

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Efectividad insecticida de dos formulaciones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.
aplicadas en adobe infestado con *Triatoma dimidiata* (Latreille),
vector de la enfermedad de Chagas

Laura Margarita Benítez Cojulún



Bióloga

Guatemala, noviembre de 2008.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Efectividad insecticida de dos formulaciones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.
aplicadas en adobe infestado con *Triatoma dimidiata* (Latreille),
vector de la enfermedad de Chagas



Informe de tesis

Presentado por

Laura Margarita Benítez Cojulún

Para optar al título de

Bióloga

Guatemala, noviembre de 2008.

NÓMINA DE LOS INTEGRANTES DE LA JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Lic. Oscar Cobar Pinto, Ph. D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M. A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Anibal Rodrigo Sevillanos Cambronero	Vocal V

DEDICATORIA

A todos los amantes de la vida que nos dan más lecciones de *bio-filia* que de *bio-logía*,
en especial a Clodette Rousselin,
profesora de Ciencias Naturales y maestra de excelencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al LENAP por haberme permitido participar en esta investigación que requirió de sus instalaciones y recursos, en particular a Eunice Enríquez y a aquellas personas que con sus consejos o con su sincera amistad facilitaron la elaboración de este trabajo. Al ing. Ronald Estrada, por su generosa colaboración. Al LAMIR, por el servicio de autoclaveado y el espacio brindado en numerosas ocasiones; en particular, a Julio Maas. A la dra. Carlota Monroy, por la pertinencia de sus correcciones. A Pavel García, por su ayuda para realizar los análisis estadísticos. A la dra. Conchita Toriello, por las sugerencias y los documentos que proporcionó para este proyecto. A los profesores que, con su excelencia, hicieron más fácil no solo la tarea de estudiar la vida, sino también la tarea de estar viva. Y, sobre todo, a mi madre y a mis demás seres queridos que me animaron a no desfallecer en esta empresa.

INDICE

1	RESUMEN	6
2	INTRODUCCIÓN	8
3	ANTECEDENTES	10
3.1	Mal de Chagas	10
3.1.1	Efectos y transmisión de la enfermedad	10
3.1.2	Control de la enfermedad en Guatemala	12
3.2	Control biológico	13
3.2.1	Generalidades	13
3.2.2	Hongos entomopatógenos	14
3.2.2.1	<i>Hongos más comúnmente usados contra insectos</i>	15
3.2.2.1.1	<i><u>Metarhizium anisopliae</u> (Metsch.) Sorok.</i>	15
3.2.2.2	<i>Inicio y desarrollo de la micosis del insecto</i>	16
3.2.2.3	<i>Factores influyentes en el desarrollo de epizootias del hongo entomopatógeno</i>	16
3.2.2.3.1	<i>Atributos del patógeno</i>	16
3.2.2.3.2	<i>Susceptibilidad del huésped a la micosis</i>	17
3.2.2.3.3	<i>Ambiente</i>	18
3.2.2.4	<i>Micoinsecticidas</i>	20
3.2.2.4.1	<i>Formulación</i>	20
3.2.2.4.2	<i>Consideraciones relacionadas con la virulencia de la cepa utilizada</i>	22
3.2.2.5	<i>Estudios de hongos entomopatógenos utilizados contra triatominos</i>	23
3.2.2.5.1	<i>Fase preliminar al bioensayo definitivo</i>	24
4	JUSTIFICACIÓN	29
4.1	Importancia de <i>T. dimidiata</i>	29
4.2	Necesidad de nuevas medidas de control	30
5	OBJETIVOS	31
6	HIPÓTESIS	32
7	MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1	Universo	33
7.2	Materiales	33
7.2.1	Cristalería	33
7.2.2	Equipo	33

