



**Universidad Nacional de La Plata**

**Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

**Selección de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* como potenciales agentes de control biológico de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**

**Autora: Lic. Marianel Lucía Falvo**

**Directores: Dra. Claudia C. López Lastra**

**Dr. Juan José García**

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencias Naturales**

**La Plata, 2019**

*A mi familia, con amor y gratitud,  
a los que están y a los que extraño.*

## **Agradecimientos**

A mis directores, Dra. Claudia López Lastra y Dr. Juan José García, por darme la oportunidad de investigar y trabajar junto a ellos, por guiarme y aconsejarme durante el desarrollo de esta tesis en un marco de confianza y afecto.

Al Dr. Christian Luz, co-director de mi beca doctoral de CONICET, por permitir que realice una pasantía de formación académica en su laboratorio, por su apoyo en la realización y publicación de parte de este trabajo y por orientarme a distancia.

A quienes me acompañaron en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE durante todo este tiempo, Romina, Alejandra, Manuel, Eliana, Anahí, Byron, Celeste, Mariana y Julieta, por los buenos momentos compartidos y por estar presente cada vez que necesité ayuda. A las dos primeras, agradezco, además, que hayan leído este manuscrito y realizado sugerencias para mejorar mi trabajo. A Habib y Mauricio por colaborar en la realización de los bioensayos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Patología de Invertebrados del Instituto de Patología Tropical e Saúde Pública de la Universidad Federal de Goiás, por recibirme y acompañarme durante mi estadía con tanta calidez. Al Dr. Éverton Fernandes por su asesoría y por facilitarme el uso de la cámara de irradiación UV-B. Al Dr. Richard Humber por enseñarme amablemente y por su generosa colaboración en las publicaciones realizadas. A la Secretaría de Políticas Universitarias (SPU) del Ministerio de Educación de la Nación por financiar mi estancia en Brasil, a través de un proyecto de cooperación CAPES-MERCOSUL.

A Flavia por su amistad y consejos.

A la Lic. Graciela Minardi por su ayuda en el análisis estadístico y en el uso del programa R.

A la Dra. Graciela Navone, directora del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CONICET-UNLP), y al resto de las autoridades, por permitirme la realización de las tareas en dichas instalaciones.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata por aceptarme en la carrera de Doctorado en Ciencias Naturales.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica (ANPCyT) y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las becas doctorales.

A mi familia por el amor y la contención que me brinda siempre. A mi papá por darme la posibilidad de estudiar. A mis hermanos, Gisel y Pablo, por apoyarme en mis proyectos. A mis sobrinos, Lucas y Juan Martín, por alegrarme la vida y enseñarme a ser mejor persona.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	VII
<b>Abstract</b> .....	X
<b>Introducción general, Objetivos e Hipótesis</b> .....	1
Introducción general .....	2
Objetivos.....	4
Hipótesis .....	5
<b>Capítulo I: Aspectos biológicos de <i>Aedes aegypti</i> y de <i>Metarhizium anisopliae</i>, y antecedentes de investigación</b> .....	6
1- Biología de <i>Aedes aegypti</i> .....	7
Taxonomía, origen y distribución.....	7
Características generales, ciclo de vida y comportamiento.....	9
<i>Aedes aegypti</i> como vector de enfermedades .....	11
Métodos actuales de control de <i>Ae. aegypti</i> .....	14
2- Biología de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	17
Taxonomía, características generales y distribución .....	17
3- Control biológico mediante hongos entomopatógenos .....	19
Modo de infección de hongos entomopatógenos .....	20
Reacciones de defensas de los insectos .....	22
Factores ambientales que afectan el uso de hongos entomopatógenos para el control biológico .....	24
Uso de hongos entomopatógenos para el control de mosquitos.....	25
<b>Capítulo II: Selección del aislamiento de <i>Metarhizium anisopliae</i> más eficiente para control de adultos de <i>Aedes aegypti</i>, y aplicación del inóculo en telas</b> .....	28
<u>Introducción</u> .....	29
Materiales y Métodos .....	31
1- Origen y mantención de la colonia de <i>Ae. aegypti</i> en el laboratorio.....	31
2- Origen y preservación <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>M. anisopliae</i> .....	33
3- Selección del aislamiento más eficiente para control de adultos de <i>Ae. aegypti</i> .....	35

3.1 Ensayo preliminar de patogenicidad de cepas de <i>M. anisopliae</i> contra <i>Ae. aegypti</i> .....	35
3.2 Evaluación de la viabilidad de los aislamientos de <i>M. anisopliae</i> y de virulencia contra <i>Ae. aegypti</i> .....	36
3.2.1 Preparación del inóculo .....	36
3.2.2 Viabilidad .....	37
3.2.3 Bioensayos.....	38
3.2.4 Variables registradas y análisis de datos .....	41
4- Inoculación de conidios de <i>M. anisopliae</i> en telas.....	43
4.1 Sustratos utilizados .....	43
4.2 Preparación y aplicación del inóculo.....	44
4.3 Bioensayos.....	45
4.4 Viabilidad de los conidios sobre los sustratos a diferentes tiempos post-aplicación ....	46
4.5 Variables registradas y análisis de datos .....	48
Resultados.....	50
1- Selección del aislamiento más eficiente para control de <i>Ae. aegypti</i> .....	50
1.1 Ensayo preliminar.....	50
1.2 Viabilidad .....	50
1.3 Supervivencia .....	51
1.4 Mortalidad por infección fúngica confirmada .....	59
1.5 Agresividad y virulencia.....	63
2- Inoculación de conidios de <i>M. anisopliae</i> en telas.....	67
2.1 Supervivencia .....	67
2.2 Mortalidad por infección fúngica confirmada .....	71
2.3 Viabilidad de los conidios sobre las telas a diferentes tiempos post-aplicación .....	72
Discusión .....	76
<b>Capítulo III: Efecto de la radiación UV-B en la viabilidad de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. IP 46 y la virulencia contra <i>Aedes aegypti</i></b> .....	81
Introducción.....	83
Materiales y Métodos .....	86
1- Origen y mantención de la colonia de <i>Ae. aegypti</i> en el laboratorio.....	86
2- Origen y preservación <i>in vitro</i> de <i>M. anisopliae</i> s.l. IP 46.....	86
3- Medición de la radiación ultravioleta.....	87

3.1 Exposición y medición de UV-B en un ambiente urbano .....	88
3.2 Exposición y medición de UV-B en el laboratorio .....	89
4- Viabilidad.....	90
5- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de <i>M. anisopliae</i> s.l. IP 46 aplicados sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i> , medio de cultivo sólido y telas tipo mosquitero.....	91
5.1 Preparación del inóculo .....	91
5.2 Bioensayos.....	92
5.3 Ensayos de viabilidad .....	96
5.4 Variables registradas y análisis de datos .....	98
6- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de <i>M. anisopliae</i> s.l. IP 46 expuestos bajo una columna de agua, en recipientes que simulaban ser sitios de cría de <i>Ae. aegypti</i> .....	98
6.1 Determinación de la concentración letal (CL50 y CL90) de <i>M anisopliae</i> s.l. IP 46 contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	98
6.2 Preparación del inóculo y exposición a UV-B .....	99
6.3 Viabilidad .....	102
6.4 Bioensayos.....	102
6.5 Variables registradas y análisis de datos .....	102
Resultados.....	104
1- Medición de la radiación ultravioleta.....	104
1.1 Exposición y medición de UV-B en un ambiente urbano .....	104
1.2 Exposición y medición de UV-B en el laboratorio .....	104
2- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de <i>M. anisopliae</i> s.l. IP 46 aplicados sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i> .....	106
2.1 Mortalidad .....	106
2.2 Conidiogénesis sobre insectos muertos .....	109
3- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de <i>M. anisopliae</i> s.l. IP 46 aplicados sobre medio de cultivo sólido y telas tipo mosquitero .....	112
4- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de <i>M. anisopliae</i> s.l. IP 46 expuestos bajo una columna de agua, en recipientes que simulaban ser sitios de cría de <i>Ae. aegypti</i> .....	115
4.1 Determinación de la concentración letal (CL50 y CL90) de <i>M anisopliae</i> s.l. IP 46 contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	115
4.2 Viabilidad .....	116

4.3 Mortalidad .....	117
Discusión .....	121
<b>Conclusiones generales y Perspectivas futuras</b> .....	124
Conclusiones Generales.....	125
Perspectivas Futuras .....	126
<b>Bibliografía</b> .....	127
<b>Anexo</b> .....	144
1- Comparaciones post-hoc realizadas luego de evaluar la supervivencia (Log-Rank) y la mortalidad por infección fúngica confirmada (análisis de proporciones), con resultados significativos ( $P < 0,05$ ) (Capítulo II) .....	145
1.1 Corrección de Dunn-Šidak (Šidak, 1967) .....	145
1.2 Efecto de la concentración del inóculo en la supervivencia, para cada aislamiento fúngico .....	145
1.3 Efecto de la cepa fúngica en la supervivencia, para cada concentración (conidios/ml) utilizada .....	147
1.4 Efecto de la concentración del inóculo en la mortalidad confirmada por infección fúngica, para cada cepa.....	148
1.5 Efecto de la cepa fúngica en la mortalidad confirmada por infección fúngica, para cada concentración (conidios/ml) utilizada .....	149
1.6 Efecto del tiempo de exposición en la supervivencia, para cada sustrato inoculado (o control) .....	150
1.7 Efecto del tipo de sustrato inoculado (o control) en la supervivencia, para cada tiempo de exposición .....	150
1.8 Efecto del tipo de sustrato inoculado con CEP 423 en la mortalidad confirmada por infección fúngica, para cada tiempo de exposición.....	151
2- Valores de ponderación por longitud de onda según la función biológica de ponderación espectral desarrollada por Quate <i>et al.</i> (1992). (Capítulo III) .....	151
3- Medios de cultivo utilizados .....	153
4- Colorante utilizado en microscopía para observar estructuras fúngicas .....	154

## Resumen

En este trabajo de tesis doctoral, se evaluó la efectividad del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* como agente de control biológico del mosquito *Aedes aegypti*, vector de diversos arbovirus. Para ello se utilizaron diferentes metodologías de aplicación de conidios y se evaluaron diferentes parámetros que reflejan la patogenicidad, virulencia y agresividad de diferentes aislamientos fúngicos.

En primer lugar, se realizaron bioensayos para seleccionar cepas fúngicas nativas, preservadas en la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE (La Plata, Buenos Aires, Argentina) (CEP 085, CEP 087, CEP 120, CEP 350, CEP 404 y CEP 423), eficaces contra adultos de *Ae. aegypti*. El ensayo fue realizado por aspersión directa de los conidios en suspensión sobre los insectos. Se aplicó un inóculo de cada cepa a diferentes concentraciones ( $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml). Durante 10 días se registró la mortalidad de los insectos y se separaron los adultos muertos para verificar la infección fúngica. Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para graficar la probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* en función del tiempo para cada cepa fúngica y para cada concentración. Las diferencias entre las curvas se analizaron mediante un análisis Log-Rank y comparaciones post-hoc entre pares. Además, se determinó para cada una de las cepas fúngicas la viabilidad, la mortalidad sobre adultos de *Ae. aegypti*, el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub>) y la concentración letal media (CL<sub>50</sub>). La existencia o no de diferencias significativas entre las cepas para cada una de estas variables se determinó mediante análisis de ANOVA y comparaciones post-hoc (Tukey) en el caso de la viabilidad; mediante análisis de proporciones con aproximación Chi cuadrado y comparaciones post-hoc entre pares en el caso de la determinación de las diferencias en el porcentaje de insectos infectados y, por último, para determinar la existencia de diferencias en el TL<sub>50</sub>, TL<sub>90</sub> y CL<sub>50</sub> se utilizó el análisis de la superposición de los intervalos de confianza de 95%. El tiempo de supervivencia de los insectos tratados fue menor que el de los controles para todas las cepas. Se encontró un efecto significativo de la concentración del inóculo en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y en el porcentaje de individuos muertos con confirmación de la infección fúngica, para las seis cepas analizadas. Con una concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml, el tiempo de supervivencia de los mosquitos varió entre 4,5 (CEP 404) y 7 (CEP 087) días posteriores a la aplicación del inóculo, contra una mediana de 10 días correspondiente a los controles. El porcentaje de

individuos infectados fue entre 50 (CEP 404) y 87% (CEP 423). El  $TL_{50}$  varió entre 6 y 7 días para todas las cepas fúngicas y no hubo diferencias significativas entre las cepas, como así tampoco en el  $TL_{90}$ . La viabilidad fluctuó entre 82 (CEP 423) y 97% (CEP 085) con diferencias significativas entre las cepas. También se encontraron diferencias significativas en la  $CL_{50}$  entre las cepas. Según este último parámetro, la cepa fúngica más virulenta fue CEP 423, con una  $CL_{50}$  de  $2,4 \times 10^6$  conidios/ml.

A continuación, se procedió a inocular tres tipos de telas, de diferente coloración y composición, con el aislamiento fúngico CEP 423. Estas telas fueron luego utilizadas como sitio de reposo de los mosquitos de modo que allí fueran infectados con los conidios. Se utilizó una tela blanca de 60% algodón-40% poliéster, una roja de 100% poliéster y una negra de 100% poliéster de trama más amplia. Se evaluó el efecto del tiempo de exposición de los mosquitos a cada sustrato (6 o 24 h) y del tipo de sustrato, en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de *Ae. aegypti* y en la proporción de insectos infectados. También se cuantificó la persistencia en el tiempo (1, 2 o 15 días) de los conidios viables sobre cada tela. La tela blanca provocó una disminución significativa en la supervivencia respecto a los controles. El menor valor de supervivencia fue de 6,5 días con 24 h de exposición. No se encontró un efecto significativo del tiempo de exposición en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. El porcentaje de infección máximo obtenido fue de 50% con exposición de 6 h. La viabilidad de los conidios allí aplicados disminuyó desde 88 (1 día) a 22% (15 días). La tela roja provocó diferencias significativas en el tiempo de supervivencia respecto al control solo con 24 h de exposición. El tiempo de supervivencia menor fue de 9 días con 24 h de exposición. Se encontró un efecto del tiempo de exposición, aumentando significativamente el porcentaje de infección (máximo alcanzado 45%) al aumentar el tiempo de exposición. La tela de color rojo fue el sustrato en el cual la viabilidad de los conidios inoculados disminuyó menos a lo largo del tiempo (47% a los 15 días post-aplicación). La tela negra provocó diferencias en el tiempo de supervivencia respecto al control solo con 6 h de exposición. El tiempo de supervivencia menor fue de 9 días con 6 h de exposición, sin embargo, tanto el porcentaje de infección fúngica (15%) como la viabilidad (37%) de los conidios fueron bajos. En general, la persistencia de los conidios viables adheridos a estos sustratos fue dependiente del tipo de sustrato y del tiempo post-aplicación.

También, fueron evaluadas la viabilidad y virulencia de *M. anisopliae* IP 46 (aislamiento fúngico nativo de Brasil) sometido a diferentes dosis de radiación UV-B (0-16,6  $\text{kJ m}^{-2}$ ). Por un lado, los tratamientos consistieron en la exposición a la radiación UV-

B de: i. adultos de *Ae. aegypti* inoculados previamente con conidios, ii. conidios sobre un medio de cultivo y iii. conidios sobre un tejido inerte. Se encontró un efecto significativo de la dosis de radiación en la viabilidad que, sobre medio de cultivo, fue completamente inhibida con dosis de radiación  $\geq 8,3 \text{ kJ m}^{-2}$  y retrasada con dosis de 2,1 y de 4,1  $\text{kJ m}^{-2}$ . Sobre un tejido inerte la viabilidad de los conidios fue retrasada pero no completamente inhibida, incluso sin encontrarse un efecto significativo de la dosis de radiación luego de 72 h de incubación. El porcentaje de mortalidad de los adultos de *Ae. aegypti* tratados con IP46 varió entre 43,8 y 70% luego de 15 días de tratamiento, y no se encontró un efecto significativo de la dosis de radiación en la patogenicidad. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la conidiogénesis sobre los cadáveres. Por otro lado, se sometieron conidios a cada dosis de UV-B, en recipientes que simulaban ser sitios de cría de *Ae. aegypti*, bajo una columna de agua de espesor variable (0-3 cm de altura). En cuanto a la viabilidad de los conidios, se encontró un efecto significativo tanto de la dosis de radiación como del nivel de agua. En relación a la patogenicidad de IP46 contra larvas de *Ae. aegypti*, el porcentaje de mortalidad obtenido varió entre 60 y 90% luego de 10 días de tratamiento y no se encontró un efecto significativo de la columna de agua ni de la dosis de radiación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se destaca el potencial de la cepa CEP 423 de *M. anisopliae* como agente de control biológico de *Ae. aegypti*, debido a su virulencia. Además, el sustrato que resultó con mejores características para la aplicación indirecta de conidios fue la tela blanca ya que los conidios permanecieron viables e infectivos, al ser aplicados sobre esta superficie. Este trabajo de tesis doctoral brinda, además, conocimientos de cómo la radiación UV-B afecta la viabilidad y la patogenicidad contra *Ae. aegypti* de la cepa IP 46 de *M. anisopliae*, información de mucha utilidad a la hora de planificar la aplicación de esta cepa en futuros trabajos de campo.

**Palabras clave:** Hongos entomopatógenos, mosquitos, metodología de aplicación de conidios, patogenicidad, virulencia, radiación ultravioleta.

## Abstract

In this doctoral thesis, the effectiveness of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* as a biological control agent of the mosquito *Aedes aegypti*, a vector of several arboviruses, was evaluated. To this end, several methodologies for conidial application were assessed and different parameters were evaluated in order to determine pathogenicity, virulence and aggressiveness of different fungal isolates.

In the first place, bioassays were carried out to select native fungal strains, preserved in the Collection of Entomopathogenic Fungi of the CEPAVE (La Plata, Buenos Aires, Argentina) (CEP 085, CEP 087, CEP 120, CEP 350, CEP 404 and CEP 423), effective against adults of *Ae. aegypti*. Assays were performed by directly spraying a conidial suspension towards the insects. An inoculum of each strain of different concentrations ( $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  and  $10^8$  conidia/ml) was applied. For 10 days the mortality of the insects was registered and the dead ones were separated to verify the fungal infection. Kaplan-Meier curves were used to illustrate the survival probability of *Ae. aegypti* over time, for each fungal strain and for each concentration. Differences among curves were analysed by means of Log-Rank test and post-hoc pairwise comparisons. Besides, the viability, the mortality of the adults of *Ae. aegypti*, the mean lethal time (LT<sub>50</sub> and LT<sub>90</sub>) and the mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) were determined for each fungal strain. The existence or not of significant differences among the strains for each of these variables was determined by means of an ANOVA and post-hoc comparisons (Tukey) in the case of viability; a test of proportions with Chi-square approximation and post-hoc pairwise comparisons for the percentage of insects infected with the fungus; and finally, significant differences in LT<sub>50</sub>, LT<sub>90</sub> and LC<sub>50</sub> were analysed by checking for superposition between 95% confidence intervals. The survival time of the treated insects was lower than that of the controls, for all the strains. The inoculum concentration had a significant effect in the Kaplan-Meier survival curves and also in the percentage of dead individuals with confirmation of fungal infection, for the six strains analysed. At a concentration of  $5 \times 10^7$  conidia/ml, the mosquitoes survival time ranged from 4.5 (CEP 404) to 7 (CEP 087) days after the beginning of the assays, against a median of 10 days corresponding to all the controls. The percentage of infected individuals was from 50 (CEP 404) to 87% (CEP 423). There were no significant differences in LT<sub>50</sub>, which varied from 6 to 7 days, nor in LT<sub>90</sub>. Viability fluctuated from 82 (CEP 423) to 97% (CEP 085) with significant

differences among strains. Significant differences were also found among the  $LC_{50}$ . According to this last parameter, the most virulent fungal strain was CEP 423, with a  $LC_{50}$  of  $2.4 \times 10^6$  conidia/ml.

Afterwards, 3 types of fabrics, of different colour and composition, were inoculated with the fungal strain CEP 423. Fabrics were then used by mosquitoes as resting places and therefore they could become infected with conidia. A white cloth of 60% cotton-40% polyester, a red one of 100% polyester and a black one of 100% polyester, with a wider weft, were used. The effects of the exposure time to each substrate (6 or 24 hours) and of the type of substrate itself were evaluated in the Kaplan-Meier survival curves of *Ae. aegypti* and in the proportion of the infected insects. The persistence over time (1, 2 or 15 days) of the viable conidia on each fabric was also quantified. The white cloth caused a significant decrease in survival with respect to the controls. The lowest survival value was 6.5 days with 24 hours of exposure. No significant effect of exposure time was found in the Kaplan-Meier survival curves. The percentage of maximum infection achieved was 50% with 6 hours of exposure. The viability of the conidia applied to this substrate, decreased from 88 (1 day) to 22% (15 days). The red cloth caused significant differences in the survival time compared to the controls, only with 24 hours of exposure. The shortest survival time was 9 days with 24 hours of exposure. An effect of the exposure time was found, significantly increasing the percentage of infection (maximum reached 45%) by increasing the exposure time. The red cloth was the substrate in which the viability of the inoculated conidia decreased less over time (47% at 15 days post-application). The black cloth caused differences in the survival time compared to the control only with 6 hours of exposure. The shortest survival time was 9 days with 6 hours of exposure, however, the percentage of fungal infection achieved (15%) and the viability of the conidia (37.3%), were very low values. In general, the persistence of the viable conidia adhered to these substrates was dependent on the type of fabric and the post-application time.

Besides, the viability and virulence of *M. anisopliae* IP 46 subjected to different doses of UV-B radiation (0-16.6 kJ m<sup>-2</sup>) were evaluated. On the one hand, adults which were previously treated with conidia were exposed to radiation. Also were exposed, conidia on a culture medium or conidia applied on an inert fabric. A significant effect of the radiation dose on viability was detected, which, on a culture medium, was completely inhibited with radiation doses  $\geq 8.3$  kJ m<sup>-2</sup> and delayed with doses of 2.1 and 4.1 kJ m<sup>-2</sup>. On an inert fabric, the viability of the conidia was delayed but not completely inhibited, without finding a significant effect of the radiation dose after 72 hours of incubation. No

significant effect of the dose of UV-B was found in the pathogenicity nor in the conidiogenesis over the corpses. On the other hand, conidia in containers that simulated breeding sites of *Ae. aegypti*, under a water column of varying thickness (0-3 cm in height), were subjected to each dose of UV-B. As regards viability of conidia, significant effects of the UV-B dose and of the water column were detected. Virulence of conidia towards the larvae of *Ae. aegypti* was not affected by the UV-B dose nor by the water column.

According to the obtained results, the strain CEP 423 of *M. anisopliae*, is highlighted as a potential biological control agent of *Ae. aegypti*. On the other hand, the white cloth was the substrate that showed the best characteristics for the indirect application of conidia. This doctoral thesis work also contributes to the knowledge of how UV-B light affects the viability and pathogenicity against *Ae. aegypti* of the *M. anisopliae* strain IP 46, which determines the possibility of a future application in the field.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi, mosquitoes, conidia application methodology, pathogenicity, virulence, ultraviolet radiation.

A microscopic image showing a dense population of rod-shaped bacteria, likely Bacillus subtilis, stained with a blue dye. The bacteria are arranged in various orientations, some in chains and others individually. The background is a light, neutral color.

**Introducción general, Objetivos e  
Hipótesis**

## Introducción general

Las enfermedades transmitidas por mosquitos se han expandido mundialmente y en muchos casos pueden resultar letales. *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) es vector de arbovirosis tales como dengue, Zika, chikungunya, fiebre amarilla y virus Mayaro. Dichas enfermedades impactan directamente sobre los seres humanos debido a que el ciclo biológico de este insecto se desarrolla principalmente en áreas urbanas, domiciliarias y peridomiciliarias. Según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO), en el continente americano durante los años 2017 y 2018 se registraron respectivamente: 483.208 casos de dengue con 253 muertes (PAHO/WHO) (2017 a), 123.087 casos de chikungunya con 107 muertes (PAHO/WHO) (2017 b), y 223.336 casos de Zika con 20 muertes y 3.720 casos confirmados de síndromes congénitos asociados a la infección del Zika durante el embarazo, como microcefalia y síndrome de Guillain-Barré (PAHO/WHO) (2018 a).

En la actualidad, no se cuenta con tratamientos efectivos contra estas dolencias ya que no existen antivirales específicos. La vacunación para la fiebre amarilla es la medida preventiva más importante contra esta enfermedad. Si bien esta vacuna es segura, asequible y muy eficaz, aún siguen surgiendo casos y brotes epidémicos (PAHO/WHO, 2018 b). Por otro lado, desde 2015 se aprobó la primera vacuna contra el dengue pero su efectividad es limitada y aún no es distribuida en muchos países. Es por esto que la principal forma de controlar la propagación de estas enfermedades es mediante la disminución de las poblaciones de mosquitos.

Con este fin se cuenta con herramientas sociales, químicas y biológicas. Las primeras se refieren a la realización de campañas educativas para eliminar los sitios de cría de los estados acuáticos y a la implementación de barreras para evitar la picadura del adulto, tales como el uso de mallas en las ventanas y de repelentes corporales. Si bien resulta eficaz, es de ejecución compleja y requiere un gran esfuerzo de organización comunitaria. Por otro lado, el control químico realizado mediante la utilización de insecticidas como piretroides y organofosforados es la forma mayormente implementada. Es necesario realizar este tipo de control durante brotes epidémicos debido a que la mortalidad del insecto se produce rápidamente. Sin embargo, su uso en exceso y como única forma de control, actúa como una fuerza selectiva que aumenta la proporción de aquellos individuos resistentes. Es de esperar que a largo plazo los insecticidas químicos dejen de ser efectivos o se requiera de dosis más elevadas. Sumado a esto, conllevan un

riesgo toxicológico para el ambiente. Por otro lado, el control biológico se presenta como una práctica sustentable y de bajo impacto ambiental. Se refiere al uso de organismos vivos para disminuir la densidad de las poblaciones de otros organismos considerados plagas. Es necesario profundizar la investigación en el campo del control biológico aplicado a insectos de interés sanitario a fin de utilizarlo complementariamente al control tradicional. Estas tres estrategias deberían ser combinadas en un Manejo Integrado de Plagas a fin de reducir la cantidad de insecticida utilizado y lograr un control eficaz y persistente en el tiempo.

El presente trabajo de tesis se enfoca en el control biológico del mosquito *Ae. aegypti* por medio del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin 1883 (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae). Este hongo presenta distribución cosmopolita y es fácil de cultivar *in vitro*. Presenta un ciclo de vida con una fase saprofita que se desarrolla en el suelo y otra fase infectiva que se desarrolla asociada a los insectos. La infección avanzada puede causar la muerte del insecto, teniendo así potencial como controlador biológico. De acuerdo al ciclo de infección, *M. anisopliae* puede tardar varios días en matar al insecto, sin embargo, en este caso puede resultar ventajoso. El tiempo de desarrollo e infección del hongo dentro del mosquito coincidiría con el tiempo de incubación y maduración del agente viral en el insecto adulto. Por lo tanto, para reducir la probabilidad de transmisión de arbovirus, no es necesaria la muerte inmediata de los insectos, que genera una elevada presión de selección. Se debe entonces solo reducir el tiempo de vida de las hembras a un tiempo menor al que lleva la maduración del virus dentro de estas (aproximadamente entre 7 y 10 días).

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la efectividad del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* contra *Ae. aegypti* con la perspectiva de que pueda ser integrado a los programas de control del mosquito vector. Con este fin a lo largo del presente texto se describen distintas metodologías de aplicación de conidios, las estructuras infectivas del hongo, en diferentes contextos.

En el primer capítulo de esta tesis, se detallan aspectos básicos de la biología de *Ae. aegypti* y de *M. anisopliae*, así como también los principales métodos de control utilizados actualmente. Además, se desarrollan los antecedentes de investigación.

En el siguiente capítulo, se desarrollan dos de los objetivos específicos de este trabajo. Por un lado, la evaluación de la patogenicidad de diferentes aislamientos nativos de *M. anisopliae* a fin de seleccionar aquel que resultara más efectivo contra *Ae. aegypti*. Por otro lado, la selección de uno de los aislamientos evaluados para ser aplicado sobre

diferentes tipos de telas (de diferente composición y textura) con perspectivas de que sean utilizadas como sitios de reposo por los mosquitos adultos y sea allí dónde se produzca la infección. La importancia de este estudio radica en que el modo y lugar donde se liberan los conidios es fundamental para asegurar la efectividad de los mismos. Un método de aplicación óptimo requiere lograr la máxima exposición del insecto hacia el producto utilizando una mínima cantidad del inóculo. Esto se logra aplicando conidios en lugares adecuados para el hongo y atractivos para los mosquitos. En el caso de *Ae. aegypti*, que es un insecto sinantrópico, los conidios se deben liberar en lugares puntuales a fin de evitar la prolongada exposición de los humanos y animales domésticos al hongo.

La efectividad de los hongos patógenos de insectos en el control de plagas depende de las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad y radiación ultravioleta. *Aedes aegypti* es un insecto diurno que posiblemente esté expuesto a la radiación solar. Debido a esto, en el tercer capítulo se evaluó el efecto de la radiación ultravioleta B (UV-B, 280-315 nm) sobre la viabilidad y la patogenicidad sobre adultos y larvas, del aislamiento de *M. anisopliae* IP 46, nativo de Brasil.

Para finalizar, en la última sección de esta tesis se detallan las principales conclusiones y perspectivas futuras, teniendo en cuenta la posibilidad de utilizar a *M. anisopliae* como agente de control biológico de *Ae. aegypti*.

## **Objetivos**

### Objetivo General

Integrar al hongo entomopatógeno *M. anisopliae* a los programas de control del mosquito vector *Ae. aegypti* para lograr, dentro de un Manejo Integrado de Plagas, la reducción, en el tiempo, de su densidad y la disminución de los niveles de insecticidas químicos aplicados.

### Objetivos Particulares

- 1) Evaluar la patogenicidad, viabilidad, agresividad y virulencia de diferentes aislamientos fúngicos nativos de *M. anisopliae*, preservados en la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, CONICET-UNLP), contra individuos adultos de *Ae. aegypti* y seleccionar aquel o aquellos que resulten más efectivos.
- 2) Estudiar la efectividad de diferentes sustratos (telas), considerados como superficies de reposo de los mosquitos adultos, como método de inoculación de los conidios. Con este fin, evaluar la patogenicidad, viabilidad y persistencia (estimada según la viabilidad a diferentes tiempos) de los conidios allí aplicados.
- 3) Evaluar el efecto de la radiación ultravioleta (UV-B) sobre la viabilidad y patogenicidad de *M. anisopliae*, aislamiento IP 46 nativo de Brasil, contra adultos y larvas de *Ae. aegypti*.

### **Hipótesis**

Los conidios de *M. anisopliae* que provienen de diferentes aislamientos presentan diferencias en la patogenicidad, agresividad y virulencia contra *Ae. aegypti*. La supervivencia (viabilidad) e infectividad de los propágulos se ve afectada por la superficie sobre la cual se depositan y por la radiación ultravioleta B (UV-B), ambos factores que son de relevancia al momento de la aplicación.



## Capítulo I

Aspectos biológicos de *Aedes aegypti* y de  
*Metarhizium anisopliae*, y antecedentes de  
investigación



## 1- Biología de *Aedes aegypti*

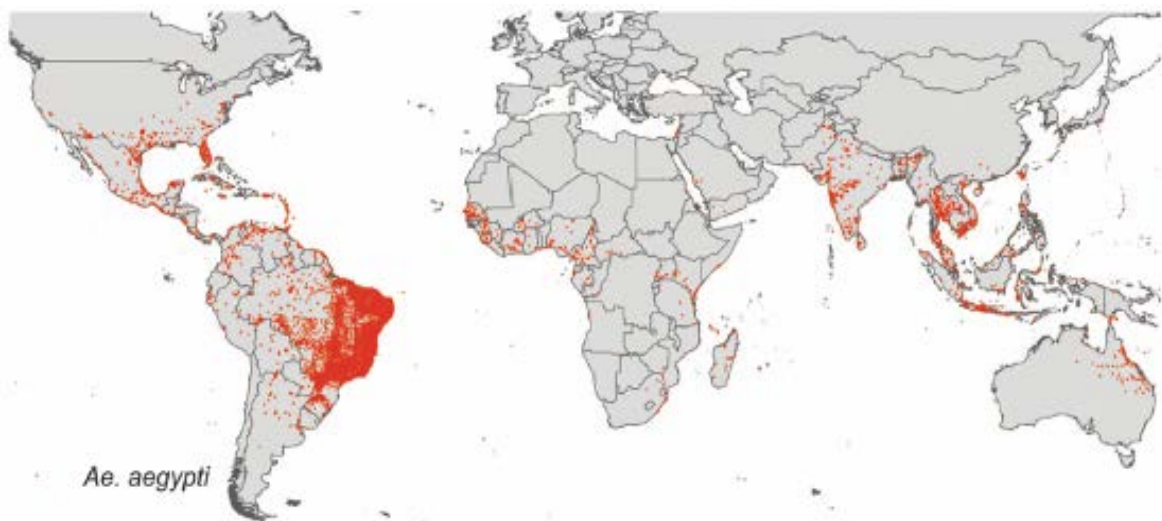
### Taxonomía, origen y distribución

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae), pertenece a la subfamilia Culicinae y a la tribu Aedini. Las clasificaciones dentro de este último taxón han sido discutidas por conformar Aedini un grupo de características heterogéneas. En particular, el género *Aedes* resulta ser un grupo polifilético (Harbach y Kithcing, 1998), conformado según la clasificación tradicional (Knight y Stone, 1977) por 74 subgéneros, entre los cuales se encuentra posicionado *Stegomyia* Theobald, 1901. A fin de clasificar el género mediante relaciones filogenéticas Reinert *et al.* (2009) propusieron, basándose 355 características morfológicas de todos los estados, elevar a categoría de género a muchos subgéneros incluidos en el tradicional género *Aedes*, uno de ellos fue *Stegomyia*. De acuerdo con esta clasificación, el modelo de estudio de este trabajo debería nombrarse *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). Evidencias genéticas también avalan esta hipótesis filogenética (Cook *et al.*, 2005). *Stegomyia* fue válido como género entre 2004 y 2014. Sin embargo, Wilkerson *et al.* (2015) volvieron a analizar el mismo conjunto de datos y, al seguir encontrando grupos polifiléticos, propusieron preservar la clasificación tradicional. Las diferencias halladas entre estos autores se debieron a la metodología utilizada en el análisis filogenético. El tema debe continuar siendo revisado. En la actualidad el Catálogo de Sistemática de Culicidae (Gaffigan *et al.*, 2017), utiliza la clasificación de Wilkerson *et al.* (2015), validando *Aedes* en categoría de género y *Stegomyia* como subgénero, por lo cual en el presente trabajo se hará referencia al nombre científico de esta especie como *Aedes aegypti*.

Esta especie es originaria de África y existen dos subespecies: *Aedes aegypti formosus* (Walker, 1848) y *Aedes aegypti aegypti*. Esta subdivisión comprende la distribución geográfica y caracteres morfológicos y comportamentales (Mattingly, 1957; Powell y Tabachnick, 2013). *Aedes aegypti formosus* se estima que fue la forma ancestral y es de coloración más oscura. Las hembras tienen una alimentación sanguínea preferentemente de animales silvestres (McBride *et al.*, 2014) y oviponen en ambientes naturales, como por ejemplo huecos en los árboles (Lounibos, 1981). En cambio, la subespecie, *Ae. aegypti aegypti*, presenta un color marrón más claro y su localización está en estrecho contacto con los asentamientos humanos, siendo el ser humano la principal fuente sanguínea para las hembras (McBride *et al.*, 2014). Es una subespecie doméstica y

los sitios de cría han sido adaptados al ambiente antrópico. *Aedes aegypti formosus* se distribuye actualmente en el Sahara africano mientras que la subespecie doméstica *Ae. aegypti aegypti* ha colonizado las zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial. Se estima que ha sido distribuida por el ser humano desde África hacia América y desde allí se esparció al resto del mundo (Brown *et al.*, 2014, Gloria-Soria *et al.*, 2016). En las zonas donde ambas subespecies coexisten de manera simpátrica, las diferencias morfológicas y comportamentales se mantienen debido a la utilización de nichos ecológicos diferentes (Moore, 1979), no obstante hay evidencias de que en algunos lugares (Argentina, Senegal y Kenia) ambas subespecies han entrado en contacto y hubo hibridación (Gloria-Soria *et al.*, 2016). No se tiene certeza aún de los riesgos epidemiológicos que surgen de esta descendencia. En este trabajo se utilizará el nombre *Ae. aegypti* para hacer referencia a la subespecie doméstica, la cual es transmisora de enfermedades al humano.

La distribución geográfica mundial de *Ae. aegypti* se muestra en la figura 1. La expansión de esta distribución ha sido consecuencia de la continua movilidad de los humanos, que proporcionan alimento sanguíneo de fácil acceso para las hembras, además de sitios de oviposición y cría de larvas. Asimismo, el cambio climático generó condiciones propicias para la colonización de nuevos hábitats. En Argentina, en 1964, *Ae. aegypti* se consideró completamente erradicado (Ousset *et al.*, 1967). Sin embargo, en 1997 se notificó la reinfestación (Aviles *et al.*, 1999). La distribución actual en Argentina abarca las regiones del Noreste, Noroeste y centro del país con presencia en 19 provincias (Stein *et al.*, 2016).



**Figura 1:** Distribución de *A. aegypti* (Kraemer *et al.* 2015)

## Características generales, ciclo de vida y comportamiento

El ciclo de vida de los mosquitos (figura 2) comprende una fase acuática y otra terrestre. Presentan un desarrollo holometábolo. Al eclosionar los huevos, los individuos atraviesan cuatro estadios larvales, un estado de pupa y luego emergen al estado adulto.

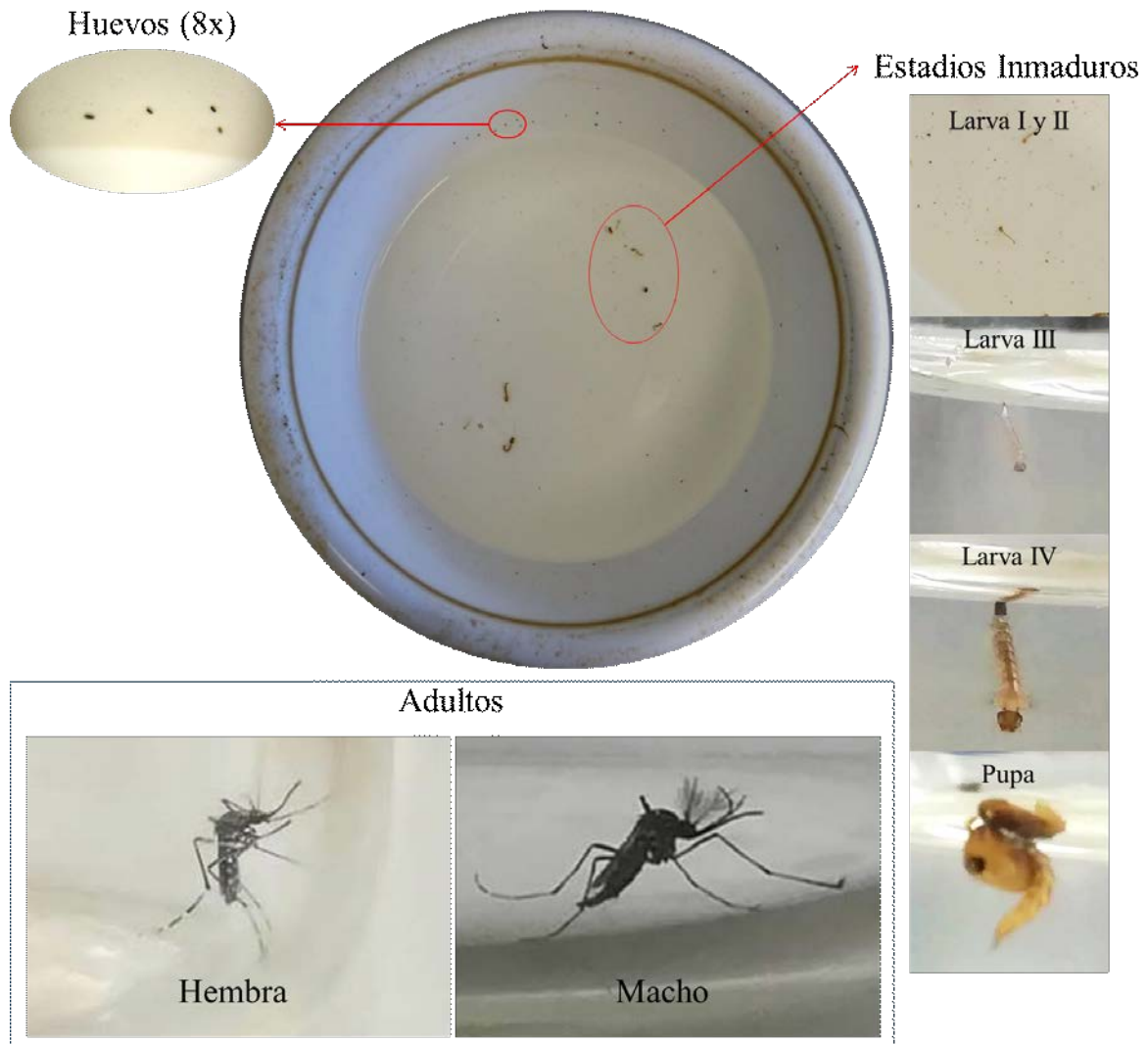
Los adultos de *Ae. aegypti* tienen una coloración oscura con un patrón de bandas claras en las patas y una estructura en forma de lira plateada, sobre el tórax dorsalmente. Machos y hembras presentan dimorfismo sexual en cuanto al aparato bucal y antenas (plumosas en los machos). De acuerdo a su ritmo circadiano son insectos diurnos. Las horas en las que se muestran con mayor actividad se corresponden con las primeras y las últimas de la fotofase (Taylor y Jones, 1969). Es en este momento en el que se aparean (Cabrera y Jaffe, 2007; Araripe *et al.*, 2018), procuran un hospedador sanguíneo (Chadee y Martínez, 2000) y oviponen (Corbet y Chadee, 1990). Se alimentan de néctar de plantas pero las hembras requieren además un aporte de proteínas sanguíneas para el desarrollo de sus huevos. Luego del apareamiento, las hembras adultas comienzan el periodo gonotrófico en el cual realizan una búsqueda de hospedador y se alimentan de su sangre (Farjana y Tuno, 2013). En el caso de *Ae. aegypti* tienen preferencia por la sangre humana (Powell y Tabachnick, 2013) aunque también se alimentan de animales domésticos y de corral. Las claves para esta búsqueda provienen de compuestos volátiles emitidos por los huéspedes tales como dióxido de carbono, ácido láctico y octenol (Bernier *et al.*, 2000), así como también por el calor emitido (Zermoglio *et al.*, 2017). Las hembras suelen alimentarse de varios individuos durante el mismo ciclo gonotrófico. Pasados tres días luego de la ingesta sanguínea, colocan sus huevos en recipientes de origen antrópico que almacenan agua de lluvia, como por ejemplo gomas de autos, baldes, latas y contenedores plásticos entre otros. Cada hembra puede depositar entre 50 y 150 huevos por postura. Los sitios de oviposición elegidos suelen estar determinados por la presencia de conoespecíficos (Wong *et al.*, 2011 a), de claves químicas provenientes de larvas y huevos (Mendki *et al.*, 2000, Ganesan *et al.*, 2006) y también por claves visuales (Badano y Regidor, 2002). Suelen elegir sitios de color oscuro y ubicados en lugares sombreados (Vezzani *et al.*, 2004). Dado que estos recipientes son temporarios, una estrategia de supervivencia de las larvas, es que las hembras tienden a distribuir sus huevos en múltiples recipientes (Reiter, 2007; Abreu *et al.*, 2015; Nazni *et al.*, 2016).

Los huevos son depositados en las paredes de los recipientes, próximos a la superficie del agua. La embriogénesis se completa en 24-48 h. Durante periodos de

precipitaciones, la línea de agua en dichos recipientes de oviposición se eleva y los huevos son inundados. En este momento es cuando eclosionan las larvas. Sin un contacto directo con el agua, las larvas pueden entrar en diapausa dentro del huevo y así sobrevivir durante varios meses en un clima seco. Esta es una de las principales razones por la cual se dificulta el control de esta especie.

A lo largo del ciclo de vida se desarrollan cuatro estadios larvales que se desplazan en el agua a través de movimientos serpenteantes característicos. Morfológicamente, las larvas de *Ae. aegypti*, se distinguen de las larvas de otros culícidos por presentar un sifón corto en el segmento posterior. Se alimentan por filtración a través de cerdas bucales, de materia orgánica dispersa en el agua. En condiciones favorables de alimento y temperatura (25 a 29 °C), las larvas completan el ciclo larval en torno a los 7-10 días.

Luego del cuarto estadio, las larvas pasan al estado de pupa, el último acuático. En este estado no se alimentan y suelen mostrar poca movilidad, no obstante, en la base del abdomen poseen un par de aletas que les permiten desplazarse en el agua. Reaccionan frente a estímulos externos y flotan en la superficie del agua, propiedad que favorece la emergencia del insecto adulto. Disponen en la base del tórax de un par de tubos respiratorios que atraviesan la superficie del agua para permitir la respiración. Este periodo puede durar hasta dos días en condiciones favorables y durante este tiempo se producen cambios anatómicos y fisiológicos para el pasaje a adulto.



**Figura 2:** Ciclo de vida de *Ae. aegypti*. Sitio de cría con huevos adheridos a la superficie y estados acuáticos en diferentes momentos de desarrollo, larvas y pupas. También se observa el dimorfismo sexual entre adultos.

### ***Aedes aegypti* como vector de enfermedades**

Los insectos hematófagos son epidemiológicamente importantes ya que potencialmente pueden ser vectores de arbovirus y parásitos. Las hembras de mosquitos, como se mencionó anteriormente, se alimentan de sangre que obtienen a través de la picadura a animales y humanos. *Aedes aegypti* es transmisor de los virus de dengue, Zika y fiebre amarilla (Flaviviridae), y chikungunya y virus Mayaro (Togaviridae), entre otros. El virus comienza a circular cuando la hembra ingiere sangre de una persona virémica, es decir que presenta el virus ya ensamblado en su sistema circulatorio. Este se replica en las células epiteliales del intestino del mosquito y a través de la hemolinfa migra hacia las

glándulas salivales en las cuales queda almacenado. Esta etapa se denomina período de incubación extrínseco. Dura entre 8 y 12 días y no representa ningún daño para el mosquito. En la próxima ingesta de sangre este mosquito puede transmitir el virus a una persona sana ya que antes de extraer la sangre, inyecta saliva que actúa como anticoagulante en el torrente sanguíneo.

## Dengue

Existen cuatro serotipos denominados DENV1 a DENV4. La respuesta inmune es serotipo específica por lo cual la enfermedad puede reincidir en un mismo paciente. La segunda infección por otro serotipo determina mayor gravedad. Los síntomas de esta enfermedad son: fiebre alta, dolor detrás de los ojos, dolor muscular y de las articulaciones, náuseas y vómitos, cansancio y erupción en la piel. En casos donde la enfermedad se agrava pueden ocurrir hemorragias y hasta provocar la muerte. Existe una vacuna contra dengue registrada, Dengvaxia (Sanofi Pasteur) y otras se encuentran en desarrollo en fase III (Kantor, 2016). Es una vacuna viva, recombinante tetravalente (para los cuatro tipos de dengue), se administra en tres dosis (0/6/12 meses). Se recomienda en zonas donde la epidemia supera el 70% de la población (WHO, 2017). En diciembre de 2015 fue aprobada en Brasil, para uso en personas de 9 a 45 años de edad, que viven en zonas endémicas. La eficacia contra dengue confirmado fue de 59,2%, con un año de seguimiento, y mayor contra serotipos 3 y 4 que para serotipos 1 y 2. Además, la efectividad fue mayor en sujetos seropositivos por previa exposición al virus que en aquellos seronegativos (Kantor, 2016). En la Argentina aún no se aprobó la administración de esta vacuna. Se identificó circulación autóctona de virus dengue serotipo DEN-1 en las provincias de Formosa, Santa Fe, Buenos Aires y Chaco (Ministerio de Salud, 2017).

## Zika

La infección por Zika suele ser asintomática en la mayoría de los casos. Cuando se presentan síntomas, estos son: conjuntivitis, erupciones en la piel, fiebre leve, dolor de cabeza, muscular y de articulaciones, inflamación de miembros inferiores y decaimiento. No existen vacunas ni tratamiento específico. Además del contagio a través del vector, se puede transmitir por vía parental, sexual y por transfusión sanguínea. La Organización

Mundial de la Salud ha declarado la infección por el virus de Zika una emergencia de salud pública internacional. Dicha declaración se hizo a partir de la posible asociación entre este virus y la microcefalia u otros trastornos neurológicos en recién nacidos (Kantor, 2016). El virus fue detectado por primera vez en América Latina en el año 2014. En 2016 se registró por primera vez en Argentina. En el año 2017 se registraron brotes de Zika en Formosa, Salta y Chaco. Se notificaron 10 casos importados en Buenos Aires, CABA, Chaco y Salta. Se notificaron en Argentina hasta noviembre de 2017, cinco casos de síndrome congénito con resultados positivos para Zika. Dos de ellos fueron clasificados como casos autóctonos y tres como casos importados (Ministerio de Salud, 2017).

### Fiebre amarilla

Este virus es endémico en las zonas tropicales de África y América Latina. Los síntomas de la fiebre amarilla son: fiebre, cefaleas, ictericia, dolores musculares, náuseas, vómitos y cansancio. También puede causar hemorragias y muerte. Existe actualmente una vacuna efectiva contra la fiebre amarilla. Esta actúa de manera preventiva contra la enfermedad pero no se cuenta aún con un tratamiento curativo. Entre enero de 2016 y enero de 2018, se confirmaron casos de esta enfermedad en siete países de la región latinoamericana: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Perú y Surinam. Debido a la reciente epizootia notificada en Brasil se detectaron dos casos importados en ciudad de Buenos Aires (Ministerio de Salud, 2018).

### Chikungunya

Los síntomas de esta enfermedad incluyen fiebre alta (mayor a 38 °C) y dolor intenso e inflamación en las articulaciones. La diversidad del virus CHIKV es limitada y hay inmunidad prolongada después de una infección. Estas son condiciones favorables para el desarrollo de vacunas. En efecto, existen dos candidatas en Fase II (Kantor, 2016). En la Argentina no se han registrado aún áreas con circulación viral autóctona de chikungunya, no obstante, se confirmaron en 2017, 14 casos importados (Ministerio de Salud, 2017). Se debe mantener el estado de alerta debido a que en la mayoría de los países de América se han registrado casos autóctonos, entre ellos Brasil, Perú, Bolivia y Paraguay.

## Virus Mayaro

Los síntomas que produce esta enfermedad son similares a los ya descritos. Entre ellos se destacan fiebre moderada, erupciones en la piel y dolores articulares severos que pueden persistir durante varios meses, principalmente en tobillos, muñecas y dedos de los pies. El virus MAYV presenta una gran similitud con CHIKV por lo que se suele confundir su diagnóstico. Tiene circulación actual en el norte de América del Sur y en América Central, generalmente en bosques tropicales o en zonas rurales donde mosquitos del género *Haemagogus* son los principales vectores. El hecho de que *Ae. aegypti* se presente como un nuevo vector del virus alerta sobre su posible dispersión hacia zonas urbanas, pudiendo surgir una nueva epidemia (Esposito y Fonseca, 2017).

## **Métodos actuales de control de *Ae. aegypti***

Los programas de control del vector han fallado reiteradamente debido a problemas asociados al tratamiento de áreas urbanas y a la falta de mantenimiento de estos en el tiempo (Gubler, 2011; Fernández-Salas *et al.*, 2015). Existen herramientas sociales, químicas y biológicas que afectan el desarrollo o supervivencia de los mosquitos en las viviendas y sus alrededores. Las mismas deben llevarse a cabo de manera racional y conjunta con el fin de lograr un Manejo Integrado de Vectores (WHO, 2004; Chanda *et al.*, 2017), que reduzca la población a corto y largo plazo.

