

# Patogenicidad *in vitro* y en pruebas de semi-campo de *Trichoderma asperellum* (Cepa VA22) sobre *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762), en la Virginia (Risaralda- Colombia)

Pathogenicity *in vitro* and in semi-field tests of *Trichoderma asperellum* (Strain VA22) on *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762), in Virginia (Risaralda- Colombia)

Nadya Lorena Cardona B.<sup>1,a</sup>, Lizeth Carolina Salgado<sup>2,a</sup>, Juan Diego Medina<sup>3,a</sup>, Dairon Andrés Machado-Agudelo<sup>4,a</sup>, Wilber Gómez -Vargas<sup>5,b</sup>, Adalucy Alvarez Aldana<sup>6,c</sup>

## Resumen

**Introducción.** *Aedes aegypti*, originario de África, se ha extendido globalmente, siendo el principal vector del dengue en Colombia. El uso repetido de insecticidas ha generado resistencia en estos mosquitos, impulsando la búsqueda de estrategias complementarias.

**Objetivo.** Este estudio se propuso evaluar el potencial del hongo *Trichoderma asperellum* aislado del municipio de la Virginia (Risaralda Colombia) como agente biocontrolador de *Ae. aegypti*.

**Metodología.** Los bioensayos *in vitro* se realizaron con larvas expuestas a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/mL del hongo, observando mortalidad a 24, 48 y 72 horas. Se llevaron a cabo ensayos de semi-campo en la misma región, utilizando la concentración de hongo de  $1 \times 10^7$  de conidias/mL en recipientes con larvas de *Aedes* de la zona, evaluando la mortalidad de larvas a las 48 horas. Para analizar la diferencia entre grupos con y sin tratamiento aplicó la prueba de Wilcoxon ( $P=0.05$ ) en el programa R versión 4.4.0 (<https://www.r-project.org/>). **Resultados.** *T. asperellum* mostró alta patogenicidad, causando mortalidades del 95% y 99% en las pruebas *in vitro* y de semi-campo, respectivamente.

**Conclusión.** Es el primer reporte de esta especie infectando estadios inmaduros de

1. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3064-4037>

2. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9133-4266>

3. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5226-1411>

4. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8339-0734>

5. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9790-7415>

6. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7460-4163>

<sup>a</sup> Grupo de Fitopatología y Biotecnología de Hongos FITOBIOL, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>b</sup> Grupo de Epidemiología y Bioestadística, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Exactas y Naturales -Universidad Libre de Colombia - Sede Pereira, Colombia.

Autor de correspondencia: Nadya Lorena Cardona - [nadya.cardona@udea.edu.co](mailto:nadya.cardona@udea.edu.co)

*Ae. aegypti* en nuestro país. Estos resultados sugieren que podría usarse en Colombia como alternativa a los métodos tradicionales de control.

**Palabras claves:** *Aedes aegypti*, Biocontrol, *Trichoderma asperellum*, Hongos entomopatógenos, Control Biológico, Pruebas de Patogenicidad.

## Abstract

**Introduction.** *Aedes aegypti*, originally from Africa, has spread globally and is the main vector of dengue in Colombia. The repeated use of insecticides has generated resistance in these mosquitoes, prompting the search for complementary strategies. **Objective.** This study aimed to evaluate the potential of the fungus *Trichoderma asperellum*, isolated from the municipality of La Virginia (Risaralda, Colombia), as a biocontrol agent for *Ae. aegypti*. **Methodology.** *In vitro* bioassays were conducted with larvae exposed to a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/mL of the fungus, observing mortality at 24, 48, and 72 hours. Semi-field trials were carried out in the same region, using a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/mL in containers with *Aedes* larvae from the area, evaluating larval mortality at 48 hours. To analyze the difference between treated and untreated groups, the Wilcoxon test ( $P=0.05$ ) was applied using the R program version 4.4.0 (<https://www.r-project.org/>). **Results.** *T. asperellum* showed high pathogenicity, causing 95% and 99% mortality in the *in vitro* and semi-field tests, respectively. **Conclusion.** This is the first report of this species infecting immature stages of *Ae. aegypti* in our country. These results suggest that it could be used in Colombia as an alternative to traditional control methods.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, Biocontrol, *Trichoderma asperellum*, Entomopathogenic fungi, Biological Control, Pathogenicity Tests.