7.2.3 Instrumentos	34
7.2.4 Reactivos	34
7.2.5 Otros	35
7.2.5.1 Seres vivos	36
7.3 Métodos	36
7.3.1 Elección de la cepa de hongo	36
7.3.2 Cultivo y almacenamiento de la cepa elegida	37
7.3.3 Obtención y reproducción de un cultivo monospórico	37
7.3.4 Formulación de las soluciones con conidios de <i>M. anisopliae</i>	38
7.3.5 Evaluación de la viabilidad de las esporas en las soluciones	39
7.3.6 Diseño experimental del bioensayo	40
7.3.7 Registro de los resultados	41
7.3.8 Detección de la presencia de hongo en las chinches muertas	42
7.3.9 Análisis estadístico	43
7.3.9.1 ANDEVA	43
7.3.9.2 Análisis de regresión para estimar valores de dosis letal y tiempo letal	43
8 RESULTADOS	45
8.1 Evaluación de la viabilidad de las esporas en las soluciones	45
8.2 Resultados del bioensayo	45
8.3 Temperatura, humedad y otras observaciones registradas durante el bioensayo	46
8.4 Detección de la presencia de hongo en las chinches muertas	47
8.5 Análisis estadístico	48
8.5.1 ANDEVA	48
8.5.2 Análisis de regresión para estimar valores de dosis letal y tiempo letal	49
8.5.2.1 Valores de dosis letal	49
8.5.2.2 Valores de tiempo letal	51
9 DISCUSIÓN	53
10 CONCLUSIONES	59
11 RECOMENDACIONES	60
12 REFERENCIAS	62
13 ANEXOS	66

1 RESUMEN

El objetivo de esta investigación era evaluar la efectividad de bioinsecticidas a base de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra *Triatoma dimidiata* (Latreille), principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala, para continuar la búsqueda de nuevos métodos de control, como alternativa a los insecticidas químicos.

Se realizaron varios experimentos preliminares y, de acuerdo con los resultados, se pusieron a prueba dos formulaciones a base de una cepa de *M. anisopliae* anteriormente evaluada (Enríquez, 2004), virulenta contra *T. dimidiata*. Ambas soluciones tenían una concentración de 2×10^7 conidios/ml. Los dos vehículos utilizados fueron agua destilada con *tween* al 0.01% y aceite de soya *Crisco*. Las soluciones fueron aplicadas en ladrillos de adobe infestados artificialmente con individuos de tercer estadio. En ambos casos, se aplicó una cantidad correspondiente a 1×10^6 esporas/cm², la mayor dosis que se encontró en la literatura para el caso de *M. anisopliae*. Estas soluciones y sus controles (soluciones sin conidios) fueron aplicados por medio de atomizadores. Durante 30 días, se contaron las chinches muertas en cada tratamiento (incluyendo los dos controles). Finalmente, se realizó una prueba a todas las chinches muertas para saber si estaban infectadas por el hongo aplicado: estas se colocaron en cámaras húmedas que fueron incubadas para favorecer el desarrollo del hongo, en caso de encontrarse presente. Se realizaron tres réplicas. Los resultados fueron analizados por medio de los paquetes estadísticos Minitab 15, InStat y PoloPlus. Minitab 15 e InStat fueron utilizados para efectuar ANDEVA (uno de libre distribución – de Friedman– y otro "paramétrico", con los datos obtenidos por medio de la transformación del arcoseno) y pruebas de comparaciones múltiples; PoloPlus se empleó para calcular valores de LD₅₀, LD₉₀ y LD₉₉, así como de LT₅₀, LT₉₀ y LT₉₉.

La mortalidad obtenida en los tratamientos de aceite de soya (tanto con conidios como sin ellos) fue de 100%. En el tratamiento "solución acuosa con conidios", la mortalidad fue ligeramente mayor a la de su control ("solución acuosa sin conidios"). Los ANDEVA detectaron diferencia significativa ($p < 0.05$) en el grupo de los cuatro tratamientos. La prueba de Fisher realizada con los datos brutos detectó diferencias significativas ($p < 0.05$ en los intervalos de confianza individuales; nivel de confianza

simultáneo: 82.43%) entre el tratamiento "solución acuosa sin conidios" y cualquiera de las dos soluciones aceitosas (con o sin conidios), que fueron las más letales. La misma prueba efectuada con los datos obtenidos por medio de la transformación del arcoseno detectó diferencias significativas ($p < 0.05$ en los intervalos de confianza individuales; nivel de confianza simultáneo: 82.43%) entre el aceite de soya y el agua con *tween*, pero no entre la presencia o ausencia de conidios de *M. anisopliae*. De acuerdo con la prueba de incubación de las chinches muertas en cámaras húmedas, solamente 20 de las 90 chinches expuestas a *M. anisopliae* estaban infectadas por el hongo, a pesar de que murieron 81. Los datos obtenidos no se ajustaron a los supuestos necesarios para que el programa PoloPlus pudiera calcular los valores de dosis letal (LD_{50} , LD_{90} y LD_{99}). Los valores de tiempo letal (LT_{50} , LT_{90} y LT_{99}) obtenidos usando los 30 datos de mortalidad acumulada de cada réplica en cada tratamiento revelaron que el aceite de soya (incluso sin conidios) mató a los insectos en menos tiempo que las soluciones acuosas (incluso las que tenían conidios).

