



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**PATOGENICIDAD DE *Metarhizium anisopliae* (Metch.)
Sorokin Y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill SOBRE *Periplaneta
americana* (L.) Y SU SINERGISMO CON EL ÁCIDO BÓRICO.**

GABRIELA HERNÁNDEZ RAMÍREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2007

La presente tesis titulada: **PATOGENICIDAD DE *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin Y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill SOBRE *Periplaneta americana* (L.) Y SU SINERGISMO CON EL ÁCIDO BÓRICO**, realizada por la alumna **GABRIELA HERNÁNDEZ RAMÍREZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____
DR. HUSSEIN SÁNCHEZ ARROYO

DIRECTOR: _____
DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

ASESOR: _____
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR: _____
DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR

DEDICATORIA

A toda mi familia...

Abuelitos, tíos y primos, por su aceptación amor y apoyo cada día de mi vida y por enseñarme que el amor no tiene límites si uno mismo no se los pone.

A mis Padres...

Por todo el esfuerzo, dedicación y por los años de su vida que han dedicado a formar el ser humano que soy hoy. Con todo mi amor les agradezco y brindo este esfuerzo compartido. Gracias por todas las bendiciones que dan a mi existencia.

A mis dos Hermanos...

Con quienes siempre será un placer compartir mis triunfos, los admiro, respeto y les agradezco todo el cariño y cada momento que me han llenado de su presencia

A mis dos mejores amigos...

Caro y Marco que cada día me brindaron su cariño, apoyo y confianza, GRACIAS por ser parte de mi vida.

A mis profesores...

Por compartir sus conocimientos y experiencia, no solo en el trabajo sino en el gran camino de la vida.

Y a ti Sofía...

Por llegar en el momento justo a mi VIDA.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados, personal técnico y administrativo por las facilidades otorgadas para el desarrollo de la presente investigación. Especialmente al Sr. Mario y a Gude

A todos los profesores del CP que tuvieron participación en mi formación profesional, particularmente a los que forman parte del programa de Entomología y Acarología.

A todos los miembros de mi consejo particular, por su asesoría, confianza y aportes en la realización de este trabajo, Dra. Raquel Alatorre Rosas, Dr. Hussein Sánchez A., Dr. Francisco Hernández R. y Dr. Juan Cibrián T.

Al Dr. Gabriel Otero Colina por sus acertadas sugerencias y valiosa asesoría para la realización del presente documento.

A mis amigos Francisco y Natalia por motivarme a terminar con el compromiso adquirido, su apoyo y consejos para finalizar esta meta.

A mis compañeros y amigos de Generación por todo su apoyo y por compartir momentos que quedan guardados dentro de mis recuerdos. De manera especial a, Jhony, Carlos, Julio, Juan, Dulce, y Max,

A todas las personas que han formado parte de esta dura y satisfactoria experiencia del Postgrado.

¡ GRACIAS !

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VII
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	IX
II. OBJETIVOS.....	XI

III. CAPÍTULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Las cucarachas.....	1
1.1.1 Importancia de las cucarachas como plaga urbana.....	2
1.1.2 Descripción de <i>Periplaneta americana</i> (Dictyoptera: Blattidae).....	2
1.1.3 Prevención y control de <i>P. americana</i>	4
1.1.4 Uso de extractos vegetales para el control de <i>P. americana</i>	6
1.1.5 Control biológico de cucarachas.....	7
1.2 Control biológico de cucarachas con hongos entomopatógenos.....	8
1.2.1 Efecto de la humedad relativa en la patogenicidad de los hongos entomopatógenos...	10
1.2.2 Mecanismos de defensa de los insectos contra los hongos entomopatógenos.....	11
1.2.3 Ventajas y desventajas del uso de hongos entomopatógenos en el control de cucarachas.....	12
1.3 Hongos entomopatógenos en combinación con dosis subletales de insecticidas químicos para aumentar su eficacia en el control de plagas.....	14
1.3.1 El ácido bórico como manejo integrado para incrementar la eficacia en la patogenicidad de los hongos entomopatógenos.....	17
1.4 Literatura citada.....	22

IV. CAPÍTULO 2.

INFECTIVIDAD, EDAD- Y HUMEDAD RELATIVA - RELACIONADO CON LA SUSCEPTIBILIDAD DE NINFAS Y ADULTOS DE *Periplaneta americana* A *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*Hyphomycetes: Moniliaceae*)

2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y métodos.....	28
2.2.1 Inducción y purificación <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en <i>P. americana</i>	29
2.2.2 Patogenicidad y selección del aislamiento infectivo contra <i>P. americana</i>	30
2.2.3 Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en diferentes estados de desarrollo de <i>P. americana</i>	31

2.2.4 Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> contra adultos de <i>P. americana</i> en condiciones controladas de HR.....	31
2.3 Resultados.....	32
2.3.1 Inducción y purificación <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en <i>P. americana</i>	32
2.3.2 Patogenicidad y selección del aislamiento infeccioso contra <i>P. americana</i>	32
2.3.3 Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en diferentes estados de desarrollo de <i>P. americana</i>	35
2.3.4 Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> contra adultos de <i>P. americana</i> en condiciones controladas de HR	36
2.4 Discusión.....	37
2.5 Literatura citada.....	40
V. CAPÍTULO 3.	
SINERGISMO - ÁCIDO BÓRICO - <i>Metarhizium anisopliae</i> Y <i>Beauveria bassiana</i>, E INFECTIVIDAD SOBRE <i>Periplaneta americana</i>.	
3.1 Introducción.....	44
3.2 Materiales y métodos.....	45
3.2.1 Compatibilidad del ácido bórico y los hongos entomopatógenos <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	46
3.2.2 Efecto del ácido bórico en ninfas de <i>P. americana</i>	47
3.2.3 Asociación de ácido bórico y <i>B. bassiana</i> para el control de <i>P. americana</i>	47
3.3 Resultados.....	49
3.3.1 Compatibilidad del ácido bórico y los hongos entomopatógenos <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	49
3.3.2 Efecto del ácido bórico en ninfas de <i>P. americana</i>	51
3.3.3 Asociación de ácido bórico y <i>Beauveria bassiana</i> para el control de <i>P. americana</i>	52
3.4 Discusión.....	54
3.5 Literatura citada.....	58
VI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 2

1. Cadáveres micosados, germinación de esporas y crecimiento micelial en ninfas y adultos de *P. americana* con hongos entomopatógenos. **A**; adulto micosado con *B. bassiana*. **B**; ninfa micosada con *M. anisopliae*. **D** y **E**; frotis de hemolinfa de cucaracha: h:hemocitos, e: blastoespora de *B. bassiana* germinando m: micelio de *M. anisopliae*. **F**; cutícula de *P. americana* 33
2. Mortalidad diaria de *P. americana* con *M. anisopliae* y *B. bassiana* inoculados de manera tópica (1.1×10^6 esp/cucaracha)..... 34
3. Mortalidad acumulada (a los 15 días) de *P. americana* tratadas con *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$)..... 34
4. Mortalidad Aislamiento-Edad en cucarachas de las edades E1, E2 y E3 infectadas con Bb 88 y Destruxin-Ma con la dosis de 1.1×10^6 esp/cucaracha. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$)..... 35
5. Mortalidad acumulada (15 días) en adultos de *P. americana* probada en condiciones controladas de $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y HR ($85 \pm 10\%$), inoculados de manera tópica la dosis de 5×10^6 esp/cucaracha con *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$)..... 36

CAPITULO 3

1. Efecto de cuatro concentraciones del ácido bórico en la germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* a las 24 horas de incubados en agar-agua a la concentración de 1×10^5 esp/ μL . Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$)..... 50
2. Germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el medio de cultivo agar-agua a la concentración de 1×10^5 esp/ μL . Letras iguales indican no diferencias significativas Tukey de las combinaciones: tiempos de lectura-aislamientos-concentraciones de AB ($P < 0.05$)..... 50
3. Mortalidad en ninfas de 3° y 4° instar de la cucaracha *P. americana* expuestas a tres concentraciones de ácido bórico por el método de ingestión. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$)..... 51
4. Mortalidad acumulada (15 días) en ninfas de 3° y 4° instar de *P. americana* expuestas durante cinco días a la combinación de ácido bórico-esporas de *B. bassiana* en dos tipos de cebo: A) polvo y B) pelet. **Cebo A)** ácido bórico 1, 3 y 5% + 3×10^8 esp/ 2 gr de polvo. **Cebo B)** ácido bórico 1, 3 y 5% + 2.5×10^8 esp/ pelet. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$)..... 53

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO 2

1. Especie, insecto hospedante y procedencia de los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*..... 28

CAPITULO 3

1. Porcentaje de germinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a las 12h, 24h y 36h, en medio de agar-agua..... 49
2. Valores de TL₅₀ en los cebos polvo y pelet a las concentraciones 3 y 5 % de ácido bórico combinados con *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 gr de polvo y 2.5×10^8 esp / pelet, respectivamente)..... 52

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1976 fueron aplicados sobre ninfas y adultos de la cucaracha *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) en condiciones de laboratorio (1.1×10^6 conidia, temperatura $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa, HR, $50 \pm 10\%$). Los aislamientos probados mostraron bajo potencial patogénico y porcentajes de mortalidad significativamente diferentes entre aislamientos. Además se observó menor mortalidad en adultos que en ninfas, en las que se presentaron cambios de conducta a la aplicación de la suspensión conidial. Los dos aislamientos más virulentos fueron seleccionados para ser probados en tres grupos de edades representativos de las etapas de desarrollo de *P. americana*. Como tendencia general se observó que la mortalidad de las cucarachas tratadas se redujo conforme aumentó su edad. Dos aislamientos, seleccionados por su patogenicidad uno de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae* fueron probados en adultos de *P. americana* con HR y temperatura controlados ($85 \pm 10\%$, 27°C). Los adultos de la cucaracha americana fueron susceptibles a *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones controladas; a HR alta ($85 \pm 10\%$) se observó mayor porcentaje de mortalidad (47%) en comparación con el bioensayo en condiciones de laboratorio donde la mortalidad sólo fue de 3%.

Para mejorar la eficacia de los hongos entomopatógenos se evaluó la compatibilidad del ácido bórico con dos aislamientos de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* cuantificando el porcentaje de germinación del hongo en agar-agua. La exposición a las 12, 24 y 36 h de las esporas de ambos hongos al ácido bórico (1, 3, 5 y 10%), reveló un efecto negativo sobre la germinación, principalmente en *M. anisopliae*, el cual mostró menor germinación al aumentar la concentración y el tiempo de exposición, mientras que *B. bassiana* tuvo reducciones menos drásticas en la germinación, expresando mayor tolerancia a las concentraciones de ácido bórico probadas. Se valoraron cebos contaminados de ácido bórico a las concentraciones 3, 4 y 7% en ninfas de *P. americana* y los resultados mostraron que en ninguna de las concentraciones probadas hubo repelencia de las cucarachas y tampoco mortalidad arriba de 5%. Finalmente se aplicaron cebos en polvo y pelets (barras, gránulos, lentejas) de la combinación de ácido bórico (1, 3 y 5%) y *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 gr de polvo y 2.5×10^8 esp / pelet, respectivamente) en ninfas de *P. americana* (3° y 4° instares), lo que resultó en una mortalidad alta (superior a 50%) y rápida, lo que sugiere alta compatibilidad entre los dos productos. La mayor mortalidad fue de $91.68 \pm 12.90\%$ ($TL_{50} = 3.81$ d), causada por la combinación

de 5% de ácido bórico y esporas de *B. bassiana* del cebo en polvo, seguida por la misma mezcla pero en pelets causo mortalidad de $86.66 \pm 13.56\%$ ($TL_{50} = 4.57$ d) Por su parte la combinación de 3% de ácido bórico y esporas de *B. bassiana* en el polvo causaron $81.62 \pm 11.07\%$ de mortalidad ($TL_{50} = 4.82$ d) sin diferencias significativas respecto a la mezcla en pelets. En contraste el polvo con esporas de *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 gr de polvo) sólo mató $1.36 \pm 13.56\%$ de las cucarachas tratadas y en el pelet contaminado con esporas de *B. bassiana* sin ácido bórico no hubo mortalidad. La asociación del ácido bórico y el hongo demuestra una interacción de sinergismo entre estos dos agentes que causa una mortalidad alta sobre ninfas de la cucaracha *P. americana*. Estos resultados son promisorios y confirman el potencial de *Beauveria bassiana* en combinación con ácido bórico como alternativa al manejo de la cucaracha americana.

Palabras clave: cucaracha americana, cebos, hongos entomopatógenos, control integrado.

ABSTRACT

The entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1976 were tested against nymphs and adults of the American cockroach *Periplaneta americana* under laboratory conditions (1.1×10^6 conidia/cockroach, $T=24 \pm 2^\circ\text{C}$ and $\text{RH}=50 \pm 10\%$). The isolates tested against nymphs and adults of *P. americana* showed a low pathogenic potential and significant differences in percentage mortality. Adults exhibited lesser percent mortality than nymphs, which showed behavioral changes once they received a conidial suspension. The two most virulent isolates were selected and tested on three representative age's groups of *P. americana*. A second experiment was conducted to evaluate if different mortality could exist in adult cockroach infected under controlled conditions ($85 \pm 10\%$, 27°C). American cockroach adults were susceptible to infection by *M. anisopliae* and *B. bassiana* under controlled condition; at high RH ($85 \pm 10\%$) these fungi caused more mortality (47%) compared with the laboratory conditions tested which reached 3% mortality.

To enhance the effectiveness of the entomopathogenic fungi the compatibility of the boric acid was evaluated with two fungus isolates, one of *M. anisopliae* and one of *B. bassiana*, by quantifying the percent fungi germination in water-agar. The exposure of spores of both fungi to boric acid during 12, 24 and 36 h revealed a negative effect on the germination mainly in *M. anisopliae*, which showed decrease in the germination percentage when increasing the concentration and the time of exposure, whereas germination of *B. bassiana* had less drastic reductions, expressing more tolerance to the concentrations tested. Baits of boric acid were also evaluated with concentrations 3, 4 and 7% against nymphs of *P. americana*; the results showed that any concentration caused mortality higher than 5% and there was no repellence of the cockroaches at these concentrations. Finally powdered and pellet baits combining boric acid (1, 3 and 5%) and *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 g dust and 2.5×10^8 esp / pellet, respectively) were offered to nymphs of *P. americana* (3^o and 4^o instars), resulting in a much higher and quicker mortality (higher than 50%), suggesting high compatibility between both agents. The highest mortality was $91.68 \pm 12.90\%$ ($\text{TL}_{50} = 3.81$ d) caused by the combination of 5% of boric acid with spores of *B. bassiana* of the powdered bait, followed by the same mixture but in pellets, which caused mortality of $88.66 \pm 13.56\%$ ($\text{TL}_{50} = 4.57$ d). The combination of 3% of boric acid and spores of *B. bassiana* in powdered bait caused $81.62 \pm 11.07\%$ of mortality ($\text{TL}_{50} = 4.82$ d) without significant differences to the mixture of 5% of boric acid and spores of *B. bassiana* in the bait in pellets. The control powder with

spores of *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 g dust) only killed $1.36 \pm 13.56\%$ of the treated cockroaches, whereas pellets with spores of *B. bassiana* without boric acid did not cause mortality. The association of the boric acid and the fungus *B. bassiana* showed a synergistic interaction between these agents causing high mortality on nymphs of the cockroach *P. americana*. The laboratory results are promising and confirm the potential of *B. bassiana* combined with boric acid as an alternative for the cockroach management.

Key words: American cockroach, baits, entomopathogenic fungus, integrated control.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.

Las cucarachas son insectos aplanados dorso-ventralmente con la cabeza oculta bajo el pronoto y pertenecen al orden Blattaria, este grupo cuenta con aproximadamente 3,500 especies en el mundo (Bennett *et al.* 1997). Las cucarachas pueden ser clasificadas ecológicamente como domesticas, peridomesticas y de vida libre. Las especies peridomesticas son las que viven alrededor del hábitat humano y están asociadas al aprovechamiento del progreso de las civilizaciones. Este grupo está representado principalmente por 11 especies de cucarachas de importancia médica y veterinaria incluyendo a la cucaracha americana, *Periplaneta americana* (L.) (Brenner, 2002).

P. americana es una plaga cosmopolita de origen africano, distribuida en climas tropicales y está asociada como vector de bacterias y protozoarios que causan enfermedades que afectan a los seres humanos como: gastroenteritis, diarreas, disentería, tuberculosis, cólera y asma bronquial (Milner y Pereira, 2000). La cucaracha americana suele ser controlada con insecticidas organosintéticos (Schal *et al.*, 1993). Sin embargo, Chad y Schal (2004) reportaron que la resistencia a estos insecticidas se ha generalizado en las poblaciones de esta cucaracha, esto ha motivado a la búsqueda y desarrollo de métodos alternativos diferentes a los insecticidas convencionales, empleando agentes biológicos como los hongos entomopatógenos (Pachamutu *et al.*, 1999).

Los trabajos para evaluar el desarrollo y eficacia de estos hongos se han enfocado en el control de plagas de importancia agrícola y pocos trabajos se han enfocado en este sentido con plagas urbanas como termitas, hormigas y cucarachas (Zurek *et al.*, 2003). El desarrollo de estas alternativas para el control de estas especies de cucarachas de importancia urbana ha cobrado cada día mayor interés. Además, existe la preocupación de cuidar el ambiente y por ello la exposición del hombre a las sustancias químicas dañinas en el aire, la comida y agua han restringido el uso de plaguicidas químicos debido a que *P. americana* suele encontrarse dentro de los hogares y lugares de servicio como hospitales, restaurantes y hoteles (Kaakeh *et al.*, 1996; Pachamuthu y Kamble, 2000).

En este sentido, los hongos entomopatógenos pueden ser una opción viable para el control de las cucarachas por su alta especificidad, dispersión pasiva, seguridad al ambiente incluyendo su baja actividad contra mamíferos y aves (Schal y Hamilton, 1991; Pachamuthu y Kamble, 2000). Una de las opciones para mejorar la eficacia de los hongos entomopatógenos es la combinación con insecticidas

orgánicos (Kaakeh *et al.* 1997; Pachamutu *et al.* 1999; Pachamutu y Kamble, 2000; Zurek *et al.* 2002), y otros métodos alternativos como el ácido bórico (Zurek *et al.*, 2002; Chad *et al.*, 2004) o insecticidas vegetales como el Neem, *Azadiracta indica* (Ritcher *et al.*, 1997).

A pesar de que los hongos entomopatógenos tienen la capacidad patogénica para ser un agente potencialmente efectivo el tiempo requerido para controlar a las cucarachas ha sido el factor más importante para limitar su aplicación. Por consiguiente, surgió la necesidad crítica reforzar la actividad biológica de los hongos entomopatógenos con la integración de dosis subletales de otros agentes insecticidas (Pachamuthu *et al.* 1999). Una opción estudiada ha sido la adición de polvos como el ácido bórico, El uso de este agente ha sido empleado para incrementar la virulencia de patógenos de insectos reportado con un efecto de intensificar el poder infectivo de patógenos como *Bacillus thuriangiensis* (Tanada y Kaya 1993) y *M. anisopliae* (Zurek *et al.* 2002).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un cebo como una alternativa a los insecticidas organosintéticos para el control de cucarachas en el ámbito residencial e industrial. Con este fin se combinó el ácido bórico y los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* buscando acelerar su actividad patogénica contra *P. americana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la patogenicidad de cuatro aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre ninfas y adultos de *P. americana* en dos condiciones de humedad.
- Evaluar el efecto sinérgico del ácido bórico sobre la actividad patogénica de *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

CAPÍTULO 1

REVISION DE LITERATURA

1.1 Las Cucarachas

Basados en evidencias fósiles se sabe que las cucarachas han estado presentes en la tierra desde hace aproximadamente 350 millones a partir del periodo Siluriano (Brenner 2002). Su tamaño varía considerablemente entre especies, las cucarachas son uno de los grupos de insectos más adaptables y exitosos, ellas han podido sobrevivir a muchos cambios ambientales a lo largo de millones de años. Hay aproximadamente 3,500 especies de cucarachas en el mundo. (Bennett et al. 1997).

Las cucarachas pueden ser clasificadas ecológicamente como domésticas, peridomésticas y silvestres. Las especies **domésticas** viven casi exclusivamente en el interior y son altamente dependientes de los recursos que les proporciona el hombre (comida, agua y refugio) para sobrevivir. Las especies domésticas incluyen a la cucaracha bandeada, *Supella longipalpa* (Blattodea: Blattellidae) y la cucaracha alemana, *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). Las especies **peridomésticas** son las que viven alrededor del hábitat humano y no requieren de ellos para su supervivencia, ellas están asociadas al aprovechamiento del progreso de las civilizaciones. Este grupo está representado por la cucaracha americana, *Periplaneta americana*, cucaracha australiana, *Periplaneta australasiae*, cucaracha café, *Periplaneta brunnea*, cucaracha ahumada, *Periplaneta fuliginosa* y la cucaracha oriental *Blatta orientalis*, todas ellas pertenecientes a Blattodea: Blattidae. Las especies **silvestres** son las que sobreviven independientes de los humanos. Este grupo incluye más del 95% de las especies existentes en el mundo. (Brenner 2002).

Las cucarachas están reconocidas dentro del orden Blattaria. Aunque la mayoría de especies son silvestres y no están directamente asociadas con la gente, algunas están estrechamente asociadas con los ambientes internos del hombre. Su comportamiento alimenticio omnívoro, facilitado por sus apéndices bucales masticadores, ha contribuido a estrechar físicamente la relación entre las poblaciones de las cucarachas peridomésticas y los humanos, con un resultado de exposición constante del hombre a estas plagas (Brenner, 2002).