## Control social

La participación de la comunidad es la medida preventiva más importante contra las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*. Este tipo de control tiene como fin eliminar los sitios de oviposición y cría de larvas, dentro y en los alrededores de las viviendas. Para esto se debe: evitar arrojar recipientes o basura que puedan acumular agua de lluvia en lugares como patios, terrazas, calles o baldíos; mantener los patios y jardines desmalezados; eliminar o cambiar diariamente el agua de los recipientes que puedan acumularla tales como floreros, porta macetas y desagües; mantener tapados los tanques de agua de las viviendas; y mantener limpias, cloradas o vacías las piletas de natación fuera de la temporada. Este método de control es efectivo pero debe realizarse constantemente y con ayuda del total de la sociedad, para lo cual es indispensable la realización de campañas educativas y de divulgación (Burrone *et al.*, 2016; Tejerina *et al.*, 2016). Una vez que las

larvas alcanzan el estado adulto poco se puede realizar desde lo social, solo resta monitorear con trampas la presencia del vector y evitar la picadura mediante el uso de repelentes y barreras mecánicas tales como mosquiteros.

### Control químico

El control químico consiste en el empleo de sustancias químicas, de origen natural o sintético, destinadas a prevenir o disminuir la población de un insecto plaga. Los insecticidas químicos se clasifican según diferentes criterios, entre ellos la vía de entrada al organismo blanco (ingestión, contacto o vía respiratoria), el modo de acción y el tipo de grupos químicos en su estructura (nitrofenoles, órganoclorados, órganofosforados, carbamatos, piretroides y hormonales). Presentan también diferentes grados de toxicidad. Un mal uso de estas sustancias conlleva un riesgo ya que puede afectar a organismos benéficos, fomentar el desarrollo de resistencia por parte de la plaga y, además, afectar la salud y provocar daños ambientales (Devine *et al.*, 2008).

Para el control de mosquitos se utilizan sustancias sintéticas que se aplican mediante el rociado directo en los sitios de interés o mediante la impregnación de sustancias químicas en diferentes materiales (Kroeger *et al.*, 2006). Para el control de los estados acuáticos se suele utilizar órganofosfatos como temefós, y reguladores de crecimiento tales como piriproxifen, novaluron y metopreno; en tanto que para el control de adultos los más utilizados son piretroides (deltametrina, permetrina) y órganofosforados (malatión, fenitrotión) (Vontas *et al.*, 2012). Estas sustancias suelen matar rápidamente pero tienen la desventaja de seleccionar individuos resistentes (Zaim y Guillet, 2002; Vontas *et al.*, 2012). Se debería fumigar con insecticidas químicos solo en caso de verificar la circulación de alguna de las enfermedades virales.

El tratamiento principal utilizado para el control de adultos es el rociado focal de volúmenes mínimos de insecticida en forma de microgotas. Esta metodología, denominada Ultra Bajo Volumen o ULV (del inglés *Ultra Low Volume*), requiere volúmenes pequeños del producto pero sus costos se incrementan en el tipo de dispositivos utilizados en la aplicación. El rociado espacial de insecticidas, se aplica desde un equipo portátil, o desde un equipo pesado montado en un vehículo. La eficacia del rociado ULV depende de un gran número de factores como el tamaño de la gota, la velocidad del vehículo cuando se utiliza equipo pesado, la dirección del viento y el solvente utilizado. Es recomendable que su aplicación sea realizada durante el pico de actividad del vector. Debido a que los adultos

de *Ae. aegypti* reposan en el interior de las viviendas, se debe contar con la colaboración de la comunidad la cual debe mantener abiertas las puertas y ventanas de las viviendas cuando se realiza el rociado para aumentar la penetración del insecticida en las mismas. En Argentina se han utilizado para el rociado ULV, fenitrotión, permetrina y deltametrina. Como otra herramienta de control, diferente de las formulaciones líquidas, también se han realizado ensayos con formulaciones fumígenas conteniendo beta-cipermetrina, encontrando una buena eficacia sobre los adultos en el interior de las viviendas (Masuh *et al.*, 2003).

### Control biológico

El control biológico es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de la población, o el impacto, de otro organismo considerado plaga (Eilenberg *et al.*, 2001). El objetivo final es provocar la mortalidad del insecto plaga o bien intervenir en los mecanismos reproductivos. En el caso de control biológico de mosquitos, dichos organismos pueden ser enemigos naturales presentes en el ecosistema tales como depredadores, parásitos y patógenos que resultan en la mortalidad de larvas o adultos, u organismos de la misma especie modificados de forma tal que la progenie resulte inviable (Benelli *et al.*, 2016). En ambos casos, los organismos controladores deben mantenerse en el ecosistema a lo largo del tiempo, ya sea por conservación del ambiente que los rodea o por la aplicación periódica de estos.

La depredación de huevos y estados acuáticos de mosquitos por parte de vertebrados (peces, renacuajos) y otros artrópodos, por ejemplo larvas de *Toxorhynchites* (Diptera: Culicidae), se utiliza regularmente en diferentes cuerpos de agua (Sarwar, 2015 a, b; Bowatte *et al.*, 2013). En cuanto al parasitismo, una gregarina *Ascogregarina culicis* se detectó en larvas de *Ae. aegypti* y podría afectar las poblaciones de mosquitos (Albicocco y Vezzani, 2009). Por otro lado, la bacteria *Wolbachia pipientis* es un endosimbionte promisorio en el control de vectores debido a que disminuye el tiempo de vida de los adultos infectados, produce infertilidad e inhibe la replicación de arbovirus dentro del mosquito (Bian *et al.*, 2010; Van den Hurk *et al.*, 2012). Entre los patógenos naturales de *Ae. aegypti* se encuentran bacterias, nematodos, virus y hongos (Sarwar, 2015 a). Dentro del primer grupo se encuentran los insecticidas biológicos más reconocidos y utilizados, *Lysinibacillus sphaericus* (Filha *et al.*, 2014) y *Bacillus thuringiensis* (Lacey, 2007). Estos productos han sido formulados y se encuentran en el mercado. Presentan buenos resultados

para el control de larvas si se los utiliza regularmente. En la actualidad no existen formulados comerciales de los otros grupos contra *Ae. aegypti* en Argentina, pero sí hay evidencias de su potencial como agentes de control (Scholte *et al.*, 2004; Hirunkanokpun *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2017 a).

Otra forma de control del vector en auge en la actualidad es la liberación de mosquitos adultos machos modificados genéticamente, ya sea por factores físicos o por ingeniería genética, con el fin de que estos dejen descendencia inviable. Por un lado, se les realiza un tratamiento por irradiación que produce aberraciones cromáticas y mutaciones letales en las células germinales. Por otro lado, la compañía inglesa Oxitec produce cría masiva de mosquitos que presentan un gen letal cuya expresión es suprimida en presencia de tetraciclina. Las larvas bajo condiciones de laboratorio, son alimentadas con tetraciclina y así consiguen llegar al estado adulto. Una vez liberados en el campo, su descendencia no conseguirá mudar más allá del estado acuático en ausencia del antibiótico (Thomas *et al.*, 2000).

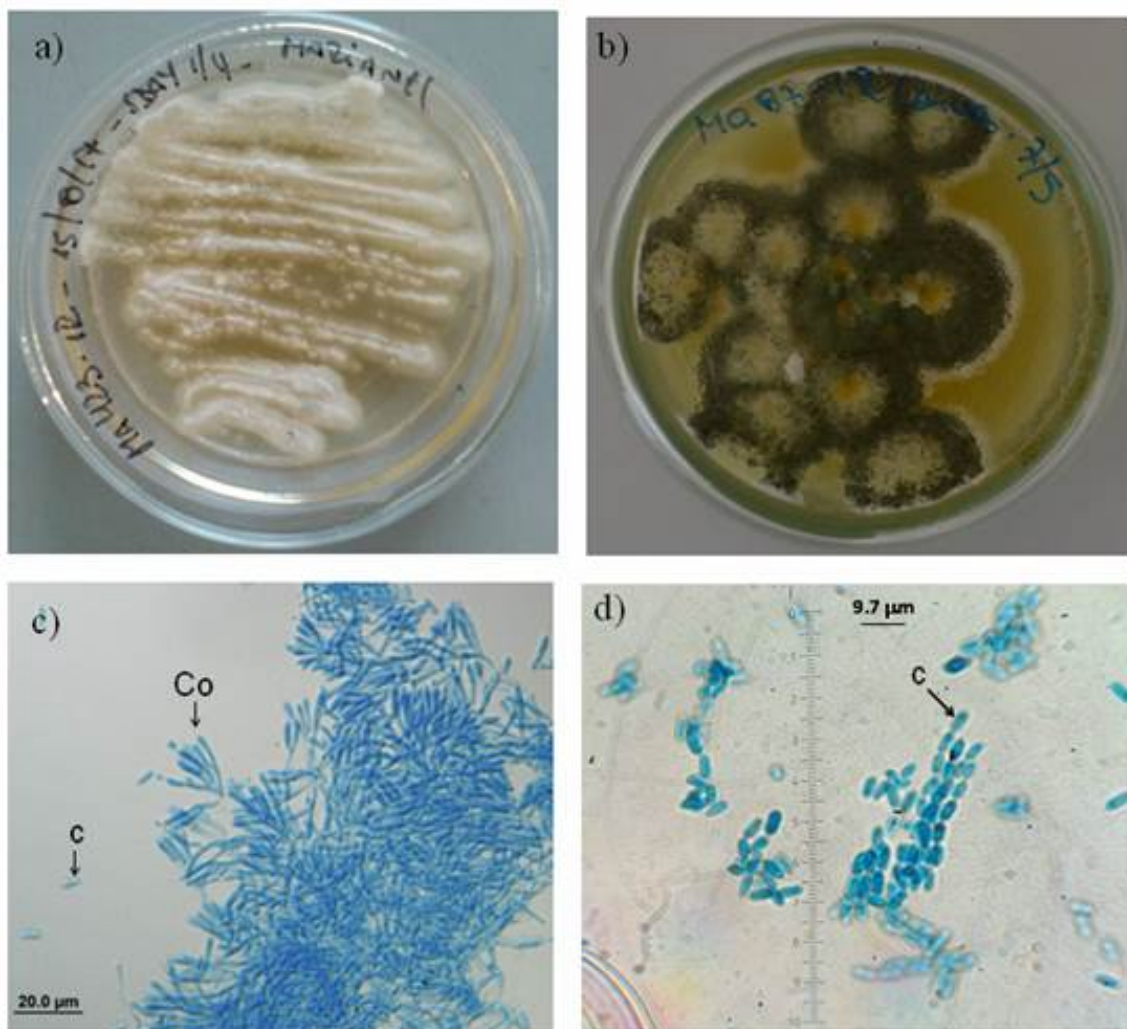
## **2- Biología de *Metarhizium anisopliae***

### **Taxonomía, características generales y distribución**

Los hongos entomopatógenos son microorganismos capaces de infectar y provocar la muerte de diferentes grupos de artrópodos. El género *Metarhizium* Sorokin incluye a un grupo de hongos filamentosos que presentan coloración verdosa cuando esporulan. Se clasifica en los siguientes taxones: phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Clavicipitaceae. El phylum Ascomycota está conformado por hongos que presentan hifas septadas que se diferencian en conidióforos, células conidiógenas y conidios, siendo estos últimos las estructuras reproductivas asexuales. También presentan una estructura de saco que contiene las ascosporas (esporas sexuales). Históricamente, *Metarhizium* ha sido encontrado en la naturaleza mayoritariamente en su estado anamórfico (de reproducción asexual) sin embargo, hay algunos casos en los que también se encontró el estado teleomórfico (de reproducción sexual) al cual se lo incluyó en el género *Metacordyceps* (Liang *et al.*, 1991). A través de estudios moleculares se determinó que existe una correspondencia genética entre estos dos géneros. Actualmente la nomenclatura está siendo revisada para evitar el uso de nombres distintos para diferentes etapas del ciclo de cada hongo. Asimismo, las

nuevas herramientas moleculares están ayudando a esclarecer las relaciones filogenéticas (Driver *et al.*, 2000; Bischoff *et al.*, 2009; Kepler *et al.*, 2014).

*Metarhizium anisopliae* (figura 3) se caracteriza por presentar conidióforos ramificados en forma de candelabro y densamente entrelazados. Las células conidiógenas forman una estructura de himenio, el esporodio. Los conidios, de color verde, son ovalados dispuestos en forma de cadenas que se adhieren entre si lateralmente (Humber, 2012). Su distribución es mundial y comprende una amplia variedad de climas, tanto regiones tropicales como templadas. Presenta un amplio rango de hospedadores (Veen, 1968) y, al ser un patógeno facultativo, puede también ser aislado de suelos (Zimmermann, 1993).



**Figura 3:** a) Cultivo de *M. anisopliae* con crecimiento vegetativo en medio de cultivo SDYA<sub>1/4</sub> (4 días de incubación); b) Cultivo esporulado de *M. anisopliae* en medio de cultivo SDYA<sub>1/4</sub> (15 días de incubación); c- d) Estructuras de *M. anisopliae* bajo microscopio óptico, coloreadas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5% p/v (1000X). Co: conidióforo con células conidiógenas, c: conidios.

### 3- Control biológico mediante hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos presentan potencial como agentes de control de plagas. De hecho, se han desarrollado en diferentes partes del mundo micoinsecticidas comerciales cuyo principal ingrediente activo son conidios principalmente de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* o *Isaria* (Faria y Wraight, 2007), que son fáciles de cultivar masivamente. Dichos productos se utilizan mundialmente en sistemas agrícolas como método de control biológico aumentativo con resultados satisfactorios (Shah y Pell, 2003).

Dentro de las ventajas de su uso en el control de plagas, se destacan la capacidad de, en algunos casos, presentar patogenicidad específica sin afectar a los enemigos naturales del organismo a combatir. Además, si se encuentra en las condiciones adecuadas el entomopatógeno puede introducirse y colonizar un ecosistema, reproduciéndose en forma continua en epizootias, lo cual disminuye la necesidad de realizar aplicaciones sucesivas. Por otro lado, la relación entre el patógeno y el hospedador, como se describe a continuación, es resultado de una competencia que a lo largo del tiempo produce una co-evolución (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Los mecanismos de infección del patógeno y de defensa del hospedador continuamente están siendo modificados por diferentes presiones de selección, lo que disminuye la posibilidad de desarrollar mecanismos de resistencia por parte del hospedador como sí ocurre cuando solo se aplican insecticidas químicos. De todas maneras, se deben profundizar los estudios respecto a la posibilidad de que los hongos entomopatógenos puedan seleccionar organismos resistentes a estos (Dubovskiy *et al.*, 2013 a). Finalmente, se debe destacar entre las ventajas que los hongos entomopatógenos no contaminan el ambiente ni afectan la salud del humano (Strasser *et al.*, 2000).

Contrariamente, entre las desventajas de su uso se debe mencionar que los micoinsecticidas no matan instantáneamente. Sin embargo, durante el desarrollo de la enfermedad dentro del insecto pueden ocurrir efectos subletales que disminuyen los daños, tales como perder la locomoción, dejar de alimentarse y afectar la reproducción. Por otro lado, la efectividad de los hongos entomopatógenos se encuentra ligada a la dependencia de las condiciones ambientales adecuadas. Debido a esto, los productos formulados requieren condiciones de almacenamiento más exigentes que las de los insecticidas inorgánicos, a fin de evitar que pierdan su patogenicidad.

## **Modo de infección de hongos entomopatógenos**

La infección fúngica comienza cuando una espora asexual o conidio se adhiere a la cutícula de un insecto hospedador, mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Los conidios están rodeados de una capa de proteínas hidrofobinas que facilitan la adhesión de forma pasiva a superficies hidrofóbicas como lo es la cutícula (Holder y Keyhani, 2005). Si el microambiente formado entre el conidio y la cutícula presenta condiciones de humedad relativa (HR) y temperatura adecuadas, el conidio germina. Luego, se produce un tubo germinativo que comienza a atravesar la cutícula y un apresorio que fija el conidio firmemente a la cutícula ayudando en la penetración. Generalmente, este proceso ocurre en las partes más débiles de la cutícula del hospedador tales como membranas intersegmentales, zonas de inserción de las patas y mandíbula. A través de la presión mecánica ejercida y de la secreción de enzimas lipasas, proteasas y quitinasas, la cutícula se va degradando (Clarkson y Charnley, 1996). Durante los pasos iniciales de germinación y penetración de la cutícula, el hongo permanece en un modo de crecimiento germinativo, utilizando la reserva de nutrientes que se encuentran en la espora. De esta forma obtiene los elementos esenciales para producir la pared celular del tubo germinativo y proveer la energía requerida en este proceso. Cuando la reserva se agota, el tubo germinativo deja de crecer pero el hongo ya consiguió introducirse en el hemocele del insecto. En este momento ocurre la transición del crecimiento germinativo al crecimiento vegetativo y el hongo comienza a utilizar fuentes externas de nutrientes, lo cual le permite un crecimiento en forma indeterminada.

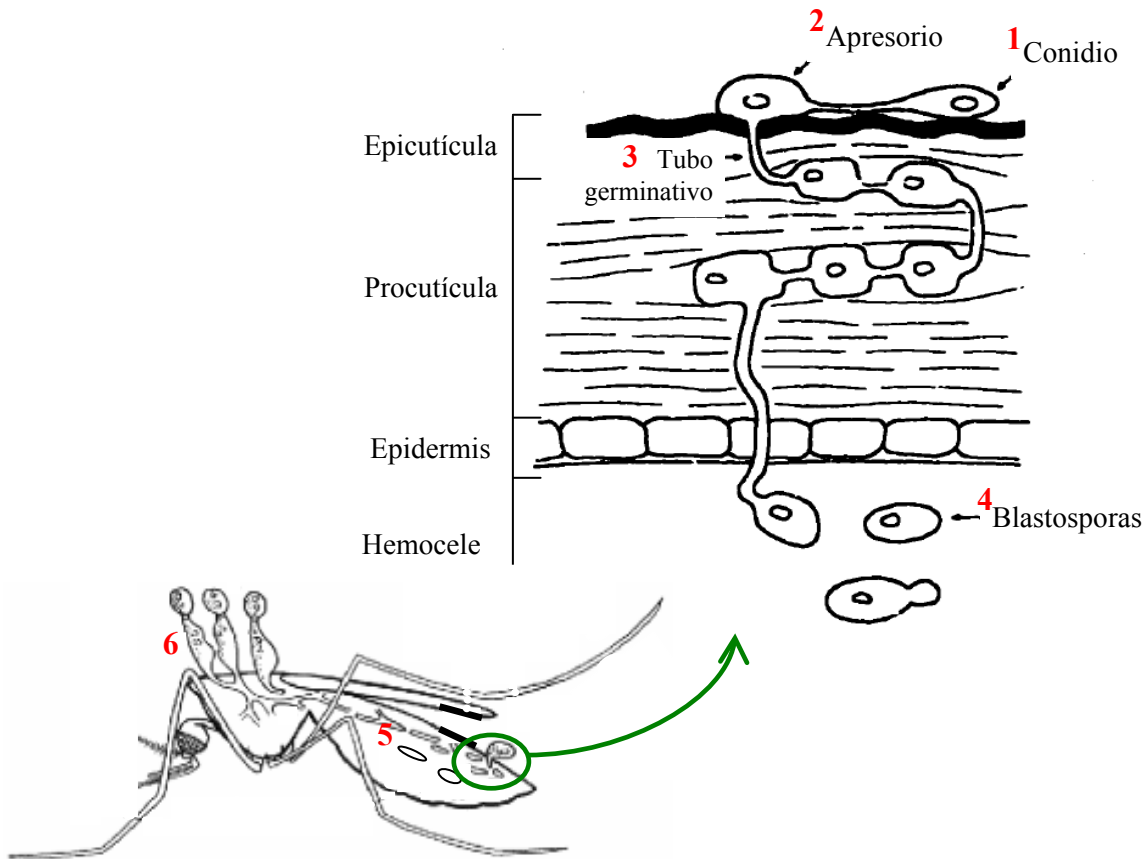
Un grupo de células denominadas blastosporas, similares a cuerpos hifales proliferan rápidamente por gemación y circulan a través de la hemolinfa. A diferencia de los conidios, estas presentan propiedades hidrofílicas. Este crecimiento en forma levaduriforme posee características en la pared celular que le permite evadir la respuesta inmune del hospedador (Wanchoo *et al.*, 2009). La primera etapa de la infección es parasítica, es decir el hospedador continúa vivo y por lo tanto alimentándose, respirando y excretando. Con estas funciones vitales el insecto provee al hongo de alimento y oxígeno, protección contra factores ambientales nocivos y excreta junto a sus desechos aquellos producidos por el hongo. Luego se genera una competencia entre ambos por los recursos.

En una etapa más avanzada de la infección, el hongo ocupa un volumen importante dentro del insecto. Esto hace que en la competencia por nutrientes y oxígeno, el insecto pierda. Además, progresivamente se va deteniendo su circulación y el sistema de órganos

del hospedador comienza a fallar. En este momento el hongo, que ya no cuenta con los beneficios que le proveía el hospedador, comienza a degradar tejidos del insecto, entre estos las paredes del tubo digestivo y de los túbulos de Malpighi. Esto provoca por un lado, la liberación de la biota intestinal hacia el hemocele que también compite por los recursos, y, por otro, un cambio en la homeostasis del ambiente interno asociado a la degradación de proteínas cuyos metabolitos no son excretados. El último paso en el ciclo patogénico es la liberación de toxinas. El insecto ya muy debilitado muere.

Una característica que diferencia a los hongos Hypocreales de otros entomopatógenos es la síntesis de toxinas químicas (micotoxinas). Estas son péptidos cíclicos que son secretados por el hongo en el hemocele y que se encuentran involucradas en el proceso infeccioso. El rol de las micotoxinas en la virulencia de los hongos entomopatógenos aún se discute, pueden o no ser la causa directa de la muerte del artrópodo. Algunas presentan acción insecticida, otras contribuyen a alterar las células del sistema inmune del hospedante, otras podrían tener efecto antimicrobiano frente a otros hongos y bacterias. Además, contribuyen a disminuir la movilidad del insecto (Kershaw *et al.*, 1999).

Luego de la muerte del hospedador, el hongo frena el crecimiento vegetativo y vuelve a formar conidios. Emerge a través del cadáver nuevamente a través de fuerzas mecánicas y reacciones enzimáticas. En el exterior, ocurre la esporulación y conidiogénesis. Los conidios son dispersados en el ambiente de forma pasiva por factores ambientales físicos y por el contacto directo de un nuevo insecto con el cadáver del hospedador infectado. De esta manera se puede iniciar un nuevo ciclo. En la figura 4 se diagrama del proceso de infección fúngica de un hongo entomopatógeno típico.



**Figura 4:** Proceso de infección de un hongo entomopatógeno. 1: Adhesión del conidio a la cutícula. 2-3: Penetración del tegumento. Formación de apresorio, tubo germinativo y secreción de enzimas hidrolíticas. 4-5: Crecimiento vegetativo dentro del insecto. Proliferación de blastosporas y cuerpos hifales. Invasión de tejidos. Liberación de toxinas y muerte. 6: Proliferación de conidios por fuera del tegumento y su posterior dispersión. Esquema adaptado y modificado de Vilcinskas y Götz (1999) y de Scholte *et al.* (2004).

### Reacciones de defensas de los insectos

Los insectos presentan diferentes mecanismos de defensa a fin de evitar la enfermedad. En primer lugar, el hospedador puede detectar la presencia del entomopatógeno y así evadir el contacto con este ya sea por repelencia hacia claves químicas provenientes del hongo o comportamentalmente, por ejemplo a través del acicalamiento o remoción de los individuos infectados en el caso de los insectos sociales (Thompson y Brandenburg, 2005; Meyling y Pell, 2006; Baverstock *et al.*, 2010; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Si el contacto entre el patógeno y el hospedador efectivamente ocurre, la infección puede ser bloqueada a diferentes niveles. El patógeno debe conseguir penetrar el tegumento y sortear el sistema inmune del hospedador.

El tegumento de los insectos está conformado por una epidermis, compuesta por células epidérmicas, oenocitos, glándulas dérmicas y receptores, que sintetiza y secreta los

componentes de la cutícula; la cual es la primera barrera física para el patógeno (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Está conformada por una estructura compleja que consta de dos capas, la epicutícula y la procutícula, que a su vez se divide en exo, meso y endocutícula. La epicutícula está conformada por proteínas y lipoproteínas, una capa lipídica y, por fuera, una capa de cemento formada por lipoproteínas. Su función es evitar la pérdida de agua. La composición de ácidos grasos en la capa lipídica varía entre especies e individuos, e incluso entre diferentes estados de desarrollo. Se ha demostrado que la composición de ácidos grasos afecta el proceso de germinación de las esporas sobre la cutícula ya que pueden estimular o inhibir el desarrollo de algunos hongos entomopatógenos (Gołębiowski *et al.*, 2008; Bogus' *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2015). De esta manera, la composición de la cutícula es un factor determinante de la especificidad del patógeno. La procutícula, está conformada por fibrillas de quitina distribuidas en distintas orientaciones, dentro de una matriz proteica. La exocutícula provee rigidez a través del proceso de esclerotización y actúa como una barrera mecánica. Además, la ecdisis representa otro obstáculo en la penetración del hongo.

Una vez dentro del hemocele, los insectos son capaces de reconocer y atacar un organismo extraño con un conjunto de respuestas inmunes celulares y humorales (Wang *et al.*, 2017). La inmunidad celular está dada por hemocitos que circulan en el hemocele y pueden reconocer microorganismos invasores (Lavine y Strand, 2002). Incluye los procesos de fagocitosis, encapsulación y nodulación. En otros casos, ocurren reacciones inmunes humorales a través de péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés *antimicrobial peptides*) involucrados en los procesos de reconocimiento de sustancias extrañas y lisis de las mismas. Los AMPs son defensinas, cecropinas, lectinas, lisozimas y atocinas. Asimismo, el complejo tirosina-fenoloxidasa se encarga de melanizar y encapsular a los antígenos. Otra reacción de defensa que presentan algunos insectos es incrementar su temperatura corporal por medio de su comportamiento (Wojda, *et al.*, 2017), por ejemplo exponiéndose al sol, y así son capaces de detener el desarrollo de blastosporas.

Se ha demostrado que luego de 25 generaciones de continua exposición al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912, la cutícula de *Galleria mellonella* (L.) puede tornarse más difícil de penetrar. Esto se debe a una elevada expresión en el tegumento de inhibidores de metaloproteasas fúngicas (IMPI del inglés, *insect metalloprotease inhibitor*) y de antioxidantes y, además, a una mayor actividad de fenoloxidasa (Dubovskiy *et al.*, 2013 a). Si bien esto podría ser un blanco para seleccionar individuos resistentes a los hongos entomopatógenos luego de sucesivas aplicaciones,

como consecuencia hay una supresión del sistema inmune sistémico y se demostró que no hay resistencia cruzada a otros hongos, como por ejemplo *M. anisopliae* (Dubovskiy *et al.*, 2013 a). También, la inversión en defensa (melanización) ocurre a expensas de la fecundidad (Dubovskiy *et al.*, 2013 b), por lo cual el trabajo en ambientes naturales es necesario para complementar esta información.

### **Factores ambientales que afectan el uso de hongos entomopatógenos para el control biológico**

Las condiciones ambientales son de extrema importancia en la efectividad de los hongos entomopatógenos cuando se realizan aplicaciones de estos a campo, aunque también se deben tener en cuenta al realizar experiencias en laboratorio. Las más preponderantes son la radiación solar, la HR y la temperatura. Conocer los efectos nocivos que estos provocan tanto en el proceso de infección como en la persistencia del inóculo, es decir el tiempo durante el cual permanece activo en el ambiente luego de la aplicación, permite generar medidas para minimizarlos. Entre estas, por ejemplo, determinar el mejor modo, lugar y momento del día en el cual se debe producir la inoculación.

En primer lugar, la radiación solar emite luz ultravioleta que provoca daño celular debido a que es absorbida por el ADN y produce la formación de especies reactivas a oxígeno (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*) (Cadet *et al.*, 2005). Como resultado la exposición prolongada produce mutaciones y muerte celular. Al tratarse de hongos entomopatógenos, cuando se exponen a radiación solar o ultravioleta se ha demostrado que se inhibe o se retrasa la germinación de los conidios (Braga *et al.*, 2001 a, b, 2015). En el capítulo III se amplía la información respecto a este tema.

En cuanto a la temperatura, el rango óptimo de crecimiento de los entomopatógenos en general varía entre 10 y 30 °C. En situaciones de temperatura extrema los procesos biológicos se ven afectados. Las bajas temperaturas inhiben el crecimiento y virulencia pero permite que el inóculo se preserve por más tiempo, pudiendo generar epizootias cuando las condiciones óptimas se restablecen. En cambio, las temperaturas elevadas pueden volver inviable al inóculo (Ignoffo, 1992).

Por último, la HR afecta también a la persistencia del hongo. El microambiente generado en la cutícula de un insecto debe tener agua libre para que el conidio pueda germinar y crecer (Ignoffo, 1992) y también para que el hongo pueda esporular luego sobre el cadáver (Hsiao *et al.*, 1992), lo cual influye en su dispersión y persistencia.

Las formulaciones otorgan protección contra los factores ambientales nocivos y favorecen la supervivencia del hongo durante su almacenamiento y luego de su aplicación. Las formulaciones oleosas en base de conidios han sido estudiadas en el control biológico de diferentes artrópodos (Bateman *et al.*, 1993; Malsam *et al.*, 2002; Blanford *et al.*, 2005; Paixão *et al.*, 2017) y de *Ae. aegypti* en particular (Scholte *et al.*, 2007; Carolino *et al.*, 2014; Lobo *et al.*, 2016) y son las más comunes de encontrar en el mercado (Faria y Wraight, 2007). Los conidios, que presentan características hidrofóbicas, suelen mezclarse con aceites vegetales o minerales (derivados de petróleo). Está demostrado que el aceite aumenta la eficacia de los hongos entomopatogénicos debido a que actúan protegiendo a los conidios de las temperaturas elevadas (Paixão *et al.*, 2017), de la radiación ultravioleta (Moore *et al.*, 1993; Alves *et al.*, 1998) y de la desecación (Bateman *et al.*, 1993). Además, facilitan la adherencia de los conidios a la superficie del insecto y al sustrato.

### **Uso de hongos entomopatógenos para el control de mosquitos**

El desarrollo de resistencia hacia los insecticidas químicos en diferentes poblaciones de mosquitos (Liu, 2015; Ranson y Lissenden, 2016; Smith *et al.*, 2016; Gray *et al.*, 2018) ha llevado en los últimos años a la búsqueda y desarrollo de insecticidas biológicos. Aunque los resultados demuestren un buen potencial de los hongos entomopatógenos para el control de las poblaciones de mosquitos, hasta el momento no se ha desarrollado un micoinsecticida diseñado para el control de Culicidae (Faria y Wraight, 2007). Los géneros de hongos patogénicos contra mosquitos son *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Culicinomyces*, *Tolypocladium*, *Beauveria* y *Metarhizium* (Scholte *et al.*, 2004). Estos han sido encontrados en la naturaleza provocando epizootias tanto en larvas (mayoritariamente) como en adultos. Por otro lado, también se encontraron aislamientos patogénicos a través de bioensayos realizados en condiciones de laboratorio. Para la implementación de los hongos entomopatógenos en los programas de control se debe tener en cuenta que el agente de control tiene que ser aplicado de manera repetitiva y que el costo se va a reducir con la posibilidad de producción masiva *in vitro* (Scholte *et al.*, 2004). En este último punto los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* presentan una ventaja, por lo que han sido mayormente estudiados tanto para el control de larvas (Alves *et al.*, 2002; Bukhari *et al.*, 2011; Butt *et al.*, 2013; Banu y Balasubramanian, 2014) como de adultos (Blanford *et al.*, 2005; Paula *et al.*, 2013; Valero-Jiménez *et al.*, 2014; Snetselaar *et*

al., 2014) de diferentes especies de mosquitos. En el caso de *M. anisopliae* también presenta efectividad en el control de huevos de *Ae. aegypti* (Sousa *et al.*, 2013).

La patogenicidad de hongos entomopatógenos ha sido demostrada para los diferentes estados de desarrollo de mosquitos. Sin embargo, son los estudios sobre hembras adultas los que echan luz sobre la posibilidad de controlar enfermedades de transmisión vectorial. En este sentido, Clark *et al.* (1968) demostraron por primera vez la susceptibilidad de adultos de tres géneros (*Anopheles*, *Culex* y *Aedes*) frente a *B. bassiana*. Posteriormente, Scholte *et al.* (2003 a) estudiaron la virulencia de diferentes hongos entomopatógenos para el control de *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Diptera: Culicidae), encontrando patogénicos a *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Fusarium* spp., con mortalidades entre 46 y 88% y tiempo letal medio entre 3 y 9 días, dependiendo del aislamiento. Estos autores destacaron la posibilidad de utilizar aislamientos nativos para no introducir especies exóticas, y también que el tiempo de supervivencia del mosquito resultó menor al tiempo requerido para el desarrollo del parásito de la malaria dentro de éste (14 días). El uso de hongos entomopatógenos podría efectivamente reducir la transmisión de la malaria ya que, además de causar la mortalidad, disminuye la tasa de alimentación sanguínea. Además, en el caso del mosquito *Anopheles stephensi* Liston, 1901 el desarrollo de *B. bassiana* dentro del hemocele del insecto, disminuye la formación de esporozoitos del agente etiológico *Plasmodium chabaudi* (Blanford *et al.*, 2005). Sin embargo, al revisar este último punto, Heinig y Thomas, (2015) no encontraron una interacción significativa entre el hongo y el agente causal de la malaria dentro el mosquito.

Los resultados promisorios obtenidos en bioensayos de patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio, acerca del control de *Anopheles* spp. (Scholte *et al.*, 2003 b; Blanford *et al.*, 2005), incentivaron el estudio sobre métodos de aplicación de conidios y formulaciones. La aplicación de propágulos fúngicos sobre las superficies donde habitualmente suelen posarse mosquitos fue estudiada en África para el control de *Anopheles*. Allí se utilizan regularmente cortinas y mosquiteros de cama impregnados con insecticidas sobre los cuales se posa el insecto cuando busca a su hospedador durante la noche (Lindsay *et al.*, 1991; Strode *et al.*, 2014). Basándose en esto, otros autores desarrollaron telas de algodón impregnadas con suspensión de conidios para ser colgadas desde el techo de las viviendas (Scholte *et al.*, 2005) o bien sobre los aleros (Farenhorst *et al.*, 2011), siendo los primeros ensayos realizados en campo. Por otro lado, se demostró que la presencia de conidios de *M. anisopliae* o de *B. bassiana* no afecta el comportamiento de reposo del mosquito sobre una superficie tratada, ya sean telas de

algodón, poliéster o superficies de barro que simulan las paredes de las viviendas, con resultados de 70-80% de mortalidad y persistencia del hongo viable por hasta 28 días (Mnyone *et al.*, 2010). Profundizando este estudio, posteriormente se colocaron telas en diferentes configuraciones tanto en la entrada a la vivienda como en su interior y alrededor de las camas (Mnyone *et al.*, 2012). Otra alternativa de aplicación fue en la superficie de recipientes de barro utilizados para almacenar agua (Farenhorst *et al.*, 2008) que cuentan con la ventaja de presentar un microambiente favorable para la viabilidad del hongo por ser húmedo y oscuro, y que reduce la exposición a la radiación solar.

Como ya se mencionó, gran parte del conocimiento actual acerca del control biológico de mosquitos adultos se asentó sobre el estudio de *Anopheles* en África. Sin embargo, muchas de estas experiencias se pueden utilizar de manera modificada para el control de *Ae. aegypti*, teniendo en cuenta su hábito diurno para la aplicación de conidios. Varios autores demostraron la patogenicidad de distintos aislamientos de hongos entomopatógenos hacia adultos de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio (Scholte *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2008; Leles *et al.*, 2010). En cuanto al método de aplicación se ha planteado el uso de pequeños trozos de tela negra de algodón tratados con conidios (Paula *et al.*, 2013; Carolino *et al.*, 2014). En este caso fueron distribuidos en un ambiente cerrado, simulando ser un aula u oficina de uso cotidiano, y colocados por debajo de mesas y sillas, consiguiendo una mortalidad del 60% a los 7 días de exposición (Paula *et al.*, 2013).

Por último, cabe destacar como modo de aplicación de hongos entomopatógenos, al uso de trampas para capturar e impregnar al mosquito (Lwetoijera *et al.*, 2010; Snatselaar *et al.*, 2014; Mmbando *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2018; Paula *et al.*, 2018). Las mismas cuentan con la presencia de claves olfativas (dióxido de carbono, amonio y ácido carboxílico) y claves visuales (telas negras). Tienen como ventaja la no exposición del hombre a los conidios permanentemente y que, al ser transportables, se pueden utilizar dentro y fuera del hogar.



## Capítulo II

**Selección del aislamiento de *Metarhizium anisopliae* más eficiente para control de adultos de *Aedes aegypti*, y aplicación del inóculo en telas**

## Introducción

La variación intraespecífica dentro de los hongos entomopatógenos determina la existencia de diferentes aislamientos o cepas fúngicas. Estos grupos, con variaciones genéticas que se determinan a través de técnicas bioquímicas y moleculares (Bidochka *et al.*, 1994; Sibao *et al.*, 2005), pueden presentar diferencias en su relación con un hospedador o con el medio ambiente. Es así que distintos aislamientos pueden presentar diferente rango de hospedadores, niveles de infección, tasa de germinación y rango ecológico. Así, por ejemplo, la susceptibilidad del hospedador *Anopheles coluzzii* Coetzee y Wilkerson, 2013 presenta variaciones frente al uso de diferentes aislamientos de *B. bassiana* (Valero-Jiménez *et al.*, 2014). Además, entre los aislamientos fúngicos existen variaciones en la capacidad de tolerar factores ambientales extremos, como por ejemplo la radiación ultravioleta (Braga *et al.*, 2001c; Fernandes *et al.*, 2007) o el clima desértico (Aguilera *et al.*, 2016). Debido a esto, es importante seleccionar un aislamiento fúngico adecuado basándose en la especie que se desee controlar y al lugar donde se va a dispersar.

El primer paso en el desarrollo de un programa de control microbiano es la evaluación de la actividad biológica de un patógeno en el laboratorio mediante bioensayos. Uno de los objetivos particulares de esta sección fue estudiar la patogenicidad de diferentes aislamientos fúngicos de *M. anisopliae* sobre adultos de *Ae. aegypti*. Se define como patogenicidad a la capacidad de un microorganismo de infectar a un huésped y provocarle una enfermedad. Según Thomas y Elkinton (2004), involucra la infectividad y la virulencia. La infectividad se refiere a la capacidad de un patógeno de invadir y establecerse dentro del hospedador. La virulencia es la gravedad con que se manifiesta la enfermedad y es un término cuantitativo que se mide a través de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), es decir la concentración requerida para matar al 50% de los huéspedes expuestos al patógeno. Otra característica a tener en cuenta es la agresividad del aislamiento. Esta se cuantifica a través del tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), que es el tiempo en el cual se muere el 50% de la población expuesta al patógeno. Para calcular la virulencia y la agresividad se debe tener certeza de que el insecto murió a causa del hongo entomopatógeno y no por otro factor (Thomas y Elkinton, 2004). La patogenicidad, la infectividad, la virulencia y la agresividad son características propias del aislamiento pero son medidas como una respuesta de un hospedador particular y en un ambiente determinado (Casadevall y Pirofski, 2001).

Asimismo, otro factor importante a tener en cuenta en los programas de control es la forma en la cual se aplica el producto y la formulación. Como ya se mencionó en el primer capítulo, se han estudiado diversas maneras de inocular conidios sobre diferentes superficies. Conocer y tener en cuenta el comportamiento de reposo de *Ae. aegypti* puede permitir optimizar el proceso de infección. Los sitios de preferencia para el reposo son lugares en el interior de las viviendas, por debajo de 1,5 m de altura, especialmente dormitorios y salas de estar (Perich *et al.*, 2000; Chadee 2013, Dzul-Manzanilla *et al.*, 2017). En relación al tipo de objetos que utilizan, los machos dan preferencia a los objetos fijos como paredes, mientras que las hembras, además de encontrarse sobre las paredes, también reposan sobre objetos con menor exposición, como muebles y objetos colgantes. El tipo de material en el cual predominan son cemento, madera y superficies textiles (Perich *et al.*, 2000).

En este trabajo se pretende encontrar un método de aplicación de conidios que favorezca la infección y posterior mortalidad de adultos de *Ae. aegypti*. En este capítulo se describen la metodología y los resultados obtenidos de los bioensayos realizados tanto por la aplicación directa como indirecta de conidios. En la primera el inóculo se aplicó por aspersión directamente sobre los mosquitos. En la segunda, el inóculo se aplicó de manera indirecta, es decir sobre la superficie de diferentes telas, sobre las cuales los mosquitos tuvieron que posarse para entrar en contacto con el mismo. Un segundo objetivo particular de este capítulo, fue determinar sobre cada sustrato utilizado la infectividad y viabilidad de los conidios allí aplicados. El fin último del método indirecto fue conseguir un tratamiento focal en superficies de uso doméstico, fáciles de encontrar en los domicilios donde se cría este insecto.

## **Materiales y Métodos**

### **1- Origen y mantención de la colonia de *Ae. aegypti* en el laboratorio**

Los individuos utilizados en todos los ensayos descritos en este capítulo fueron criados en la colonia de *Ae. aegypti* instalada en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, CONICET-UNLP). La misma se inició en el año 1994 a partir de ejemplares recolectados en la Ciudad de La Plata, Buenos Aires. Se mantuvo en el laboratorio hasta la actualidad, según el método estándar para cría de culícidos descrito por Gerberg *et al.* (1994). El protocolo de cría de mosquitos se desarrolló en un bioterio bajo condiciones controladas de temperatura y HR, monitoreadas a través de un termohigrómetro (E9155020, AMARELL, Alemania). La temperatura se mantuvo a  $28 \pm 2$  °C utilizando radiadores para calefacción por agua caliente en invierno y además una estufa eléctrica con termostato. La HR se mantuvo a  $75 \pm 15\%$  utilizando un humidificador de ambiente eléctrico, programado para que libere vapor de agua durante 15 minutos continuos y en intervalos de 90 minutos. Además, se mantuvo un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (figura 5 a). A continuación se describen los procedimientos realizados para cada estado del ciclo de vida de los mosquitos.

#### Adultos

Los adultos de *Ae. aegypti* se distribuyeron en dos jaulas de acrílico cúbicas, de 40 cm de lado (figura 5 b), con una manga en la zona frontal. Una fue la jaula de emergencia, donde emergieron los adultos a partir de las pupas y se mantuvieron en esta jaula por hasta una semana. Posteriormente, fueron transferidos a la denominada jaula de cría donde ocurrió la alimentación sanguínea de las hembras y la puesta de huevos. En esta última, se introdujo dos veces por semana una gallina inmovilizada durante 40 minutos, para suplir la necesidad hematófaga de las hembras. Luego, se ubicaron en el interior de la jaula tres ovitrampas compuestas por un recipiente de plástico negro (8 cm de altura x 10 cm de diámetro) dentro del cual se introdujo un cartón corrugado rectangular (32 cm de base x 10 cm de altura), recubriendo la pared del mismo, y 20 ml de agua declorinada. Allí las hembras depositaron los huevos. Ambas jaulas fueron provistas de pasas de uva, como fuente de hidratos de carbono, y de agua a través de un recipiente invertido cubierto de tela de voile.

### Huevos

El cartón corrugado contenido en cada ovitrampa fue retirado de la jaula de cría 72 h luego de la ingesta sanguínea, es decir luego de la oviposición. Se dejó secar dentro del bioterio a  $28 \pm 2$  °C para finalizar el desarrollo del embrión y eliminar el exceso de agua. Luego se conservaron los cartones secos con huevos dentro de bolsas plásticas a temperatura ambiente (figura 5 c). De esta forma se preservaron los huevos durante varios meses, con una vida media de hasta 1 año.

### Estados acuáticos (larvas)

Una vez por semana se colocó el cartón corrugado con los huevos dentro de una bandeja de plástico (53 cm de largo x 39 cm de ancho x 12 cm de altura), conteniendo 15 litros de agua de clorinada. Allí eclosionaron los huevos y a medida que se desarrollaron las larvas, fueron transferidas a bandejas más pequeñas (30 cm de largo x 22 cm de ancho x 7 cm de altura) con 2,5 litros de agua de clorinada. En estas bandejas la densidad poblacional fue menor (300 larvas/litro) y se consiguió un correcto desarrollo de las larvas hasta alcanzar el estado de pupa. Para la nutrición de las larvas, se utilizó alimento balanceado para conejos que fue molido en un triturador doméstico para granos de café, y de esta forma espolvoreado sobre las bandejas (figura 5 d).

### Estados acuáticos (pupas)

Cuando las larvas alcanzaron el estado de pupa (figura 5 d) fueron retiradas de las bandejas y colocadas en un recipiente de plástico con 800 ml de agua de clorinada que fue ubicado en la jaula de emergencia, hasta la obtención de adultos.



**Figura 5:** Cría de *Ae. aegypti* en laboratorio. a) Dispositivos utilizados para el control de las variables ambientales dentro del bioterio. b) Jaulas de cría y de emergencia de los adultos, y detalle de una ovitrampa. c) Cartón corrugado con postura de huevos y su almacenamiento en bolsas plásticas. d) Bandejas con huevos inundados en agua, estadios larvales (L1-L4) y pupas.

## 2- Origen y preservación *in vitro* de aislamientos de *M. anisopliae*

Se utilizaron nueve aislamientos nativos de *M. anisopliae*: CEP 085, CEP 087, CEP 120, CEP 122, CEP 350, CEP 404, CEP 409, CEP 415 y CEP 423. Los datos de colecta, origen geográfico, insecto hospedador, sustrato y método de aislamiento de las cepas utilizadas se describen en la tabla 1. Dichos aislamientos se encuentran preservados en la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE (CONICET-UNLP) (indexada en la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos N° S1-06 y en la Federación Mundial de Colecciones de cultivos, N° 973).

Aislamiento fúngico	Lugar de recolección	Fecha de recolección	Hospedador	Tipo de ambiente (sustrato)	Método de aislamiento
CEP 085 †	Los Hornos, La Plata, Bs. As.	30/03/2004	<i>Kanaima fluvialis</i> (Hemiptera: Cercopidae)	Sobre <i>Eryngium</i> sp. (Apiales: Apiaceae)	Directo desde insecto
CEP 087 †	Abasto, La Plata, Bs. As.	07/04/2004	Hemiptera: Cercopidae (especie no identificada)	Sobre <i>Eryngium</i> sp.	Directo desde insecto
CEP 120 †	Abasto, La Plata, Bs. As.	12/05/2004	<i>Kanaima fluvialis</i>	Sobre <i>Eryngium</i> sp.	Directo desde insecto
CEP 122 † ARSEF 8527	Abasto, La Plata, Bs. As.	18/05/2004	Hemiptera: Cercopidae (especie no identificada)	Sobre <i>Eryngium</i> sp.	Directo desde insecto
CEP 350 ‡	Campo Ramón, Misiones	14/05/2009	-	Suelo de <i>Ilex paraguariensis</i> (cultivo convencional de yerba mate)	Desde suelo por medio de cultivo selectivo
CEP 404 ♦	Pocito, San Juan	31/11/2012	-	Suelo árido de cultivos orgánicos	Desde suelo por insecto trampa ( <i>T. molitor</i> )
CEP 409 ♦	Pocito, San Juan	18/11/2012	-	Suelo árido de cultivos convencionales	Desde suelo por insecto trampa ( <i>T. molitor</i> )
CEP 415 Δ	Parque Nacional El Palmar, Entre Ríos.	11/06/2013	Blattodea (especie no identificada)	Hojarasca	Directo desde insecto
CEP 423	Tolosa, La Plata, Bs. As.	15/03/2013	-	Suelo de jardín urbano	Desde suelo por insecto trampa ( <i>T. molitor</i> )

**Tabla 1:** Aislamientos de *M. anisopliae* utilizados en esta tesis y preservados en la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE (CONICET-UNLP). Se indican los datos de colecta, origen geográfico, hospedador, sustrato y método de aislamiento de las cepas. †Toledo *et al.* (2008). ‡Schapovaloff (2012). ♦Aguilera (2016). ΔGutiérrez (2015).

Para realizar los ensayos descritos en este capítulo las cepas de interés fueron recuperadas de la Colección tanto desde el método de criopreservación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en glicerol 10%, como a partir de la preservación de cepas en papel a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estos y otros métodos de preservación utilizados para conservar el germoplasma de las cepas fúngicas en la Colección de Hongos del CEPAVE se describen en Gutiérrez *et al.*, (2017 b). Cuando se comenzó a trabajar en esta tesis, las primeras transferencias se realizaron a partir de los aislamientos preservados en la Colección con el método de criopreservación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  con glicerol 10%. Una vez recuperadas las cepas de hongos de interés desde la Colección, y de haber sido corroborada la patogenicidad de los aislamientos de *M. anisopliae* sobre *Ae. aegypti* (mediante ensayos preliminares), para la realización de las actividades posteriores se procedió a aislar el hongo de manera directa desde el cadáver (Lecuona, 1996) de *Ae. aegypti* cada vez que era inoculado e infectado. Luego, se preservó a cada aislamiento en papel (Gutiérrez *et al.*, 2017 b) para realizar las nuevas transferencias cada vez que se requería el material. De esta manera, se consiguió homogeneizar la calidad de los conidios y mantener a los aislamientos virulentos al obtenerlos siempre directamente del hospedero (denominado comúnmente “primer repique”).

La manipulación de los cultivos fúngicos siempre se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Se trabajó en una cámara de flujo de laminar y con todo el material esterilizado en autoclave tipo Chamberlain a  $120^{\circ}\text{C}$  y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

### **3- Selección del aislamiento más eficiente para control de adultos de *Ae. aegypti***

#### **3.1 Ensayo preliminar de patogenicidad de cepas de *M. anisopliae* contra *Ae. aegypti***

El objetivo de este ensayo fue seleccionar los aislamientos a utilizar realizando un pasaje por hospedero, es decir obtener el primer repique a partir de *Ae. aegypti*. Se evaluó la patogenicidad de las cepas de manera preliminar. Cada cepa se repicó en placas de Petri (10 cm diámetro) conteniendo medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar suplementado con extracto de levadura (SDAY<sub>1/4</sub>) (ver anexo). Durante 15 días fueron incubadas a  $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y fotoperíodo 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Cuando estos cultivos estuvieron esporulados se colocaron cinco adultos de *Ae. aegypti* dentro de la placa de cultivo, durante 3 h. Luego los insectos fueron transferidos a recipientes de plástico (7 cm diámetro x 7 cm altura) con provisión de agua y pasas de uva como alimento. Durante 10 días se controló la mortalidad diaria, se separó a los insectos muertos y se verificó la infección fúngica en

cámaras húmedas, procedimiento que se detallará en la sección 3.2.3 de bioensayos (página 38). En los casos en que se encontraron cadáveres con proliferación del hongo *M. anisopliae*, el mismo fue aislado directamente desde el insecto (Lecuona, 1996) en medio selectivo para aislar hongos entomopatógenos (ver anexo). Luego de 15 días de incubación a  $25 \pm 1$  °C, se transfirió a una placa de Petri (6 cm de diámetro) con medio de cultivo SDAY<sub>¼</sub>, a partir de la cual fueron preservados en papel.

Los ensayos que se describen a continuación fueron realizados utilizando solo las cepas fúngicas que resultaron patogénicas para *Ae. aegypti* en los ensayos preliminares. Estas fueron: CEP 085, CEP 087, CEP 120, CEP 350, CEP 404 y CEP 423.

### **3.2 Evaluación de la viabilidad de los aislamientos de *M. anisopliae* y de virulencia contra *Ae. aegypti***

Se realizó una aplicación del inóculo de manera directa sobre los mosquitos por aspersion utilizando un micropulverizador (aerógrafo) (FENGDA, modelo BD180, China). En paralelo a los bioensayos se evaluó la viabilidad de los aislamientos *in vitro* como medida de control de calidad de estos, es decir para corroborar que las condiciones ambientales utilizadas durante el bioensayo y las de almacenamiento, no resultaran perjudiciales para el hongo.

