

Efecto de la combinación de *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium virens* sobre la oviposición, eclosión y emergencia de *Aedes aegypti*

José Luis Torres-Estrada, D en C,⁽¹⁾ Mercedes Nathalie Mendoza-Ledesma, M en C,⁽¹⁾ Olga Ruth Gálvez-Coutiño, QFB.⁽¹⁾

Torres-Estrada JL, Mendoza-Ledesma MN, Gálvez-Coutiño OR.

Efecto de la combinación de *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium virens* sobre la oviposición, eclosión y emergencia de *Aedes aegypti*. *Salud Publica Mex.* 2020;62:410-416.

<https://doi.org/10.21149/11035>

Resumen

Objetivo. Evaluar el efecto de la combinación de *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium virens*, ambos con Aqua Reslin Super, sobre oviposición, eclosión y emergencia de *Aedes aegypti*. **Material y métodos.** Se realizaron evaluaciones para determinar el efecto de los tratamientos impregnados en papel filtro y expuestos dentro de recipientes de plástico sobre la oviposición, eclosión y emergencia de *Aedes aegypti*. **Resultados.** Los resultados indicaron que las combinaciones hongo e insecticida no afectaron el comportamiento de oviposición, pero sí la eclosión de los huevos y la emergencia del adulto. **Conclusión.** Con los resultados se puede concluir que la combinación de hongos + insecticida puede ser una buena opción para aplicarse en sitios de oviposición con miras al desarrollo de una ovitrampa letal.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*; *Gliocladium virens*; *Aedes aegypti*; ovitrampa; insecticida; dengue

Torres-Estrada JL, Mendoza-Ledesma MN, Gálvez-Coutiño OR.

Effect of the combination of *Metarhizium anisopliae* and *Gliocladium virens* on the oviposition, hatching and emergency of *Aedes aegypti*. *Salud Publica Mex.* 2020;62:410-416.

<https://doi.org/10.21149/11035>

Abstract

Objective. To evaluate the effect of the combination of *Metarhizium anisopliae* and *Gliocladium virens*, both with Aqua Reslin Super, on the oviposition, hatching and emergence of *Aedes aegypti*. **Materials and methods.** Evaluations were carried out to determine the effect of treatments impregnated on filter paper and exposed within plastic containers on the oviposition, hatching and emergency of *Aedes aegypti*. **Results.** The results indicated that the fungus and insecticide combinations did not affect the oviposition behavior, but if the hatching of the eggs and the adult's emergency. **Conclusion.** With the results it can be concluded that the combination of fungi + insecticide can be a good option to be applied in oviposition sites with a view to the development of a lethal ovitrap.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; *Gliocladium virens*; *Aedes aegypti*; ovitrap; insecticide; dengue

(1) Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública. Tapachula, Chiapas.

Fecha de recibido: 25 de julio de 2019 • Fecha de aceptado: 13 de septiembre de 2019

Autor de correspondencia: Dr. José Luis Torres Estrada. Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública. 4ta. Avenida Norte y 19 calle Poniente, col. Centro. Tapachula, Chiapas, México.
Correo electrónico: jltorres@insp.mx

Dengue, chikungunya y Zika son enfermedades transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti* y representan un problema de salud pública en México.¹ A la fecha no existe vacuna ni tratamiento efectivo para estas enfermedades, por lo que el único modo de reducir las tasas de infección es a través del control del mosquito vector. El control convencional de *Ae. aegypti* involucra la eliminación de criaderos y la aplicación de insecticidas.¹ En México, como en otras partes del mundo, uno de los principales problemas asociados con el control químico es el desarrollo de resistencia a insecticidas,² por lo que es necesario implementar nuevas estrategias de control. En este sentido, una manera de optimizar el uso de insecticidas es combinándolos, a dosis subletales, con otros agentes de control; los hongos entomopatógenos pueden ser una opción.³

Algunos estudios han confirmado el potencial de los hongos entomopatógenos de manera individual sobre mosquitos vectores.^{3,4} Asimismo, se ha reconocido que los hongos entomopatógenos pueden infectar distintas fases del ciclo de vida de *Ae. aegypti*^{5,6} y que también es posible combinar hongos entomopatógenos con insecticidas a dosis subletales, con lo que se obtiene un mayor efecto en la mortalidad de mosquitos vectores.⁷ La elección del método de liberación de hongos es un determinante importante en la efectividad del control de vectores que debe solucionarse antes de avanzar hacia la investigación en campo.⁸ Algunos métodos han sido explorados para la posible diseminación de los hongos entomopatógenos, como la liberación de machos infectados,⁹ el uso de ollas de barro impregnadas,⁸ telas de algodón impregnadas^{10,11} y el uso de ovitrampas.¹² Esta última estrategia puede favorecer el desarrollo del hongo entomopatógeno, por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el efecto de la combinación de *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium virens*, ambos con Aqua Reslin Super, sobre distintas fases del ciclo de vida de *Ae. aegypti*, con miras al desarrollo de una ovitrampa letal.