## Introducción

*Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) es un insecto nativo de África, y actualmente tiene una distribución mundial con presencia en 114 países, en América del Sur, África sub sahariana, Indonesia y el noreste de Australia México,

Estados Unidos, África del Norte y el Sudeste Asiático áreas costeras dispersas en Portugal, España e Italia [1]. En Colombia es el principal transmisor del dengue y se distribuye en el 80 % del territorio nacional, desde los 1000 hasta los 2302 msnm [2] y es

el vector de otros virus que causan enfermedades como el Chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla [3]. Las medidas de control convencionales se enfocan en prácticas culturales, como la eliminación de criaderos, y en la aplicación de insecticidas, con el objetivo de disminuir la densidad poblacional de mosquitos [5]. Además, se están llevando a cabo investigaciones sobre bacterias biocontroladoras con el fin de prevenir epidemias. [4]. Sin embargo, a pesar de que el uso de productos químicos ha sido una de las medidas más extensivas en el tiempo, se ha reportado que su uso indiscriminado induce resistencia en poblaciones de los mosquitos [5]. Por lo anterior, recientemente se han buscado alternativas como los hongos entomopatógenos, que podrían emplearse como una herramienta más en el manejo de este vector. Tal es el caso de *Trichoderma asperellum* el cual fue biolarvicida en la fase L3 de *Ae. aegypti*, atribuido a la producción de enzimas quitinolíticas [6], y ha sido encontrado por otros autores en mosquitos anofelinos [7] Así mismo, algunos autores han trabajado con *Trichoderma longibrachiatum*, entre otros hongos, encontrando como éste presentó la mayor actividad larvicida a las 24 horas, causando mortalidades de 100% [8]. Teniendo en cuenta que este género podría ser promisorio el control de *Ae. aegypti*, como se ha reportado en otros países, y que en Colombia no existen reportes de hongos biocontroladores de este género, se propuso esta investigación que tuvo como objetivo evaluar un aislamiento del hongo

*T. asperellum* proveniente del municipio de la Virginia (Risaralda, Colombia) con el fin de establecer su patogenicidad en pruebas *in vitro* y en semi-campo.

## **Materiales y métodos**

### **Aislamiento del Hongo**

El aislamiento del hongo usado en este trabajo fue obtenido a partir de un cuerpo de agua de los alrededores del municipio de la Virginia (Humedal Balsillas, 4° 53' 57.095" N, 75° 52' 44.472" W, Departamento de Risaralda, Colombia) a la cual se le ha denominado "Cepa VA22". El aislamiento escogido, mostró en estudios previos una gran capacidad y rapidez en esporular, aspecto que podría ser tenido en cuenta en futuros estudios para su producción masiva y bioformulación. El aislamiento fue conservado en nevera a 4-8 °C, en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, (PDA marca Oxoid ®), hasta el momento de su uso.

### **Identificación morfológica y molecular de la cepa VA22**

Para la identificación morfológica, las cepas fueron sembradas en agar papa dextrosa (PDA) e incubadas durante 7 a 15 días a 25°C. Se realizaron preparados de las muestras con azul de lactofenol y se analizaron mediante microscopía óptica; se describieron las estructuras reproductivas

y se utilizaron claves taxonómicas para la determinación hasta el nivel de género [9]. Para la identificación molecular, se realizó la extracción de ADN a partir de la biomasa fúngica obtenida en medio líquido Sabouraud dextrosa (Merck®) con 10 g/L de extracto de levadura (SDYB) (Scharlau®). Durante tres días, las cepas se sometieron a agitación orbital (agitador Mazzine, Indulab®) de 120 rpm. Después, la biomasa se filtró y se sometió a maceración con nitrógeno líquido. La muestra resultante se procesó según el protocolo de extracción de ADN publicado por Miranda y Sandoval [10].

Se amplificó la región ITS (que abarca ITS1, 5.8S ADNr e ITS 2) usando los cebadores ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (21). La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems MiniAmp con 25 µl de volumen total de reacción por muestra, que contenía 2.5 µl de buffer 10X (Smobio®), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Smobio®), 0.2 mM de dNTPs (Smobio®), 0.2 pmol/µl de cada cebador (AccuOligo®, Bioneer), 0.06 U/µl de polimerasa Taq (Smobio®) y 20 ng/µl de ADN.

El ciclo de amplificación comenzó con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, alineación a 55°C durante 1 minuto, y extensión a 72°C durante 1 minuto y 30 segundos.

Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos amplificados de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa (1 % p/v) en tampón TAE 0.5X a 80 V durante 40 minutos. Los amplicones resultantes se enviaron a la Unidad de Servicios de Secuenciación “Gabriel de Jesús Bedoya Berrío” de la Universidad de Antioquia.

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas mediante el programa FinchTV. Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos de dominio público UNITE (<https://unite.ut.ee/>) y NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando la herramienta BLASTN para alinear secuencias de nucleótidos.

### ***Obtención de huevos de Ae. aegypti***

Los huevos de *Ae. aegypti* utilizados para este estudio fueron obtenidos de una colonia de cría perteneciente al Grupo de Entomología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Corresponde a una cepa de mosquito nativa de Medellín, la cual ha sido criada de forma axénica. La generación utilizada correspondió a F2 y se criaron con un fotoperiodo de 12-12 Luz/oscuridad.

### **Protocolo de eclosión y mantenimiento de larvas**

En un recipiente plástico con 500 mL de agua destilada estéril, se dispusieron tirillas de papel que contenían los huevos de *Ae. aegypti*, a los cuales se les agregó 1g de comida granulada para peces, previamente esterilizado. Estos fueron incubados bajo condiciones de laboratorio, con una temperatura promedio de 28 °C durante tres días, en espera de su eclosión. Después, se retiraron las tirillas y las larvas eclosionadas se mantuvieron allí entre tres y cinco días más, con las mismas condiciones, para que maduraran hasta el estadio L2-L3, usadas en los experimentos. Aquellas no utilizadas, se descartaron por inmersión en alcohol al 70%.

### **Prueba de patogenicidad in vitro**

Para la multiplicación de la Cepa VA22 se usó el medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB) adicionado con vitaminas y sales (Resultados no publicados, Comunicación personal Lizeth Salgado, 2023) en erlenmeyers que contenían 250 mL del medio, y sometidos a una agitación constante de 120 RPM durante 4 días. Después se filtró micelio, para que en el medio solo queden las estructuras reproductivas. Los conteos se realizaron utilizando un hemocitómetro, para el cálculo de la concentración requerida de las conidias para la realización de los diferentes bioensayos.

Para la realización de los bioensayos se utilizaron vasos de plástico desechables de 207 mL (TAMI®, Colombia), previamente esterilizados con luz UV durante unos 30 minutos. Allí se ajustó la concentración deseada con un volumen final de 50 mL de agua destilada estéril (ADE). Posteriormente se añadieron 3-4 granos de comida para peces previamente esterilizados y por último 20 larvas en estadios (L2-L3). Estos estadios fueron escogidos, de acuerdo con ensayos previos en donde se estableció como la cepa utilizada, infectaba en mayor proporción tales estados inmaduros. Cada uno de los vasos fue cubierto con velo tipo suizo, para evitar el escape de los individuos que pasaran a la etapa de adulto. El tratamiento con el hongo tuvo tres (3) repeticiones al igual que los controles, los cuales consistieron en vasos con larvas con el alimento, sin la aplicación de hongo. Los vasos fueron incubados bajo condiciones de laboratorio, con una temperatura que osciló entre 27-29 °C. Los tiempos de evaluación fueron 24, 48, 72 horas después del inicio del experimento, tanto en el tratamiento con hongo como en el control. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad y al final del ensayo, se corrigió la mortalidad de acuerdo con la fórmula de Abbot [11]

La mortalidad de las larvas se definió como la falta de movimiento ante estímulos lumínicos y mecánicos, mediante la estimulación mecánica por medio de un pincel durante

30-40 segundos. Se realizó la verificación de los agentes causales, tomando las larvas muertas en los vasos para su siembra en PDA acidificado, después de una desinfección superficial previa. Posterior a su siembra, se incubaron a temperatura ambiente durante siete días y se verificó el crecimiento del hongo. Para la identificación morfológica, las cepas fueron sembradas en agar papa dextrosa (PDA) e incubadas durante 7 a 15 días a 25°C. Se realizaron preparados de las muestras con azul de lactofenol y se analizaron mediante microscopía óptica; se describieron las estructuras reproductivas y se utilizaron claves taxonómicas para la determinación hasta el nivel de género [9].