1.1.1 Importancia de las cucarachas como plaga urbana.

Las cucarachas peridomésticas son las plagas de mayor importancia económica en áreas urbanas dada su estrecha asociación con los humanos, debido a que normalmente se alimentan de la comida, humana o animal o cualquier bebida, así como animales muertos y materiales de las plantas, piel, pelo, papel, tejidos, y almidón. Además, su presencia lleva consigo la asociación de problemas de salud humana, la contaminación de la comida, impregnándola con un olor desagradable, y pueden transmitir microorganismos de varios tipos, los cuales son transportados en las patas, el cuerpo y en sus excretas que pueden provocar, gastroenteritis, diarreas, disentería, tuberculosis, cólera y asma bronquial. Sin embargo, su estatus como plaga urbana es controversial porque a pesar de tener la capacidad para transportar una gran variedad de patógenos nocivos en humanos (*Salmomella*, *Staphilococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia coli* y *Shigella disenteriae* y los protozoarios que causan la hepatitis B y *Toxoplasmosis parasitica*, principalmente), mas bien su aversión es expresada con “desagrado” que en ocasiones puede causar disturbios psicológicos y estrés mental (Smith y Whitman, 1996).

1.1.2 Descripción de *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattidae).

Dentro de las 11 especies de cucarachas comúnmente encontradas en los alrededores de los hogares y de importancia medica y veterinaria se encuentra la cucaracha americana o *Periplaneta americana* (L.), plaga de origen africano distribuida mundialmente. Esta especie, denominada comúnmente “cucaracha americana” de origen tropical, está perfectamente adaptada a las condiciones de México, en zonas de climas calurosos y húmedos.

En algunas partes del mundo, como en India, esta especie de cucaracha predomina en lugar de *Blattella germanica*, incluso en las casas. *P. americana* suele habitar en el interior de los edificios (sótanos, calderas, cocinas, áreas calientes en proceso de fabricación de productos alimenticios). Puede emerger desde las redes de alcantarillado durante la noche cuando son más activas y suelen ser gregarias, en el día, viven en huecos y grietas que son oscuros y húmedos. Además, les gusta estar en superficies porosas como la madera, el cartón y el papel porque pueden llenar estas superficies con su olor, lo cual atrae a otras cucarachas a estas mismas áreas (Brenner, 2002).

La cucaracha americana es de color castaño a rojizo, salvo una banda de color amarillo alrededor del borde del pronotum, la cual es más ancha en el margen posterior. La cucaracha americana es una de las especies más grandes, los adultos miden de 34-53 mm, son alados y capaces de volar, viven un promedio de 15 meses, pero su longevidad puede exceder los 2 años. Los machos parecen ser considerablemente más largos que las hembras porque sus alas extienden 4 a 8 mm más allá de la punta del abdomen, mientras que en las hembras no sucede, se reproducen durante todo el año (Brenner, 2002).

Ambos sexos tienen un par de cercos delgados, articulado a la punta del abdomen. Los cercos de las hembras tienen 13 o 14 segmentos y los machos tienen 18 o 19 (Bell, 1981). Los machos tienen un par de estiletes entre los cercos. La presencia de 2 pares de accesorios en la punta del abdomen del macho, comparado con 1 par en la hembra, es uno de los rasgos morfológicos que separa los sexos. Las hembras de la cucaracha americana depositan y pegan sus huevos (ooteca) en áreas abrigadas o cercanas al piso, generalmente cerca de una fuente de alimento. Una ooteca (8 mm de largo) se forma cada mes hasta que han producido de 6 a 14 y cada una contiene de 12 a 16 embriones. Los huevos se incuban entre 5 a 7 semanas, las primeras ninfas son de color blanquecino-marrón y posteriormente se tornan de color rojizo.

Para alcanzar su desarrollo como adultos las ninfas completan su desarrollo típicamente en 13-14 meses atravesando por 13 mudas y viven en este estado hasta 15 meses. El primer instar de esta cucaracha, inmediatamente después de salir de la ooteca, consume su piel embrionaria. Las ninfas son blancas, después se vuelven café grisáceo. Tienen una longitud de 3.5 mm. En los primeros instars, las hembras tienen una muesca en medio del margen posterior del noveno esternito, considerando que en los machos, este margen es liso o sólo ligeramente dentado. Los instars subsiguientes son casi uniformemente de color castaño rojizo, aunque los márgenes posteriores de segmentos torácicos y abdominales son de un color más oscuro, dando a los insectos una apariencia rayada transversalmente. En la muda final, las alas completamente formadas aparecen, mientras se extienden por completo durante 25 a 30 minutos. Los adultos tienen la capacidad de vivir por lo menos dos a tres meses sin alimento, un mes sin agua y sobrevivir fácilmente a las temperaturas de congelación al aire libre, sin embargo, la temperatura preferida por adultos y ninfas es 28 °C, y permanecen activos a 21 °C (Bell, 1981).

1.1.3 Prevención y Control de *Periplaneta americana*.

Entender la biología y el comportamiento básico de las cucarachas es esencial para su manejo, tradicionalmente las cucarachas han sido controladas usando una variedad de químicos tóxicos aplicados como plaguicidas residuales, muchos son formulados con ingredientes de acción neurotóxica, que afectan el sistema nervioso causando fallas locomotoras y respiratorias. Estos incluyen insecticidas organofosforados, carbamatos, insecticidas de origen botánico como piretrinas y piretroides (Schal y Hamilton, 1990; Schal *et al.*, 1993). Aunque actualmente también se usan otros ingredientes con diferente modo de acción, como el ácido bórico que cuando es ingerido (aplicado como polvo fino o en solución diluida), daña el epitelio del intestino de las cucarachas y las mata por la interferencia en la absorción de nutrientes o por la reducción cuticular de lípidos causando desecación (Ebeling *et al.* 1996).

Otros ingredientes activos con otros modos de acción, tales como la hidrametilona y la sulfluramida son inhibidores metabólicos, los cuales interrumpen la producción a energía. Todas estas formulaciones aplicadas para el manejo y control de cucarachas incluyen, polvos humectables, emulsiones, aerosoles, cebos y polvos. El uso de cebos que contenga alguno de los ingredientes activos mencionados se ha empleado extensivamente en el control de cucarachas en forma de cebaderos que son colocadas dentro y fuera de las áreas afectadas para reducir la exposición humana a los agentes químicos. Otras formulaciones de cebos en gel o en pasta son también usadas en puntos más dirigidos como hendiduras y grietas o rendijas, haciendo con esto inaccesible el contacto con niños y mascotas. (Brenner, 2002).

Sin embargo, para un manejo efectivo y consistente de cucarachas, se requiere considerar grados de planeación y organización para el desarrollo de programas multifacéticos que incluyen tratamientos de inspección (comúnmente incluyen el uso de múltiples formulaciones insecticidas además de técnicas no químicas aplicadas dentro y alrededor de los lugares infestados), la educación de los clientes y el seguimiento, que es importante para mantener adecuados niveles de control a través de todo el proceso de manejo. Los métodos de control de cucarachas incluyen los tratamientos preventivos y correctivos. Las medidas preventivas dan énfasis a la higiene para eliminar desechos y fuentes de comida, además del sellado de las rutas de acceso (Cochran, 1989).

Sin embargo, la aplicación de estas medidas correctivas para suprimir las infestaciones establecidas enfatizan el uso de insecticidas y normalmente implica la fumigación con insecticidas de actividad residual larga en intervalos de tiempo fijos (Schal y Hamilton, 1990). Hay numerosas formulaciones de insecticidas para el control de cucarachas en el mercado, algunas se etiquetan de "uso general" y estas son dirigidas para el uso del dueño de una casa, hay otras que se etiquetan "uso restringido" para un controlador profesional o aplicadores con licencia. (Benson y Zungoli, 1997). Los reguladores de crecimiento pueden ser usados para el control preventivo de cucarachas adultas, los dos más usados comúnmente son los análogos de la hormona juvenil, que regula la maduración morfológica y el proceso de reproducción y los inhibidores de la síntesis de quitina, los cuales evitan la formación normal de la quitina durante el proceso de muda. Ambos son altamente específicos para artrópodos, presentan muy baja toxicidad en mamíferos y son efectivos a excepcionalmente bajos rangos de aplicación.

Actualmente, se han extendido el número de reportes por causa de resistencia a insecticidas organosintéticos en poblaciones de *P. americana*. Las restricciones de regulación impuestas en 1996 por la agencia de Protección de la Calidad de los Alimentos de Estados Unidos de América para el uso y manejo de insecticidas, menciona que involucra un riesgo tanto para la salud como para el ambiente y la emergencia de resistencia a insecticidas en poblaciones de esta cucaracha (Cochran, 1989; 1995; Chad y Schal, 2004); lo que ha motivado a seguir las investigaciones en la aplicación de medidas correctivas alternas como la colocación de trampas de cebos tóxicos que pueden proporcionar el control suficiente bajo las condiciones apropiadas y además técnicas que involucren agentes de control biológico. La aplicación del manejo integrado de plagas donde se incorporan a varias técnicas de control, ha contribuido significativamente al éxito en el control de cucarachas y con esto se realiza el uso de agentes no tóxicos, como trampas adhesivas, aparatos para aspirar, tierras de diatomáceas, repelentes de sílica-gel y desecantes. El desarrollo de agentes de control biológico como alternativa a los insecticidas químicos para el control de especies de cucarachas de importancia urbana es un asunto de interés creciente. Las preocupaciones para el ambiente y la exposición del hombre a las sustancias químicas dañinas en el aire, la comida y el agua han estimulado a que existan mayores restricciones de acuerdo a la legislación, con respecto al uso de plaguicidas químicos, particularmente para plagas encontradas en los hogares y lugares de servicio, como hospitales, restaurantes y hoteles (Kaakeh *et al.*, 1996; Pachamuthu y Kamble, 2000; Quesada *et al.*, 2004).

1.1.4 Uso de extractos vegetales para el control de *P. americana*

Richter *et al.*, (1997) propusieron el uso de extractos vegetales como el NeemAzal de *Azadiracta indica* agente de control biológico para el Manejo de *P. americana*, señalan que los ingredientes activos con propiedades insecticidas del árbol del Neem se encuentran en las semillas y son las azadiractinas. Este grupo de componentes no son tóxicos para los mamíferos y son biodegradados fácilmente por las plantas y el suelo, además de cumplir con los requerimientos toxicológicos y de seguridad para el ambiente. NeemAzal se elabora a través de una extracción simple del aceite procedente de las semillas del árbol del Neem, que permite obtener una producción económica y de calidad estandarizada del ingrediente activo.

Adler y Uebel (1985) reportaron un incremento en la mortalidad y una disminución en el desarrollo de ninfas de los últimos instares de *P. americana*, al ser alimentadas con pelets impregnados con Margosan-O (formulación comercial de extracto de neem que contiene *Azadiractina*) después de una aplicación tópica en el abdomen de 6 especies diferentes de cucarachas incluyendo *P. americana*. Richter *et al.*, (1997) probaron el efecto de *A. indica* en el desarrollo, la reproducción y la fertilidad de *P. americana* cuando la cucarachas fueron alimentadas con preparaciones de NeemAzal (*Azadiractina* 20%), esta sustancia fue mezclada con alimento. Según Richter y Bärwolf, (1994) una cucaracha debía tomar alrededor de 5 µg de *Azadiractina* por día contenidos en 20 mg de comida, por lo que seleccionaron tres concentraciones 0.2%, 2% y 10%. Se demostró en la reducción de consumo alimenticio un efecto de repelencia al NeemAzal cuando ambos fueron mezclados, el decremento en la ingestión del alimento dio como resultado un retardo en el crecimiento de las ninfas y finalmente en una reducción de la reproducción y la fertilidad de los adultos. En las ninfas del último instar el déficit en la cantidad de crecimiento fue del 10% en los grupos tratados con 0.2% y 2% de NeemAzal en el alimento, y 30% en los tratamientos al 10% de NeenAzal. Las hembras tratadas fueron afectadas en la postura de ootecas. La concentración al 10% del extracto en la comida generó una reducción del 50% en la producción de ootecas depositadas, incluyendo en este efecto la disminución en el número de ootecas viables; 60% de reducción en el caso de 2% de Neemazal, 50% en las ootecas de las hembras tratadas con 10%, las que además fueron considerablemente más pequeñas que las ootecas normales. Estas ootecas pequeñas fueron fértiles pero contenían considerablemente menos embriones (7.7 ± 0.7 ninfas/ooteca) comparados con el control (14.8 ± 1.4 ninfas/ooteca).

1.1.5 Control biológico de cucarachas.

El desarrollo de agentes de control biológico como alternativa a los insecticidas químicos para el control de especies de cucarachas de importancia urbana es un asunto de interés creciente. Las preocupaciones para el ambiente y la exposición del hombre a las sustancias químicas dañinas en el aire, la comida y agua han estimulado a que existan mayores restricciones de acuerdo a la legislación con respecto al uso de plaguicidas químicos, particularmente para plagas encontradas en los hogares (Kaakeh *et al.*, 1996; Pachamuthu y Kamble, 2000; Quesada *et al.*, 2004).

Las formas de control biológico aplicadas para el manejo de cucarachas son el uso de avispas parasíticas, nematodos entomofílicos y hongos entomopatógenos. Los parasitoides *Comperia merceti* (Himenoptera: Evaniidae) y *Aprostocetus hagenowii* (Himenoptera: Eulofidae), prefieren las ootecas de *P. americana*, de las cuales pueden emerger hasta 260 individuos de cada ooteca y puede alcanzar hasta el 90% de parasitismo (Lebeck, 1991). Sin embargo, esta técnica de control no ha podido ser implementada por la poca aceptación de las avispas, cuya presencia pueden ser tan incómodas como las cucarachas. En este caso los aspectos benéficos de reducir o de eliminar el uso de insecticidas tradicionales se puede también considerar menos importante que la introducción intencional de otro organismo vivo al ambiente (Schal y Hamilton, 1990).

Tsia y Cahill (1970) encontraron nueve especies de nematodos parásitos de cucarachas y los últimos estudios indican que el género *Steinernema* ha sido efectivo en pruebas de campo (Schal y Hamilton, 1990). Mathur *et al.*, (1997) realizaron pruebas de laboratorio sobre adultos de *P. americana* inoculando 5000 nemátodos de la especie *S. carpocapsae* en estado juvenil y obtuvieron una mortalidad del 70% en machos y 50% en hembras, los valores de DL₅₀ se registraron en 3467.78 para los machos y 4986.05 para las hembras. Los cambios registrados en el intestino medio de los insectos debidos a la penetración de los nematodos fueron la desintegración de las células columnares, destrucción del citoplasma y degeneración de núcleos a nivel celular.

También, se han realizado investigaciones con protozoarios depredadores, bacterias, hongos y virus entomopatógenos, los cuales son potencialmente usados para el control de cucarachas por su dispersión pasiva, seguridad al ambiente, su alto potencial de especificidad y porque no son detectados en las casas. Algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* causaron arriba del 45% de

mortalidad sobre *P. americana* cuando fueron alimentadas con altas concentraciones de esta bacteria. (Milner y Pereira, 2000). Steenberg *et. al.*, (1998) encontraron que el hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, la bacteria *Serratia marcescens* y un nematodo mermitido fueron encontrados infectando proporciones bajas de *Blatella germanica* colectadas en diez localidades, que incluyeron un hospital, un restaurante y una tienda de mascotas en Dinamarca.

1.2 Control biológico de cucarachas con hongos entomopatógenos. La literatura sobre los patógenos de cucarachas fue revisada por Suiter (1997), quien concluye que la patogenicidad de muchos de los patógenos descritos no se ha probado en campo, y que los agentes más prometedores para el control de esta plaga son los hongos, como *Cordyceps blattae*, el cual fue probado por Roth and Willis (1960) y resultó ser altamente patogénico para la cucaracha alemana, sin embargo, la producción masiva de este patógeno se dificulta. El uso de insecticidas biológicos basados en hongos entomopatógenos resulta ser una alternativa potencial, ya que tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros). Así mismo, los hongos pueden jugar un papel muy importante en la salud humana ya que algunas especies son virulentas para insectos vectores de enfermedades como las moscas, mosquitos y cucarachas.

Los hongos entomopatógenos requieren de una humedad alta para poder infectar a su huésped, por lo que las epizootias naturales son más comunes durante condiciones de alta humedad (Tanada y Kaya 1993). Estos microorganismos actúan por contacto, causan la patogenicidad por la invasión a través del integumento del insecto. Se considera que, una vez que las unidades infectivas, conidia o espora se adhiere a la superficie cuticular. En condiciones favorables de humedad y temperatura (H.R. \leq 70 % y 27-32 °C) las esporas que logran alcanzar al insecto forman un tubo germinativo buscando puntos que faciliten su penetración. Esta penetración es ayudada por la formación de células apresoriales, que ejercen presión física sobre el exoesqueleto, además de la producción de enzimas proteolíticas, proteasas, quitinasas y lipasas, que pueden degradar la cutícula y entrar en forma mecánica y actuar de manera sinérgica para digerir y penetrar la epicutícula (Ferron 1978, Hajek y St. Leger 1994). Las principales áreas de penetración son la región bucal, el ano, las regiones intersegmentales y los espiráculos, sitios donde existe alta humedad que promueve la germinación de las esporas y permite la fácil penetración de las hifas. La invasión del hemocele y tejidos se produce a través de cuerpos hifales entre las 24 y 48 horas siguientes.

La muerte del hospedante ocurre debido a las micotoxinas segregadas y a los daños mecánicos; luego producen sustancias bactericidas que permiten el crecimiento de hifas en el cadáver, aprovechando los nutrientes para su desarrollo y esporulación al exterior. (Hajek y St. Leger 1994).

Dentro de los hongos entomopatógenos se encuentran especies que han sido clasificadas como generalistas (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) y específicas (*Aschersonia aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii*, *Entomophthora spp.*) (Tanada y Kaya 1993). Se considera que los hongos generalistas tienen la capacidad de infectar diferentes órdenes de insectos, mientras que en los específicos la actividad se restringe a una especie, una familia o un grupo de insectos. Los estudios han demostrado que los hongos entomopatógenos Hyphomycetes producen toxinas insecticidas importantes. Una toxina microbiana se puede definir como un veneno biológico derivado de un microorganismo; la mayoría de estas toxinas producidas por los patógenos son péptidos, pero varían grandemente en términos de la estructura, de la toxicidad y de la especificidad. Los diferentes efectos de las toxinas producidas por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, han sido observados sobre diferentes especies de insectos Roberts (1966; 1967), encontró en sus experimentos con *Metarhizium*, sobre larvas de *Bombyx mori* (L.), las "destruxinas" las cuales pueden causar la muerte al insecto; sin embargo, la toxicosis no fue el único factor involucrado.

En cuanto a los efectos producidos por las toxinas aisladas de *Beauveria*, se ha observado que éstas influyen sobre una serie de aspectos fisiológicos del insecto e incitan una progresiva degeneración del tejido, a causa de la deshidratación de sus células. Se ha señalado que tales toxinas, además de producirle la muerte al insecto, pueden alterar procesos vitales en la metamorfosis y en la fecundidad (Taborsky V. 1992).

Mohan *et al.*, 1999 evaluaron en laboratorio la patogenicidad de tres aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *Periplaneta americana* basándose en los hábitos gregarios de estos insectos, para promover una infección inicial y una subsiguiente diseminación, apoyados en que *B. bassiana* es un hongo con un amplio rango de hospederos y se ha reportado infectando a *P. americana* y *B. germánica* además de que su ocurrencia natural en lugares con climas tropicales es mucho más común que la de *M. anisopliae* (Zukowski y Bajan 1996).

Steenberg *et. al.*, (1998), trabajaron con aislamientos pertenecientes a seis especies de hyphomycetes (*Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii*) seleccionados por ser infectivos contra 4 especies de cucarachas sinantrópicas (*Blattella germanica*, *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana* y *Supella longipalpa*) en bioensayos con altas concentraciones de esporas. Todos los aislamientos fúngicos fueron infectivos pero *B. orientalis* fue notablemente menos susceptible comparada con las otras especies. En bioensayos preliminares, *M. anisopliae* (aislado de un escarabajo) fue más virulento en ninfas, hembras y machos de *B. germanica* comparados con el homólogo de *P. fumosoroseus*. Para ambas especies de hongos las hembras de *B. germanica* parecían más susceptibles a la infección que los machos. La esporulación de los cadáveres hembras fue significativamente más alta para *P. fumosoroseus* que produjo 10 veces más conidia por cadáver comparado con *M. anisopliae*.

1.2.1 Efecto de la humedad relativa en la patogenicidad de los hongos entomopatógenos.

Como se ha mencionado el potencial epizoótico de un hongo entomopatógeno, depende altamente de la intensidad de esporulación sobre el cadáver de su hospedero y sobre la progresiva habilidad del hongo para propagarse en los insectos saludables (transmisión horizontal) este potencial es dependiente de la fluctuación de humedad y temperatura en el ambiente. (Romaña y Fargues 1987).

Ferron (1977) menciona que Müller-Kögler, (1965) hipotetizó que la humedad relativa en el inicio de una infección causada por hiphomycetes como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea* y *Paecilomyces*, estos pueden aprovechar la humedad del integumento del insecto y que la fase de incubación de la enfermedad donde el desarrollo y la producción de toxinas, características de esta fase son relativamente independientes al ambiente externo. Sin embargo, las fases saprofítica y reproductiva para la momificación del cadáver y el desarrollo de conidiosporas sobre la superficie del cuerpo del insecto requiere de una humedad relativa cercana al punto de saturación. Por lo tanto, Ferron (1977) concluye que *B. bassiana* inoculada en el integumento de larvas del escarabajo *Scolytus scolytus*, puede ser infectiva incluso a humedades relativas tan bajas como el 51%, pero para el desarrollo del micelio en la superficie de los cadáveres se necesitan HR \geq 92%. Ramoska (1984) menciona que la humedad relativa es el factor predominante que influye en la eficacia de *Beauveria bassiana* contra la chinche *Blissus leucopterus* y concluye que los hongos entomopatógenos no pueden ser un agente de control eficaz estando en ambientes secos.

