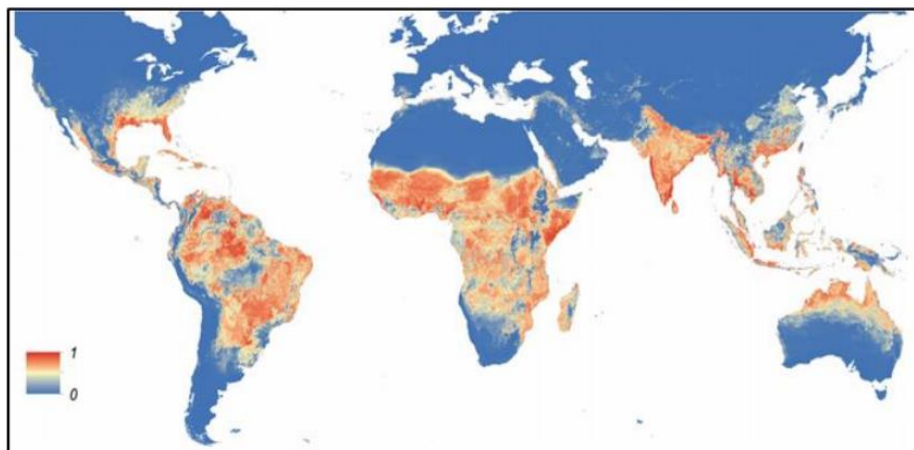


Figura 3. Modelamiento de la posible distribución mundial de *Ae. aegypti*. Rojo: presencia. Azul: ausencia (Kraemer et al., 2015).

2.2. Enfermedades tropicales

Son enfermedades que se dan en las zonas intertropicales en lugares en donde las condiciones sanitarias son deficientes generando hábitats adecuados para que microorganismos, reservorios y vectores puedan prosperar (Tercero-Gutiérrez & Olalla-Herbosa, 2008). Los vectores son organismos que transmiten patógenos, gran parte de estos son hematófagos que ingieren microorganismos y luego, son transmitidos al huésped y pueden causar enfermedades (Organización Mundial de la Salud, 2014). Dentro de los microorganismos transmitidos se encuentran los *Flavivirus*, el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del dengue con sus 4 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), siendo este último la enfermedad viral transmitida por mosquito más importante a nivel global (Evans et al., 2018).

El dengue es transmitido por el díptero *Aedes aegypti* y en menor medida por *Aedes albopictus* a través de la picadura de las hembras causando una transmisión horizontal. El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus* (Familia Flaviviridae) y se encuentra en más de cien países tropicales y subtropicales en Asia, África y América donde la temperatura y la humedad favorecen la proliferación de vectores (Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018). Actualmente el dengue se ha propagado a nuevas zonas entre ellas Europa, presentando infecciones en Francia, Croacia, Portugal entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2022). Muchas infecciones pueden ser asintomáticas, pero también se pueden presentar síntomas similares a los de la gripe o incluso evolucionar hacia un dengue grave que puede involucrar hemorragias, insuficiencia orgánica o extravasación de plasma y si no se trata adecuadamente se puede presentar riesgo de muerte (Organización Mundial de la Salud, 2022).

Anualmente se estima que hay hasta 390 millones de infecciones a nivel mundial y más de 2.500 millones de personas viven en áreas de riesgo de infección (Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018). Entre 2001 y 2007 más de 30 países de América notificaron 4'332.731 casos de dengue y los países andinos dentro de los que se encuentra Colombia contribuyeron con un 19% (819.466). Colombia y Venezuela tuvieron el mayor porcentaje de casos de la subregión (81%) y la mayoría de las muertes se dio en Colombia (Organización Mundial de la Salud, 2009).

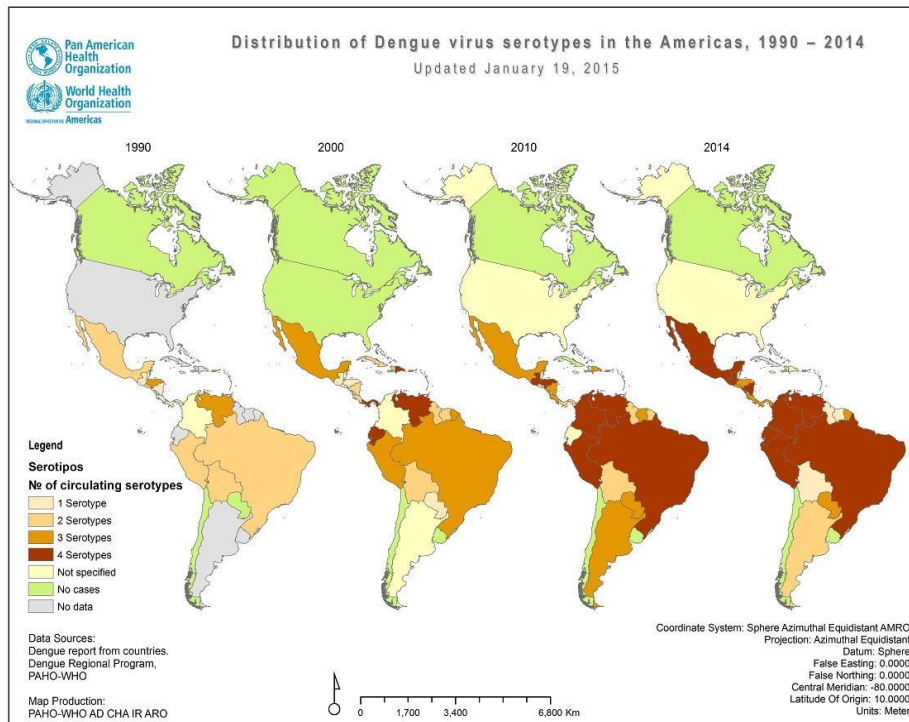


Figura 4. Distribución de los serotipos del virus dengue en América 1990-2014. (PAHO-WHO).

Otra de las enfermedades es la fiebre amarilla que ha afectado a la población humana desde hace varios siglos, es causada por un *Flavivirus* (familia flaviviridae) transmitido principalmente por *Ae. aegypti*. A inicios del siglo XX, las poblaciones de este vector se redujeron en América debido a planes de control y prevención establecidos principalmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS), pero, el desarrollo de una vacuna generó cambios en las estrategias de control y se descuidó el manejo de las poblaciones del vector (Rogers et al., 2006). Otra enfermedad importante transmitida por vectores en Colombia es el Zika, esta es una enfermedad febril provocada por el virus Zika (género *Flavivirus*, familia Flaviviridae) que se transmite por la picadura de los mosquitos *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*. Durante el año 2017 se notificaron en Colombia 2.130 casos (Informe de Evento Enfermedad por Virus Zika, Colombia, 2017). La fiebre Chikungunya, que es provocada por un virus de la familia Togaviridae también es transmitida por *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus*. Esta enfermedad se propagó desde Tanzania por el continente Africano, Asia, Europa, las islas caribeñas y América. Dentro de los síntomas está la fiebre acompañada de dolores articulares y de huesos (Organización Mundial de la Salud, 2020).

2.3. Estrategias de control

En la búsqueda de alternativas para disminuir estos vectores se han propuesto diferentes estrategias que ayuden en el descenso de la tasa de contagio como controles culturales y de origen químico (Ranson et al., 2008). Dentro del control cultural están la mayoría de medidas preventivas que pueden tomar los humanos y se basa en eliminar hábitats para el desarrollo de los estados acuáticos utilizando coberturas o mallas para los recipientes o tanques de almacenamiento de agua impidiendo el libre desarrollo de las larvas. Adicional a esto, se usan mallas en ventanas, toldillos y trampas para los organismos adultos (Organización Mundial de la Salud, 2022).

La OMS ha liderado en América latina diferentes programas de prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. Entre los años 1948 y 1972 hubo un notable esfuerzo para controlar las poblaciones del mosquito transmisor del dengue y se logró en 21 países. Asimismo, en 1981 se logró el control de las poblaciones de mosquitos en Cuba gracias a la aplicación de productos químicos. Sin embargo, debido a la falta de continuidad de los programas, las poblaciones se restablecieron y aumentaron, presentando brotes epidémicos e incluso resistencia en los vectores (Brathwaite et al., 2012).

Dentro de las alternativas más utilizadas están los insecticidas de origen sintético, lo cual ha resultado ser efectivo, sin embargo, su uso indiscriminado ha causado que los insectos desarrollen resistencia. Las principales clases de insecticidas son los organofosforados, los carbamatos y los piretroides (Van Den Berg, 2012). La amplia utilización de estos agentes sintéticos no solo afecta la salud humana (Bassil et al., 2007), ya que estos plaguicidas pueden metabolizarse, almacenarse o bioacumularse en la grasa corporal y pueden generar daños gastrointestinales, neurológicos, respiratorios y reproductivos (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016), sino también la salud de los ecosistemas, por lo que las consecuencias ecológicas del uso de insecticidas causan gran preocupación, ya que no son específicos al controlar el insecto de interés, sino también en organismos que no son su objetivo (Devine et al., 2008). Dado lo anterior, se han desarrollado métodos alternativos para el control de enfermedades y estos se han implementado en el manejo integrado de vectores.

2.4. Manejo integrado de vectores

El manejo integrado de vectores está basado en la combinación de medidas de control, ya sea químicas como el uso de insecticidas, físicas y culturales como el uso de toldillos o la educación preventiva, siendo dirigidas a combatir los vectores. Desafortunadamente en Colombia y en la mayoría de los países de la región, se ha avanzado de forma lenta; esto en parte a inconvenientes con la aplicación sostenida en el control empírico vectorial, que es una herramienta fundamental de control, la ausencia de acciones de prevención y la creencia de que la aplicación de insecticidas es la única solución a las epidemias (Padilla, 2017). Dentro del manejo integrado de vectores está el control biológico.