### ***Diseño experimental***

Para establecer si existían diferencias significativas entre las unidades experimentales con tratamiento vs. aquellas sin tratamiento (control), se realizó la prueba de Wilcoxon a un nivel de significancia de 0.05. Los datos fueron analizados en el programa R versión 4.4.0 (<https://www.r-project.org/>)

### ***Prueba de patogenicidad en condiciones de Semi-Campo***

Este experimento, fue acompañado por la Alcaldía Municipal de la Virginia a través de la subsecretaria de salud y la Unidad de gestión ambiental del municipio (<https://www.youtube.com/watch?v=iUubC-nuaNQ>), quienes confirmaron

el sitio de aplicación de acuerdo con sus registros de índices aédicos. La presencia de *Aedes aegypti* fue corroborada por el grupo de Entomología médica de la Universidad de Antioquia (GEM). Para determinar la presencia de microorganismos en el agua, previo al montaje en semi campo, se colectaron muestras en tubos cónicos tipo Falcon y fueron procesados en el laboratorio de Investigaciones de la Universidad libre Sede Belmonte. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100uL en superficie en los medios PDA y Agar Nutritivo (AN). Estos fueron incubados bajo condiciones de laboratorio y posterior a incubación, se procedió a realizar coloración de gram y montajes de placas con azul de lactofenol para la observación de hongos, los cuales fueron observados en microscopio de luz a 40X.

El hongo *Trichoderma*, utilizado fue multiplicado bajo las mismas condiciones descritas y explicadas previamente para las pruebas *in vitro*. Esta parte de la investigación fue realizada en zona urbana del municipio de la Virginia, Risaralda, en el barrio El Porvenir. El lugar de aplicación del hongo correspondió a un patio en donde se encontraban diferentes tipos de recipientes con poblaciones de *Ae. aegypti*, de acuerdo con información suministrada por la autoridad sanitaria de esta zona (Comunicación personal Juan Sebastián Ramírez, 2023). Dentro del patio, se ubicaron contenedores de agua lluvia (baldes, cajas, tanques)

que fueran reservorios de agua lluvia y que no presentaran más de 1m de distancia. La unidad experimental consistió en cajas plásticas redondas (10 cms de diámetro x 5cms de profundidad), que fueron depositadas en la superficie del agua de los contenedores escogidos para la prueba, con el fin de que estos flotaran. Los recipientes plásticos, tenían una tapa plástica perforada con seis orificios abiertos con punzón metálico, con el fin de que las larvas pudieran respirar. Los tratamientos consistieron en cajas plásticas con la adición de 20 mL de la suspensión del hongo, hasta llegar a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias / mL. El agua utilizada para el ensayo provenía de contenedores plásticos ubicados en el patio (Agua lluvia, pH: 6.5-7.0), y para el montaje de las unidades experimentales, se escogieron cinco puntos de la propiedad. Cada caja plástica, contenía 10 larvas de estadios 2-3 provenientes del mismo sitio donde se realizó el ensayo. Los controles consistieron en recipientes de agua con las larvas, pero sin el hongo. Se incubaron durante 48 horas, con una temperatura ambiental media de 30 °C. La variable a evaluar fue el porcentaje de movilidad, como medida indirecta de mortalidad. Así mismo, se observó si existía presencia de adultos en las unidades experimentales

## **Diseño experimental**

Para comparar el efecto del hongo sobre la movilidad de individuos de *Ae. aegypti*, la movilidad fue tomada como un proxy para establecer la mortalidad y calcular los porcentajes. Para establecer si existían diferencias significativas entre las unidades experimentales con tratamiento vs. las unidades experimentales sin tratamiento (control), se realizó la prueba de Wilcoxon a un nivel de significancia de 0.05. Los datos fueron analizados en el programa R versión 4.4.0 (<https://www.r-project.org/>)

## **Resultados**

De acuerdo con los resultados de la identificación morfológica, este aislado corresponde al género *Trichoderma* sp. Por otra parte, se obtuvo un fragmento de 450 nucleótidos y corresponde a *Trichoderma asperellum*, con un 100% de identidad y un E value de 0 al realizar la búsqueda en Blast (Figura 1) y del 99% de este mismo hongo en UNITE. Es relevante destacar que este es el primer informe en Colombia de esta especie fúngica infectando larvas de *Ae. aegypti* tanto *in vitro* como en condiciones de semi-campo.

```

RID: 27C54XU0013
Job Title:Nucleotide Sequence
Program: BLASTN
Database: nt Nucleotide collection (nt)
Query #1: Query ID: lcl|Query_6287330 Length: 450

Sequences producing significant alignments:

Description                               Scientific   Common
Name                                         Name
Trichoderma asperellum isolate T2 (Reverse) small subunit... Trichoderma ... NA
Trichoderma asperellum clone SF_786 small subunit ribosomal RN... Trichoderma ... NA
Trichoderma asperellum clone SF_554 small subunit ribosomal RN... Trichoderma ... NA
Trichoderma asperellum clone SF_387 small subunit ribosomal RN... Trichoderma ... NA
Trichoderma asperellum isolate T1 (Reverse) small subunit... Trichoderma ... NA
Trichoderma asperellum strain MF1 small subunit ribosomal RNA... Trichoderma ... NA
Trichoderma asperellum isolate Tasp48 small subunit ribosomal... Trichoderma ... NA