Doberski (1981) reportó que larvas, pupas y adultos de *Scolytus scolytus* fueron susceptibles a la infección causada por los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces farinosus* con bajas dosis de conidias. En contraste, el efecto de las condiciones ambientales, específicamente humedad y temperatura modifican la patogenicidad de los tres hongos. Los rangos de temperatura probados fueron 2, 6, 10, 15, 20 y 25 °C, y el porcentaje de mortalidad registrado disminuyó al decremento de la temperatura, siendo más afectados los aislamientos de *M. anisopliae*, los cuales no provocaron infección bajo los 10 °C, sin embargo, los adultos expuestos a *B. bassiana* con las concentraciones 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 esp/mL a partir de los 15° presentaron infección. Los valores de humedad probados fueron de 51, 74, 86, 90, 95, 97.5 y 100%. Los tres hongos causaron patogenicidad y bajos niveles de mortalidad, pero a partir del 95% la mortalidad fue provocada en su mayoría por efecto de las bacterias. Por lo que se concluye que la infección por estos hongos, fue mucho más rápida al incrementarse la humedad.

1.2.2 Mecanismos de defensa de los insectos contra los hongos entomopatógenos

Las barreras estructurales, es decir la defensa del insecto contra estos patógenos son la rigidez del exoesqueleto y la membrana peritrófica de las paredes del epitelio intestinal (St. Leger et. al. 1989). Los hongos al atravesar estas estructuras llegan hasta el hemocele donde deben superar las defensas activas como la fagocitosis, encapsulación y mecanización. La habilidad del hongo para infectar a un insecto puede estar influenciada por el estado fisiológico del hospedero, ya que muchos hongos pueden infectar específicamente a un particular estado de desarrollo, como huevos, larvas, pupas o adultos. Se cree que la cutícula posee sustancias de inactivación y que algunos de los estados de desarrollo podrían presentar condiciones fisiológicas desfavorables para los hongos. Conforme el insecto se desarrolla, realiza varias mudas, siendo este proceso un mecanismo de defensa (Boucias y Pendland 1984).

Hajek y St Leger (1994) demostraron que la baja patogenicidad de un hongo se debe a la naturaleza de la cutícula, su densidad, grosor y el grado de esclerotización. Boucias et al., (1984) sugieren que la susceptibilidad de larvas de noctuidos a hongos hyphomicetes disminuye al aumentar la edad del hospedante. Sin embargo, Mohamed *et al.*, (1977) reportaron que instares de I y II de *Heliothis zea* fueron menos susceptibles que los instares III y IV. Los últimos instares de larvas de *Scarabaeidae* fueron más susceptibles a la infección por hongos que las del segundo instar. Maniania y Odulaja

(1998) concluyen que la edad del hospedante tiene un efecto pronunciado sobre la susceptibilidad a la infección por *M. anisopliae* en dos especies de mosca Tsetse, *Glossina morsitans morsitans* y *G. m. centralis*; este estudio reafirma la importancia de entender la interacción entre el hospedante y el patógeno, porque esta es la clave para entender los factores que se involucran en el inicio y desarrollo de epizootias. (Tanada and Fuxa, 1987). Fargues y Luz (1998), reportan que la esporulación en insectos muertos por la infección de *B. bassiana* alcanzó más de 10^5 conidia/ninfa con temperaturas de 20 a 25°C y H.R. de 97% por al menos 12h/día, mientras que las ninfas de 3 y 5 instar requieren de un periodo de 16h/día o más a las mismas condiciones de humedad y temperatura.

1.2.3 Ventajas y desventajas en el uso de hongos entomopatógenos para en control de cucarachas.

Según CAB Internacional (1998) el hongo entomopatógeno, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin ha sido aislado de 200 especies de insectos incluyendo *Blattella germanica* y *Periplaneta americana* (Quesada. *et al.*, 2004). Sin embargo, su acción lenta (normalmente de 30 días aproximados) y la eficacia inconsistente han confundido el uso eficaz de este patógeno en condiciones de campo (Pachamutu *et al.*, 1999). Kaakeh *et al.* 1996 reportan de 26 a 30 días para obtener una mortalidad del 90% o más con *M. anisopliae* probado en la cucaracha alemana por el método de contacto. (Pachamuthu y Kamble, 2000). La formulación comercial de *M. anisopliae* contra cucarachas, Bio-Path por EcoScience Corp. (Worcester, MA) estuvo a la venta por algunos años y recientemente se discontinuó. Zukowsky y Bajan (1996) reportan también varios aislamientos de *B. bassiana* como patógenos de la cucaracha alemana, *B. germanica*. Desafortunadamente, las cucarachas viven en ambientes que son generalmente muy secos para la aplicación de productos a base de hongos, lo que obstaculiza la persistencia o inicio de una epizootia en el hábitat de las cucarachas. Se necesita el desarrollo de una formulación microbiana que sea capaz de promover niveles de control equivalentes a los insecticidas químicos. Un nivel bajo en la mortalidad puede ser aceptable a cambio de la seguridad para el hombre que implementa el empleo de los hongos entomopatógenos. (Milner y Pereira, 2000).

Es importante determinar la virulencia de los patógenos y el comportamiento de respuesta de las cucarachas a las formulaciones probadas, además se debe evaluar la aceptación o repelencia de los ingredientes activos probados, ya que la formulación puede mejorar la eficacia de los agentes de control y aumentar la aceptación de las cucarachas para ofrecer mejores niveles de control. Ying *et al.*, (1996),

evaluaron las cámaras de Bio Path, EcoScience Co. en arenas de prueba con el uso de dos cámaras/m² y reportan tiempos de TL₅₀ de 4.1 y 11.9 días para machos y hembras respectivamente de la especie de cucaracha alemana. Esto lo relacionaron con un efecto de la humedad relativa sobre las arenas de prueba, afectando directamente la eficacia del micoinsecticida y en consecuencia concluyen que son necesarias humedades mayores al 50% para la eficacia de infecciones causadas por el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* sobre la cucaracha *B. germanica*. (Pachamutu *et al.*, 1999; Zurek *et al.*, 2002).

A pesar de que la mayoría de los trabajos se han enfocado en cuantificar y evaluar la mortalidad causada a la plaga directamente por el hongo. Quesada *et al.*, 2004 y Kaakeh *et al.*, 1996, consideraron que la mortalidad inicial causada por la aplicación del hongo puede ser seguida por una transmisión horizontal dentro de la población de la plaga, es decir la transmisión del hongo de cucaracha a cucaracha, un fenómeno que puede ser atribuido al comportamiento gregario de las cucarachas. La transmisión horizontal puede contribuir ampliamente a la diseminación de la infección como parte del desarrollo comercial de una formulación.

Quesada *et al.*, 2004, probaron cuatro concentraciones de esporas de *M. anisopliae* cepa EAMa 01/121-Su (4.2x10⁶, 4.2x10⁷, 4.2x10⁸, 4.2x10⁹, esp/mL), al aplicar 4 µL de cada dilución de esporas de manera tópica en los primeros segmentos abdominales ventrales de adultos de cucaracha alemana y obteniendo una DL₅₀ con un valor de 1.4x10⁷ esporas por mililitro y un valor de TL₅₀= 14.8 días y 5.3 días para 4.2x10⁸ y 4.2x10⁹ esporas por mililitro respectivamente.

La transmisión horizontal de *M. anisopliae* fue medida colocando un cadáver de adulto que presentaba profunda micosis en el centro del recipiente que contenía 10 adultos de cucaracha recién emergidos y saludables que presentó un radio de mortalidad del 87.5 y un TL₅₀ de 12.2 días, lo cual indica el potencial de esta cepa para ser transmitido de manera horizontal y diseminar la infección dentro de la población de insectos. Sin embargo, Kaakeh *et al.*, (1996), reportan que cucarachas muertas por el hongo no fueron comidas por las cucaracha saludables que generalmente muestran un comportamiento caníbal, lo que sugiere un mecanismo de repelencia al hongo por parte de las cucarachas.

1.3 Hongos entomopatógenos en combinación con dosis subletales de insecticidas químicos para aumentar su eficacia de control de plagas.

Una de las opciones para mejorar la eficacia de los hongos entomopatógenos es la combinación con insecticidas orgánicos, como el imidacloprid, clorpirifos, propetamfos, y ciflutrin (Kaakeh *et al.*, 1997; Pachamutu *et al.*, 1999; Pachamutu y Kamble, 2000, Zurek *et al.*,2002), y otros métodos alternativos como el ácido bórico (Zurek *et al.*,2002 ; Chad *et al.*,2004), tierras de diatomeas (Akbar *et al.*, 2004) o insecticidas vegetales como el NeemAzal de *Azadiracta indica* (Ritcher *et al.*, 1997).

La integración de un aislamiento fúngico con un insecticida requiere el conocimiento minucioso de la compatibilidad que existe entre los dos agentes, particularmente en el porcentaje de germinación de las esporas y el crecimiento de las colonias. Otro indicador de la compatibilidad es la esporulación del hongo, la cual puede ser afectada por el insecticida causando un efecto potencial inhibitorio y afectar de manera simultanea el desarrollo de la condición epizootica de la enfermedad o reducir la eficacia del hongo en campo. Sin embargo, los estudios de compatibilidad *in vitro* entre entomopatógenos e insecticidas han sido dirigidos para el control de plagas agrícolas, pero aún no han sido evaluados totalmente para el control de cucarachas en ambientes urbanos.

Además, la integración de agentes biológicos con concentraciones subletales de insecticidas proporciona la ventaja de reducir la contaminación de los hábitats urbanos, mejorando la seguridad del hombre. (Kaakeh *et al.*, 1997; Pachamutu *et al.*, 1999; Pachamutu y Kamble, 2000, Zurek *et al.*,2002 ; Chad *et al.*,2004),

Quintela y McCoy (1997, 1998) proponen mejorar la patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* con dosis subletales de imidacloprid y evaluar el efecto sinergista de estos dos hongos entomopatógenos y el insecticida en los primeros instares. En el año 1997 Quintela y McCoy combinaron *M. anisopliae* y *B. bassiana* con dosis subletales de imidacloprid, por contacto directo o por tratamiento oral, logrando incrementar la mortalidad y la micosis del 1^{er} instar del gorgojo *Diaprepes abbreviatus*. El TL₅₀ fue reducido significativamente a través del efecto sinérgico del tratamiento hongo/químico. El sinergismo solo ocurrió en concentraciones de imidacloprid de 100 ppm o mayores. En concentraciones del hongo a 10⁶ y 10⁷ esp/mL con imidacloprid en dosis de 100 ppm o más, la mortalidad de las larvas y la micosis alcanzaron del 90 al 100%.

Quintela y McCoy (1998) analizaron en laboratorio el impacto de concentraciones subletales de imidacloprid y de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* solos o en combinación sobre la movilidad, mortalidad y micosis del 1^{er} instar del gorgojo de la raíz de los cítricos *Diaprepes abbreviatus*. La aplicación de ambos hongos (5×10^3 , 5×10^4 y 5×10^5 conidia/g de suelo) en formulación oleosa y en polvo humectable no afectó el movimientos de la larva de *Diaprepes abbreviatus* en suelo a diferentes humedades (1-12%). La adición del imidacloprid al suelo en dosis de 5 mg/g de suelo o mayores disminuyó significativamente el movimiento larval. Por otra parte, cuando el químico se aplicó con un hongo el movimiento larval fue disminuido severamente. El tratamiento aplicado en suelo de esporas como polvo humectable (5×10^3 , 5×10^4 y 5×10^5 causó una mortalidad mínima (4.9-14.2% para y H.R. 2.0 a 8.0% con *M. anisopliae*) en larvas de *Diaprepes abbreviatus*. De hecho, la micosis larval (10.2%) fue encontrada solo para la formulación oleosa de *B. bassiana* a la concentración de 5×10^5 conidia/g de suelo. Cuando dosis subletales (50, 25, 5 y 0 $\mu\text{g/g}$ de suelo) de imidacloprid fueron combinadas con esporas de algún hongo y aplicadas a suelo, tanto la mortalidad larval como la micosis se incrementaron significativamente. 5×10^5 esporas de *B. bassiana* con 50 μg de imidacloprid produjeron 85% de mortalidad y 85% de micosis, 5×10^5 esporas de *M. anisopliae* con 50 μg de imidacloprid produjeron 89% de mortalidad y 98% de micosis.

Kaakeh *et al.*, (1997). Evaluaron la actividad biológica de *M. anisopliae* y de imidacloprid, mediante una exposición oral de cebos sólidos y líquidos en ninfas de *Blattella germanica*. Además determinaron el sinergismo entre estos dos agentes, sometiendo a las cucarachas a un contacto directo con las esporas del hongo o por aplicación tópica de conidioesporas de *M. anisopliae* y a continuación alimentadas con cebos de imidacloprid. Las cucarachas oralmente expuestas a cebos sólidos de imidacloprid exhibieron síntomas de toxicidad de manera inmediata (efecto knockdown dentro de los primeros 30 min), no obstante, las cucarachas se recobraron de estos síntomas. De igual manera sucedió en la exposición a cebos líquidos, un efecto de derribo temporal en los primeros minutos. Las aplicación en contacto directo de *M. anisopliae* y alimentación con imidacloprid, indicaron sinergismo (84.4-93.3 % en 13 días), comparada con la actividad de los componentes individuales. Las cucarachas murieron relativamente rápido cuando se alimentaron con midacloprid después de una aplicación tópica con suspensiones de esporas de *M. anisopliae*. Con dosis de 2.5×10^9 conidia/mL + 1000 ppm de imidacloprid se registró una mortalidad del 100% en 17 días, 2.5×10^9 conidia/mL + 500 ppm de imidacloprid causó 100% en 25 días. Lo que indica una posible interacción de sinergismo entre cebos de imidacloprid y *M. anisopliae*.

Concluyen que la mortalidad de las cucarachas inoculadas tópicamente con suspensiones de esporas, fue mayor al incrementar la concentración del hongo. Y que los cebos de imidacloprid utilizados en manejo de cucarachas tienen un potencial limitado, pero su actividad puede ser mejorada usándolos en combinación con un entomopatógeno como *M. anisopliae*.

Pachamutu *et al.* 1999 evaluaron la virulencia de *M. anisopliae* contra la cucaracha alemana (*B. germanica*) y determinaron la dosis letal requerida para matar el 50% de la población plaga además de evaluar la compatibilidad del hongo mediante pruebas *in vitro* con insecticidas usados comercialmente. Usaron 5 concentraciones de *M. anisopliae* (8×10^7 a 2×10^9 esp/mL), las cuales causaron un rango de mortalidad en las cucarachas del 31 al 86% en 21 días y un valor de $DL_{50} = 4.18 \times 10^8$ esp/mL. Para medir la compatibilidad de *M. anisopliae* con los insecticidas se midió el crecimiento de las colonias cultivadas en el medio ADS incorporado con las concentraciones de 0.5, 5, 50 y 500 ppm de clorpirifos y propetamfos, y 0.05, 0.5, 5 y 50 para ciflutrin, del cual se obtuvo un crecimiento radial del 96 al 97%. La esporulación del hongo fue significativamente diferente comparando el control (1.60×10^9 esp/caja cultivada) con los tratamientos de propetamfos y clorpirifos a 500 ppm que no presentó esporulación. Los tratamientos con diferencias no significativas comparados con el control, fueron clorpirifos a 5 ppm, propetamfos a 5 y 50 ppm y el ciflutrin a 50 ppm.

Pachamutu y Kamble, (2000), midieron el efecto de *M. anisopliae* solo y en combinación con dosis subletales de formulaciones comerciales de clorpirifos, propetamfos y ciflutrin sobre la mortalidad de *B. germanica*, combinaron esporas de *M. anisopliae* (4.18×10^8 esp/mL) y 0.5 a 50 ppm de clorpirifos y propetamfos y 0.05 a 5 ppm de ciflutrin en la selección de una dosis subletal, del cual obtuvieron las mortalidades de 5 a 20% para los insecticidas solos y de 48 a 70% para la combinación de *M. anisopliae* con los insecticidas. En otro bioensayo probaron concentraciones más altas 100 a 300 ppm de clorpirifos y propetamfos y 20 a 40 ppm de ciflutrin, de las cuales obtuvieron del 15 al 60% de mortalidad de cucarachas y en la combinación de los insecticidas con *M. anisopliae* la mortalidad de las cucarachas se incremento del 57.5 al 92.5%. El porcentaje de mortalidad en la combinación de insecticidas con *M. anisopliae* fue significativamente más alta que cuando se aplicaron los insecticidas solos. Se observó una interacción significativa en la combinación de *M. anisopliae* y múltiples concentraciones de insecticidas. La interacción indicó un efecto agregado para clorpirifos y ciflutrin y un efecto sinergista en la combinación con propetamfos.

1.3.1 El ácido bórico como manejo integrado para incrementar la eficacia en la patogenicidad de los hongos entomopatógenos.

En las dos últimas décadas los cebos han desplazado a las formulaciones en spray o fumigaciones, para el control de cucarachas y otras plagas urbanas, especialmente para formar parte de un programa de manejo integrado. La ventaja de los cebos (tabletas o gel), es que se aplican en forma más localizada al origen de la plaga, hendiduras, orificios o grietas y así las toxinas son muchos menos diseminadas y riesgosas para el humano. Los cebos de ácido bórico tienen un largo historial como insecticidas en el manejo de plagas urbanas y han demostrado ser una alternativa efectiva a los insecticidas neurotóxicos (formulaciones en spray de organofosforados, carbamatos y piretroides) empleados convencionalmente, ya que los cebos no requieren equipo especializado y su aplicación no es complicada. (Bennet *et al.*, 1996).

El ácido bórico (H_3BO_3) es un polvo no volátil y tiene una absorción considerada como nula a través de la piel, toxicidad relativamente baja en los mamíferos, no obstante, los cebos que contienen del 30 al 50% han sido poco efectivos, porque causan repelencia. Una propiedad favorable del ácido bórico es su alta solubilidad en agua y aparente falta de repelencia a dosis menores al 22% (Gore y Schal, 2004). El ácido bórico en soluciones de agua presenta la ventaja de servir como un medio en el cual los atrayentes; feromonas de agregación, olores de comida y fagoestimulantes puedan ser agregados a los cebos. (Gore *et al.*, 2004). Estudios recientes han mostrado que cebos líquidos que contienen ácido bórico y sacarosa pueden ser efectivos contra algunas especies de hormigas y de la mosca doméstica y para el control de cucarachas. El modo de acción del ácido bórico contra insectos no es del todo conocido, sin embargo, la destrucción de las paredes en el tracto digestivo y la penetración en el exoesqueleto ha sido reportada, Cochran (1995), menciona que el ácido bórico destruye el epitelio del intestino medio y sugiere que las cucarachas mueren de inanición. (Zurek *et al.*, 2002).

Gore y Schal (2004) evaluaron en laboratorio soluciones de ácido bórico y azúcares en diferentes concentraciones para el control de *Blattella germanica*. Determinaron la efectividad de tres boratos (tetraborato de sodio, octaborato disódico tetrahidratado y ácido bórico), colocaron viales que contenían concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5%, y como resultado obtuvieron mortalidad en los tres boratos, sin embargo, en concentraciones mayores al 2% de ácido bórico la TL_{90} se redujo a 4 días, mientras que para el tetraborato y el octaborato la TL_{90} fue de 6 y 7 días respectivamente.

Para probar la efectividad de monosacáridos y disacáridos como fagoestimulantes, expusieron 50 machos durante 24 o 48 horas para elegir entre un vial con agua limpia y otro con 0.1 M de 13 azúcares (como la fructosa, sacarosa, maltosa, glucosa, ribosa, xilosa, galactosa y trealosa, entre otras), combinado con ácido bórico al 1% en agua. Solo dos azúcares maltosa y sacarosa causaron que los machos consumieran cantidades letales de ácido bórico durante las 24 horas en las que estuvieron expuestos. Las soluciones que contenían ribosa o sorbosa, mataron solo el 10% de las cucarachas en un lapso de 15 días. El control fue sometido a soluciones de ácido bórico de 0.5, 1.0 y 2.0 % sin azúcares, causando una mortalidad con una TL_{90} =5.8 días con el ácido bórico al 2% y valores de TL_{90} que rebasaron los 15 días al utilizar ácido bórico al 0.5%.

Los resultados fueron confirmados cuando expusieron hembras a soluciones de 0.5% de ácido bórico con 0.1M de azúcar en agua. Las hembras fueron igualmente estimuladas para consumir el ácido bórico con varios azúcares. Basándose en estos estudios y considerando el costo de los carbohidratos para una futura implementación en programas de Manejo Integrado de Plagas, seleccionaron maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa para el prototipo de cebo en solución acuosa, donde el rango de concentraciones probado en azúcares fue del 0.01 al 2.0 M, para el ácido bórico las concentraciones usadas fueron del 0.5, 1.0 y 2.0%, los controles consistieron en viales que contenían ácido bórico pero sin azúcar. La mortalidad se registró durante 15 días.

A bajos niveles de ácido bórico (0.5 y 1%) los cuatro azúcares fueron más efectivos a una concentración de 0.1 M. Con ácido bórico al 2%, y concentraciones de azúcar mayores al 1M los cebos fueron rechazados por las cucarachas y en consecuencia el incremento en valores de TL_{90} . Los disacáridos sacarosa y maltosa fueron los más efectivos. Con 0.5 y 1% de ácido bórico los valores de TL_{90} fueron los más bajos combinados con soluciones de sacarosa 0.05 y 0.5 M. Con la maltosa y soluciones de ácido bórico a 0.5 y 1% la mortalidad fue incluso más rápida que con las concentraciones equivalentes de sacarosa.