2.5. Control biológico

El control biológico consiste en la acción de parásitos, patógenos o depredadores para mantener las poblaciones de otras especies a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia, es una forma de control denso dependiente, los enemigos naturales se incrementan y destruyen un gran porcentaje de la población; es la manipulación de los enemigos naturales de las plagas por parte del hombre para lograr su control. Dentro de esta categoría no solo están parásitos, patógenos y depredadores, sino también fitófagos, hormonas juveniles, feromonas e incluso técnicas autocidas (Guédez et al., 2008). También se han utilizado nemátodos y virus. Los bioinsecticidas o bioplaguicidas hacen parte del control biológico y pueden ser a base de microorganismos como hongos, bacterias, oomycetes entre otros (Virginia-Padilla, 2017).

Dentro de los casos exitosos en América latina está el control de *Aleurocanthus woglumi* Ashby (mosca prieta) por el endoparasitoide solitario *Encarsia opulenta* Silvestri (Cano & Swezey, 1992), control de *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar) por el parasitoide *Cotesia flavipes* (Badilla-Fernández, 2002) y el control de *Eriosoma lanigerum* (Pulgón lanigero de la manzana) por el microhimenóptero *Aphelinus mali* Hald (Koch, 1977). Entre las ventajas de este método está el poco o nulo efecto nocivo colateral hacia otros organismos, la baja resistencia de las plagas y la ausencia de problemas con intoxicaciones y es visto como una estrategia amigable con el medio ambiente y la salud de los humanos, sin embargo, algunas de las desventajas se centran en la variabilidad de su eficiencia y la velocidad a la cual actúa, debido a factores externos como lo son la presencia de sustancias tóxicas o las condiciones meteorológicas locales (Lacey et al., 2001).

2.6. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son considerados de gran importancia dentro del control biológico por su habilidad de parasitar diferentes órdenes de insectos como Díptera, Hemiptera, Coleóptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera; atacando tanto estadios inmaduros como adultos (Schapovaloff, 2012). Algunos de los hongos más comúnmente estudiados son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* ahora (*Akhantomycetes lecanii*) (Sahayaraj & Namasivayam, 2008). Se ha reportado la patogenicidad de estos hongos sobre vectores como es el caso de *M. anisopliae* controlando *Ae. aegypti* (Carolino et al., 2014). Igualmente se ha reportado *Beauveria tenella* como patógeno natural de *Aedes sierrensis*, *Ae. Aegypti*, *Aedes hexodontus*, *Culex pipiens*, *Culex tarsalis* y *Culiseta incidens* en campo y en laboratorio (Pinnock, et al., 1973), asimismo larvas de *Aedes triseriatus* han mostrado susceptibilidad a *Tolypocladium cylindrosporum* (Nadeau & Boisvert, 1994).

También se han probado diferentes combinaciones como es el caso de *Metarhizium brunneum* y un depredador de mosquitos *Toxorhynchites brevialpis* para el control de dípteros (Alkhaibari et al., 2018). Otros de los hongos probados han sido *Pythium carolinianum* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* (Su et al., 2001), *Tolypocladium cylindrosporum* sobre varias especies de mosquitos en diferentes partes del mundo (Gardner & Pillai, 1987), el género *Isaria* sobre mosquitos adultos de *Ae. aegypti* (Ramirez et al., 2018), hongos Entomophthorales del género *Pandora* como patógenos de *cacopsylla pyri*, *Cacopsylla pyricola*, *Cacopsylla picta*, *Cacopsylla pruni*, y *Cacopsylla peregrina* (Gorg et al., 2021), además, el género *Trichoderma* spp. puede tener efectos patogénicos sobre algunos grupos de insectos.

2.7. *Trichoderma* spp.

El hongo *Trichoderma* es un género perteneciente a la familia Hypocreaceae del grupo Ascomycota que ha sido ampliamente estudiado por sus interesantes características, ya que son exitosos colonizadores de hábitats, muy buenos competidores y tienen una potente maquinaria para la descomposición de diferentes sustratos. Este género se puede encontrar tanto en sustratos en descomposición como en la rizosfera de las plantas donde puede inducir resistencia en ellas (Schuster & Schmoll, 2010). Es un hongo aeróbico, con capacidad de crecer en un

amplio rango de temperaturas, mejorando su esporulación bajo los efectos de la luz; presenta septos simples en su estado vegetativo y se reproduce asexualmente por conidios producidos por conidióforos hialinos ramificados con fiálides simples o en grupos y conidios de 3 a 5 micrómetros de diámetro (Martinez et al., 2013).

Es un grupo antagonista y es utilizado en el control biológico de enfermedades de plantas producidas por hongos (Valdés Ríos, 2014). Se ha registrado la acción de las enzimas quitinasa y β -1,3-glucanasa derivadas de este hongo en la pared celular del fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* (Corrêa et al., 2007). La maquinaria enzimática desempeña una función especial ayudando en la interacción antagonista-patógeno; en primer lugar, hay un reconocimiento del huésped, seguido de adhesión, que puede ocurrir por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina en la pared del organismo objetivo y finalmente la acción de las enzimas, como las quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* spp (Martinez et al., 2013). Este hongo puede actuar por la adhesión de las esporas a la cutícula de los insectos, partes bucales, espacios intersegmentales o incluso los espiráculos, estas germinan, penetran los tejidos y se diseminan; después de la muerte del insecto este puede crecer y esporular fuera del cuerpo (Rodríguez-González et al., 2020).

El género *Trichoderma* spp. produce metabolitos secundarios aromáticos volátiles (Geetha et al., 2003) y algunos de estos han sido evaluados para atracción de oviposición en mosquitos grávidos de *Culex quinquefasciatus*. Se comparó una fórmula de atracción de oviposición a base de *Trichoderma* spp. y un atrayente conocido y se encontró que el hongo fue más atractivo (70%) respecto al otro (30%). También *Trichoderma atroviride* ha sido expuesto a soluciones de nitratos de plata para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNP) y estas han mostrado ser eficientes en el control de larvas de primer, segundo, tercer y cuarto estadio de *Ae. aegypti*. Estas nanopartículas se incrustan en la cutícula de las larvas y causan daños que se van manifestando a lo largo de las etapas de desarrollo del insecto (Singh & Prakash, 2015). Este hongo ha sido probado en huevos, larvas y adultos de *Xylotrechus arvicola*, una importante peste de Viñedos; en este trabajo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma gamsii* lograron una mortalidad larval superior al 65,0 % y una mortalidad adulta del 87,5%. (Rodríguez-González et al., 2018). Asimismo, la actividad insecticida de *Trichoderma inhamatum* ha sido probada en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* presentando porcentajes significativos de afectación (Vallejos-Sirpa et al., 2014). Adicional a esto, *Trichoderma harzianum* mezclado con la neurotoxina espinosina se ha probado sobre el

gorgojo del trigo *Sitophilus granarius* (L.1758) potenciando así su efecto de biocontrol (Andrade-Bustamante et al., 2022).

3. Planteamiento del problema

El incremento de la población humana ha desencadenado problemas ambientales y de salud, provocando un desplazamiento de la fauna y la flora y ocasionado la proliferación de insectos perjudiciales para la salud humana; tal es el caso del mosquito *Aedes aegypti*, vector del dengue, chikungunya, fiebre amarilla y virus del sika (Maringer et al., 2017); igualmente las precarias condiciones de higiene de algunas viviendas, generan espacios para el crecimiento y la propagación de vectores, lo que ha conllevado a que las enfermedades de transmisión vectorial representen más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, provocando más de 700.000 muertes por año (Organización Mundial de la Salud, 2020). En la búsqueda de alternativas para disminuir la dispersión de estos, se han propuesto controles culturales y de origen químico, pero su uso intensivo ha favorecido la aparición de resistencia (Ranson et al., 2008). En la búsqueda de estrategias más amigables con el ambiente y la salud humana algunos hongos entomopatógenos se han reportados como efectivos contra los insectos vectores; cómo es el caso de *Beauveria bassiana* sobre *Triatoma infestans* principal vector doméstico de *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas (Forlani, 2014). En Colombia no se reporta un gran número de investigaciones en el biocontrol de insectos vectores a partir de hongos y teniendo en cuenta que este país es un territorio biodiverso, genera expectativas en el ámbito de la bioprospección, por lo cual se han generado proyectos como el de la Universidad de Antioquia y la Universidad Libre, donde se busca realizar la bioprospección de hongos cómo biocontroladores de *Ae. aegypti* en 3 zonas endémicas (La Virginia, Turbo y Nuquí) y así obtener diferentes aislados con potencial biocontrolador. Este proyecto pretende evaluar la patogenicidad de 4 aislamientos de hongos muestreados en la región de Nuquí (Chocó) sobre estadios larvales de *Ae. aegypti* en laboratorio.

4. Hipótesis

4.1. Nula: no hay diferencias significativas en la patogenicidad de los hongos en larvas de *Aedes aegypti*.

4.1.1. Alterna: si los hongos entomopatógenos tienen diferente porcentaje y tiempo de afectación, entonces, habrá diferencias significativas en la patogenicidad sobre larvas de *Aedes aegypti*.

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la patogenicidad *in vitro* de aislamientos de hongos del municipio Nuquí sobre estadios larvales de *Aedes aegypti*.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad patogénica *in vitro* de los hongos sobre etapas larvales L2-L3 de *Ae. aegypti*
2. Determinar la concentración letal 50 (CL50) del aislamiento más patogénico sobre etapas larvales L2-L3 de *Ae. aegypti*.
3. Determinar el tiempo letal 50 (TL50) del aislamiento más patogénico sobre etapas larvales L2-L3 de *Ae. aegypti*.

6. Materiales y métodos

6.1. Población de *Ae. Aegypti*

La población de *Ae. Aegypti* fue proporcionada por una colonia de cría, sostenida por el grupo FITOBIOL en las instalaciones del laboratorio de entomología médica de la facultad de medicina de la Universidad de Antioquia, donde periódicamente se hace extracción de los huevos producidos por las hembras.



Figura 5. Jaulas para la cría de mosquitos (Foto por Dairon Machado).

6.2. Eclosión de los huevos y mantenimiento de las larvas

Para la obtención de las larvas se dispusieron tiras de papel con huevos de *Ae. Aegypti* de 1 a 3 meses de extraídos de las jaulas, en un recipiente con agua destilada estéril y algunos granos de alimento para peces (figura 6). Una vez eclosionados, las tiras de papel fueron retiradas y en el transcurso de los días se agregan más granos de alimento. El agua estuvo a temperatura ambiente de Medellín y se ajustó a pH 7. Las larvas se mantuvieron en el laboratorio del grupo FITOBIOL ubicado en la Universidad de Antioquía entre 4 y 6 días hasta que las larvas llegaron a estadio L2-L3 donde estuvieron listas para los ensayos; las que no alcanzaron dicha etapa fueron descartadas en alcohol al 70%.