Material y métodos

Sitio y fecha del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología de Patógenos y Vectores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP), del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), ubicado en Tapachula, Chiapas, México. Los experimentos se realizaron en septiembre de 2019.

Hongos entomopatógenos

El hongo *Metarhizium anisopliae* (cepa 33) fue donado al laboratorio de Biología de Patógenos y Vectores del CRISP por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional de Irapuato, Guanajuato, México, en 2007, y mantenido en viales con aceite mineral a -20° C. El hongo *Gliocladium virens* fue aislado y obtenido de criaderos de *Anopheles albimanus* del Sur de Chiapas, México.³

Cultivo de hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos fueron cultivados en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA Bioxon, Becton Dickinson, México). La reactivación del hongo se realizó inoculando mosquitos *Ae. aegypti* previamente desinfectados en hipoclorito de sodio al 0.5% y colocándolo en una placa con SDA para promover la esporulación del hongo sobre el insecto, a partir del cual se cultivó en placas con SDA por 21 días. Las conidias fueron cosechadas directamente del medio sólido y suspendidas en Tween 80 al 0.01%. La concentración de conidias se determinó usando una cámara de Neubauer. Se prepararon suspensiones con concentraciones finales de 1×10^8 conidas/mL y se utilizaron sólo aquellas con $\geq 90\%$ de germinación.

Insecticida

Se utilizó el insecticida comercial Aqua Reslin Super (Bayer CropScience AG) a la concentración de 0.001%. La concentración se determinó a partir de ensayos de respuesta. Este insecticida se encuentra en la lista de productos del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (Cenaprece).

Sustratos

Se utilizó papel filtro Whatman (poro medio) como sustrato de oviposición, con dimensiones de 5 cm de ancho por 21 cm de largo.

Mosquitos

Se utilizaron hembras *Ae. aegypti* susceptibles (cepa New Orleans) obtenidas de una colonia establecida en el insectario del CRISP de cuatro días de edad, copuladas y con 72 h post-alimentación sanguínea. Los mosquitos fueron mantenidos a $27 \pm 2^\circ \text{C}$, $80 \pm 10\%$ de HR y un fotoperiodo 12:12 L: O.

Tratamientos

Se evaluaron cuatro tratamientos: 1) hongo entomopatógeno, 2) insecticida Aqua Reslin Super (ARS), 3) combinación hongo + insecticida y 4) control; los tratamientos se colocaron por separado en recipientes de plástico transparente con capacidad de 262 mL. En los tratamientos que contenían hongo se agregaron 100 mL de la suspensión del hongo entomopatógeno, mientras que a los tratamientos sin hongo (insecticida y control) se añadieron 100 mL de agua estéril. Se colocó el sustrato impregnado con 3 mL de agua en el caso de los tratamientos sin insecticida (control y hongo solo) y con 3 mL de la solución de Aqua Reslin Super para los tratamientos que llevaban insecticida (insecticida solo y la combinación hongo + insecticida).

Bioensayos

Oviposición, eclosión y emergencia

Se colocaron 15 hembras grávidas en cámaras conductuales (50 x 50 x 50 cm) que contenían cada tratamiento por separado. Las hembras se dejaron durante 24 h para determinar el efecto de los tratamientos sobre la oviposición. Posteriormente, se retiraron las hembras a compartimientos de reposo. Se realizó el conteo de huevos y se dejaron 25 de ellos por tratamiento. Finalmente, se monitoreó la eclosión y la emergencia para cada tratamiento.