Pudo concluirse que la cepa elegida, en una dosis de 1×10^6 conidios/cm², no incrementó significativamente ($p > 0.05$) la mortalidad de *T. dimidiata* en ladrillos de adobe, y que el aceite de soya, que ha sido empleado como ingrediente activo de insecticidas, podría incrementar la mortalidad de *T. dimidiata*.

2 INTRODUCCIÓN

El mal de Chagas, infección parasítica que en su estado crónico produce daño irreversible a los órganos (Nakagawa *et al.*, 2003), constituye uno de los mayores problemas de salud humana en la mayoría de países latinoamericanos (Lecuona *et al.*, 2001). Se extiende desde México hasta Argentina y se estima que unos 100 millones de personas están en riesgo de contraerlo (Panzera *et al.*, 2006).

En Sudamérica, en las últimas décadas, las intervenciones para controlar la enfermedad permitieron que el número de personas infectadas con la enfermedad de Chagas bajara de 16-18 millones a 10-12 millones. Dado que más del 80% de la infección se debe a la transmisión por vectores (chinchas), la principal estrategia consistió en rociar las viviendas con insecticidas residuales y fue combinada con vigilancia comunitaria de los vectores. Tras ese éxito en Sudamérica, en 1997 los países centroamericanos formaron la Iniciativa para el Control de la Enfermedad de Chagas, con la meta de eliminar la transmisión de esta enfermedad para el 2010. Al igual que en Sudamérica, se aplicó el rociamiento de viviendas con insecticidas químicos, pero los vectores son distintos (Hashimoto *et al.*, 2006), por lo que los resultados no fueron igual de exitosos. En esta región hay insectos de reciente domesticación, como *T. dimidiata*, por lo cual todavía hay poblaciones selváticas (Monroy, com. pers., 2007).

Como mencionaron Lecuona *et al.* (2001), el control de los triatomíneos –insectos vectores de la enfermedad (Nakagawa *et al.*, 2003)– depende de acciones coordinadas que permitan mejorar las condiciones socioeconómicas, y del uso de métodos de control más eficientes y menos tóxicos que los utilizados hasta ahora. Nakagawa *et al.* (2003), por su parte, señalan la reinfestación frecuente después de varios rociamientos con insecticidas químicos en Jutiapa, por lo que recomiendan desarrollar nuevas estrategias de control. Por ello se han hecho estudios acerca de hongos patógenos para los triatomíneos, con la idea de llegar a desarrollar un bioinsecticida (Lecuona *et al.*, 2001).

El concepto básico de usar microorganismos para controlar plagas lleva largo tiempo de existir (Payne, 1988). Los hongos entomopatógenos, en particular, han jugado un papel único en la historia del control microbiológico de insectos (Roberts y Yendol, 1971).

Además, el desarrollo de resistencia a los plaguicidas químicos por parte de algunas plagas –con el consecuente incremento de los costos de producción de nuevos compuestos– ha impulsado un mayor interés en agentes de control biológico. Este interés ha aumentado por las consecuencias adversas al ambiente, de los plaguicidas químicos tóxicos (Payne, 1988).

El principal vector de la enfermedad de Chagas en el país es *T. dimidiata*, por lo que el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP– ha empezado a explorar el uso de hongos entomopatógenos para controlarlo: en el 2001 realizó un estudio sobre el aislamiento de hongos nativos patógenos de *T. dimidiata* (Enríquez, 2002), y posteriormente llevó a cabo un proyecto evaluando la virulencia de cepas de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el control de la misma especie de chinche (Enríquez, com. pers., 2006). El presente trabajo dio seguimiento a estas investigaciones, poniendo a prueba la efectividad de dos formulaciones (una acuosa y una aceitosa) de *M. anisopliae*, a base de una cepa anteriormente evaluada, virulenta contra *T. dimidiata* (Enríquez, 2004). Se puso a prueba la concentración de 2×10^7 conidios/ml, de acuerdo con lo recomendado por Enríquez (2004). Ambas soluciones fueron aplicadas en adobes infestados artificialmente con *T. dimidiata* (individuos de tercer estadio), en una dosis de 1×10^6 esporas/cm², la mayor dosis que se encontró para el caso de *M. anisopliae*. Las aplicaciones se hicieron por medio de atomizadores. La dosis de *M. anisopliae* no fue suficiente para infectar a todos los insectos. El aceite de soya fue un mejor vehículo que el agua con *tween*, ya que parece haber incrementado la mortalidad de *T. dimidiata*. El aceite de soya ya había sido empleado como ingrediente activo de insecticidas contra mosquitos y termitas, pero no hay evidencia de que sus presuntas propiedades insecticidas hayan sido reportadas sobre triatominos.