Zurek y Gore (2004), exponen que el ácido bórico ha servido desde hace tiempo como un insecticida en el manejo de plagas urbanas y ha mostrado ser una alternativa efectiva para su uso en ambientes sensibles, tales como la producción de cerdos. Evaluaron cebos líquidos con ácido bórico para controlar a la cucaracha alemana en una granja comercial de cerdos.

El cebo contenía concentraciones de 1-2% de ácido bórico y de 0.5M de sacarosa y fue aplicado en 21 muestras por corral. Los resultados de un estudio de 2 años mostraron reducciones importantes en la población de la cucaracha. Cuando los cebos fueron retirados durante el verano la población de cucarachas aumento significativamente más rápido que cuando los cebos fueron retirados durante el invierno. ($94\pm 3.0\%$ de reducción de la población en verano, $29\pm 17\%$ aumento en la densidad al quitar el cebo, $90\pm 2.0\%$ baja en la población de invierno y $10\pm 2.9\%$ en el incremento de la población al quitar el cebo). Estos datos indicaron que las formulaciones líquidas de ácido bórico redujeron el umbral de infestación en la producción de cerdos. Concluyen que esta propuesta debiera tener aplicaciones en ambientes urbanos y agrícolas.

Zurek *et al.*, (2002) plantearon implementar y desarrollar alternativas a los insecticidas organosintéticos para el control de cucarachas en el ámbito residencial y en la producción animal e industrial. Hacia este fin ellos buscaron acelerar la actividad de *M. anisopliae* y el ácido bórico con combinaciones de estos dos agentes insecticidas contra *Blattella germanica*. Evaluaron en biosensayos de laboratorio la aplicación tópica de *M. anisopliae* ($0.40 \text{ g} = 8.96 \times 10^9 \text{ conida/m}^2$ o $0.04 = 8.96 \times 10^8$) y del ácido bórico ($0.2, 0.1, 0.05$ o 0.025 g/m^2) de manera independiente, la concentración de 0.2 g de ácido bórico/ m^2 causó una mortalidad al 100% en 15 días ($\text{TL}_{50}=5$ días), mientras que las concentraciones más bajas $0.1, 0.05$ y 0.25 mataron solo el 88, 38.5 y 9.5% respectivamente durante los 28 días del bioensayo. La concentración más alta de *M. anisopliae* ($0.40 \text{ g} = 8.96 \times 10^9 \text{ conida/m}^2$), eliminó al 92.5% de las cucarachas, mientras que la concentración más baja ($0.04 = 8.96 \times 10^8 \text{ conida/m}^2$) mató el 36.5%. En contraste una combinación del ácido bórico con *M. anisopliae* provocó una mortalidad mayor que la aplicación únicamente del hongo. Las cucarachas fueron tratadas con diferentes combinaciones de ácido bórico y *M. anisopliae* o polvo de harina. Se aplicaron concentraciones altas (0.2 g de ácido bórico x 0.4 g de hongo o de harina / m^2), a concentración media (0.05 g de ácido bórico x 0.4 g de hongo) o a concentración baja (0.025 g de ácido bórico x 0.04 g de hongo/ m^2). Un bioensayo adicional se dirigió con esporas de *M. anisopliae* inactivo, esterilizado durante 20 minutos (0.2 g de ácido bórico / m^2 con 0.4 g del hongo inactivo). Las aplicaciones combinadas con concentración alta o concentración media dieron como resultado una mortalidad mucho más rápida, haciendo pensar en una compatibilidad alta entre estos dos agentes. Ambas concentraciones de la aplicación de los polvos mataron el 100% de las cucarachas en 8 días ($\text{TL}_{50}=3$ días para la concentración alta y $\text{TL}_{50}=5$ días para la concentración media).

El polvo combinado con una concentración baja de ácido bórico (0.025 g/m²) y una concentración baja del hongo (0.04 g/m²) solo mató 9.5 y 36.5% de las cucarachas, la emergencia del hongo surgió entre el 86 al 100% de los insectos muertos, indicando que el ácido bórico no afectó la virulencia del hongo. La mortalidad del tratamiento con ácido bórico fue del 100% en 13 días, y en el tratamiento con el hongo inactivo fue del 0% en los 28 días del ensayo. Las cucarachas tratadas únicamente con harina no registraron mortalidad.

Para determinar la dosis de ácido bórico que pudiera producir mayor crecimiento del hongo, desviaron la ingestión inyectando el hongo y el ácido bórico directo al hemocele. *M. anisopliae* se diluyó (5.1x10⁴, 5.1x10³, 5.1x10² conidia/mL) en una solución Buffer de Fosfato de Potasio (PPBT). El ácido bórico se diluyó también en PPBT estéril a 5.0, 2.0, 1.0 y 0.1%. Cada cucaracha se inyectó dos veces con 1µL de la suspensión de esporas y 1µL de la solución de ácido bórico, así sucesivamente para cada tratamiento. Los controles fueron cucarachas inyectadas con ácido bórico sin hongo y cucarachas inyectadas con 2µL de *M. anisopliae*. El ácido bórico inyectado fue relativamente letal para las cucarachas, excepto a la dosis de 100 µg de ácido bórico equivalente a 2 µL de la solución al 5% que mató a todas las cucarachas en 8 días. Dosis menores a 50 µg no mataron ninguna cucaracha en 28 días. Por consiguiente la dosis subletal de 50 µg se seleccionó para las inyecciones combinadas con el hongo. La dosis alta de *M. anisopliae* (5.1x10⁴) mató todas cucarachas en 4 días con una TL₅₀=2 días. La inyección de ácido bórico (50 µg) junto con 5.1x10³ esporas del hongo produjeron 100% de mortalidad en 11 días (TL₅₀=5 días). El ácido bórico solo no causó mortalidad y el hongo solo produjo un 60% de mortalidad. Se diluyó el ácido bórico en una solución al 0.01% con agua y se aplicó polvo de esporas (0.40 g= 8.96x10⁹ conida/m²) a lo largo del recipiente que contenía las cucarachas. La mortalidad causada por este tratamiento fue del 100% en 20 días (TL₅₀=11días). Para medir la virulencia del hongo, los cadáveres fueron inmediatamente removidos y colocados en cajas Petri previamente esterilizados (con etanol 70%, hipoclorito de sodio 0.05% sucesivamente), colocando en su interior papel filtro humedecido, y selladas con parafilm, la emergencia de las hifas fue supervisada durante 10 días a temperatura ambiente. Las esporas colectadas de los cadáveres se inocularon en arroz para su producción masiva, posteriormente se hizo la extracción y se aplicaron a cucarachas adultas hembras y machos (0.40 g esp./m² a lo largo del contenedor). La mortalidad causada por este tratamiento fue del 92% a los 28 días de la exposición.

Como se ha mencionado la cucaracha americana, *Periplaneta americana* es una plaga importante por su distribución mundial y que suele ser controlada con insecticidas organosintéticos, lo que ha permitido el desarrollo de casos de resistencia a estos insecticidas en las poblaciones de esta cucaracha. (Schal *et al.*, 1993, Chad y Schal 2004). Esto ha motivado a la búsqueda de métodos alternativos para el control de cucarachas incluido el control biológico, con el uso de los hongos entomopatógenos por su dispersión pasiva, seguridad al ambiente, incluyendo su baja actividad contra mamíferos y aves, y su alta especificidad (Schal y Hamilton, 1990, Pachamuthu y Kamble, 2000). Para mejorar la eficacia de los hongos entomopatógenos, se ha optado por la combinación con insecticidas orgánicos inorgánicos como el ácido bórico e insecticidas vegetales como el NeemAzal de *Azadiracta indica* (Kaakeh *et al.*, 1997; Ritcher *et al.* 1997, Pachamutu *et al.*, 1999; Pachamutu y Kamble, 2000, Zurek *et al.* 2002; Chad *et al.* 2004). El ácido bórico aplicado en cebos (tabletas o gel), tiene las ventajas de que se aplican en forma más localizada al origen de la plaga, y así las toxinas son muchos menos diseminadas y riesgosas para el humano, como alternativa efectiva a los insecticidas neurotóxicos (Zurek *et al.* 2002, Gore y Schal, 2004). En la presente investigación se plantea implementar y desarrollar un cebo como una alternativa a los insecticidas organosintéticos para el control de cucarachas en el ámbito residencial y e industrial. Con este fin se combinará el ácido bórico y los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* buscando acelerar su actividad patogénica contra *P. americana*.

1.4 LITERATURA CITADA

- ANDIS, M. 1994. The Bio-Path cockroach control chamber uses nature to control nature's pests. *Pest Control*. 62(7):44-48.
- ATKINSON T.H., KOEHLER P., PATTERSON R. S. 1991. Catalog and Atlas of the Cockroaches (Dictyoptera) of North America north of Mexico. *Miscellaneous Entomol. Soc. Am.* 78: 1-86
- BENNETT, F. W.; OWENS, J. M. & CORRIGAN, R. M. 1996. Guía científica de Truman para operaciones de control de plagas. Universidad de Purdue. Advanstar. EU. 14-30 y 127-143 pp.
- BOUCIAS DG, PENDLAND JC. 1984. Host recognition and Specificity of Entomopathogenic Fungi. In: Roberts D. and Aist, J. (Eds) *Infection Process of Fungi*. The Rockefeller Foundation. USA. pp.185-196.
- BRENNER RJ. 2002. Cockroaches (*Blattaria*). In: Mullen, G. and Durden, L. (Ed.), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, China. pp. 29-43.
- DOVERSKI JW. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus* to Larvae and Adults of *S. scolytus*. *J. Inverteb. Pathol.* 37:188-194.
- EBELING W., WAGNER R. E. AND REIERSON D. A. 1966. Influence of repellency of blatticides. I. Laboratory experiments with German cockroaches. *J. Econ. Entomol.* 59:1374-1388.
- FERRON P. 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (fungi imperfecta Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides octectus* (Col:Bruchidae). *Entomophaga*. 2:393-396.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23:409-442.
- FUXA, R. J. Y TANADA, Y. The pathogen population. In: R.J. Fuxa y Y.Tanada (eds), *Epizootiology of Insects Diseases*. JohnWiley & Sons, New Cork. pp 113-157.
- GORE, J. C. Y SCHAL, C. 2004. Laboratory evaluation of boric acid-sugar solutions as baits for management of german cockroach infestations. *J. Econ. Entomol.* 97(2): 581-587.
- GORE, J. C.; ZUREK, L.; SANTANGELO, R. G.; STRINGHAM, S. M.; WATSON, D. W. & SCHAL, C. 2004. Water solutions of boric acid and sugar management of german cockroach populations in livestock production systems. *J. Econ. Entomol.* 97(2): 715-720.
- KAAKEH W, REID BL, BOHNERT TJ, BENNETT GW. 1996. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (imperfect fungus Hyphomycetes) and hydramethylnon among German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Entomol. Sc.* 31(4): 378-390.
- LEBECK, M. L. 1991. Una revisión de los enemigos naturales himenópteros de cucarachas con énfasis sobre control biológico. *Control biológico de cucarachas. Médico de IPM* 17:12-13.
- LUZ C, TIRANO MS, SILVA IG, CORDEIRO MT, ALJANABI SM. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93(6):839-846.

- MANIANIA NK, ODULAJA A. 1998. Effect of species, age, and sex of tsetse on response to infection by *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol* 43:311-323.
- MATHUR N., S. KHERA, S. AND GANDHI, GUPTA R. 1997. Susceptibility of *Periplaneta americana* cockroach of *Steinernema carpocapsae* : histopathological changes in the midgut of cockroach . *Diario indio de Nematología*. 26: 183-188.
- MILNER RJ, PEREIRA RM. 2000. Microbial Control of urban pests – cockroaches, ants and termites. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers. pp. 721-740.
- MILLER DM, KOEHLER PG. 2003. Least Toxic Methods of Cockroach Control In: Series of the Entomology and Nematology ENY-258. Department, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- MOHAN MC, LAKSHMI AK, DEVI KU. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Sci. Technol.* 9(1):29-33.
- PACHAMUTHU P. KAMBLE ST, 2000. In vivo study on Combined Toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with Sublethal Doses of Chlorpirifos, Propetamphos and Cyflutrin Against German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 93(1): 60-70.
- QUESADA-MORAGA E, QUIRÓS RS, GARCÍA PV, ÁLVAREZ CS. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea:Blattellidae). *J. Inverteb. Pathol.* 87:51-58.
- QUINTELA, D. F., AND C.W. MCCOY. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal dosis of imidacloprid. *Environ. Entomol.* 26:340-346 pp.
- QUINTELA, D. F., AND C.W. MCCOY. 1998. Sinergistic Effect of Imidacloprid and two Entomopathogenic Fungi on the Behavior and Survival of Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Soil. *J. Econ. Entomol.* 91: 340-346.
- RAMOSKA WA. 1984. The Influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the Chinch Bug, *Blissus leucopterus*. *J. Inverteb. Pathol.* 43:389-394.
- SCHAL C. AND HAMILTON R. L. 1990. Integrated suppression of synanthropic cockroaches. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 521-551.
- STEENBERG T.; VAGN JENSEN K.M.; SMITS P. H.; 1998. Entomopathogenic fungi for control of German cockroach (*Blattella germanica*) and other synanthropic cockroaches. *Bulletin-OILB-SROP.* 21(4):145-150.
- SUITER D.R.; HINKLE N.C. 1997. Biological suppression of synanthropic cockroaches. *J. Agricult. Entomol.* 14: 259-270.
- TABORSKY V. 1992. "Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome". University of Agricultura Prague, Czechoslovakia. *FAO Agriculture Services Boletin* No. 96 Cap 4.
- TANADA Y. AND KAYA H. K. 1993. "Fungal infections". In: *Insect Pathology*. Ed. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 319-357pp.

- Zukowski K.; Bajan C. Popowska Nowak E. 1998. Evaluation of effect *Metarhizium anisopliae* on reduction of numbers of *Blattella germanica*. J. Roczniki Pantstwowego Zacladu Higieny. 49:315-325
- ZUREK L. AND KEDDIE, B. A. 2000. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a promising Microbial Control Agent of the Satin Moth (Lepidoptera: Lymantriidae). Biocontrol Sci. and Technol.10: 641-644.
- ZUREK L., WATSON, D. W. AND SCHAL C. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Duteromycota: Hypomycetes) and Boric Acid against the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Biological Control 23: 296-302.
- ZUREK L., CHAD, G. J., STRINGHAM S. M., WATSON W. D., WALDVOGEL G. M. AND SCHAL., C. 2003. Boric Acid Dust as a Component of an Integrated Cockroach Management Program in Confined Swine Production. J. Econ. Entomol. 95: 340-346.

CAPÍTULO 2

INFECTIVIDAD, EDAD- Y HUMEDAD RELATIVA -RELACIONADOS CON LA SUSCEPTIBILIDAD DE NINFAS Y ADULTOS DE *Periplaneta americana* A *Metarhizium anisopliae* Y *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae)

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 (un aislamiento) y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1976 (tres aislamientos) fueron aplicados, sobre ninfas y adultos de la cucaracha *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) en condiciones de laboratorio (1.1×10^6 conidia, temperatura $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa, HR, $50 \pm 10\%$). Los cuatro aislamientos probados contra ninfas y adultos de *P. americana* mostraron bajo potencial patogénico y porcentajes de mortalidad de significativamente diferentes entre los aislamientos probados, además se observó menor mortalidad en adultos que en ninfas, en las que se presentaron cambios de conducta a la aplicación de la suspensión conidial. Los dos aislamientos más virulentos fueron seleccionados para ser probados en tres grupos de edades representativos a las etapas de desarrollo de *P. americana*. Como tendencia general se observó que la mortalidad de las cucarachas tratadas se redujo conforme aumentó su edad. Finalmente un aislamiento de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae* fueron probados en adultos de *P. americana* con HR y temperatura controlados ($85 \pm 10\%$, 27°C). Los adultos de la cucaracha americana fueron susceptibles a *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones controladas; a HR alta ($85 \pm 10\%$) se observó mayor porcentaje de mortalidad (47%), en comparación con el bioensayo en condiciones ambientales de laboratorio donde la mortalidad sólo fue de 3%.

Palabras clave: cucaracha americana, hongos entomopatógenos, etapa de desarrollo.

ABSTRACT:

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 (1 isolate) and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1976 (3 isolates) were tested against nymphs and adults of the American cockroach *Periplaneta americana* under laboratory conditions ($T=24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $\text{HR}=50\pm 10\%$). The four conidial suspensions tested against nymphs and adults of *P. americana* showed a low pathogenic potential and significant differences in percentage of mortality. Smaller mortality was also observed in adults in contrast with the nymphs, in those that behavior changes were presented to the application of the suspension conidial. The two most virulent isolates were selected and tested on three representative age's groups of *P. americana*. The results showed a decreasing tendency in mortality as cockroach age increased mortality. Finally, an experiment was conducted to evaluate if different mortality could exist in adult cockroach infected under controlled conditions ($85 \pm 10\%$, 27°C). American cockroach adults were susceptible to infection by *M. anisopliae* and *B. bassiana* under controlled condition; at high RH ($85 \pm 10\%$) these fungus caused more mortality (47%) compared with the laboratory conditions tested which reached 3% mortality.

Key words: American cockroach, entomopathogenic fungus, stage.

2.1 INTRODUCCIÓN

La cucaracha americana, *Periplaneta americana* (L.) (Dictyoptera: Blattidae), es una plaga de origen africano, importante por su distribución mundial (Brenner 2002) y que suele ser controlada con insecticidas organosintéticos, organofosforados, piretroides, carbamatos y reguladores de crecimiento, principalmente (Schal et al. 1990; Zurek et al. 2002). Mohan (1999) reportó que la resistencia a estos insecticidas se ha generalizado en las poblaciones de *P. americana*, lo que involucra un riesgo para la salud en caso de ser aplicados dentro de las viviendas (Atkinson et al. 1991). El desarrollo de resistencia a insecticidas en plagas urbanas ha motivado a la búsqueda de métodos alternativos para el control de cucarachas, incluido el control biológico que además no tiene efectos contra el humano y el ambiente (Kaakeh et al. 1996; Suiter y Hinkle 1997; Pachamuthu y Kamble 2000).

Con respecto al control biológico de cucarachas, se menciona el uso de parasitoides y nematodos (Miller y Koehler 2003), sin embargo, estas formas de control no son tan aceptadas si los agentes para controlar son tan desagradables como las cucarachas (Milner y Pereira 2000). También se han hecho investigaciones con bacterias, hongos y virus entomopatógenos (Andis 1994), los cuales pueden ser potencialmente usados por su dispersión pasiva y seguridad al ambiente, lo que incluye su baja actividad contra mamíferos y aves, alto potencial de especificidad y porque no son detectados en las viviendas a simple vista (Schal y Hamilton 1990).

Los hongos entomopatógenos son fáciles de propagar y de almacenar, lo que hace atractivo su uso para la formulación de micoinsecticidas y la regulación de poblaciones de cucarachas. Recientemente, los hongos han recibido atención en programas de manejo de plagas urbanas porque algunas especies son virulentas para moscas, mosquitos y cucarachas (Pachamuthu y Kamble 2000). *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) ha sido aislado de 200 especies de insectos incluyendo *B. germanica* y *P. americana* (Quesada et al. 2004). Kaakeh et al. (1996) reportan que se requieren de 26 a 30 días para causar una mortalidad de 90% de la cucaracha alemana, *B. germanica* usando *M. anisopliae*. Quesada-Moraga et al. (2004) y Kaakeh et al. (1996) consideran que la mortalidad inicial causada por la aplicación de *M. anisopliae* puede ser seguida por una transmisión horizontal dentro de la población de la plaga, un fenómeno que puede ser favorecido por el comportamiento gregario de las cucarachas. Zukowsky y Bajan (1996) reportan también varios aislamientos de *B. bassiana* como patógenos de la cucaracha alemana, *B. germanica*. (Milner y Pereira 2000).

En la presente investigación se evaluó la patogenicidad de cuatro aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en ninfas y adultos de *P. americana*, así como el comportamiento de estos insectos ante el desarrollo de la infección causada por los hongos entomopatógenos en dos condiciones de humedad relativa, para seleccionar el aislamiento más efectivo como posible agente de control biológico.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos. Se utilizaron cuatro aislamientos, tres de *M. anisopliae* y uno de *B. bassiana* (Cuadro 1), seleccionados por su alta patogenicidad sobre los insectos hospedantes de los que fueron aislados. El inóculo se obtuvo de material preservado en glicerol 10% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos de criopreservación. La propagación de cada uno de los aislamientos se realizó en agar dextrosa Sabouraud (ADS-Bioxon®) y se incubaron a $26 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 días con un fotoperiodo 12:12 h (luz: oscuridad).

Cuadro 1. Especie, insecto hospedante y procedencia de los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*

Especie	Procedencia	Insecto Hospedante
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. acridum	Isla Socorro, Nayarit.	<i>Schistocerca piceifrons</i> Walter 1870
<i>Beauveria bassiana</i> (Bb 88)	Costa de Oaxaca, Oaxaca	<i>Broca del café</i> <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari, 1867)
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. anisopliae	Producto Comercial "Saligreen-Ma" CP campus Córdoba	<i>Mosca pinta</i> <i>Aeneolamia postica</i> (Walter, 1858).
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. anisopliae	Producto Comercial "Destruxin-Ma" Laboratorios Laverlam	Coleoptera, Homoptera y Lepidoptera

Cría de insectos. El pie de cría de *P. americana* se obtuvo de la Universidad de Florida, Gainesville, E.U.A. y fue mantenido e incrementado en el insectario del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Las colonias se mantuvieron en recipientes de plástico de 1.2 x 0.8 x 0.6 m. A cada recipiente se le suministró agua en un tubo de cristal de 20 cm de longitud x 2 cm de diámetro, tapado con algodón hidrófilo para evitar escurrimientos y formación de mohos. Adicionalmente, en cada recipiente se colocaron nueve cilindros de cartón plisado (20 x 32 cm) para refugio de las cucarachas (Zurek et al. 2002). Para la alimentación de las cucarachas se suministró el producto comercial PROLAB 2500 Rodent Diet®.