Figura 6. Recipiente para eclosión de los huevos y desarrollo de las larvas (23 x 37 cm) (Foto por Yisel Gómez).

6.3. Aislamientos de los hongos

Los hongos fueron aislados en el municipio de Nuquí (Chocó) bajo el proyecto “Bioprospección de Oomycota y Hongos como biocontroladores de *Aedes aegypti*. En tres zonas endémicas y evaluación de protocolos para su producción masiva en fermentación líquida mediante tanque agitado”. Este aislamiento fue llevado a cabo por el grupo de investigación FITOBIOL (Fitopatología y Biotecnología de Hongos) de la Universidad de Antioquía. Los hongos fueron tomados de zonas urbanas cerca al malecón, estadio y hospital de Nuquí entre el 16 y 18 de septiembre de 2021.

6.4. Selección de los hongos

Para la selección de los hongos se realizaron observaciones microscópicas para identificar algunas estructuras y características, así como algunos ensayos preliminares de

patogenicidad para observar el comportamiento de estos. Se escogieron 4 aislamientos del género *Trichoderma* debido a su rápido crecimiento, su facilidad para desarrollarse en diferentes medios y a su alta esporulación. En este trabajo se nombran como ENA1, ENA2, M1A5 y HNA1. La inicial de cada nombre se refiere al sitio de donde fueron aislados (estadio, malecón y hospital).

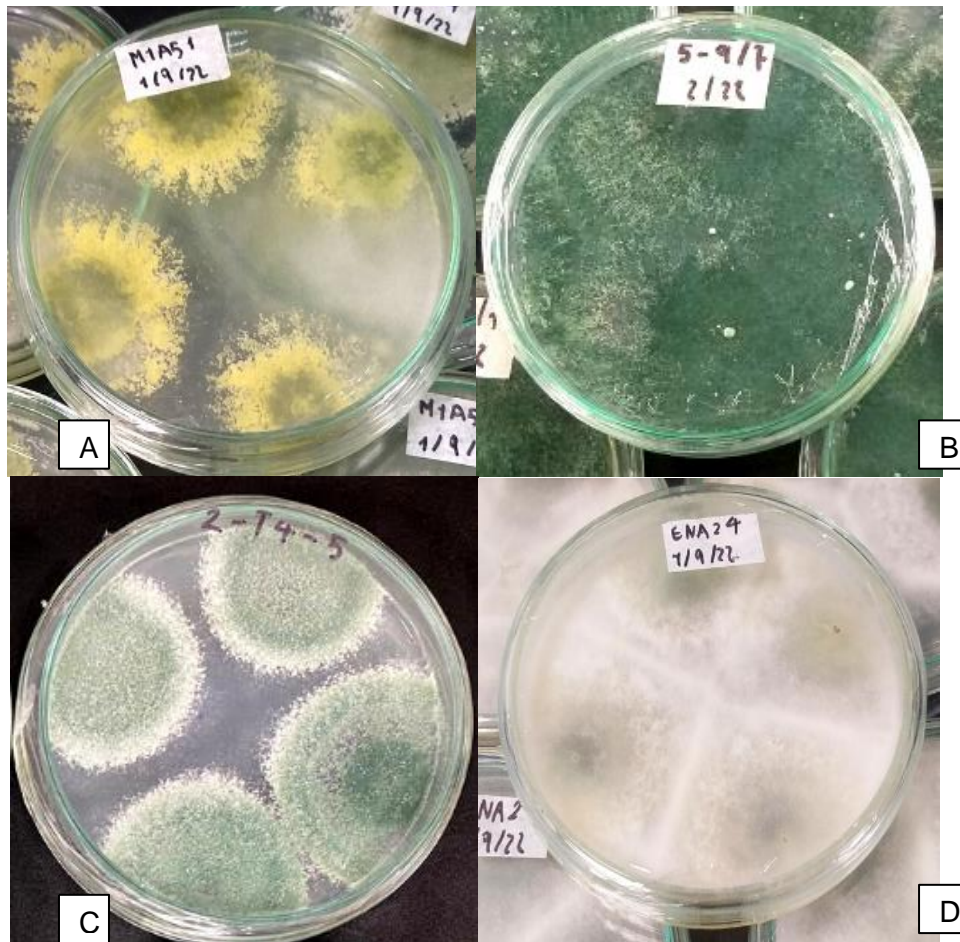


Figura 7. Crecimiento macroscópico de los hongos. A). M1A5, B). ENA1, C). HNA1 y D). ENA2 (Foto por Yisel Gómez).

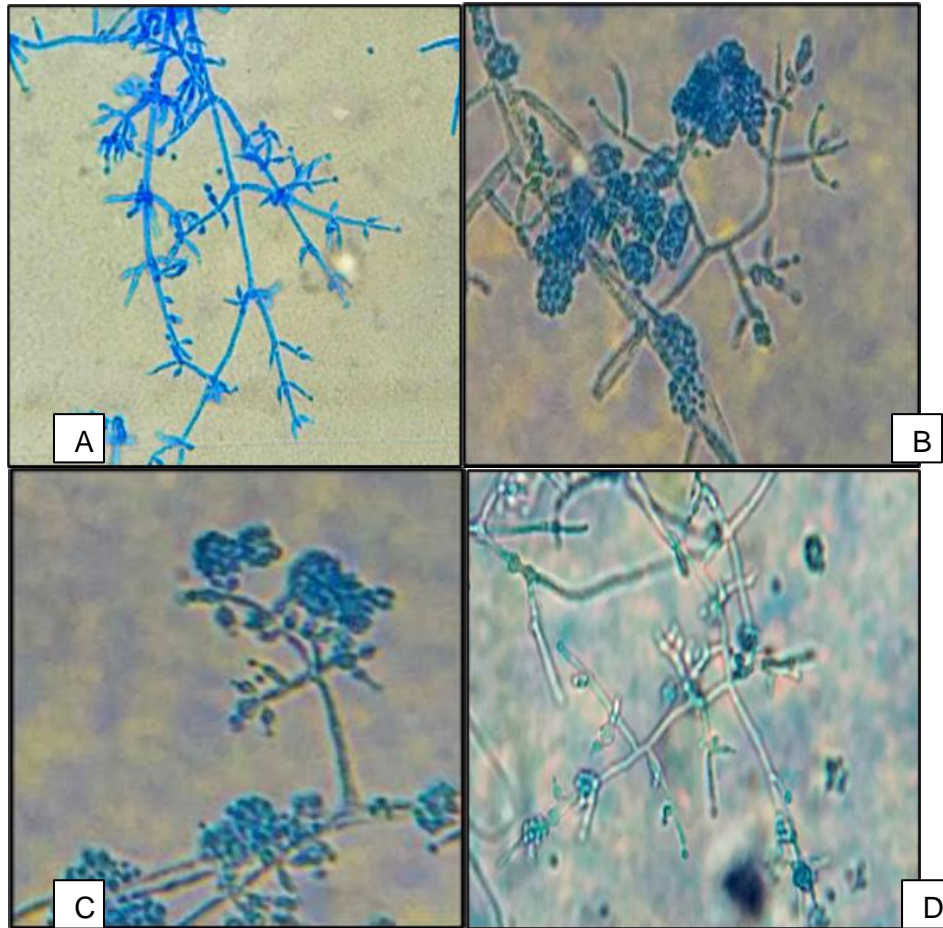


Figura 8. Observaciones microscópicas de los hongos (40 X). A). MIA5, B). ENA1, C). HNA1, D). ENA2 (Foto por Yisel Gómez).

6.5. Cultivo de los hongos

Los aislamientos seleccionados se cultivaron en arroz (Cenicafé, 2006), en botellas de vidrio de 250 ml aproximadamente, con 50 g de arroz, 25 ml de agua destilada estéril (ADE) y 18 microlitros de ácido láctico para evitar el crecimiento de bacterias (figura 9). Las botellas con el arroz se esterilizaron al igual que los tapones de gasa con los que se cerraron las botellas. El inóculo se preparó a partir de los aislamientos fúngicos mantenidos en papa dextrosa agar (PDA); se tomaron 5 bocados de aproximadamente 1.5 cm de cada hongo y se depositaron en tubos falcon con 15 ml de ADE/Tween-20 (0,1) % para posteriormente tomar 5 o 6 ml e inocular el arroz por medio de una micropipeta. Para observar esporulación los hongos se dejaron en crecimiento aproximadamente 7 días con luz constante en los primeros 3 días.



Figura 9. Cultivo de los hongos en arroz. Cada hongo fue cultivado por duplicado (Foto por Yisel Gómez).

6.6. Producción del inóculo

Pasados 7 días a cada botella se le añadieron aproximadamente 100 ml de ADE/Tween-20 (0.1%) y con la ayuda de palos de madera estériles (30 x 1 cm), se agito el arroz para suspender el cultivo con el fin de separar los conidios; luego, el contenido de las botellas fue filtrado en un recipiente de vidrio estéril por medio de una gasa, descartando el micelio y reservando la fase acuosa con los conidios, obteniendo así la solución madre para cada uno de los hongos; posteriormente, se realizaron diluciones seriadas, llevando cada aislamiento a un factor de dilución de $\frac{1}{1000}$ y luego de esto, se leyó la concentración por medio de la cámara de Neubauer. Después de observar en la cámara, se decidió utilizar una concentración de 1×10^7 con/ml en los ensayos de patogenicidad. Esta concentración ha sido anteriormente reportada por diferentes autores en bibliografía revisada (Ardila-Ríos, 2013), (Marín & Bustillo, 2002).



Figura 10. Montaje para la producción del inóculo. (Foto por Yisel Gómez).