3 ANTECEDENTES

3.1 Mal de Chagas

3.1.1 Efectos y transmisión de la enfermedad

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad cuya fase aguda generalmente se observa en niños, en tanto que las manifestaciones crónicas irreversibles suelen aparecer en etapas posteriores. Muchas personas infectadas no presentan manifestaciones clínicas. Entre los síntomas de la enfermedad aguda figuran la fiebre variable y el malestar generalizado (así como la linfadenopatía y la hepatosplenomegalia). En el sitio de la infección puede presentarse una reacción inflamatoria (chagoma) que dura hasta ocho semanas. En algunos casos, se observa edema de los párpados de un ojo (signo de Romaña). Las manifestaciones que pueden ser mortales incluyen miocarditis y meningoencefalitis. Las secuelas crónicas irreversibles comprenden lesión del miocardio, así como afección del tracto gastrointestinal (Chin, 2001).

El mal de Chagas es causado por *Trypanosoma cruzi* Chagas (Panzera *et al.*, 2006), un protozoario que en el ser humano se presenta como hemoflagelado y como parásito intracelular sin flagelo externo. Los vectores infectados, que son especies hematófagas de la familia Reduviidae (chinchas de trompa cónica o besadoras), principalmente varias especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, excretan los tripanosomas con sus heces (Chin, 2001). La familia Reduviidae forma parte del orden Hemiptera; la subfamilia a la que pertenecen los vectores de la enfermedad es Triatominae (Panzera *et al.*, 2006), razón por la cual se les denomina triatominos.

Los insectos defecan durante la succión de sangre; la infección del hombre y de otros mamíferos se produce cuando las heces recién excretadas por los vectores contaminan las conjuntivas, las membranas mucosas, las abrasiones o heridas en la piel (incluido el sitio de la picadura). Los insectos se infectan cuando se alimentan

con sangre de un animal con parasitemia; los parásitos se multiplican en su intestino (Chin, 2001).

La transmisión también se puede producir por transfusión de sangre y en las ciudades se ha observado una cifra cada vez mayor de infecciones de este tipo. Los microorganismos también pueden atravesar la placenta para producir infección congénita. En ocasiones, se producen infecciones accidentales en el laboratorio, y el trasplante de órganos de donantes chagásicos constituye un peligro cada vez mayor de transmisión de *T. cruzi* (Chin, 2001).

Esta enfermedad estaba circunscrita a mamíferos silvestres situados entre el sur de los Estados Unidos y la Patagonia, quienes conviven con chinches silvestres y mantienen al parásito. Sin embargo, cuando las chinches son desalojadas de su hábitat natural, invaden las viviendas rústicas del hombre, llevando la enfermedad al humano y a los animales domésticos (Enríquez, 2004). Actualmente la enfermedad presentada por humanos representa uno de los mayores problemas de salud en América Latina (Dumonteil *et al.*, 2004; Lecuona *et al.*, 2001), y su transmisión generalmente ocurre adentro de las casas. El número de triatominos en las casas depende de factores ecológicos y socioculturales (Zeledon y Rabinovich, 1981, citados por Lecuona *et al.*, 2001).

Hay tres especies de triatominos domiciliarios en Guatemala: *T. dimidiata*, *Rhodnius prolixus* Stål y *Triatoma nitida* Usinger. Los dos vectores más importantes son *T. dimidiata* y *R. prolixus* (Nakagawa *et al.*, 2003); *R. prolixus* tiene mayor capacidad vectorial que *T. dimidiata* (Monroy, com. pers., 2007); sin embargo, se considera que *T. dimidiata* es el principal vector, por ser el único que ha sido encontrado en todas las regiones del país y por ser una especie nativa. *R. prolixus*, en cambio, es una especie importada (Hashimoto *et al.*, 2006). Esta, además, es exclusivamente doméstica en Centroamérica, mientras que *T. dimidiata* es también peridoméstica y selvática (Nakagawa *et al.*, 2003).