Los recipientes se cubrieron con tela de organza para proveer una ventilación adecuada y para evitar la fuga de los insectos, se aplicó una mezcla de vaselina-aceite (3:2) en los bordes de cada recipiente. La cría se mantuvo a temperatura de 29 ± 2 °C, HR $\leq 60\%$ y fotoperíodo de 12:12 h (luz: oscuridad).

Selección de individuos por edades. Con el fin de obtener generaciones de la misma edad se confinaron machos y hembras adultos en las condiciones descritas anteriormente. Las ootecas producidas se colectaron semanalmente y se colocaron en un contenedor nuevo para esperar la emergencia de las ninfas y obtener grupos de edad homogéneos. Para los bioensayos se establecieron tres grupos: el primero incluyó a ninfas del 1° al 6° ínstar (**E1**); el segundo del 7° al 13° ínstar (**E2**) y un tercer grupo estuvo conformado por los adultos (**E3**).

2.2.1 Inducción y purificación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en *P. americana*.

Para mantener o incrementar la virulencia del hongo se hizo una inducción de los cuatro aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Cuadro 1) en ninfas y adultos de *P. americana* (Schaerffenberg 1964). Se emplearon dos procedimientos: inmersión e inoculación tópica con una suspensión de esporas en Tween 80 0.01%. Las conidia se obtuvieron de cultivos esporulados a 25 ± 1 °C sobre el medio de cultivo ADS con 15 días de edad. La concentración de la suspensión se calculó con un hemocitómetro o Cámara de Neubauer. El primer procedimiento consistió en sumergir 10 insectos de cada grupo de edad (**E1**, **E2** y **E3**) en una suspensión de 1×10^9 esp/mL. En el segundo procedimiento se hizo una inoculación tópica de una suspensión de 5×10^9 esp/mL en el pronoto y abdomen (10 μ L, en cada uno) en 10 cucarachas de las edades E1, E2 y E3. Posterior a la inoculación, cada insecto se colocó individualmente en una caja Petri con el fondo cubierto con papel Whatman® No. 9 húmedo y se mantuvo en la cámara de incubación con las condiciones descritas para el desarrollo de las conidia. La mortalidad se registró cada 24 horas. Las cucarachas muertas fueron esterilizadas con etanol 70% (5 min), hipoclorito de sodio 0.5% (1 min) y lavadas con agua destilada estéril (1 min) (Zurek y Keddie 2000); y luego se les colocó individualmente en cámara húmeda para monitorear el desarrollo de la micosis en cada insecto durante un periodo de 15 días. Los insectos muertos fueron mantenidos en condiciones ambientales de laboratorio (24 ± 2 °C y HR de $50 \pm 10\%$). De las cucarachas micosadas se obtuvieron aislamientos puros y éstos se mantuvieron en medio ADS suplementado con 1% de cutícula de cucaracha previamente escarificada y macerada. Para la escarificación se aplicó la técnica seguida por Kingsolver (1970) la cual ayudó a remover el tejido graso y muscular.

La cutícula escarificada se deshidrató a 60 °C durante 18 h. Los aislamientos inducidos y cultivados en ADS suplementado fueron preservados en tubos de criopreservación con glicerol 10% a -20 °C; los insectos micosados se conservaron a 4 °C.

Desarrollo y progreso de la infección. Se tomaron seis insectos vivos de los tratados tópicamente (E1, E2 y E3), entre las 48 y 72 horas posteriores a la inoculación. De las extremidades de cada insecto se tomó una gota de hemolinfa y se hizo un frotis teñido con colorante Giemsa y solución de May-Grownwald consecutivamente. Los insectos muertos que presentaron crecimiento micelial y cambios de coloración se disecaron de las partes alares y los esternitos 5° y 7° para observar la presencia de esporas y formación de micelio. Se preparó un frotis húmedo teñiendo con lactofenol azul de metileno. Las tinciones se observaron en microscopio compuesto con los objetivos 10x y 40x.

2.2.2 Patogenicidad y selección de aislamientos infectivos contra *P. americana*.

El ensayo se realizó en condiciones de laboratorio ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ y HR $50 \pm 10\%$), se emplearon suspensiones de 1.1×10^8 esp/mL en Tween 80 0.01% de aislamientos que habían presentado un porcentaje de germinación a las 24 horas de 99, 97, 95 y 92% para Bb 88, *Ma* (Destruxin), *Ma* (Saligreen) y *Ma* var. *acidum*, respectivamente. Las cucarachas se inmovilizaron previamente a temperatura de -20°C (**E1**, 2.5 min; **E2**, 7.5 min; **E3**, 9 min). Se inocularon 10 ejemplares de *P. americana* de cada grupo de edad por tratamiento, con 10 μL de la suspensión de esporas (1.1×10^8) entre las coxas posteriores de cada uno (Quesada-Moraga et al. 2004). Después de la aplicación, los insectos se colocaron en cajas de cristal (0.2 x 0.2 x 0.3 m) y se mantuvieron en las mismas condiciones que el pie de cría.

En el testigo, las cucarachas solo fueron inoculadas con 10 μL de solución de Tween 80 0.01%. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento, incluyendo el testigo, cuantificando la mortalidad cada 24 horas durante 15 días. Las cucarachas muertas fueron colocadas en cámara húmeda hasta observar la esporulación de los hongos. Los datos de mortalidad acumulada durante los 15 días de la prueba fueron transformados ($\arcseno \sqrt{\text{porcentaje}}$), sometidos a la prueba de normalidad y homogeneidad de Bartlett y se analizaron mediante un diseño completamente al azar. La selección de los hongos se basó en la información obtenida del PROC ANOVA en SAS para Windows 8.01 (SAS Institute, 2000) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

2.2.3 Patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en diferentes estados de desarrollo de *P. americana* y HR ambiental. Destruxin-Ma y Bb 88 se probaron sobre las etapas de desarrollo de *P. americana* E1, E2 y E3. Para ello, se utilizaron los aislamientos inducidos con las cucarachas, se propagaron en ADS y se incubaron 15 días a 25 ± 1 °C. Las esporas fueron colectadas y utilizadas para preparar una suspensión en Tween 80 0.01% con una concentración de 1.1×10^8 esp/mL. El porcentaje de germinación a las 24 horas fue de 96% para ambos hongos. La prueba consistió en aplicar una dosis de 1.1×10^6 esp/cucaracha, 10 μ L de la suspensión tópicamente entre las coxas posteriores a 20 insectos por bloque de edad; las cucarachas fueron previamente inmovilizadas a -20 °C como se describió en el bioensayo de selección. En el testigo, los insectos se inocularon con 10 μ L de una solución de Tween 80 0.01%. Todos los tratamientos del experimento tuvieron tres repeticiones. Después de la aplicación, los insectos se colocaron en cajas de cristal (0.2 x 0.2 x 0.3 m) con alimento, agua y refugio en condiciones de 26 ± 2 °C y HR $50 \pm 10\%$. Se registró la mortalidad cada 24 horas durante 15 días. Los porcentajes de mortalidad se normalizaron con la transformación $\arcseno \sqrt{\text{porcentaje}}$ y se analizaron con un arreglo factorial 2x3 (aislamiento-edad). Las combinaciones tratamiento-edad y comparación de la patogenicidad de los dos hongos se analizaron con PROC ANOVA y las comparaciones de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) en SAS para Windows 8.01 (SAS Institute, 2000).

2.2.4 Patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos de *P. americana* en condiciones controladas de HR. Debido a que en la prueba con HR baja ($\geq 55\%$) los adultos presentaron baja mortalidad, se realizó una prueba para comparar la patogenicidad de Bb88 (*B. bassiana*) y Destruxin (*M. anisopliae*) en condiciones de alta humedad (HR $85 \pm 10\%$). Los porcentajes de germinación fueron de 97% y 99% para Destruxin y Bb 88, respectivamente. Para su manipulación, las cucarachas se inmovilizaron en frío a -20 °C durante 9 min. En medio del tercer par de coxas de 100 cucarachas adultas de *P. americana* (hembras y machos de un mes aproximadamente) se aplicaron 10 μ L de una suspensión de 5×10^8 esp/mL). Después de la aplicación los insectos se colocaron en cajas de cristal (0.2 x 0.2 x 0.3 m) con alimento, agua y refugio. Cada caja se incubó en una cámara con condiciones controladas de 27 °C y HR $85 \pm 10\%$. La HR fue registrada con un datalogger HOBO®, que se calibró para tomar lecturas cada hora. El registro de mortalidad se hizo cada 24 horas durante 15 días. El análisis se realizó con un diseño completamente al azar de igual manera que para el bioensayo de selección.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Inducción y purificación.

De los insectos sumergidos en la suspensión de esporas (1×10^9 esp/mL) de los cuatro aislamientos, 90% murieron por bacteriosis; sin embargo, el resto de insectos (10% aprox.) desarrollaron esporulación parcial, principalmente en cabeza, patas y tórax. En cambio, la infección causada por los hongos inoculados de manera tópica (5×10^9 esp/mL) sobre *P. americana* fue confirmada por la presencia de micelio y conidia observados sobre la cutícula de las cucarachas (70% de las cucarachas muertas).

Desarrollo y progreso de la infección. Durante las primeras horas después de la inoculación se observaron algunos cambios en el comportamiento de las cucarachas, caracterizado por contracciones y acicalamiento constante en el periodo de incubación. Además, en las ninfas de **E1**, se observó inducción a la muda (10-40% de los insectos tratados) generalizada en todos los tratamientos excepto en el testigo. En las cucarachas muertas se observó desecación, rigidez y crecimiento de cuerpos hifales sobre la cutícula externa del insecto, que llegó a ser mucho más abundante con el progreso de la infección hasta la conidiogénesis, que tomó color verde olivo y blanco. Además, en los escleritos teñidos se confirmó la presencia de cadenas de esporas y micelio distribuido dentro y fuera de la cutícula disectada. También, se observó crecimiento micelial y producción de blastoesporas en los frotis de hemolinfa. (Figura 1).

2.3.2 Patogenicidad y selección del aislamiento infectivo contra *P. americana*.

Los cuatro aislamientos probados fueron infectivos para *P. americana*, con efectos que se observaron a partir de las 48 horas de la inoculación. Después de la aplicación las cucarachas mostraron disminución en la movilidad y alimentación; en algunos tratamientos con *M. anisopliae* las cucarachas mantuvieron conducta agresiva y golpeteo contra las paredes de los contenedores de cristal, así como canibalismo contra las cucarachas muertas e incluso con las que presentaban síntomas de enfermedad. El mayor porcentaje de mortalidad se registró a las 72 horas posteriores a la inoculación; sin embargo, hubo disminución de la mortalidad en el transcurso de los 15 días de observación (Figura 2). Esto puede estar relacionado con la susceptibilidad de cada cucaracha a la infección causada por los hongos entomopatógenos o con la pérdida de viabilidad de los hongos a lo largo del tiempo.

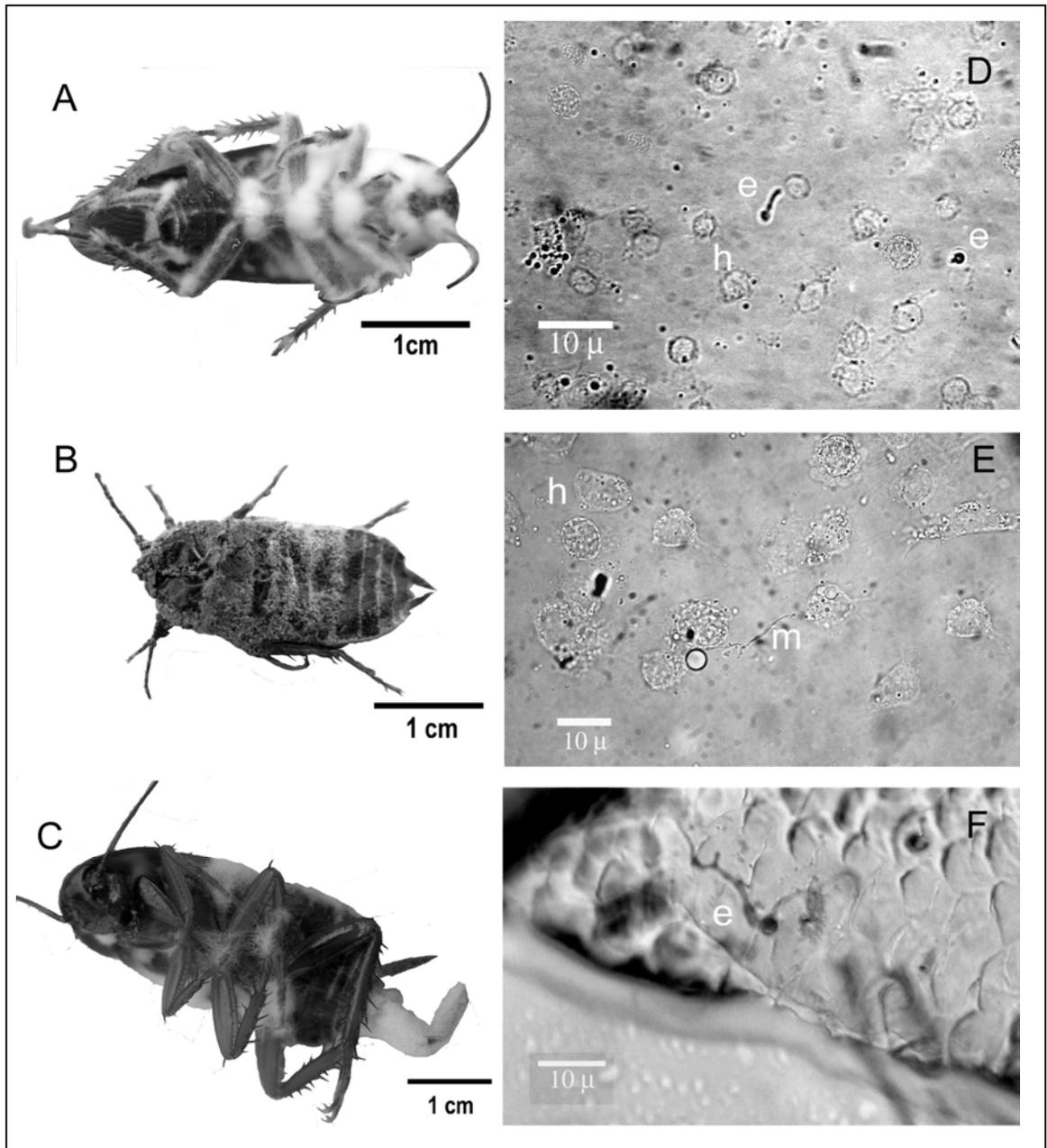


Figura. 1. Cadáveres micosados, germinación de esporas y crecimiento micelial en ninfas y adultos de *P. americana* con hongos entomopatógenos. **A**; adulto micosado con *B. bassiana*. **B**; ninfa micosada con *M. anisopliae*. **D** y **E**; frotis de hemolinfa de cucaracha: h:hemocitos, e: blastoespora germinando de *B. bassiana*, m: micelio de *M. anisopliae*. **F**; cutícula de *P. americana*:e: espora de *B. bassiana* germinando.

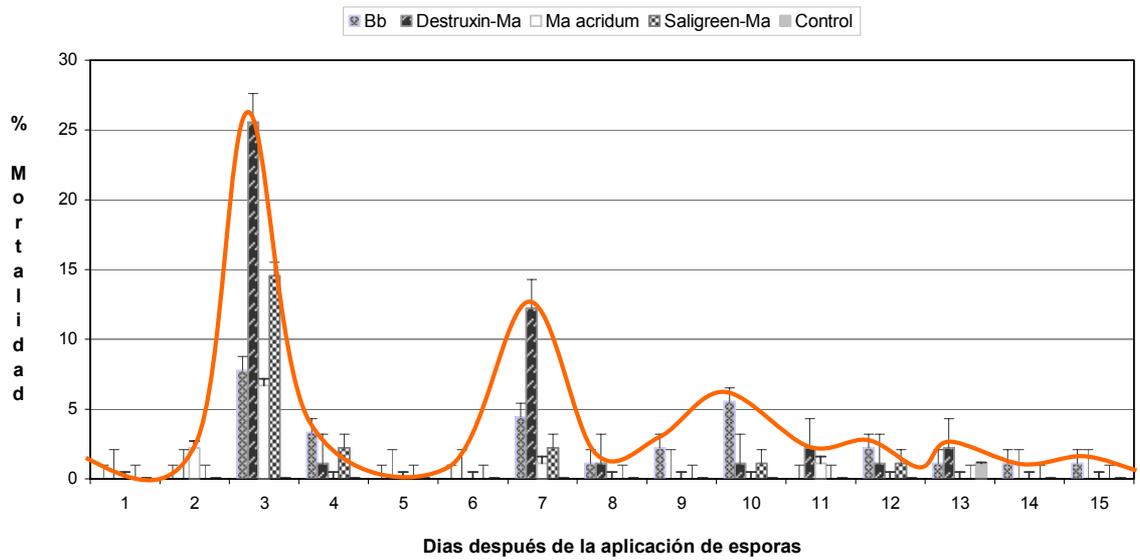


Figura 2. Mortalidad diaria de *P. americana* con *M. anisopliae* y *B. bassiana* inoculados de manera tópica (1.1×10^6 esp/cucaracha).

Los aislamientos que produjeron mayor porcentaje de mortalidad fueron *B. bassiana*, con $30.0 \pm 3.81\%$, y Destruxin (*M. anisopliae*) con $46.66 \pm 8.03\%$, la mortalidad fue significativamente diferente de la del testigo pero no entre ellos (Figura 3).

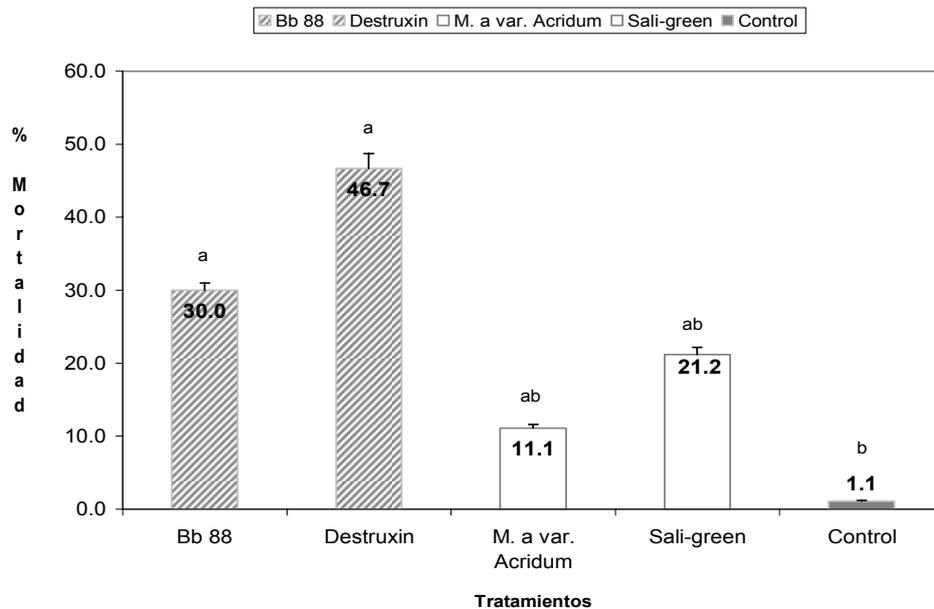


Figura 3. Mortalidad acumulada (a los 15 días) de *P. americana* tratadas con *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

Entre 50 y 70% de las ninfas muertas de *P. americana* presentaron micosis generalizada y mayor esporulación mientras que en los adultos el desarrollo de la micosis fue menor y se observó la presencia de bacterias en la parte abdominal. Los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey permitieron seleccionar los aislamientos de Bb 88 y Destruxin como los mejores candidatos para subsecuentes experimentos con la cucaracha americana (Figura 3).

2.3.3 Patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en diferentes estados de desarrollo de *P. americana* y HR ambiental.

Al comparar la susceptibilidad de los grupos de edad **E1**, **E2** y **E3** de *P. americana* expuestos a Bb 88 y Ma- Destruxin, se observaron diferencias significativas entre adultos y ninfas pero no hubo diferencias significativas entre los dos aislamientos probados. En la interacción aislamiento-edad, las combinaciones de Bb 88 y Destruxin con los grupos de edad **E1**, **E2** no mostraron diferencias estadísticas entre ellas, pero sí con **E3** y en la interacción de las tres edades con el testigo.