Objetivo 1

6.7. Prueba de patogenicidad

Con el fin de evaluar el objetivo 1 los tratamientos de esta prueba consistieron en 4 hongos (ENA1, ENA2, M1A5 y HNA1) a una concentración de 1×10^7 con/ml y 2 controles, uno consistía en ADE y el otro en ADE/Tween-20 (0.1%). Cada tratamiento tenía 5 repeticiones y esta prueba se realizó 2 veces en el tiempo. La unidad experimental evaluada fueron 20 larvas en estadio L2-L3 de *Ae. Aegypti* en un vaso transparente con un volumen final de 50 ml del respectivo tratamiento (figura 11). Los vasos fueron cubiertos con velo suizo, se aseguraron con un resorte plástico y fueron distribuidos de manera aleatoria. Se hicieron lecturas de afectación larval a las 24, 48 y 72 horas hasta observar el paso de las larvas a pupas. Las larvas fueron alimentadas con alimento para peces 2 veces durante todo el experimento. Esta prueba fue llevada a cabo del 1 al 6 de julio de 2022 y del 28 de agosto al 2 de septiembre de 2022.



Figura 11. Montaje para la prueba de patogenicidad (Foto por Yisel Gómez).

6.8. Verificación de agentes causales por medio de pruebas de Koch

La verificación de los agentes causales se hizo por medio de observación de las larvas al estereoscopio buscando deformidades morfológicas, melanización, hinchamiento y crecimiento del hongo en el cuerpo de las larvas; adicional a esto, 4 de las larvas muertas por repetición se sembraron en PDA. Después de aproximadamente 6 días se verificó el crecimiento macroscópico del hongo. Por último, se realizaron placas de los hongos con azul de lactofenol y se observaron las estructuras al microscopio con el fin de evidenciar si el hongo que se aplicó fue el agente causal y de esta manera comprobar los postulados.

Objetivo 2

6.9. Prueba de concentración letal 50 (CL50)

Con el fin de hallar la concentración letal 50 se utilizó la cepa ENA1, la cual presentó mayor actividad contra las larvas en la prueba de patogenicidad. Dentro de los tratamientos se evaluaron 5 concentraciones: 1×10^7 , 3×10^7 , 6×10^7 , 9×10^7 y 1×10^8 con/ml y 2 controles, uno con ADE y el otro ADE/Tween-20 (0.1%). Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones y el experimento se realizó 2 veces en el tiempo. La unidad experimental evaluada fueron 20 larvas en estadio L2-L3 en un vaso transparente con un volumen final de 50 ml del respectivo tratamiento. Los vasos fueron cubiertos con velo suizo, se aseguraron con un resorte plástico y fueron distribuidos de manera aleatoria. Se hizo lectura de la afectación larval a las 24 y 48 horas y las larvas fueron alimentadas una vez durante todo el experimento. Esta prueba fue llevada a cabo del 9 al 11 y del 28 al 30 de noviembre de 2022.

Objetivo 3

6.10. Prueba de tiempo letal 50 (TL50)

Para hallar el tiempo letal 50 se utilizó nuevamente la cepa ENA1. El tratamiento consistió en una concentración de 1×10^8 con/ml, debido a que esta presentó el mayor porcentaje de afectación larval en el experimento de concentración letal 50. Adicional a esto, se usaron 2 controles, uno con ADE y el otro ADE/Tween-20 (0.1%). En total hubo 20 repeticiones y se evaluaron 4 de estas cada 8 horas al igual que los controles, el experimento se realizó 2 veces en el tiempo. La unidad experimental fueron 10 larvas en estadio L2-L3 en un vaso transparente con un volumen final de 50 ml del respectivo tratamiento. Los vasos fueron cubiertos con velo suizo, se aseguraron con un resorte plástico y fueron distribuidos de manera aleatoria. Se realizó lectura de afectación larval cada 8 horas en un periodo de tiempo de 40 horas (5 lecturas). Las larvas fueron alimentadas una vez durante todo el experimento. Este experimento fue llevado a cabo del 27 al 29 de enero de 2023 y del 3 al 5 de febrero de 2023.

Resumen del diseño experimental

Tabla 1. Resumen del diseño experimental de las 3 pruebas.

Prueba	Unidad experimental	Tiempo de lectura	Concentración	Réplicas y repeticiones
Prueba de patogenicidad	1 vaso, 50 ml de tratamiento, 20 larvas	24, 48 y 72 h	1×10^7 con/ml	2 repli, 5 rep por tratamiento
CL50	1 vaso, 50 ml de tratamiento, 20 larvas	24 y 48 h	1×10^7 , 3×10^7 , 6×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 con/ml	2 repli, 5 rep por tratamiento
TL50	1 vaso, 50 ml de tratamiento, 10 larvas	5 lecturas, una cada 8 h	1×10^8 con/ml	2 repli, 4 rep por tratamiento

En cada unidad experimental se identificaron y se contabilizaron las larvas afectadas y sanas y esto para encontrar un porcentaje de afectación para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de afectados: } \frac{\text{número de individuos afectados}}{\text{Total de individuos}} \times 100$$

Este porcentaje de afectación fue la variable respuesta utilizada en todas las evaluaciones que se realizaron en este trabajo.

6.11. Análisis estadístico

Se hizo corrección de los datos con la fórmula de Abbott, citada por (Rueda-Páramo, 2015), debido a que se presentó afectación larval en los controles. Se ajustaron los datos con un modelo de regresión lineal simple y para probar si la distribución de los datos era normal se hizo una prueba de Shapiro-Wilk. Así mismo, se realizó la prueba de Levene para comprobar homocedasticidad. Como los datos no presentaron normalidad y homocedasticidad se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comprobar si habían diferencias

estadísticamente significativas entre los tratamientos. Además, se hizo un ANOVA para observar si había variabilidad entre las réplicas de cada una de las pruebas y, debido a las diferencias en los datos, se analizaron de forma independiente. Todos los análisis se hicieron por medio del software R (R Core Team, 2020).

Fórmula corrección de Abbott (Abbott, 1925):

$$\% \text{ corregido: } \frac{(\% \text{ experimento} - \% \text{ controles})}{(100 - \% \text{ controles})} \times 100$$

7. Resultados y discusión

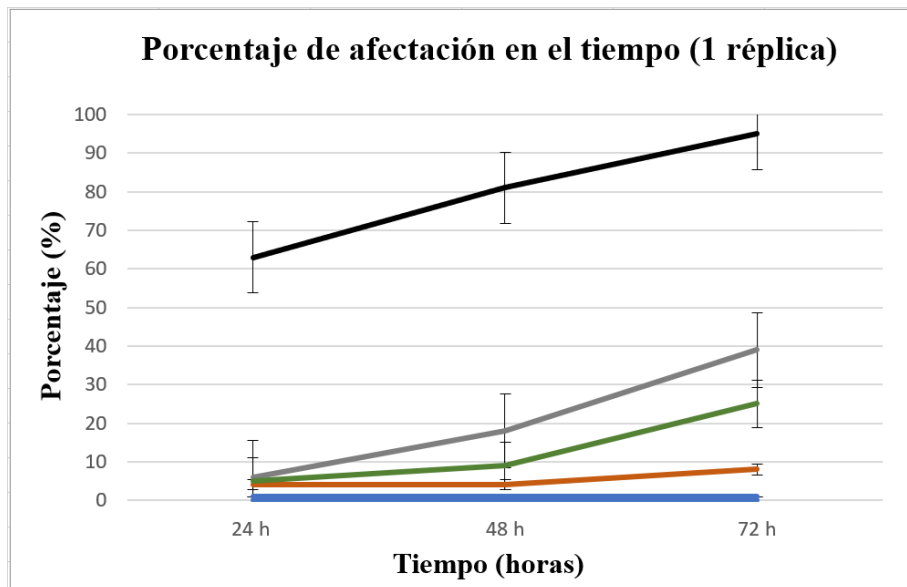
7.1. Prueba de patogenicidad

En la prueba de patogenicidad se pudo evidenciar que los 4 hongos (ENA1, ENA2, M1A5 y HNA1), presentaron afectación larval a partir de las 24 horas, aumentando a las 48 y mostrando una afectación alta a las 72 horas. Por el contrario, la mortalidad en los controles no superó el 5%, entonces, teniendo en cuenta la poca variación de los porcentajes de afectación en los controles se puede inferir que el agua destilada estéril y el agua destilada esteril/Tween-20 (0,1%) no ejercen un efecto representativo sobre las larvas, en consecuencia, las muertes pueden ser debido a eventos aleatorios o a algún daño mecánico debido a la manipulación de estas. La afectación se midió en el porcentaje de larvas muertas que tuviera cada repetición. Las larvas muertas se reconocieron por la ausencia de movilidad en presencia de un estímulo lumínico, blanqueamiento de sus cuerpos e hinchamiento, al igual que señales de crecimiento fúngico en zonas como la cabeza, tórax, segmentos del abdomen, branquias terminales e incluso en el sifón (figura 12). Por lo general, eran encontradas en el fondo del vaso y eran retiradas con la ayuda de una pipeta pasteur.



Figura 12. Observación del crecimiento del hongo en el cuerpo de las larvas (estereoscopio)
(Foto por Yisel Gómez).

Porcentaje de afectación larval en el tiempo



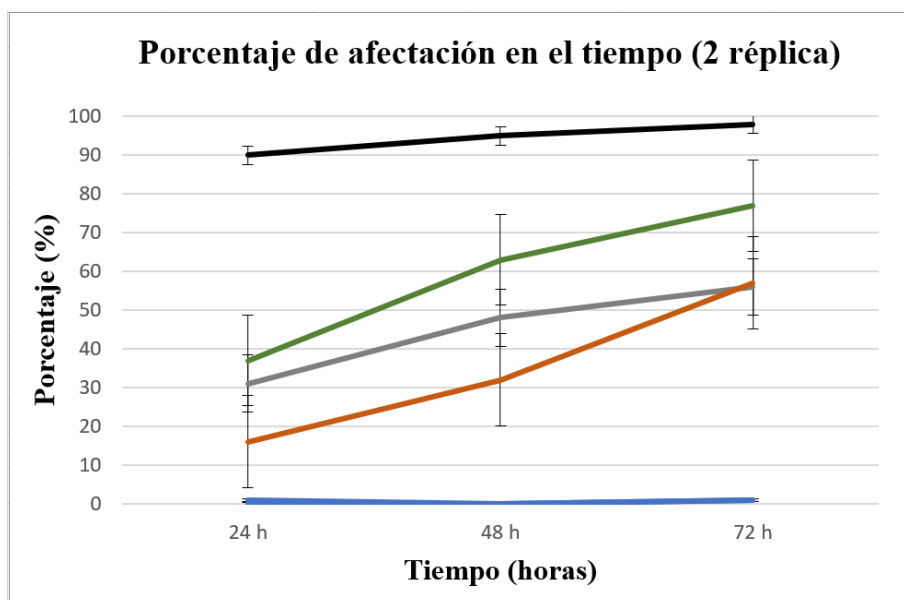


Figura 13. Porcentaje de afectación larval en el tiempo. ENA1 (negro), ENA2 (gris), HNA1 (verde), M1A5 (naranja), CONTROL (azul).