```

| Description   | Scientific Name | Common Name | Taxid  | Max Score | Total Score | Query cover | E Value | Per. Ident | Acc. Len | Accession  |
|---|-----------------|-------------|--------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|------------|
| Trichoderma asperellum isolate T2 (Reverse) small subunit...      | Trichoderma ... | NA          | 101201 | 832       | 832         | 100%        | 0.0     | 100.00     | 603      | MK928418.1 |
| Trichoderma asperellum clone SF_786 small subunit ribosomal RN... | Trichoderma ... | NA          | 101201 | 832       | 832         | 100%        | 0.0     | 100.00     | 598      | MT530062.1 |
| Trichoderma asperellum clone SF_554 small subunit ribosomal RN... | Trichoderma ... | NA          | 101201 | 832       | 832         | 100%        | 0.0     | 100.00     | 594      | MT529830.1 |
| Trichoderma asperellum clone SF_387 small subunit ribosomal RN... | Trichoderma ... | NA          | 101201 | 832       | 832         | 100%        | 0.0     | 100.00     | 599      | MT529663.1 |
| Trichoderma asperellum isolate T1 (Reverse) small subunit...      | Trichoderma ... | NA          | 101201 | 832       | 832         | 100%        | 0.0     | 100.00     | 599      | MK928415.1 |
| Trichoderma asperellum strain MF1 small subunit ribosomal RNA...  | Trichoderma ... | NA          | 101201 | 832       | 832         | 100%        | 0.0     | 100.00     | 605      | MT126695.1 |
| Trichoderma asperellum isolate Tasp48 small subunit ribosomal...  | Trichoderma ... | NA          | 101201 | 832       | 832         | 100%        | 0.0     | 100.00     | 585      | MT065827.1 |

Figura 1. Resultados del Blast (NCBI) correspondiente a *Trichoderma asperellum*

Posterior a la incubación de cuatro días en agitación, el hongo logró una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/mL, a partir de las cuales fue posible preparar las suspensiones de trabajo. En los bioensayos *in vitro* posterior a 24 horas de incubación, las larvas presentaron un promedio del porcentaje de mortalidad del 100% en los tratamientos. Algunas de ellas presentaron deformidades morfológicas, mientras que en el control se encontraron solo algunas larvas inmóviles, que correspondió a un 5% de mortalidad, pero sin alteraciones en su morfología (Ta-

bla 1). Posterior a la aplicación de la fórmula de Abbot, el resultado de la patogenicidad del hongo sobre las larvas fue del 95% y al aplicar la prueba de Wilcoxon, se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento y el control ( $P > 0.05$ ). Al sembrar las larvas en medio de cultivo, se obtuvo el hongo, por lo que se corroboró que la mortalidad se debió al hongo aplicado. Los resultados de los controles que fueron sembrados no mostraron presencia del hongo y solo se observaron bacilos Gram negativos (BGN).

Tabla 1. Bioensayos *in vitro* de la cepa VA22 en tres (3) tiempos diferentes.

| Tratamiento | Repeticiones | Larvas iniciales | 24 h | 48 h | 72 h | Total larvas inmóviles | % de mortalidad | Promedio % de Patogenicidad |
|-------------|--------------|------------------|------|------|------|------------------------|-----------------|-----------------------------|
| VA22        | 1            | 20               | 20   | 0    | 0    | 20                     | 100             | 100                         |
|             | 2            | 20               | 20   | 0    | 0    | 20                     | 100             |                             |
|             | 3            | 20               | 20   | 0    | 0    | 20                     | 100             |                             |
| Control     | 1            | 20               | 0    | 3    | 0    | 3                      | 15              | 5                           |
|             | 2            | 20               | 0    | 0    | 0    | 0                      | 0               |                             |
|             | 3            | 20               | 0    | 0    | 0    | 0                      | 0               |                             |