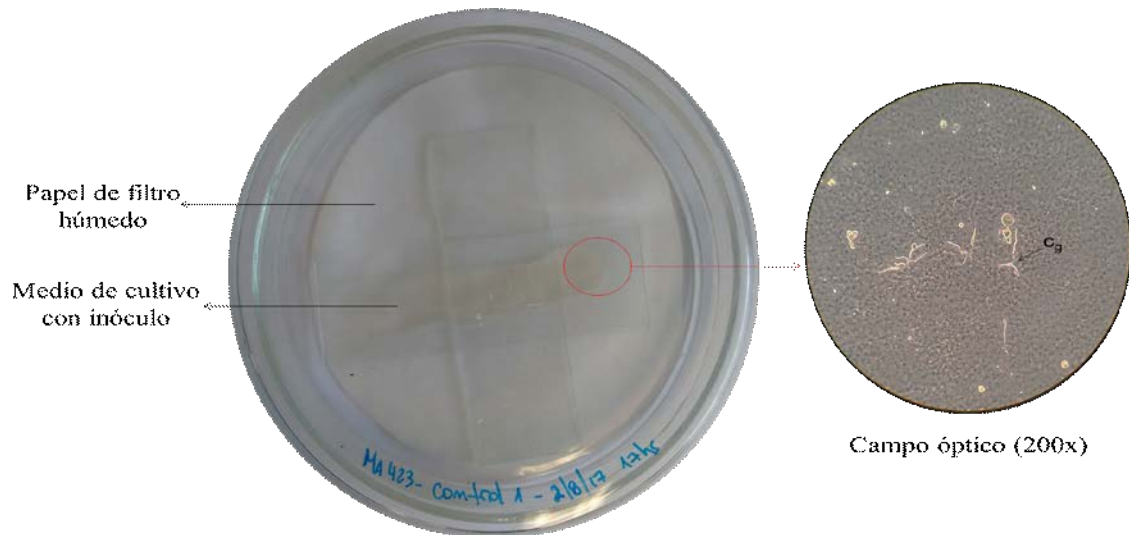
#### **3.2.1 Preparación del inóculo**

Los aislamientos fueron cultivados en placa de Petri (10 cm de diámetro) con medio de cultivo SDAY<sub>¼</sub> durante 15 días, en incubadora a  $25 \pm 1$  °C. Se preparó una suspensión de conidios raspándolos desde la superficie de 6 placas de cultivo utilizando una espátula, esterilizada en la llama de un mechero Bunsen, y resuspendiéndolos en un tubo de centrifuga (Falcon®) con 15 ml de Tween 80 (polisorbato de sodio) 0,01% v/v, diluido en agua destilada, y perlitas de vidrio. Se agitó en vórtex durante 5 minutos y se filtró a través de un embudo con un algodón hidrofílico. A partir de esta suspensión, la denominada suspensión madre (figura 7 b), se prepararon diluciones seriadas de 1 ml, en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml (Eppendorf), con factores de dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , utilizando Tween 80 acuoso 0,01% v/v. A partir de la última dilución, se determinó la concentración de conidios de la suspensión madre, utilizando una cámara de Neubauer. Se

prepararon nuevamente suspensiones con Tween 80 acuoso 0,01% v/v, ajustando a las concentraciones requeridas para cada bioensayo (sección 3.2.3, página 38).

### 3.2.2 Viabilidad

La viabilidad de los conidios fue estimada a partir de las suspensiones preparadas para la realización de los bioensayos. La misma fue evaluada como el porcentaje de germinación de conidios *in vitro*. Se utilizó la técnica modificada de Lane *et al.* (1988). Se acondicionó una placa de Petri (10 cm de diámetro) con un papel de filtro humedecido con 1 ml de agua destilada estéril y por encima de este se colocaron dos portaobjetos ubicados perpendicularmente, uno conteniendo 500  $\mu$ l de medio de cultivo SDAY<sub>1/4</sub> de 2 mm de espesor (figura 6). Se inoculó con una pipeta automática 100  $\mu$ l de una suspensión de conidios de  $10^6$  conidios/ml sobre el medio de cultivo y se distribuyó homogéneamente con una espátula de Drigalsky. Cada placa de Petri se incubó por 24 h a  $25 \pm 1$  °C. Luego se cuantificó mediante un microscopio óptico de contraste de fases (200x) (Olympus Bx41), el número de conidios germinados y no germinados sobre un total de 600 conidios por placa, observados en tres campos ópticos distintos. Se consideró un conidio germinado cuando el tubo germinativo alcanzó la mitad de la longitud máxima de la espora. El procedimiento se realizó por triplicado. Los ensayos de viabilidad se realizaron en simultáneo a cada bioensayo, en tres repeticiones independientes.



**Figura 6:** Ensayo de viabilidad de *M. anisopliae*. Cámara húmeda conformada por una placa de Petri conteniendo dos portaobjetos ubicados perpendicularmente, uno de ellos con una delgada capa de medio de cultivo SDAY<sub>1/4</sub>. En la base se encontraba un papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. A través de un microscopio óptico se observaron los conidios germinados ( $c_g$ ) y no germinados.

### 3.2.3 Bioensayos

Para la realización de los bioensayos se utilizaron adultos de *Ae. aegypti* de 3 a 7 días post-emergidos, criados en las condiciones de laboratorio como ya se ha descrito. Fueron alimentados con pasas de uva, sin la administración de un hospedador sanguíneo. Los insectos se tomaron de la jaula de emergencia utilizando un aspirador manual o uno a batería y para su manipulación se anestesiaron con CO<sub>2</sub> (figura 7 a) por no más de 10 segundos a 50 kg/cm<sup>2</sup> de presión y un flujo máximo de 15 litros/minuto. Utilizando un pincel, se colocaron 10 individuos en una placa de Petri (10 cm diámetro x 1 cm altura) que se cubrió con un tejido de mosquitero de 15 cm de lado (49 agujeros/cm<sup>2</sup>) sujetándolo con una banda elástica (figura 7 b). El tejido utilizado fue previamente descontaminado sumergiéndolo en una solución de hipoclorito de sodio 1% v/v durante 1 hora, luego enjuagado con abundante agua y secado. Por cada cepa a inocular se prepararon cinco placas de Petri. A una de estas se le aplicó Tween 80 acuoso 0,01 v/v sin inóculo correspondiéndose con el control del experimento. Las otras cuatro fueron rociadas con suspensiones de conidios de distintas concentraciones,  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml. Se realizaron tres repeticiones independientes por cada cepa y concentración, utilizando un total de 30 individuos por tratamiento.

Una vez que los mosquitos recuperaron su movilidad dentro de la placa de Petri, se procedió a realizar la aplicación de las suspensiones realizadas. Para esto se utilizó un micropulverizador (aerógrafo) (figura 7 b) acoplado a un compresor de flujo continuo de aire con compresión constante de 5 lb de salida. Así el líquido se aplicó por aspersión en forma de finas gotas y bajo una presión constante. De este modo se consiguió que la aplicación fuese homogénea hacia todos los insectos, ubicándolo siempre a 15 cm de distancia. Antes y después de utilizar el aerógrafo se lo limpió con alcohol 70% v/v y agua destilada. Se inoculó primero el control con 0,5 ml de Tween 80 acuoso 0,01% v/v y los adultos fueron transferidos a recipientes plásticos (7 cm altura x 7 cm diámetro) cubiertos con tela de voile. Luego se roció 0,5 ml de las suspensiones de conidios, de cada una de las concentraciones preparadas ( $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml) comenzando por la menos concentrada y en orden creciente de concentración. A continuación se traspasó a los insectos a recipientes de plástico (7 cm de diámetro x 7 cm altura) cubiertos con tela de voile. Los recipientes utilizados contenían en su interior un vial de plástico de 1,8 ml (45 mm alto x 11 mm diámetro) con un algodón humedecido, rodeado de un papel de filtro de modo que el agua subiera por capilaridad. Por encima de la tela de voile se colocaron dos pasas de uva (figura 7 c). Se mantuvo a los insectos en un ambiente a  $28 \pm 2$  °C y  $75 \pm 15\%$  de HR durante 10 días.

Diariamente, se registró el número de insectos muertos por día y estos fueron retirados con un pincel estéril a través de una abertura en el recipiente cubierta con cinta de papel (figura 7 c). Para confirmar la infección fúngica, los insectos muertos fueron sumergidos en hipoclorito de sodio 0,5% v/v durante 1 minuto, secados sobre un papel de filtro estéril, y luego colocados en cámaras húmedas (figura 7 c). Las mismas consistían en placas de Petri acondicionadas de manera similar a las utilizadas para evaluar la viabilidad pero sin medio de cultivo. Estas fueron incubadas por hasta 10 días a  $25 \pm 1$  °C. En los casos en los que ocurrió la infección se verificó la presencia de *M. anisopliae* sobre la cutícula del insecto y se procedió al nuevo aislamiento y posterior preservación en papel.

a) Manipulación del estado adulto de *Aedes aegypti*b) Inoculación de *Metarhizium anisopliae* sobre *Aedes aegypti*c) Mantenimiento de *Aedes aegypti* luego de la inoculación hasta la muerte y confirmación de la infección fúngica

**Figura 7:** Bioensayos de patogenicidad de *M. anisopliae* sobre adultos de *Ae. aegypti* por aplicación directa del inóculo. a) Dispositivos utilizados para la manipulación de mosquitos adultos: aspirador y tubo de CO<sub>2</sub>. b) Suspensión madre de *M. anisopliae*, aerógrafo utilizado para la inoculación y placa de Petri cubierta con un tejido de mosquitero, conteniendo 10 individuos. c) Recipientes plásticos en los cuales se mantuvo a los adultos durante 10 días y remoción de los insectos muertos a través de una abertura utilizando un pincel. Además, se observa una cámara húmeda utilizada para confirmar la infección fúngica.

### 3.2.4 Variables registradas y análisis de datos

#### Viabilidad

La variable medida fue la proporción de conidios germinados sobre un total de 600 conidios contados por cámara húmeda, luego de 24 h de incubación. Este valor se calculó por triplicado para cada cepa utilizada, realizando tres repeticiones independientes ( $N = 9$ ). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa de computación InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015). Los datos fueron transformados con la función arcoseno-raíz cuadrada. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene y la normalidad de los residuos a través de la prueba de Shapiro-Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu (1997). Las diferencias entre los valores medios de viabilidad para cada aislamiento se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con nivel de significancia de 95%. Se realizaron comparaciones post-hoc de Tukey con nivel de significancia global de 95%.

#### Supervivencia

Se estudió para cada aislamiento el efecto de la concentración de conidios en la probabilidad de supervivencia de los mosquitos a lo largo del tiempo. También, se analizó si había un efecto de la cepa fúngica utilizada, para cada concentración. Con este fin, para cada uno de los 30 individuos utilizados en cada tratamiento (control,  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  o  $10^8$  conidios/ml) fue medido el tiempo de supervivencia (TS), es decir el tiempo durante el cual permanecieron vivos, y se obtuvo el valor promedio y la mediana para el control y para cada concentración, de cada cepa fúngica utilizada. En las condiciones en que se realizaron los ensayos, el valor máximo que pudo tomar el TS correspondió a 10 días por ser el tiempo de duración del ensayo. Es importante aclarar que algunos individuos sobrevivieron al día 10 de observación del ensayo y se desconoce el verdadero tiempo de supervivencia de estos. Para el cálculo de TS (media  $\pm$  D.E y mediana  $\pm$  M.A.D.) se asignó a estos individuos el valor de TS máximo.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa R. 3.4.4 (R Core Team, 2018). Se realizó la comparación entre las curvas de supervivencias de Kaplan-Meier mediante un análisis de Log-Rank (Kleinbaum y Klein, 2012), con nivel de significancia de 95%. Estas curvas evalúan la probabilidad de supervivencia en función del tiempo de

observación del bioensayo. Para poder realizarlas se debió medir el tiempo hasta la ocurrencia de un evento. En este caso se designó como evento a la muerte de un insecto. En el cálculo de la probabilidad de supervivencia, este análisis tuvo en cuenta a los datos censurados, es decir aquellos que en los 10 días de observación no murieron. En esta sección se incluyó en el análisis a todos los individuos muertos, ya sea con o sin confirmación de la infección fúngica.

En el caso de encontrar diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), se realizaron comparaciones post-hoc entre pares de curvas, modificando el nivel de significancia de cada comparación ( $\alpha_i$ ) para que la significancia global sea de 95% (Lyman Ott y Longnecker, 2010). Se utilizó la corrección de Dunn-Šidak (ver anexo) (Šidak, 1967). En el caso del efecto de la concentración se realizaron diez comparaciones con una significancia individual por cada comparación ( $\alpha_i$ ) de 0,0051. Para el efecto entre cepas, se realizaron 15 comparaciones con  $\alpha_i$  de 0,0034 en cada una.

#### Mortalidad por infección fúngica confirmada

Se calculó la proporción de individuos de *Ae. aegypti* infectados con *M. anisopliae*, para cada aislamiento y para cada concentración. En este caso, solamente se tuvieron en cuenta a los adultos muertos con infección fúngica confirmada, por ende fueron descartados aquellos que murieron por causas desconocidas, probablemente durante la manipulación. Se calculó el porcentaje de infección acumulado luego de 10 días posteriores al inicio del tratamiento.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico R 3.4.4. Se realizó un análisis de proporciones con aproximación Chi cuadrado. En caso de encontrar diferencias significativas se realizaron comparaciones post-hoc de a pares ajustando la significación de cada comparación individual según el método de Dunn-Šidak, para que el nivel de significancia global sea de 95%. Por un lado, se analizó el efecto de la concentración de conidios en el grado de infección de adultos de *Ae. aegypti* dentro de cada aislamiento. Se debieron realizar seis comparaciones entre pares, cada una con  $\alpha_i$  de 0,0085. Por otro lado, para cada concentración se analizó si existieron diferencias en la proporción de individuos infectados entre los aislamientos. Se realizó el mismo análisis estadístico. En este caso debieron realizarse 15 comparaciones de a pares, cada una con  $\alpha_i$  de 0,0034.

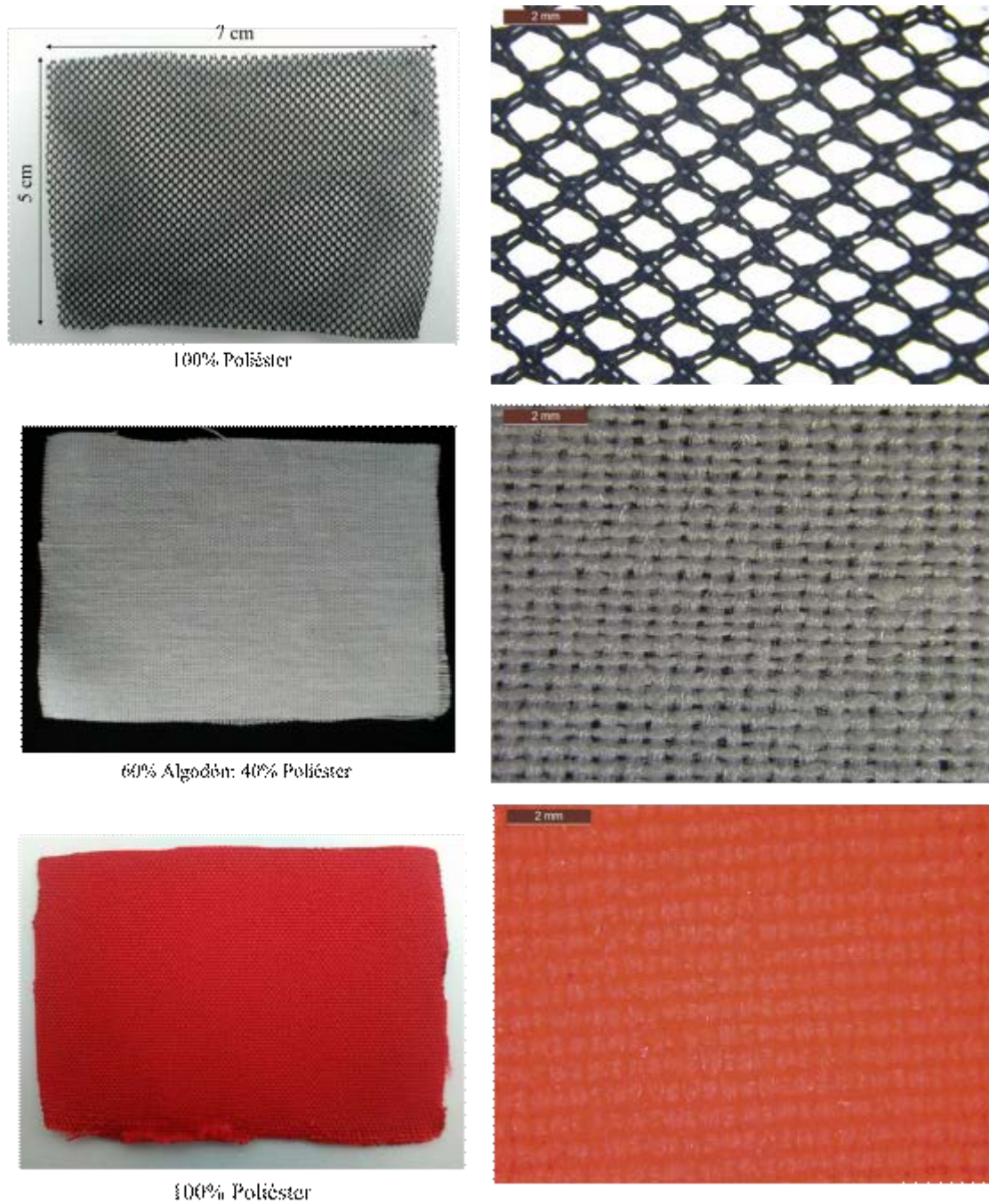
### Agresividad y virulencia

Como medida de la agresividad de cada aislamiento se estimaron los valores de tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) y tiempo letal 90 (TL<sub>90</sub>). Para estimar la virulencia se calculó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de cada aislamiento. Se tuvo en cuenta solo a los individuos que presentaron una infección fúngica verificada en cámara húmeda, y solo a los casos en que el porcentaje de infección superó el 50%. Los valores de TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub>, y sus respectivos intervalos de confianza de 95% (IC<sub>95</sub>), se calcularon en relación a la concentración  $5 \times 10^7$  conidios/ml. Se utilizó el programa estadístico para datos correlacionados desarrollado por Throne *et al.* (1995) (USDA, del inglés *United States Department of Agriculture*) y el Mathematica 5.2 (Wolfram). Además, se realizaron análisis para determinar la curva de dosis-respuesta y estimar las CL<sub>50</sub>, y sus respectivos IC<sub>95</sub>, utilizando la versión 1.5 del programa estadístico Probit US-EPA (del inglés *United States Environmental Protection Agency*). Las CL<sub>50</sub> se calcularon teniendo en cuenta el valor acumulado de los individuos muertos e infectados con *M. anisopliae* en el día 10 post-tratamiento. Las diferencias entre los valores, tanto de TL como de CL, fueron consideradas significativas ( $P < 0,05$ ) si no había superposición de los IC<sub>95</sub> entre los aislamientos.

## **4- Inoculación de conidios de *M. anisopliae* en telas**

### 4.1 Sustratos utilizados

Se utilizaron tres tipos de superficies textiles de uso cotidiano. Dos de ellas corresponden a telas que podrían utilizarse en la confección de cortinas y una tercera que podría utilizarse como mosquitero en las ventanas de los hogares. Se recortaron rectángulos de 35 cm<sup>2</sup> (5 cm de altura x 7 cm de base) de cada sustrato, donde se aplicó el inóculo con la metodología que se describe a continuación. Por un lado, se empleó una tela blanca de composición 60% algodón y 40% poliéster cuyo entramado de fibras conformaban una estructura de 400 orificios/cm<sup>2</sup>. Además, se utilizaron sustratos de composición totalmente inorgánica, 100% poliéster. Estos fueron una tela roja de 320 orificios/cm<sup>2</sup> y un tejido negro de 64 orificios/cm<sup>2</sup> (figura 8).



**Figura 8:** Sustratos textiles de 35 cm<sup>2</sup> utilizados para la inoculación del aislamiento de *M. anisopliae* seleccionado y detalle de las tramas de cada tejido observado bajo lupa (10X). La línea de escala corresponde a 2 milímetros.

#### 4.2 Preparación y aplicación del inóculo

A partir del aislamiento seleccionado como el más eficiente contra *Ae. aegypti*, se preparó una suspensión de conidios en Tween 80, 0,01% v/v siguiendo el procedimiento que se describió en la sección 3.2.1 (página 36). Se ajustó la concentración final a  $3 \times 10^8$

conidios/ml. La suspensión se aplicó de manera homogénea, sobre cada rectángulo de cada uno de los tres tipos de tela, utilizando un aerógrafo a 15 cm de distancia (figura 9 a). Se aplicó 0,5 ml sobre cada lado (1 ml en total por rectángulo). La concentración final sobre la superficie se midió recortando 1 cm<sup>2</sup> de la zona central de la tela que fue resuspendido en 1 ml de Tween 80 0,01% v/v y agitado en vórtex a 20 rpm durante 3 minutos. De la suspensión resultante se registró la concentración de conidios bajo un microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer, y esta fue equivalente a 10<sup>6</sup> conidios/cm<sup>2</sup>. Este valor fue el resultante de promediar tres rectángulos de forma previa a la realización del bioensayo.

Antes de aplicar el producto todos los sustratos fueron esterilizados en autoclave. Se realizaron los bioensayos con dos tiempos de exposición de los mosquitos al inóculo, 6 y 24 h. También se evaluó la viabilidad de los conidios sobre cada tela a lo largo del tiempo, 1, 2 y 15 días luego de la aplicación. Con este fin, en cada repetición se rociaron de manera simultánea dos rectángulos de cada tipo de tela con 1 ml (0,5 ml de cada lado) de Tween 80, 0,01% v/v, para realizar los controles. Además, se rociaron tres rectángulos de cada sustrato con la suspensión de *M. anisopliae* de 3 x 10<sup>8</sup> conidios/ml (0,5 ml de cada lado). Antes de exponer a los mosquitos a las mismas, todas las telas se mantuvieron en una incubadora a 25 ± 1 °C durante 24 h para que se evapore el exceso de líquido. Las telas que se utilizaron para realizar las mediciones de la viabilidad de los conidios a los 15 días fueron almacenadas en incubadora a 25 ± 1 °C, hasta su utilización.

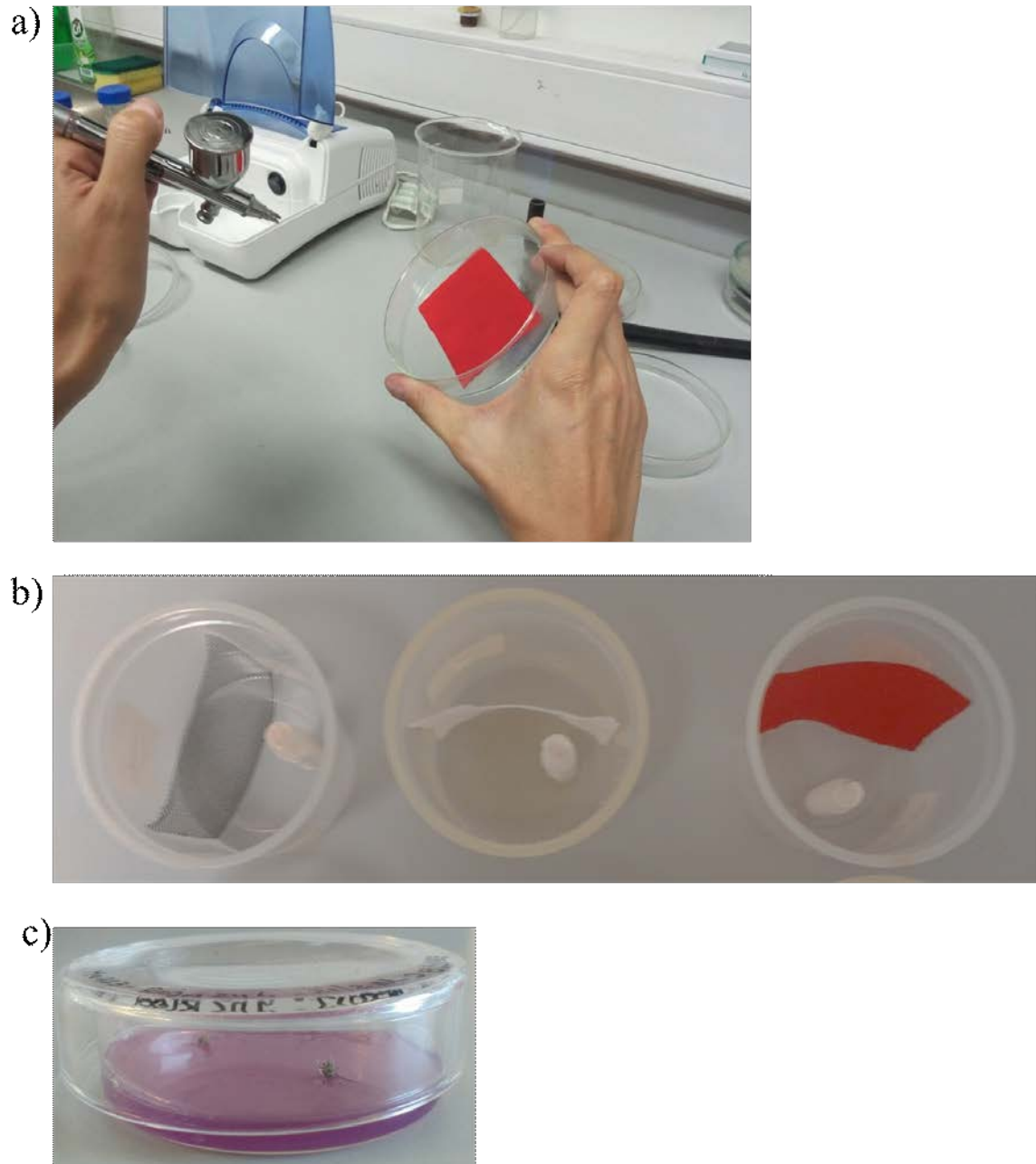
#### 4.3 Bioensayos

La exposición de los insectos a los conidios se realizó en recipientes plásticos (7 cm de diámetro x 7 cm altura) que contenían en su interior un vial de 1,8 ml (45 mm alto x 11 mm diámetro) con un algodón humedecido, rodeado de un papel de filtro de modo que el agua subiera por capilaridad. Dentro de cada uno, se colocó un tipo de tela, control o tratada con el inóculo, correspondientemente (figura 9 b). Los individuos utilizados presentaron las mismas condiciones de crecimiento, alimentación y estado fisiológico que los utilizados anteriormente. Se colocó en cada recipiente a 10 individuos adultos de *Ae. aegypti* adormecidos con CO<sub>2</sub>. Se cerró por encima con tela de voile y se colocaron pasas de uva por encima de esta. Se dejó al sustrato dentro del recipiente para que los mosquitos pudieran tener contacto con el mismo.

Transcurrido el tiempo de exposición de 6 o 24 h, los mosquitos fueron transferidos a recipientes limpios con provisión de agua y pasas de uva. Al igual que en el bioensayo anterior, se mantuvo a los insectos en un ambiente a  $27 \pm 1$  °C y  $75 \pm 15\%$  de HR. Durante 10 días se registró el número de insectos muertos por día. Se procedió de igual manera para retirar a los insectos muertos. La confirmación de la infección fúngica en este caso se realizó colocando a los insectos muertos (previamente lavados superficialmente con hipoclorito de sodio 0,5% v/v durante 1 minuto y secados sobre un papel de filtro estéril) en placas de Petri con agar-agua-cristal violeta y antibiótico (ver anexo) que actuó como cámara húmeda (figura 9 c). Estas fueron incubadas por hasta 10 días a  $25 \pm 1$  °C o hasta observar la presencia de *M. anisopliae* en el exterior del cadáver. Cada bioensayo se repitió cuatro veces de forma independiente, utilizando un total de 40 individuos por tratamiento.

#### 4.4 Viabilidad de los conidios sobre los sustratos a diferentes tiempos post-aplicación

Luego de retirar cada una de las telas cumplidas las 6 o 24 h de exposición, respectivamente, se recortó 1 cm<sup>2</sup> del centro de cada sustrato. Este fue suspendido en 1 ml de Tween 80 acuoso, 0,01% v/v. Luego se agitó en vórtex durante 3 minutos a 20 rpm para conseguir liberar mecánicamente a los conidios del tejido y así formar una suspensión de conidios. Estas telas habían sido inoculadas el día previo a la realización del bioensayo, por lo cual corresponden a los tiempos post-aplicación de 1 y 2 días, respectivamente. Se procedió de igual forma con las telas que se almacenaron durante 15 días luego de la aplicación del inóculo. De cada suspensión, se sembraron 100 µl de concentración 10<sup>6</sup> conidios/ml en una placa de Petri (10 cm de diámetro) acondicionada como cámara húmeda y con medio de cultivo SDAY<sub>1/4</sub> suplementado con cloranfenicol 0,05% p/v para inhibir la proliferación de bacterias que pudieran estar presentes en el sustrato. Se prosiguió como se detalla en la sección 3.2.2 (página 37). La viabilidad del aislamiento también se midió en cada repetición, antes de la inoculación sobre las telas. Se verificó que esta superara el 90% de conidios germinados, siguiendo la misma metodología ya explicada. Se realizaron tres repeticiones independientes (N = 3) de cada tipo de tela y de cada tiempo post-aplicación.



**Figura 9:** Bioensayos de patogenicidad de la cepa fúngica de *M. anisopliae* seleccionada sobre adultos de *Ae. aegypti* por aplicación indirecta del inóculo. a) Aspersión de la suspensión sobre uno de los sustratos utilizando el aerógrafo. b) Recipientes utilizados para la exposición de los mosquitos con telas inoculadas con *M. anisopliae* o con Tween 80 acuoso, 0,01% v/v (controles) c) Cámara húmeda de agar-agua-cristal violeta con antibiótico utilizada para la confirmación de la infección fúngica.

#### 4.5 Variables registradas y análisis de datos

##### Supervivencia

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico R 3.4.4. Para realizar las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se designó como evento a la muerte de un insecto teniendo en cuenta a todos los individuos muertos, ya sea con o sin confirmación de la infección fúngica. La comparación entre las curvas se realizó mediante un análisis de Log-Rank con nivel de significancia de 95%. En el caso de encontrar diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), se realizaron comparaciones post-hoc entre pares de curvas, modificando el nivel significancia de cada comparación para que la significancia global sea de 95%. Se utilizó la corrección de Dunn-Šidak. Se realizaron solo las comparaciones de interés y no todas las posibles, para que el nivel de significancia en cada comparación ( $\alpha_i$ ) se reduzca lo menos posible.

Por un lado, se estudió para cada tipo de sustrato, el efecto del tiempo de exposición de los mosquitos a las telas rociadas con conidios (o a sustratos textiles sin conidios utilizados como controles), en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Para ello se calculó para cada tipo de sustrato inoculado (o control) el TS (media y mediana) de los 40 individuos expuestos a 6 o a 24 h, respectivamente. Al igual que en la sección anterior, el valor de TS máximo fue de 10 días y se asignó este valor a aquellos individuos que sobrevivieron durante todo el ensayo y de los cuales se desconoce el verdadero tiempo de supervivencia. En este caso se realizaron cuatro comparaciones post-hoc (cepa seleccionada 6 h - cepa seleccionada 24 h, control 6 h - cepa seleccionada 6 h, control 24 h - cepa seleccionada 24 h y control 6 h - control 24 h) con  $\alpha_i$  de 0,0127.

En un segundo análisis, se analizó el factor del tipo de sustrato en la supervivencia de los mosquitos. Para evaluar si alguna de las telas utilizadas por su composición presentaba algún efecto adverso o tóxico para los mosquitos, fueron comparadas, a través del análisis Log-Rank, las curvas de supervivencia de los individuos controles solo con el mayor tiempo de exposición (24 h). Luego, para 6 y 24 h de exposición, respectivamente, se compararon las curvas de supervivencia de *Ae. aegypti* expuestos a las diferentes telas tratadas con *M. anisopliae*. En caso de encontrar diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), se realizaron tres comparaciones post-hoc entre pares de tratamientos (Log-Rank con  $\alpha_i$  de 0,017 por cada comparación).

### Mortalidad por infección fúngica confirmada

Se calculó la proporción de individuos muertos de *Ae. aegypti*, para cada tipo de sustrato y para cada tiempo de exposición. En este caso, solamente se tuvieron en cuenta los adultos muertos con infección fúngica confirmada y este valor correspondió al porcentaje de infección acumulado luego de 10 días de observación del bioensayo. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico R 3.4.4. Se realizó un análisis de proporciones con aproximación Chi cuadrado. Por un lado, se evaluó el efecto del tiempo de exposición al inóculo en la infectividad de la cepa *M. anisopliae* seleccionada para cada tipo de sustrato. Por otro lado, se evaluó el efecto del tipo de sustrato en la infectividad de la cepa, tanto para 6 como para 24 h de exposición de los mosquitos a la tela tratada. Se realizaron tres comparaciones post-hoc de a pares con  $\alpha_i$  de 0,017, para que el nivel de significancia global sea de 95%.

### Viabilidad

La variable medida fue la proporción de conidios germinados sobre un total de 600 conidios contados por cámara húmeda, luego de 24 h de incubación. Este valor se calculó para la suspensión de conidios antes de ser aplicada sobre el sustrato (control) y para los conidios aplicados sobre cada tipo de tela y para cada tiempo post-aplicación, realizando tres repeticiones independientes en todos los casos ( $N = 3$ ). Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa estadístico InfoStat. Los datos fueron transformados con la función arcoseno-raíz cuadrada. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene y la normalidad de los residuos a través de la prueba de Shapiro-Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu (1997). Las diferencias entre los valores medios de viabilidad de los conidios para cada tratamiento realizado se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (tipo de sustrato y tiempo post-aplicación) con nivel de significancia de 95%. Se realizaron comparaciones post-hoc de Tukey con nivel de significancia global de 95%. También se comparó la viabilidad de cada tratamiento respecto a la del control mediante una prueba de t para dos muestras independientes.

## Resultados

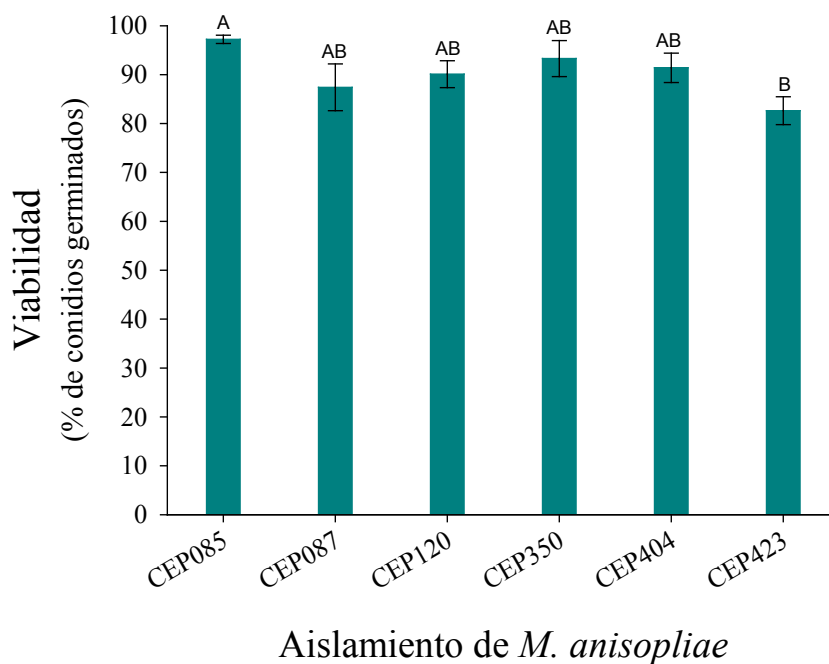
### 1- Selección del aislamiento más eficiente para control de *Ae. aegypti*

#### 1.1 Ensayo preliminar

Las cepas de *M anisopliae* CEP 122, CEP 409 y CEP 415 no resultaron patogénicas para adultos de *Ae. aegypti* en las condiciones en que se realizaron los ensayos. Sin embargo, fue posible aislar el hongo entomopatógeno desde el cadáver de mosquitos infectados en todos los otros casos: CEP 085, CEP 087, CEP 120, CEP 350, CEP 404 y CEP 423.

#### 1.2 Viabilidad

En la figura 11 se observa el porcentaje de germinación de conidios obtenido para cada cepa luego de 24 h de incubación en cámara húmeda, en medio de cultivo SDAY<sub>1/4</sub>. Los valores obtenidos fueron los siguientes: CEP 085,  $97,2 \pm 0,8\%$ ; CEP 087,  $87,4 \pm 4,8\%$ ; CEP 120,  $90,1 \pm 2,7\%$ ; CEP 350,  $93,3 \pm 3,7\%$ ; CEP 404,  $91,4 \pm 3,0\%$  y CEP 423,  $82,6 \pm 2,9\%$ . Al transformar los datos de proporciones con la función arcoseno-raíz cuadrada, la prueba de Levene resultó no significativa ( $F_{g.l.: 5,48} = 1,94$ ;  $P = 0,11$ ), por ende no se rechazó la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. Por otro lado, la prueba de Shapiro-Wilks modificada también arrojó un resultado no significativo ( $W_{g.l.: 54} = 0,95$ ;  $P = 0,21$ ), por lo tanto, no se rechazó la hipótesis nula de distribución normal de los residuos. Una vez corroborados los supuestos del ANOVA, al realizar este análisis se encontraron diferencias significativas entre las proporciones (datos transformados) de conidios germinados de cada cepa fúngica analizada (ANOVA:  $F_{g.l.: 5,48} = 2,88$ ;  $P = 0,024$ ). Por comparación post-hoc de Tukey se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la viabilidad entre las cepas CEP 085 y CEP 423.



**Figura 11:** Viabilidad de los aislamientos de *M. anisopliae* que fueron patogénicos contra *Ae. aegypti*. Se observa para cada cepa el valor promedio (N = 9) del porcentaje de conidios germinados sobre un total de 600 conidios observados. Las líneas verticales indican error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas por comparaciones post-hoc de Tukey (P < 0,05).

### 1.3 Supervivencia

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para la media y la mediana del TS de *Ae. aegypti* tratados con diferentes concentraciones de conidios de diferentes aislamientos de *M. anisopliae*. Los insectos utilizados en el control tuvieron más sobrevivencia (TS) respecto a los grupos tratados con las cepas fúngicas. Aun así, la mortalidad acumulada al día 10 superó el 10% que se esperaba tener en un control.

En las figuras 12 a 17 se observa el efecto de la concentración del inóculo en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada aislamiento fúngico. Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones (o entre el control y las concentraciones utilizadas) en todos los aislamientos fúngicos analizados. En general, las curvas de supervivencia para las concentraciones más altas ( $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml) tuvieron una caída más rápida en el tiempo que aquellas para las que se utilizaron las suspensiones menos concentradas ( $5 \times 10^6$  y  $10^7$  conidios/ml). A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada aislamiento fúngico en particular. En el anexo (tabla A1) se muestran

todas las comparaciones post-hoc realizadas entre pares, con sus respectivos valores del estadístico y  $\alpha_i$  por corrección de Dunn-Šidak.

Para la cepa CEP 085 (figura 12) el TS mayor se obtuvo con el control y con  $5 \times 10^6$  conidios/ml y fue de  $10 \pm 0$  días, en cambio, el valor más bajo se obtuvo con  $10^7$  conidios/ml y fue de  $5,0 \pm 1,5$  días. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Log-Rank,  $X^2_{g.l.: 4} = 35,9$ ;  $P = 3,1 \times 10^{-7}$ ). Según las comparaciones post-hoc realizadas entre pares, se pudo comprobar que la supervivencia del control no difirió significativamente de la supervivencia de los insectos tratados con la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml ( $P > 0,0051$ ), pero sí lo hizo de la del resto de las concentraciones ( $P < 0,0051$ ). Del mismo modo, la supervivencia de los insectos tratados con la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml no difirió significativamente de la supervivencia de los insectos controles ( $P > 0,0051$ ), pero sí lo hizo de la del resto de las concentraciones ( $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml) ( $P < 0,0051$ ). Entre las concentraciones más altas ( $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml), no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,0051$ ).

Para la cepa CEP 087 (figura 13) el TS mayor se obtuvo con el control y con  $5 \times 10^6$  conidios/ml y fue de  $10 \pm 0$  días, en cambio, el valor más bajo se obtuvo con  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml y fue de  $7 \pm 1,5$  días. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Log-Rank,  $X^2_{g.l.: 4} = 54,6$ ;  $P = 3,9 \times 10^{-11}$ ). Según las comparaciones pos-hoc entre pares realizadas, se encontró que la supervivencia de los insectos utilizados en el control difirió significativamente de la supervivencia de los insectos tratados cualquiera fuese la concentración utilizada ( $P < 0,0051$ ). También se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,0051$ ) entre el tratamiento con concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml y aquellos con las concentraciones más altas ( $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml). Entre  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml no hubo diferencias significativas ( $P > 0,0051$ ).

Para la cepa CEP 120 (figura 14) el TS mayor se obtuvo con el control y con  $5 \times 10^6$  conidios/ml y fue de  $10 \pm 0$  días, en cambio, el valor más bajo se obtuvo con  $5 \times 10^7$  conidios/ml y fue de  $5 \pm 3$  días. El análisis de Log-Rank indicó diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier ( $X^2_{g.l.: 4} = 30,9$ ;  $P = 3,25 \times 10^{-6}$ ). Según las comparaciones post-hoc entre pares realizadas, la supervivencia del control no difirió significativamente ( $P > 0,0051$ ) de la supervivencia de los insectos tratados con la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml, pero sí lo hizo de la del resto de las concentraciones

( $P < 0,0051$ ). La supervivencia no fue significativamente diferente ( $P > 0,0051$ ) entre todas las concentraciones utilizadas ( $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml).

Para la cepa CEP 350 (figura 15) el TS mayor se obtuvo con el control y fue de  $10 \pm 0$  días, en cambio, el valor más bajo se obtuvo con  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml y fue de  $6 \pm 1,5$  días. El análisis de Log-Rank indicó diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier ( $X^2_{g.l.: 4} = 56,1$ ;  $P = 1,9 \times 10^{-11}$ ). Según las comparaciones post-hoc de a pares realizadas, la supervivencia del control no difirió significativamente ( $P > 0,0051$ ) de la supervivencia de los insectos tratados con la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml, pero sí lo hizo de la del resto de las concentraciones ( $P < 0,0051$ ). Además, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,0051$ ) en la supervivencia de los adultos tratados con  $5 \times 10^6$  y los tratados con  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml, respectivamente. También se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,0051$ ) en la supervivencia de *Ae. aegypti* entre las concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  conidios/ml. La supervivencia no fue significativamente diferente ( $P > 0,0051$ ) entre las concentraciones de  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml.

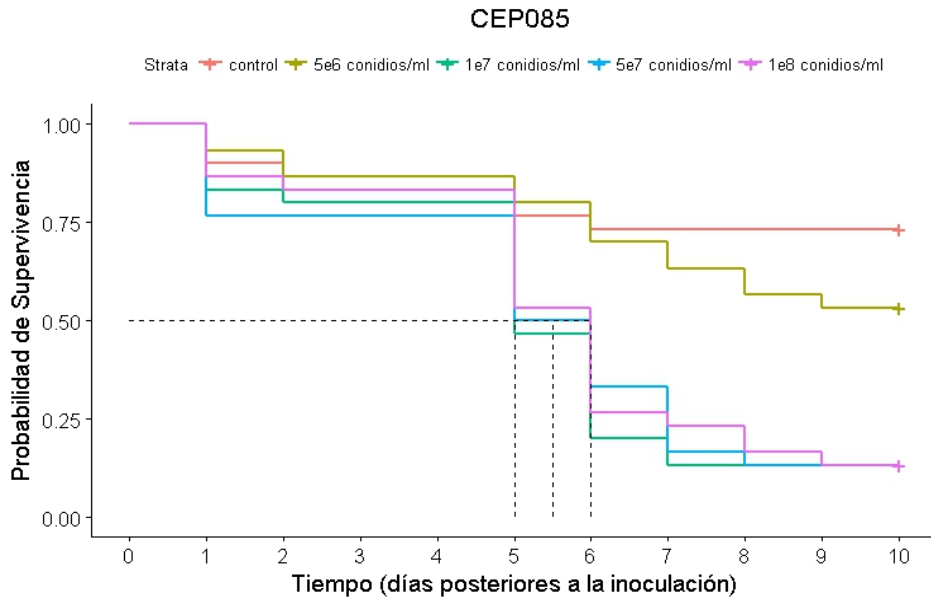
Para la cepa CEP 404 (figura 16) el TS mayor se obtuvo con el control y fue de  $10 \pm 0$  días. En cambio, el valor más bajo de TS se obtuvo con  $5 \times 10^7$  conidios/ml y fue de  $4,5 \pm 2,2$  días. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Log-Rank,  $X^2_{g.l.: 4} = 54$ ;  $P = 5,3 \times 10^{-11}$ ). Según las comparaciones post-hoc de a pares realizadas, la supervivencia del control no difirió significativamente ( $P > 0,0051$ ) de la supervivencia de los insectos tratados con las concentraciones de  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  conidios/ml, respectivamente. Sí lo hizo de las concentraciones más altas ( $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml) ( $P < 0,0051$ ). La supervivencia de los insectos tratados con las concentraciones de  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  conidios/ml no difirieron significativamente entre sí ( $P > 0,0051$ ) pero si lo hicieron de la supervivencia obtenida con las concentraciones más altas ( $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml) ( $P < 0,0051$ ). Entre estas dos últimas curvas no se encontraron diferencias significativas entre sí ( $P > 0,0051$ ).

Para la cepa CEP 423 (figura 17) el TS mayor se obtuvo con el control y fue de  $10 \pm 0$  días. En cambio, el valor más bajo de TS se obtuvo con  $5 \times 10^7$  conidios/ml y fue de  $6 \pm 2,2$  días. El análisis de Log-Rank indicó diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier ( $X^2_{g.l.: 4} = 56,1$ ;  $P = 1,9 \times 10^{-11}$ ). En este caso, por comparaciones post-hoc de a pares, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,0051$ ) entre el control y todas las concentraciones utilizadas. La curva de supervivencia correspondiente a la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml no difirió significativamente ( $P$

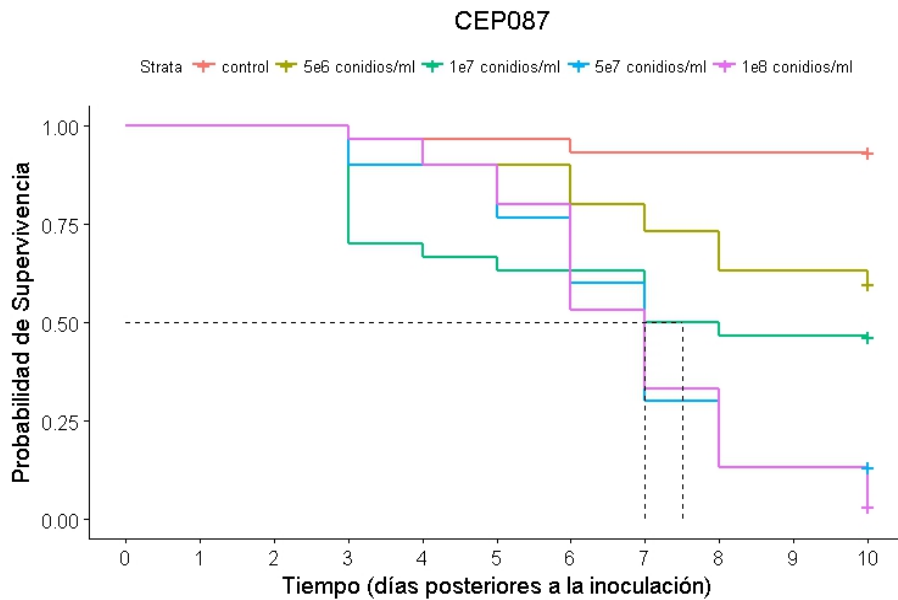
> 0,0051) de la de  $10^7$  conidios/ml pero sí lo hizo de las curvas del resto de las concentraciones ( $P < 0,0051$ ). La supervivencia no fue significativamente diferente ( $P > 0,0051$ ) entre las concentraciones  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml.

Aislamiento fúngico	Concentración (conidios/ml)	Tiempo de supervivencia (TS) de <i>Ae. aegypti</i> (días)	
		Media $\pm$ D.E.	Mediana $\pm$ D.A.M.
CEP 085	Control*	8,0 $\pm$ 3,5	10,0 $\pm$ 0,0 a
	$5 \times 10^6$ *	7,8 $\pm$ 3,0	10,0 $\pm$ 0,0 a
	$1 \times 10^7$ *	5,3 $\pm$ 2,6	5,0 $\pm$ 1,5 b
	$5 \times 10^7$ *	5,3 $\pm$ 2,9	5,5 $\pm$ 2,2 b
	$1 \times 10^8$ *	5,7 $\pm$ 2,7	6,0 $\pm$ 1,5 b
CEP 087	Control*	9,6 $\pm$ 1,5	10,0 $\pm$ 0,0 a
	$5 \times 10^6$ *	8,5 $\pm$ 2,3	10,0 $\pm$ 0,0 b
	$1 \times 10^7$ *	7,1 $\pm$ 3,1	7,5 $\pm$ 3,7 bc
	$5 \times 10^7$ *	6,7 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 1,5 c
	$1 \times 10^8$ *	6,8 $\pm$ 1,8	7,0 $\pm$ 1,5 c
CEP 120	Control*	8,8 $\pm$ 2,5	10,0 $\pm$ 0,0 a
	$5 \times 10^6$ *	7,4 $\pm$ 3,4	10,0 $\pm$ 0,0 ab
	$1 \times 10^7$ *	6,4 $\pm$ 3,4	7,0 $\pm$ 4,5 b
	$5 \times 10^7$ *	5,5 $\pm$ 2,9	5,0 $\pm$ 3,0 b
	$1 \times 10^8$ *	6,1 $\pm$ 2,7	7,0 $\pm$ 1,5 b
CEP 350	Control*	8,0 $\pm$ 3,6	10,0 $\pm$ 0,0 a
	$5 \times 10^6$ *	8,1 $\pm$ 2,7	9,5 $\pm$ 0,7 ab
	$1 \times 10^7$ *	7,2 $\pm$ 3,0	8,0 $\pm$ 3,0 bc
	$5 \times 10^7$	5,6 $\pm$ 2,8	6,0 $\pm$ 1,5 cd
	$1 \times 10^8$	5,3 $\pm$ 2,0	6,0 $\pm$ 1,5 d
CEP 404	Control*	7,7 $\pm$ 3,6	10,0 $\pm$ 0,0 a
	$5 \times 10^6$ *	7,3 $\pm$ 2,5	7,0 $\pm$ 3,7 a
	$1 \times 10^7$ *	6,9 $\pm$ 2,9	7,0 $\pm$ 4,5 a
	$5 \times 10^7$ *	4,1 $\pm$ 2,5	4,5 $\pm$ 2,2 b
	$1 \times 10^8$ *	4,4 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 0,7 b
CEP 423	Control*	9,2 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 0,0 a
	$5 \times 10^6$ *	7,8 $\pm$ 2,9	9,0 $\pm$ 1,5 b
	$1 \times 10^7$ *	7,4 $\pm$ 2,2	7,0 $\pm$ 3,0 bc
	$5 \times 10^7$ *	6,1 $\pm$ 2,3	6,0 $\pm$ 2,2 c
	$1 \times 10^8$	6,1 $\pm$ 2,2	6,0 $\pm$ 1,5 c

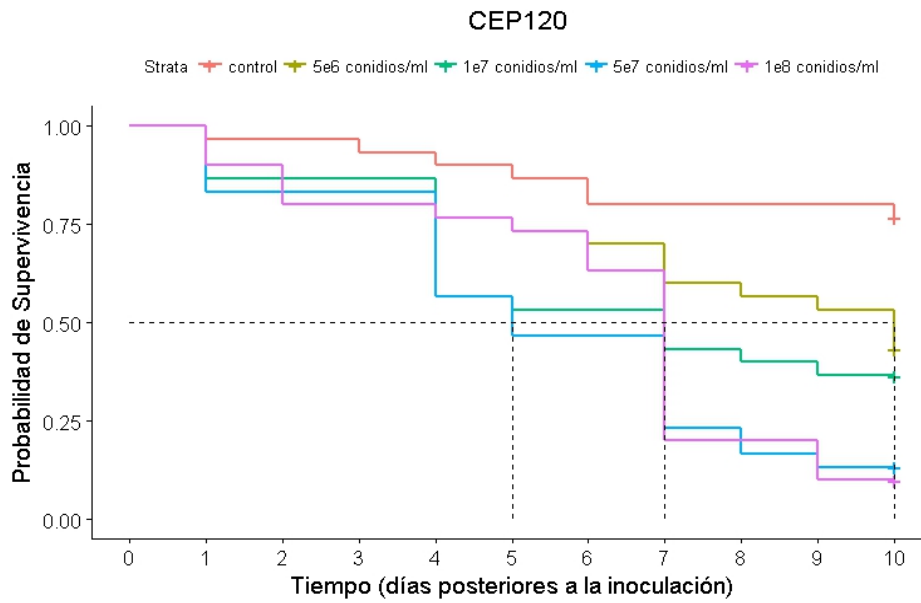
**Tabla 2:** Tiempo de supervivencia (TS) de *Ae. aegypti* tratados con diferentes cepas de *M. anisopliae* y diferentes concentraciones (control sin conidios,  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  o  $10^8$  conidios/ml) de cada una. Se informa el valor de TS estimado con la media  $\pm$  desvío estándar (D.E.) y la mediana  $\pm$  desviación absoluta respecto a la mediana (D.A.M.). N = 30 en cada tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas en la mediana del tiempo de supervivencia, de cada aislamiento, encontradas en el análisis de las curvas de Kaplan-Meier y comparaciones post-hoc entre pares (Log-Rank,  $P < 0,0051$ ). El asterisco indica que en el cálculo de TS de ese grupo se tuvieron en cuenta datos censurados, es decir que para algunos individuos se estimó un TS = 10 días (valor máximo), pudiendo ser este un valor mayor.