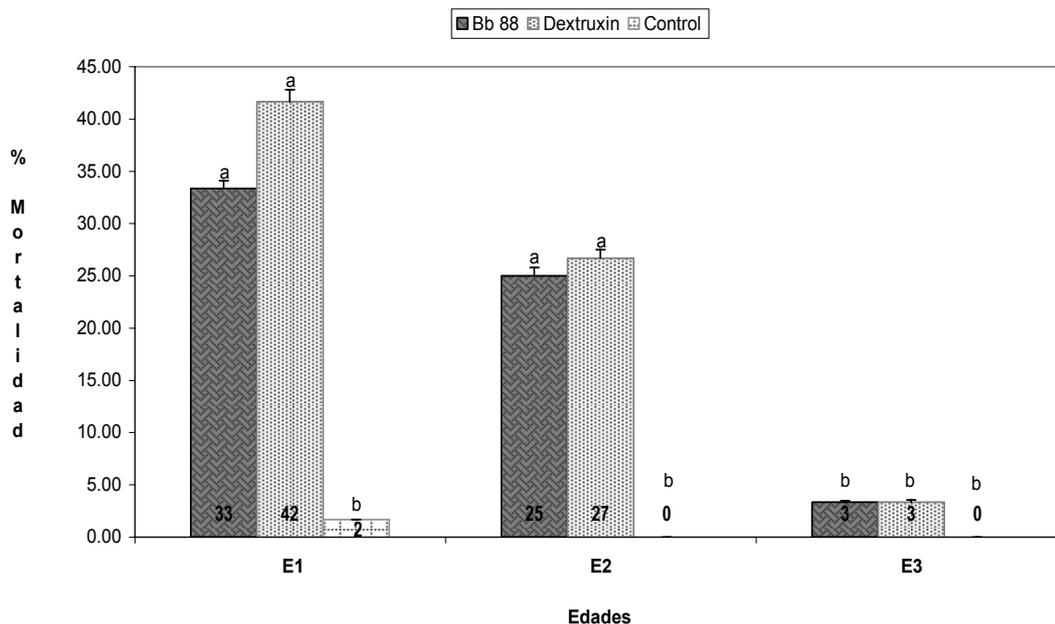


Figura 4. Mortalidad Aislamiento-Edad en cucarachas de las edades **E1**, **E2** y **E3** infectadas con Bb 88 y Destruxin-Ma con la dosis de 1.1×10^6 esp/cucaracha. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la mortalidad puede ser comparada por grupos de edades dentro de un mismo aislamiento, por las diferencias significativas observadas en la combinación **edad-aislamiento** (Figura 4). En la misma figura se aprecia una disminución de la mortalidad conforme la edad de las cucarachas aumentaba. El grupo de las ninfas (**E1**) presentó el mayor porcentaje de mortalidad, donde los insectos micosados permanecieron libres de bacterias y del crecimiento de otros hongos contaminantes saprófitos como *Aspergillus* sp. (Micheli, Link 1809), *Penicillium* sp. (Link 1809) y *Mucor* sp. (Micheli, Saint-Amans 1821), que estuvieron presentes en algunas ninfas muertas del grupo **E2**.

2.3.4 Patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos de *P. americana* en condiciones controladas de HR.

Los resultados del experimento con HR controlada permiten confirmar la influencia de la **HR** sobre la patogenicidad de los hongos, ya que una **HR** de $85 \pm 10\%$ indujo mortalidades hasta de 54% (Figura 5) donde no hubo diferencias significativas entre los dos aislamientos probados; en contraste, en la prueba realizada con **HR** de $50 \pm 10\%$ la mortalidad alcanzó sólo el 3%.

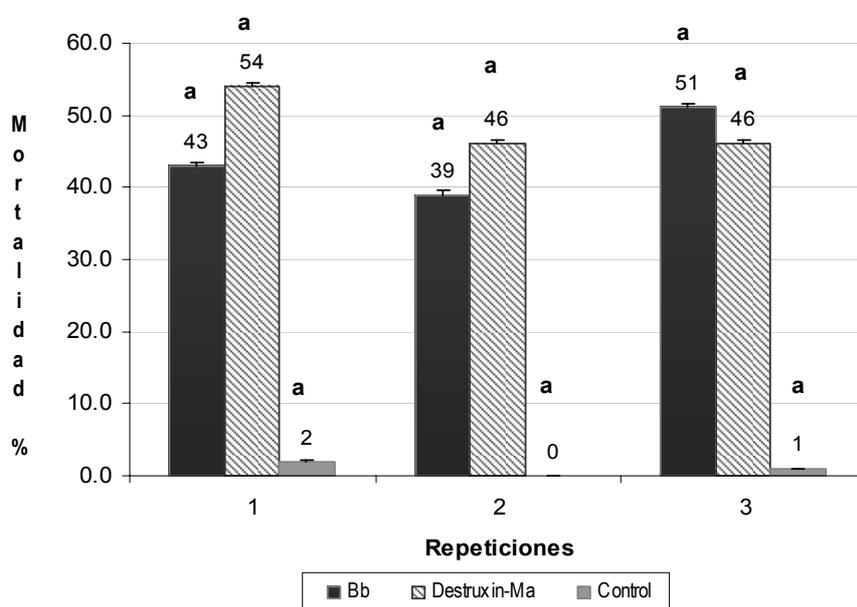


Figura 5. Mortalidad acumulada (15 días) en adultos de *P. americana* probada en condiciones controladas de $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y HR ($85 \pm 10\%$), inoculados de manera tópica la dosis de 5×10^6 esp/cucaracha con *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

Sin embargo, a pesar de que las cucarachas esporularon a humedades mayores de 95%, el alimento de las cucarachas empezó a ablandarse, lo que provocó presencia de contaminantes (hongos saprófitos y bacterias) sobre el cuerpo de las cucarachas muertas.

2.4 DISCUSIÓN

El presente estudio permitió confirmar la relación de la edad, humedad relativa y patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas y adultos de *P. americana*. Los resultados de este estudio corroboran investigaciones similares sobre los factores involucrados en el desarrollo de los hongos entomopatógenos. Se observó que no es necesario un periodo de exposición en alta humedad para que la infección pudiera ocurrir. Ramoska (1984) mencionó que la HR es el factor predominante que influye en la eficacia de *B. bassiana* contra la chinche *Blissus leucopterus* (Say 1832) y concluyó que los hongos entomopatógenos no pueden ser un agente de control eficaz estando en ambientes secos. Sin embargo, Fargues (1972), quien probó siete cepas de *B. bassiana* contra larvas del escarabajo colorado de la papa, *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) a 100%, 75% y 55% de HR con diferentes concentraciones de esporas, encontró que la mortalidad a todas las humedades fue muy similar pero hubo diferencias asociadas con la concentración de esporas (Romaña y Fargues 1992). Ferron (1977) reportó que humedades relativas tan bajas como 51% permitieron la infección de larvas del escarabajo *Scolytus scolytus* (Fabricius 1793). Por lo anterior, Ramoska (1984) sugiere que la HR atmosférica y la HR microambiental que provee el integumento del insecto pueden influir de diferente manera en el desarrollo de la infección.

La conidiogénesis requiere humedades mayores al 70% (Schaerffenberg (1964); sin embargo, la esporulación sobre las cucarachas muertas fue independiente a las fluctuaciones de HR, en tanto el cuerpo de las cucarachas no se desecó; esto se demuestra en las ninfas E2, las que presentan mayor masa corporal que influyó en una mayor conidiogénesis (70-90%), lo cual puede contribuir a la transmisión horizontal y diseminación de la infección. Luz et al. (1998) compararon la patogenicidad de aislamientos *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra *Triatoma infestans* (Klug, 1834) en dos condiciones de HR, cercana a la saturación y 50%; el método de aplicación fue la inmersión de los insectos en una suspensión de 10^8 esporas/mL, durante 6 segundos. Sus resultados muestran que en baja HR (50%) la virulencia fue significativamente menor a los 15 días posteriores a la aplicación, variando del 17.5% al 97.5% entre las dos condiciones que ellos probaron.

En el presente estudio la infectividad de los hongos entomopatógenos probados a HR baja (50%) y humedades relativas mayores que al 70% sobre adultos de *P. americana* no mostraron diferencias significativas por lo que se sugiere que los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* pueden proveer un nivel aceptable de control contra adultos de *P. americana* en su ambiente natural. La mortalidad expresada en las cucarachas tratadas confirma la patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre ninfas y adultos de *P. americana*, aun cuando el ambiente no contaba con condiciones de alta humedad (HR=50±10%). La infección pudo ser favorecida por el microhábitat provisto por la humedad del cuerpo de las cucarachas después de la inoculación, el cual permitió la germinación de las esporas e invasión de la cutícula (Doberski, 1981).

La edad se ha considerado como uno de los factores que determinan la mortalidad, por lo que Boucias y Pendland (1984) reportaron que existe una edad de maduración de la respuesta inmune. Debido a esto los primeros instares de desarrollo de los insectos son mayormente afectados por las infecciones causadas por los entomopatógenos. Mohan et al. (1999) reportaron diferencias de virulencia entre aislamientos de *B. bassiana* sobre dos edades de *P. americana* y mortalidad a los tres días de inoculados por aspersión, inmersión y de manera tópica en condiciones de HR>90% y 25 ±1 °C. Este suceso es visto como un fenómeno general del retraso de la mortalidad en las edades maduras y que puede estar asociado con las interacciones entre el integumento del insecto invadido por el hongo y el proceso de muda del hospedante que sucede en los estadios ninfales. Vandenberg et al. (1998) concluyen que algunos insectos emplean el cambio de muda como un mecanismo de defensa, lo que conduce a la pérdida del inóculo mediante la exuvia y fallas en el subsecuente desarrollo de la enfermedad. El constante acicalamiento de las cucarachas adultas observado en esta investigación, también puede remover las esporas de sus cuerpos y así protegerse de alguna manera contra la infección (Roberts y Humber, 1984; Fransen et al., 1987).

Con estos resultados se puede inferir que la edad del hospedante puede ser factor limitativo para el progreso de la enfermedad contra *P. americana*. Fargues y Luz et al. (1998) sugieren que la edad generalmente se considera como un factor de alta variabilidad en los valores de tiempo letal (TL), similar a lo observado en los datos de mortalidad, esto sugiere que cada TL puede ser comparado entre grupos de edad.

Los resultados obtenidos son comparables a los citados por Fargues y Luz (1998) y Maniania y Odulaja (1998) quienes concluyen que la edad del hospedante tiene un efecto pronunciado sobre la susceptibilidad a la infección por *M. anisopliae* en dos subespecies de moscas Tsetsé *Glossina morsitans morsitans* (Leak, 1998) y *G. m. centralis* (Leak, 1998). El presente estudio reafirma la importancia de entender la interacción entre el hospedante y el patógeno (Fuxa y Tanada, 1987) debido a que permitió conocer los factores involucrados en el inicio y desarrollo de la infección.

En los tres estados de desarrollo probados se observa la tendencia de disminución en la mortalidad al aumentar la edad de las cucarachas. Fargues y Luz (1998) de manera similar reportan diferencias de mortalidad y esporulación entre insectos adultos y ninfas de tercero y quinto instar muertos por la infección de *B. bassiana* en las mismas condiciones de humedad y temperatura. Por otra parte, la capacidad del hongo para infectar a un insecto puede estar influenciada por el estado fisiológico del hospedante, ya que muchos hongos pueden infectar específicamente a un particular estado de desarrollo, y se sabe que la cutícula posee sustancias de inactivación desfavorables para los hongos (Boucias y Pendland 1984). Maniania y Odulaja (1998) determinaron que la edad del hospedante tiene un efecto pronunciado sobre la susceptibilidad a la infección causada por Hyphomycetes y concluyen que en la interacción hospedante-patógeno se encuentran los mecanismos para entender los factores involucrados durante el inicio y desarrollo de la enfermedad.

Estos resultados sobre la patogenicidad de las conidia de *M. anisopliae* (Destruxin-Ma) y *B. bassiana* (Bb 88) pueden ser usados para el desarrollo de un método apropiado de aplicación de estos entomopatógenos en ambientes urbanos, además de ser una iniciativa para el impulso en la aplicación de los hongos entomopatógenos como agente de control biológico para la regulación de poblaciones de *P. americana*.

2.5 LITERATURA CITADA

- ANDIS, M. 1994. The Bio-Path cockroach control chamber uses nature to control nature's pests. *Pest Control*. 62(7):44-48.
- ATKINSON TH, KOEHLER PG, PATTERSON R S. 1991. Catalog and Atlas of the Cockroaches (Dictyoptera) of North America north of Mexico. *Miscellaneous Entomol. Soc. Am.* 78: 1-86
- BOUCIAS DG, PENDLAND JC. 1984. Host recognition and Specificity of Entomopathogenic Fungi. In: Roberts D. and Aist, J. (Eds) *Infection Process of Fungi*. The Rockefeller Foundation. USA. pp.185-196.
- BRENNER RJ. 2002. Cockroaches (*Blattaria*). In: Mullen, G. and Durden, L. (Ed.), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, China. pp. 29-43.
- DOVERSKI JW. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus* to Larvae and Adults of *S. scolytus*. *J. Inverteb. Pathol.* 37:188-194.
- FRANSEN JJ, WINKELMAN K, VAN LENTEREN JC. 1987. The differential mortality at various Life Stages of the Greenhouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:Aleyrodidae) by Infection with the Fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *J. Inverteb. Pathol.* 50:158-165.
- FERRON P. 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (fungi imperfecta Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides octectus* (Col:Bruchidae). *Entomophaga*. 2:393-396.
- KAAKEH W, REID BL, BOHNERT TJ, BENNETT GW. 1996. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (imperfect fungus Hyphomycetes) and hydramethylnon among German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae). *J. Entomol. Sc.* 31(4): 378-390.
- KINGSLOVER JM. 1970. A study of male genitalia in Bruchidae (Coleoptera). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 72(3): 370-386.
- LUZ C, TIRANO MS, SILVA IG, CORDEIRO MT, ALJANABI SM. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93(6):839-846.
- MANIANIA NK, ODULAJA A. 1998. Effect of species, age, and sex of tsetse on response to infection by *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol* 43:311-323.
- MILNER RJ, PEREIRA RM. 2000. *Microbial Control of urban pests – cockroaches, ants and termites. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers. pp. 721-740.
- MILLER DM, KOEHLER PG. 2003. Least Toxic Methods of Cockroach Control In: *Series of the Entomology and Nematology ENY-258*. Department, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- MOHAN MC, LAKSHMI AK, DEVI KU. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Sci. Technol.* 9(1):29-33.

- PACHAMUTHU P, KAMBLE ST, 2000. In vivo study on Combined Toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Zygomycetes) Strain ESC-1 with Sublethal Doses of Chlorpyrifos, Propetamphof and Cyfluthrin Against German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 93(1): 60-70.
- QUESADA-MORAGA E, QUIRÓS RS, GARCÍA PV, ÁLVAREZ CS. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Inverteb. Pathol. 87:51-58.
- RAMOSKA WA. 1984. The Influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the Chinch Bug, *Blissus leucopterus*. J. Inverteb. Pathol. 43:389-394.
- ROBERTS D, HUMBER R. 1984. Entomopathogenic Fungi In: Roberts D. and Aist, J. (Eds.) Infection Processes of Fungi; A Bellagio Conference March 21-25 1983. The Rockefeller Foundation New York, 1-12.
- SCHAERFFENBERG B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. J. Insect Pathol. 6: 8-20.
- SCHAL C, HAMILTON RL. 1990. Integrated suppression of synanthropic cockroaches. Ann. Rev. Entomol. 35:521-551
- SAS INSTITUTE. 2000. SAS User's Guide, Version 8.02. SAS institute, Cary, NC, USA.
- SUITER DR, HINKLE NC. 1997. Biological suppression of synanthropic cockroaches. J. Agricultural Entomol 14(3): 259-270.
- VANDEBERG JD, RAMOS M, ALTRE AJ. 1998 Dose-Response and Age- Temperatura-Related Susceptibility of the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) to Two Isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). J. Environ. Entomol. 27: 1017-1021.
- ZUREK L, KEDDIE BA. 2000. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a promising Microbial Control Agent of the Satin Moth (Lepidoptera: Lymantriidae). Biocontr. Sci. Technol. 10: 641-644.
- ZUREK L, WATSON DW, SCHAL C. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Duteromycota: Zygomycetes) and Boric Acid against the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Biological Control 23: 296-302.

CAPÍTULO 3

SINERGISMO - ACIDO BÓRICO - *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, E INFECTIVIDAD SOBRE *Periplaneta americana*.

RESUMEN

Se evaluó la compatibilidad del ácido bórico con dos aislamientos de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* cuantificando el porcentaje de germinación de dichos hongos sobre el substrato húmedo agar-agua. La exposición a las 12, 24 y 36 h de las esporas de ambos hongos al ácido bórico mostró un efecto negativo sobre la germinación. *M. anisopliae* mostró menor germinación al aumentar la concentración y el tiempo de exposición, mientras que la germinación de *B. bassiana* tuvo reducciones menos drásticas, mostrándose más tolerante a las concentraciones de 1 y 3 %, tratamientos en los que no se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$). También se valoraron cebos contaminados de ácido bórico a las concentraciones 3, 4 y 7% en ninfas de *P. americana* y los resultados mostraron que en ninguna de las concentraciones probadas se obtuvo mortalidad arriba del 5% y tampoco hubo repelencia de las cucarachas a las concentraciones probadas. Finalmente se aplicaron cebos en polvo y pelets (barras, gránulos) de la combinación de ácido bórico (1, 3 y 5%) y *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 gr de polvo y 2.5×10^8 esp / pelet, respectivamente) en ninfas de *P. americana* (3° y 4° instares), lo que resultó en una mortalidad mucho más alta (superior al 50%) y rápida sugiriendo alta compatibilidad entre los dos productos. La mayor mortalidad fue del $91.68 \pm 12.90\%$ ($TL_{50} = 3.81$ d) causada por la combinación de 5% de ácido bórico y esporas de *B. bassiana* del cebo en polvo, seguida por la misma mezcla pero en el pelets que causó mortalidad de $86.66 \pm 13.56\%$ ($TL_{50} = 4.57$ d), por su parte, la combinación de 3% de ácido bórico y esporas de *B. bassiana* en el polvo causaron $81.62 \pm 11.07\%$ de mortalidad ($TL_{50} = 4.82$ d) sin diferencias significativas respecto a la mezcla de 5% de ácido bórico y esporas de *B. bassiana* del cebo en pelets, mientras que el polvo con esporas de *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 gr de polvo) solo mató $1.36 \pm 13.56\%$ de las cucarachas tratadas. En los pelets contaminados con esporas de *B. bassiana* sin ácido bórico no hubo mortalidad. La asociación del ácido bórico y el hongo demuestra una interacción de sinergismo entre estos dos agentes que causa una mortalidad alta de ninfas de la cucaracha *P. americana*.

Palabras clave: cebos, cucaracha americana, manejo integrado

ABSTRACT

To enhance the effectiveness of the entomopathogenic fungi the compatibility of the boric acid was evaluated with two fungus isolates, one of *M. anisopliae* and one of *B. bassiana*, by quantifying the percent fungi germination in water-agar. The exposure of spores of both fungi to boric acid during 12, 24 and 36 h reveals a negative effect on the germination mainly in *M. anisopliae*, which showed decrease in the germination percentage when increasing the concentration and the time of exposure, whereas germination of *B. bassiana* had less drastic reductions, expressing more tolerance to the concentrations tested. Baits of boric acid were also evaluated with concentrations 3, 4 and 7% against nymphs of *P. americana*; the results showed that any concentration caused mortality higher than 5% and there was no repellence of cockroaches at these concentrations. Finally powdered and pellet baits combining boric acid (1, 3 and 5%) and *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 g dust and 2.5×10^8 esp / pelet, respectively) were offered to nymphs of *P. americana* (3^o and 4^o instars), resulting in a much higher and quicker mortality (higher than 50%), suggesting high compatibility between both agents. The highest mortality was $91.68 \pm 12.90\%$ ($TL_{50} = 3.81$ d) caused by the combination of 5% of boric acid with spores of *B. bassiana* of the powdered bait, followed by the same mixture but in pellets, which caused mortality of $88.66 \pm 13.56\%$ ($TL_{50} = 4.57$ d). The combination of 3% of boric acid and spores of *B. bassiana* in powdered bait caused $81.62 \pm 11.07\%$ of mortality ($TL_{50} = 4.82$ d) without significant differences to the mixture of 5% of boric acid and spores of *B. bassiana* in the bait in pellets. By contrast, the powder with spores of *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 g dust) only killed $1.36 \pm 13.56\%$ of the treated cockroaches, whereas pellets with spores of *B. bassiana* without boric acid did not cause mortality. The association of the boric acid and the fungus *B. bassiana* showed a synergistic interaction between these agents causing a high mortality on nymphs of the cockroach *P. americana*. The laboratory results are promising and confirm the potential of *B. bassiana* combined with boric acid as an alternative for the cockroach management.

Key words: baits, American cockroach, integrated control

3.1 INTRODUCCIÓN

La cucaracha americana, *Periplaneta americana* (L.) es una plaga urbana importante, que puede actuar como un vector de problemas a la salud humana (gastroenteritis, diarreas, disentería, tuberculosis, cólera, entre otras), debido a que en su tracto digestivo se encuentran una gran cantidad de microorganismos como protozoarios y bacterias que son transportados en sus patas y diseminados mediante sus secreciones y excretas (Cochran, 1989). Para el control de esta especie se han empleado frecuentemente insecticidas organosintéticos residuales de acción neurotóxica. Éstos incluyen insecticidas organofosforados y carbamatos, así como insecticidas de origen botánico como piretrinas y piretroides (Schal y Hamilton, 1990; Schal et al. 1993). Sin embargo, se ha documentado el incremento en el número de casos de resistencia a piretroides (Pachamuthu y Kamble, 2000; Quesada et al., 2004, Schal et al., 1993; 2004), por lo que, es necesario desarrollar nuevas opciones para el control de esta plaga (Pachamutu et al., 1999).

El control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* se considera como una opción potencial para el control de *P. americana*. Quesada et al. (2004), probaron cuatro concentraciones de esporas de *M. anisopliae* cepa EAMa, contra adultos de la cucaracha alemana, *Blattella germanica* y concluyen que este hongo tiene el potencial para ser transmitido de manera horizontal y diseminar la infección dentro de la población de esta cucaracha. Mohan et al. (1999), evaluaron en laboratorio la patogenicidad de tres aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *P. americana* basándose en los hábitos gregarios de estos insectos, para promover una infección inicial y una subsecuente diseminación. Steenberg et. al. (1998), trabajaron con seis aislamientos de los Hyphomycetes: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces farinosus* y *Verticillium lecanii*, seleccionados por ser infectivos contra cuatro especies de cucarachas (*B. germanica*, *Blatta orientalis*, *P. americana* y *Supella longipalpa*). Encontraron que todos los aislamientos fúngicos fueron infectivos, aunque *B. orientalis* denotó menor susceptibilidad.