Efecto de las combinaciones sobre la viabilidad de los hongos

Se realizaron monitoreos en los tratamientos hongo + insecticida a los 4, 8 y 12 días para determinar la viabilidad de las conidias. Se tomó una muestra de la suspensión de conidias y se prepararon diluciones en serie a partir de las cuales se cultivaron en placas con medio sólido SDA. Las placas se incubaron por 14 h y posteriormente se contaron las conidias germinadas y no germinadas para determinar el porcentaje de germinación. Una conidia se consideró germinada cuando el tubo germinativo tenía una longitud doble del tamaño de la misma. El porcentaje de germinación se calculó con la siguiente fórmula:

Porcentaje de germinación = (Conidias germinadas / total de conidias) X 100

Se realizaron tres repeticiones para cada experimento.

Análisis estadístico

A los resultados obtenidos de los efectos producidos por las combinaciones hongo + insecticida sobre la oviposición, eclosión de los huevos y emergencia del adulto de *Aedes aegypti* se les realizó un análisis de varianza seguido de una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron en el programa SAS para Windows versión 9.00 (SAS, Institute Inc., Cary NC, USA V.9 para Windows 2002).

Consideraciones éticas

El presente estudio fue revisado y aprobado por las comisiones de Ética, Investigación y Bioseguridad del INSP. El presente estudio forma parte del proyecto *Ovitrapas letales con sustratos impregnados de hongos entomopatógenos e insecticidas para la vigilancia entomológica y control de Aedes aegypti, vector de Dengue y Chikungunya en México*, con el código del proyecto: 858-7158. FONDO: FOSISS-2015-1-262172.

Resultados

Efecto de *M. anisopliae* + Aqua Reslin Super en la oviposición, eclosión y emergencia de *Ae. Aegypti*

La oviposición no se vio afectada en los tratamientos con el hongo *M. anisopliae* y la combinación *M. anisopliae* + ARS, pero sí con el insecticida ARS al compararlas con el control ($F=37.06$; $gl=3$; $P=0.0001$). La eclosión y la emergencia sí fueron afectadas por el hongo *M. anisopliae*; se observó baja eclosión en el tratamiento *M. anisopliae* (13.32%) y la combinación *M. anisopliae* + ARS (13.32%), lo que muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control ($F=387.67$; $gl=3$; $P=0.0001$), mientras que la emergencia se mantuvo en 13.32% con el hongo solo y en la combinación hongo + insecticida se redujo a 8% ($F=332$; $gl=3$; $P=0.0001$) (figura 1).

Efecto de *G. virens* + Aqua Reslin Super en la oviposición, eclosión y emergencia de *Ae. aegypti*

Al igual que con el hongo *M. anisopliae*, el hongo *G. virens* no afectó la oviposición cuando se comparó con el control, por lo que se obtuvieron resultados similares con la combinación *G. virens* + ARS; sin embargo, la

oviposición en el tratamiento con el insecticida ARS sí se vio afectada ($F=79.24$; $gl=3$; $P=0.0001$). La eclosión en el tratamiento de *G. virens* (94.68%) no se vio afectada al no encontrarse diferencias con el control (90.68%), mientras que en la combinación *G. virens* + ARS la eclosión disminuyó a 29.32% ($F=113.44$; $gl=3$; $P=0.0001$). La emergencia fue la más afectada ya que tanto en el hongo como en la combinación hongo + insecticida fue nula ($F=1032.23$; $gl=3$; $P=0.0001$) (figura 2).