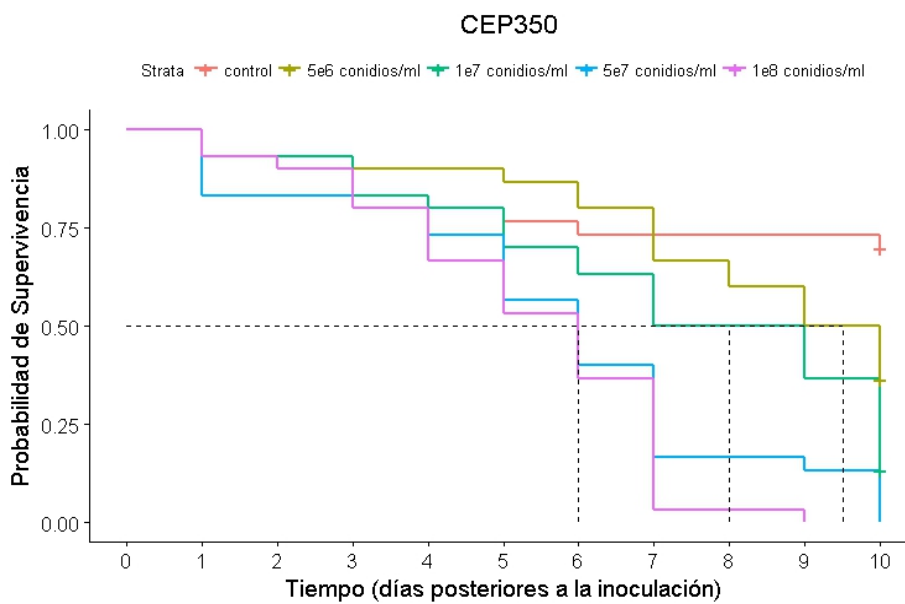
**Figura 12:** Probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* tratados con diferentes concentraciones de *M. anisopliae* CEP 085 en función del tiempo. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que algunos datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0051$ ): (control- $10^7$  conidios/ml), (control- $5 \times 10^7$  conidios/ml), (control- $10^8$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $10^7$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  conidios/ml) y ( $5 \times 10^6$ - $10^8$  conidios/ml).



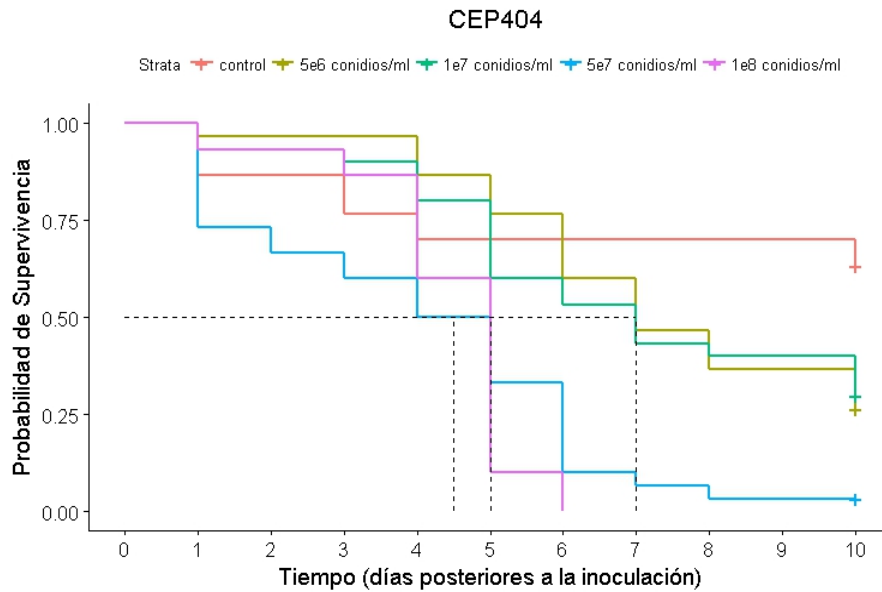
**Figura 13:** Probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* tratados con diferentes concentraciones de *M. anisopliae* CEP 087 en función del tiempo. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que algunos datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0051$ ): (control- $5 \times 10^6$  conidios/ml), (control- $10^7$  conidios/ml), (control- $5 \times 10^7$  conidios/ml), (control- $10^8$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  conidios/ml) y ( $5 \times 10^6$ - $10^8$  conidios/ml).



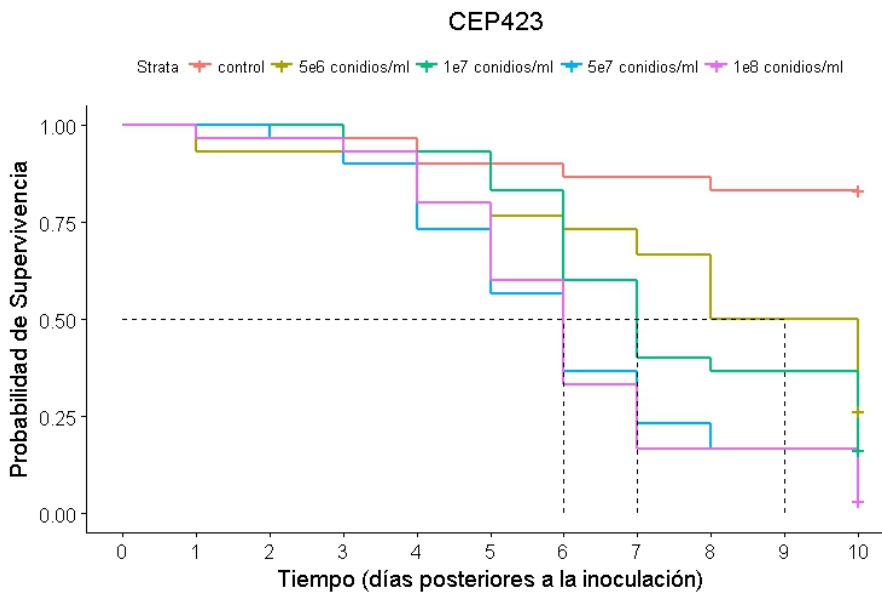
**Figura 14:** Probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* tratados con diferentes concentraciones de *M. anisopliae* CEP 120 en función del tiempo. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que algunos datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0051$ ): (control- $10^7$  conidios/ml), (control- $5 \times 10^7$  conidios/ml) y (control- $10^8$  conidios/ml).



**Figura 15:** Probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* tratados con diferentes concentraciones de *M. anisopliae* CEP 350 en función del tiempo. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que algunos datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0051$ ): (control- $10^7$  conidios/ml), (control- $5 \times 10^7$  conidios/ml), (control- $10^8$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $10^8$  conidios/ml) y ( $10^7$ - $10^8$  conidios/ml).

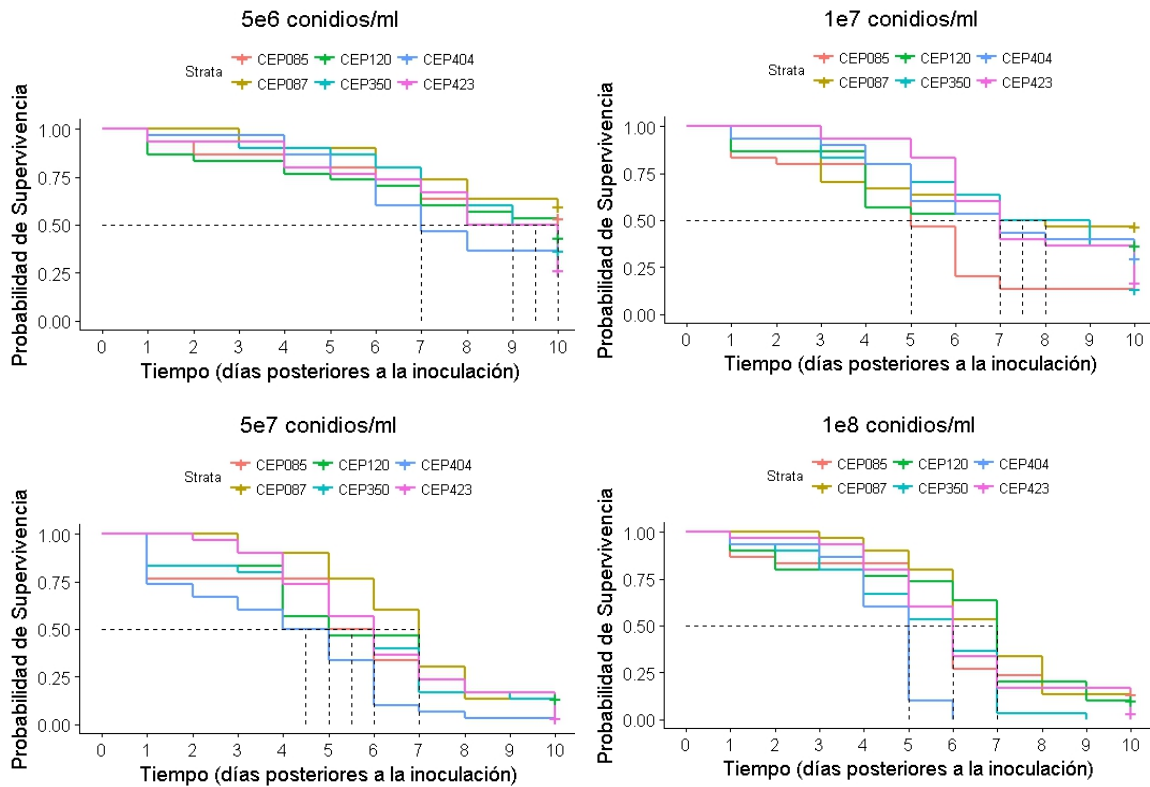


**Figura 16:** Probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* tratados con diferentes concentraciones de *M. anisopliae* CEP 404 en función del tiempo. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que algunos datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0051$ ): (control- $5 \times 10^7$  conidios/ml), (control- $10^8$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $10^8$  conidios/ml), ( $10^7$ - $5 \times 10^7$  conidios/ml) y ( $10^7$ - $10^8$  conidios/ml).



**Figura 17:** Probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* tratados con diferentes concentraciones de *M. anisopliae* CEP 423 en función del tiempo. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que algunos datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0051$ ): (control- $5 \times 10^6$  conidios/ml), (control- $10^7$  conidios/ml), (control- $5 \times 10^7$  conidios/ml), (control- $10^8$  conidios/ml), ( $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  conidios/ml) y ( $5 \times 10^6$ - $10^8$  conidios/ml).

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en la figura 18, muestran el efecto de la cepa fúngica, para cada concentración de conidios utilizada. No se encontró un efecto significativo del tipo de aislamiento en la supervivencia de *Ae. aegypti* utilizando las concentraciones de  $5 \times 10^6$  (Log-Rank,  $X^2_{g.l.:5} = 8,6$ ;  $P = 0,12$ ) y  $10^7$  conidios/ml (Log-Rank,  $X^2_{g.l.:5} = 10,5$ ;  $P = 0,062$ ). En cambio, sí hubo diferencias en la supervivencia de los mosquitos, entre aislamientos fúngicos para las concentraciones de  $5 \times 10^7$  (Log-Rank,  $X^2_{g.l.:5} = 15,6$ ;  $P = 0,008$ ) y  $10^8$  conidios/ml (Log-Rank,  $X^2_{g.l.:5} = 36,6$ ;  $P = 7 \times 10^{-7}$ ). En el anexo se detallan todas las comparaciones post-hoc de a pares realizadas, con sus respectivos valores del estadístico y de  $\alpha_i$  por corrección de Dunn-Šidak (tabla A2). En el caso de la concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml las diferencias estuvieron dadas por los aislamientos CEP 087 y CEP 404 ( $P < 0,0034$ ), que fueron los que provocaron el mayor y el menor TS, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los otros pares de aislamientos. En cuanto a la concentración más alta,  $10^8$  conidios/ml, la cepa CEP 404 difirió significativamente ( $P < 0,0034$ ) de todos los otros aislamientos fúngicos.



**Figura 18:** Probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* tratados con diferentes cepas fúngicas de *M. anisopliae*, con distintas concentraciones, en función del tiempo. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que algunos datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0034$ ):  $5 \times 10^7$  conidios/ml: (CEP 087-CEP 404).  $10^8$  conidios/ml: (CEP 085-CEP 404), (CEP 087-CEP 404), (CEP 120-CEP 404), (CEP 350-CEP 404) y (CEP 423-CEP 404).  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  conidios/ml: no hubo diferencias significativas.

#### 1.4 Mortalidad por infección fúngica confirmada

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de insectos infectados con *M. anisopliae* tratados con diferentes concentraciones de conidios de diferentes aislamientos fúngicos. Este valor se calculó de forma acumulada a los 10 días desde el comienzo del bioensayo. Se encontró un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) de la concentración del inóculo en la proporción de insectos infectados en todas las cepas inoculadas. Al realizar las comparaciones post-hoc entre pares, en general se encontró que la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml no difirió significativamente de la de  $10^7$  conidios/ml, en tanto que la concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml no lo hizo de la de  $10^8$

conidios/ml. Todas las comparaciones post-hoc realizadas entre pares de tratamientos se especifican en el anexo (tabla A3) donde se detallan sus respectivos valores del estadístico y  $\alpha_i$ .

Para la cepa CEP 085 el porcentaje de individuos infectados varió entre 23,3% para  $5 \times 10^6$  conidios/ml y 66,7% para  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml. Se encontraron diferencias significativas en la proporción de individuos infectados con *M. anisopliae*, entre las diferentes concentraciones (análisis de proporciones,  $X^2_{g.l.: 3} = 16,37$ ;  $P = 0,0009$ ). Estas diferencias se encontraron entre la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml y las concentraciones de  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml, respectivamente ( $P < 0,0085$ ). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  conidios/ml, ni entre  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml ( $P > 0,0085$ ).

Para la cepa CEP 087 el porcentaje de individuos infectados varió entre 23,3% para  $10^7$  conidios/ml y 93,3% para  $10^8$  conidios/ml. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (análisis de proporciones,  $X^2_{g.l.: 3} = 42,05$ ;  $P = 3,9 \times 10^{-9}$ ). Estas diferencias se encontraron entre la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml y las concentraciones de  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml, respectivamente ( $P < 0,0085$ ). También se encontraron diferencias significativas, entre la concentración de  $10^7$  conidios/ml y las concentraciones de  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml, respectivamente ( $P < 0,0085$ ).

Para la cepa CEP 120 el porcentaje de individuos infectados varió entre 23,3% para  $5 \times 10^6$  conidios/ml y 70% para  $5 \times 10^7$  conidios/ml. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (análisis de proporciones,  $X^2_{g.l.: 3} = 17,49$ ;  $P = 0,00056$ ). Las diferencias significativas ( $P < 0,0085$ ) estuvieron dadas entre la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml y las concentraciones de  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml, respectivamente. No hubo diferencias significativas ( $P > 0,0085$ ) entre las concentraciones más altas ( $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml).

Para la cepa CEP 350 el porcentaje de individuos infectados varió entre 36,7% para  $10^7$  conidios/ml y 83,3% para  $10^8$  conidios/ml. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (análisis de proporciones,  $X^2_{g.l.: 3} = 21,01$ ;  $P = 0,0001$ ). Las diferencias significativas ( $P < 0,0085$ ) estuvieron dadas entre la concentración más alta y la más baja, y entre  $10^7$  conidios/ml y las concentraciones de  $5 \times 10^7$  y  $10^8$  conidios/ml, respectivamente.

Para la cepa CEP 404 el porcentaje de individuos infectados varió entre 40% para  $10^7$  conidios/ml y 80% para  $10^8$  conidios/ml. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (análisis de proporciones,  $X^2_{g.l.: 3} = 10,91$ ;  $P = 0,012$ ). Las

diferencias significativas ( $P < 0,0085$ ) estuvieron dadas entre la concentración de  $10^7$  conidios/ml y  $10^8$  conidios/ml.

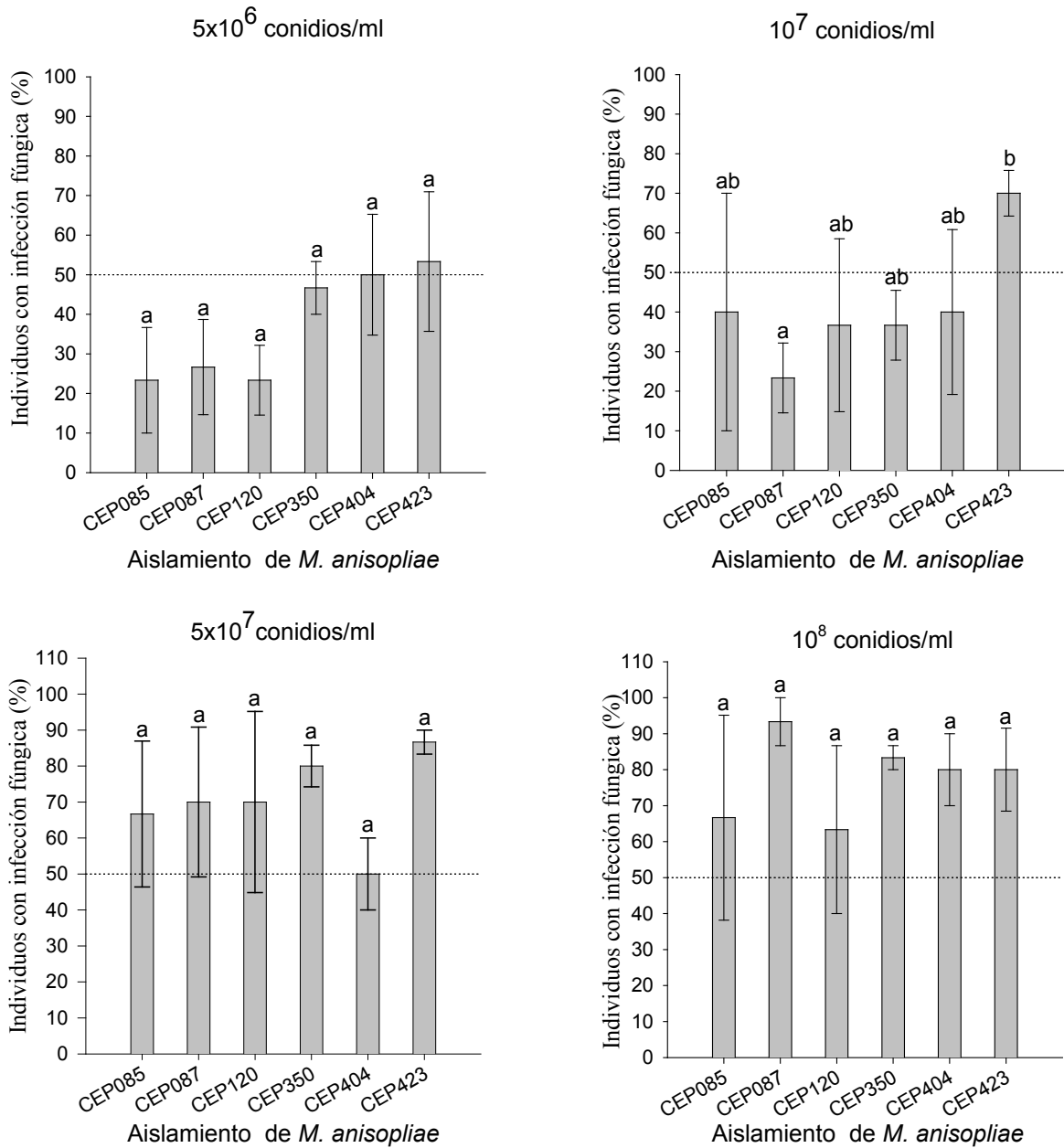
Para la cepa CEP 423 el porcentaje de individuos infectados varió entre 53,3% para  $5 \times 10^6$  conidios/ml y 86,7% para  $5 \times 10^7$  conidios/ml. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (análisis de proporciones,  $X^2_{g.l.: 3} = 9,49$ ;  $P = 0,023$ ). Sin embargo, al realizar las comparaciones de a pares con un nivel de significancia modificado ( $\alpha_i = 0,0085$  por cada comparación), no se encontraron tales diferencias.

Aislamiento fúngico	Concentración (conidios/ml)	Porcentaje de infección fúngica acumulado (día 10) $\pm$ E.E.	Análisis de proporciones	
			$X^2_{g.l.: 3}$	P
CEP 085	$5 \times 10^6$	23,3 $\pm$ 13,3 a	16,37	0,00
	$1 \times 10^7$	40,0 $\pm$ 30,0 ab		
	$5 \times 10^7$	66,7 $\pm$ 20,3 b		
	$1 \times 10^8$	66,7 $\pm$ 28,5 b		
CEP 087	$5 \times 10^6$	26,7 $\pm$ 12,0 a	42,05	0,00
	$1 \times 10^7$	23,3 $\pm$ 8,8 a		
	$5 \times 10^7$	70,0 $\pm$ 20,8 b		
	$1 \times 10^8$	93,3 $\pm$ 6,7 b		
CEP 120	$5 \times 10^6$	23,3 $\pm$ 8,8 a	17,50	0,00
	$1 \times 10^7$	36,7 $\pm$ 21,9 ab		
	$5 \times 10^7$	70,0 $\pm$ 25,2 b		
	$1 \times 10^8$	63,3 $\pm$ 23,3 b		
CEP 350	$5 \times 10^6$	46,7 $\pm$ 6,7 ab	21,01	0,00
	$1 \times 10^7$	36,7 $\pm$ 8,8 a		
	$5 \times 10^7$	80,0 $\pm$ 5,8 bc		
	$1 \times 10^8$	83,3 $\pm$ 3,3 c		
CEP 404	$5 \times 10^6$	50,0 $\pm$ 15,3 ab	10,90	0,01
	$1 \times 10^7$	40,0 $\pm$ 20,8 a		
	$5 \times 10^7$	50,0 $\pm$ 10,0 ab		
	$1 \times 10^8$	80,0 $\pm$ 10,0 b		
CEP 423	$5 \times 10^6$	53,3 $\pm$ 17,6 a	9,50	0,02
	$1 \times 10^7$	70,0 $\pm$ 5,8 a		
	$5 \times 10^7$	86,7 $\pm$ 3,3 a		
	$1 \times 10^8$	80,0 $\pm$ 11,5 a		

**Tabla 3:** Porcentaje de individuos de *Ae. aegypti* infectados con *M. anisopliae* tratados con diferentes cepas y diferentes concentraciones de cada una. Las letras diferentes en la columna de porcentaje indican que se encontraron diferencias significativas según las comparaciones post-hoc de a pares (análisis de proporciones,  $P < 0,0085$ ), entre concentraciones de una misma cepa.

En la figura 19 se observa el porcentaje de individuos infectados por aislamiento en cada concentración. El análisis de las proporciones reveló un efecto significativo de la cepa fúngica utilizada, para las concentraciones de  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$  y  $5 \times 10^7$  conidios/ml. Sin embargo, cuando se realizaron comparaciones de a pares con un nivel de significancia modificado ( $\alpha_i = 0,0034$  por cada comparación), solo encontraron diferencias significativas entre los aislamientos para la concentración de  $10^7$  conidios/ml. Todas las comparaciones de a pares realizadas se especifican a través de letras en la figura 19 y en el anexo (tabla A4) se detallan sus respectivos valores del estadístico y  $\alpha_i$ .

Para la concentración más baja,  $5 \times 10^6$  conidios/ml, el análisis de proporciones dio un efecto significativo ( $X^2_{g.l.: 5} = 12,96$ ;  $P = 0,024$ ). A pesar de esto no se encontraron diferencias significativas por comparaciones post-hoc de a pares. Para  $10^7$  conidios/ml, también se encontró un efecto significativo de la concentración de conidios en la proporción de insectos infectados ( $X^2_{g.l.: 5} = 14,78$ ;  $P = 0,01$ ). En este caso, las comparaciones post-hoc de a pares revelaron diferencias significativas ( $P < 0,0034$ ) entre el aislamiento CEP 087 y CEP 423. En cuanto a la concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml, también se encontró un efecto significativo de la concentración ( $X^2_{g.l.: 5} = 11,37$ ;  $P = 0,04$ ) pero no se encontraron diferencias en el análisis por comparaciones post-hoc de a pares. Finalmente, para la concentración más alta,  $10^8$  conidios/ml, no se encontraron diferencias significativas de la concentración ( $X^2_{g.l.: 5} = 10,67$ ;  $P = 0,06$ ).



**Figura 19:** Mortalidad por infección fúngica verificada. Porcentaje de individuos de *Ae. aegypti* infectados por los distintos aislamientos de *M. anisopliae* inoculados a diferentes concentraciones. Las líneas verticales indican error estándar de tres repeticiones. Las letras distintas indican diferencias significativas por comparaciones post-hoc entre pares de tratamientos (Log-Rank,  $P < 0,0034$ ).

### 1.5 Agresividad y virulencia

Los valores de tiempo letal (TL) para cada aislamiento, utilizando una concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml, se detallan en la tabla 4. No se pudieron calcular estos valores para el aislamiento CEP 404 porque el porcentaje de infección no superó el

50%. Teniendo en cuenta que hay superposición de los IC<sub>95</sub>, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub> de los distintos aislamientos.

Los valores de concentración letal (CL) para cada aislamiento, calculados a los 10 días posteriores a la inoculación de *M. anisopliae*, se detallan también en la tabla 4. En base a la no superposición de los IC<sub>95</sub> se encontraron diferencias significativas entre la CL<sub>50</sub> del aislamiento CEP 423 y las CL<sub>50</sub> de los aislamientos CEP 085, CEP 087 y CEP 120, siendo la primera una concentración menor.

Cepa fúngica	Tiempo Letal (TL) (días)			Concentración Letal (CL) (conidios/ml)	
	TL <sub>50</sub> (IC <sub>95</sub> )	TL <sub>90</sub> (IC <sub>95</sub> )	Pendiente ± E.E.	CL <sub>50</sub> (IC <sub>95</sub> )	Pendiente ± E.E.
CEP 085	6,5 (5,2-8,5) a	13,2 (9,7-26,4) a	4,2 ± 1,0	2,4 x 10 <sup>7</sup> (1,2 x 10 <sup>7</sup> - 4,8 x 10 <sup>7</sup> ) a	0,9 ± 0,2
CEP 087	7,0 (6,3-7,8) a	9,7 (8,5-12,6) a	8,8 ± 1,7	1,9 x 10 <sup>7</sup> (1,2 x 10 <sup>7</sup> - 2,7 x 10 <sup>7</sup> ) a	1,6 ± 0,3
CEP 120	6,2 (4,5-8,6) a	15,8 (10,6-40,8) a	3,1 ± 0,8	2,5 x 10 <sup>7</sup> (1,3 x 10 <sup>7</sup> - 5,2 x 10 <sup>7</sup> ) a	0,9 ± 0,2
CEP 350	6,9 (5,8-8,2) a	12,1 (9,8-17,4) a	5,2 ± 0,9	1,0 x 10 <sup>7</sup> (4,1 x 10 <sup>6</sup> - 1,8 x 10 <sup>7</sup> ) ab	1,0 ± 0,2
CEP 404	ND	ND	ND	1,3 x 10 <sup>7</sup> (6,5 x 10 <sup>5</sup> - 3,7 x 10 <sup>7</sup> ) ab	0,6 ± 0,2
CEP 423	6,0 (5,0-7,2) a	10,7 (8,7-15,3) a	5,1 ± 0,9	2,4 x 10 <sup>6</sup> (6,6 x 10 <sup>3</sup> - 7,2 x 10 <sup>6</sup> ) b	0,7 ± 0,2

**Tabla 4:** Tiempo letal (TL) 50 y 90 y concentración letal (CL) 50 de diferentes aislamientos de *M. anisopliae*. Los valores de TL se calcularon utilizando una concentración de 5 x 10<sup>7</sup> conidios/ml. Los valores de CL se calcularon a los 10 días posteriores a la aplicación del hongo. Se informan también los intervalos de confianza 95% (IC<sub>95</sub>) y la pendiente de regresión Probit con su error estándar (E.E.) para cada caso. ND: No determinado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre aislamientos (P < 0,05) detectadas por la falta de superposición de los IC<sub>95</sub>.

Un resumen de los resultados obtenidos de todos los parámetros evaluados para determinar cuál fue el aislamiento de *M. anisopliae* más eficiente para el control de *Ae. aegypti*, se muestra en la tabla 5. Se decidió continuar trabajando con el aislamiento CEP 423 ya que provocó un porcentaje de infección mayor que el de las otras cepas fúngicas, aún con la concentración más baja. Además, presentó un valor de  $CL_{50}$  significativamente menor que el de los otros aislamientos.

Aislamiento fúngico	Viabilidad (media ± E.E.)	Supervivencia	Infectados (%)	Agresividad		Virulencia
		TS de <i>Ae. aegypti</i> (mediana ± D.A.M.) (días)		TL <sub>50</sub> (IC <sub>95</sub> ) (días)	TL <sub>90</sub> (IC <sub>95</sub> ) (días)	CL <sub>50</sub> (IC <sub>95</sub> ) (conidios/ml)
CEP 085	97,2 ± 0,8 a	5,5 ± 2,2 ab	66,7 a	6,5 (5,2 - 8,5) a	13,5 (9,7 - 26,4) a	2,4 x 10 <sup>7</sup> (1,2 x 10 <sup>7</sup> - 4,8 x 10 <sup>7</sup> ) a
CEP 087	87,4 ± 4,8 ab	7,0 ± 1,5 a	70,0 a	7,0 (6,3 - 7,8) a	9,7 (8,5 - 12,6) a	1,9 x 10 <sup>7</sup> (1,2 x 10 <sup>7</sup> - 2,7 x 10 <sup>7</sup> ) a
CEP 120	90,1 ± 2,7 ab	5,0 ± 3,0 ab	70,0 a	6,2 (4,5 - 8,6) a	15,8 (10,6 - 40,8) a	2,5 x 10 <sup>7</sup> (1,3 x 10 <sup>7</sup> - 5,2 x 10 <sup>7</sup> ) a
CEP 350	93,3 ± 3,7 ab	6,0 ± 1,5 ab	80,0 a	6,9 (5,8 - 8,2) a	12,1 (9,8 - 17,4) a	1 x 10 <sup>7</sup> (4,1 x 10 <sup>6</sup> - 1,8 x 10 <sup>7</sup> ) ab
CEP 404	91,4 ± 3,0 ab	4,5 ± 2,2 b	50,0 a	ND	ND	1,3 x 10 <sup>7</sup> (6,5 x 10 <sup>5</sup> - 3,7 x 10 <sup>7</sup> ) ab
CEP 423	82,6 ± 2,9 b	6,0 ± 2,2 ab	86,7 a	6,0 (5,0 - 7,2) a	10,7 (8,7 - 15,3) a	2,4 x 10 <sup>6</sup> (6,6 x 10 <sup>3</sup> - 7,2 x 10 <sup>6</sup> ) b

**Tabla 5:** Resumen de los parámetros evaluados de cada aislamiento fúngico de *M. anisopliae*. **Viabilidad:** % de conidios germinados *in vitro*; las letras diferentes indican diferencias significativas post-hoc (Tukey,  $P < 0,05$ ); E.E.: error estándar;  $N = 9$ . **Supervivencia:** Tiempo de supervivencia (TS) (días) de *Ae. aegypti* tratados con cada aislamiento por aspersión de la suspensión de concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml, D.A.M.: desviación absoluta respecto a la mediana. Las letras diferentes indican diferencias significativas de las curvas de supervivencia, por comparaciones post-hoc entre pares (Log-Rank,  $P < 0,0034$ );  $N = 30$ . **Infectados:** % acumulado de individuos de *Ae. aegypti* infectados al día 10 post tratamiento; valor obtenido para el tratamiento por aspersión de la suspensión de concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml de cada cepa fúngica. Las letras iguales indican la falta de diferencias significativas por comparaciones post-hoc entre pares (análisis de proporciones,  $P > 0,0034$ );  $N = 30$ . **Agresividad:** Tiempo letal (TL) 50 y 90 calculados por análisis Probit en base de los individuos infectados para cada aislamiento fúngico para la concentración  $5 \times 10^7$  conidios/ml; las letras iguales indican la falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) debido a la superposición de los intervalos de confianza 95% (IC<sub>95</sub>). ND: no determinado. **Virulencia:** Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de cada aislamiento fúngico calculada por análisis Probit en base de los individuos infectados al día 10 post-tratamiento con 4 concentraciones diferentes ( $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $10^8$  conidios/ml); las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) debido a la falta de superposición de los IC<sub>95</sub>.

## 2- Inoculación de conidios de *M. anisopliae* en telas

### 2.1 Supervivencia

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para el TS (media y mediana) de los mosquitos expuestos a los diferentes sustratos inoculados con CEP 423, o a los correspondientes controles, de acuerdo al tiempo de exposición (6 o 24 h). Los insectos controles tuvieron más sobrevivencia (TS) respecto a los grupos tratados con el hongo. Aun así, la mortalidad acumulada al día 10 superó el 10% que se esperaba tener en un control.

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, clasificadas según el tipo de sustrato, se observan en la figura 20. Se encontraron diferencias significativas en los tres casos. En el anexo (tabla A5) se muestran todas las comparaciones post-hoc de a pares realizadas, con sus respectivos valores de estadístico y  $\alpha_i$

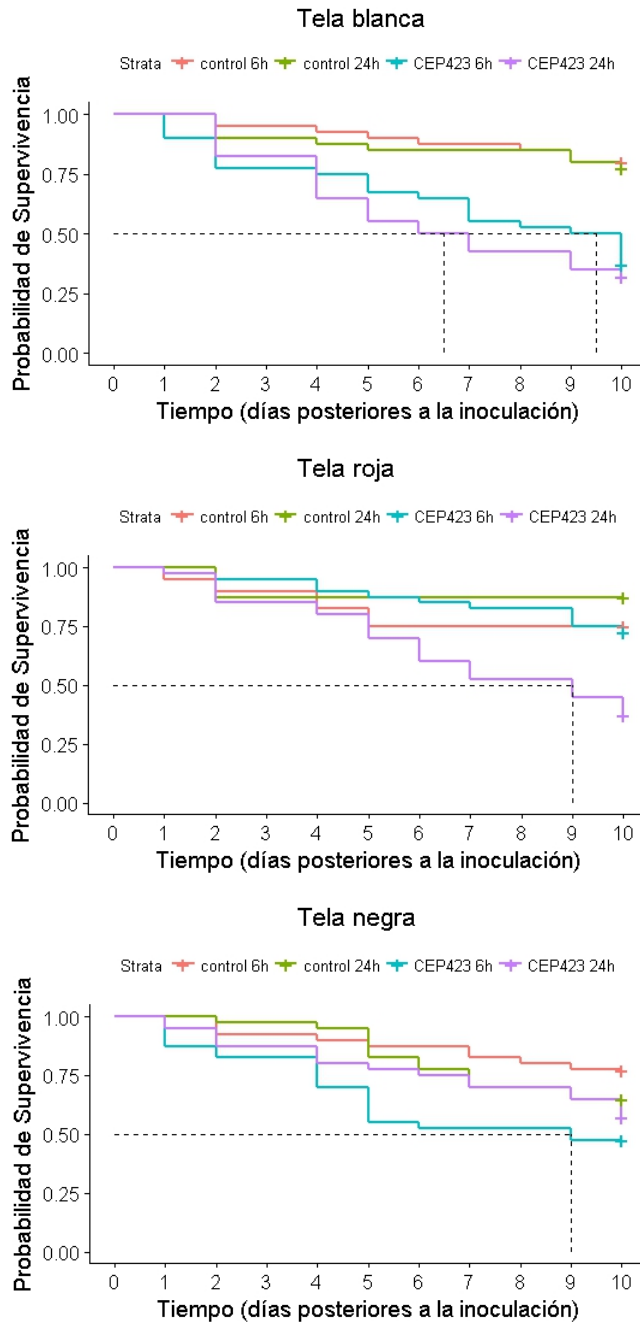
Para la tela blanca de algodón-poliéster, ambos controles (6 y 24 h de exposición) presentaron el mayor TS correspondiente a  $10 \pm 0$  días. El valor más bajo de TS fue de  $6,5 \pm 5,5$  días al exponer a los mosquitos a la tela tratada con la cepa CEP 423 durante 24 h. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Log-Rank,  $X^2_{g.l.: 3} = 32,2$ ;  $P = 4,7 \times 10^{-7}$ ). Según las comparaciones post-hoc de a pares realizadas, no se encontró un efecto significativo ( $P > 0,0127$ ) del tiempo de exposición tanto en los insectos tratados como en los controles. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos controles ( $P > 0,0127$ ). Sí se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,0127$ ) entre los tratamientos con la cepa CEP 423 y su respectivo control para cada tiempo de exposición.

Para la tela roja de poliéster, el mayor TS se obtuvo con ambos controles y con el tratamiento con la cepa CEP 423 con 6 h de exposición. Este valor fue de  $10 \pm 0$  días. En cambio, el TS fue menor,  $9 \pm 1,5$  días, al exponer a los mosquitos a la tela tratada con CEP 423 durante 24 h. El análisis de Log-Rank también indicó diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier ( $X^2_{g.l.: 3} = 24,1$ ;  $P = 2,4 \times 10^{-5}$ ). Según las comparaciones post-hoc de a pares realizadas, se encontró un efecto significativo ( $P < 0,0127$ ) del tiempo de exposición en los insectos tratados con CEP 423. Con 6 h de exposición, la supervivencia de los insectos no difirió significativamente ( $P > 0,0127$ ) de su control. En cambio, sí se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,0127$ ) cuando la exposición fue de 24 h. Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,0127$ ) entre ambos controles.

Para la tela negra de poliéster, el mayor TS se obtuvo con ambos controles y con el tratamiento con CEP 423 con 24 h de exposición. Este valor fue de  $10 \pm 0$  días. En cambio, el TS fue menor,  $9 \pm 0$  días, al exponer a los mosquitos a la tela tratada con CEP 423 durante 6 h. El análisis de Log-Rank indicó diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier ( $X^2_{g.l.: 3} = 9,75$ ;  $P = 0,021$ ). Por comparaciones post-hoc de a pares, no se encontró un efecto significativo ( $P > 0,0127$ ) del tiempo de exposición entre los insectos tratados con CEP 423. Tampoco se encontraron diferencias entre ambos controles ( $P > 0,0127$ ), ni entre la curva de supervivencia de los insectos expuestos al hongo durante 24 h con su respectivo control ( $P > 0,0127$ ). Sí difirieron significativamente la supervivencia de los insectos expuestos a CEP 423 durante 6 h con su respectivo control ( $P < 0,0127$ ).

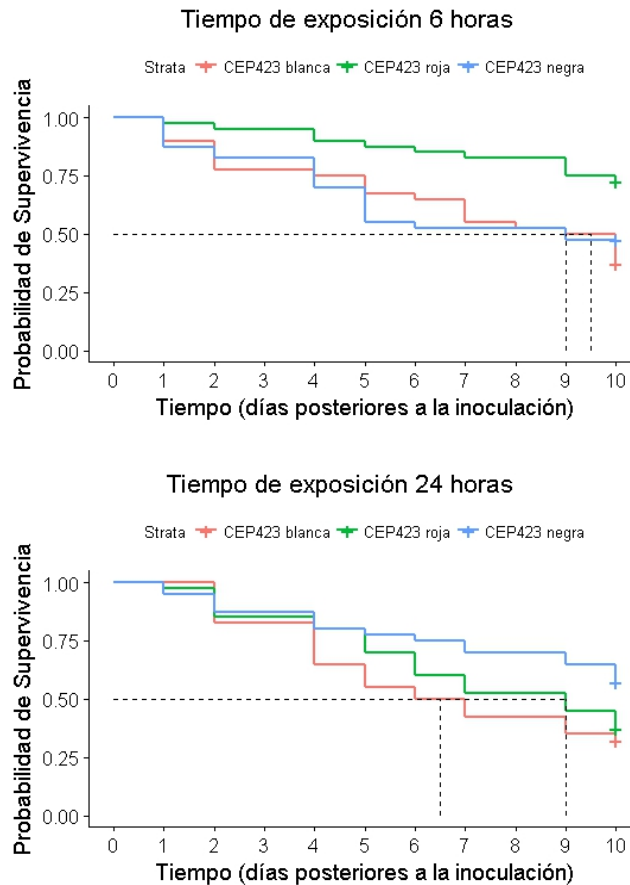
Sustrato inoculado	Tratamiento	Tiempo de Exposición (h)	Tiempo de Supervivencia (TS) de <i>Ae. aegypti</i> (días)	
			Media $\pm$ D.E.	Mediana $\pm$ D.A.M.
Blanca 60Alg:40Pol	Control	6	9,1 $\pm$ 2,2	10,0 $\pm$ 0,0*
		24	8,9 $\pm$ 2,6	10,0 $\pm$ 0,0 **
	CEP 423	6	7,1 $\pm$ 3,5	9,5 $\pm$ 0,7*
		24	6,5 $\pm$ 3,2	6,5 $\pm$ 5,2 **
Roja 100Pol	Control	6	8,3 $\pm$ 3,0	10,0 $\pm$ 0,0
		24	9,0 $\pm$ 2,7	10,0 $\pm$ 0,0 **
	CEP 423	6	8,9 $\pm$ 2,4	10,0 $\pm$ 0,0*
		24	7,3 $\pm$ 3,1	9,0 $\pm$ 1,5* **
Negra 100Pol	Control	6	8,9 $\pm$ 2,4	10,0 $\pm$ 0,0*
		24	8,6 $\pm$ 2,3	10,0 $\pm$ 0,0
	CEP 423	6	6,8 $\pm$ 3,5	9,0 $\pm$ 3,5*
		24	8,1 $\pm$ 3,1	10,0 $\pm$ 0,0

**Tabla 6:** Efecto del tiempo de exposición en el tiempo de supervivencia (TS) de *Ae. aegypti* expuestos a telas tratadas con CEP 423 (1 ml de concentración  $3 \times 10^8$  conidios/ml) o Tween 80 acuoso, 0,01% v/v (control) durante 6 o 24 h. Se indica el valor de TS estimado según la media  $\pm$  desvío estándar (D.E.) y la mediana  $\pm$  desviación absoluta respecto a la mediana (D.A.M.). N = 40 en cada tratamiento. Para todos los grupos, en el cálculo de TS se tuvieron en cuenta datos censurados, es decir que para algunos individuos se estimó un TS = 10 días (valor máximo), pudiendo ser este un valor mayor. Los símbolos \* y \*\* indican diferencias significativas en la mediana del tiempo de supervivencia entre los pares indicados, de cada tipo de sustrato, encontradas en el análisis de las curvas de Kaplan-Meier y comparaciones post-hoc entre pares (Log-Rank,  $P < 0,0127$ ).



**Figura 20:** Efecto del tiempo de exposición (6 o 24 h) a telas tratadas con Tween 80 acuoso, 0,01% v/v (control) o *M. anisopliae* CEP 423 (1 ml de concentración  $3 \times 10^8$  conidios/ml), en la supervivencia de *Ae. aegypti*. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que los datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0127$ ): tela blanca: (control 6h- CEP 423 6h) y (control 24h- CEP 423 24h), tela roja: (control 24h-CEP 423 24h) y (CEP 423 6h-CEP 423 24h), tela negra: (control 6h- CEP 423 6h).

Teniendo en cuenta al factor tipo de sustrato, como se esperaba no se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los individuos expuestos a las telas utilizadas como control y expuestos a esta durante 24 horas de exposición (Log-Rank,  $X^2_{g.l.:2} = 4,9$ ;  $P = 0,086$ ). En cuanto a los individuos expuestos durante 6 h a las telas tratadas con CEP 423, los resultados arrojaron diferencias significativas (Log-Rank,  $X^2_{g.l.:2} = 9,98$ ;  $P = 0,007$ ) entre las curvas de supervivencia. Con un  $\alpha_i$  por comparación de 0,017, correspondiente a 3 comparaciones post-hoc, se encontraron diferencias significativas entre la tela blanca y la roja, y también entre la tela negra y la roja (anexo, tabla A6). No se encontraron diferencias significativas para 24 h de exposición (Log-Rank,  $X^2_{g.l.:2} = 5,85$ ;  $P = 0,054$ ) aunque con p-valor cercano al límite de significancia. Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 21.



**Figura 21:** Efecto del tipo de sustrato inoculado con *M. anisopliae* CEP 423 (1 ml de concentración  $3 \times 10^8$  conidios/ml), en la supervivencia de *Ae. aegypti*. El símbolo + sobre la curva en el día 10 indica que los datos fueron censurados. Al interceptar la línea punteada con las curvas, sobre el eje x, se puede estimar el tiempo que sobrevive la mitad de los individuos tratados, desde el momento de la aplicación del inóculo. Comparaciones post-hoc entre pares que resultaron significativas (Log-Rank,  $P < 0,0127$ ): 6 horas de exposición: (CEP 423 blanca-CEP 423 roja) y (CEP 423 roja-CEP 423 negra); 24 horas de exposición: no se encontraron diferencias significativas.

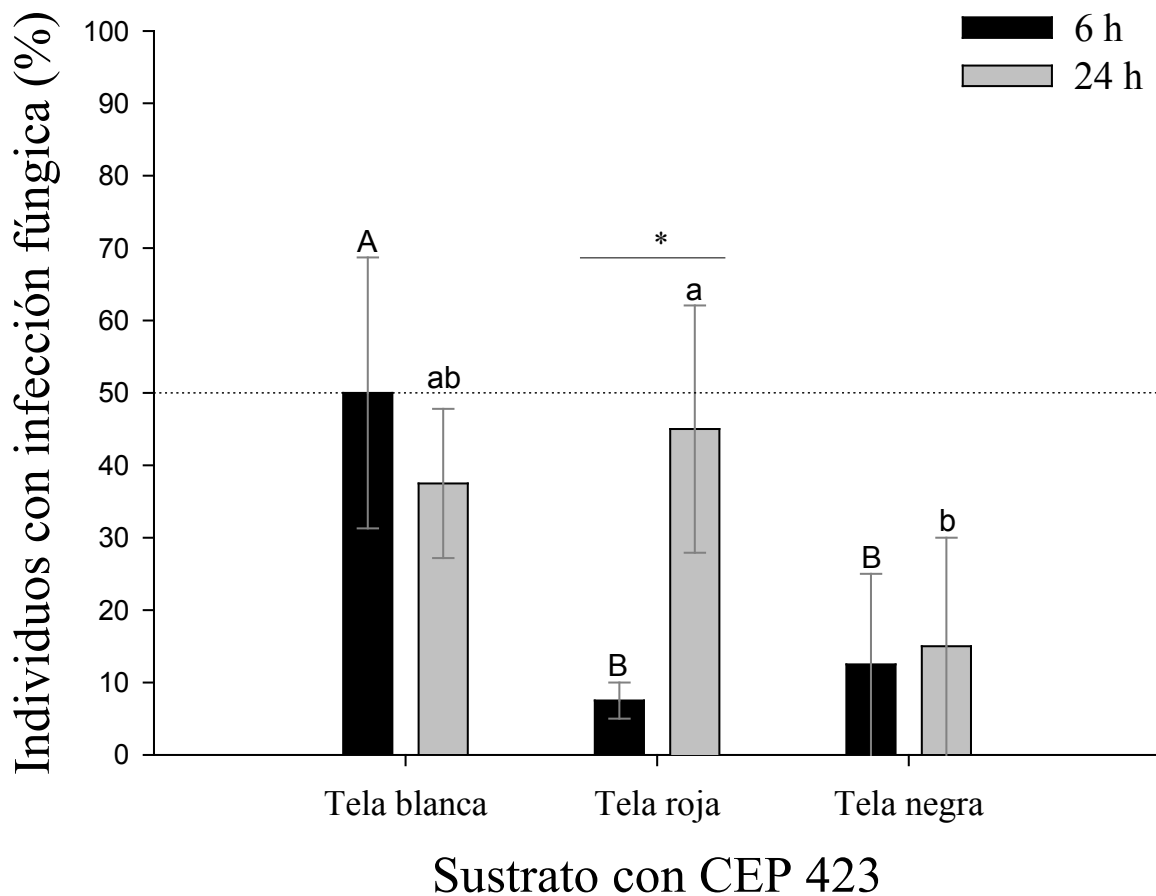
## 2.2 Mortalidad por infección fúngica confirmada

En la tabla 7 se indica el porcentaje de individuos infectados para cada sustrato y tiempo de exposición. También se observa el resultado del análisis de proporciones para evaluar el efecto del tiempo de exposición al inóculo en la infectividad de *M. anisopliae* CEP 423 contra *Ae. aegypti*. El tiempo de exposición no fue significativo en el porcentaje de individuos infectados tanto en la tela blanca ( $X^2_{g.l.: 1} = 0,81$ ;  $P = 0,37$ ) como en la negra ( $X^2_{g.l.: 1} = 5,2 \times 10^{-33}$ ;  $P = 1$ ). En cambio, resultó ser un factor significativo para la tela roja ( $X^2_{g.l.: 1} = 12,66$ ;  $P = 0,00037$ ) en la cual al aumentar el tiempo de exposición al inóculo aumentó la proporción de organismos infectados con el hongo.

Sustrato inoculado con CEP 423	Tiempo de Exposición (h)	Porcentaje de infección fúngica acumulado (día 10) $\pm$ E.E.	Análisis de proporciones	
			$X^2_{g.l.: 1}$	P
Tela Blanca 60%Alg40%Pol	6	50,0 $\pm$ 18,7	0,81	0,37
	24	37,5 $\pm$ 10,3		
Tela Roja 100%Pol	6	7,5 $\pm$ 2,5	12,66	0,00
	24	45,0 $\pm$ 17,1		
Tela Negra 100%Pol	6	12,5 $\pm$ 12,5	$5,2 \times 10^{-33}$	1
	24	15,0 $\pm$ 15,0		

**Tabla 7:** Mortalidad por infección fúngica confirmada. Porcentaje de individuos de *Ae. aegypti* infectados con *M. anisopliae* inoculado a través de tres tipos de sustratos durante 6 o 24 h. E.E.: error estándar de cuatro repeticiones.

En cuanto al tipo de sustrato utilizado, se encontró un efecto significativo en el grado de infección de *Ae. aegypti* tanto para el tiempo de exposición de 6 ( $X^2_{g.l.: 2} = 24,13$ ;  $P = 5,8 \times 10^{-6}$ ) como de 24 h ( $X^2_{g.l.: 2} = 8,89$ ;  $P = 0,0117$ ). Con 6 h de exposición la tela blanca provocó un mayor porcentaje de infección significativamente diferente de los otros dos sustratos. Con 24 h de exposición se encontraron diferencias significativas entre las telas roja y negra, siendo esta última la que provocó el menor porcentaje de infección. Estos resultados se observan en la figura 22 y se detallan las comparaciones post-hoc entre pares en el anexo (tabla A7).