## Prueba en semi-campo

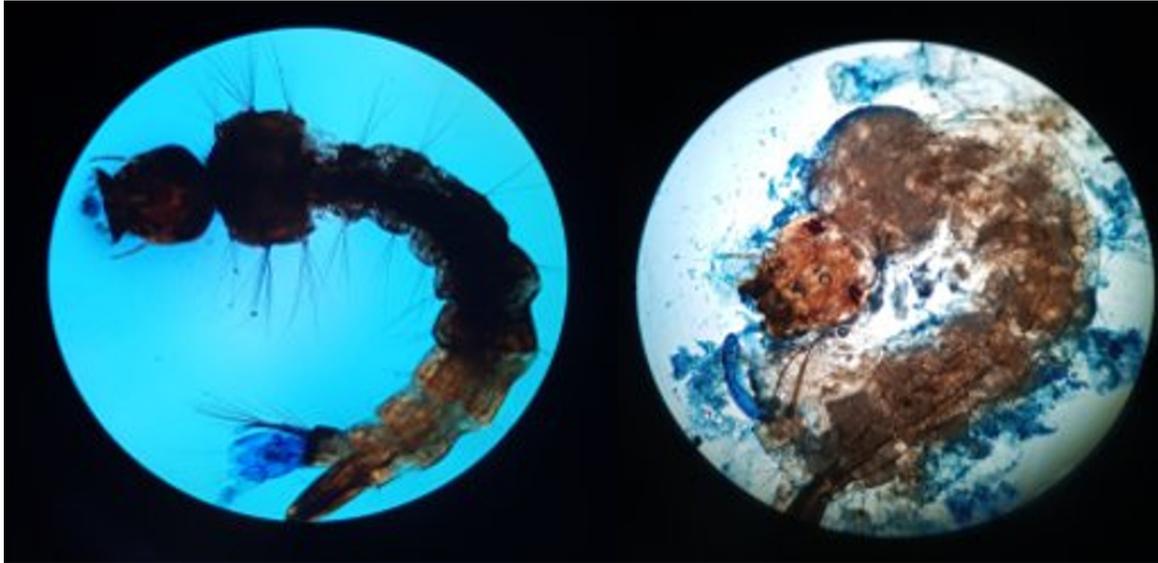
A pesar de que la prueba *in vitro* mostró mortalidad a las 24 horas, en las condiciones de semi-campo, con el agua del sitio, las larvas nativas, y bajo las condiciones ambientales del lugar donde se hizo el experimento, se observó la mortalidad a las 48 horas. La prueba de Wilcoxon, mostró un  $P= 0,029$ , por lo cual se puede inferir que hay diferencias significativas entre ambos grupos (control vs hongo). En la tabla 2, puede observarse como la proporción de la mortalidad de los controles estuvo entre 0.0 y 0.1, mientras que en los tratamientos fue de 1.0. Posterior a la aplicación de la prueba de Abbot, se encontró como la mortalidad del hongo bajo las condiciones evaluadas, correspondió a un 99%. Así mismo, al realizar las siembras de las larvas en el medio de cultivo, en todas se observó

el crecimiento del hongo. En las larvas del control, no hubo crecimiento de *Trichoderma* sp.; sin embargo, en una de ellas creció *Penicillium* sp., y en las demás se determinó la presencia de BGN.

Al igual que las observaciones *in vitro*, algunas de las larvas evaluadas, presentaron deformaciones morfológicas al ser observadas en el estereoscopio y se determinó la presencia de estructuras del hongo (Figura 2). Los aislamientos de las diluciones del agua, correspondieron a BGN, y otros hongos ambientales como *Penicillium* sp y levaduras. Se corroboró que el agua en donde se montó el ensayo de semi campo, no presentaba previamente el hongo *Trichoderma* sp.

**Tabla 2.** Mortalidad de individuos sometidos a *Trichoderma asperellum* y sus controles, en condiciones de semi-campo.

| ID | Treatment | Individuos iniciales | Mortalidad | Proporción mortalidad |
|----|-----------|----------------------|------------|-----------------------|
| C1 | Control   | 10                   | 0          | 0.0                   |
| C2 | Control   | 10                   | 1          | 0.1                   |
| H1 | Hongos    | 10                   | 10         | 1.0                   |
| H2 | Hongos    | 10                   | 10         | 1.0                   |
| H3 | Hongos    | 10                   | 10         | 1.0                   |
| H4 | Hongos    | 10                   | 10         | 1.0                   |
| H5 | Hongos    | 10                   | 10         | 1.0                   |



**Figura 2.** Observación de estadios larvarios posterior a 48 horas de incubación en la prueba de semi-campo. Izquierda; control sin hongo. Derecha, tratamiento con hongo. Montaje con azul de lactofenol. 10X.