En la primera réplica el hongo ENA1 presentó el porcentaje más alto de afectación con (94,6 %), seguido de ENA2 (38 %), HNA1 (19 %) y por último, M1A5 con (7.2 %) presentando el valor más bajo de afectación. En la segunda réplica se pudo evidenciar nuevamente que ENA1 presentó mayor afectación (97,8 %), seguido de HNA1 con (76%), ENA2 (55%) y M1A5 (56%). Siguiendo los resultados de las 2 réplicas, el hongo ENA1 tendió a presentar los valores más altos de afectación, diferente a ENA2 que se mantuvo con niveles medios y siempre por debajo de ENA1. A pesar de que el aislamiento HNA1 presentó un porcentaje alto en la segunda réplica, también se mantuvo por debajo de los porcentajes de ENA1. El hongo M1A5 fue el aislamiento que presentó valores más bajos de afectación larval. Las réplicas se tomaron por separado debido a que entre estas se presentaban diferencias estadísticas al analizar por un anova factorial. Sin embargo, en las 2 réplicas el hongo ENA1 generó mayor porcentaje de mortalidad, razón por la que se escogió para los análisis de CL50 y TL50.

Siguiendo los postulados de Koch, el crecimiento de los hongos a partir de las larvas se pudo observar aproximadamente a los 3 o 4 días y la esporulación a los 7 días, indicada por el color verde que es característico del género *Trichoderma*. Los aislamientos se diferenciaban por su forma característica de crecimiento, las diferentes tonalidades del verde, la influencia sobre el medio de cultivo y el tiempo que tardaban en esporular, siendo ENA2 el que requería

más tiempo. La identificación microscópica del género se hizo a partir de las estructuras asexuales que son los conidióforos, evidenciando la presencia de múltiples conidios.

El porcentaje de afectación de los datos no exhibió una distribución normal, por lo tanto, se realizó un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis. Con un valor- $p < 0.05$ en la primera réplica se obtuvo (0.00008472), entonces, se determina que si hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Para la segunda réplica se obtuvo (0.000061), presentando también diferencias estadísticamente significativas.

Porcentaje de afectación prueba de patogenicidad

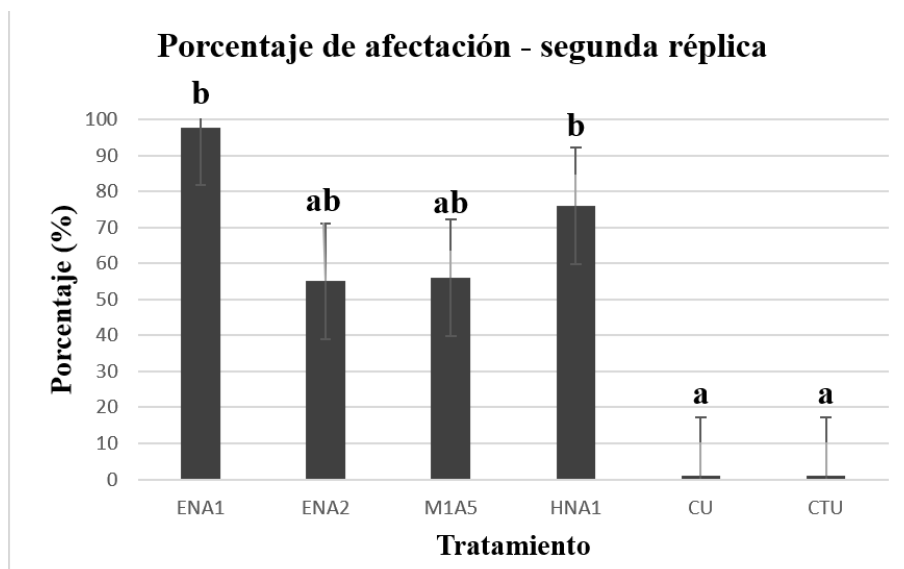
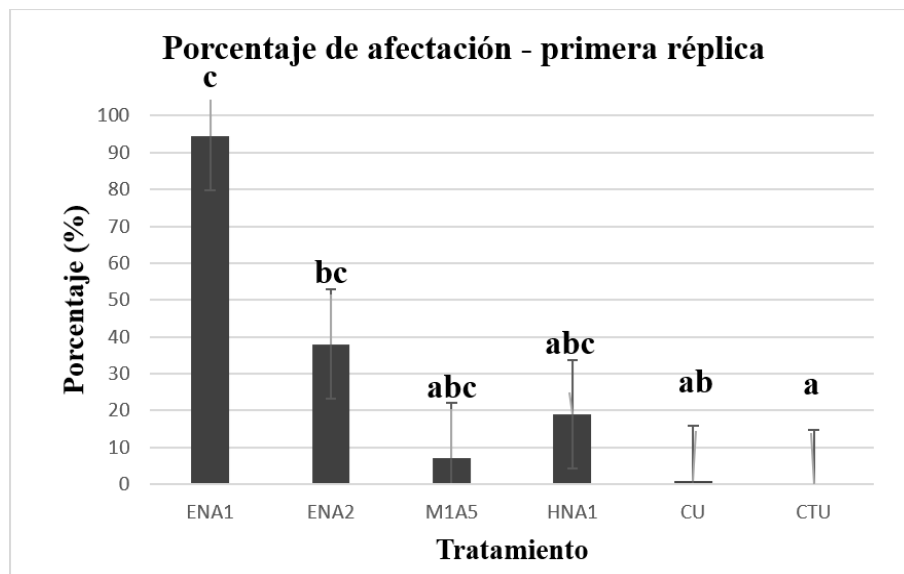


Figura 14. Prueba de patogenicidad. Análisis no paramétrico de Kruskal-wallis, letras diferentes muestran diferencias estadísticas.

En los últimos años muchos investigadores se han interesado por buscar productos extraídos de organismos como plantas, hongos y bacterias, como alternativa al uso de insecticidas químicos para su implementación en el manejo integrado de plagas. Los hongos han demostrado tener potencial insecticida y larvicida y podrían ser usados como bioplaguicidas. Lo ventajoso de utilizar microorganismos como bioplaguicidas es su fácil descomposición en el ecosistema y en el caso de este trabajo, al ser los aislamientos endémicos del lugar es probable que su toxicidad sea selectiva y no interfiera en el equilibrio del ecosistema. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. podrían estar produciendo proteasas y quitinasas que destruyen las membranas de las larvas o sustancias que se difunden de manera intercelular y destruyen los componentes celulares, sin embargo, esto corresponde a otra fase de investigación, limitando este estudio al potencial patogénico que tiene el hongo en general sobre las larvas del díptero.

Dentro de los reportes existentes de *Trichoderma* spp. como entomopatógeno está *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma viride*; estos han sido probados sobre larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio y han encontrado que los metabolitos secundarios extracelulares tienen un efecto de toxicidad sobre las larvas L3 del díptero, encontrando porcentaje considerables de afectación al igual que los obtenidos en este trabajo (Perera et al., 2023). La especie *Trichoderma asperellum* también ha sido probada sobre *Ae. Aegypti* y, gracias a la acción de los peptaiboles, que son péptidos que pueden inducir citotoxicidad e incluso apoptosis, después de 60 horas de exposición el 80% de las larvas estaban muertas (da Silveira et al., 2019), igual que el efecto producido por el hongo ENA1. La especie *Trichoderma asperellum* también ha llamado la atención por la acción de enzimas quitinolíticas en la cutícula larvaria de este díptero, generando la muerte del 100% de las larvas después de 72h, siendo estos resultados concordantes con los obtenidos en este trabajo, debido a que, después de las 72 horas, el 100% de las larvas murieron para el hongo ENA1 (da Silveira et al., 2017).

Otro caso interesante es la evaluación de la actividad larvicida de hongos nativos de México sobre *Ae. aegypti*. *Trichoderma longibrachiatum* causó mortalidad del 100% de las larvas a las 24 horas con una concentración de 1×10^8 con/ml, siendo el aislamiento más virulento en comparación con *Aspergillus aculeatus* y *Metarhizium anisopliae.*, demostrando

así, el alto potencial patogénico que tiene el género *Trichoderma* (Cisneros-Vásquez et al., 2023), o el reportado en un estudio en la Amazonia donde se sometieron larvas de *Ae. aegypti* a diferentes aislamientos. *Trichoderma atroviride* obtuvo porcentajes de mortalidad de 83,3 % a las 24 h, 93,3 % a las 48h y 96,6 % a las 72 horas a una concentración de 500 µg/ml, siendo el comportamiento de este aislamiento comparable con los obtenidos para las diferentes cepas en este trabajo (De Oliveira et al., 2021). Estos resultados apuntan a un potencial uso biotecnológico de moléculas bioactivas o productos derivados de los hongos para el control de vectores, generando efectos tóxicos en algunos dípteros.

7.2. Prueba de concentración letal 50 (CL50)

La prueba de concentración letal 50 realizada dos veces en el tiempo fue leída a las 48 horas. En el primer ensayo la concentración 1×10^7 con/ml obtuvo (11%) de afectación, seguido de 3×10^7 (69%), 6×10^7 (73%), 9×10^7 (90%) y 1×10^8 con/ml (99%) (tabla 2). En el segundo ensayo la concentración 1×10^7 con/ml obtuvo (15%) de afectación, seguido de 3×10^7 (76,5 %), 6×10^7 (83,5 %), 9×10^7 (93%) y 1×10^8 con/ml (99,5 %) (tabla 3). La mortalidad de las larvas se relacionó con el aumento de la concentración de conidios en los tratamientos evaluados, entonces, a mayor concentración mayor fue el porcentaje de afectación. Las larvas en estos tratamientos mostraban hinchamiento, blanqueamiento, pérdida de movilidad y el crecimiento del hongo en sus estructuras. A diferencia de esto, las larvas en los controles no presentaron ningún signo de afectación.