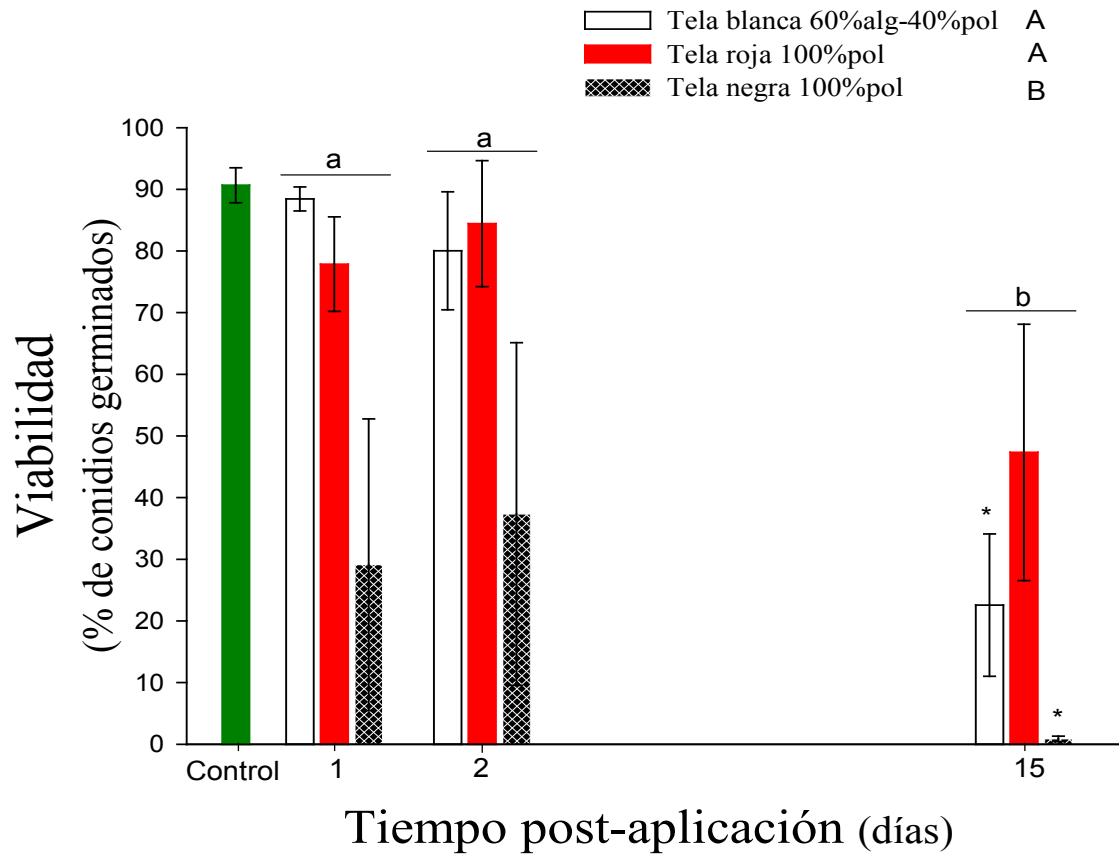
**Figura 22:** Mortalidad por infección fúngica confirmada. Porcentaje de individuos de *Ae. aegypti* infectados con *M. anisopliae* CEP 423 inoculado a través de tres tipos de sustratos. Letras diferentes indican diferencias significativas por comparaciones post-hoc entre pares de tratamientos (análisis de proporciones,  $P < 0,017$ ). Las letras mayúsculas indican las diferencias significativas entre los sustratos para 6 h de exposición. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los sustratos para 24 h de exposición. El asterisco indica diferencias significativas entre los dos tiempos de exposición, 6 y 24 h, a la tela roja. Las líneas verticales indican error estándar de cuatro repeticiones.

### 2.3 Viabilidad de los conidios sobre las telas a diferentes tiempos post-aplicación

En la figura 23 se observa el porcentaje de germinación de conidios luego de 24 h de incubación en una cámara húmeda con medio de cultivo SDAY<sub>1/4</sub> suplementado con cloranfenicol 0,05% p/v. Se observa este valor para el control, para cada tipo de sustrato (tela blanca, negra o roja) y para cada tiempo post-aplicación (1, 2 o 15 días). El valor de viabilidad de la suspensión antes de la aplicación sobre las telas fue de  $90,7 \pm 2,8\%$ . Para los distintos tratamientos los valores de viabilidad obtenidos se detallan en la tabla 8.

Al transformar los datos de proporciones con la función arcoseno-raíz cuadrada, la prueba de Levene resultó no significativa (factor sustrato:  $F_{g.l.: 2,24} = 2,18$ ;  $P = 0,1354$ ; factor tiempo post-aplicación:  $F_{g.l.: 2,24} = 0,65$ ;  $P = 0,5311$ ), por ende no se rechazó la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. Por otro lado, la prueba de Shapiro-Wilks modificada también arrojó un resultado no significativo ( $W_{g.l.: 27} = 0,95$ ;  $P = 0,4845$ ), por lo tanto no se rechazó la hipótesis nula de distribución normal de los residuos. Al realizar el ANOVA de dos factores no se encontró una interacción significativa entre los dos factores ( $F_{g.l.: 4,18} = 0,37$ ;  $P = 0,825$ ) por eso se procedió a analizar los efectos principales por separado. Se encontró un efecto significativo del tipo de sustrato inoculado ( $F_{g.l.: 2,18} = 9,45$ ;  $P = 0,0016$ ). La comparación post-hoc de Tukey demostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la tela negra 100% poliéster y las otras dos, presentando la primera un porcentaje de viabilidad de conidios menor. Por otro lado, también se encontró un efecto significativo del tiempo post-aplicación de los conidios independientemente del sustrato sobre el cual fueron aplicados ( $F_{g.l.: 2,18} = 7,75$ ;  $P = 0,0037$ ). La comparación post-hoc de Tukey demostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre el tiempo de 15 días y los tiempos de 1 y 2 días post-aplicación. Es decir que la viabilidad de los conidios sobre el sustrato disminuyó significativamente a lo largo del tiempo.

El control se comparó con cada uno de los tratamientos mediante una prueba de t para dos muestras independientes. La tela blanca difirió significativamente del control solo luego de 15 días posteriores a la aplicación (control vs. tela blanca 1 día post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = -0,69$ ,  $P = 0,52$ ; control vs. tela blanca 2 días post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = -0,96$ ,  $P = 0,39$ ; control vs. tela blanca 15 días post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = -5,06$ ,  $P = 0,007$ ). La tela roja no difirió significativamente del control en ninguno de los días posteriores a la aplicación (control vs. tela roja 1 día post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = 1,65$ ,  $P = 0,17$ ; control vs. tela roja 2 días post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = 0,46$ ,  $P = 0,67$ ; control vs. tela roja 15 días post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = 2,16$ ,  $P = 0,097$ ). La tela negra difirió significativamente del control solo luego de 15 días posteriores a la aplicación (control vs. tela negra 1 día post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = 2,59$ ,  $P = 0,061$ ; control vs. tela negra 2 días post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = 1,86$ ,  $P = 0,2$ ; control vs. tela negra 15 días post-aplicación:  $T_{g.l.: 4} = 18,25$ ,  $P = 0,0001$ ).



**Figura 23:** Viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* CEP 423 aplicados sobre diferentes sustratos textiles. Alg: algodón, Pol: poliéster. Las líneas verticales indican error estándar de tres repeticiones. En verde se observa la viabilidad de los conidios antes de la aplicación sobre las telas. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0,05$ ). En mayúscula se indican las diferencias significativas entre los sustratos. En minúscula, las diferencias significativas entre los tiempos post-aplicación del inóculo sobre la tela. El asterisco \* indica diferencias significativas entre el tratamiento marcado y el control (Prueba T entre dos muestras independientes,  $P < 0,05$ ).

A modo de resumen en la tabla 8 se definen los parámetros analizados para cada sustrato. En el momento de elegir a uno que sea efectivo el control biológico de *Ae. aegypti* se debe tener en cuenta que la tela blanca ha provocado la mayor infección en menor tiempo. Sin embargo, la tela roja si bien requiere mayor tiempo de exposición para lograr el mismo grado de infección, presenta la ventaja de conservar la viabilidad de los conidios por más tiempo.

Sustrato inoculado con CEP 423	Supervivencia		Infectados (%)		Viabilidad (media ± E.E.)		
	TS de <i>Ae. aegypti</i> (mediana ± D.A.M.) (días)						
	6 h de exposición	24 h de exposición	6 h exposición	24 h de exposición	1 día	2 días	15 días
Tela blanca 60%Alg40%Pol	9,5 ± 0,7 a	6,5 ± 5,2 ab	50,0 a	37,5 ab	88,4 ± 1,9 A a	80,0 ± 9,6 A a	22,6 ± 11,5 A b
Tela roja 100%Pol	10,0 ± 0,0 a *	9,0 ± 1,5 a *	7,5 b **	45,0 a **	77,9 ± 7,7 A a	84,4 ± 10,2 A a	47,3 ± 20,8 A b
Tela negra 100%Pol	9,0 ± 3,5 b	10,0 ± 0,0 b	12,5 b	15,0 b	29,1 ± 23,6 B a	37,3 ± 27,8 B a	0,89 ± 0,44 B b

**Tabla 8:** Resumen de los parámetros obtenidos acerca de la aplicación indirecta de conidios de *M. anisopliae* CEP 423 sobre adultos de *Ae. aegypti*, a través de distintos sustratos textiles. **Tiempo de supervivencia** (TS) (días) de *Ae. aegypti* en función del tipo de sustrato inoculado y del tiempo de exposición (h) del insecto a los conidios, respectivamente. D.A.M.: desviación absoluta respecto a la mediana, las letras diferentes en esta columna indican diferencias significativas de las curvas de supervivencia, por comparaciones post-hoc entre pares (Log-Rank,  $P < 0,017$ );  $N = 40$ . \* Indica un efecto significativo del tiempo de exposición entre el par indicado. **Infectados** (% acumulado de individuos de *Ae. aegypti* infectados al día 10 post tratamiento). Las letras diferentes indican diferencias significativas por comparaciones post-hoc entre pares (análisis de proporciones,  $P < 0,017$ );  $N = 40$ . \*\* Indica un efecto significativo del tiempo de exposición entre el par indicado. **Viabilidad** (% de conidios germinados *in vitro*); E.E.: error estándar.  $N = 3$ . Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0,05$ ): en mayúscula se indican las diferencias significativas entre los sustratos. En minúscula, las diferencias significativas entre los tiempos post-aplicación del inóculo sobre la tela

## Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que seis de los nueve aislamientos fúngicos de *M. anisopliae* evaluados fueron capaces de infectar y matar a los adultos de *Ae. aegypti*, tratados en condiciones de laboratorio. Se encontró una diferencia significativa entre las CL<sub>50</sub> de los aislamientos patogénicos pero no de los TL<sub>50</sub> ni TL<sub>90</sub>. De esta manera, se corroboró la hipótesis planteada de que existe una variabilidad entre las cepas nativas en cuanto a la patogenicidad y a la virulencia contra adultos de *Ae. aegypti*, pero no se encontró una diferencia significativa en la agresividad entre las cepas. Otros trabajos en los cuales se evaluaron cepas fúngicas con potencial para el control de mosquitos vectores (Scholte *et al.*, 2003 a, Blanford *et al.*, 2005; Paula *et al.*, 2008; Leles *et al.*, 2010; Valero-Jiménez *et al.*, 2014), también comprobaron que existe una variación en el grado de virulencia de cada aislamiento. La virulencia ha sido relacionada con características morfológicas y fisiológicas del hongo tales como tasa de crecimiento hifal y de esporulación, el tamaño de los conidios, la producción y secreción de enzimas, y la expresión de genes que codifican para toxinas (Liu *et al.*, 2003; Talaei-Hassanloui *et al.*, 2006; Aguilera *et al.*, 2016; Valero-Jiménez *et al.*, 2016 a-b).

La primera característica que se evaluó en este trabajo fue la viabilidad de los conidios de cada aislamiento que ha sido relacionada con la calidad del inóculo (Jenkins y Grzywacz, 2000) y la variabilidad intraespecífica de la virulencia (Daoust y Roberts, 1982). Una tasa de germinación alta podría provocar una colonización del hospedador más rápida. Sin embargo, otros estudios demostraron que no existe una correlación entre la viabilidad y la virulencia (James y Jaronski, 2000; Liu *et al.*, 2003; Talaei-Hassanloui *et al.*, 2006). En concordancia con esto último, la germinación de los conidios en este caso no resultó ser un factor determinante ni predictor de la virulencia de las cepas fúngicas. Por ejemplo, CEP 423, con un valor significativamente menor de viabilidad que el resto de las cepas, fue la más virulenta al presentar una menor CL<sub>50</sub>, también significativamente diferente de la de los otros aislamientos, y además, provocó el mayor porcentaje de insectos infectados. Por el contrario, CEP 085 presentó la mayor viabilidad y la CL<sub>50</sub> resultó ser de las más elevadas y por ende menos virulenta.

La concentración del inóculo tuvo un efecto significativo en el tiempo de supervivencia de *Ae. aegypti*, el cual se redujo al aumentar la concentración. En los controles el tiempo de supervivencia difirió significativamente del de los insectos tratados

con todas las cepas fúngicas, pero para que esto ocurra cada aislamiento presentó un umbral de concentración diferente. Además, más allá de cierta concentración ya no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los insectos. De manera similar ocurrió con la proporción de individuos muertos con confirmación de la infección fúngica para cada aislamiento, que fue dependiente de la concentración del inóculo pero alcanzó un tope máximo, que no se incrementó al aumentar la concentración. Estos parámetros deben ser considerados a la hora de tomar decisiones respecto a la concentración de la cepa fúngica que se debiera utilizar en un programa de control microbiano de mosquitos optimizando el manejo y favoreciendo la reducción de los costos.

En algunos casos no pudo comprobarse la infección fúngica de los insectos muertos ya que no se observó esporulación sobre los cadáveres. Esto genera las diferencias entre los valores obtenidos de tiempo de supervivencia (mediana), calculado sobre todos los insectos muertos, y el TL<sub>50</sub>, calculado sobre los insectos muertos e infectados. Se ha demostrado que esta última parte del ciclo del hongo depende del régimen de temperatura y del estado de desarrollo en cual se encontraba el insecto en el momento de la infección, y que la esporulación por fuera del cadáver no siempre ocurre (Elliot *et al.*, 2002). En los resultados de este capítulo, si bien no se descarta la posibilidad de que el hongo no haya podido esporular por fuera del cadáver, es más probable que los insectos en los que no se observó esporulación hayan muertos por causas ajenas al hongo. Los valores de mortalidad en los controles fueron de entre 6 y 36%, pudiendo deberse a errores en la manipulación de los insectos. Se debe destacar que el ensayo en el que más controles se murieron fue el que correspondió a CEP 404 que correspondientemente presentó un TS menor (en los insectos tratados) que otras cepas. Es por esto, que en este caso, el valor de TL brinda información más certera acerca de la agresividad de la cepa y este valor debería relacionarse con el periodo de incubación extrínseco del arbovirus.

En cuanto a la capacidad vectorial de *Ae. aegypti*, el tiempo en el cual el mosquito es capaz de transmitir, por ejemplo el virus del dengue, varía entre 9 y 23 días a 26 y 28 °C, y entre 5 y 19 días a 30 °C, posteriores a adquirirlo (Rohani *et al.*, 2009; Tjaden *et al.*, 2013). En este trabajo de tesis, encontramos que la agresividad de las cepas fúngicas utilizadas a 27 ± 1 °C fue de un TL<sub>50</sub> de 6-7 días, y un TL<sub>90</sub> de 9-16 días, lo cual es un resultado promisorio para reducir la transmisión del virus. Otros estudios han demostrado que la utilización de hongos entomopatógenos disminuyó la transmisión de la malaria en África reduciendo la sobrevivencia del mosquito a un tiempo menor que el tiempo que requiere el parásito *Plasmodium* sp. para desarrollarse en el hospedero (Blanford *et al.*, 2005).

Adicionalmente a las características propias de cada aislamiento fúngico, el método de aplicación de los conidios también resulta relevante ya que contribuye a la distribución de los conidios sobre la cutícula del insecto (Fernández *et al.*, 2001). El hongo entomopatógeno tiende a penetrar por la cutícula en los lugares más débiles, por eso el sitio donde se adhiere el conidio a la cutícula puede dar lugar a que la penetración e infección sea exitosa o no. Utilizando el método de aplicación de los conidios de CEP 423 directamente sobre los mosquitos por aspersión, se consiguió una mayor proporción de insectos infectados y un menor tiempo de supervivencia, que cuando se aplicó un método indirecto. Estos resultados concuerdan con los de Fernández *et al.* (2001) con *Leptinotarsa decemlineata* (Lepidoptera: Chrysomelidae), quienes observaron que los conidios aplicados por aspersión tenían una tasa de germinación más rápida que los aplicados indirectamente, dejando a los insectos caminar sobre hojas tratadas. Se propone en dicho trabajo que la presión de la pulverización puede mejorar el alojamiento del conidio dentro de los pliegues cuticulares, facilitando la germinación y la penetración. Si el insecto está expuesto a un sustrato con conidios, la infección depende de la capacidad del hongo para sobrevivir hasta que se contacte con el huésped. Por otro lado, la aplicación de conidios en suspensión tiene la ventaja de que el inóculo ya presenta humedad por lo tanto pueden germinar directamente, en cambio las esporas aplicadas sobre un sustrato, en caso de que se hayan secado, deben primero absorber humedad del ambiente para luego germinar.

Los trabajos llevados a cabo con mosquitos mayoritariamente se enfocan en la aplicación indirecta de conidios de hongos entomopatógenos sobre papel (Scholte *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2008; Valero-Jimenez *et al.*, 2014), telas (Mnyone *et al.*, 2010, 2012; Farenhorst *et al.*, 2011; Paula *et al.*, 2013, Carolino *et al.*, 2014), sustratos de arcilla o barro (Farenhorst *et al.*, 2008; Mnyone *et al.*, 2010), o bien, en el uso de trampas (Snetselaar *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Paula *et al.*, 2018). Si se piensa aplicar el producto a gran escala, la aplicación indirecta presenta ventajas sobre la directa tales como reducir el volumen a inocular, disminuir el contacto con el ser humano, y si se diseñan sustratos específicos para un determinado huésped, se puede disminuir la posibilidad de atacar a organismos no blancos o benéficos. Más allá de que los resultados obtenidos indiquen que con el método de aplicación directo se haya logrado una mayor infectividad que con el indirecto, los sustratos tratados con el hongo sirvieron como lugar de reposo de los mosquitos y al contactarlos estos fueron infectados. Se obtuvo en efecto un porcentaje de insectos infectados. Sin embargo, son necesarias futuras investigaciones orientadas a aumentar la concentración o desarrollar formulaciones que faciliten la adhesión de los

conidios. También se verificó que la composición, la trama y el color de las diferentes telas influyeron en la capacidad de ceder al inóculo (% de insectos infectados) y en la supervivencia de los conidios allí aplicados (viabilidad en función de tiempo post-aplicación).

Otros autores han demostrado que el uso de telas de algodón negras tratadas con *M. anisopliae* o *B. bassiana*, son sustratos atractivos para *Ae. aegypti*, donde los adultos, al posarse, se infectan con el hongo (Paula *et al.*, 2013, Carolino *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). En estos trabajos, a los 7 días luego del tratamiento y con una exposición de los mosquitos hacia la tela de 24 h se encontró una supervivencia de alrededor del 30% y un tiempo de supervivencia (mediana) de entre 3 y 4 días (Paula *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2018). En los ensayos realizados en esta tesis los tiempos de supervivencia y los porcentajes de supervivencia a los 10 días posteriores a la inoculación, fueron mayores a los encontrados por otros autores. Debido a que diversos materiales pueden estar disponibles en una vivienda, como alternativa se utilizó en este trabajo una tela roja, ya que tanto el color rojo como el negro resultan atractivos para adultos de *Ae. aegypti* (Brett, 1938; Badano y Regidor, 2002), una blanca y otra negra cuyo entramado de fibras conforman un tamaño de poro más amplio. En todos los casos se encontró un porcentaje de mortalidad que no se correspondió con el porcentaje de insectos esporulados, pudiendo deberse la muerte de los insectos a la manipulación durante el ensayo. En cuanto a la tela negra, es probable que alguno de los componentes que se utilizan en la industria textil pudiera haber interferido en el ensayo ya que la viabilidad de los conidios allí aplicados fue baja, en concordancia con el porcentaje de infección. Además, Farenhorst *et al.*, 2011 demostraron que resultan más infectivas las telas con trama cerrada que aquellas que pudieran perder parte del producto rociado que atraviesa los poros. En cuanto a los tipos de telas utilizadas, que se diferencian en su composición (algodón y poliéster o poliéster solo), la eficacia para infectar y matar a *Ae. aegypti*, con un menor tiempo de exposición, fue mayor en la tela blanca de algodón-poliéster. En coincidencia con los resultados obtenidos en esta tesis, Farenhorst *et al.* (2011) encontraron que el algodón resultó más efectivo que el poliéster.

En relación al tiempo de exposición del mosquito a la superficie tratada con el patógeno, es difícil calcular cuánto tiempo de contacto es el necesario para que ocurra la adhesión del conidio y la infección. Aumentar el tiempo de exposición solo aumenta la probabilidad de que ocurra el contacto pero no asegura que vaya a ocurrir. Se esperaba que con 24 h de exposición el porcentaje de infección fuese mayor que con 6 h, lo cual resultó

significativo solo en el caso de la tela roja. Estudios previos han demostrado que un tiempo mínimo de 3 h de exposición, fue suficiente para conseguir la infección en bioensayos similares donde se cubría con el sustrato tratado a toda la superficie con la que pudiera tener contacto el mosquito (Farenhorst, *et al.*, 2011; Valero-Jiménez *et al.*, 2014). Sin embargo, de acuerdo a la metodología llevada a cabo en los bioensayos realizados en esta tesis, se requirió de un tiempo mayor ya que el mosquito tenía la posibilidad de posarse tanto sobre la tela tratada como sobre las restantes superficies no tratadas dentro del recipiente según su elección, que es una situación que ocurriría en un ensayo a campo.

En cuanto a la persistencia de los conidios en los sustratos, cabe aclarar que se evaluó de forma preliminar la patogenicidad de los conidios en las telas luego de una semana post-inoculación pero no se encontró un resultado positivo en ninguna de las telas tratadas. Según Carolino *et al.* (2014) los conidios son patogénicos en las telas, inoculados con Tween 80 acuoso, por hasta 11 días luego de la aplicación. En cuanto a la viabilidad de los conidios, se encontró una disminución de la misma a los 15 días independientemente de la composición de la tela. Farenhorst *et al.* (2011) encontraron que la viabilidad de los conidios en la tela de algodón fue más alta que en la tela de poliéster, atribuido a sustancias químicas que se utilizan para suavizar las fibras del poliéster (Pang *et al.*, 2006). En este trabajo la viabilidad de los conidios, por el contrario, se mantuvo mejor a lo largo del tiempo en la tela roja de poliéster.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan al conocimiento de las condiciones de aplicación que deberían ser tenidas en cuenta al momento de desarrollar una estrategia de control de *Ae. aegypti* basada en hongos entomopatógenos. Si bien se han obtenido resultados promisorios mediante el método de aplicación directa de *M. anisopliae* aún resta realizar pruebas de patogenicidad sobre otros organismos no blanco. Para la aplicación indirecta se deberá tener en cuenta el mejor sustrato a inocular que facilite la transmisión de los conidios y que a la vez resulte atractivo para el mosquito.

## Capítulo III

# Efecto de la radiación UV-B en la viabilidad de *Metarhizium anisopliae* s.l. IP 46 y la virulencia contra *Aedes aegypti*

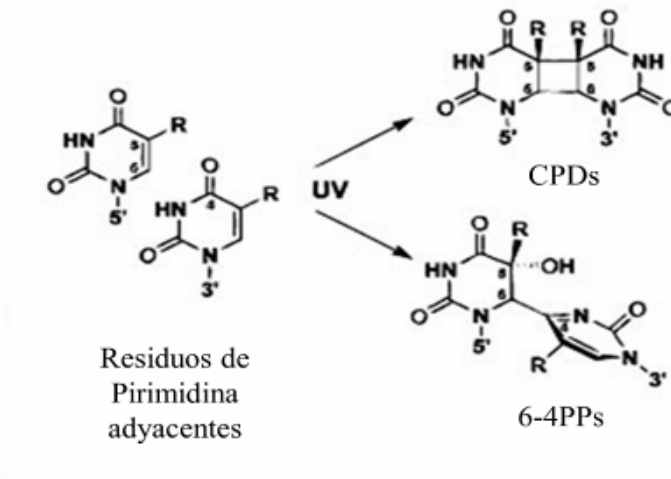
Esta investigación fue financiada por la Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (CAPES, Brasil) y el Ministerio de Educación de la Nación Argentina (PPCP016/2011). Se realizó bajo la supervisión de los Drs. Christian Luz y Éverton Fernandes en el Laboratorio de Patología de Invertebrados (IPTSP-UFG), Goiânia, GO, Brasil.

La información suministrada en este capítulo ha sido publicada en los siguientes trabajos científicos:

- ♦ Falvo, M. L., Pereira-Junior, R. A., Rodrigues, J., López Lastra, C. C., García, J. J., Fernandes, É. K. K. y Luz, C. (2016). UV-B radiation reduces in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* s.l but does not affect virulence in fungus treated *Aedes aegypti* adults and development on dead mosquitoes. *Journal of Applied Microbiology*, 121(6), 1710-1717. doi: 10.1111/jam.13309
  
- ♦ Falvo, M. L., Albornoz Medina, P., Rodrigues, J., López Lastra, C. C., García, J. J., Fernandes, É. K. K. y Luz, C. (2018). Effect of UV-B irradiation on water-suspended *Metarhizium anisopliae* s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae) conidia and their larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 55(5), 1330–1333. doi: 10.1093/jme/tjy071

## Introducción

La radiación solar está conformada por radiaciones electromagnéticas que se distribuyen desde el infrarrojo hasta el ultravioleta, incluyendo el espectro de luz visible (Chance y Kurucz, 2010). Las ondas de la radiación ultravioleta presentan una longitud de onda de menor y mayor energía y por ende son más dañinas. Se clasifican en tres tipos UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm) y UV-C (100–280 nm). La atmósfera terrestre absorbe el espectro UV-C. La radiación UV-B es parcialmente absorbida por el ozono pero una parte llega a la superficie de la tierra junto con la UV-A (Diffey, 2002), situación que es agravada por el agujero de ozono que se produce en los polos del planeta. La radiación UV-A incide sobre las células de manera indirecta ya que no es absorbida por las moléculas sino que provoca un estrés oxidativo a través de la generación de especies reactivas a oxígeno (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*) (Cadet *et al.*, 2005). Como se mencionó anteriormente, la longitud de onda más pequeña hace que la radiación UV-B sea más deletérea que la UV-A. La radiación UV-B es absorbida directamente por los cromóforos celulares tales como el ADN, proteínas y fosfolípidos. El ADN es el blanco principal de la radiación UV-B induciendo la formación de dímeros de pirimidina por uniones de enlaces covalentes entre bases de pirimidina adyacentes (figura 24). Se forman así los siguientes productos: dímeros ciclobutano-pirimidina (CPDs, del inglés *cyclobutane pyrimidine dimers*) y dímeros del tipo pirimidina (6,4) pirimidinona, conocidos como 6,4 fotoproductos (6-4PPs, del inglés *photoproducts*) (Schuch *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2010; Cadet *et al.*, 2012). Esto genera una alta tasa de mutaciones y la muerte celular. Además, la radiación UV-B induce un estrés oxidativo a través de la formación de 8-hidroxi-2'-desoxi guanosina (8-oxodG) (Cadet *et al.*, 2015).



**Figura 24:** Estructura química de los dímeros de pirimidina producidos en el ADN, principal mecanismo de daño causado por la radiación UV-B. CPDs: dímeros ciclobutano-pirimidina (del inglés *cyclobutane pyrimidine dimers*). 6-4PPs: 6,4 fotoproductos (del inglés *photoproducts*), dímeros de pirimidina (6,4) pirimidinona.

El efecto de la radiación ultravioleta sobre varias especies de hongos entomopatógenos ha sido estudiado tanto en condiciones de laboratorio como de campo y en diferentes especies. La radiación UV-B puede matar a los conidios, y, en caso de que estos sobrevivan, afectar su viabilidad y virulencia. En estudios previos se ha demostrado que la viabilidad de los hongos entomopatógenos resulta perjudicada ya que la radiación UV-B inhibe o retrasa la germinación de los conidios (Fargues *et al.*, 1996; Braga *et al.*, 2001a–c, 2015; Fernandes *et al.*, 2015), y además, la exposición de los conidios a la radiación provoca una reducción en la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) (Braga *et al.*, 2001a–c). En consecuencia, la luz UV-B disminuye la eficacia de la infectividad y la persistencia de los propágulos en el campo (Zimmermann, 1982).

Los insectos con hábito de vida diurno están temporalmente expuestos a la radiación UV-B que proviene del sol. Por todo lo dicho, la efectividad del tratamiento de estos insectos con hongos entomopatógenos puede resultar obstaculizada por este factor. *Aedes aegypti* tiene en su ritmo circadiano dos momentos de máxima actividad de vuelo que coinciden con las primeras horas de la fotofase y el final de esta, dos horas antes de la puesta del sol (Taylor y Jones 1969; Araripe *et al.*, 2018). Durante estos momentos los adultos realizan las actividades de búsqueda de fuentes de néctar y pareja y, en el caso de las hembras, de fuentes sanguíneas y sitios de oviposición (Trpis *et al.*, 1973; Chadee y Martínez 2000; Cabrera y Jaffe 2007; Wong *et al.*, 2011 b). Uno de los objetivos

particulares de esta sección fue estudiar si la radiación UV-B afecta a los conidios del hongo entomopatógeno *M. anisopliae sensu lato* (s.l.). IP 46 depositados sobre la superficie de adultos de *Ae. aegypti*, luego de la inoculación. Además, continuando con la idea planteada en el capítulo II de la aplicación de *M. anisopliae* en lugares puntuales, otro objetivo fue evaluar el efecto de la luz UV-B en conidios aplicados sobre una tela de tipo mosquitero que, utilizada en ventanas, podría estar expuesta a la radiación solar.

Por otro lado, en los ecosistemas acuáticos el agua ejerce una protección contra el daño provocado por la radiación UV-B. Es decir que con la profundidad de la columna de agua, los efectos negativos de esta tienden a disminuir. Esto se debe por un lado, a que las partículas disueltas o en suspensión absorben parte de la radiación, y por otro, a que el agua refleja una parte de los rayos incidentes (Piazena *et al.*, 2002; Hader *et al.*, 2007). Como se mencionó anteriormente, los sitios de desarrollo de los estados acuáticos de *Ae. aegypti* se caracterizan por ser lugares pequeños donde se acumula agua de manera transitoria. En ellos el nivel de agua varía de acuerdo a las condiciones ambientales de temperatura, HR, precipitaciones y corrientes de aire. El segundo objetivo de este trabajo fue estudiar si en un posible sitio de cría de *Ae. aegypti*, donde la columna de agua suele ser pequeña y clara, los conidios de *M. anisopliae* resultaban protegidos de la radiación.

## **Materiales y Métodos**

### **1- Origen y mantención de la colonia de *Ae. aegypti* en el laboratorio**

Los individuos utilizados en los siguientes ensayos fueron criados en el Laboratorio de Patología de Invertebrados del Instituto de Patología Tropical y Salud Pública (IPTSP) de la Universidad Federal de Goiás (UFG), Brasil. La colonia de *Ae. aegypti* se originó a partir de larvas recolectadas en 2012 en la ciudad de Goiânia, Goiás, Brasil. Las condiciones ambientales del bioterio se mantuvieron constantes a  $27 \pm 5$  °C,  $75 \pm 10\%$  de HR y fotoperíodo natural. Los adultos permanecieron en una jaula (50 cm altura x 50 cm de ancho x 40 cm profundidad) cubierta en todos sus lados con una malla de nylon. Se les ofreció continuamente una solución de sacarosa al 10% p/v en un pequeño recipiente de vidrio con algodón y un papel de filtro colocado en posición vertical, de modo que la solución subía por capilaridad. Para la alimentación sanguínea de las hembras, dos veces por semana, se introducía en la jaula dos ratones inmovilizados y anestesiados (Lima *et al.*, 2009). Esta metodología fue aprobada por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la UFG (CEUA 079/13, UFG, Febrero 10, 2014). Para la oviposición se colocó dentro de la jaula un papel de filtro (15 cm de largo x 7 cm de ancho) ubicado en un vaso de vidrio color ámbar y levemente inmerso en agua. Tres días después de la alimentación, dicho papel de filtro con huevos era removido y se dejaba secar a temperatura ambiente durante 48 h para completar la embriogénesis. Luego eran almacenados a temperatura ambiente en bolsas plásticas hasta su utilización. Para el nacimiento de las larvas, dicho papel era sumergido en bandejas plásticas con 2 litros de agua de grifo. Para su alimentación se usó alimento balanceado para gatos triturado que era espolvoreado en días alternos sobre la superficie del agua. Al alcanzar el estado de pupas se traspasaban a vasos plásticos con 15 ml de agua y estos se colocaban dentro de vasos de plástico más grandes (7 cm de diámetro x 10 cm de altura) cubiertos con tela de voile y provisión de solución de sacarosa 10% p/v para cuando emergieran los adultos, que luego eran utilizados para los bioensayos o bien traspasados a la jaula de cría.

### **2- Origen y preservación *in vitro* de *M. anisopliae* s.l. IP 46**

La cepa utilizada para los bioensayos fue IP 46 que pertenece al complejo de *M. anisopliae* s.l. Fue aislado a partir de muestras de suelo del estado de Goiás, Brasil (Rocha *et al.*, 2013) y ha sido preservado en el Laboratorio de Patología de Invertebrados del

IPTSP (UFG, Brasil). Este aislamiento fue elegido debido a que en trabajos previos se demostró su patogenicidad contra huevos, larvas y adultos de *Ae. aegypti* (Leles *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2013; Lobo *et al.*, 2016). Se repicó en placas de Petri (100 mm de diámetro) con medio de cultivo PDA (papa, dextrosa, agar) (ver anexo) y se incubó durante 15 días a  $27 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 12 h luz/oscuridad.

### 3- Medición de la radiación ultravioleta

El daño provocado por la radiación ultravioleta es dependiente de las longitudes de onda que afectan a una determinada respuesta biológica. Por cada longitud de onda del espectro a analizar (en este caso el UV-B), se deben calcular dos parámetros: la irradiancia y el espectro de acción. Estos se deben tener en cuenta si se quiere comparar el efecto de la radiación ultravioleta para una respuesta biológica determinada en diferentes escenarios, por ejemplo en el campo, donde la radiación varía de acuerdo al ángulo de incidencia del sol o a la estación del año, o en un experimento de laboratorio donde la radiación proviene de lámparas. La irradiancia es la cantidad de energía (fotones), por longitud de onda, que incide sobre un área. Se mide en unidades de  $\text{mW cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  utilizando un espectrorradiómetro ( $I_\lambda$ ). El espectro de acción hace referencia al daño biológico causado por cada longitud de onda. Se determina a partir de experimentos en los cuales se expone una muestra biológica a diferentes longitudes de onda y se mide una respuesta determinada, por ejemplo la formación de dímeros de pirimidina en un determinado organismo. Dicha respuesta debe ser transformada utilizando valores numéricos (factores de ponderación,  $F_\lambda$ ) para relativizar el daño causado por cada longitud de onda. De estos dos parámetros se obtiene una “función biológica de ponderación espectral” (1) (BSWFs, del inglés *Biological spectral weighting functions*) multiplicando la irradiancia de cada longitud de onda por el factor de ponderación correspondiente.

$$\text{BSWF} = \sum I_\lambda \times F_\lambda; \quad \lambda = (290-400 \text{ nm}) \quad (1)$$

Existen diferentes BSWF de acuerdo al organismo con el cual se trabaja y el efecto que se quiere evaluar. La selección de la BSWF más apropiada es crítica y tiene implicancia en los resultados del experimento (Cullen y Neale, 1997).

La BSWF propuesta por Quate *et al.* (1992) explica el efecto de la radiación en la formación de dímeros de pirimidina en plántulas de alfalfa. Esta función otorga el valor 1 a

la respuesta biológica obtenida a 300 nm, atribuye factores de ponderación más altos a las longitudes de onda del espectro UV-B (290 a 299 nm) y resta importancia a las longitudes de onda del espectro UV-A (anexo, tabla A8). No existe hasta el momento una BSWF que utilice hongos como modelo. Para medir el efecto de la radiación UV-B sobre la germinación de los conidios de *M. anisopliae*, se utiliza la BSWF desarrollada por Quaitte *et al.* (1992) (Fernandes *et al.*, 2007; Braga *et al.*, 2001 a-c, Rangel *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2010). La misma es la recomendada por Paul *et al.* (1997), que luego de estudiar el espectro de acción de nueve respuestas biológicas de hongos concluyeron que el daño en el ADN del hongo se aproxima a dicha función (Braga *et al.*, 2001 b).

En este trabajo todas las mediciones de irradiancia se realizaron utilizando un espectrorradiómetro (Ocean Optics, USB2000 +RAD, Dunedin, FL). Antes de cada medición, se calibró el equipo cubriéndolo con papel aluminio que impide el paso de la luz. Este dispositivo permitió obtener la irradiancia para cada longitud de onda que incidía sobre una superficie en un tiempo determinado (1 segundo). Para que este valor tenga un significado biológico, las medidas de irradiancia obtenidas se normalizaron utilizando los coeficientes de ponderación de la BSWF desarrollada por Quaitte *et al.* (1992). Resumiendo, el valor final obtenido de irradiancia ponderada según la ecuación de Quaitte (al que se denominará valor de Quaitte), representa a la cantidad de energía proveniente de la fuente de emisión de radiación (ya sea el sol o lámparas de UV), que incide en una superficie determinada y que realmente afecta el ADN de un hongo expuesto a esa fuente. El valor de Quaitte ( $\text{mW m}^{-2}$ ) puede ser modificado en sus unidades a fin de obtener un valor final de dosis de irradiación ( $\text{kJ m}^{-2}$ ) que depende del tiempo de exposición, y que es el valor que se analizará a lo largo de este capítulo.

### 3.1 Exposición y medición de UV-B en un ambiente urbano

Durante los meses de agosto a noviembre de 2015 se midió una vez por mes la radiación ultravioleta emitida por el sol en la terraza del instituto IPTSP, ciudad de Goiânia, Brasil. Las mediciones se llevaron a cabo siempre en los mismos horarios: 10:00, 12:00 y 15:00 h en días soleados y despejados de nubes. Estas mediciones se realizaron con el fin de comparar la intensidad de la radiación UV-B de la luz solar local con la de la radiación proporcionada por una cámara de irradiación artificial en el laboratorio.

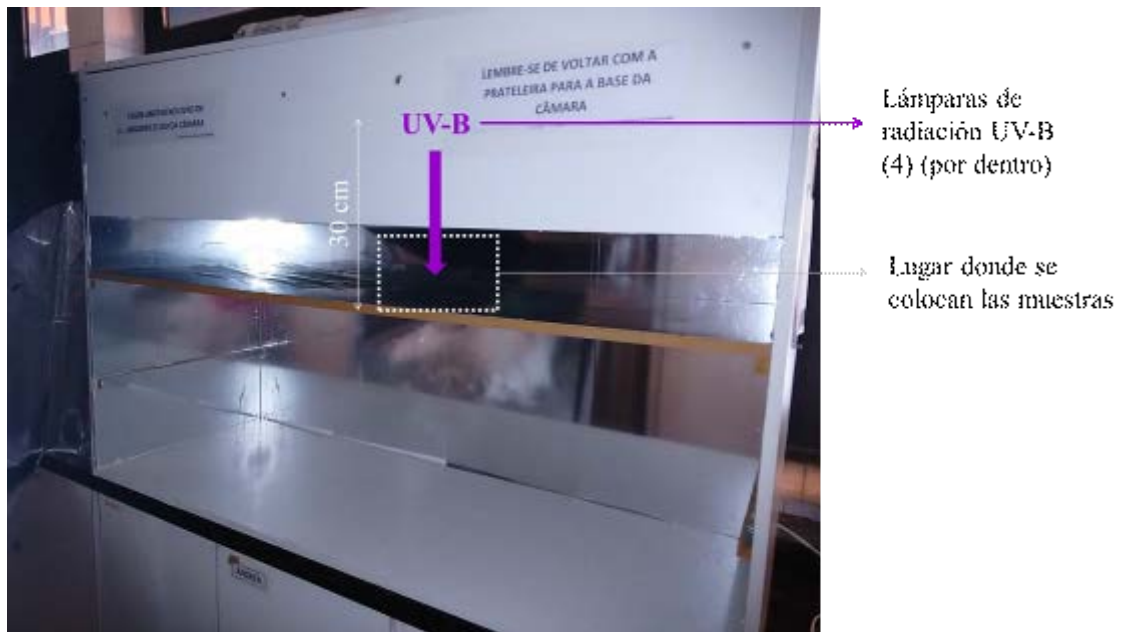
### 3.2 Exposición y medición de UV-B en el laboratorio

En condiciones de laboratorio la exposición a la radiación UV-B ocurrió dentro una cámara de madera (133 cm ancho x 986 cm altura x 950 cm profundidad) donde se encontraban cuatro lámparas de luz ultravioleta (UVB-313 EL; Q-Lab Corporation, Cleveland, OH, EE.UU) (figura 25). Antes de comenzar el ensayo, se encendieron las 4 lámparas durante 20 minutos y la cámara permaneció cerrada a fin de estabilizar la radiación. Al momento de colocar o retirar objetos de la cámara, las lámparas permanecieron encendidas por lo cual se utilizó un traje de seguridad con guardapolvo, guantes de látex y una máscara facial para evitar el contacto con la luz ultravioleta cuando la cámara se abría.

Los objetos a ser irradiados, dependiendo del experimento (detallado en cada una de las siguientes secciones), fueron colocados a una distancia de 30 cm de las lámparas, en el centro de la cámara. Durante todo el tiempo de exposición fueron cubiertos por un film de diacetato de celulosa de 0,13 mm de grosor (JCS Industries, Le Mirada, CA, EE.UU) que impedía el paso de las radiaciones de longitudes de onda menores a 290 nm (UV-C), que no están presentes en la biosfera. Las condiciones ambientales se midieron constantemente con un termohigrómetro (E9155020, AMARELL, Alemania). La temperatura se mantuvo estable a  $28 \pm 2$  °C utilizando la ventilación de dos aires acondicionados. La HR fue de  $45 \pm 10\%$ .

En la primera serie de ensayos de los que se describen a continuación, se realizaron bioensayos con mosquitos adultos y con conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 aplicados sobre un medio de cultivo y sobre un tejido de fibra de vidrio. En este caso, según las mediciones realizadas dentro de esta cámara con el espectrorradiómetro, los objetos fueron sometidos a una irradiancia ponderada por Quaité de  $1152 \text{ mW m}^{-2}$ . El tiempo de exposición fue de 10, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos por lo cual las dosis de irradiación recibidas fueron de 0,7; 2,1; 4,1; 8,3; 12,4 y  $16,6 \text{ kJ m}^{-2}$  respectivamente. Los bioensayos que le siguen, utilizando larvas de segundo estadio (L2) de *Ae. aegypti*, se realizaron 2 meses después y en este caso la irradiancia ponderada por los coeficientes de Quaité dentro de la cámara de radiación fue de  $1093 \text{ mW m}^{-2}$ . Se utilizaron los mismos tiempos de exposición y las dosis recibidas fueron de 0,7; 2,0; 3,9; 7,9; 11,8;  $15,7 \text{ kJ m}^{-2}$ , respectivamente. En todos los casos se colocó dentro de la cámara a un grupo de las correspondientes unidades experimentales, de acuerdo a cada ensayo que se describe a continuación, cubierto de papel aluminio durante el tiempo que duró el ensayo (240

minutos). Estas se utilizaron como control positivo ya que no recibieron radiación UV-B ( $0 \text{ kJ m}^{-2}$ ).



**Figura 25:** Cámara de irradiación de luz UV-B. Se observa el interior de la cámara, que cuenta con cuatro lámparas en la parte superior. En el centro del estante se realiza de forma periódica la medición de irradiancia con un espectrorradiómetro, luego se calcula la irradiancia ponderada (Quaite *et al.*, 1992). Allí mismo se colocan las muestras y luego se cierra completamente por el tiempo que dura la exposición.

#### 4- Viabilidad

La viabilidad de los conidios se evaluó antes del inicio de cada experimento y de cada repetición para verificar el buen estado del aislamiento fúngico IP 46 (porcentaje de germinación  $> 95\%$ ). También, se evaluó la viabilidad luego de la exposición a la radiación UV-B (secciones 5.3 y 6.3 de este capítulo, páginas 96 y 102, respectivamente). El procedimiento fue el mismo en ambos casos y según lo detallado por Fernandes *et al.* (2007). Se realizó una suspensión de  $10^6$  conidios/ml y se inoculó  $20 \mu\text{l}$  en el centro de una caja de Petri (60 mm diámetro) con medio de cultivo sólido PDA suplementado con: 0,1% p/v de extracto de levadura, 0,05% p/v de cloranfenicol y 0002% p/v de benomyl con 50% de ingrediente activo (Benlate, DuPont, São Paulo, SP, Brasil), de aquí se denominará a este medio como PDAY+clor+ben. Se incubó por al menos 24 h (o el tiempo detallado en cada sección) a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad. Cabe aclarar que el benomyl es un fungistático que inhibe la reproducción del hongo. Ha sido utilizado en trabajos previos para evaluar la

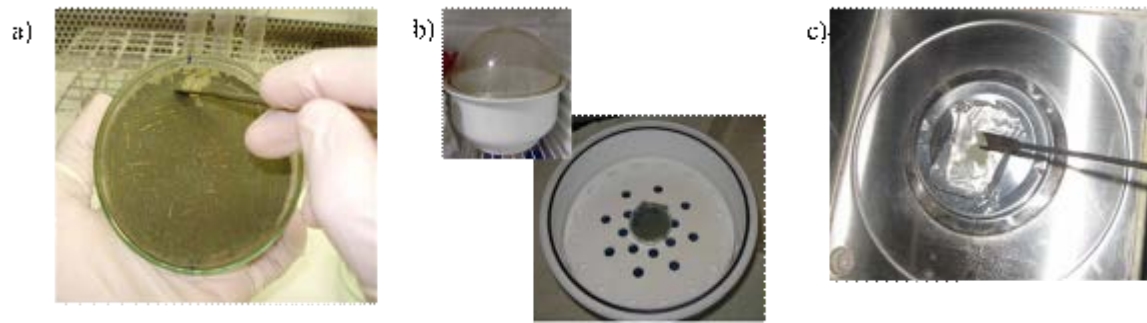
viabilidad de hongos entomopatógenos luego de la exposición a UV-B (Braga *et al.*, 2001 a-b). Cuando se presume un retraso en la germinación de los conidios, como en este caso, y por ende se deben realizar tiempos de incubación superiores a 24 h, el benomyl permite observar la formación del tubo germinativo en estos tiempos ya que inhibe el desarrollo del micelio.

Antes de la observación al microscopio óptico de contraste de fases (200x), se coloreó la suspensión con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5% p/v, que detuvo el proceso de germinación. Se calculó el porcentaje de conidios germinados sobre un total de 300 conidios contados por placa. Se consideró un conidio germinado cuando el tubo germinativo era mayor al diámetro máximo del conidio.

## **5- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 aplicados sobre adultos de *Ae. aegypti*, medio de cultivo sólido y telas tipo mosquitero**

### **5.1 Preparación del inóculo**

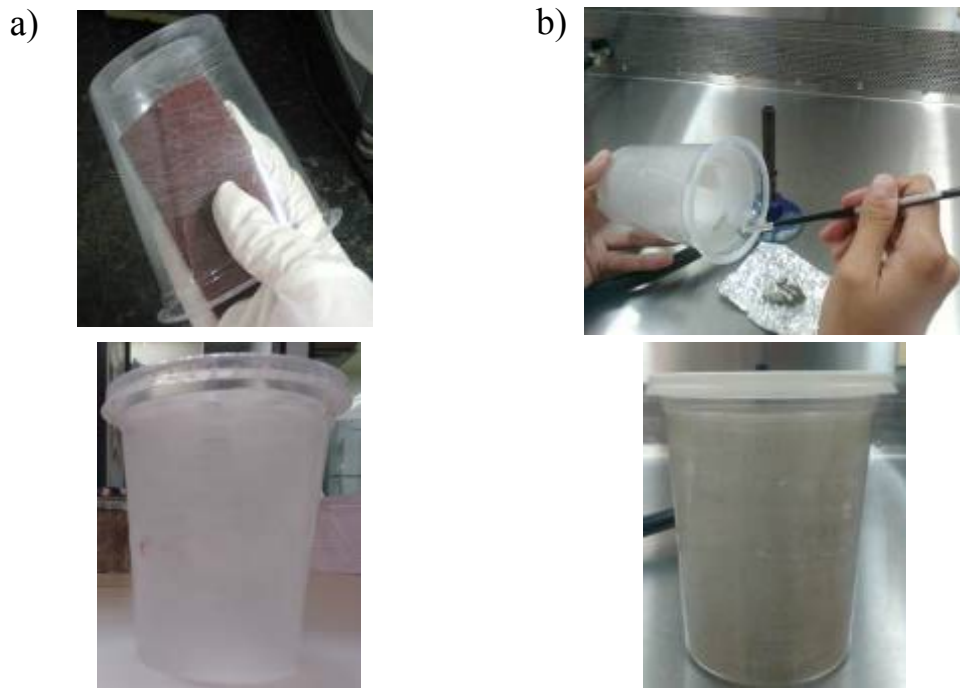
Durante todo el proceso se utilizaron materiales estériles y se trabajó bajo flujo laminar. Los conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 se rasparon de la superficie de 7 placas de Petri (100 mm de diámetro), cultivadas según se explicó en la sección 2 de este capítulo (página 86), utilizando una espátula (figura 26 a) esterilizada en la llama de un mechero Bunsen. Los conidios fueron colocados en una placa de Petri (60 mm de diámetro) que se ubicó dentro de una secadora con sílica gel a 4 °C durante 48 h (figura 26 b). A fin de tener una aproximación de la cantidad de conidios por unidad de masa, se pesó 0,01 g de conidios secos (figura 26 c) y se los resuspendió en un vaso de precipitados con 50 ml de Tween 80 acuoso, 0,01% v/v. Se homogeneizó la suspensión en un agitador magnético utilizando un imán, se realizaron diluciones seriadas y se calculó la cantidad aproximada de conidios por gramo de peso seco mediante el uso de una Cámara de Neubauer (hemocitómetro). Antes de cada bioensayo se repitió este accionar tres veces y se calculó un promedio de conidios/g. Por otro lado, a partir de esta misma suspensión, se verificó que la viabilidad inicial del inóculo superara el 95%.



**Figura 26:** Preparación del inóculo de *M. anisopliae* s.l. IP 46. a) Raspado de conidios de la superficie de un cultivo con 15 días de incubación a  $25 \pm 1$  °C, en medio PDA. b) Secado de los conidios en secadora con sílica gel, durante 48 h a 4 °C. c) Pesaje de conidios en balanza analítica para el posterior cálculo de conidios/gr.

## 5.2 Bioensayos

El inóculo fue aplicado a adultos de *Ae. aegypti* en forma de polvo seco de conidios dentro de vasos de plástico con tapa. Estos recipientes (7 cm de diámetro x 10 cm de altura), que presentaban un área total de  $333 \text{ cm}^2$ , fueron previamente raspados en su interior, de manera homogénea, con una lija (Carborundum<sup>®</sup>, carbomassa A150, n° 12E, Vinhedo, SP, Brasil), para facilitar la adhesión de los conidios a su superficie. También se realizaron 50 agujeros de 2-3 mm de diámetro en la parte superior de la pared del vaso. Luego fueron enjuagados con agua y secados, quedando como se muestra en la figura 27 a. Para su esterilización se los colocó en el flujo laminar con la luz UV encendida (UV-C Lamp Germicidal Ultraviolet G30T8; Royal Philips Electronics, Amsterdam, Holanda) durante 20 minutos. Por cada repetición se prepararon dos vasos, uno permaneció limpio para realizar los controles y el otro fue tratado en su superficie con los conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46. Se calculó y se pesó la cantidad de polvo de conidios secos necesaria para que la superficie del vaso completa (incluyendo la tapa), presente una concentración final de  $3,3 \times 10^5$  conidios/ $\text{cm}^2$ . Luego se lo distribuyó utilizando un pincel, de manera uniforme en toda la superficie (figura 27 b). Para decidir qué concentración utilizar se realizaron ensayos preliminares previos, con concentraciones de  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  conidios/ $\text{cm}^2$ . Mientras que en las dos primeras el efecto de la radiación fue enmascarado por las altas concentraciones que provocaban mortalidad a causa del hongo de todos los mosquitos, en el último caso no se encontró mortalidad alguna.