Una de las limitantes para la aplicación de esta estrategia de control, es su lento modo de acción, que normalmente toma 30 días con variaciones de mortalidad entre 17 y 100%, (Mohan et al. 1999), lo que pone en duda la efectividad de estos agentes para su aplicación en campo. Algunos investigadores sugieren que para mejorar la eficacia de los hongos entomopatógenos se incorporen dosis subletales

de insecticidas orgánicos como el imidacloprid, clorpirifos, propetamfos, y ciflutrin en cebos, (Kaakeh *et al.* 1997; Pachamutu *et al.* 1999; Pachamutu y Kamble, 2000, Zurek *et al.* 2002). Otros métodos alternativos empleados son los reguladores de crecimiento, insecticidas vegetales como el NeemAzal® de *Azadiracta indica* (Ritcher *et al.* 1997), agentes reguladores de agua como el ácido bórico y las tierras diatomáceas (Zurek *et al.* 2002; Akbar *et al.* 2004; Chad *et al.* 2004.). Zurek *et al.* (2001) evaluaron aplicaciones tópicas en polvo y en solución con agua de *M. anisopliae* y ácido bórico contra *B. germanica*, y concluyeron que esta combinación mató significativamente más rápido a las cucarachas que la aplicación de dichos agentes de manera independiente. En esta investigación se evalúa el efecto de diferentes concentraciones de ácido bórico sobre la actividad patogénica de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, en ninfas de la cucaracha americana. Adicionalmente se evaluó la interacción hongo entomopatógenos-ácido bórico en dos formulaciones de cebos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Cría de *P. americana*. La colonia de *P. americana* susceptibles a insecticidas fue proporcionada por la Universidad de Florida, Gainesville, E.U.A., y fue mantenida en el insectario de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, a una temperatura de 29 ± 2 °C, humedad relativa (HR) de $60 \pm 10\%$ y fotoperíodo de 12 L: 12 O. Para mantener una población de edad uniforme de *P. americana*, se colocaron adultos en recipientes plásticos de 1.2 m x 0.8 m x 0.6 m. A cada recipiente se le proporcionó agua mediante un dispositivo fabricado con un tubo de cristal 20 cm x 2 cm de diámetro, tapado con algodón hidrófilo para evitar escurrimientos y formación de mohos. Adicionalmente, se colocaron nueve cilindros de cartón plisado (20 cm x 32 cm) como refugio (Zurek *et al.*, 2002). Las cucarachas se alimentaron con el producto comercial PROLAB 2500 Rodent Diet®. Para evitar la fuga de los insectos se colocó una mezcla de vaselina y aceite mineral (3:2) en los bordes de los recipientes, cada recipiente se cubrió con tela de organza para permitir la ventilación.

Hongos entomopatógenos. Los hongos utilizados en este estudio fueron (a) *M. anisopliae* que se obtuvo del producto comercial Destruxin-Ma Lab. Laverlam®, y (b) *B. bassiana* (Bb 88) proporcionado por el laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados. Los hongos se reprodujeron sobre agar dextrosa Sabouraud (ADS-Bioxon®) y se incubaron a 26 ± 2 °C durante 15 días con un fotoperíodo 12:12 h. Ambos aislamientos fueron pasados por *P. americana* y reaislados sobre ADS.

Se aplicaron 10 μL de una suspensión de esporas de 5×10^9 esp/mL en el pronoto y abdomen de 10 ninfas de *P. americana*; después de la inoculación, cada insecto se colocó en cajas Petri con papel húmedo Whatman® No.9 y se le mantuvo en la cámara de incubación a las condiciones descritas para la cría. Las esporas obtenidas de las cucarachas micosadas se purificaron mediante dos pases sucesivos en ADS. Para obtener preparaciones de conidia, ambos hongos fueron cultivados en ADS por un periodo de 15 días en las condiciones mencionadas anteriormente. Las esporas fueron cosechadas mediante barrido con un pincel y preservadas a 4°C en microviales de 2 mL de capacidad.

3.2.1 Compatibilidad del ácido bórico y los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

Para evaluar el efecto del ácido bórico (AB) sobre la viabilidad de las esporas de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana*, se emplearon 4 dosis; 1, 3, 5 y 10% a partir de la referencia sugerida por el producto comercial Roach Kill® (4.88 g/m²), el cual fue utilizado en todas las pruebas. Las concentraciones fueron ajustadas diluyendo la concentración de ácido bórico con 0.1% de Tween 80. A cada concentración se le agregaron 1×10^7 esp/mL de cada uno de los aislamientos. De la suspensión, hongo-AB se aplicaron 20 μL en rodajas de medio de cultivo agar-agua de 2 cm de diámetro, después de la inoculación cada rodaja se colocó sobre un portaobjetos, se cubrió con un cubre objetos y se colocó dentro de una caja de Petri estéril (9 cm diámetro) sobre un triángulo de cristal que sirvió como soporte. En la base de la caja se aplicaron 10 mL de glicerol al 20% para mantener una humedad constante dentro de la caja Petri, la cual fue sellada con parafilm y almacenada dentro de una cámara de germinación a 26 ± 2 °C con un fotoperiodo 12:12 h. Para cada concentración se contó con tres repeticiones más el testigo, el cual consistió en discos de agar agua en los que se aplicaron 20 μL de la suspensión de esporas de cada uno de los hongos.

Los discos fueron revisados con la ayuda de un microscopio compuesto (40x) evaluando la germinación de conidia a las 12, 24 y 36 horas posteriores a la inoculación. Los datos de porcentaje de germinación registrada durante los tres tiempos de lectura señalados, fueron transformados con el (arcoseno $\sqrt{\text{porcentaje}}$), sometidos a la prueba de normalidad y homogeneidad de Bartlett y se analizaron mediante un diseño factorial con un arreglo de 3x2x5 (tiempo de lectura-aislamiento-concentración de AB), con el cual se evalúa el efecto del ácido bórico sobre la germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, basándonos en la información del PROC ANOVA en SAS para Windows 8.01

(SAS Institute, 2000) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) de la combinación hongo-concentración a las 24 horas. Además se analizaron las interacciones hongo-concentración-tiempo de lectura para ver la tendencia del efecto del ácido bórico sobre los dos aislamientos probados.

3.2.2 Efecto del ácido bórico en ninfas de *P. americana*.

Se prepararon cebos con una mezcla (p/v) de una solución de ácido bórico (3, 5, 7% respectivamente), 5% de grenetina y 100 g de alimento molido (PROLAB 2500 Rodent Diet®) y 50 mL de agua destilada. Para homogeneizar la mezcla, ésta se puso al calor en un frasco de cristal (135 mL) con tapa, la mezcla líquida se vertió en moldes cilíndricos de plástico de 20 g de capacidad. Una vez gelificados los cebos se colocaron como alimento en cajas de cristal de 1.2m x 0.8m x 0.6m, que contenían 50 ninfas (3° y 4° ínstar) de *P. americana*, aclimatadas a los recipientes de cristal previamente durante 48 h. En cada recipiente se colocó agua y un cilindro de cartón como refugio. Los recipientes de cristal se mantuvieron en una incubadora a 27 °C y HR $77 \pm 5.2\%$. La mortalidad de las cucarachas se supervisó diariamente durante 15 días, cada tratamiento se reprodujo tres veces. Los cebos contaminados se retiraron a los cinco días de ser expuestos y se cambiaron por el alimento PROLAB 2500 Rodent Diet®, comúnmente proporcionado para el mantenimiento de la cría. El testigo fue alimentado con cebos sin ácido bórico y se mantuvo a las mismas condiciones que los demás tratamientos. Todos los tratamientos tuvieron tres repeticiones. Los datos de mortalidad acumulada se normalizaron ($\arcseno \sqrt{\text{porcentaje}}$) y analizaron mediante un diseño completamente al azar. La selección de los hongos se basó en la información obtenida del PROC ANOVA en SAS para Windows 8.01 (SAS Institute, 2000) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.2.3 Asociación de ácido bórico y *B. bassiana* en el control de *P. americana*

Ninfas de 3° y 4° ínstar de *P. americana* fueron utilizadas para evaluar el efecto del ácido bórico (AB) y *B. bassiana* (Bb 88) solos y combinados. En este ensayo se probaron: (a) **cebo en polvo**, constituido de una mezcla de 10 gr de alimento molido, 10% de azúcar glass®, AB (0, 1, 3 y 5%), y *B. bassiana* 3×10^8 esp / en 2 g de polvo y (b) **cebo en pelet (barras de alimento)**, en cuya preparación se utilizó la misma mezcla del cebo en polvo, adicionando 10% de grenetina y 10 mL de agua destilada, esta mezcla se puso al calor en un frasco de cristal (135 mL) con tapa para evitar la evaporación del líquido.

Con esta mezcla se rellenaron popotes de plástico y una vez solidificada y seca, se dividió en cinco raciones de 2 g cada una. Para cubrir cada pelet con las esporas de los hongos, éstos se depositaron en un tubo de cristal de 1.8x 15 cm, en donde se encontraban 0.2 g de esporas, se agitaron uniformemente en un vortex (Maxi Mix II by Thermolyne®) durante dos minutos, con lo que se logró una concentración final de 2.5×10^8 esp/pelet. La concentración de esporas del cebo en polvo se determinó preparando una suspensión con 2 g de polvo en 100 mL de Tween 80 al 0.01%; en el caso de los pelets la concentración de esporas se calculó lavando cada pelet en 10mL de 0.01% Tween 80. La cuantificación de esporas en ambos casos se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

Dos días antes de la prueba 12 ninfas de *P. americana* de 3º y 4º instares se inmovilizaron con CO₂ y se colocaron en frascos de plástico de 250 mL, con la tapa perforada (orificio de 4 cm²) y cubierta con tela de organza para proporcionar ventilación al recipiente. Dentro de cada recipiente se colocó agua en un tubo para micro centrífuga de 1mL (CORNING®) tapado con un algodón hidrófilo, alimento (PROLAB 2500 Rodent Diet®) y un cartón corrugado enrollado de 4 cm de largo que sirvió de refugio a las cucarachas. Transcurrido este periodo se cambió el alimento por cebos preparados con AB, AB + *B. bassiana*. Todos los tratamientos consistieron en cinco repeticiones.

Como testigo absoluto se aplicaron los pelets de alimento sin el hongo y ácido bórico. En el polvo, el testigo absoluto fue la mezcla del alimento molido con el 10% de azúcar glass. La exposición a los cebos se realizó en un periodo de cinco días y el registro de la mortalidad se llevó a cabo diariamente durante 15 días. Las condiciones de humedad relativa (75.5 ± 7.8 %) y temperatura (24 ± 1 °C), fueron registradas con un datalogger HOB0®, que se programó para tomar lecturas cada hora.

Los datos de porcentaje de mortalidad acumulada registrada diariamente durante los 15 días, fueron normalizados ($\arcseno \sqrt{\text{porcentaje}}$) y se analizaron con un diseño factorial con un arreglo de 2 x 2 x 4 (cebo-ausencia o presencia del hongo-concentración de AB), el cual indica el efecto del ácido bórico y la mortalidad ocasionada por *B. bassiana* sobre *P. americana*. La información obtenida del PROC ANOVA en SAS para Windows 8.01 (SAS Institute, 2000) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) de la combinación de los tres factores se analizaron para ver la aceptación o repelencia de los cebos formulados a las concentraciones mencionadas y la mortalidad acumulada al final de la evaluación.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Compatibilidad del ácido bórico y los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*

La prueba de viabilidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* efectuada en agar-agua permitió cuantificar el porcentaje de germinación del hongo sobre un substrato húmedo, tratando de igualar las condiciones y las disposición de nutrientes con los que se aplicaría el hongo en los cebos usados en pruebas posteriores. La germinación de *B. bassiana* fue más rápida comparado con *M. anisopliae* (Cuadro 1); se obtuvo una alta germinación desde las 12h.

Cuadro 1. Formación del tubo germinativo (% de germinación) de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a las 12h, 24h y 36h, en medio de agar-agua. Tukey (P<0.05).

Lecturas de germinación (%)	12 horas	24 horas	36 horas
<i>B. bassiana</i>	83 ± 7.21 % e	99 ± 1 % b	100 ± 0 % a
<i>M. anisopliae</i>	36.33 ± 14.84 % k	76.33 ± 3.06 % f	94.67 ± 3.06 % c

La exposición a las 24 h de las esporas de ambos hongos a AB mostró un efecto negativo sobre la germinación (Figura 1). Considerando la lentitud en la germinación de *M. anisopliae*, este hongo fue afectado por las diferentes concentraciones de AB, mientras que *B. bassiana* tuvo reducciones menos drásticas, mostrándose más tolerante a las concentraciones de 1 y 3 %, tratamientos en los que no se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

En la Figura 2 se muestra la interacción de las combinaciones de los tres factores estudiados (tiempo de lectura-aislamiento-concentración de AB), donde se observa la misma tendencia de reducción del porcentaje de germinación en los dos aislamientos probados. *M. anisopliae* mostró menor germinación conforme incrementaron tanto la concentración de ácido bórico como el tiempo de exposición.

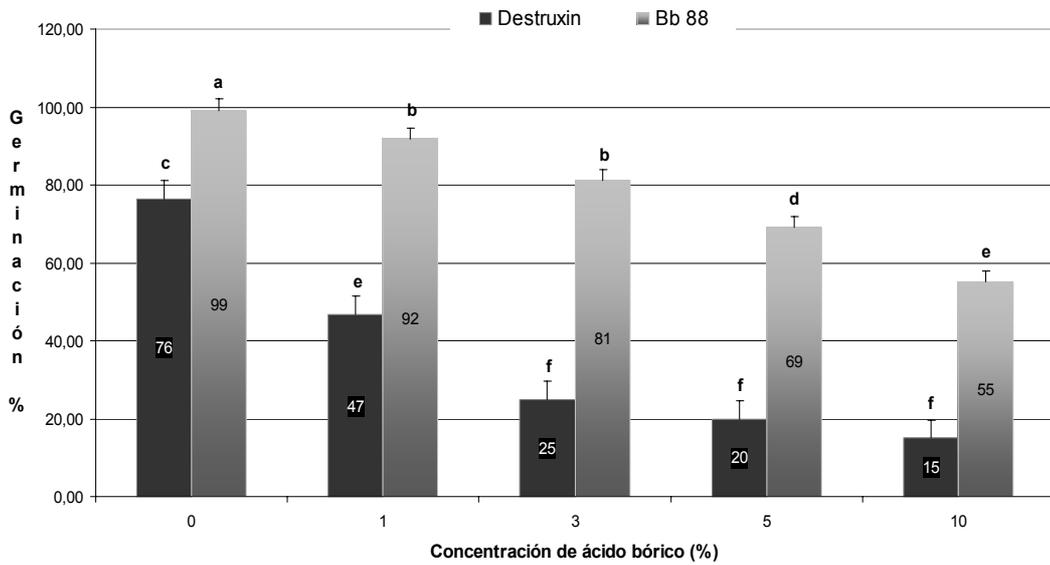


Figura 1. Efecto de cuatro concentraciones del ácido bórico en la germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* a las 24 horas de inoculados en el medio de cultivo agar-agua a la concentración de 1×10^5 esp/μL. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey (P<0.05).

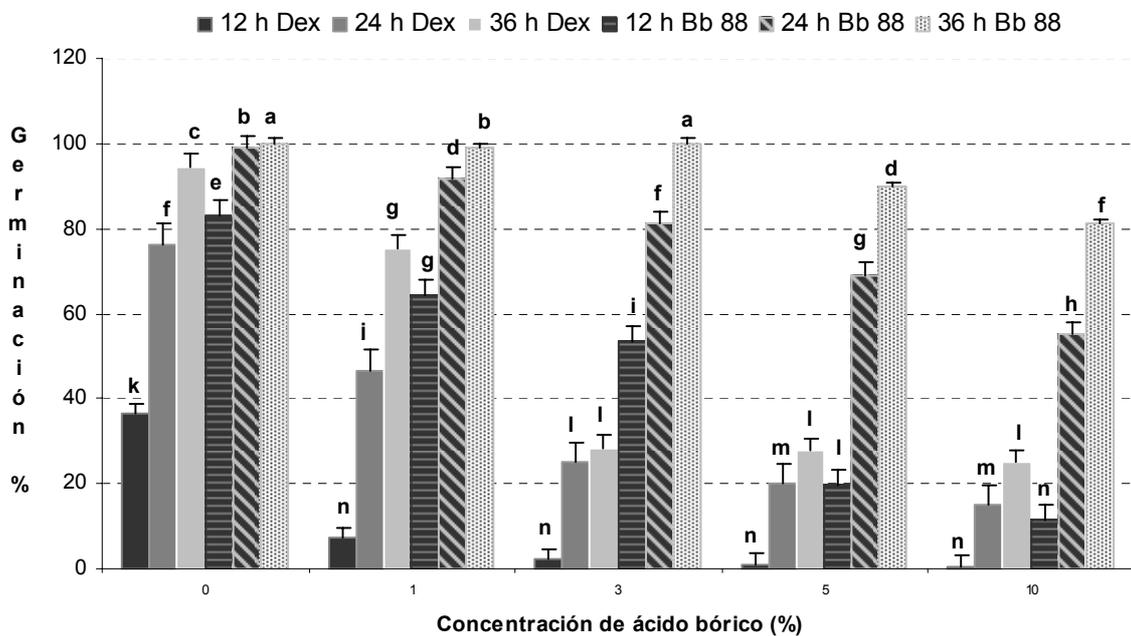


Figura 2. Germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en las combinaciones: tiempos de lectura-aislamientos-concentraciones de AB inoculados en el medio de cultivo agar-agua a la concentración de 1×10^5 esp/μL. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey (P<0.05).

En el caso de *B. bassiana* la germinación ocurrió en las diferentes concentraciones de ácido bórico; a las 36 de inoculación en 10% de AB la germinación fue alta (>81%). La germinación de *B. bassiana* a las 12 y 24 parece ser inhibida por la presencia de ácido bórico; sin embargo, las lecturas realizadas posteriormente parecen indicar que las esporas recobran su capacidad de germinación, como se muestra en las barras correspondientes a las 36 h. Con este hongo no se observaron diferencias en germinación (100%) entre el testigo y la concentración al 3% del ácido bórico.

3.3.2 Efecto del ácido bórico en ninfas de *P. americana*.

La mortalidad corregida de las ninfas de *P. americana* después de la ingestión de AB varió de 0.67 a $4 \pm 2\%$ para las diferentes concentraciones, a los 15 días después de la exposición al producto (Figura 3). En ninguna de las concentraciones probadas se obtuvo mortalidad arriba del 5%, lo cual coincide con Zurek *et al.* (2002), quienes indican que concentraciones menores al 0.2% no causan mortalidad en las cucarachas tratadas. Se puede considerar que las concentraciones de ácido bórico empleadas en este estudio constituyen dosis subletales.

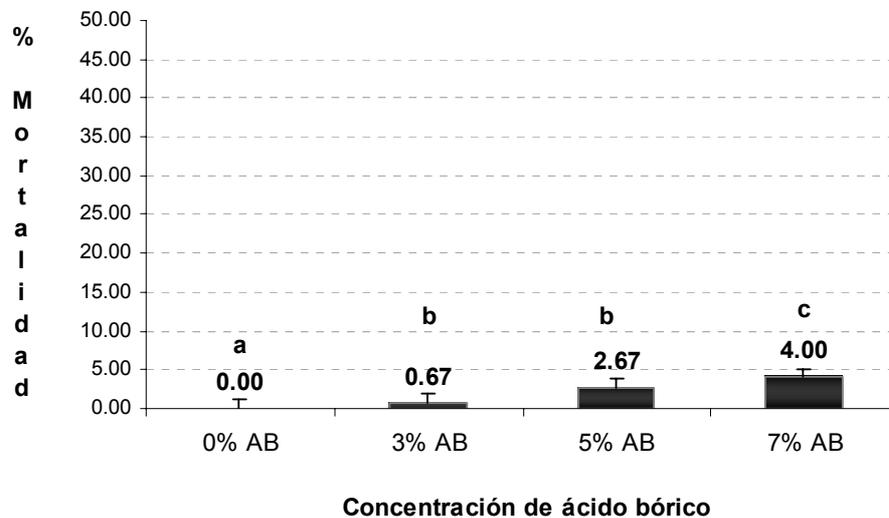


Figura 3. Mortalidad en ninfas de 3° y 4° instar de la cucaracha *P. americana* expuestas a tres concentraciones de ácido bórico por el método de ingestión. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

3.3.3 Asociación de ácido bórico y *B. bassiana* en el control de *P. americana*.

La aplicación combinada de AB (1, 3, y 5%) y esporas de *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 g de polvo y 2.5×10^8 esp / pelet, respectivamente) sobre ninfas de *P. americana* (3° y 4° instar) resultó en una mortalidad mucho más alta y rápida, lo que sugiere alta compatibilidad entre los dos productos. Las concentraciones de 3 y 5% en la aplicación en polvo mataron 82 y 92% de las cucarachas respectivamente con un TL_{50} de 4.81 días en la concentración baja y 3.81 días en la concentración alta (Fig. 4, Cuadro 2), matando significativamente más rápido que cuando se aplicaron en forma independiente el hongo o el ácido bórico. De manera similar, la combinación de ácido bórico (3, 5%) y el hongo en los pelets (2.5×10^8 esp / pelet) elevó significativamente la mortalidad de las cucarachas a 63 y 87 % en la concentración baja y alta de ácido bórico respectivamente (Fig. 4).