Porcentaje de afectación de las diferentes concentraciones de ENA1 sobre *Aedes aegypti*

Tabla 2. Porcentaje de afectación de las diferentes concentraciones para la primera réplica.

Concentración (con/ml)	Porcentaje
1 x 10 ⁷	11 %
3 x 10 ⁷	69 %
6 x 10 ⁷	73 %
9 x 10 ⁷	90 %
1 x 10 ⁸	99 %

Tabla 3. Porcentaje de afectación de las diferentes concentraciones para la segunda réplica. .

Concentración (con/ml)	Porcentaje
1 x 10 ⁷	15 %
3 x 10 ⁷	76.5 %
6 x 10 ⁷	83.5 %
9 x 10 ⁷	93 %
1 x 10 ⁸	99.5 %

Porcentaje de afectación prueba concentración letal 50

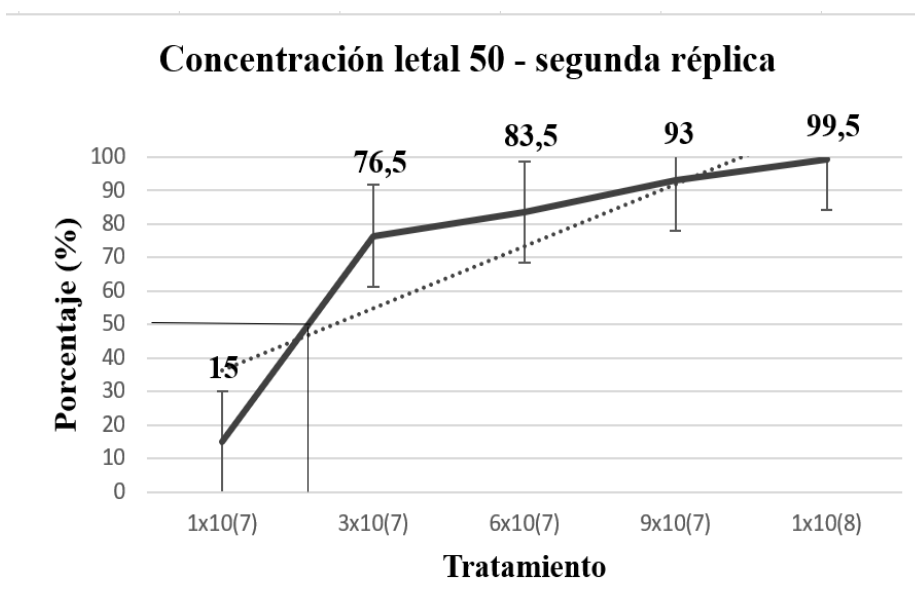
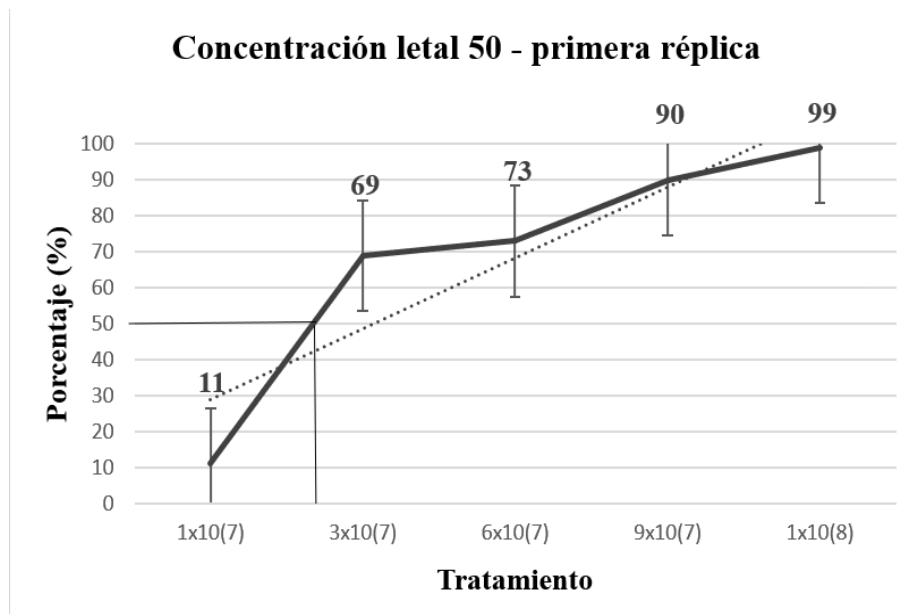


Figura 15. Porcentaje de afectación larval por las diferentes concentraciones para la primera y segunda réplica

En la figura 15 se puede observar que ambas réplicas tienen un crecimiento exponencial, mostrando porcentajes de afectación bajos para la concentración más baja y un incremento considerable para la segunda concentración. Después de esto, el crecimiento de la gráfica se hace constante, aumentando el porcentaje de afectación a medida que aumenta la concentración.

Mediante un análisis probit con un intervalo de confianza del 95% en el programa R se obtuvieron las concentraciones letales medias (CL50) para las 2 réplicas en el tiempo. Para la

primera réplica la CL50 fue 2.4628×10^7 con/ml y para la segunda réplica fue 1.0450×10^7 con/ml. A pesar de que estas concentraciones letales medias son altas comparadas con concentraciones reportadas en la literatura, como por ejemplo, CL50 de $1,17 \times 10^4$ con/ml de *Metarhizium rileyi* (anteriormente *Nomuraea rileyi*) para el control de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Espinell et al., 2014); CL50 de $9,0 \times 10^6$ con/ml de *Beauveria bassiana* para el control de larvas de *Diatraea saccharalis* (García et al., 2018) o CL50 de $3,5 \times 10^5$ con/ml y $6,8 \times 10^6$ con/ml de *B. bassiana* sobre larvas de *Duponchelia fovealis* (Baja et al., 2020); este aislamiento tarda muy poco tiempo en actuar, mostrando resultados incluso a las 24 horas con porcentajes muy altos de afectación.

Al igual que en este trabajo, otros estudios han reportado CL50 altas, como por ejemplo el obtenido en un estudio en Colombia con *Verticillium lecanii* sobre huevos próximos a eclosionar de *Aleurotrachelus socialis*, reportando una CL50 de $1,4 \times 10^7$ con/ml (Alean-C et al., 2004) e incluso mayores como el reportado para el género *Isaria* en un estudio para el control de la broca del café donde se obtuvo $0,11 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹ (Lezcano-B et al., 2015) o las concentraciones 2.0×10^8 , 1.7×10^{10} y 8.0×10^9 con/ml para 3 cepas de *Beauveria bassiana* para el control de *Conotrachelus dimidiatus* (Cerna-Chávez et al., 2021). *Trichoderma* spp. no solo ha sido probado para el control de *Ae. Aegypti* sino también para el control de mosquitos del género *Anopheles* (vector de la malaria), presentado actividad larvicida; *Trichoderma asperellus* mostró valores de CL50 de $2,68 \times 10^7$ con/ml y TL50 de 12,33 horas (Podder & Ghosh, 2019).

Concentración letal 50

Tabla 4. Concentración letal 50 de ENA1 sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Réplica	CL50
Primera	2.462×10^7 con/ml
Segunda	1.0450×10^7 con/ml

7.3 Prueba de tiempo letal 50 (TL50)

Para la prueba tiempo letal 50 realizada dos veces en el tiempo se hicieron 5 lecturas, una cada 8 horas. En el primer ensayo a las 8 horas se obtuvo (45%) de afectación, a las 16 horas (72,5%), a las 24 horas (90 %), a las 32 horas (95%) y a las 40 horas (97,5%). En el segundo ensayo a las 8 horas se obtuvo (47,5%) , a las 16 horas (67,5%), a las 24 horas (80%), a las 32 horas (92,5%) y a las 40 horas (100%) de afectación.

Porcentaje de afectación en los diferentes tiempos de ENA1 sobre *Aedes aegypti*

Tabla 5. Porcentaje de afectación en los diferentes tiempos

Tiempo (horas)	Porcentaje
8	46,25 %
16	70 %
24	85 %
32	93,75 %
40	98,75 %

Con las dos réplicas se realizó un análisis en bloque mediante el programa R, donde el bloque era el tiempo; al no encontrar diferencias significativas en las varianzas entre ambos experimentos, los datos se tomaron en conjunto y se unieron para los análisis. Mediante un

análisis probit con un intervalo de confianza del 95% se obtuvo el tiempo letales medio (TL50) 9.45 horas (figura 16).

Porcentaje de afectación prueba de tiempo letal 50

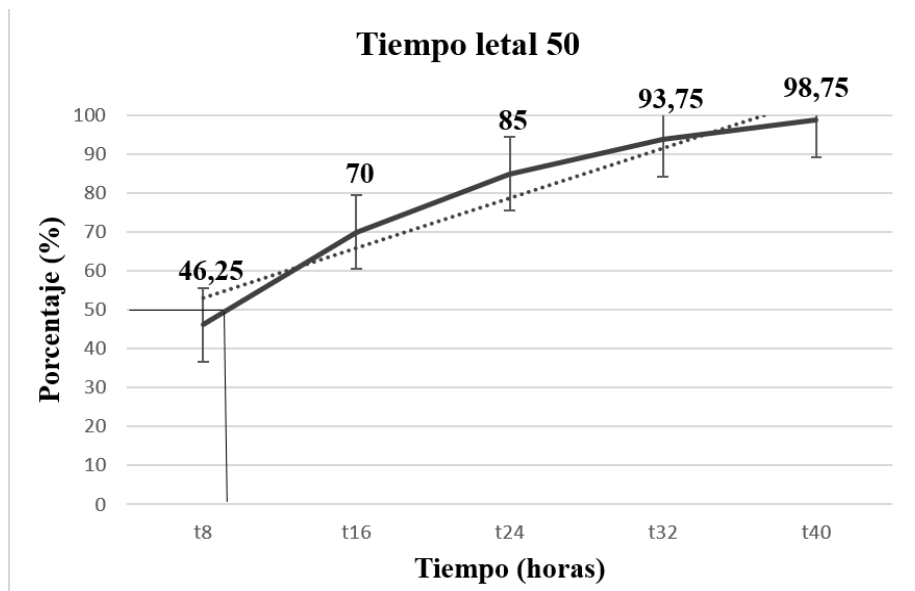


Figura 16. Porcentaje de afectación larval en los diferentes tiempos.