**Figura 27:** Preparación de los recipientes utilizados para inocular *M. anisopliae* s.l. IP 46 (conidios en forma de polvo) en adultos de *Ae. aegypti*. a) Vaso de plástico lijado en su interior, una vez limpio se utilizó para realizar los controles sin hongo. b) Aplicación de los conidios en toda la superficie del vaso utilizando un pincel, a una concentración final de  $3,33 \times 10^5$  conidios/cm<sup>2</sup>.

Se utilizaron individuos de *Ae. aegypti* de hasta una semana post-emergidos, criados en el laboratorio según lo establecido y con alimentación solo a base de sacarosa. Para su manipulación se utilizó un aspirador manual y en los casos necesarios eran anestesiados con CO<sub>2</sub>. Dentro del vaso sin tratamiento se colocaron 12 hembras y 12 machos. Dentro del vaso tratado con conidios se colocaron 42 hembras y 42 machos. Se mantuvieron allí dentro por un tiempo de exposición al entomopatógeno de 6 h (de 7:00 a 13:00 h, momento en que *Ae. aegypti* es activo). Durante este tiempo se mantuvo a ambos recipientes con mosquitos dentro de un contenedor tapado con solución saturada de NaCl en la parte inferior a fin de mantener la humedad a 75% (Winston y Bates, 1960). También permanecieron en incubadora a  $25 \pm 1$  °C.

A continuación, se preparó a los adultos para ser irradiados dentro de la cámara de irradiación de luz UV-B. Para esto se anestesiaron con CO<sub>2</sub> y fueron traspasados a placas de Petri (90 mm de diámetro x 10 mm de altura) cubiertas con papel film para evitar el escape de los insectos (figura 28 a). Previamente se verificó que este material permitiese el pasaje de la radiación UV-B, utilizando un espectrorradiómetro cubierto con el mismo. La cantidad de mosquitos en cada placa, tanto de los controles como de los tratados con *M.*

*anisopliae* fue de tres hembras y tres machos. Se prepararon dos placas por cada dosis de radiación, por ende un total de 12 insectos por repetición.

Cada placa de Petri con mosquitos fue ubicada dentro de la cámara de irradiación y se procedió al tratamiento con UV-B según lo especificado en la sección 3.2 (página 89). El tiempo de exposición y las dosis de radiación recibidas se detallan en la figura 28 b. Al cumplirse el tiempo de exposición eran retiradas de la cámara cuidadosamente.

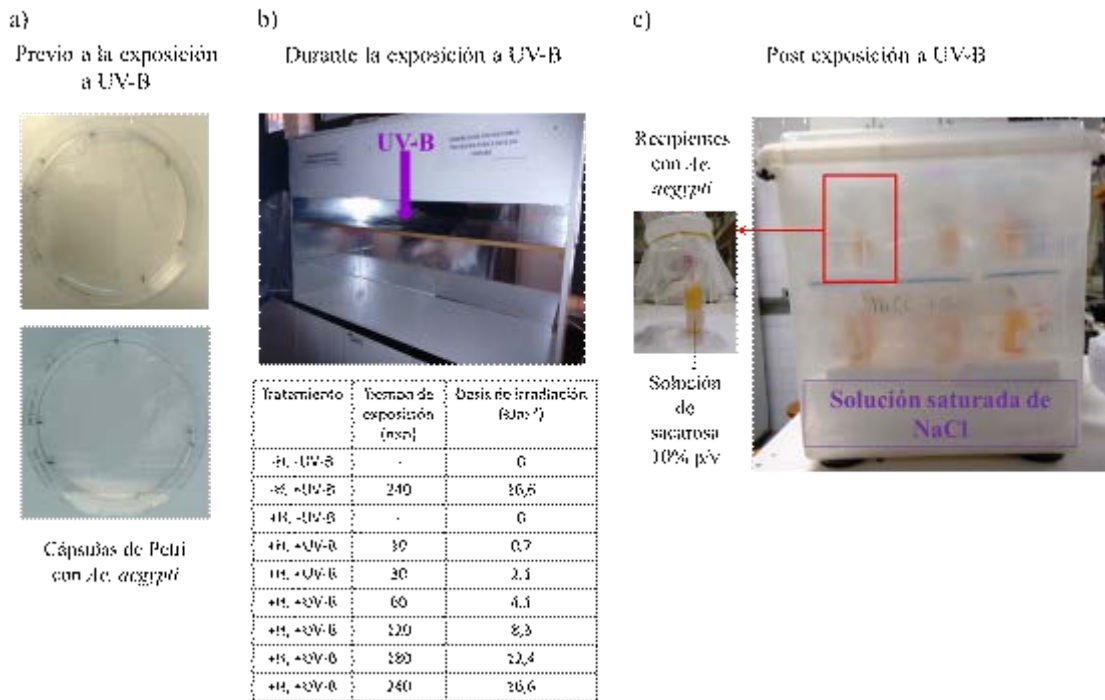
Se realizaron los siguientes controles y tratamientos:

- ♦ Control negativo de hongo y UV-B (-H, -UV-B): Los mosquitos no fueron expuestos a los conidios y las placas de Petri se mantuvieron dentro de la cámara de radiación cubiertas con papel de aluminio durante 4 h (dosis recibida:  $0 \text{ kJ m}^{-2}$ ).
- ♦ Control negativo de hongo y positivo de UV-B (-H, +UV-B): Se realizó con el fin de evaluar si la radiación tenía un efecto perjudicial por sí misma sobre los individuos. Los mosquitos no fueron expuestos a los conidios y las placas de Petri se mantuvieron dentro de la cámara de radiación durante 4 h (dosis recibida:  $16,6 \text{ kJ m}^{-2}$ ).
- ♦ Control positivo de hongo y negativo de UV-B (+H, -UV-B): Los mosquitos fueron expuestos a los conidios y las placas de Petri se mantuvieron dentro de la cámara de radiación cubiertas con papel de aluminio durante 4 h (dosis recibida:  $0 \text{ kJ m}^{-2}$ ).
- ♦ Tratamientos con hongo y con UV-B (+H, +UV-B): Los mosquitos fueron expuestos a los conidios y las placas de Petri se mantuvieron dentro de la cámara de radiación por 10, 30, 60, 120, 180 o 240 minutos (dosis recibidas: 0,7; 2,1; 4,1; 8,3; 12,4 o  $16,6 \text{ kJ m}^{-2}$ , respectivamente).

Posteriormente al proceso de radiación, se transfirieron los mosquitos a contenedores de plástico limpios (7 cm de diámetro x 10 cm de altura). Cada recipiente contenía 12 adultos (6 hembras y 6 machos), de acuerdo al tratamiento recibido. Contenían en su interior un vial con solución de sacarosa 10% p/v y un papel de filtro por el cual la solución subía por capilaridad. También presentaban una abertura cubierta por cinta de papel y estaban tapados con tela de voile por la parte superior. Todos los recipientes se colocaron dentro de un contenedor tapado, con solución saturada de NaCl en la parte inferior, a fin de mantener la humedad a 75% (Winston y Bates, 1960) (figura 28 c). Permanecieron en incubadora a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y foto período 12:12 h de luz/oscuridad, durante

15 días. Diariamente se realizó el monitoreo de la mortalidad de los insectos a fin de evaluar el  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  de cada tratamiento.

Los insectos muertos fueron retirados por la abertura del recipiente utilizando un pincel. Luego fueron lavados superficialmente con hipoclorito de sodio 0,5% v/v durante 1 minuto y secados sobre un papel de filtro estéril. Finalmente, fueron colocados en placas de Petri acondicionadas como cámaras húmedas con agar-agua suplementado con cristal violeta, cloranfenicol y tiabendazol (ver anexo). Estas fueron incubadas durante 10 días para verificar la infección fúngica. Por último, se evaluó el proceso de conidiogénesis sobre los cadáveres para cada tratamiento. Los adultos muertos, con formación de conidios sobre su tegumento, fueron cuidadosamente removidos del agar y colocados en un tubo de ensayo con tapa conteniendo 5 ml de Tween 80 acuoso 0,01% v/v. Los tubos se agitaron en vórtex por 2 minutos, se filtró la suspensión y se cuantificó la cantidad de conidios por insecto muerto a través de un hemocitómetro.



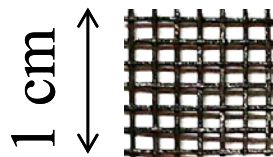
**Figura 28:** Bioensayo de exposición a la radiación UV-B. a) Antes de la exposición a la radiación, los mosquitos adultos fueron tratados con conidios (+H) o no (controles, -H), y agrupados de a 3 machos y 3 hembras en placas de Petri cubiertas con papel film. Se utilizaron dos placas de Peri por cada tratamiento (N = 12). b) Las placas de Petri se colocaron dentro de la cámara de radiación por el tiempo indicado (minutos) y recibiendo la correspondiente dosis de irradiación (kJ m<sup>-2</sup>) (+UV-B). Los controles sin radiación (-UV-B) se colocaron en la cámara por 4 h pero no recibieron dosis (0 kJ m<sup>-2</sup>) por estar cubiertos con papel aluminio. c) Una vez concluido el proceso de exposición a la radiación, se mantuvo a los individuos en recipientes de plástico con provisión de sacarosa (10% p/v), bajo condiciones controladas (75% HR a través de una solución saturada de NaCl, 25 ± 1 °C en incubadora) durante 15 días y se evaluó la mortalidad diariamente.

### 5.3 Ensayos de viabilidad

A fin de evaluar el efecto de la radiación sobre los conidios se midió la viabilidad del inóculo luego de la exposición a UV-B, utilizando las mismas dosis de radiación y condiciones ya señaladas en la sección 3.2 (página 89). El procedimiento utilizado ha sido descrito en la sección 4 de este capítulo (página 90). Dos tipos de experimentos se realizaron con este fin. Por un lado, la viabilidad se midió en conidios irradiados sobre un medio de cultivo sólido, que es el procedimiento estándar realizado en los ensayos de exposición a UV-B (Braga *et al.*, 2001 a-c; Fernandes *et al.*, 2007). Por el otro, se evaluó la viabilidad de conidios irradiados sobre un tejido sintético, utilizado comúnmente como material de mosquitero en las aberturas de las viviendas.

En el primer caso, se sembraron 20  $\mu\text{l}$  de una suspensión de conidios  $10^6$  conidios/ml en el centro de placas de Petri (60 mm de diámetro) con medio de cultivo PDAY+clor+ben. Luego de la evaporación del líquido se taparon con papel film para igualar las condiciones con los ensayos de los mosquitos adultos. Luego, se trasladaron a la cámara de UV-B. Se realizó un control (-UV-B) tapando una placa con papel aluminio que permaneció en la cámara durante todo el tratamiento (240 minutos). El resto de las placas fueron retiradas de la cámara en los tiempos correspondientes, los mismos utilizados en los bioensayos. Luego de la radiación, cada placa fue incubada en oscuridad a  $25 \pm 1$  °C, durante 24, 48 o 72 h. Luego de ese tiempo, se observó cada placa de Petri en el microscopio y se contaron los conidios germinados de un total de 300 por tratamiento.

En el segundo caso, se recortaron pedazos de  $1 \text{ cm}^2$  de un tejido de fibra de vidrio de 36 agujeros/ $\text{cm}^2$  (figura 29) y se esterilizaron en autoclave tipo Chamberlain por 20 minutos a 121 °C y 1 atmósfera de presión. Con un pincel se dispersó de manera uniforme una cantidad de conidios secos correspondiente a una concentración aproximada de  $10^6$  conidios/ $\text{cm}^2$ . Se colocó cada pedazo de tejido tratado en el centro de la base de una placa de Petri (60 mm de diámetro) y se la cubrió con papel film. A continuación, se colocaron las placas en la cámara de radiación por los mismos tiempos ya mencionados. Un control (-UV-B) se cubrió con papel de aluminio y permaneció dentro de la cámara por 240 minutos. Por último, luego de la exposición a la radiación UV-B, el tejido con conidios irradiados o no (control, -UV-B) fue resuspendido en 1 ml de Tween 80 acuoso 0,01% v/v y agitado en vórtex durante 2 minutos. De la suspensión resultante se sembraron 20  $\mu\text{l}$  en medio de cultivo PDAY+clor+ben, se incubaron por 24, 48 o 72 h en oscuridad a  $25 \pm 1$  °C y se continuó de la misma manera ya mencionada.



**Figura 29:** Tejido de fibra de vidrio sobre el cual se aplicaron conidios secos de *M. anisopliae* s.l. IP 46 ( $10^6$  conidios/ $\text{cm}^2$  aproximadamente) para ser irradiados con UV-B.

#### 5.4 Variables registradas y análisis de datos

Los bioensayos se repitieron 4 veces ( $N = 4$ ) de manera independiente y en paralelo a estos se realizaron los ensayos de viabilidad post-exposición a UV-B. Los valores promedio de porcentaje de mortalidad y de germinación se calcularon para cada tratamiento recibido. También se cuantificó el número promedio de conidios por cadáver en cada tratamiento, luego de 10 días de incubación en cámara húmeda. De ser necesario, estos valores fueron transformados por la función arcoseno-raíz cuadrada y analizados por ANOVA. Los datos fueron analizados utilizando el programa de computación InfoStat. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene y la normalidad de los residuos a través de la prueba de Shapiro-Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu (1997). En caso de rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias, se realizó el análisis post-hoc de Student–Newman–Keuls (SNK) para realizar comparaciones múltiples de las medias. Las medias se consideraron diferentes con un nivel de significancia de 95%.

Los valores de tiempo letal 50 y 90 ( $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ ) se calcularon por análisis Probit junto con sus intervalos de confianza de 95% ( $IC_{95}$ ) (Throne *et al.*, 1995). Se consideraron estadísticamente diferentes cuando los  $IC_{95}$  no se solapaban.

### **6- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 expuestos bajo una columna de agua, en recipientes que simulaban ser sitios de cría de *Ae. aegypti***

#### 6.1 Determinación de la concentración letal ( $CL_{50}$ y $CL_{90}$ ) de *M. anisopliae* s.l. IP 46 contra larvas de *Ae. aegypti*

En cuatro recipientes plásticos (3,9 cm de diámetro x 4 cm de altura) con capacidad de 30 ml se prepararon suspensiones de conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 con las siguientes concentraciones finales:  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$  y  $5 \times 10^7$  conidios/ml. Se utilizaron 7 placas de Petri (100 mm de diámetro) cultivadas como ya se mencionó en la sección 2 de este capítulo (página 86). El procedimiento para preparar las suspensiones ya fue descrito en la sección 3.2.1 del capítulo 2 (página 36). Se homogenizó cada recipiente que contenía una suspensión de conidios, a través de una pipeta Pasteur de plástico de 3 ml, pipeteando 10 veces de manera sucesiva, es decir que 10 veces se tomó y expulsó el líquido.

En cada recipiente se colocaron 10 larvas de *Ae. aegypti* de segundo estadio (L2). Se realizó un control colocando 10 larvas en 30 ml de agua destilada. Todos los recipientes

se incubaron a  $25 \pm 1$  °C y 12 h de fotoperíodo, durante 10 días. Cada día se monitoreaba la mortalidad diaria y aquellas larvas muertas eran lavadas con suspensión de hipoclorito de sodio 0,5% v/v durante 1 minuto y luego incubadas en una cámara húmeda con agar (ver anexo) para verificar la infección fúngica. El experimento se repitió 3 veces de forma independiente.

Se calculó la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  y su respectivos  $IC_{95}$  por análisis probit utilizando el programa de computación Micro Probit versión 3.1 desarrollado por Thomas y Alexandra Sparks (© 1987). En base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar para los siguientes bioensayos una concentración de  $2 \times 10^7$  conidios/ml, que mató al 90% de los individuos en un tiempo de 8 días (Tabla 12).

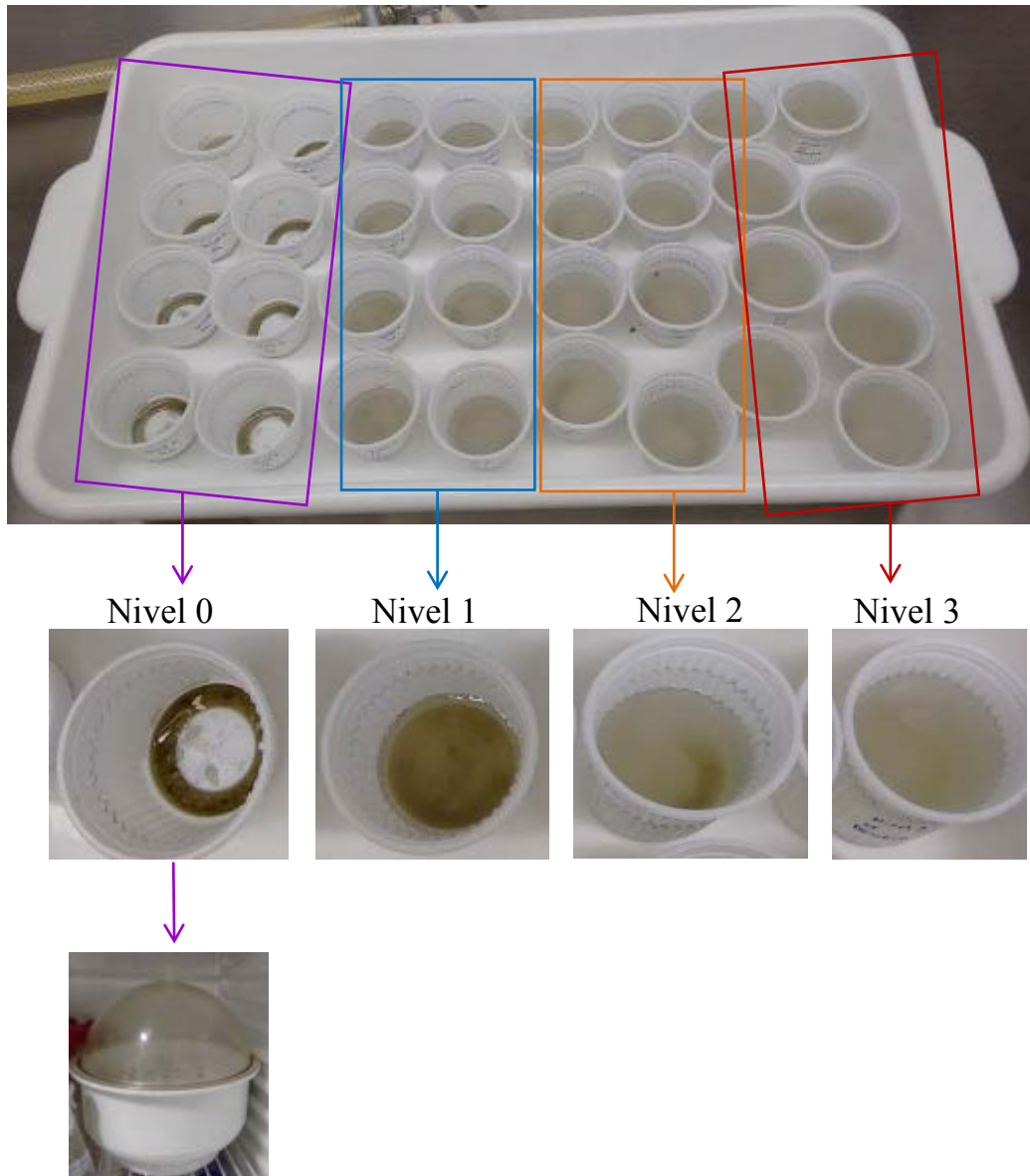
## 6.2 Preparación del inóculo y exposición a UV-B

A fin de evaluar si el agua tenía un efecto protector de los conidios contra la radiación UV-B, se acondicionaron vasos de plástico de manera que los conidios quedaran decantados en el fondo y sobre estos se formara una columna de agua de espesor variable. Cada recipiente fue marcado en tres alturas correspondientes a 1, 2 y 3 cm contando desde las bases de los mismos. Se vertió agua dentro de cada recipiente hasta alcanzar dichas marcas y luego se trasvasó el líquido a una probeta para calcular el volumen correspondiente a cada una de las columnas de agua formadas. Respectivamente, fueron de 7, 18 y 30 ml.

Los recipientes utilizados fueron esterilizados previamente a su uso colocándolos en un flujo laminar con exposición a radiación UV (UV-C Lámpara Germicida Ultravioleta G30T8, Royal Philips Electronics, Amsterdam, Países Bajos) durante 20 minutos. A continuación, en cada uno se colocó 1 ml de una suspensión de conidios de concentración  $6 \times 10^8$  conidios/ml, preparada según ya se mencionó. En cuanto a la altura de la columna de agua se realizaron 4 tratamientos (figura 30):

- ◆ Nivel 0: Los recipientes fueron colocados en una secadora con sílica gel durante 48 h a 4 °C con el objetivo de evaporar el líquido y que sobre la base quedaran solo los conidios secos.
- ◆ Nivel 1: Se llenó a los recipientes con agua destilada esterilizada (6 ml) hasta la primera marca, realizada previamente, a 1 cm de la base.

- ◆ Nivel 2: Se llenó a los recipientes con agua destilada esterilizada (17 ml) hasta la segunda marca, realizada previamente, a 2 cm de la base.
- ◆ Nivel 3: Se llenó a los recipientes con agua destilada esterilizada (29 ml) hasta la tercera marca, realizada previamente, a 3 cm de la base.



**Figura 30:** Recipientes utilizados para evaluar el efecto de la radiación UV-B y de los niveles de agua por encima de los conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46. Se esperó a que los conidios decanten en la base de los recipientes y se forme una columna de agua por sobre estos de diferente espesor. Se detallan los niveles de agua: 0 (conidios secos, que luego se traslada a una secadora con sílica gel), 1, 2 o 3 cm desde la base del recipiente.

Se prepararon ocho recipientes de cada nivel a fin de exponerlos a seis dosis de radiación (+H, +UV-B) y realizar dos controles sin radiación (+H, -UV-B). Un grupo de recipientes (1 de cada nivel) se dejó afuera de la cámara de radiación, en incubadora a  $25 \pm 1$  °C (control 1). Otro grupo (también formado por un recipiente de cada nivel) fue envuelto en papel aluminio y colocado dentro de la cámara de radiación por 240 minutos (control 2). El resto de los recipientes también fue colocado en la cámara de radiación para recibir la dosis de UV-B correspondiente. Todos los recipientes permanecieron estáticos durante una noche (15 h) de manera que los conidios pudieran descender completamente hacia la base del recipiente y se formara una columna de agua por encima de ellos. En base a la cantidad de conidios inoculados y la superficie de la base del recipiente se calculó una densidad aproximada de  $8,5 \times 10^7$  conidios/cm<sup>2</sup>. Al día siguiente se realizó el proceso de exposición a la radiación dentro de la cámara tal cual se especificó en la sección 3.2 de este capítulo (página 89). Durante los primeros 20 minutos, que es el tiempo que tardaron las lámparas de UV-B en estabilizarse dentro de la cámara, todos los recipientes fueron cubiertos por papel de aluminio que luego fue retirado.

En resumen, según las dosis de UV-B recibidas se realizaron los siguientes tratamientos:

- ♦ Control positivo de hongo y negativo de UV-B (+H, -UV-B) (control 1): Los recipientes (uno por cada nivel de agua) se dejaron por fuera de la cámara de radiación y permanecieron en incubadora a  $25 \pm 1$  °C (dosis recibida:  $0 \text{ kJ m}^{-2}$ ).
- ♦ Control positivo de hongo y negativo de UV-B (+H, -UV-B) (control 2): Los recipientes (uno por cada nivel de agua) se mantuvieron dentro de la cámara de radiación cubiertos con papel de aluminio durante 240 minutos (dosis recibida:  $0 \text{ kJ m}^{-2}$ ).
- ♦ Tratamientos con hongo y con UV-B (+H, +UV-B): Los recipientes (uno por cada nivel de agua) se mantuvieron dentro de la cámara de radiación por 10, 30, 60, 120, 180 o 240 minutos (dosis recibidas: 0,7; 2,0; 3,9; 7,9; 11,8 o  $15,7 \text{ kJ m}^{-2}$ , respectivamente).

Luego de la exposición a la radiación UV-B, se retiraron los recipientes de la cámara cuidadosamente. A aquellos correspondientes a los niveles de agua 0, 1 y 2 se les agregó agua destilada estéril hasta un volumen final de 30 ml, es decir hasta igualar al nivel 3 marcado previamente. Se homogenizó la suspensión en cada recipiente utilizando una pipeta. En estas condiciones todos los recipientes presentaron una concentración final

de  $2 \times 10^7$  conidios/ml. Esta concentración corresponde con la  $CL_{90}$  a los 8 días de tratamiento (tabla 12).

### 6.3 Viabilidad

Una vez homogeneizada la suspensión, de cada recipiente se retiró una alícuota de 50  $\mu$ l y se adicionó a un tubo de microcentrifuga (Eppendorf) con 950  $\mu$ l de Tween 80 acuoso, 0,01% (v/v) y se agitó en vórtex. De esta manera, la concentración resultante fue de  $10^6$  conidios/ml. Se realizó el ensayo de viabilidad de acuerdo a lo especificado en la sección 4 de este capítulo (página 90), con incubación de los cultivos de 24 h.

### 6.4 Bioensayos

En cada recipiente con suspensión de conidios, ya sean irradiados con diferentes dosis de UV-B (+H, +UV-B), o no (+H, -UV-B; control 1 y control 2), se colocaron 10 larvas L2 de *Ae. aegypti*. También se realizó un control negativo, colocando 10 larvas en un recipiente limpio con 30 ml de agua destilada en ausencia de *M. anisopliae* (-H, -UV-B). Durante 10 días permanecieron en incubadora a  $25 \pm 1$  °C y con fotoperíodo de 12 h luz/oscuridad. Se alimentaron con alimento balanceado triturado suministrado cada tres días en cada recipiente. De ser necesario, los conidios eran resuspendidos y la suspensión homogeneizada mediante una pipeta Pasteur de plástico de 3 ml. Se evaluó la mortalidad diaria de las larvas en cada recipiente. Aquellas que se encontraban muertas eran lavadas con hipoclorito de sodio acuoso 0,5% v/v durante 1 minuto y transferidas a una placa de Petri acondicionada como cámara húmeda con agar. Estas fueron incubadas por 10 días o hasta observar si había desarrollo de micelio y conidios sobre el cadáver.

### 6.5 Variables registradas y análisis de datos

Los bioensayos y los ensayos de viabilidad se repitieron 4 veces (N = 4) de manera independiente. Se calcularon los valores promedio de porcentaje de mortalidad de las larvas y de germinación de los conidios para cada tratamiento y estos fueron transformados por la función arcoseno-raíz cuadrada. Los efectos del nivel de agua y de la radiación UV-B sobre la mortalidad de las larvas y la viabilidad de los conidios, fueron analizados por

ANOVA. Los datos fueron analizados utilizando el programa de computación InfoStat. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene y la normalidad de los residuos a través de la prueba de Shapiro-Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu (1997). En caso de rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias, se realizó el análisis de Student–Newman–Keuls para realizar comparaciones múltiples post-hoc de las medias. Estas se consideraron diferentes con un nivel de significancia de 95%.

Los  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  se calcularon por análisis Probit junto con sus intervalos de confianza de 95% ( $IC_{95}$ ) (Throne *et al.*, 1995). Se consideraron estadísticamente diferentes cuando los  $IC_{95}$  no se solapaban.

## Resultados

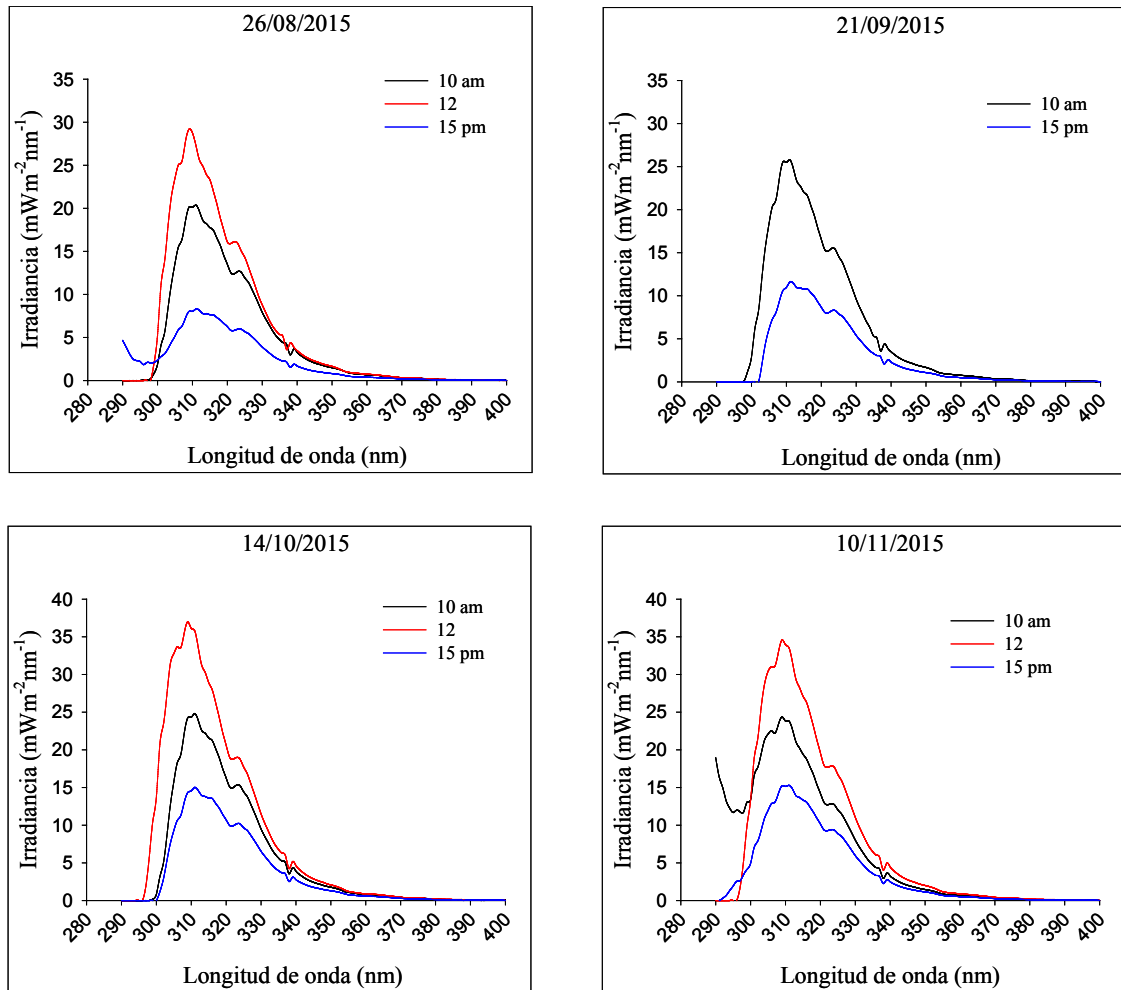
### 1- Medición de la radiación ultravioleta

#### 1.1 Exposición y medición de UV-B en un ambiente urbano

La irradiancia solar medida en la Ciudad de Goiânia, Goiás, Brasil, entre los meses de agosto a noviembre de 2015, varió a lo largo del tiempo y momento del día. En la figura 31 se observa la irradiancia ( $\text{mW m}^{-2}$ ) que provee cada longitud de onda (nm), ponderada por los coeficientes de la BSWF desarrollada por Quaité *et al.* (1992). A través de estas funciones se obtuvieron los valores de irradiancia total ponderada por Quaité ( $\text{mW m}^{-2}$ ) con los cuales se calculó la dosis de radiación por hora de exposición a la radiación solar ( $\text{kJ m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) (tabla 9). Como era de esperar, la radiación fue más elevada en la medición realizada al mediodía, seguida por la realizada durante la mañana (10 am) y disminuyó hacia la tarde (15 p.m.). Se observó también mayor radiación en los meses de octubre-noviembre que en agosto-septiembre.

#### 1.2 Exposición y medición de UV-B en el laboratorio

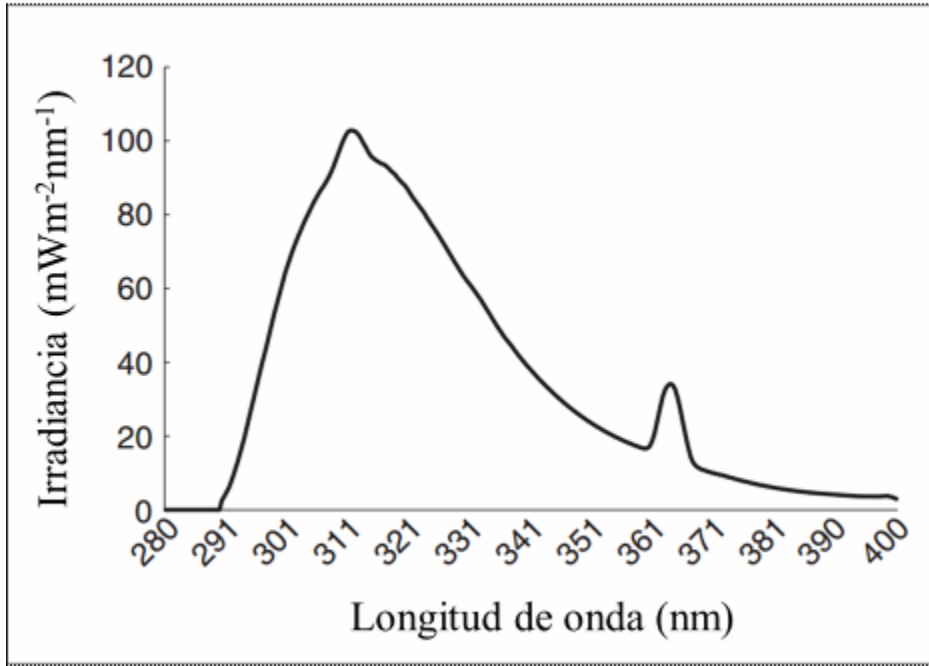
El valor de irradiancia total ponderada (Quaité *et al.*, 1992), proporcionada por las lámparas de radiación UV-B ubicadas dentro de la cámara de irradiación, y las dosis de radiación que de este valor se desprendieron, ya han sido mencionados en la sección de materiales y métodos. A modo recordatorio y en función de comparar los resultados con las mediciones realizadas en un ambiente urbano, se detallan nuevamente en la tabla 10. La irradiancia ( $\text{mW m}^{-2}$ ) por longitud de onda (nm), dentro de la cámara de radiación, se muestra en la figura 32. Conviene aclarar que con el tiempo las lámparas van reduciendo la cantidad de irradiación que emiten y por eso el valor de irradiancia en la segunda tanda de experimentos fue un poco menor (1152 en experimentos con adultos vs. 1093  $\text{mW m}^{-2}$  en experimentos con larvas). Sin embargo, en ambos casos los experimentos realizados dentro de la cámara de radiación otorgaron dosis más elevadas que lo que se experimentaría en condiciones de campo o semi-campo.



**Figura 31:** Variación de la irradiancia espectral de la radiación solar medida en las fechas y horarios indicados, en la ciudad de Goiânia, en días soleados. La irradiancia de cada longitud de onda (nm) está ponderada por los coeficientes de la BSWF desarrollada por Quaitte *et al.* (1992).

Fecha	Horario	Irradiancia total (mW m <sup>-2</sup> ) (Quaitte <i>et al.</i> , 1992)	Dosis de radiación (kJ m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )
26/08/2015	10:00	506,5	1,8
	12:00	707,0	2,6
	15:00	256,9	0,9
21/09/2015	10:00	634,6	2,3
	12:00	774,9	2,8
	15:00	298,4	1,1
14/10/2015	10:00	600,3	2,2
	12:00	911,6	3,3
	15:00	385,0	1,4
10/11/2015	10:00	751,7	2,7
	12:00	857,6	3,1
	15:00	417,6	1,5

**Tabla 9:** Valores de irradiancia total ponderada (Quaitte *et al.*, 1992) (mW m<sup>-2</sup>) obtenidos durante los meses de agosto a noviembre en la ciudad de Goiânia en los horarios 10:00, 12:00 y 15:00 h en días soleados. Se informa también la dosis de radiación que obtendrían las muestras en caso de estar expuestas a esta radiación durante 1 hora (kJ m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>).



**Figura 32:** Variación de la irradiancia espectral emitida por las 4 lámparas de luz UV-B dentro de la cámara de irradiación a un valor de radiación total ponderado (Quaite *et al.*, 1992) de 1152 mW m<sup>-2</sup>.

Tipo de ensayo	Irradiancia total (mW m <sup>-2</sup> ) (Quaite <i>et al.</i> , 1992)	Dosis de radiación (kJ m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )
Descritos en la sección 5	1152	4,1
Descritos en la sección 6	1093	3,9

**Tabla 10:** Valores de irradiancia total ponderada (Quaite *et al.*, 1992) (mW m<sup>-2</sup>) emitidos por las 4 lámparas de luz UV-B dentro de la cámara de irradiación. Se informa también la dosis de radiación que obtuvieron las muestras expuestas a esta radiación durante 1 hora (kJ m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>).

**2- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 aplicados sobre adultos de *Ae. aegypti***

**2.1 Mortalidad**

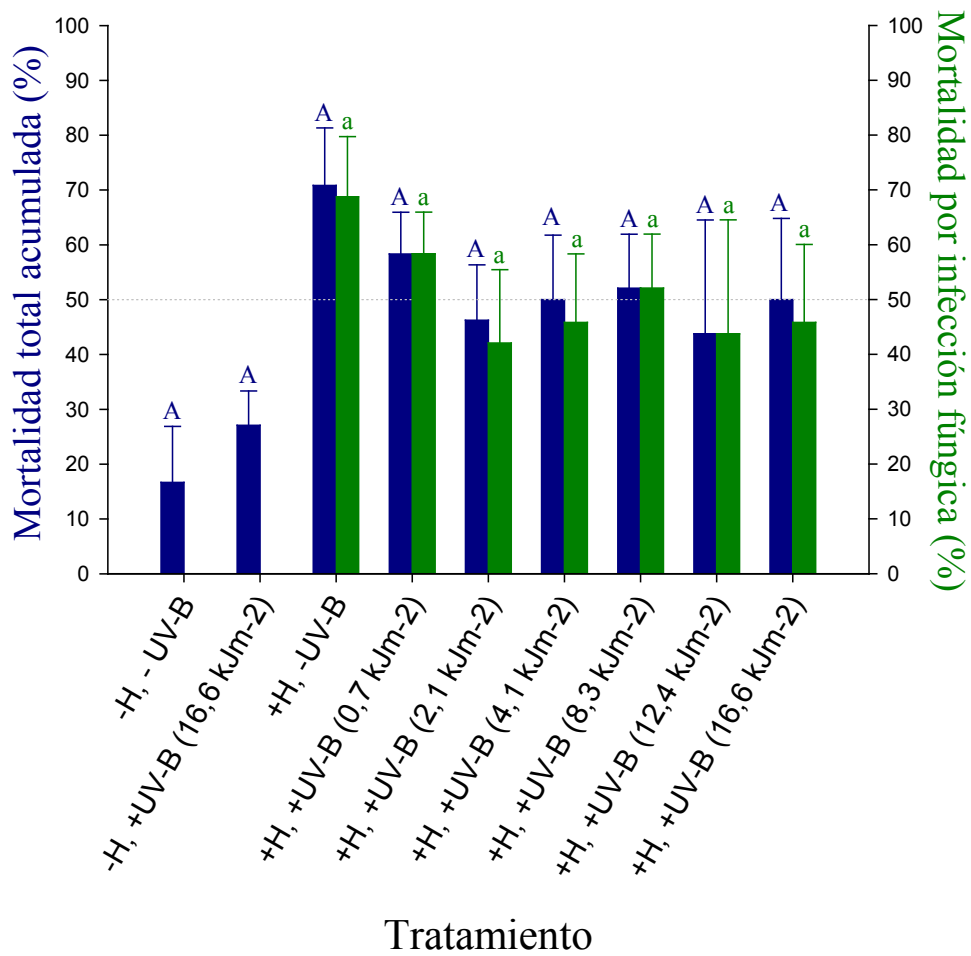
En la figura 33 se observa el porcentaje de mortalidad total acumulada al día 15 post tratamiento. Como se esperaba, la mayor proporción de individuos muertos se alcanzó con el tratamiento de exposición al hongo en ausencia de radiación UV-B (+H, -UV-B, 0 kJ m<sup>-2</sup>) y fue de 70,8 ± 10,5%. Por otro lado, el menor porcentaje de mortalidad se encontró en el control negativo tanto de hongo como de radiación (-H, -UV-B, 0 kJ m<sup>-2</sup>) y

resultó de  $16,7 \pm 10,2\%$ . La radiación ultravioleta por si sola (-H, +UV-B,  $16,6 \text{ kJ m}^{-2}$ ) causó una mortalidad de  $27,1 \pm 6,3\%$ . Los tratamientos con hongo y con diferentes dosis de UV-B provocaron una mortalidad de entre  $43,8 \pm 20,8\%$  (+H, +UV-B,  $12,4 \text{ kJ m}^{-2}$ ) y  $58,3 \pm 7,6\%$  (+H, +UV-B,  $0,7 \text{ kJ m}^{-2}$ ).

La prueba de Levene resultó no significativa ( $F_{g.l.: 8,27} = 1,03$ ;  $P = 0,44$ ), por ende no se rechazó la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. Por otro lado, la prueba de Shapiro-Wilks modificada también arrojó un resultado no significativo ( $W_{g.l.: 36} = 0,95$ ;  $P = 0,32$ ) por lo tanto, no se rechazó la hipótesis nula de distribución normal de los residuos. Una vez corroborados los supuestos del ANOVA, al realizar este análisis no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{g.l.: 8,27} = 1,79$ ;  $P = 0,12$ ).

En los casos en que los insectos fueron tratados con conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 (+H), el porcentaje de mortalidad por infección fúngica fue confirmada luego de la incubación del insecto muerto en cámara húmeda. En general, en casi todos los insectos muertos se pudo observar la esporulación del hongo sobre el cadáver (Figura 33). El porcentaje máximo de infección se obtuvo en ausencia de radiación (+H, -UV-B  $0 \text{ kJ m}^{-2}$ ;  $68,75 \pm 10,96\%$ ), y el mínimo en el tratamiento de exposición a la UV-B durante 30 minutos (+H, +UV-B;  $2,075 \text{ kJ m}^{-2}$ ;  $42,08 \pm 13,36\%$ ). Tampoco se encontró un efecto significativo de la dosis de radiación UV-B sobre la mortalidad con infección fúngica confirmada, de los adultos de *Ae. aegypti* ( $F_{g.l.: 6,21} = 0,49$ ;  $P = 0,81$ ).

En general, los insectos comenzaron a morir luego del tercer día de evaluación. Los valores de  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  se detallan en la tabla 11, junto con sus respectivos  $IC_{95}$  y la pendiente de regresión Probit, para cada tratamiento realizado. Los valores calculados para los individuos tratados con el hongo y no expuestos a la radiación UV-B resultaron menores, si bien no se encontraron diferencias significativas basadas en la no superposición de  $IC_{95}$  entre todos los tratamientos.



**Figura 33:** Patogenicidad de *M. anisopliae* s.l. IP 46 sobre adultos de *Ae. aegypti* expuestos a conidios secos (+H) o no (control, -H), y luego sometidos a diferentes dosis de radiación UV-B (+UV-B) o no (control, -UV-B). Se indica el valor medio del porcentaje y el error estándar (E.E.), sobre un total de cuatro repeticiones. Se observa en azul el porcentaje de mortalidad acumulada al día 15 luego de la exposición, ya sea a los conidios y/o a la radiación UV-B, dependiendo del caso. En verde se muestra el porcentaje de infección fúngica verificada luego de 10 días de incubación del insecto muerto en cámara húmeda a  $25 \pm 1$  °C. Las letras iguales indican que no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad total acumulada (mayúsculas) ni en la mortalidad por infección fúngica (minúsculas).

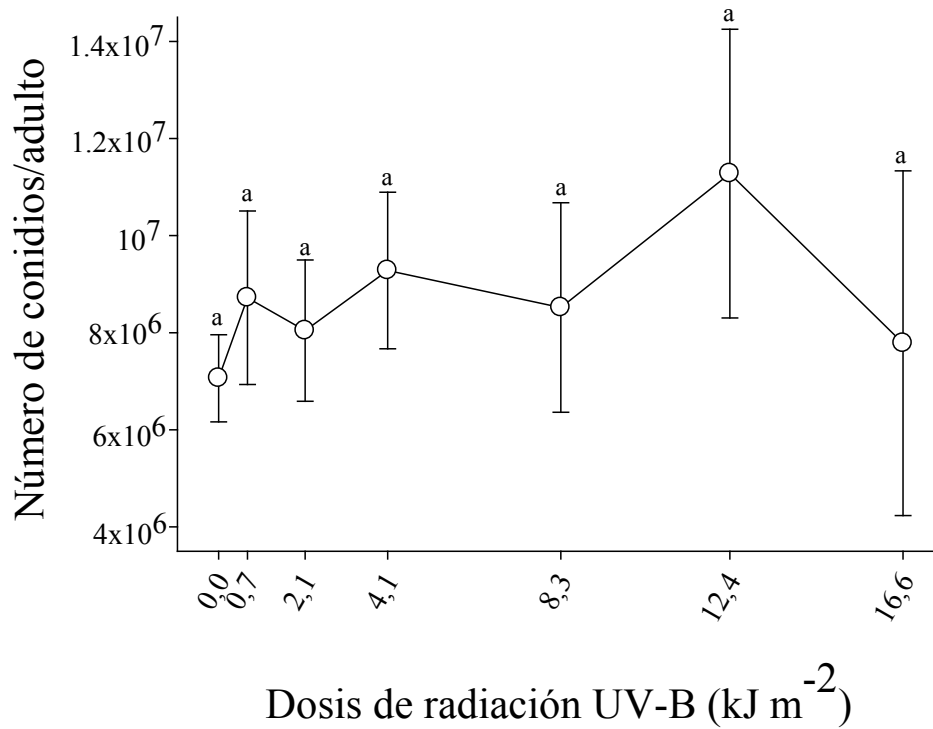
Dosis de UV-B (kJ m <sup>-2</sup> )	Tiempo letal (TL) (días)		Pendiente ± E.E.
	TL <sub>50</sub> (IC <sub>95</sub> )	TL <sub>90</sub> (IC <sub>95</sub> )	
0	9,7 ( 2,4–27,9) a	21,3 (13,0–123,6) a	0,11 ± 0,02
0,7	14,2 ( 6,2–33,6) a	29,1 (19,1–97,6) a	0,08 ± 0,02
2,1	18,0 (12,8–28,6) a	37,5 (27,4–68,8) a	0,07 ± 0,02
4,1	16,6 ( 8,6–41,2) a	34,3 (22,3–110) a	0,07 ± 0,02
8,3	14,2 ( 9,7–24,0) a	25,6 (18,7–54,9) a	0,11 ± 0,02
12,4	16,8 (13,3–23,2) a	29,7 (23,3–45,3) a	0,10 ± 0,02
16,6	16,7 ( 8,7–41,3) a	34,2 (22,2–109,6) a	0,07 ± 0,02

**Tabla 11:** Tiempo letal (TL) 50 y 90 y sus respectivos intervalos de confianza (IC<sub>95</sub>) de adultos de *Ae. aegypti* tratados con conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 y luego sometidos a diferentes dosis de radiación UV-B. Se informa también la pendiente de la regresión Probit con su error estándar (E.E.) en cada caso. Las letras iguales indican que no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) basadas en la superposición de los IC<sub>95</sub>.

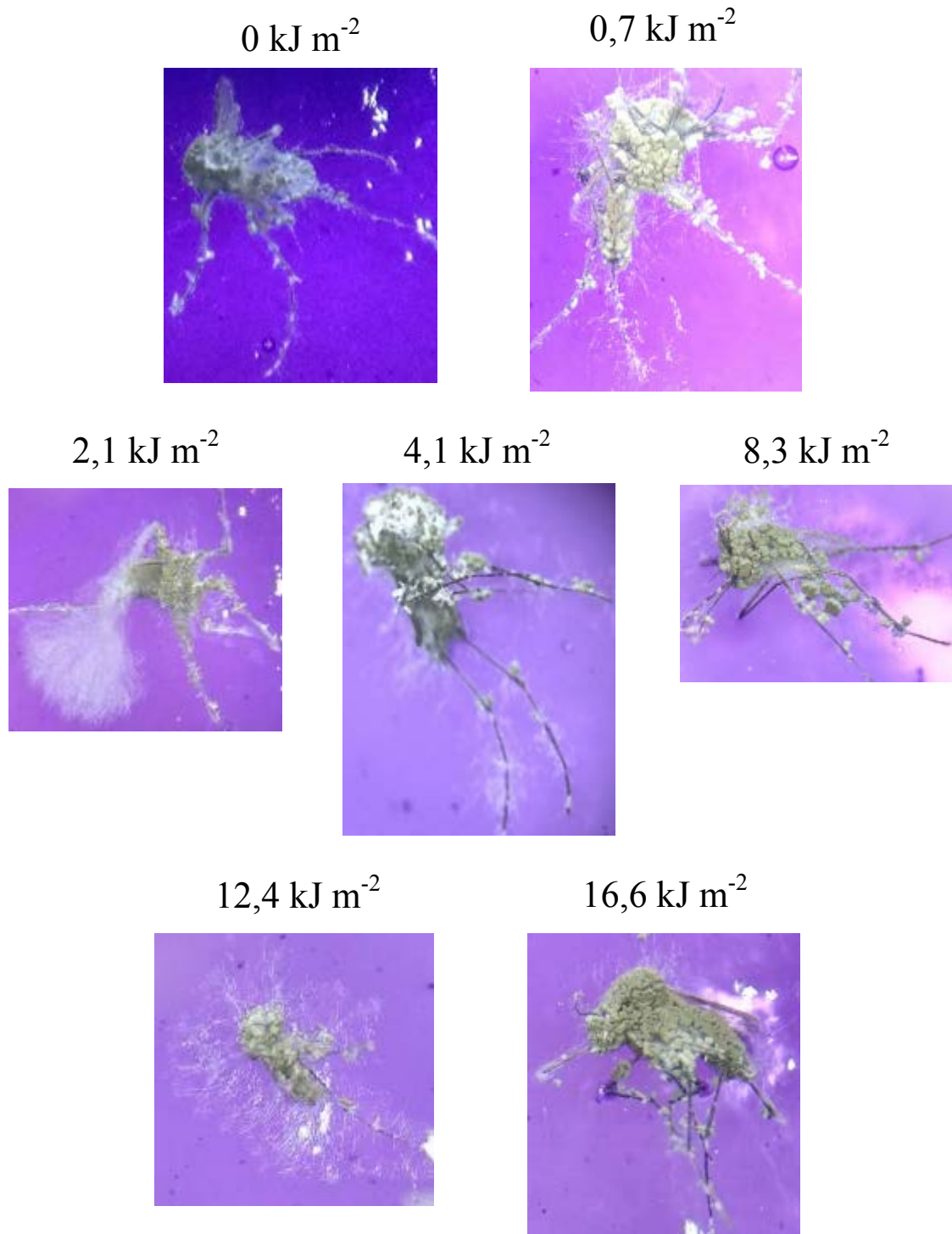
## 2.2 Conidiogénesis sobre insectos muertos

En general, el micelio sobre los cadáveres comenzó a desarrollarse luego de 24 h de incubación a  $25 \pm 1$  °C, en cámaras húmedas de agar-agua. Independientemente de la dosis de radiación a la que fuera expuesto el insecto cuando estaba vivo, el proceso de conidiogénesis por sobre la cutícula comenzó luego de 2-3 días luego de muerte. La figura 34 muestra el número promedio de conidios por cada adulto muerto, según la dosis de radiación de UV-B recibida. El valor máximo fue de  $1,13 \times 10^7 \pm 2,97 \times 10^5$  conidios/insecto muerto que se obtuvo con la dosis de radiación de 12,4 kJ m<sup>-2</sup>. El valor mínimo fue de  $7,06 \times 10^6 \pm 8,98 \times 10^5$  conidios/insecto muerto que se obtuvo con el tratamiento control, en ausencia de radiación (0 kJ m<sup>-2</sup>). El análisis de Levene reveló homogeneidad de varianzas ( $F_{g.l.: 6,21} = 1,03$ ,  $P = 0,43$ ) y el análisis de Shapiro Wilks distribución normal de los residuos ( $W_{g.l.: 28} = 0,96$ ,  $P = 0,72$ ). No se encontró un efecto significativo de la dosis de radiación en la conidiogénesis sobre los insectos muertos ( $F_{g.l.: 6,21} = 0,28$ ;  $P = 0,89$ ). En la figura 35 se muestran los adultos muertos incubados en cámara húmeda a  $25 \pm 1$  °C durante 10 días, con desarrollo de conidios sobre su superficie. A

modo de ejemplo se eligieron fotos representativas de cada dosis de radiación a la que fueron sometidos previamente y en todos los casos se confirmó la infección fúngica.