La presencia de ácido bórico parece tener un efecto sobre la cucaracha y el hongo, la cucaracha al comer los cebos muestra mayor susceptibilidad a la invasión por el hongo, obteniendo mayor mortalidad de las cucarachas tratadas con la combinación AB + *B. bassiana* (polvo) que con el hongo solo (1.66%). Algunos autores mencionan que la ingestión de bajas concentraciones de ácido bórico destruye la cubierta celular del intestino medio (Cochran, 2005), este efecto puede ser suficiente para causar la muerte del insecto o hacerlo susceptible a la invasión del entomopatógeno, daños físicos del intestino o la alteración del pH de la hemolinfa facilita la infección y disminuyen la respuesta inmunológica del insecto.

Cuadro 2. Valores de TL_{50} y mortalidad acumulada en los cebos polvo y pelet a las concentraciones 3 y 5 % de ácido bórico combinados con *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 gr de polvo y 2.5×10^8 esp / pelet, respectivamente)

Tipo de Cebo	Formulación	TL_{50} (Días)	Mortalidad
Polvo	AB 3% + <i>B. bassiana</i>	4.8059±1.0659	81.62±11.07
Polvo	AB 5% + <i>B. bassiana</i>	3.8106±0.7696	91.68±12.90
Pelet	AB 3% + <i>B. bassiana</i>	8.6693±2.1422	63.34±8.51
Pelet	AB 5% + <i>B. bassiana</i>	4.0537±1.0196	86.66±13.56

La combinación a la concentración más baja del AB (1%) combinada con las esporas de *B. bassiana*, sólo mató $38.32 \pm 5.4\%$ y $35 \pm 5.6\%$ en el polvo y el pelet, respectivamente. Sin embargo, la aplicación de estos agentes de control evaluados de manera independiente causó mortalidades menores que la combinación de los mismos. El AB solo a 1% en polvo mató a $3.32 \pm 0.58\%$ de las cucarachas, en tanto

la exposición al pelet a esta concentración no produjo mortalidad. La exposición al polvo con esporas de *B. bassiana* (3×10^8 esp / 2 g de polvo y 2.5×10^8 esp / pelet, respectivamente) sin AB sólo mató al $1.66 \pm 0.43\%$ de las cucarachas, y el pelet no causó mortalidad en las ninfas (Figura 4).

Las concentraciones del 3 y 5 % de AB causaron mortalidad significativamente menor que en la combinación con las esporas del hongo, excepto en el polvo a la concentración del 5% que mató al $46.62 \pm 5.8 \%$ de las cucarachas, significativamente igual a la mortalidad producida por la combinación del AB a 1% con las esporas del hongo. En la concentración del AB al 3% el polvo resultó ser más infectivo matando a $28.28 \pm 3.99 \%$ de las cucarachas, comparado con el pelet a la misma concentración que causó la mortalidad significativamente menor de $4.98 \pm 1.01 \%$. El pelet al 5 % de AB y esporas de *B. bassiana* causó una mortalidad significativamente menor ($18.32 \pm 3.64 \%$) que el polvo a esta concentración (Figura 4). Los cadáveres colectados al final del experimento presentaron esporulación de *B. bassiana*, indicando que no hubo un efecto negativo en el desarrollo del hongo ($80 \pm 10 \%$ de micosis en las cucarachas muertas), además también se observó desarrollo de hongos saprófitos como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

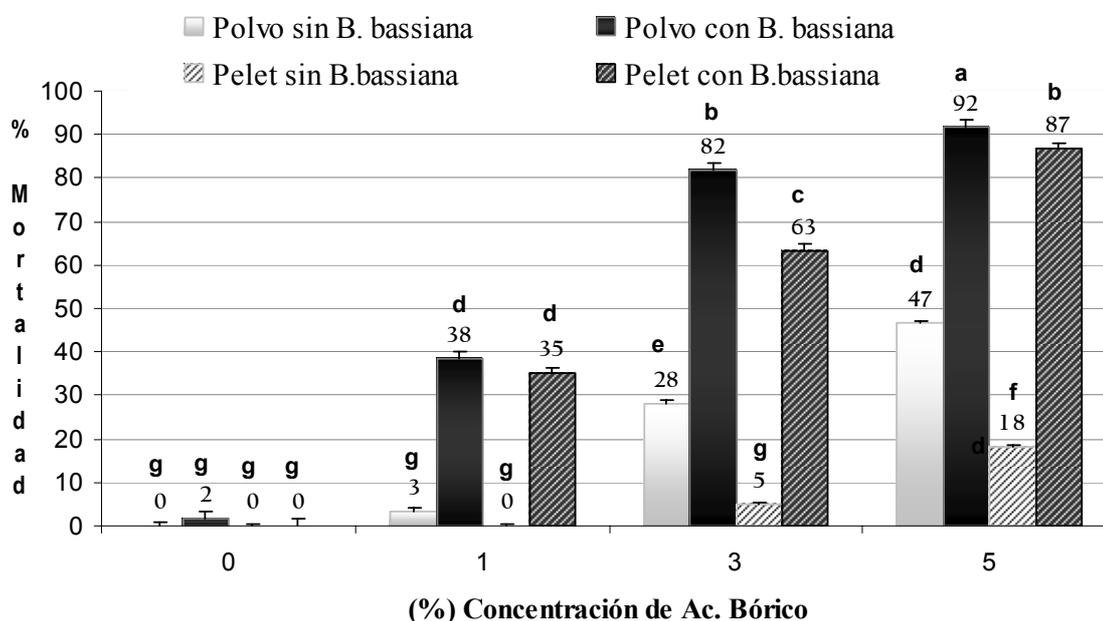


Figura 4. Mortalidad acumulada (15 días) en ninfas de 3° y 4° instar de *P. americana* expuestas durante cinco días a la combinación de ácido bórico-esporas de *B. bassiana* en dos tipos de cebo: A) polvo y B) pelet. **Cebo A)** ácido bórico 1, 3 y 5% + 3×10^8 esp/ 2 gr de polvo. **Cebo B)** ácido bórico 1, 3 y 5% + 2.5×10^8 esp/ pelet. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

3.4 DISCUSIÓN

Este estudio nos permitió evaluar el desarrollo del hongo entomopatógeno *B. bassiana* combinado con diferentes concentraciones de ácido bórico (AB) en una formulación en cebo tóxico de alimento y el azúcar glass (sacarosa) como fagoestimulante para el manejo integrado de *P. americana*. El AB ha sido formulado en cebos sólidos contra las cucarachas porque ofrece alta seguridad en mamíferos, no se volatiliza y la absorción a través de la piel de los humanos es despreciable. Sin embargo, su uso se ha limitado porque los insecticidas orgánicos proporcionan una muerte mucho más rápida (Zurek *et al.*, 2002).

En esta investigación era necesario descartar el inconveniente de que este agente no fuera compatible con los hongos entomopatógenos; es decir, que afecte el desarrollo del hongo, lo que puede disminuir su viabilidad y por ende un decremento del grado de patogenicidad, virulencia y la reproducción de sus estructuras infectivas, particularmente en el porcentaje de germinación de las esporas. (Kaakeh *et al.* 1997; Pachamutu *et al.* 1999; Pachamutu y Kamble, 2000, Zurek *et al.* 2002 ; Chad *et al.* 2004).

El análisis del efecto del ácido bórico sobre la germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* permitió seleccionar a este último, porque este hongo fue capaz de producir el tubo germinativo (81 ± 2.65 %) a la concentración más alta de ácido bórico probada (10%). Los resultados muestran que la germinación de *M. anisopliae* en todos los tratamientos e incluso en el testigo expresó un menor desarrollo del tubo germinativo, comparado con el desarrollo *B. bassiana*. Esto nos permite creer que este hongo tiene mayor capacidad de desarrollarse en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes. Se concluye que la viabilidad de los dos aislamientos probados está directamente relacionada como un factor limitativo a la combinación con dosis altas de ácido bórico y que *M. anisopliae* es el más afectado. Al respecto, St Leger *et al.* (1989) afirman que cuando un hongo entomopatógeno como *M. anisopliae* es combinado con otro agente insecticida, la germinación no es afectada, pero la formación del apresorio y la diferenciación de las hifas pueden ser significativamente inhibidas por la incorporación de ciertas macromoléculas en el medio nutritivo, en este caso la combinación con el AB.

Las ventajas en el uso del AB es que es barato, seguro para el ser humano, y se ha observado que tiene el efecto de intensificar la virulencia y el poder infectivo de patógenos como *Bacillus thuringiensis* mezclado con AB al 1% cuando se aplicó vía ingestión contra larvas de la palomilla *Porthetria dispar*

(Doane y Wallis, 1964), en la combinación con diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* contra la cucaracha alemana (Zurek *et al.* 2002). Se tiene el antecedente de que *M. anisopliae* se ha considerado como un agente de control potencial para su aplicación en ambientes urbanos y ha sido evaluado para el control de la cucaracha alemana (Quesada-Moraga *et al.* 2004). Kaakeh *et al.* (1996, 1997) reportan tiempo letal de *M. anisopliae* para el control de esta cucaracha, pero no presentan referencias acerca de la concentración letal, además incluyen datos de mortalidad basados en ensayos de contacto con el producto comercial Bio-Path producido por Ecoscience, el cual requirió 28 días para causar 28% de mortalidad. A pesar de que *M. anisopliae* tiene la capacidad patogénica para ser un agente potencialmente efectivo el tiempo requerido para controlar a las cucarachas ha sido el factor más importante para limitar su aplicación. Por consiguiente, surgió la necesidad crítica reforzar la actividad biológica de los hongos entomopatógenos con la integración de dosis subletales de otros agentes insecticidas (Pachamuthu *et al.* 1999).

El ácido bórico ha sido aplicado en polvo como un insecticida de contacto, mezclado con atrayentes, pues hay reportes de que el AB no se adhiere fácilmente a la cutícula de *P. americana* y que ésta tampoco lo ingiere durante su acicalamiento (Strong *et al.*, 1993, Gore y Schal, 2004). La mezcla con harina o azúcares o la combinación con agua en cebos líquidos ha sido reportada como una estrategia para aumentar la atracción y la ingestión al AB; sin embargo, cebos que contienen del 30 a 50% han sido repelidos por la cucaracha alemana, *Blattella germanica* (Gore y Schal, 2004). Gore *et al.* (2004) probaron la tolerancia de cebos combinando, el ácido bórico a 2% con sacarosa 0.5 M mezclados con alimento contra la cucaracha alemana. La concentración de ambos ingredientes en el cebo fue de gran aceptación y sin datos de actividad repelente. Nuestros resultados en la evaluación de dosis subletales de ácido bórico a ninfas de *P. americana* en la combinación de azúcar glass®, alimento y el AB a (3, 5, y 7%), confirman la aceptación de esta mezcla y además indican que una concentración de 7% de ácido bórico, a pesar de causar mortalidades bajas (4%), es significativamente diferente de las otras concentraciones probadas.

Estos datos y el bajo efecto de inhibición que causó el AB en el porcentaje de germinación de las esporas de *B. bassiana* puede ser empleada para el manejo integrado de la cucaracha americana. Sin embargo, Ebeling *et al.* (1966) documentaron que el ácido bórico aplicado en polvo es más efectivo como un veneno estomacal que como insecticida de contacto, pues el polvo se adhiere a la cutícula de

las cucarachas por carga electrostática y las mata principalmente por ingestión durante el acicalamiento y de manera secundaria por penetración al exoesqueleto. También mencionan que aunque las cucarachas son mayormente atraídas cuando el ácido bórico se mezcla con un fagoestimulante como el azúcar éste puede disminuir su eficacia porque hay una reducción de la carga electrostática. Esto coincide con los resultados donde se evaluó la combinación de AB y esporas de *B. bassiana* proporcionadas a las ninfas de *P. americana* en el cebo en polvo, donde se expresó la mayor mortalidad; sin embargo en la combinación de 3% de AB y esporas de *B. bassiana* en el pelet también hubo atracción al pelet, pues éste logró causar una mortalidad cercana a 82%. La interacción de sinergismo entre estos dos agentes, y de acuerdo con lo mencionado con Ebeling et al (1966) y Gore y Schal (2004) podemos confirmar que el ácido bórico es un agente efectivo para ser integrado a un biológico como el hongo *B. bassiana* porque no son rechazados por las cucarachas y por ello son efectivos para su manejo integrado.

Otros factores como el tiempo de exposición a los cebos y el método de aplicación también deben ser considerados para el manejo integrado de esta plaga. Grzegorz et al. (2001) probaron formulaciones en cebo con diferentes ingredientes activos contra la cucaracha alemana, incluyendo la formulación comercial MRF 2000, pasta de ácido bórico al 33.33% durante 5 días continuos en adultos, ninfas del primer y segundo ínstar de la cucaracha *Blattella germanica* y la mortalidad acumulada mayor a los 15 días del tratamiento se registró en las ninfas de primer ínstar (87 ± 3.9 %).

Comparando los resultados, de la exposición a las dos formulaciones de cebos (polvo y pelet) con el ácido bórico como agente insecticida único durante 5 días, la mortalidad causada por la concentración más alta (5%) fue de 18.32 ± 9.72 % para el pelet y de 46 ± 11.33 para el polvo registrada también a los 15 días de exposición. Estos datos sugieren que aunque el ácido bórico puede destruir la pared del intestino de las cucarachas y causarles la muerte por el daño mecánico del tracto digestivo o por una septicemia originada por los microorganismos asociados a su tracto digestivo, también el incremento de la mortalidad podría ser por un efecto de desgaste o abrasión de la cutícula de las cucarachas en el momento del acicalamiento, conducta que fue muy marcada en los tratamientos de cebo en polvo. Zureck et al. (2002) interpretan que aunque el principio de sinergia no es determinado, está claro que las cucarachas tratadas con los cebos que contienen concentraciones subletales de ácido bórico son más susceptibles a la infección con *B. bassiana* que cuando se aplica el hongo solo.

La infectividad del hongo fue reforzada ampliamente y podemos concluir que la penetración de la cutícula de *P. americana* por *B. bassiana* se ve facilitada por la acción del ácido bórico. *B. bassiana* puede entrar al hemocele de la cucaracha y continuar con la reproducción y división de estructuras infectivas que matan al hospedante.

La naturaleza de la infección causada por la combinación de ácido bórico y el hongo podría ser inmunológica; es decir que la combinación de estos dos agentes reduzcan la capacidad de defensa de las cucarachas, haciéndolas más susceptibles a la infección o romper el balance natural con sus microorganismos simbióticos a los que está asociada y morir por bacteremias o toxemias. Sin embargo, es importante remarcar que la esporulación de los hongos sobre las cucaracha muertas fue mayor al 70% en todos los tratamientos donde se combinaron los dos agentes, y hubo también un porcentaje de cucarachas adicional donde la esporulación se presentó en partes localizadas de las cucaracha, como apéndices bucales y abdomen, pero ésta fue acompañada por la presencia de bacteria y desarrollo de hongos saprofitos contaminantes como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*

La reducción del tiempo letal observada en los tratamientos que causaron mortalidades mayores al 50% permiten concluir que hay una relación de sinergismo entre *B. bassiana* y el ácido bórico. Esto ofrece una alternativa inocua para el ambiente urbano estrechamente relacionado con la salud humana, donde la ventaja principal es que el tiempo letal es menor que cuando estos agentes se aplican de manera independiente, y la esporulación del hongo sobre los insectos muertos no se ve afectada. Se considera que el manejo integrado de cucarachas con la combinación de éstos agentes puede ser ideal porque el hábitat de esta plaga se asemeja a las condiciones ambientales que necesita el hongo para promover la infección inicial y una sucesiva diseminación en del patógeno en las poblaciones de esta cucaracha.

3.5 LITERATURA CITADA

- ANDIS, M. 1994. The Bio-Path cockroach control chamber uses nature to control nature's pests. *Pest Control*. 62(7):44 - 48.
- BENNETT, F. W.; OWENS, J. M. & CORRIGAN, R. M. 1996. Guía científica de Truman para operaciones de control de plagas. Universidad de Purdue. Advanstar. EU. 14-30 y 127-143 pp.
- COCHRAN D. G. 1995. Toxic effects of boric acid on the German cockroach. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 5, (6): 561-563
- DOANE C. C, AND WALLIS C. R; 1964. Enhancement of the action *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on *Porthetria dispar* (Linnaeus) in laboratory test. *J. Insect Pathology*. 6: 423-429.
- EBELING W., WAGNER R. E. AND REIERSON D. A.1966. Influence of repellency of blatticides. I. Laboratory experiments with German cockroaches. *J. Econ. Entomol.*59:1374-1388.
- GORE, J. C. Y SCHAL, C. 2004. Laboratory evaluation of boric acid-sugar solutions as baits for management of german cockroach infestations. *J. Econ. Entomol.* 97(2): 581-587.
- GORE, J. C.; ZUREK, L.; SANTANGELO, R. G.; STRINGHAM, S. M.; WATSON, D. W. & SCHAL, C. 2004. Water solutions of boric acid and sugar management of german cockroach populations in livestock production systems. *J. Econ. Entomol.* 97(2): 715-720.
- GRZEGORZ B., KOPANIC, JR. R. J.AND SCHAL C. 2001. Transfer of Ingested Insecticides among Cockroaches: Effects of Active Ingredient, Bait Formulation, and Assay Procedures. *J. Econ. Entomol.* 94(5): 1229-1236.
- HAJEK, A. & ST. LEGER, R. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- KAAKEH W.; REID B. L; BOHNERT T. J.; BENNETT G. W. 1996. Horizontal Transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (imperfect fungus Hyphomycetes) and hydramethylnon among German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae). *J. of Entomological Science* 31(4): 378-390.
- KAAKEH W.; REID B. L; BOHNERT T. J.; BENNETT G. W. 1997. Toxicity of Imidacloprid on the German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae) and the Synergism Between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes). *J. Econ. Entomol.*90(2):473-482.
- MILNER R. J. AND PEREIRA R. M. 2000. Microbial Control of Urban Pests – Cockroaches, Ants and Termites. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers. 721-740 pp.
- MOHAN. M. C.; LAKSHMI, A. K.; DEVI K. U; 1999. Laboratory evaluation of the patogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *J. Biocontrol Science and Technology of Economic-Entomology* 9(1):29-33.
- PACHAMUTHU P. AND KAMBLE S. T. 2000. In vivo study on Combined Toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with Sublethal Doses of Chlorpirifos,

- Propetamphos and Cyflutrin Againsts German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Economic Entomology.93(1):60-70.
- PACHAMUTHU P.; KAMBLE S. T; AND YUENG G. Y. 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. J. of Economic-Entomology 92(2):340-346.
- QUESADA-MORAGA E, QUIRÓS RS, GARCÍA PV, ÁLVAREZ CS. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea:Blattellidae). J. Inverteb. Pathol. 87:51-58.
- SCHAL C. AND HAMILTON R. L. 1990. Integrated suppression of synantropic cockroaches. Annual Review of Entomology 35: 521-551.
- ST. LEGER R.J., BUTT T. M.; GOETTEL M.S.; STAPLES, R.C. AND ROBERTS D.W. 1989. Production in vitro of apresoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Exp. Mycol 13:274-288.
- STRONG C. A., KOEHLER G. P. AND PATTERSON R. S.; 1993. Oral toxicity and Repellency of Borates to German Cockroaches (Dictyoptera Blattellidae). J. Econ. Entomol. 85(5):1458-1463.
- SUITER D.R.; HINKLE N.C. 1997. Biological suppression of synanthropic cockroaches. Journal of Agricultural Entomology. 14(3): 259-270.
- THOMPSON S. AND BRANDENBURG R. L. 2006. Effect of Combining Imidacloprid and Diatomaceous Earth with *Beauveria bassiana* on Mole Cricket (Orthoptera: Gryllotalpidae) Mortality. J. Econ. Entomol. 99(6): 1948-1954.
- TANADA Y. AND KAYA H. K. 1993. "Fungal infections". In: Insect Pathology. Ed. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 319-357pp.
- ZUREK LUDEK; D. WES WATSON AND COBY SCHAL. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Duteromycota: Hypomycetes) and Boric Acid against the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Biological Control 23: 296-302.

CONCLUSIÓN GENERAL

El presente estudio permitió confirmar que los factores bióticos y abióticos involucrados (humedad relativa, la edad en relación al estado fisiológico del insecto y el comportamiento) influyen en el inicio y desarrollo de la infección causada por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas y adultos de *Periplaneta americana*, y se reafirma la importancia de entender la interacción entre el hospedante y el patógeno.

También el cambio de muda fue visto como un mecanismo de defensa, con la posible pérdida del inóculo mediante la exuvia y el constante acicalamiento de las cucarachas adultas donde las esporas pudieron ser removidas de sus cuerpos protegiéndose de alguna manera contra la infección de estos hongos. Se considera que la edad la edad del hospedante constituye un factor limitativo para el progreso de la enfermedad.

La combinación *B. bassiana* y el ácido bórico mezclado con alimento y el azúcar como fagoestimulante aplicada en cebos, causó alta mortalidad en ninfas de *P. americana*. Además, estas formulaciones no resultaron ser repelentes para las cucarachas. Podemos concluir que esta combinación es atrayente y ofrece la ventaja de acelerar la mortalidad de las cucarachas.

Este estudio permitió observar que *B. bassiana* logra preservar su viabilidad en el cebo y tiene la capacidad de desarrollarse en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, a pesar de la inhibición de la germinación que ocasiona la combinación con el ácido bórico. Los resultados sobre el efecto sinérgico de las conidias de *B. bassiana* y el ácido bórico son prometedores y pueden ser usados para el desarrollo de un método apropiado para el control de la cucaracha en ambientes urbanos.