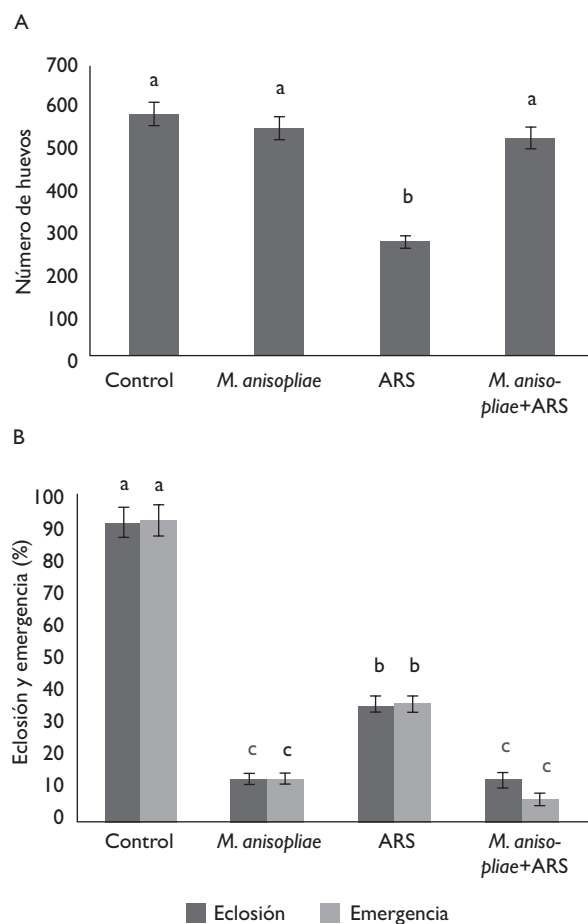


FIGURA 1. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE METARHIZIUM ANISOPLIAE Y AQUA RESLIN SUPER EN LOS ESTUDIOS REALIZADOS DURANTE SEPTIEMBRE DE 2019 EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PATÓGENOS Y VECTORES DEL CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA, UBICADO EN TAPACHULA, CHIAPAS, MÉXICO, SOBRE A). OVIPOSICIÓN Y B). ECLOSIÓN Y EMERGENCIA DE Aedes Aegypti EN CONDICIONES DE LABORATORIO. LETRAS IGUALES INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE NO SIGNIFICATIVAS

Efecto de la combinación sobre la producción de conidias de *M. anisopliae* y *G. virens*

La producción de conidias de los dos hongos evaluados en este estudio fue muy similar y fue afectada por el insecticida ARS, además de disminuir en *M. anisopliae* a 57.67% y en *G. virens* a 70.75% después de cuatro días de exposición; mientras tanto, a los 8 y 12 días post-

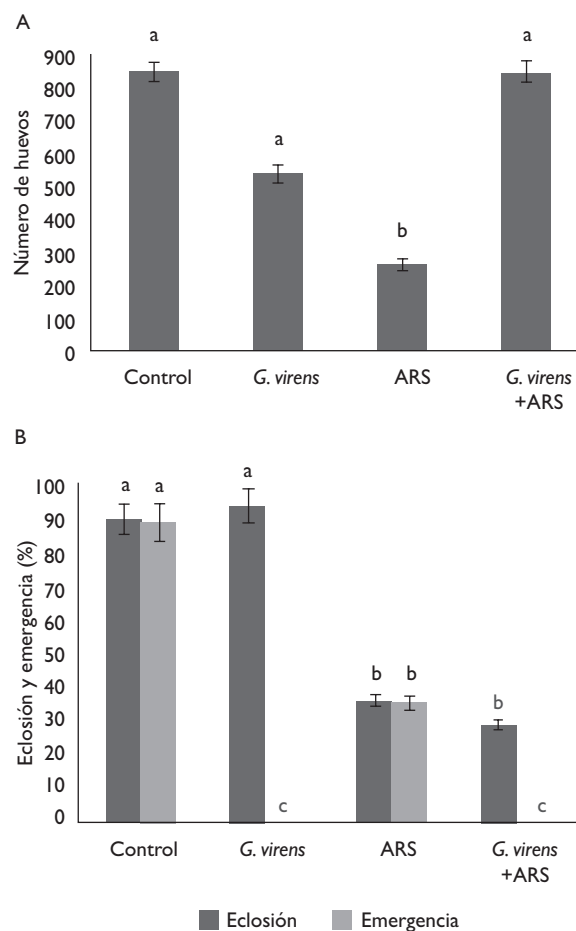


FIGURA 2. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE GLIOCLADIUM VIRENS Y AQUA RESLIN SUPER REALIZADOS DURANTE SEPTIEMBRE DE 2019 EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PATÓGENOS Y VECTORES DEL CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA, UBICADO EN TAPACHULA, CHIAPAS, MÉXICO, SOBRE A). OVIPOSICIÓN Y B). ECLOSIÓN Y EMERGENCIA DE Aedes Aegypti EN CONDICIONES DE LABORATORIO. LETRAS IGUALES INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE NO SIGNIFICATIVAS

exposición la germinación se mantuvo en un rango de 26-32% en ambos hongos (figura 3).