## Discusión

El género *Trichoderma*, ha sido utilizado en forma tradicional como biocontrolador de hongos fitopatógenos, y como biofertilizante. Sin embargo, estudios recientes demuestran como dentro de su ADN, existen genes relacionados con funciones reportadas en hongos entomopatógenos, lo que podría aumentar su utilidad en el biocontrol de insectos [12].

En el presente estudio, el hongo *T. asperellum* cepa VA22, mostro patogenicidad del 95% *in vitro*, posterior a 24 horas de ser aplicado sobre estadios larvarios de *Ae. aegypti*, lo cual es comparable a lo demostrado por Cisneros-Vazquez et al. (2023)[8] quienes registraron mortalidades *in vitro* del 100% sobre *Ae. aegypti*, con la cepa *Trichoderma longibrachiatum*. Así mismo, la cepa VA22, tuvo la capacidad

de producir mortalidad de larvas de *Ae. aegypti*, bajo las condiciones ambientales de la Virginia, Risaralda (Colombia) y fue patógena tanto en poblaciones multiplicadas bajo condiciones axénicas, como en aquellas poblaciones naturales presentes en el sitio de evaluación, lo cual podría convertirlo en un candidato adecuado para ser usado como biocontrolador de larvas de este artrópodo en Colombia. Por otra parte, al no haber encontrado hasta la fecha reportes sobre pruebas en semi- campo, esta metodología reportada en el presente estudio podría ayudar a otros investigadores a realizar sus pruebas, con el fin de evidenciar si sus cepas pueden afectar poblaciones nativas de *Ae. aegypti*.

Es importante resaltar como la cepa VA22 tuvo la capacidad de producir deformaciones morfológicas en los estadios larvarios

(Figura 2). Lo anterior podría ser explicado por la infección de esta cepa en diferentes puntos del cuerpo de las larvas mediante la producción de toxinas o de enzimas, aspectos que ya han sido reportados en otras especies de hongos patógenas a mosquitos [13–16]. Sin embargo, en el caso de este hongo, aún se desconocen los mecanismos exactos de su actividad, que podrían igualmente, estar relacionados con la capacidad para activar vías de transcripción que producen alteraciones en la inmunidad, reducen la sobrevivencia, cambios fisiológicos y comportamentales, estudios que has sido llevados a cabo *Metarhizium anisopliae* [17]. Por otra parte, la degradación específica de la cutícula, fue explicada previamente en Brasil en esta especie, mediante el estudio de un complejo de quitinasas de *T. asperellum*, que permitió degradar la cutícula de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* durante su micoparasitismo [6]. Así mismo, la patogenicidad de la cepas VA22 en corto tiempo (24-48 horas), adicional al uso de enzimas toxinas, o debido a posibles alteraciones en los mecanismos de inmunidad del *Ae. aegypti*, podría ser también explicada mediante el ingreso por orificios naturales, tal y como fue estudiado hace varios años con el hongo *Culicinomyces clavosporus* [18]. Estos aspectos , deben ser investigados en futuros estudios, con el fin de establecer los mecanismos de acción de este hongo en Colombia.

## **Financiación**

Este proyecto formó parte del macroproyecto “Bioprospección de Oomycota y Hongos como biocontroladores de *Aedes aegypti* en tres zonas endémicas y evaluación de protocolos para su producción masiva en fermentación líquida mediante tanque agitado” Código No. 111584467306, financiado por MINCIENCIAS,

## **Agradecimientos**

Los autores desean agradecer a la Secretaria de Salud de Risaralda por su acompañamiento y logística para la toma de muestras en el municipio de la Virginia, al señor Juan Sebastián Ramírez (Máxima autoridad sanitaria del municipio de la Virginia, Risaralda, 2023) y a su equipo, por el acompañamiento en los montajes de las pruebas de Semi-campo, a la Microbióloga Mayra Agudelo por su colaboración en el procesamiento de las muestras de las pruebas *in vitro* y Semicampo, y a la Universidad Libre Seccional Pereira por facilitar la infraestructura del campus Belmonte, para el desarrollo de los análisis de las pruebas de Semi Campo.