**Figura 34:** Conidiogénesis de *M. anisopliae* s.l. IP 46 sobre adultos de *Ae. aegypti*. Se muestra el promedio del número de conidios/adulto muerto de cuatro repeticiones (N = 4) en función de la dosis de UV-B a la cual fueron expuestos los individuos. Las líneas verticales indican error estándar. Las letras iguales indican que no se encontraron diferencias significativas (P > 0,05).



**Figura 35:** Conidiogénesis en cámara húmeda (10 días de incubación a 25 °C) de *M. anisopliae* s.l. IP 46 sobre cadáveres de adultos de *Ae. aegypti*. Previamente los insectos fueron tratados con conidios y sometidos a diferentes dosis de radiación UV-B. Las fotos se tomaron bajo lupa con un aumento de 30x.

### 3- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 aplicados sobre medio de cultivo sólido y telas tipo mosquitero

La viabilidad del inóculo (% de conidios germinados) expuesto a radiación UV-B sobre medio de cultivo PDAY+clor+ben resultó dependiente de la dosis de radiación (figura 36 a). Con 24 h de incubación a 25 °C, el control sin radiación UV-B (0 kJ m<sup>-2</sup>, envuelto en papel aluminio durante la exposición a UV-B), alcanzó un valor de germinación de conidios de 94,7 ± 2,8%. Cuando el inóculo recibió radiación, el valor de la viabilidad fue disminuyendo al aumentar la dosis. Se obtuvo un valor mínimo de 24,3 ± 23,3% con la dosis de 4,1 kJ m<sup>-2</sup> y la viabilidad fue nula para las dosis de 8,8 kJ m<sup>-2</sup> y superiores. Se encontraron diferencias significativas entre las dosis de radiación evaluadas ( $F_{g.l.: 6,21} = 14,1$ ;  $P < 0,001$ ).

Al aumentar el tiempo de incubación, se observó una recuperación de la viabilidad para las dosis de 2,1 y 4,1 kJ m<sup>-2</sup>, efecto que no sucedió para las dosis más elevadas (8,3-16,6 kJ m<sup>-2</sup>) que continuaron siendo valores nulos. Con 48 h de incubación en el control sin radiación se obtuvo un valor de viabilidad de 98,9 ± 0,4%. También fue descendiendo acorde al aumento de la dosis de radiación. Se registró un valor mínimo de 51,5 ± 24,8% con la dosis de 4,1 kJ m<sup>-2</sup> y la viabilidad fue nula para las dosis de 8,8 kJ m<sup>-2</sup> y superiores. Se encontraron diferencias significativas entre las dosis evaluadas ( $F_{g.l.: 6,21} = 19,5$ ;  $P < 0,001$ ).

Finalmente, a las 72 h de incubación se obtuvo un valor de viabilidad de 99,3 ± 0,4% en el control sin radiación. También fue descendiendo acorde al aumento de la dosis de radiación. Se registró un valor mínimo de 63,2 ± 22,4% con la dosis de 4,1 kJ m<sup>-2</sup> y la viabilidad fue nula para las dosis de 8,8 kJ m<sup>-2</sup> y superiores. Se encontraron diferencias significativas entre las dosis evaluadas ( $F_{g.l.: 6,21} = 24,8$ ;  $P < 0,001$ ).

A modo general, la viabilidad de *M. anisopliae* s.l. IP 46 en medio de cultivo PDAY+clor+ben no se vio afectada por la dosis más baja (0,7 kJ m<sup>-2</sup>), fue retrasada por las dosis de 2,1 y 4,1 kJ m<sup>-2</sup> y completamente inhibida por las dosis mayores.

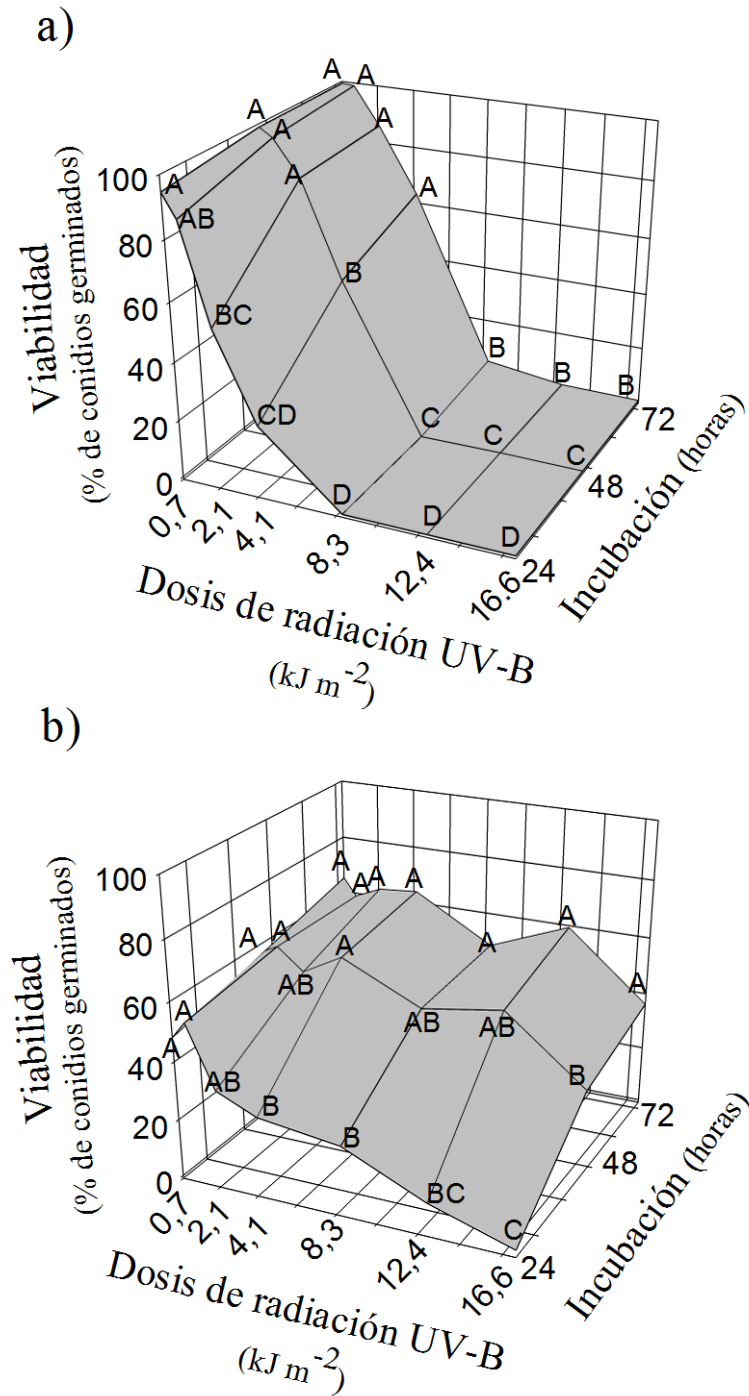
Cuando los conidios secos fueron aplicados sobre un tejido de fibra de vidrio, el valor de viabilidad (figura 36 b) alcanzado por los controles (0 kJ m<sup>-2</sup>) fue de 48,1 ± 8% con 24 h de incubación con una tendencia a disminuir este valor al aumentar la dosis de radiación. Se alcanzó un valor mínimo de 10,4 ± 4,1% para la dosis de 12,4 kJ m<sup>-2</sup> y fue nulo para dosis superiores. Se encontraron diferencias significativas entre las dosis evaluadas ( $F_{g.l.: 6,21} = 9,9$ ;  $P < 0,001$ ).

Al aumentar el tiempo de incubación, se observó una recuperación de la viabilidad para todas las dosis de radiación, incluida la más alta de  $16,6 \text{ kJ m}^{-2}$ . Con 48 h de incubación en el control sin radiación se obtuvo un valor de viabilidad de  $57 \pm 2\%$ . Se registró un valor mínimo de  $28,4 \pm 4,7\%$  con la dosis de  $16,6 \text{ kJ m}^{-2}$ . Se encontraron diferencias significativas entre las dosis evaluadas ( $F_{\text{g.l.: } 6,21} = 2,8$ ;  $P = 0,04$ ).

Con 72 h de incubación, la viabilidad máxima alcanzada en el control sin radiación fue de  $65,6 \pm 4,3\%$ . El valor mínimo fue de  $36,1 \pm 6,4\%$  para la dosis de  $16,6 \text{ kJ m}^{-2}$ . El efecto de la dosis de radiación no fue significativo ( $F_{\text{g.l.: } 6,21} = 2,45$ ;  $P = 0,06$ ) en este caso.

A modo general, la viabilidad de *M. anisopliae* s.l. IP 46 en el tejido de fibra expuesto a las radiaciones más bajas de UV-B ( $0,7-4,1 \text{ kJ m}^{-2}$ ) resultó menor respecto a la obtenida en el medio de cultivo. Sin embargo, la viabilidad de los conidios no se vio totalmente inhibida al aumentar las dosis de UV-B ( $8,3-16,6 \text{ kJ m}^{-2}$ ), encontrándose incluso una tendencia a aumentar con el tiempo de incubación.

En la figura 36 las letras diferentes indican diferencias significativas en la viabilidad, analizadas por comparaciones post-hoc (SNK), entre dosis de UV-B, dentro de cada tiempo de incubación.

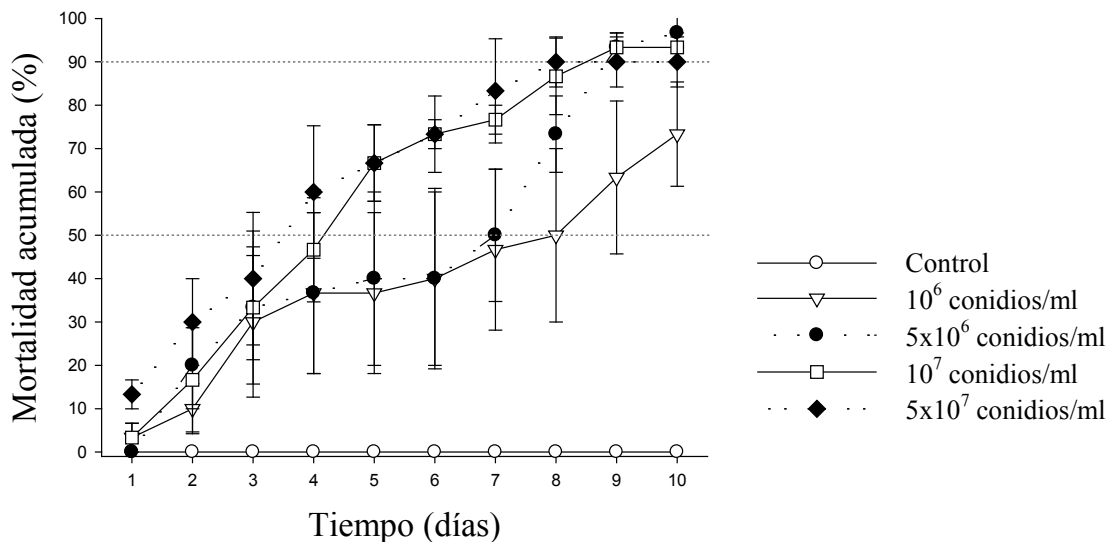


**Figura 36:** Efecto de la radiación UV-B sobre la viabilidad (% de conidios germinados) de *M. anisopliae* s.l. IP 46. Conidios expuestos dentro de la cámara de radiación sobre: a) medio de cultivo PDAY+clor+ben. b) un tejido de fibra de vidrio, del que luego se realizó una suspensión y se sembró en medio de cultivo PDAY+clor+ben. Letras diferentes indican diferencias significativas (post-hoc, SNK  $P < 0,05$ ) en la viabilidad por cada tiempo de incubación.

#### 4- Efecto de la radiación UV-B sobre conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 expuestos bajo una columna de agua, en recipientes que simulaban ser sitios de cría de *Ae. aegypti*

##### 4.1 Determinación de la concentración letal (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) de *M. anisopliae* s.l. IP 46 contra larvas de *Ae. aegypti*

En la figura 37 se observa el porcentaje promedio de mortalidad acumulada de larvas de *Ae. aegypti* colocadas en suspensiones de conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46 de diferentes concentraciones en función del tiempo de duración del bioensayo. Luego de 10 días, los valores de mortalidad acumulada para cada concentración fueron los siguientes: 10<sup>6</sup> conidios/ml, 73,3 ± 12%; 5 x 10<sup>6</sup> conidios/ml, 96,7 ± 3,3%; 10<sup>7</sup> conidios/ml, 93,3 ± 3,3% y 5 x 10<sup>7</sup> conidios/ml, 90 ± 5,8%. Los valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> fueron calculados para los días 5 y 8 post tratamiento. Estos valores se detallan en la tabla 12 con sus respectivos IC<sub>95</sub> y se utilizaron para definir qué concentración utilizar en los ensayos posteriores. Se determinó la concentración de 2 x 10<sup>7</sup> conidios/ml ya que es la que mata al 90% de los individuos (CL<sub>90</sub>) tratados luego de 8 días de incubación a 25 ± 1 °C y fotoperíodo 12 h de luz/oscuridad.



**Figura 37:** Concentración letal (CL) 50 y 90 de *M. anisopliae* s.l. IP 46 contra larvas de *Ae. aegypti*. Se observa la mortalidad acumulada por día de tratamiento, para cada concentración utilizada. Las líneas verticales indican el error estándar. Las líneas punteadas representan los porcentajes de mortalidad del 50 y 90% respectivamente.

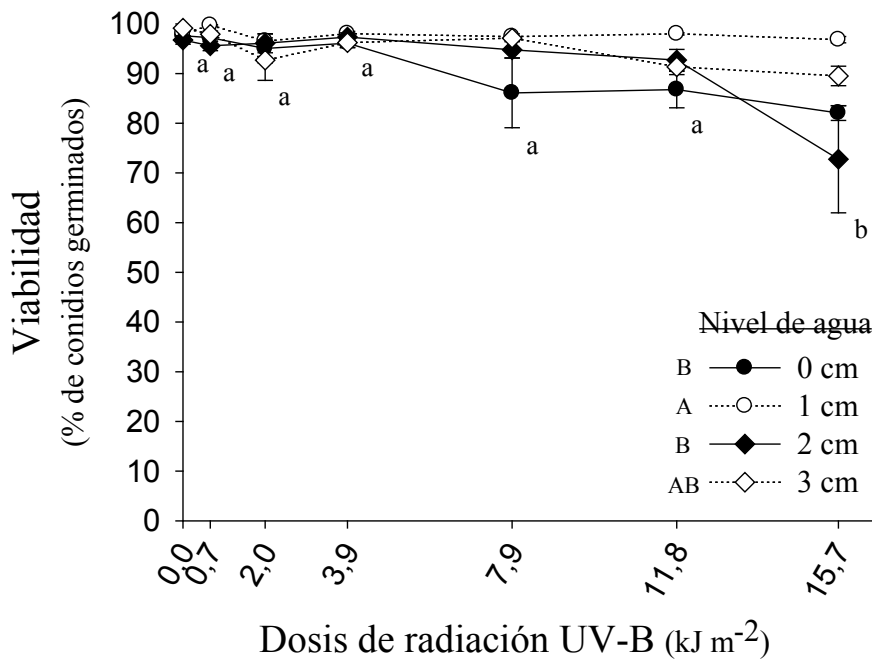
Días post tratamiento	Concentración letal (CL) (conidios/ml)		Pendiente ± E.E
	CL <sub>50</sub> (IC <sub>95</sub> )	CL <sub>90</sub> (IC <sub>95</sub> )	
5	5,2 x 10 <sup>6</sup> (7,5 x 10 <sup>5</sup> –7,5 x 10 <sup>6</sup> )	1,5 x 10 <sup>9</sup> (3,4 x 10 <sup>7</sup> –2,2 x 10 <sup>15</sup> )	0,52 ± 0,10
8	9,6 x 10 <sup>5</sup> (6,6 x 10 <sup>4</sup> –2 x 10 <sup>6</sup> )	2 x 10 <sup>7</sup> (8,4 x 10 <sup>6</sup> –7,4 x 10 <sup>7</sup> )	0,96 ± 0,32

**Tabla 12:** Concentración letal (CL) (conidios/ml) 50 y 90 de *M. anisopliae* s.l. IP 46 contra larvas L2 de *Ae. aegypti*, calculadas para los días 5 y 8 luego del inicio del ensayo. Se informa también la pendiente de regresión del análisis Probit con su error estándar (E.E.).

#### 4.2 Viabilidad

En la figura 38 se observa el porcentaje de conidios germinados luego de 24 h de incubación a  $25 \pm 1$  °C, en función de la dosis de radiación UV-B recibidas (0; 0,7; 2; 3,9; 7,9; 11,8 o 15,7 kJ m<sup>-2</sup>), bajo diferentes niveles de agua (0, 1, 2 o 3 cm). Se obtuvo un efecto significativo del nivel de agua ( $F_{g.l.: 3,84} = 6,7$ ;  $P < 0,001$ ; 1 cm [A]; 3 cm [AB]; 0 y 2 cm [B]; letras distintas indican diferencias significativas post-hoc entre los tratamientos, por SNK). También se encontró un efecto significativo de la dosis de radiación, ( $F_{g.l.: 6,84} = 9,5$ ;  $P < 0,001$ ; 0; 0,7; 2; 3,9; 7,9 y 11,8 kJ m<sup>-2</sup> [a], y 15,7 kJ m<sup>-2</sup> [b]; letras distintas indican diferencias significativas post-hoc entre los tratamientos, por SNK).

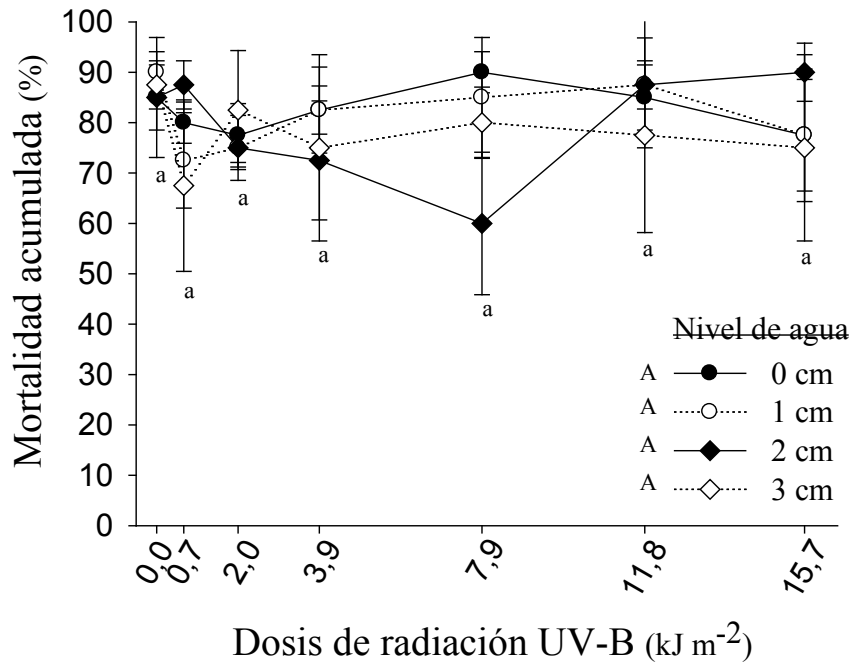
Los valores promedio de viabilidad obtenidos en cada nivel de agua fueron los siguientes: para el nivel 0, el porcentaje de conidios germinados mínimo fue de  $82,1 \pm 1,5\%$  (15,7 kJ m<sup>-2</sup>) y el máximo fue de  $97,6 \pm 1,2\%$  (0 kJ m<sup>-2</sup>, envuelto en papel de aluminio). Para el nivel 1, la germinación de conidios varió entre  $96,5 \pm 0,6\%$  (2 kJ m<sup>-2</sup>) y  $99,7 \pm 0,1\%$  (0,7 kJ m<sup>-2</sup>). Para el nivel 2, varió entre  $72,8 \pm 10,8\%$  (15,7 kJ m<sup>-2</sup>) y  $97,3 \pm 0,9\%$  (3,9 kJ m<sup>-2</sup>). Finalmente, en el nivel 3 el resultado de viabilidad varió entre  $89,5 \pm 2\%$  (15,7 kJ m<sup>-2</sup>) y  $99,1 \pm 0,1\%$  (0 kJ m<sup>-2</sup>, envuelto en papel de aluminio).



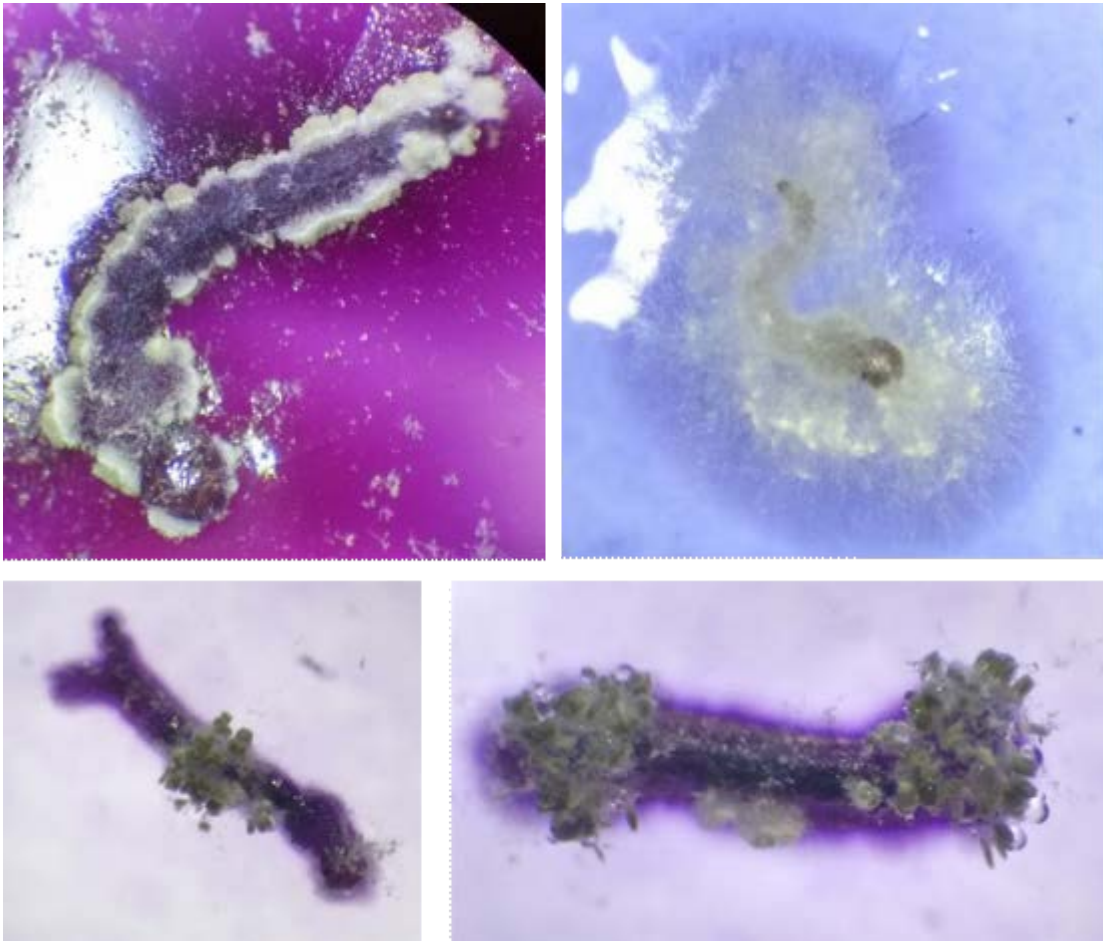
**Figura 38:** Viabilidad de *M. anisopliae* s.l. IP 46 en medio de cultivo PDAY+clor+ben luego de 24 h de incubación a 25 ± 1 °C. Las barras verticales indican error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (post-hoc, SNK, P < 0,05). En letras minúsculas se indica el efecto de la dosis de radiación, en letras mayúsculas el efecto del nivel de agua.

#### 4.3 Mortalidad

En la figura 39 se muestra el porcentaje promedio de mortalidad acumulada de larvas de *Ae. aegypti* al día 10 de tratamiento con conidios que fueron expuestos a radiación UV-B o no (control cubierto con papel de aluminio, 0 kJ m<sup>-2</sup>), bajo diferentes niveles de agua. No se encontró un efecto significativo de la columna de agua sobre la virulencia de los conidios ( $F_{g.l.: 3,84} = 0,3$ ;  $P = 0,85$ ). Tampoco se detectó un efecto significativo de la dosis de radiación ( $F_{g.l.: 6,21} = 1,2$ ;  $P = 0,39$ ). Los valores de mortalidad variaron entre 60 ± 14% (7,9 kJ m<sup>-2</sup> en un nivel de agua de 2 cm) y 90 ± 5,8% (15,7 kJ m<sup>-2</sup> en un nivel de agua de 2 cm). En la figura 40 se puede observar, en cámaras húmedas, la esporulación del hongo sobre las larvas muertas.



**Figura 39:** Patogenicidad de *M. anisopliae* s.l. IP 46 sobre larvas L2 de *Ae. aegypti*. Mortalidad de larvas acumulada al día de tratamiento con una suspensión de conidios que fueron previamente irradiados con diferentes dosis de UV-B (0; 0,7; 2; 3,9; 7,9; 11,8 o 15,7 kJ m<sup>-2</sup>), bajo diferentes volúmenes de agua (niveles de la columna de agua: 0, 1, 2 o 3 cm). Las líneas verticales indican error estándar. Las letras iguales indican que no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). En letras minúsculas se indica el efecto de la dosis de radiación, en letras mayúsculas el efecto del nivel de agua.



**Figura 40:** Larvas de *Ae. aegypti* infectadas con *M. anisopliae* s.l. IP 46. Luego de cada tratamiento las larvas muertas fueron incubadas en cámaras húmedas de agar-agua. Se observa la proliferación de conidios por fuera del tegumento. Las fotos fueron tomadas bajo lupa con aumento 30x.

Los valores de  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  de las larvas, se detallan en la tabla 13 para cada tratamiento. No se encontraron diferencias significativas basadas en la superposición de los  $IC_{95}$ . El valor menor de  $TL_{50}$  obtenido fue de 2,7 (-7,2-4,9) días (dosis de radiación  $11,8 \text{ kJ m}^{-2}$ , nivel de la columna de agua de 3 cm) y el mayor de 8 (6,4-11,9) días (dosis de radiación  $3,9 \text{ kJ m}^{-2}$ , nivel de la columna de agua de 2 cm). El valor de  $TL_{90}$ , varió entre 8,9 (7,2-13,2) días (dosis de radiación  $11,8 \text{ kJ m}^{-2}$ , nivel de la columna de agua de 2 cm) y 19,3 (13,0 -76,8) días (dosis de radiación  $7,9 \text{ kJ m}^{-2}$ , nivel de la columna de agua de 2 cm). No se encontró una tendencia marcada entre estos valores y los factores analizados.

Nivel de la columna de agua (cm)	Dosis de radiación UV-B (kJ m <sup>-2</sup> )	Tiempo letal (TL) (días)		Pendiente ± E.E.
		TL <sub>50</sub> (IC <sub>95</sub> )	TL <sub>90</sub> (IC <sub>95</sub> )	
0	0 (control 1)	4,1 (1,1 – 5,8)	12,5 (9,5 – 23,4)	0,15 ± 0,05
	0 (control 2)	4,7 (3,1 – 5,9)	10,6 (8,6 – 15,2)	0,22 ± 0,05
	0,7	6,4 (5,1 – 8,0)	12,5 (10,1–18,5)	0,21 ± 0,05
	2,0	7,2 (5,9 – 9,1)	13,3 (10,7 –20,1)	0,21 ± 0,05
	3,9	5,1 (2,6 – 7,2)	14,0 (10,4 –28,9)	0,14 ± 0,05
	7,9	4,5 (3,2 – 5,5)	9,1 (7,7 – 12,0)	0,27 ± 0,05
	11,8	4,9 (3,6 – 6,0)	10,2 (8,5 – 13,9)	0,24 ± 0,05
	15,7	6,5 (5,4 – 8,0)	11,8 (9,8 – 16,3)	0,24 ± 0,05
1	0 (control 1)	4,7 (3,2 – 5,9)	10,3 (8,5 – 14,5)	0,23 ± 0,05
	0 (control 2)	3,7 (1,8 – 4,9)	9,3 (7,6 – 13,2)	0,23 ± 0,05
	0,7	7,2 (6,1 – 8,7)	12,1 (10,2 –16,6)	0,26 ± 0,05
	2,0	6,0 (4,7 – 7,4)	11,7 (9,6 – 16,7)	0,22 ± 0,05
	3,9	6,0 (4,7 – 7,5)	12,1 (9,8 – 17,9)	0,21 ± 0,05
	7,9	3,3 (0,9 – 4,6)	9,6 (7,7 – 14,3)	0,20 ± 0,05
	11,8	3,7 (0,8 – 5,2)	11,2 (8,7 – 18,8)	0,17 ± 0,05
	15,7	3,7 (0,2 – 5,3)	12,0 (9,1 – 22,3)	0,15 ± 0,05
2	0 (control 1)	6,4 (4,9 – 8,6)	13,8 (10,7 –23,2)	0,18 ± 0,05
	0 (control 2)	3,0 (-2,6 – 4,9)	12,4 (9,1 – 27,4)	0,14 ± 0,05
	0,7	4,6 (2,9 – 6,0)	10,9 (8,8 – 16,3)	0,20 ± 0,05
	2,0	6,3 (5,0 – 7,9)	12,5 (10,1 –18,6)	0,21 ± 0,05
	3,9	8,0 (6,4 – 11,9)	15,9 (12,0 –30,4)	0,16 ± 0,05
	7,9	7,7 (5,4 – 17,8)	19,3 (13,0 –76,8)	0,11 ± 0,05
	11,8	2,8 (0,2 – 4,2)	8,9 (7,2 – 13,2)	0,21 ± 0,05
	15,7	3,6 (1,6 – 4,9)	9,6 (7,8 – 14,0)	0,21 ± 0,05
3	0 (control 1)	3,9 (0,9 – 5,5)	11,9 (9,1 – 21,4)	0,16 ± 0,05
	0 (control 2)	4,1 (1,6 – 5,6)	11,5 (9,0– 19,2)	0,17 ± 0,05
	0,7	7,8 (6,5 – 10,3)	14,1 (11,2 –22,2)	0,20 ± 0,05
	2,0	4,7 (3,3 – 5,9)	10,1 (8,4 – 13,9)	0,24 ± 0,05
	3,9	5,6 (3,5 – 7,8)	14,2 (10,7 –28,1)	0,15 ± 0,05
	7,9	5,4 (3,7 – 7,0)	12,4 (9,8 – 20,1)	0,18 ± 0,05
	11,8	2,7 (-7,2 – 4,9)	13,7 (9,6 – 42,8)	0,12 ± 0,05
	15,7	4,9 (2,4 – 6,8)	13,4 (10,1 –26,1)	0,15 ± 0,05

**Tabla 13:** Tiempo letal (TL) 50 y 90 con sus respectivos intervalos de confianza (IC<sub>95</sub>) de larvas de *Ae. aegypti* tratadas con conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46, previamente expuestas a diferentes dosis de radiación UV-, bajo diferentes volúmenes de agua. Control 1 hace referencia al control positivo de conidios que permaneció fuera de la cámara de radiación, Control 2 es el control positivo de conidios que permaneció dentro de la cámara de radiación por 240 minutos envuelto en papel aluminio. Se informa también la pendiente de la regresión Probit con su error estándar (E.E.) en cada caso.

## Discusión

La germinación de los conidios es el primer paso para que un hongo entomopatógeno consiga invadir a su hospedador. La radiación solar, en especial el espectro UV-B, afecta a este proceso (Fargues *et al.*, 1996; Braga *et al.*, 2001a-b; Rangel *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2007), por lo cual actúa inhibiendo la penetración de la cutícula y disminuyendo la patogenicidad. Los resultados aquí presentados enfatizan la importancia del sustrato y del entorno en el cual se exponen los conidios a la radiación para la supervivencia de estos. En este trabajo, por un lado, se presentaron ensayos de exposición a la radiación UV-B de conidios, ya sea en la cutícula de un insecto *in vivo*, sobre un medio de cultivo o sobre una superficie inerte como el tejido de fibra de vidrio. Por el otro lado, se estudió el efecto sobre la viabilidad y la virulencia de conidios irradiados en una suspensión acuosa, bajo una columna de agua. La radiación provocó un efecto deletéreo sobre la viabilidad de los conidios expuestos sobre medio de cultivo y sobre el tejido, retrasando o inhibiendo la germinación. También se observó un efecto significativo de la radiación en la viabilidad de los conidios expuestos a UV-B bajo una columna de agua. En cuanto a la virulencia, no se encontró un efecto significativo de la radiación sobre el aislamiento *M. anisopliae* s.l. IP 46, ya sea contra adultos o larvas de *Ae. aegypti*. Este último punto aumenta el potencial de esta cepa como agente de control biológico contra *Ae. aegypti* ya que demuestra su patogenicidad contra diferentes estados de desarrollo del hospedador.

Dependiendo del sustrato, los conidios pueden acceder a un microambiente con más o menos agua disponible y esto provoca variación en la susceptibilidad a la UV-B (Fernandes *et al.*, 2015). Estudios previos indican que los conidios frescos son más susceptibles a la radiación que los conidios secados por aireación y almacenados por un tiempo mayor. Esto se atribuye a diferencias en el estado metabólico que es más activo en los primeros. Los cambios bioquímicos y fisiológicos afectados por la radiación se encuentran en forma basal o nula en los conidios secos (Le Grand y Cliquet, 2013). Al exponer a los conidios en un medio de cultivo, el líquido circundante pudo eventualmente dar inicio a las actividades metabólicas de los conidios. Estos procesos fisiológicos se vieron afectados por la radiación de manera proporcional al tiempo de exposición dentro de la cámara de radiación. Con la dosis menor evaluada ( $0,7 \text{ kJ m}^{-2}$ ), las placas de cultivos se retiraron luego de diez minutos y los conidios no resultaron afectados, continuando los

procesos biológicos para la germinación del conidio normalmente. Con las dosis de 2,1 y 4,1  $\text{kJ m}^{-2}$  los procesos metabólicos empezaron a ser afectados por la radiación ya que la germinación de los conidios fue significativamente menor respecto del control (0  $\text{kJ m}^{-2}$ ) a las 24 h de incubación. Sin embargo, cuando transcurrieron tiempos de incubación más prolongados (72 h), la viabilidad se recuperó. Esto puede deberse a la activación de mecanismos de reparación celular, como la fotoreactivación y la reparación por escisión de nucleótidos (Chelico *et al.*, 2006) luego de la exposición. Con dosis mayores a 8,3  $\text{kJ m}^{-2}$ , la radiación UV-B inhibió por completo la germinación de los conidios. En esta dosis evaluada resultó más notable la diferencia con los conidios secos expuestos a la radiación sobre un tejido, sin agua disponible ni nutrientes. En este caso los procesos metabólicos se dispararon de manera menos avanzada para todos los tiempos de exposición y los cambios en la viabilidad fueron más estables. El tejido también pudo haber ocultado a ciertos conidios de la radiación.

Asimismo, el efecto adulticida de *M. anisopliae* s.l. IP 46 no se vio afectado por la radiación. En el diseño experimental planteado los conidios mayormente se adhirieron en la parte ventral del insecto. Eventualmente pudo haber sobrevivido algún conidio en lugares de la cutícula no expuesto a radiación. También es posible que la luz visible haya activado mecanismos de protección y reactivación de los conidios posterior a la exposición a UV-B (Braga *et al.*, 2002; Brancini *et al.*, 2016). Es importante destacar que las dosis planteadas en el laboratorio son mucho mayores a las obtenidas en la ciudad de Goiânia en los horarios en los que *Ae. aegypti* permanece activo y además los adultos no deberían estar expuestos a la radiación solar por tiempos tan prolongados. Debido a esto, la virulencia debería mantenerse en posibles aplicaciones a campo.

La radiación UV-B no presentó un efecto significativo en la conidiogénesis de *M. anisopliae* s.l. IP 46 luego de infectar y matar a un individuo de *Ae. aegypti*. Esto resultaría beneficioso en el proceso de dispersión del hongo y de la propagación entre poblaciones locales de mosquitos. Sin embargo, existe una gran variación en la producción de conidios/cadáver en cada dosis de UV-B analizada y en especial en las dosis más elevadas ( $> 8,3 \text{ kJ m}^{-2}$ ). El proceso de conidiogénesis *post-mortem* es afectado por factores bióticos y abióticos tales como la temperatura, el tipo de cepa utilizada y la concentración inoculada (Luz *et al.*, 1999). Estos factores, hasta el momento no han sido estudiados para *M. anisopliae* s.l. IP 46 y es posible que tengan alguna influencia en los resultados obtenidos.

Por otro lado, no se ha comprobado que el agua ejerza un efecto protector de los conidios irradiados bajo una columna de hasta 3 cm de altura. Si bien los resultados indican un efecto significativo de la radiación UV-B en la viabilidad, en todas las dosis analizadas, incluyendo la más alta (15,7 kJ m<sup>-2</sup>), el porcentaje de los conidios germinados superó el 70%. Dado que las dosis testeadas son más altas que las medidas en un ambiente urbano, este resultado continúa siendo promisorio.

Por último, en cuanto a la virulencia del hongo contra las larvas de *Ae. aegypti*, no se encontró un efecto significativo de la radiación y el porcentaje de mortalidad varió entre un 60 y 90%. Las hembras adultas suelen colocar sus huevos en sitios sombríos (Vezzani *et al.*, 2004) pero aun así las larvas que luego se desarrollan pueden estar en contacto con la radiación solar. La aplicación de conidios de *M. anisopliae* en los sitios de cría puede resultar una estrategia complementaria a los controles actualmente utilizados. Las larvas suelen alimentarse con alimento que sedimenta en el fondo de los sitios de cría al igual que lo hacen los conidios. La infección ocurriría a través de la ingesta de los conidios (Butt *et al.*, 2013) o por contacto con la cutícula.

Como conclusión, según los resultados obtenidos el aislamiento de *M. anisopliae* s.l. IP 46 se reafirma como un candidato propicio para ser incluido en los programas de control del vector. Este actúa sobre diferentes estadios y presenta elevada tolerancia a la radiación UV-B a la cual están expuestos los mosquitos diurnos como *Ae. aegypti*.

**Conclusiones generales y  
Perspectivas futuras**

## Conclusiones Generales

- ♦ La Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE cuenta con aislamientos fúngicos nativos de *M. anisopliae* que resultaron patogénicos sobre adultos de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio. Entre ellos se demostró que la cepa CEP 423, aislada originalmente de suelo de la ciudad de La Plata, fue la más virulenta.
- ♦ La concentración del inóculo fue un factor determinante de la supervivencia de los mosquitos tratados y de la infectividad del hongo entomopatógeno.
- ♦ El método de aplicación directo de los conidios dio resultados promisorios ya que la agresividad de las cepas fúngicas se corresponde con el periodo de incubación extrínseco de los arbovirus dentro del mosquito. Sin embargo, presenta desventajas en cuanto a la logística que se emplearía en la práctica.
- ♦ El método de aplicación indirecto a través de telas como sitios de reposo de *Ae. aegypti* provocó, como máximo, la infección y muerte del 50% de los individuos tratados. El desarrollo de esta metodología en una vivienda, debería complementarse con estudios comportamentales a fin de aumentar la probabilidad de interacción entre el mosquito y el sustrato con conidios.
- ♦ La aplicación de conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46, nativo de Brasil, en forma indirecta a través de polvo seco, fue eficaz para infectar y matar a adultos de *Ae. aegypti*. Adicionalmente, la aplicación de una suspensión de conidios en un posible sitio de cría también ocasionó una mortalidad elevada de los estados larvales. No obstante, la complejidad estaría dada en la posibilidad de abarcar a todos los criaderos y resulta más económico la eliminación de dichos sitios de cría.
- ♦ La radiación ultravioleta UV-B afecta negativamente a la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* s.l. IP 46. Sin embargo, favorablemente, este aislamiento es capaz de mantener su patogenicidad sobre adultos y larvas de *Ae. aegypti*, al exponerse a dosis de UV-B mucho más elevadas que las que se presentan naturalmente en el ambiente.

## Perspectivas Futuras

La demostración de la patogenicidad, virulencia y agresividad de una cepa fúngica, así como la evaluación de diferentes métodos de aplicación, es solo el primer paso en la evaluación de *M. anisopliae* como agente de control biológico de adultos de *Ae. aegypti*. Aún resta mucho trabajo por delante si se tiene como objetivo integrar a los hongos entomopatógenos a los programas de control de mosquitos.

Las futuras investigaciones deberán enfocarse en la posibilidad de generar un producto que se pueda liberar en el campo. Para ello se debe determinar la posibilidad de desarrollo y producción masiva de la cepa seleccionada, y se deben estudiar los factores ambientales que afectan a su viabilidad o patogenicidad. También se deberán desarrollar formulaciones que faciliten la adhesión de los conidios a la cutícula y que permitan que el inóculo mantenga su calidad a lo largo del tiempo. Por otro lado, se deberá estudiar el rango de hospedadores posibles de la cepa fúngica a utilizar, ya que no se desea la eliminación de los organismos benéficos ni de otros enemigos naturales de *Ae. aegypti*.

Para finalizar, dada la importancia sanitaria de *Ae. aegypti*, se debe mantener la densidad poblacional de los mosquitos por debajo de las requeridas para desencadenar epidemias. Para ello es absolutamente necesario llevar a cabo un Manejo Integrado de Plagas. Debido a esto, otra perspectiva a futuro es estudiar la interacción de *M. anisopliae* con los insecticidas químicos de uso habitual.

# **Bibliografía**

- Abreu, F., Morais, M., Ribeiro, S. y Eiras, Á.** (2015). Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(5), 669-676. doi: 10.1590/0074-02760140490
- Aguilera Sammaritano, J. A.** (2016). *Control microbiano de Bemisia tabaci (mosca blanca) mediante el uso de hongos entomopatógenos* (Tesis Doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Aguilera Sammaritano, J. A., López Lastra, C. C., Leclerque, A., Vázquez, F., Toro, M. E., D'Alessandro, C. P., ... y Lechner, B. E.** (2016). Control of *Bemisia tabaci* by entomopathogenic fungi isolated from arid soils in Argentina. *Biocontrol Science and Technology*, 26(12), 1668-1682. doi: 10.1080/09583157.2016.1231776
- Albicócco, A. P. y Vezzani, D.** (2009). Further study on *Ascogregarina culicis* in temperate Argentina: prevalence and intensity in *Aedes aegypti* larvae and pupae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3), 210-214. doi: 10.1016/j.jip.2009.05.003
- Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C. y Leather, S. R.** (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection*, 17(8), 675-679. doi: 10.1016/S0261-2194(98)00074-X
- Alves, S. B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R. M. y Vieira, S. A.** (2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolate for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 126, 504-509. doi: 10.1046/j.1439-0418.2002.00674.x
- Araripe, L. O., Bezerra, J. R. A., da Silva Rivas, G. B. y Bruno, R. V.** (2018). Locomotor activity in males of *Aedes aegypti* can shift in response to females' presence. *Parasites & Vectors*, 11:254. doi: 10.1186/s13071-018-2635-9
- Aviles, G., Rangeón, G., Vorndam, V., Briones, A., Baroni, P., Enria, D. y Sabbatini, M. S.** (1999). Dengue reemergence in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 5(4), 575. doi: 10.3201/eid0504.990424
- Badano, E. I. y Regidor, H. A.** (2002). Selección de hábitat de oviposición en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mediante estímulos físicos. *Ecología Austral*, 12(2), 129-134.
- Banu, A. N. y Balasubramanian, C.** (2014). Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Beauveria bassiana* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(8), 2869-2877. doi: 10.1007/s00436-014-3948-z
- Bateman, R. P., Carey, M., Moore, D. y Prior, C.** (1993). The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology*, 122(1), 145-152. doi: 10.1111/j.1744-7348.1993.tb04022.x
- Baverstock, J., Roy, H. E. y Pell, J. K.** (2010). Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl*, 55(1), 89-102. doi: 10.1007/s10526-009-9238-5
- Benelli, G., Jeffries, C. L. y Walker, T.** (2016). Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. *Insects*, 7(4), 52. doi: 10.3390/insects7040052
- Bernier, U. R., Kline, D. L., Barnard, D. R., Schreck, C. E. y Yost, R. A.** (2000). Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are

- candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Analytical Chemistry*, 72(4), 747-756. doi: 10.1021/ac990963k
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y. y Xi, Z.** (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, 6(4):e1000833. doi: 10.1371/journal.ppat.1000833
- Bidochka, M. J., McDonald, M. A., Leger, R. J. S. y Roberts, D. W.** (1994). Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*, 25(2), 107-113. doi: 10.1007/BF00309534
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. y Humber, R. A.** (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530. doi: 10.3852/07-202
- Blanford, S., Chan, B. H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R. J., Read, A. F. y Thomas, M. B.** (2005). Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 308(5728), 1638-1641. doi: 10.1126/science.1108423
- Bogus', M. I., Czygier, M., Golebiowski, M., Keçdra, E., Kucin'ska, J., Mazgajska, J., ... y Wlo'ka, E.** (2010). Effects of insect cuticular fatty acids on in vitro growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Experimental Parasitology*, 125, 400-408. doi: 10.1016/j.exppara.2010.04.001
- Bowatte, G., Perera, P., Senevirathne, G., Meegaskumbura, S. y Meegaskumbura, M.** (2013). Tadpoles as dengue mosquito (*Aedes aegypti*) egg predators. *Biological Control*, 67(3), 469-474. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.10.005
- Braga, G. U., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J. y Roberts, D. W.** (2001 a). Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 734-739. doi: 10.1562/0031-8655(2001)0740734BSUAUR2.0.CO2
- Braga, G. U., Flint, S. D., Messias, C. L., Anderson, A. J. y Roberts, D. W.** (2001 b). Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 105(7), 874-882. doi:10.1017/S0953756201004270
- Braga, G. U., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J. y Roberts, D. W.** (2001 c). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 N to 54 S. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 98-108. doi:10.1006/jipa.2001.5048
- Braga, G. U., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J. y Roberts, D. W.** (2002). Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia*, 94: 912-920. doi: 10.1080/15572536.2003.11833149
- Braga, G. U., Rangel, D. E., Fernandes, É. K., Flint, S. D. y Roberts, D. W.** (2015). Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics*, 61(3), 405-425. doi: 10.1007/s00294-015-0483-0
- Brancini, G. T. P., Rangel, D. E. y Braga, G. U.** (2016). Exposure of *Metarhizium acridum* mycelium to light induces tolerance to UV-B radiation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(6):fnw036. doi:10.1093/femsle/fnw036

- Brett, G. A.** (1938). On the relative attractiveness to *Aedes aegypti* of certain coloured cloths. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(1), 113-124. doi: 10.1016/S0035-9203(38)90101-4
- Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., ... y Powell, J. R.** (2014). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, 68(2), 514-525. doi: 10.1111/evo.12281
- Bukhari, T., Takken, W. y Koenraadt, C. J.** (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors*, 4:23. doi: 10.1186/1756-3305-4-23
- Burroni, N. E., Peresan, L. y Ocampo Mallow, C.** (2016). *Aedes aegypti* y virus Dengue: saberes y prácticas para el control. En Berón, C. M., Campos, R. E., Gleiser, R. M., Díaz-Nieto, L. M., Salomón, O. D. y Schweigmann, N. (Eds.), *Investigaciones sobre Mosquitos de Argentina*. (Capítulo 27, pp. 339-348). Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina. ISBN 978-987-544-721-9
- Butt, T. M., Greenfield, B. P., Greig, C., Maffei, T. G., Taylor, J. W., Piasecka, J., ... y Eastwood D. C.** (2013). *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. *PLoS One*, 8(12):e81686. doi: 10.1371/journal.pone.0081686
- Cabrera, M., y Jaffe, K.** (2007). An aggregation pheromone modulates lekking behavior in the vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(1), 1-10. doi: 10.2987/8756-971X(2007)23[1:AAPMLB]2.0.CO;2
- Cadet, J., Sage, E. y Douki, T.** (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1), 3-17. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.09.012
- Cadet, J., Mouret, S., Ravanat, J. L. y Douki, T.** (2012). Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochemistry and Photobiology*, 88(5), 1048-1065. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01200.x
- Cadet, J., Douki, T. y Ravanat, J. L.** (2015). Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 91(1), 140-155. doi: 10.1111/php.12368
- Cardoso, D. D. O., Gomes, V. M., Dolinski, C., Souza, R. M. y Idalino, W. S. S.** (2016). Efficacy of *Heterorhabditis indica* LPP35 against *Aedes aegypti* larvae in human-generated containers and bromeliads. *Nematoda*, 3. Descargado de <http://nematoda.org/files/v3n1/nematodaNC0172015.pdf>
- Carolino, A. T., Paula, A. R., Silva, C. P., Butt, T. M. y 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 & Vectors*, 7:198. doi: 10.1186/1756-3305-7-198
- Casadevall, A. y Pirofski, L. A.** (2001). Host - pathogen interactions: the attributes of virulence. *The Journal of infectious diseases*, 184(3), 337-344. doi: 10.1086/322044
- Chadee, D. D.** (2013) Resting behaviour of *Aedes aegypti* in Trinidad: with evidence for the re-introduction of indoor residual spraying (IRS) for dengue control. *Parasites & Vectors*, 6:255. doi: 10.1186/1756-3305-6-255

- Chadee, D.D. y Martinez, R.** (2000) Landing periodicity of *Aedes aegypti* with implications for dengue transmission in Trinidad, West Indies. *Journal of Vector Ecology*, 25, 158-163. Descargado de <https://pdfs.semanticscholar.org/2a24/434202775993cd2846ecfcc54376c5d467b1.pdf>
- Chance, K., y Kurucz, R. L.** (2010). An improved high-resolution solar reference spectrum for earth's atmosphere measurements in the ultraviolet, visible, and near infrared. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 111(9), 1289-1295. doi: 10.1016/j.jqsrt.2010.01.036
- Chanda, E., Ameneshewa, B., Bagayoko, M., Govere, J. M., y Macdonald, M. B.** (2017). Harnessing integrated vector management for enhanced disease prevention. *Trends in Parasitology*, 33(1), 30-41. doi: 10.1016/j.pt.2016.09.006
- Chelico, L., Haughian, J. L. y Khachatourians, G. G.** (2006). Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *B. nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii*. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 964–972. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02844.x
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T. y Lindegren, J. E.** (1968). Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11(1), 1-7. doi: 10.1016/0022-2011(68)90047-5
- Clarkson, J. M. y Charnley, A. K.** (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4(5), 197-203. doi: 10.1016/0966-842X(96)10022-6
- Cook, S., Diallo, M., Sall, A. A., Cooper, A. y Holmes, E. C.** (2005). Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) involved in transmission of arboviral disease in West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 42, 19–28. doi: 10/1093/jmedent/42.1.19
- Corbet, P. S. y Chadee, D. D.** (1990). Incidence and diel pattern of oviposition outdoors of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, WI in relation to solar aspect. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 84(1), 63-78. doi: 10.1080/00034983.1990.11812434
- Cullen, J. J. y Neale, P. J.** (1997). Biological weighting functions for describing the effects of ultraviolet radiation on aquatic systems. En Häder, D-P. (Ed.), *The Effects of Ozone Depletion on Aquatic Ecosystems*, capítulo 6, (pp. 97-118). Environmental Intelligence Unit, Academic Press y R.G. Landes Company, Austin, TX.
- Daoust, R. A. y Roberts, D. W.** (1982). Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(1), 107-117. doi: 10.1016/0022-2011(82)90042-8
- Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., Furlong y M. J.** (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1), 74-100.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W.** (2015). InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Descargado de <http://www.infostat.com.ar>
- Diffey, B. L.** (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13. doi: 10.1016/S1046-2023(02)00204-9