Discusión

En el presente estudio se reporta el efecto de la combinación por separado de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *G. virens* con el insecticida ARS sobre el comportamiento de oviposición, eclosión y emergencia de *Ae. aegypti*. La oviposición de *Ae. aegypti* y las combinaciones hongo + insecticida utilizadas en este trabajo no se vieron afectadas por ambos hongos, ya que después de 24 h el promedio de huevos contabilizados en los tratamientos fue muy similar al contabilizado en el control. Estudios previos con *M. anisopliae* mostraron que este hongo no presenta efectos repelentes sobre mosquitos culícidos,^{8,10,11,13} sin embargo, los insecticidas piretroides sí pueden tener efectos repelentes sobre mosquitos.¹⁴ En este trabajo, en el tratamiento con el insecticida ARS la cantidad de huevos se vio disminuida en comparación con el resto de los tratamientos probados, incluyendo el control; no obstante, cuando este insecticida se combinó con cualquiera de los dos hongos utilizados, no se observó una disminución en la cantidad de huevos por lo que existe la posibilidad de combinar los hongos utilizados con el insecticida ARS sin la necesidad de colocar algún tipo de atrayente de oviposición, pues las combinaciones hongo + insecticida probadas en este trabajo no presentaron un efecto repelente a las hembras de *Ae. aegypti*.

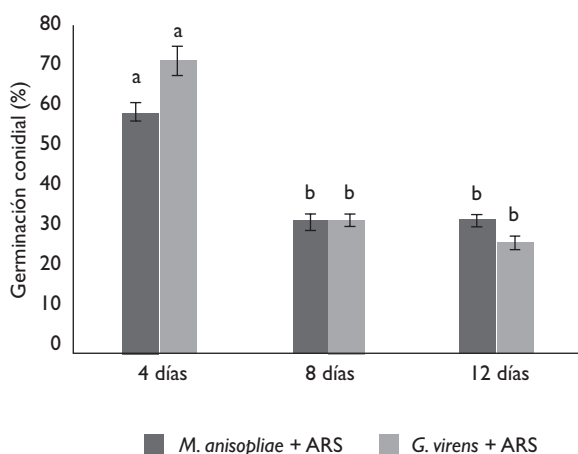


FIGURA 3. PORCENTAJE DE CONIDIAS GERMINADAS OBTENIDAS EN LAS COMBINACIONES *M. ANISOPLIAE* + AQUA RESLIN SUPER Y *GLIOCLADIUM VIRENS* Y AQUA RESLIN SUPER. LETRAS IGUALES INDICAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE NO SIGNIFICATIVAS

La eclosión de los huevos a las 24 h fue baja (13.32%) con el hongo *M. anisopliae*, mientras que con el hongo *G. virens* fue de 94.68%. Algunos autores indican que *M. anisopliae* puede estimular la eclosión de los huevos de *Ae. aegypti* cuando estos son tratados con dicho hongo,¹⁵ aspecto que fue inverso en nuestro estudio. Por su parte, se ha reportado que los huevos de *Ae. aegypti* no presentaron eclosión al tratarlos con *Tolypocladium cylindrosporum* y *Culicinomyces spp.*, respectivamente.^{16,17} Igualmente se ha mencionado que las larvas dentro de los huevos podrían verse afectadas por el desarrollo del hongo en la superficie de los huevos y de alguna manera esto podría resultar en la eclosión.¹⁸ La eclosión de los huevos en el tratamiento *M. anisopliae* fue baja y cuando el hongo se combinó con el insecticida el tratamiento *M. anisopliae* + ARS mantuvo el mismo porcentaje de eclosión; mientras tanto, en el tratamiento *G. virens* la eclosión fue alta y cuando se combinó con el insecticida la eclosión se redujo. Puesto que con el hongo *G. virens* la eclosión no se vio afectada, incluso fue ligeramente mayor al control mientras que en el tratamiento *G. virens* + ARS disminuyó, su reducción pudo deberse al efecto del insecticida ARS, pues con éste la eclosión obtenida también fue baja. Es preciso señalar que en ningún tratamiento se observó eclosión acumulada en los siguientes 12 días y los huevos no eclosionados de igual forma no presentaron ningún tipo de deformación visible. Asimismo, no todas las larvas de los tratamientos con *G. virens* y las combinaciones hongo + insecticidas evaluados llegaron a la fase de pupa, sino que algunas permanecieron en larvas de segundo instar (L2) hasta morir. En tanto, no se observó mortalidad larvaria en los controles y en el insecticida. Las larvas que murieron mostraron poco movimiento o incluso signos de parálisis después de 24-96 h de exposición; resultados similares sugieren que la mortalidad larvaria podría atribuirse a la infección por hongo.¹⁶ Estos mismos investigadores sugieren que las larvas dentro de los huevos no pudieron eclosionar al estar infectados con el hongo o fueron afectadas por el hongo de alguna otra manera. En ninguno de los tratamientos se registró mortalidad en fase de pupa, lo que permitió la emergencia de todos los adultos.¹⁶ Es evidente la susceptibilidad de *Ae. aegypti* a los hongos *M. anisopliae* y *G. virens* utilizados en este estudio y la manera en que estos hongos actúan sobre las distintas fases del ciclo de vida de este vector, pues *M. anisopliae* afectó la eclosión de los huevos y la disminuyó a 13.32%, mientras que *G. virens* afectó la fase larvaria al promover 100% de mortalidad.