Según lo reportado en la literatura, 9.45 horas es una fracción de tiempo muy corta para que el 50% de las larvas de *Ae. aegypti* mueran. Esto podría ser ventajoso en el momento de pensar en generar un bioformulado, ya que, entre menos tiempo se demore en actuar, más rápido será el proceso de control del organismo de interés. Por ejemplo, para *Beauveria bassiana* se ha reportado un TL50 de 4.7 días - 9.8 días para el control de *Premnotrypes vorax* (gusano blanco de la papa) (Rivera & Pinto, 2001); o de 7 días para controlar el 50% de la población de larvas de *Ae. Aegypti* (Rebaza-Sánchez et al., 2020); asimismo, se encontró que se necesita un TL50 de entre 6 a 7 días para el control del mosquito *Ae. Aegypti* por parte de diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* aisladas de Buenos Aires, Argentina (Falvo et al., 2019).

Para el control de este díptero no solo han sido probados hongos, sino también diferentes grupos de plantas y otros microorganismos, como es el caso de *Bacillus thuringiensis*, bacteria que produce delta-endotoxinas con alto efecto tóxico sobre las larvas de *Ae. Aegypti*, sin embargo, esta bacteria necesita un tiempo letal medio de 72 horas para obtener una tasa de

mortalidad del 57% de las larvas (López-Ordoñez & Marroquín, 2015), diferente al tiempo letal medio obtenido para ENA1, que es mucho más bajo que este.

A pesar de que el aislamiento ENA1 necesita una dosis letal media por encima de 1×10^7 con/ml (figura 15), es importante considerar que necesita menos de 10 horas para controlar el 50% de la población de interés de *Ae. Aegypti*. Esta acción acelerada podría ser importante en el momento de implementar un plan de control que requiera resultados rápidos. Estos resultados son importantes ya que, es prioritario ampliar el espectro de estrategias de control vectorial a ser utilizadas. Por lo tanto, se sugiere que ENA1 es potencial biocontrolador y tras más estudios, podría ser utilizado en reservorios de agua urbanos como tanques de agua, llantas usadas, etc., además de acompañar a las estrategias vectoriales dirigidas a controlar los estadios adultos del vector del dengue.

8. Conclusiones

Los aislamientos fúngicos del género *Trichoderma* sp. tomados de Nuquí (Chocó) tiene potencial patogénico sobre las larvas de *Aedes aegypti*. Los 4 aislamientos probados ENA1, ENA2, M1A5 y HNA1 presentaron diferencias en el porcentaje de afectación siendo el hongo ENA1 el más patogénico. En la determinación de la concentración letal 50 se exhibieron concentraciones de 2.4628×10^7 con/ml y 1.0450×10^7 con/ml y para el tiempo letal 50 se obtuvo 9.45100 horas. Las concentraciones alcanzadas son un poco altas en comparación con la literatura, sin embargo, el TL50 es muy bajo, necesitando poco tiempo para que el 50% de la población de interés muera. Una próxima etapa de este trabajo sería hacer identificación y extracción de los metabolitos que son tóxicos para las larvas de este díptero y así identificar el agente causal de la mortalidad.

9. Recomendaciones

En el protocolo de eclosión de los huevos es importante la temperatura y el pH del agua, ya que al utilizar pH por debajo de 5, los huevos se demoran en eclosionar y las larvas tienen crecimientos más lentos, adicional a esto, al pasar por diferentes periodos de lluvia y sequía

durante el año en el trópico, en las temporadas más frías los huevos tardan más en eclosionar, razón por la cual se recomienda someter a incubación. También es importante mencionar que una vez los huevos son retirados de la colonia de cría van perdiendo viabilidad con el paso del tiempo. Otro factor determinante es la concentración de inóculo en el porcentaje de mortalidad de las pruebas, siendo concentraciones menores a 1×10^6 con/ml menos efectivas, causando poco o nulo efecto en las larvas. La alimentación larval es igual de importante, ya que en ausencia de alimento, se cree que las larvas tienden a cometer canibalismo; así mismo, la manipulación de estas debe hacerse con cuidado debido a que se pueden generar muertes por daño mecánico.

10. Referencias bibliográficas

- Abbott, W. S. (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18 (2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- Alamri, S., Mostafa, Y. S., Hashem, M., & Alrumman, S. (2016). Enhancing the biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* JF419706 through cell wall degrading enzyme production. *Int. J. Agric. Biol*, 18, 765–772. 10.17957/IJAB/15.0164.
- Alean-C, Irina., Morales-R, Anuar., Holguín-A, C. M., & Bellotti-C, Anthony. (2004). Patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 29-36. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01200488200400010005&lng=en&tlng=es.
- Alkhaibari, A. M., Maffeis, T., Bull, J. C., & Butt, T. M. (2018). Combined use of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, and the mosquito predator, *Toxorhynchites brevipalpis*, for control of mosquito larvae: Is this a risky biocontrol strategy? *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 38-50. 10.1016/j.jip.2018.02.003.
- Andrade-Bustamante, G., Suárez-Hernández, A. M., Aispuro-Hernández, E., & Martínez-Ruiz, F. E. (2022). *Trichoderma harzianum* y espinosina en el control de gorgojo del trigo *Sitophilus granarius* (L. 1758). *Biotecnia*, 25(1), 94–99. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1819>.

- Ardila-Ríos, Y. P. (2013). *Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre Eurhizococcus colombianus Jakubski (Hemiptera: Margarodidae), plaga de Mora (Rubus glaucus Benth)*. (Doctoral dissertation).
- Badilla-Fernández, F. (2002). Un programa exitoso de control biológico de insectos plaga de la caña de azúcar en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 64, 77-87.
- Baja, F., Poitevin, C.G., Araujo, E.S., Mirás-Avalos, J. M., Zawadneak M. A. C., & Pimentel, I. C. (2020). Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). *Crop Protection*, 138, 1-9.
- Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., & Kerr, K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides. *Canadian Family Physician*, 53(10), 1705-1711. <https://mayoclinic.pure.elsevier.com/en/publications/cancer-health-effects-of-pesticides-systematic-review>.
- Bello-García, F. J., Ospina de Dulce, B., Giraldo-Rios, A., & Duque-Beltran, S. (1987). Comparación citogenética de dos poblaciones de *Aedes aegypti* en Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias Universidad Javeriana*, 1(1), 11-26. <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/5043>.
- Brathwaite, D. O., San Martín, J. L., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 87, 584–593.
- Cano, E & Swezey, S. L. Control biológico de la mosca prieta (*Aleurocanthus woglumi* ASHBY) (Homoptera: Aleyrodidae) en Nicaragua. *Rev. Nica. Ent.*, 20, 41-57.
- Carolino, A. T., Paula, A. R., Silva, C. P., Butt, T. M., & Samuels, R. I. (2014). Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors*, 7(1). 10.1186/1756-3305-7-198.
- Cenicafe. (2006). Producción de los hongos comestibles orellanas y Shiitake. *Sección de Divulgación y Transferencia, Cenicafé, FNC*, 12-13.
- Cerna-Chávez, E., Lira-Ramos, K. V. De., Ochoa-Fuentes, Y. M., Delgado-Ortiz, J. C., Cepeda-Siller, M., & González-Gaona, E. (2021). Actividad de extractos de plantas y hongos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba (*Conotrachelus dimidiatus* Champion) Coleóptera: Curculionidae. *Biotecnia*, 23(1), 70-76. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.1335>

- Cisneros-Vázquez, L.A., Penilla-Navarro, R. P., Rodríguez, A. D., Ordóñez-González, J.G., Valdez-Delgado, K.M., Danis-Lozano, R., & Vázquez-Martínez, M. G. (2023). Entomopathogenic fungi for the control of larvae and adults of *Aedes aegypti* in Mexico. *Salud Publica Mex*, 65. 144-150. <https://doi.org/10.21149/1393>.
- Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R., & Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* sacc. *Fitosanidad*, 11(1), 3-9.
- Da Silveira, A. A., Andrade, J. P., Peixoto-Guissoni, A. C., Garcia-Silva, H., Lino-Souza, G., Fernandes, K. F. (2017). Biotechnological application of chitinolytic enzymes from *Trichoderma asperellum* for the biocontrol of *Aedes aegypti*, *Journal of Biotechnology*, 256.
- Da Silveira, A. A., Andrade, J. P., Guissoni, A.P., Souza-Junior, E. S., Di-Medeiros, M. B., Oliveira, A. L., Borges, J. C., Brito, P., Silveira, L. A., Silveira-Lacerda, E. P., Souza, G. R., Fernandes, K. F. (2019). Peptaibols from *trichoderma asperellum* induce apoptosis against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Biotechnology*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.272>.
- De Oliveira, M.R., Katak, R. M., da Silva, G.F., Marinotti, O., Terenius, O., Tadei, W. P., de Souza, A. D. L., & de Souza, A. Q. L. (2021). Extracts of Amazonian Fungi With Larvicidal Activities Against *Aedes aegypti*. *Front Microbiol*, 10 (12),743246. doi: 10.3389/fmicb.2021.743246.
- Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 25(1), 74-100. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n1/a11v25n1>.
- Espinel, C., Chaparro, M., Grijalba, E.(2014) .Um novo bioinseticida a base de una cepa colombiana de *Nomuraea rileyi* para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). En: Memorias, XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, Goiânia, Brasil. 413.
- Evans, H. C. Elliot, S. L., & Barreto, R. W. (2018). Entomopathogenic fungi and their potential for the management of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113 (3), 206-214. 10.1590/0074-02760170369.
- Falvo, M. L., Lopez-Lastra, C. C., & Garcia, J. J. (2019). Selección de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* como potenciales agentes de control biológico de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Tesis de centro de Est.Parasitol.Y de vectores (I), 14,3.