- Doberski, J. W. y Tribe, H. T.** (1980). Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(1), 95-100. doi:10.1016/S0007-1536(80)80013-1
- Driver, F., Milner, R. J. y Trueman, J. W. H.** (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134–150. doi: 10.1017/s0953756299001756
- Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., Kryukov, V. Y., Grizanov, E. V., ... y Butt, T. M.** (2013 a). Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi?. *PloS One*, 8(4):e60248. doi: 10.1371/journal.pone.0060248
- Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M., Kryukov, V. Y., Yaroslavtseva, O. N., Grizanov, E. V., Greig, C., ... y Butt, T. M.** (2013 b). More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280(1763) *Proceedings of the Royal Society B*, 280:20130584. doi: 10.1098/rspb.2013.0584
- Dzul-Manzanilla, F., Ibarra-López, J., Bibiano Marín, W., Martini-Jaimes, A., Leyva, J. T., Correa-Morales, F., ... y Vazquez-Prokopec, G. M.** (2017). Indoor resting behavior of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Acapulco, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 54(2), 501-504. doi: 10.1093/jme/tjw203
- Elliot, S. L., Blanford, S. y Thomas, M. B.** (2002). Host–pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269(1500), 1599-1607. doi: 10.1098/rspb.2002.2067
- Eilenberg, J., Hajek, A. y Lomer, C.** (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387-400. doi: 10.1023/A:1014193329979
- Esposito, D. L. A. y Fonseca, B. A. L. D.** (2017). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil?. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(5), 540-544. doi: 10.1016/j.bjid.2017.06.002
- Farenhorst, M., Farina, D., Scholte, E. J., Takken, W., Hunt, R. H., Coetzee, M. y Knols, B. G.** (2008). African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* ss and *Anopheles funestus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6), 910-916. doi: 10.4269/ajtmh.2008.78.910
- Farenhorst, M., Hilhorst, A., Thomas, M. y Knols, B. G. J.** (2011). Development of fungal Applications on netting substrates for Malaria vector control. *Journal of Medical Entomology*, 48(2), 305-313. doi: 10.1603/ME10134
- Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L. A., ... y Rougier, M.** (1996). Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*, 135(3), 171-181. doi: 10.1007/BF00632339
- Faria, M. R. y Wraight, S. P.** (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.08.001

- Farjana, T. y Tuno, N.** (2013) Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 50(4), 838–846. doi: 10.1603/ME12146
- Fernandes, E. K. K., Rangel, D. E., Moraes, A. M., Bittencourt, V. R. y Roberts, D. W.** (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3), 237-243. doi: 10.1016/j.jip.2007.05.007
- Fernandes, E. K. K., Rangel, D. E., Braga, G. U. y Roberts, D. W.** (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current genetics*, 61(3), 427-440. doi: 10.1007/s00294-015-0492-z
- Fernández, S., Groden, E., Vandenberg, J. D. y Furlong, M. J.** (2001). The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(3), 217-226. doi: 10.1006/jipa.2001.5022
- Fernández-Salas, I., Danis-Lozano, R., Casas-Martínez, M., Ulloa, A., Bond, J. G., Marina, C. F., ... y Díaz-González, E. E.** (2015). Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. *Antiviral Research*, 124, 30-42. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.10.015
- Filha, M. H. N. L. S., Berry, C. y Regis, L.** (2014). *Lysinibacillus sphaericus*: Toxins and mode of action, applications for mosquito control and resistance management. *Advances in Insect Physiology*, 47, 89-176. doi: 10.1016/B978-0-12-800197-4.00003-8
- Gaffigan, T. V., Wilkerson, R. C., Pecor, J. E., Stoffer, J. A. y Anderson, T.** (2017). *Walter Reed Biosystematics Unit, Systematic Catalog of Culicidae*. Smithsonian Institution, Washington, DC, USA. Recuperado de <http://www.mosquitocatalog.org>. Fecha de acceso: 28/06/2017.
- Ganesan, K., Mendki, M., Suryanarayana, M., Prakash, S. y Malhotra, R.** (2006). Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. *Australian Journal of Entomology*, 45(1), 75-80. doi: 10.1111/j.1440-6055.2006.00513.x
- Gerberg, E. J., Barnard, D. R. y Ward, R. A.** (1994). Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *American Mosquito Control Association, Inc.*, Lake Charles, USA. ISBN : 0960621083
- Gloria-Soria, A., Ayala, D., Bheecarry, A., Calderon-Arguedas, O., Chadee, D. D., Chiappero, M., ... y Powell, J. R.** (2016). Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Molecular Ecology*, 25(21), 5377-5395. doi: 10.1111/mec.13866.
- Goettel, M. S. e Inglis, G. D.** (1997). Fungi: Hyphomycetes. En *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lacey, L. A. (Ed.), capítulo V-3 (pp. 213-250), Academic Press, New York. doi: 10.1016/B978-012432555-5/50013-0
- Gołębiowski, M., Malinski, E., Bogus, M. I., Kumirska, J. y Stepnowski, P.** (2008). The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 38(6), 619–627. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.03.005
- Gray, L., Florez, S. D., Barreiro, A. M., Vadillo-Sánchez, J., González-Olvera, G., Lenhart, A., ... y Vazquez-Prokopec, G. M.** (2018). Experimental evaluation of the impact of household aerosolized

- insecticides on pyrethroid resistant *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 8(1):12535. doi: 10.1038/s41598-018-30968-8
- Gubler, D. J.** (2011). Prevention and control of *Aedes aegypti*-borne diseases: lesson learned from past successes and failures. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 19(3), 111-114.
- Gutiérrez, A. C.** (2015). Estudio y evaluación de los patógenos de cucarachas (Insecta: Blattodea) urbanas en la provincia de Buenos Aires, como potenciales agentes de control (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- Gutiérrez, A. C., Gołębowski, M., Pennisi, M., Peterson, G., García, J. J., Manfrino, R. G. y López Lastra, C. C.** (2015). Cuticle fatty acid composition and differential susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). *Journal of Economic Entomology*, 108(2), 752-760. doi:10.1093/jee/tou096
- Gutiérrez, A. C., Rueda-Páramo, M., Falvo, M. L., López Lastra, C. C. y García, J. J.** (2017 a). *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) as a future biorational tool for the control of *Aedes aegypti* (L.). *Acta Tropica*, 169: 112-118. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.01.021
- Gutiérrez, A. C., Tornesello Galván, J., Manfrino, R. G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D'Alessandro, C. y López Lastra, C. C.** (2017 b). Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbiontes de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 183-188. doi: 10.1016/j.ram.2016.09.007
- Häder, D. P., Kumar, H. D., Smith, R. C. y Worrest, R. C.** (2007). Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 267-285. doi: 10.1039/C0PP90036B
- Harbach, R. E. y Kithcing, I. J.** (1998). Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology*, 23(4), 327-370. doi: 10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x
- Heinig, R. L. y Thomas, M. B.** (2015). Interactions between a fungal entomopathogen and malaria parasites within a mosquito vector. *Malaria Journal*, 14:22. doi: 10.1186/s12936-014-0526-x
- Hirunkanokpun, S., Carlson, J. O. y Kittayapong, P.** (2008). Evaluation of mosquito dengue viruses for controlling *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Variation in efficiency due to virus strain and geographic origin of mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78, 784-790. doi: 10.4269/ajtmh.2008.78.784
- Holder, D. J. y Keyhani, N. O.** (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260-5266. doi: 10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005
- Hsiao, W. F., Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G.** (1992). Effect of temperature and relative humidity on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*, toward the oat - bird berry aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae). *Journal of Applied Entomology*, 114, 484-490. doi: 10.1111/j.1439-0418.1992.tb01155.x
- Humber R.** (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En Lacey, L. A. (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2º ed., capítulo VI (pp. 151-187). Academic Press (Elsevier Ltd.), Great Britain. ISBN: 978-0-12-386899-2

- Ignoffo, C. M.** (1992). Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *The Florida Entomologist*, 75(4), 516-525. doi: 10.2307/3496133
- James, R. R. y Jaronski, S. T.** (2000). Effect of low viability on infectivity of *Beauveria bassiana* conidia toward the silverleaf whitefly. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76(3), 227-228. doi: 10.1006/jipa.2000.4954
- Jenkins, N. E. y Grzywacz, D.** (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753-777. doi: 10.1080/09583150020011717
- Kantor, I.** (2016). Dengue, Zika y Chikungunya. *Medicina (Buenos Aires)*, 76, 93-97.
- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F. y Rehner, S. A.** (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811-829. doi: 10.3852/13-319
- Kershaw, M. J., Moorhouse, E. R., Bateman, R., Reynolds, S. E. y Charnley, A. K.** (1999). The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(3), 213-223. doi: 10.1006/jipa.1999.4884
- Kleinbaum, D. G. y Klein, M.** (2012). *Survival Analysis: A Self-Learning Text*. Statistics for Biology and Health Series. Springer, NY, USA. doi: 10.1007/978-1-4419-6646-9
- Knight, K. L. y Stone, A.** (1977). *A Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae)*, Volume VI, 2<sup>o</sup> ed. The Thomas Say Foundation, Entomological Society of America, College Park, MD, USA.
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... y Hay, S. I.** (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLIFE*, 4:e08347. doi: 10.7554/eLife.08347
- Kroeger, A., Lenhart, A., Ochoa, M., Villegas, E., Levy, M., Alexander, N. y McCall, P. J.** (2006). Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomised trials. *BMJ*, 332(7552), 1247-1252. doi: 10.1136/bmj.332.7552.1247
- Lacey, L.A.** (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23 (sp2), 133-163. doi: 10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIAB]2.0.CO;2
- Lane B. S., Humphreys, A. M., Thompson, K., Trinci, A. P. J.** (1988). ATP Content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as criterion of spore viability. *Transactions of the British Mycological Society*, 90(1), 109-111. doi: 10.1016/S0007-1536(88)80186-4
- Lavine, M. D. y Strand, M. R.** (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1295-1309. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9
- Le Grand, M. y Cliquet, S.** (2013) Impact of culture age on conidial germination, desiccation and UV tolerance of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 23(7), 847-859. doi: 10.1080/09583157.2013.802289
- Lecuona R. E.** (1996). Técnicas empleadas con Hongos Entomopatógenos. En Lecuona, R. E. (Ed.), *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*. (pp. 143-150). Talleres gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 9504369375

- Leles, R. N., Sousa, N. A., Rocha, L. F. N., Santos, A. H., Silva, H. H. G. y Luz, C.** (2010). Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 107(5), 1271-1274. doi: 10.1007/s00436-010-1991-y
- Leles, R. N., López Lastra, C. C., García, J. J., Fernandes, É. K. K. y Luz, C.** (2013). A simple method for the detection of *Leptolegnia chapmanii* from infected *Aedes aegypti* larvae. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(6), 425-429. doi: 10.1139/cjm-2012-0703
- Liang, Z. Q., Liu, A. Y. y Liu, J. L.** (1991). A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta Mycologica Sinica*, 10, 257-262.
- Lima, W. P., Chiaravalloti Neto, F., Macoris, M. D. L. D. G., Zuccari, D. A. P. C. y Dibo, M. R.** (2009). Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(6), 638-641.
- Lindsay, S. W., Adiamah, J. H., Miller, J. E. y Armstrong, J. R. M.** (1991). Pyrethroid - treated bednet effects on mosquitoes of the *Anopheles gambiae* complex in The Gambia. *Medical and Veterinary Entomology*, 5(4), 477-483. doi: 10.1111/j.1365-2915.1991.tb00576.x
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M. y Parker, B. L.** (2003). Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(3), 139-147. doi: 10.1016/S0022-2011(03)00018-1
- Liu, N.** (2015). Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual Review of Entomology*, 60, 537-559. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020828
- Lobo, L. S., Rodrigues, J. y Luz, C.** (2016). Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 26(3), 386-401. doi: 10.1080/09583157.2015.1123220
- Lounibos, L. P.** (1981). Habitat segregation among African treehole mosquitoes. *Ecological Entomology*, 6(2), 129-154. doi: 10.1111/j.1365-2311.1981.tb00601.x
- Luz, C., Silva, I. G., Cordeiro, C. M. T. y Tigano, M. S.** (1999). Sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Triatoma infestans* after infection at different temperatures and doses of inoculum. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 223-225. doi: 10.1006/jipa.1998.4827
- Lwetoijera, D. W., Sumaye, R. D., Madumla, E. P., Kavishe, D. R., Mnyone, L. L., Russell, T. L. y Okumu, F. O.** (2010). An extra-domiciliary method of delivering entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* IP 46 for controlling adult populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *Parasites & Vectors*, 3:18. doi: 10.1186/1756-3305-3-18
- Lyman Ott, R. y Longnecker, M.** (2010). *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*. Brooks/Cole Cengage Learning, Scarborough, Canada (Nelson Education, Ltd.). ISBN-13: 978-0-495-01758-5
- Mahibbur, R. M. y Govindarajulu, Z.** (1997). A modification of the test of Shapiro and Wilks for normality. *Journal of Applied Statistics*, 24(2), 219-235. doi: 10.1080/02664769723828

- Malsam, O., Kilian, M., Oerke, E. C. y Dehne, H. W.** (2002). Oils for increased efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control whiteflies. *Biocontrol Science and Technology*, 12(3), 337-348. doi: 10.1080/09583150220128121
- Masuh, H., De Licastró, S. A., Lopez, P. A., Vega, C. y Zerba, E.** (2003). Field evaluation of a smoke-generating formulation containing beta-cypermethrin against the dengue vector in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19(1), 53-57.
- Mattingly, P. F.** (1957). Genetical Aspects of the *Aedes aegypti* Problem. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 51(4), 392-408. doi: 10.1080/00034983.1957.11685829
- McBride, C. S., Baier, F., Omondi, A. B., Spitzer, S. A., Lutomiah, J., Sang, R., ... y Vosshall, L. B.** (2014). Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature*, 515(7526), 222-227. doi:10.1038/nature13964
- Mendki, M., Ganesan, K., Shri, P., Suryanarayana, M., Malhotra, R., Rao, K. y Vaidyanathaswamy, R.** (2000). Heneicosane: an oviposition-attractant pheromone of larval origin in *Aedes aegypti* mosquito. *Current Science*, 78(11), 1295-1296.
- Meyling, N. V. y Pell, J. K.** (2006). Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*, 31(2), 162-171. doi: 10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x
- Ministerio de Salud** (2017). *Boletín integrado de Vigilancia*. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la situación de Salud. N° 368, SE28, julio de 2017. Descargado de <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2017>
- Ministerio de Salud** (2018). *Boletín integrado de Vigilancia*. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la situación de Salud. N° 400, SE08, febrero de 2018. Descargado de <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2018>
- Mmbando, A. S., Okumu, F. O., Mgando, J. P., Sumaye, R. D., Matowo, N. S., Madumla, E., ... y Lwetoijera, D. W.** (2015). Effects of a new outdoor mosquito control device, the mosquito landing box, on densities and survival of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, inside controlled semi-field settings. *Malaria Journal*, 14:494. doi: 10.1186/s12936-015-1013-8
- Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Lwetoijera, D. W., Mpingwa, M. W., Simfukwe, E. T., Knols, B. G. J., ... y Russell, T. L.** (2010). Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malaria Journal*, 9:246. doi: 10.1186/1475-2875-9-246
- Mnyone, L. L., Lyimo, I. N., Lwetoijera, D. W., Mpingwa, M. W., Nchimbi, N., Hancock, P. A., ... y Koenraad, C. J.** (2012). Exploiting the behaviour of wild malaria vectors to achieve high infection with fungal biocontrol agents. *Malaria Journal*, 11:87. doi: 10.1186/1475-2875-11-87
- Moore, D. F.** (1979). Hybridization and Mating Behavior in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 16 (3), 223-226. doi: 10.1093/jmedent/16.3.223
- Moore, D., Bridge, P. D., Higgins, P. M., Bateman, R. P. y Prior, C.** (1993). Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology*, 122(3), 605-616. doi: 10.1111/j.1744-7348.1993.tb04061.x
- Nascimento, É., Da Silva, S. H., dos Reis Marques, E., Roberts, D. W. y Braga, G. U.** (2010). Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi

- Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. *Photochemistry and Photobiology*, 86(6), 1259-1266. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00793.x
- Nazni, W. A., Bandara, M. R. S. S., Azahari, A. H., Craig, R. W. y Lee, H. L.** (2016). Skip oviposition behavior of laboratory, field and transgenic strain of *Aedes aegypti* (L.). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 47(4), 680-690.
- Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N. O.** (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357-374. doi:10.3390/insects4030357
- Ousset, J. H., De Ustaran, J. K. y Lombardo, B.** (1967). Erradicación del *Aedes aegypti* en la República Argentina. *Segundas Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas*, 2, 81-88.
- Paixão, F. R. S., Muniz, E. R., Barreto, L. P., Bernardo, C. C., Mascarin, G. M., Luz, C. y Fernandes, É.K.** (2017). Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(3), 324-337. doi: 10.1080/09583157.2017.1281380
- Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO)** (2017 a). *Reported cases of Dengue Fever in the Americas by Country or Territory*. Update 27<sup>th</sup> October 2017, EW 41. Washington, D.C. Descargado de [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=3273&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=3273&lang=en)
- Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO)** (2017 b). *Number of Reported cases of Chikungunya Fever in the Americas by Country or Territory*. Update 22<sup>nd</sup> December 2017, EW 51. Washington, D.C. Descargado de [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=5927&item=chikungunya&type=statistics&Itemid=40931&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=5927&item=chikungunya&type=statistics&Itemid=40931&lang=en)
- Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO)** (2018 a). *Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas Cumulative cases, 2015-2018*. Update 4<sup>th</sup> January 2018. Washington, D.C. Descargado de [https://docs.google.com/viewer?url=https%3A%2F%2Fwww.paho.org%2Fhq%2Findex.php%3Foption%3Dcom\\_docman%26view%3Ddownload%26category\\_slug%3Dcasos-acumulados-xls-8935%26alias%3D43299-casos-acumulados-zika-4-enero-2018-299%26Itemid%3D270%26lang%3Den%26force\\_download%3D1](https://docs.google.com/viewer?url=https%3A%2F%2Fwww.paho.org%2Fhq%2Findex.php%3Foption%3Dcom_docman%26view%3Ddownload%26category_slug%3Dcasos-acumulados-xls-8935%26alias%3D43299-casos-acumulados-zika-4-enero-2018-299%26Itemid%3D270%26lang%3Den%26force_download%3D1)
- Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO)** (2018 b). *Epidemiological Update: Yellow Fever*. 12<sup>th</sup> January 2018. Washington, D.C. Descargado de [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=14043:12-january-2018-yellow-fever-epidemiological-update&Itemid=42346&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14043:12-january-2018-yellow-fever-epidemiological-update&Itemid=42346&lang=en)
- Pang, K., Kotek, R. y Tonelli, A.** (2006). Review of conventional and novel polymerization processes for polyesters. *Progress in Polymer Science*, 31(11), 1009-1037. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.08.008
- Paul, N. M.** (1997). Interactions between trophic levels. En Lumsden, P. J. (Ed.), *Plants and UV-B Responses to environmental Change*, (pp. 317-339). Cambridge University Press, Cambridge, UK. ISBN: 0521572223
- Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera, M. P. y Samuels, R. I.** (2008). Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*:

- prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*, 18(10), 1017-1025. doi: 10.1080/09583150802509199
- Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Pereira, C. R. y Samuels, R. I.** (2013). Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. *Parasites & Vectors*, 6:256. doi: 10.1186/1756-3305-6-256
- Paula, A. R., Silva, L. E., Ribeiro, A., Butt, T. M., Silva, C. P. y Samuels, R. I.** (2018). Improving the delivery and efficiency of fungus-impregnated cloths for control of adult *Aedes aegypti* using a synthetic attractive lure. *Parasites & Vectors*, 11:285. doi: 10.1186/s13071-018-2871-z
- Perich, M. J., Davila, G., Turner, A., Garcia, A. y Nelson, M.** (2000). Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *Journal of Medical Entomology*, 37(4): 541-546. doi: 10.1603/0022-2585-37.4.541
- Piazena, H., Perez-Rodriguez, E., Häder, D. P. y Lopez-Figueroa, F.** (2002). Penetration of solar radiation into the water column of the central subtropical Atlantic Ocean—optical properties and possible biological consequences. *Deep Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 49(17), 3513-3528. doi: 10.1016/S0967-0645(02)00093-0
- Powell, J. R. y Tabachnick, W. J.** (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*: A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(Suppl. I), 11-17. doi: 10.1590/0074-0276130395
- Quaite, F. E., Sutherland, B. M. y Sutherland, J. C.** (1992). Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature*, 358(6387), 576-578. doi: 10.1038/358576a0
- R Core Team** (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Descargado de <https://www.R-project.org/>.
- Rangel, D. E., Braga, G. U., Flint, S. D., Anderson, A. J. y Roberts, D. W.** (2004). Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(2-3), 77-83. doi: 10.1016/j.jip.2004.06.007
- Ranson, H. y Lissenden, N.** (2016). Insecticide resistance in african *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends in Parasitology*, 32(3), 187-196. doi: 10.1016/j.pt.2015.11.010 1
- Reinert, J. F., Harbach, R. E. y Kitching, I. J.** (2009). Phylogeny and classification of tribe Aedini (Diptera: Culicidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157(4), 700–794. doi: 10.1111/j.1096-642.2009.00570.x
- Reiter, P.** (2007). Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), 261-273. doi: 10.1089/vbz.2006.0630
- Rocha, L. F., Inglis, P. W., Humber, R. A., Kipnis, A. y Luz, C.** (2013). Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. *Journal of Basic Microbiology*, 53(3), 251-259. doi: 10.1002/jobm.201100482
- Rohani, A., Wong, Y. C., Zamre, I., Lee, H. L. y Zurainee, M. N.** (2009). The effect of extrinsic incubation temperature on development of dengue serotype 2 and 4 viruses in *Aedes aegypti* (L.). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(5), 942. PMID: 19842378
- Sarwar, M.** (2015 a). Reducing dengue fever through biological control of disease carrier *Aedes* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *International Journal of Preventive Medicine Research*, 1(3), 161-166.

- Sarwar, M.** (2015 b). Control of dengue carrier *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) larvae by larvivorous fishes and putting it into practice within water bodies. *International Journal of Preventive Medicine Research*, 1(4), 232-237.
- Schapovaloff, M. H.** (2012). Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- Scholte, E. J., Takken, W. y Knols, B. G. J.** (2003 a). Pathogenicity of five east African entomopathogenic fungi against adult *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)*, 14, 25-29.
- Scholte, E. J., Njiru, B. N., Smallegange, R. C., Takken, W. y Knols, B. G.** (2003 b). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* ss) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*, 2:29. doi: 10.1186/1475-2875-2-29
- Scholte, E. J., Knols, B. G., Samson, R. A. y Takken, W.** (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*, 4(1):19. doi: 10.1093/jis/4.1.19
- Scholte, E. J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., ... y Knols, B. G.** (2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308(5728), 1641-1642. doi: 10.1126/science.1108639
- Scholte, E. J., Takken, W. y Knols, B. G.** (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102(3), 151-158. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.04.011
- Schuch, A. P., da Silva Galhardo, R., de Lima-Bessa, K. M., Schuch, N. J. y Menck, C. F. M.** (2009). Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(1), 111-120. doi: 10.1039/B810085C
- Shah, P. A. y Pell, J. K.** (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 413-423. doi: 10.1007/s00253-003-1240-8
- Sibao, W., Xuexia, M., Weiguo, Z., Huang, B., Meizhen, F., Zengzhi, L. I. y Huang, Y.** (2005). Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research*, 109(12), 1364-1372. doi: 10.1017/S0953756205003709
- Šidák, Z.** (1967). Rectangular confidence region for the means of multivariate normal distributions. *Journal of the American Statistical Association*, 62, 626-633. doi: 10.1080/01621459.1967.10482935
- Silva, L. E. I., Paula, A. R., Ribeiro, A., Butt, T. M., Silva, C. P. y Samuels, R. I.** (2018). A new method of deploying entomopathogenic fungi to control adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Applied Entomology*, 142(1-2), 59-66. doi: 10.1111/jen.12402
- Smith, L. B., Kasai, S., y Scott, J. G.** (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 1-12. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.03.005
- Snetselaar, J., Andriessen, R., Suer, R. A., Osinga, A. J., Knols, B. G. y Farenhorst, M.** (2014). Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 7:200. doi: 10.1186/1756-3305-7-200

- Sousa, N. A., Lobo, L. S., Rodríguez, J. y Luz, C.** (2013). New insights in the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulation and application against *Aedes aegypti* eggs. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 193-199. doi: 10.1111/lam.12097
- Stein M., Rossi, G. C. y Almirón, W. R.** (2016). Distribución geográfica de Culicidae de Argentina. En Berón, C. M., Campos, R. E., Gleiser, R. M., Díaz-Nieto, L. M., Salomón, O. D. y Schweigmann, N. (Eds.), *Investigaciones sobre Mosquitos de Argentina*. (Capítulo 4, pp. 46-56). Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina. ISBN 978-987-544-721-9
- Stevens, R.** (1974). Stains, Reagents, Media. En Stevens, R. (Ed.), *Mycology Guidebook*, (p. 651). University of Washington Press, Seattle, USA. ISBN 0-295-95313-6
- Strasser H., Vey, A. y Butt, T. M.** (2000). Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolite of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 717-735. doi: 10.1080/09583150020011690
- Strode, C., Donegan, S., Garner, P., Enayati, A. A. y Hemingway, J.** (2014). The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine*, 11(3):e1001619. doi:10.1371/journal.pmed.1001619
- Talaci-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M. y Mozaffari, J.** (2006). Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5), 525-534. doi: 10.1080/09583150500532758
- Taylor, B. y Jones, M. D. R.** (1969). The circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes aegypti* (L.): the phase-setting effects of light-on and light-off. *Journal of Experimental Biology*, 51(1), 59-70.
- Tejerina, E. F., Tarataglini, L. C., De Lima, E. A. y Rodríguez, Y. M.** (2016). Acción comunitaria. En Berón, C. M., Campos, R. E., Gleiser, R. M., Díaz-Nieto, L. M., Salomón, O. D. y Schweigmann, N. (Eds.), *Investigaciones sobre Mosquitos de Argentina*. (Capítulo 28, pp. 349-358). Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina. ISBN 978-987-544-721-9
- Thomas, D. D., Donnelly, C. A., Wood, R. J. y Alphey, L. S.** (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287(5462), 2474-2476. doi: 10.1126/science.287.5462.2474
- Thomas, S. R. y Elkinton, J. S.** (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(3), 146-151. doi: 10.1016/j.jip.2004.01.006
- Thompson, S. R. y Brandenburg, R. L.** (2005). Tunneling responses of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Environmental entomology*, 34(1), 140-147. doi: 10.1603/0046-225X-34.1.140
- Throne, J. E., Weaver, D. K., Chew, V. y Backer J. E.** (1995). Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economic Entomology*, 88(5), 1510-1512. doi: 10.1093/jee/88.5.1510
- Tjaden, N. B., Thomas, S. M., Fischer, D. y Beierkuhnlein C.** (2013). Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6):e2207. doi: 10.1371/journal.pntd.0002207

- Toledo, A. V., De Remes Lenicov, A. M. M. y López Lastra, C. C.** (2008). Espectro de hospedadores hallado en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) en Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 43(3-4), 211-220.
- Trpis, M., McClelland, G. A. H., Gillett, J. D., Teesdale, C. y Rao, T. R.** (1973). Diel periodicity in the landing of *Aedes aegypti* on man. *Bulletin of the World Health Organization*, 48(5), 623-629. PMID: 4544150
- Valero-Jiménez, C. A., Debets, A. J., van Kan, J. A., Schoustra, S. E., Takken, W., Zwaan, B. J. y Koenraadt, C. J.** (2014). Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria Journal*, 13:479. doi: 10.1186/1475-2875-13-479
- Valero-Jiménez, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J. y van Kan, J. A.** (2016 a). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 41-49. doi: 10.1016/j.jip.2015.11.011
- Valero-Jiménez, C. A., Faino, L., Spring, D., Smit, S., Zwaan, B. J. y van Kan, J. A.** (2016 b). Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: uncovering signatures of virulence against mosquitoes. *BMC Genomics*, 17:986. doi: 10.1186/s12864-016-3339-1
- Van den Hurk, A. F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A. T., Frentiu, F. D., McElroy, K., Day, A., ... y O'Neill, S. L.** (2012). Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11):e1892. doi: 10.1371/journal.pntd.0001892
- Veen K. H.** (1968). Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin (Tesis Doctoral). Mededelingen Landbouwhogeschool, l'Universite Agronomique, Wageningen, Nederland.
- Vezzani, D., Velázquez, S. M. y Schweigmann, N.** (2004). Seasonal pattern of abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires city, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(4), 351-356. doi: 10.1590/S0074-02762004000400002
- Vilcinskas, A. y Götz, P.** (1999). Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology*, 43, 267-313. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60244-4
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A. y Ranson, H.** (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 126-131. doi: 10.1016/j.pestbp.2012.05.008
- Wanchoo, A., Lewis, M. W. y Keyhani, N. O.** (2009). Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in *in vitro* and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155(9), 3121-3133. doi: 10.1099/mic.0.029157-0
- Wang, Y. H., Chang, M. M., Wang, X. L., Zheng, A. H. y Zou, Z.** (2017). The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 12-21. doi: 10.1016/j.dci.2017.12.001
- Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., Fonseca, D. M., Schultz, T. R., Price, D. C. y Strickman, D. A.** (2015). Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. *PLoS one*, 10(7):e0133602. doi: 10.1371/journal.pone.0133602

- Winston, P. W. y Bates, D. H.** (1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, 41(1), 232-237. doi.org/10.2307/1931961
- Wojda, I.** (2017) Temperature stress and insect immunity. *Journal of Thermal Biology*, 68(Part A), 96-103. doi: 10.1016/j.jtherbio.2016.12.002
- Wong, J., Stoddard, S., Astete, H., Morrison, A. y Scott, T.** (2011 a). Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4):e1015. doi: 10.1371/journal.pntd.0001015
- Wong, J., Astete, H., Morrison, A. C. y Scott, T. W.** (2011 b). Sampling considerations for designing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition studies in Iquitos, Peru: substrate preference, diurnal periodicity, and gonotrophic cycle length. *Journal of Medical Entomology*, 48(1), 45-52. doi: 10.1603/ME10149
- World Health Organization (WHO)** (2004). Global Strategic Framework for Integrated Vector Management. Descargado de [http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO\\_CDS\\_CPE\\_PVC\\_2004\\_10.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_PVC_2004_10.pdf)
- World Health Organization (WHO)** (2017). Dengue vaccine: WHO position paper, July 2016-recommendations. *Vaccine*, 35(9), 1200-1201. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.10.070
- Zaim, M. y Guillet, P.** (2002). Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology*, 18(4), 161-163. doi: 10.1016/S1471-4922(01)02220-6
- Zermoglio, P. F., Robuchon, E., Leonardi, M. S., Chandre, F. y Lazzari, C. R.** (2017). What does heat tell a mosquito? Characterization of the orientation behaviour of *Aedes aegypti* towards heat sources. *Journal of Insect Physiology*, 100, 9-14. doi: 10.1016/j.jinsphys.2017.04.010
- Zimmermann, G.** (1982). Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(1), 36-40. doi: 10.1016/0022-2011(82)90034-9
- Zimmermann, G.** (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pest Management Science*, 37(4), 375-379. doi: 10.1002/ps.2780370410



**Anexo**

## 1- Comparaciones post-hoc realizadas luego de evaluar la supervivencia (Log-Rank) y la mortalidad por infección fúngica confirmada (análisis de proporciones), con resultados significativos ( $P < 0,05$ ) (Capítulo II)

### 1.1 Corrección de Dunn-Šidak (Šidak, 1967)

$$\alpha_i = 1 - (1 - \alpha_g)^{(1/m)} \quad (2)$$

donde  $\alpha_i$  es la significancia individual por comparación realizada;  $\alpha_g$  es el nivel de significancia global y es de 0,05 en todos los análisis; m es el número de comparaciones a realizar tomando de a pares entre todos los tratamientos.

### 1.2 Efecto de la concentración del inóculo en la supervivencia, para cada aislamiento fúngico

Tratamientos a comparar: control,  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $10^8$  conidios/ml.

$$m = \binom{5}{2} = 10, \alpha_i = 0,0051$$

**Tabla A1**

Aislamiento fúngico (Log-Rank, $\alpha_g = 0,05$ )	Par de tratamientos a comparar	Log-Rank		
		$X^2_{g.l.:1}$	P	Significativo (S) o no significativo (NS) ( $\alpha_i = 0,0051$ )
CEP 085 ( $X^2_{g.l.:4} = 35,9$ ; $P = 3 \times 10^{-7}$ )	Control- $5 \times 10^6$ (conidios/ml)	1,7	0,1860	NS
	Control- $10^7$ (conidios/ml)	16,9	0,0000	S
	Control- $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	17,6	0,0000	S
	Control- $10^8$ (conidios/ml)	16,8	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	12,9	0,0003	S
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	12,2	0,0005	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	11,3	0,0008	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	0,1	0,7480	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0,2	0,6600	NS
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0	0,8520	NS
CEP 087 ( $X^2_{g.l.:4} = 54,6$ ; $P = 3,9 \times 10^{-11}$ )	Control- $5 \times 10^6$ (conidios/ml)	8,8	0,0030	S
	Control- $10^7$ (conidios/ml)	15,4	0,0001	S
	Control- $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	37,1	0,0000	S
	Control- $10^8$ (conidios/ml)	49,1	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	1,7	0,1930	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	13,7	0,0002	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	20,1	0,0000	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	3,4	0,0664	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	6,2	0,0125	NS
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0,2	0,6280	NS

CEP 120 ( $X^2_{g.l.:4} = 30,9$ ; $P = 3,25 \times 10^{-6}$ )	Control- $5 \times 10^6$ (conidios/ml)	6,4	0,0116	NS
	Control- $10^7$ (conidios/ml)	9,7	0,0018	S
	Control- $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	23,7	0,0000	S
	Control- $10^8$ (conidios/ml)	22,8	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	0,6	0,4440	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	7,6	0,0058	NS
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	7,0	0,0082	NS
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	2,8	0,0946	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	1,8	0,1800	NS
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0,3	0,5680	NS
CEP 350 ( $X^2_{g.l.:4} = 56,1$ ; $P = 1,9 \times 10^{-11}$ )	Control- $5 \times 10^6$ (conidios/ml)	4,5	0,0344	NS
	Control- $10^7$ (conidios/ml)	14,0	0,0002	S
	Control- $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	26,0	0,0000	S
	Control- $10^8$ (conidios/ml)	24,6	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	3,5	0,0630	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	17,9	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	25,9	0,0000	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	6,3	0,0118	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	12,6	0,0004	S
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	1,2	0,2740	NS
CEP 404 ( $X^2_{g.l.:4} = 54$ ; $P = 5,3 \times 10^{-11}$ )	Control- $5 \times 10^6$ (conidios/ml)	5,0	0,0255	NS
	Control- $10^7$ (conidios/ml)	4,4	0,0368	NS
	Control- $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	22,1	0,0000	S
	Control- $10^8$ (conidios/ml)	19,3	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	0	0,9020	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	18,6	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	29,5	0,0000	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	13,5	0,0002	S
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	18,5	0,0000	S
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0,4	0,5180	NS
CEP 423 ( $X^2_{g.l.:4} = 56,1$ ; $P = 1,9 \times 10^{-11}$ )	Control- $5 \times 10^6$ (conidios/ml)	16,7	0,0000	S
	Control- $10^7$ (conidios/ml)	23,2	0,0000	S
	Control- $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	38,5	0,0000	S
	Control- $10^8$ (conidios/ml)	37,6	0,0000	S
	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	1,2	0,2720	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	10,2	0,0014	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	10,4	0,0013	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	5,7	0,0173	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	5,9	0,0151	NS
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0	0,9660	NS

### 1.3 Efecto de la cepa fúngica en la supervivencia, para cada concentración (conidios/ml) utilizada

Tratamientos a comparar: CEP 085, CEP 087, CEP 120, CEP 350, CEP 404, CEP 423.

$$m = \binom{6}{2} = 15. \alpha_i = 0,0034$$

**Tabla A2**

Concentración (Log-Rank, $\alpha_g = 0,05$ )	Par de tratamientos a comparar	Log-Rank		
		$X^2_{g.l.:1}$	P	Significativo (S) o no significativo (NS) ( $\alpha_i = 0,0034$ )
$5 \times 10^7$ conidios/ml ( $X^2_{g.l.:5} = 15,6; P = 0,0082$ )	CEP 085-CEP 087	2,4	0,1240	NS
	CEP 085-CEP 120	0	0,8560	NS
	CEP 085-CEP 350	0,1	0,7040	NS
	CEP 085-CEP 404	4,5	0,0348	NS
	CEP 085-CEP 423	0	0,9420	NS
	CEP 087-CEP 120	1	0,3160	NS
	CEP 087-CEP 350	3,3	0,0681	NS
	CEP 087-CEP 404	15,8	0,0001	S
	CEP 087-CEP 423	2,2	0,1410	NS
	CEP 120-CEP 350	0,4	0,5210	NS
	CEP 120-CEP 404	5,3	0,0207	NS
	CEP 120-CEP 423	0,1	0,8130	NS
	CEP 350-CEP 404	4,8	0,0284	NS
	CEP 350-CEP 423	0,2	0,6960	NS
	CEP 404-CEP 423	6,0	0,0140	NS
$10^8$ conidios/ml ( $X^2_{g.l.:5} = 36,6; P = 7,3 \times 10^{-7}$ )	CEP 085-CEP 087	0,5	0,4590	NS
	CEP 085-CEP 120	1,1	0,3040	NS
	CEP 085-CEP 350	1,1	0,2950	NS
	CEP 085-CEP 404	12,8	0,0003	S
	CEP 085-CEP 423	0	0,8440	NS
	CEP 087-CEP 120	0	0,8790	NS
	CEP 087-CEP 350	8,2	0,0042	NS
	CEP 087-CEP 404	31,4	0,0000	S
	CEP 087-CEP 423	1,2	0,2720	NS
	CEP 120-CEP 350	5,4	0,0198	NS
	CEP 120-CEP 404	21,5	0,0000	S
	CEP 120-CEP 423	1,4	0,2370	NS
	CEP 350-CEP 404	9,2	0,0024	S
	CEP 350-CEP 423	1,5	0,2150	NS
	CEP 404-CEP 423	16,0	0,0001	S

### 1.4 Efecto de la concentración del inóculo en la mortalidad confirmada por infección fúngica, para cada cepa

Tratamientos a comparar:  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $10^8$  conidios/ml.

$$m = \binom{4}{2} = 6. \alpha_i = 0,0085$$

**Tabla A3**

Aislamiento fúngico (análisis de proporciones, $\alpha_g = 0,05$ )	Par de tratamientos a comparar	Análisis de proporciones		
		$X^2_{g.l.:1}$	P	Significativo (S) o no significativo (NS) ( $\alpha_i = 0,0085$ )
CEP 085 ( $X^2_{g.l.:3} = 16,37$ ; P = 0,00095)	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	1,2	0,2000	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	9,7	0,0018	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	9,7	0,0018	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	3,3	0,0700	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	3,3	0,0700	NS
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0	1	NS
CEP 087 ( $X^2_{g.l.:3} = 42,05$ ; P = $3 \times 10^{-9}$ )	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	0	1	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	9,6	0,0019	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	25,1	0,0000	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	11,3	0,0008	S
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	27,4	0,0000	S
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	4,0	0,0400	NS
CEP 120 ( $X^2_{g.l.:3} = 17,5$ ; P = 0,00056)	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	0,7	0,3980	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	11,3	0,0008	S
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	8,2	0,0042	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	5,4	0,0197	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	3,3	0,0700	NS
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0,1	0,7800	NS
CEP 350 ( $X^2_{g.l.:3} = 21$ ; P = 0,0001)	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	0,3	0,6000	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	5,8	0,0159	NS
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	7,3	0,0068	S
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	9,9	0,0017	S
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	11,7	0,0006	S
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0	1	NS
CEP 404 ( $X^2_{g.l.:3} = 10,9$ ; P = 0,012)	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	0,3	0,6000	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	0	1	NS
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	4,7	0,0300	NS
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	0,3	0,6000	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	8,4	0,0037	S
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	4,7	0,0300	NS
CEP 423 ( $X^2_{g.l.:3} = 9,5$ ; P = 0,02)	$5 \times 10^6$ - $10^7$ (conidios/ml)	1,1	0,2900	NS
	$5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	6,4	0,0112	NS
	$5 \times 10^6$ - $10^8$ (conidios/ml)	3,7	0,0550	NS
	$10^7$ - $5 \times 10^7$ (conidios/ml)	1,6	0,2100	NS
	$10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0,4	0,5510	NS
	$5 \times 10^7$ - $10^8$ (conidios/ml)	0,1	0,7290	NS

### 1.5 Efecto de la cepa fúngica en la mortalidad confirmada por infección fúngica, para cada concentración (conidios/ml) utilizada

Tratamientos a comparar: CEP 085, CEP 087, CEP 120, CEP 350, CEP 404, CEP 423.

$$m = \binom{6}{2} = 15, \alpha_i = 0,0034$$

**Tabla A4**

Aislamiento fúngico (análisis de proporciones, $\alpha_g = 0,05$ )	Par de tratamientos a comparar	Análisis de proporciones		
		$X^2_{g.l.: 1}$	P	Significativo (S) o no significativo (NS) ( $\alpha_i = 0,0034$ )
$5 \times 10^6$ conidios/ml ( $X^2_{g.l.: 5} = 12,96$ ; $P = 0,024$ )	CEP 085-CEP 087	0	1	NS
	CEP 085-CEP 120	0	1	NS
	CEP 085-CEP 350	2,6	0,1000	NS
	CEP 085-CEP 404	3,5	0,0610	NS
	CEP 085-CEP 423	4,5	0,0340	NS
	CEP 087-CEP 120	0	1	NS
	CEP 087-CEP 350	1,8	0,1800	NS
	CEP 087-CEP 404	2,5	0,1100	NS
	CEP 087-CEP 423	3,4	0,0650	NS
	CEP 120-CEP 350	2,6	0,1044	NS
	CEP 120-CEP 404	3,5	0,0600	NS
	CEP 120-CEP 423	4,5	0,0340	NS
	CEP 350-CEP 404	0	1	NS
	CEP 350-CEP 423	0,1	0,7960	NS
	CEP 404-CEP 423	0	1	NS
$10^7$ conidios/ml ( $X^2_{g.l.: 5} = 14,8$ ; $P = 0,011$ )	CEP 085-CEP 087	1,2	0,2670	NS
	CEP 085-CEP 120	0	1	NS
	CEP 085-CEP 350	0	1	NS
	CEP 085-CEP 404	0	1	NS
	CEP 085-CEP 423	4,3	0,0380	NS
	CEP 087-CEP 120	0,7	0,3980	NS
	CEP 087-CEP 350	0,7	0,3980	NS
	CEP 087-CEP 404	1,2	0,2670	NS
	CEP 087-CEP 423	11,3	0,0008	S
	CEP 120-CEP 350	0	1	NS
	CEP 120-CEP 404	0	1	NS
	CEP 120-CEP 423	5,4	0,0199	NS
	CEP 350-CEP 404	0	1	NS
	CEP 350-CEP 423	5,4	0,0199	NS
	CEP 404-CEP 423	4,3	0,0380	NS
$5 \times 10^7$ conidios/ml ( $X^2_{g.l.: 5} = 11,37$ ; $P = 0,04$ )	CEP 085-CEP 087	0	1	NS
	CEP 085-CEP 120	0	1	NS
	CEP 085-CEP 350	0,8	0,3800	NS
	CEP 085-CEP 404	1,1	0,2950	NS
	CEP 085-CEP 423	2,3	0,12700	NS
	CEP 087-CEP 120	0	1	NS
	CEP 087-CEP 350	0,4	0,5510	NS
	CEP 087-CEP 404	1,7	0,1900	NS
	CEP 087-CEP 423	1,6	0,2100	NS
	CEP 120-CEP 350	0,4	0,5510	NS
	CEP 120-CEP 404	1,7	0,1900	NS
	CEP 120-CEP 423	1,6	0,2100	NS
	CEP 350-CEP 404	4,7	0,0300	NS
	CEP 350-CEP 423	0,1	0,7300	NS
	CEP 404-CEP 423	7,7	0,0055	NS

### 1.6 Efecto del tiempo de exposición en la supervivencia, para cada sustrato inoculado (o control) con la cepa seleccionada (CEP 423)

Tratamientos a comparar: control 6 h de exposición, control 24 h de exposición, tela inoculada con CEP 423 6 h de exposición, tela inoculada con CEP 423 24 h de exposición.

$$m = 4, \alpha_i = 0,0127$$

**Tabla A5**

Sustrato (Log-Rank, $\alpha_g = 0,05$ )	Par de tratamientos a comparar	Log-Rank		
		$X^2_{g.l.:1}$	P	Significativo (S) o no significativo (NS) ( $\alpha_i = 0,0127$ )
Blanca Algodón-Poliéster ( $X^2_{g.l.:3} = 32,2$ ; $P = 4,7 \times 10^{-7}$ )	CEP 423 6h-CEP 423 24h	0,4	0,5110	NS
	Control 6h-CEP 423 6h	14,7	0,0001	S
	Control 24h-CEP 423 24h	16,3	0,0001	S
	Control 6h- Control 24h	0,1	0,7760	NS
Roja Poliéster ( $X^2_{g.l.:3} = 24,1$ ; $P = 2,4 \times 10^{-5}$ )	CEP 423 6h-CEP 423 24h	9,9	0,0017	S
	Control 6h-CEP 423 6h	0	0,9350	NS
	Control 24h-CEP 423 24h	19,3	0,0000	S
	Control 6h- Control 24h	1,9	0,1660	NS
Negra Poliéster ( $X^2_{g.l.:3} = 9,75$ ; $P = 0,021$ )	CEP 423 6h-CEP 423 24h	1,3	0,2610	NS
	Control 6h-CEP 423 6h	8,2	0,0041	S
	Control 24h-CEP 423 24h	0,5	0,4600	NS
	Control 6h- Control 24h	1,3	0,2460	NS

### 1.7 Efecto del tipo de sustrato inoculado (o control) en la supervivencia, para cada tiempo de exposición

Tratamientos a comparar: tela blanca inoculada con CEP 423, tela roja inoculada con CEP 423, tela negra inoculada con CEP 423

$$m = \binom{3}{2} = 3, \alpha_i = 0,017$$

**Tabla A6**

Tiempo de exposición (Log-Rank, $\alpha_g = 0,05$ )	Par de tratamientos a comparar	Log-Rank		
		$X^2_{g.l.:1}$	P	Significativo (S) o no significativo (NS) $\alpha_i = 0,017$
6 h ( $X^2_{g.l.:2} = 9,98$ ; $P = 0,007$ )	Blanca CEP 423-negra CEP 423	0,2	0,200	NS
	Blanca CEP 423-roja CEP 423	9,9	0,002	S
	Negra CEP 423-roja CEP 423	6,3	0,012	S

### 1.8 Efecto del tipo de sustrato inoculado con CEP 423 en la mortalidad confirmada por infección fúngica, para cada tiempo de exposición

Tratamientos a comparar: tela blanca inoculada con CEP 423, tela roja inoculada con CEP 423, tela negra inoculada con CEP 423.

$$m = \binom{3}{2} = 3, \alpha_i = 0,017$$

**Tabla A7**

Tiempo de exposición (Análisis de proporciones, $\alpha_g = 0,05$ )	Par de tratamientos a comparar	Análisis de proporciones		
		$X^2_{g.l.: 1}$	P	Significativo (S) o no significativo (NS) ( $\alpha_i = 0,017$ )
6 h ( $X^2_{g.l.: 2} = 24,13$ ; P = $5,8 \times 10^{-6}$ )	Blanca CEP 423-negra CEP 423	11,4	0,001	S
	Blanca CEP 423-roja CEP 423	15,6	0,000	S
	Negra CEP 423-roja CEP 423	0,1	0,710	NS
24 h ( $X^2_{g.l.: 2} = 8,9$ ; P = 0,0117)	Blanca CEP 423-negra CEP 423	4,1	0,042	NS
	Blanca CEP 423-roja CEP 423	0,2	0,650	NS
	Negra CEP 423-roja CEP 423	7,2	0,007	S

## 2- Valores de ponderación por longitud de onda según la función biológica de ponderación espectral desarrollada por Quaite *et al.* (1992). (Capítulo III)

Tabla A8

Longitud de onda (nm)	Factor de ponderación	Longitud de onda (nm)	Factor de ponderación
290	3,6245	346	0,007764
291	3,1748	347	0,00707
292	2,7834	348	0,006442
293	2,4424	349	0,005872
294	2,1451	350	0,005356
295	1,8857	351	0,004887
296	1,6591	352	0,004462
297	1,4609	353	0,004076
298	1,2876	354	0,003725
299	1,1359	355	0,003406
300	1,0027	356	0,003116
301	0,8859	357	0,002853
302	0,78337	358	0,002612
303	0,69328	359	0,002394
304	0,61404	360	0,002194
305	0,54429	361	0,002012
306	0,48284	362	0,001846
307	0,42867	363	0,001695
308	0,38087	364	0,001557
309	0,33865	365	0,001431
310	0,30135	366	0,001315
311	0,26835	367	0,001209
312	0,23915	368	0,001113
313	0,21328	369	0,001024
314	0,19035	370	0,000944
315	0,17	371	0,000869
316	0,15194	372	0,000801
317	0,1359	373	0,000739
318	0,12163	374	0,000682
319	0,10894	375	0,000629
321	0,097636	376	0,000581
321	0,087567	377	0,000537
322	0,07859	378	0,00049
323	0,07058	379	0,000459
324	0,063429	380	0,000424
325	0,057039	381	0,000393
326	0,051327	382	0,000363
327	0,046217	383	0,000336
328	0,041642	384	0,000312
329	0,037544	385	0,000289
331	0,03387	386	0,000268
332	0,030575	387	0,000248
333	0,027617	389	0,000231
334	0,024961	389	0,000214
335	0,022574	390	0,000199
336	0,020427	391	0,000185
337	0,018496	393	0,000172
338	0,016757	393	0,000159
339	0,011519	394	0,000148
340	0,013778	395	0,000138
341	0,012505	397	0,000128
342	0,011355	398	0,00012
343	0,010317	398	0,000111
344	0,009379	399	0,000104
345	0,008531	400	9,02E-05

### 3- Medios de cultivo utilizados

Sabouraud Dextrosa Agar suplementado con extracto de levadura (SDAY) (Goettel e Inglis, 1997). Se utilizó una variante de este medio con los componentes nutricionales reducidos al 25% de su cantidad original (SDAY<sub>1/4</sub>).

Peptona 2,5 gr

Dextrosa 4 gr

Extracto de levadura 2,5 gr

Agar 10 gr

Agua destilada 1000 ml

Se suplementó en los casos indicados con:

Cloranfenicol 0,5g

Papa Dextrosa Agar (PDA)

Mezcla comercial PDA (Difco<sup>TM</sup>, Becton Dickinson & Company, France) 39g

Agar 1g

Agua destilada 1000 ml

Se suplementó en los casos indicados (PDAY+clor+ben) con:

Extracto de levadura 1g

Cloranfenicol 0,5g

Benomyl (50% de ingrediente activo) (0,1% p/v, diluido en agua destilada) 20ml

Medio selectivo para aislar hongos entomopatógenos (Doberski y Tribe, 1980)

Dextrosa 40g

Peptona 10g

Agar 15g

Cloranfenicol 0,5g

Cristal violeta 0,01g

Agua destilada 1000 ml

Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio) 0,25g; se agrega luego de la esterilización cuando el medio de cultivo esté tibio.

Agar-agua (Cámaras húmedas) (Leles *et al.*, 2013)

Agar 10g

Cristal violeta 0,01g

Cloranfenicol 0,5g

Tiabendazol 0,004g

Agua destilada 1000 ml

pH 5,5

#### **4- Colorante utilizado en microscopía para observar estructuras fúngicas**

Azul de algodón en Lactofenol de Ammann (Stevens, 1974)

Fenol (cristales) 20g

Ácido láctico 20g (16 ml)

Glicerol 40g (31 ml)

Azul de algodón 0,05-1g

Agua destilada 20 ml