Algunos hongos entomopatógenos son compatibles con insecticidas químicos; esta interacción debe ser probada si se pretende aplicar a los hongos en campo.^{19,20} La viabilidad de los hongos en este trabajo se vio

reducida a 57.67 y 70.75% en *M. anisopliae* y *G. virens*, respectivamente, después de cuatro días de permanecer en contacto con el sustrato impregnado con el insecticida ARS; mientras tanto, después de 12 días, *M. anisopliae* tuvo una germinación de 32.33% y *G. virens* de 26.93%. Aunque se podría suponer que estos resultados se deban al efecto del insecticida, la rápida actividad microbiana que causa la descomposición de este sustrato puede comprometer la viabilidad de las conidias que están en contacto con él.¹⁸

La disminución de la actividad residual de hongos entomopatógenos después de varios días también se ha reportado en otros trabajos, incluso en condiciones controladas; sin embargo, esta actividad residual no se probó directamente a través de la germinación de las conidias, sino que fue inferida cuando el tratamiento resultó menos eficaz con el paso de los días.^{8,10}

Con lo anterior, en este trabajo se provee información fundamental sobre la acción de *M. anisopliae* y *G. virens* sobre *Ae. aegypti*, por lo que las perspectivas de desarrollar una estrategia de control integrado utilizando estos hongos con piretroides son prometedoras. Tanto el piretroide utilizado en las concentraciones evaluadas en el presente estudio como ambos hongos no presentan efectos sobre organismos no blanco,^{21,22} por lo que pueden ser utilizados en las ovitrampas estándares que alimentan la plataforma entomológica de la Secretaría de Salud en México. *Gliocladium virens* presenta una ventaja como agente de control, ya que al ser un hongo nativo, su aplicación en el entorno natural reduce el riesgo de alterar el equilibrio ecológico,⁴ además de que al utilizar aislamientos obtenidos del área donde se pretende usar, podría ser más tolerante a las condiciones ambientales.¹⁴ Sin embargo, es necesaria la evaluación junto con insecticidas en ovitrampas estándar con miras a desarrollar una ovitrampa letal contra *Ae. aegypti*.

Finalmente, se propone que la estrategia de vigilancia entomológica mediante ovitrampas que realiza el programa de control de vectores en México se utilice para la diseminación de hongos entomopatógenos colocados en el sustrato dentro de las ovitrampas y que los mosquitos al contacto se infecten; de esta manera se realiza no sólo la vigilancia de las poblaciones de mosquitos vectores de dengue sino también un control de las poblaciones de *Ae. aegypti*. Aún mejor, si se utilizan las combinaciones exitosas de hongo e insecticida que se obtuvieron en los bioensayos de laboratorio del presente estudio, es posible impregnar los sustratos de las ovitrampas con estas combinaciones y obtener mejores resultados de control, incluso en poblaciones de mosquitos que ya presenten problemas de resistencia a insecticidas. Las ovitrampas no tienen contacto directo con la población, ya que las coloca y retira el personal

de vectores, por lo que pueden convertirse en una estrategia segura de vigilancia y control de vectores. Las ovitrampas letales que utilizan estas dos medidas de reducción de poblaciones son medidas de control sencillas que la comunidad y los programas de control de vectores pueden aplicar.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte financiero para la realización del presente estudio por medio del apoyo al proyecto *Ovitrampas letales con sustratos impregnados de hongos entomopatógenos e insecticidas para la vigilancia entomológica y control de Aedes aegypti, vector de Dengue y Chikungunya en México*, fondo FOSISS-2015-1-262172. Al apoyo técnico del Sr. Amílcar Zúñiga A. En memoria de la Dra. Guadalupe Vázquez Martínez (Lupita) quien escribió el presente proyecto y murió en 2016.