## **Conflicto de intereses**

Los autores manifiestan no tener conflictos de intereses en la financiación o en algún aspecto relacionado con la presente publicación.

## Referencias

- Laporta GZ, Potter AM, Oliveira JFA, et al. Global Distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a Climate Change Scenario of Regional Rivalry. *Insects*; 14. Epub ahead of print 1 January 2023. DOI: 10.3390/insects14010049.
- Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, et al. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomedica* 2016; 36: 303–308.
- Castrillón JC, Castaño JC, Urcuqui S. Dengue en Colombia: diez años de evolución. *Revista chilena de infectología* 2015; 32: 142–149.
- Bliman PA. A feedback control perspective on biological control of dengue vectors by *Wolbachia* infection. *Eur J Control*; 59. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1016/j.ejcon.2020.09.006.
- Rodrigues-Alves ML, Melo-Júnior OA de O, Silveira P, et al. Historical Perspective and Biotechnological Trends to Block Arboviruses Transmission by Controlling *Aedes aegypti* Mosquitos Using Different Approaches. *Frontiers in Medicine*; 7. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3389/fmed.2020.00275.
- Silveira A, Andrade J, Guissoni A, et al. Larvicidal potential of cell wall degrading enzymes from *Trichoderma asperellum* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biotechnol Prog*; 37.
- Podder D, Ghosh SK. A new application of *Trichoderma asperellum* as an anopheline larvicide for eco friendly management in medical science. *Sci Rep*; 9. Epub ahead of print 1 December 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37108-2.
- Cisneros-Vázquez LA, Penilla-Navarro RP, Rodríguez AD, et al. Entomopathogenic fungi for the control of larvae and adults of *Aedes aegypti* in Mexico. *Salud Publica Mex* 2023; 65: 144–150.
- Domsch KH, GW and ATH. *Compendium of Soil Fungi*. London: IHW-Verlag, 1993.
- Miranda E, Sandoval L. Desarrollo de un método rápido y sencillo para el aislamiento de DNA de especies fúngicas que afectan el arroz y el tabaco. *Fitosanidad*. marzo de 2000;4(1-2):107-8.
- Puntener W. *Manual for Field Trials in Plant Protection*. Basle, Switzerland : Ciba-Geigy Limited, 1981.
- Monte E. The sophisticated evolution of *Trichoderma* to control insect pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 120. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1073/pnas.2301971120.
- Foresman D, Tartar A. The transcriptome of the entomopathogenic fungus *Culicinomyces clavisporus* contains an ortholog of the insecticidal ribotoxin Hirsutellin. *PeerJ*; 11. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.7717/peerj.16259.
- Tawidian P, Rhodes VL, Michel K. Mosquito-fungus interactions and antifungal immunity. *Insect Biochem Mol Biol*; 111. Epub ahead of print 1 August 2019. DOI: 10.1016/j.ibmb.2019.103182.
- Shen D, Nyawira KT, Xia A. New discoveries and applications of mosquito fungal pathogens. *Current Opinion in Insect Science* 2020; 40: 111–116.
- Sundaravadelan C, Padmanabhan MN. Effect of mycosynthesized silver nanoparticles from filtrate of *Trichoderma harzianum* against larvae and pupa of dengue vector *Aedes aegypti* L. *Environmental Science and Pollution Research* 2014; 21: 4624–4633.
- Mehmood N, Hassan A, Zhong X, et al. Entomopathogenic fungal infection following immune gene silencing decreased behavioral and physiological fitness in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol*; 195. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1016/j.pestbp.2023.105535.
- Sweeney AW. The time-mortality response of mosquito larvae infected with the fungus *Culicinomyces*. *J Invertebr Pathol*; 42. Epub ahead of print 1983. DOI: 10.1016/0022-2011(83)90058-7.

© 2024 – Nadya Lorena Cardona, Lizeth Carolina Salgado, Juan Diego Medina, Dairon Andrés Machado Agudelo, Wilber Gómez Vargas, Adalucy Alvarez Aldana.



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Attribution (CC BY). Se permite el uso, distribución o reproducción en otros foros, siempre que se acredite al autor original y al propietario del copyright y se cite la publicación original en esta revista, de acuerdo con la práctica académica aceptada. No se permite ningún uso, distribución o reproducción que no cumpla con estos términos.