- Ferreira-de-Lima, V. H., & Lima-Camara, T. N. (2018). Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites & vectors*, 11, 1-8. DOI 10.1186/s13071-018-2643-9.
- García, J.L., Sotelo, P., Monroy, D.M., Barrera, G., Gómez-Valderrama, J., Espinel, C., Barreto, E., & Villamizar, L. (2018). Identification and characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate having a high potential for the control of the *Diatraea* sp. sugarcane stem borer. *Biotecnología Aplicada*, 35(1), 1201-1207.
- Gardner, J. M., & Pillai, J. S. (1987). *Tolypocladium cylindrosporium* (Deuteromycotina: Moniliales), a fungal pathogen of the mosquito *Aedes australis* II. Methods of spore propagation and storage. *Mycopathologia*, 97, 77-82. 10.1007/BF00436841.
- Geetha, I., Paily, K. P., Padmanaban, V., & Balaraman, K. (2003). Oviposition response of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* to the secondary metabolite (s) of the fungus, *Trichoderma viride*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 223-226. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000200010>.
- Görg, L. M., Eilenberg, J., Jensen, A. B., Jensen, A. H., & Gross, J. (2021). Pathogenicity against hemipteran vector insects of a novel insect pathogenic fungus from Entomophthorales (*Pandora* sp. nov. inedit.) with potential for biological control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 183. 10.1016/j.jip.2021.107621
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L & Olivari, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 7(13), 50-74.
- Instituto Nacional De Salud (2017). Informe de evento: enfermedad por virus Zika, Colombia. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ZIKA%202017.pdf>.
- Koch, C. K. (1977). Aspectos generales del control biológico e integrado de plagas en Chile. *Bol. Serv. Plagas*, 3, 121-132.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H.K., & Vail, P. (2001). Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. *Biol. Control*, 21, 230-248.
- Laird, M. (1988). Predators in the biocontrol of immature Culicidae. In: The natural history of larval mosquito habitats. M. Laird (ed.). *Academic Press, New York*, 466-484.
- Laiton-Donato, K., Usme-Ciro, J. A., Rico, A., Pardo, L., Martínez, C., Salas, D., Ardila, S., & Páez, A. (2016). Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora en el gen E1. *Biomédica* 36 (Sup2):25-34. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2990>.

- Lezcano-B, J., Saldaña, E., Ruíz, R., & Caballero, S. (2015). Patogenicidad y virulencia del aislado de la cepa nativa de *Isaria* spp. Y dos hongos entomopatógenos comerciales. *Ciencia Agropecuaria*, (23), 20-38. <http://200.46.165.126/index.php/ciencia-agropecuaria/article/view/120>
- López-Ordoñez, E. J., & Marroquín, L. C. (2015). Formulación sólida a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de larvas de *Aedes aegypti*. *Portal De La Ciencia*, 4, 38–44. <https://doi.org/10.5377/pc.v4i0.1860>
- Marín, P., & Bustillo, A. (2002). Pruebas microbiológicas y fisicoquímicas para el control de calidad de los hongos entomopatógenos. *Memorias Curso Internacional Teórico-Práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos naturales de la broca del café. Cenicafé, Chinchiná*, 72-89.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tlng=es.
- Nadeau, M. P., & Boisvert, J. L. (1994). Larvicidal activity of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on the mosquito *Aedes triseriatus* and the Black fly *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10 (4), 487-491. https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V10_N4_P4_87-491.pdf.
- Nelson, M. J. (1986). *Aedes Aegypti*: Biología y ecología. Organización Panamericana de la Salud. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/28513>.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>.
- OMS. (2009). *Dengue*: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/31071>.
- OMS. (2014). A Global Brief on Vector-Borne Diseases. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111008/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf
- OMS. (2020). Enfermedades transmitidas por vectores. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>.

- OMS. (2020). Chikungunya. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>.
- OMS (2022). Dengue y dengue grave. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- OPS. (2014). Distribución de serotipos de virus de Dengue en las Américas, 1990-2014; 2015. <https://www.paho.org/es/documentos/distribucion-serotipos-virus-dengue-americas-1990-2014-2015-mapa-solo-ingles>
- Padilla, J.C., Pardo, R., & Molina, J.A. (2017). Manejo integrado de los riesgos ambientales y el control de vectores: una nueva propuesta para la prevención sostenible y el control oportuno de las enfermedades transmitidas por vectores. *Biomédica*. 37(2), 7-11. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.4139>.
- Patiño-Beltran, R. M. (2001). Bionomía de *Aedes aegypti* L, vector de Dengue en el sur del estado de Jalisco, México. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma De Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/6776/1/1080124422.PDF>.
- Perera, D. S., Hiruni-Tharaka, W. G., Amarasinghe, D., & Wickramarachchi, S. R. (2023). Extracellular extracts of antagonistic fungi, *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma viride*, as larvicides against dengue vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, *Acta Tropica*, 238.
- Pinnock, D. E., Garcia, R., & Cubbin, C. M. (1973). *Beauveria tenella* as a Control Agent for Mosquito Larvae. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 22, 143-147.
- Podder, D., & Ghosh, S.K. (2019). A new application of *Trichoderma asperellum* as an anopheline larvicide for eco-friendly management in medical science. *Sci Rep* 9, 1108. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37108-2>
- Ramirez, J. L., Muturi, E. J., Dunlap, C., & Rooney, A.P. (2018). Strain-specific pathogenicity and subversion of phenoloxidase activity in the mosquito *Aedes aegypti* by members of the fungal entomopathogenic genus *Isaria*. *Scientific Reports*, 8 (1). [10.1038/s41598-018-28210-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28210-6).
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., & Black, W. C. (2008). Review Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net*, 1(1). <http://journal.tropika.net/pdf/tropika/v1n1/a02v1n1.pdf>
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rebaza-Sánchez, N., Zavaleta-Espejo, G., Blas-Cerdán, W., Saldaña-Jiménez, J., & Pedro-Huaman, J. (2020). ACTIVIDAD LARVICIDA DE *Bacillus thuringiensis* H-14 var.

- israelensis Y Beauveria bassiana SOBRE Aedes aegypti LARVICIDAL ACTIVITY OF Bacillus thuringiensis H-14 var. israelensis AND Beauveria bassiana ON Aedes aegypti. *REBIOL*, 40(1), 53-68.
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2996>
- Reinert, J. F., Harbach, R. E., & Kitching, I. J. (2009). Phylogeny and classification of tribe Aedini (Diptera: Culicidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157(4), 700-794.
- Rey, J. R., & Lounibos, P. (2015). Ecología de Aedes aegypti y Aedes albopictus en América y transmisión de enfermedades. *biomédica*, 35 (2), 177-85.
<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2514>
- Rivera, G., & Pinto, L. (2001). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa, Premnotrypes vorax (Hustache). *Revista Colombiana De Biotecnología*, 3(2), 53-65.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30076>
- Rodríguez-González, A., Casquero, P. A., Cardoza, R. E., & Gutiérrez, S. (2019). Effect of trichodiene synthase encoding gene expression in Trichoderma strains on their effectiveness in the control of Acanthoscelides obtectus. *Journal of Stored Products Research*, 83, 275-280. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.07.006>.
- Rodríguez-González, A., Campelo, M. P., Lorenzana, A., Mayo-Prieto, González-López, Ó., Álvarez-García, S., Gutiérrez, S., & Casquero, P. A. (2020). Spores of Trichoderma strains sprayed over Acanthoscelides obtectus and Phaseolus vulgaris L. beans: *Effects in the biology of the bean weevil*. *Journal of Stored Products Research*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101666>.
- Rogers D. J., Wilson A. J., Hay S. I., & Graham A. J. (2006). The global distribution of yellow fever and dengue. *Ad. Parasitol*, 62, 181-220.
- Rueda-Páramo, M. E. (2015). Aporte al conocimiento de la biología básica y aplicada de *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila, Saprolegniales) cómo agente de control biológico de Aedes aegypti (Diptera, Culicidae). [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata].
- Sahayaraj, K., Karthick, S., & Namasivayam, R. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African Journal of Biotechnology*, 7 (12), 1907-1910. <https://academicjournals.org/AJB>
- Schapovaloff, M. E. (2012). Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate Illex paraguariensis en la

- provincia de Misiones. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/25996/Documento_completo_en_baja_resoluci%C3%B3n.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Schuster, A. Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 787–799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
- Singh, G & Prakash, S. (2015). Virulency of novel nanolarvicide from *Trichoderma atroviride* against *Aedes aegypti* (Linn.): a CLSM analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(16), 12559-12565. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4531-6>.
- Su, X., Zou, F., Guo, Q., Huang, J., & Chen, T. (2001). Fungal Diversity A report on a mosquito-killing fungus, *Jythium carolinianum*. *Fungal Diversity*, 7, 129-133. https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_7_129-133.pdf
- Tercero-Gutiérrez, M. J., & Olalla-Herbosa, R. (2008). Enfermedades tropicales transmitidas por vectores. Medidas preventivas y profilaxis. *Offarm*, 27 (6), 78-89.
- Valdés-Ríos, E. L. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Revista Científica Agroecosistemas*, 2(1). <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/40>.
- Vallejos-Sirpa, J. G; Espinal Churata, C; Mollinedo, P., & Terrazas Siles, E. (2014). EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD INSECTICIDA Y QUITINOLÍTICA DE *TRICHODERMA INHAMATUM* Y *BEAUVERIA BASSIANA* EN LA MOSCA DE LA FRUTA *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Revista Boliviana de Química*, 31(1), 5-9. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000100002&lng=es&tlng=es.
- Virginia-Padilla, M. (2017). Bioinsecticidas. [Tesis de pregrado, Universidad de La Laguna]. <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/4277/Bioinsecticidas.pdf>
- Van den Berg, H., Zaim, M., Yadav, R. S., Soares, A., Ameneshewa, B., Mnzava, A., Hii, J., Dash, A. P., & Ejov, M. (2012). Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environmental Health Perspectives*, 120 (4), 577-582. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104340>.