Declaración de conflicto de intereses. Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de enfermedades. Dengue. México: Cenaprece, 2014. Disponible en: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue.html>
2. Kuri-Morales PA, Correa-Morales F, González-Acosta C, Moreno-García M, Santos-Luna R, Román-Pérez S, et al. Insecticide susceptibility in Mexican populations of *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*): a nationwide assessment. *Med Vet Entomol* 2018;32:162-74. <https://doi.org/10.1111/mve.12281>
3. Vázquez-Martínez MG, Rodríguez-Meneses A, Rodríguez AD, Rodríguez MH. Lethal effects of *Gliocladium virens*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the malaria vector *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Sci Technol*. 2013;23(9):1098-109. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.822470>
4. Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BGJ. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J*. 2003;2(29):1-8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-29>
5. Luz C, Tai MHH, Santos AH, Rocha LFN, Albernaz DAS, Silva HHG. Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *J Med Entomol*. 2007;44(5):799-804. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.799>
6. Leles RN, Almeida SN, Nunes RLF, Santos AH, García SHE, Luz C. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 2010;107:1271-4. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1991-y>
7. Paula AR, Carolino AT, Samuels RI. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasit vectors*. 2011;4(8):1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-8>
8. Farenhorst M, Farina D, Scholte EJ, Takken W, Hunt RH, Coetzee M, Knols BGJ. African water storage pots for the delivery of the entomo-

- pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(6):910-6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.910>
9. García-Munguía AM, Garza-Hernández JA, Rebollar-Téllez EA, Rodríguez-Pérez MA, Reyes-Villanueva F. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2011;4:24. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-24>
10. Mnyone LL, Kirby MJ, Lwetoijera DW, Mpingwa MV, Simfukwe ET, Knols BGJ, et al. Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malar J*. 2010;9:246. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-246>
11. Paula AR, Carolino AT, Silva CP, Pereira CR, Samuels RI. Testing fungus impregnated for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. *Parasit Vectors*. 2013;6:256. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-256>
12. Snetselaar J, Andriessen R, Suer RA, Osinga AJ, Knols BGJ, Fahrenhorst M. Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors*. 2014;7:200. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-200>
13. Carolino AT, Paula AR, Silva CP, Butt TM, Samuels RI. Monitoring persistence of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 2014;7:198. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-198>
14. Bowman NM, Akialis K, Cave G, Barrera R, Apperson CS, Meshnick SR. Pyrethroid insecticides maintain repellent effect on knock-down resistant populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS ONE*. 2018;13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196410>
15. Sousa NA, Lobo LS, Rodrigues J, Luz C. New insights on the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulation and application against *Aedes aegypti* eggs. *Appl Microbiol*. 2013;57:193-9. <https://doi.org/10.1111/lam.12097>
16. Rocha LFN, Sousa NA, Rodrigues J, Catão AML, Marques CS, Fernandes EKK, Luz C. Efficacy of *Tolypocladium cylindrosporum* against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. *J Appl Microbiol*. 2015;119:1412-9. <https://doi.org/10.1111/jam.12945>
17. Rodrigues J, Campos VC, Humber RA, Luz C. Efficacy of *Culicinyomys* spp. against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. *J Invertebr Pathol*. 2018;157. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.010>
18. Leles RN, D'Alessandro WB, Luz C. Effects of *Metarhizium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. *Parasitol Res*. 2012;110:1579-82. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2666-z>
19. Avery PB, Pick DA, Aristizábal LF, Kerrigan J, Powell CA, Rogers ME, Arthurs SP. Compatibility of *Isaria fumosorosea* (Hymenoptera: Cordycipitaceae) Blastospores with agricultural chemicals used for management of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Insects*. 2013;4:694-711. <https://doi.org/10.3390/insects4040694>
20. Pelizza SA, Schalamuk S, Simón MR, Stenglein SA, Pacheco-Marino SG, Scorsetti AC. Compatibility of chemical insecticides and entomopathogenic fungi for control of soybean defoliating pest, *Rachiplusia nu*. *Rev Argent Microbiol*. 2018;50(2):189-201. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.06.002>
21. Schleier JJ, Peterson RK. Toxicity and risk of permethrin and naled to non-target insects after adult mosquito management. *Ecotoxicology*. 2010;19(6):1140-6. <http://doi.org/10.1007/s10646-010-0497-9>
22. Tanada YH, Kaya K. Insect pathology. Nueva York: Academic Press Inc, 1993:666.