3.1.2 Control de la enfermedad en Guatemala

Una de las medidas tomadas en el control de la chinche picuda (nombre común de *T. dimidiata*) ha sido el mejoramiento de las viviendas. Esto incluye la construcción de paredes con otros materiales que hagan más difícil la puesta de huevos, y la aplicación de repellos o pinturas a estas, de tal forma que las chinches sean más susceptibles a depredadores, por estar más visibles en una superficie lisa y blanca (Enríquez, 2004). Otra medida ha consistido en dar información sobre los vectores a la población en riesgo, para propiciar la participación comunitaria en su erradicación (Schofield, 1994). Además, se han empleado insecticidas químicos, rociando las paredes dentro de cada vivienda (Dumonteil *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2006).

En 1997, la Organización Mundial de la Salud –OMS– y los países centroamericanos se plantearon la meta de eliminar la transmisión de la enfermedad de Chagas para finales del 2010 a través de la eliminación de *R. prolixus*, la reducción de la distribución de *T. dimidiata* y la eliminación de la transmisión de *T. cruzi* por transfusiones de sangre. En enero del 2000, el Ministerio de Salud de Guatemala inició un programa de control de vectores para eliminar la transmisión del mal de Chagas en cinco departamentos del este del país (Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa y Jalapa), donde existe el mayor riesgo de contraer la enfermedad. Esto se hizo con la colaboración de la Agencia de Cooperación Internacional de Japón –JICA, por su nombre en inglés– la Organización Panamericana de la Salud, la Universidad de San Carlos de Guatemala, y la UVG/CDC-MERTUG (Universidad del Valle de Guatemala; el Centro para el Control de la Enfermedad de los Estados Unidos de América y la Unidad de Investigación y Entrenamiento en Entomología Médica). Bajo el SIAS (Sistema Integral de la Atención en Salud), cuya administración es descentralizada, cada departamento constituye un “área de salud”, responsable de ejecutar programas, tales como operaciones de control de los vectores (Nakagawa *et al.*, 2003).

El control de *R. prolixus* progresa exitosamente; sin embargo, se sabe que el control de *T. dimidiata* es más difícil, ya que la existencia de poblaciones peridomésticas y

selváticas permite que reinfeste las casas tratadas con métodos tradicionales (Dumonteil *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2003; Panzera *et al.*, 2006).

En cuanto a las investigaciones realizadas en Guatemala para explorar otras formas de control, puede mencionarse la que Monroy y Enríquez, del LENAP, llevaron a cabo en 1999, sobre la eficacia de *Telenomus fariai* Lima como control biológico de *T. dimidiata*. Dicho parasitoide es específico para los huevos de la chinche. Posteriormente, el LENAP emprendió la investigación de hongos entomopatógenos como formas de control biológico, de la cual se hablará más adelante.

3.2 Control biológico

3.2.1 Generalidades

El control biológico consiste en la utilización de organismos vivos o de sus productos para luchar contra otros organismos, tales como plagas de cultivos, malezas, parásitos de animales, insectos domésticos y vectores de enfermedades de plantas, o, como en este caso, vectores de enfermedades de animales (incluyendo a los seres humanos) (Pintureau, 2002).

Las poblaciones de insectos sucumben ante variadas infecciones causadas por microorganismos patógenos (bacterias, protozoos, hongos) y virus (Payne, 1988). Ciertos patógenos provocan epizootias a altas densidades de poblaciones; pueden causar mortalidades muy altas. Otras enfermedades solamente debilitan a los insectos, haciéndolos más susceptibles a otros factores de mortalidad (Schotman y Lacayo, 1989, citados por Enríquez, 2004).

El concepto básico del uso de microorganismos para controlar plagas de insectos no es nuevo (Payne, 1988); sin embargo, el interés por los agentes de control biológico se ha incrementado debido al desarrollo de resistencia por parte de ciertas plagas a los insecticidas químicos, y al incremento del costo de producción de nuevos compuestos de este tipo. A estas causas se añade la toma de conciencia de los efectos nocivos que algunos plaguicidas tóxicos tienen sobre el ambiente.

La ventaja que proporciona el control biológico es que sus agentes pueden ser elegidos de tal forma que sean específicos (no dañinos para organismos benéficos), no contaminantes del ambiente, y en algunos casos, persistentes (Payne, 1988). En los últimos años, en Guatemala se han creado instituciones privadas y comerciales que han impulsado fuertemente el control biológico de plagas de importancia económica (Hernández, 1992, citado por Enríquez, 2004).

3.2.2 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos han jugado un papel único en la historia del control microbiológico de insectos (Steinhaus, 1956, citado por Roberts y Yendol, 1971). De hecho, desde el siglo XIX ha habido muchos intentos de controlar plagas económicamente importantes mediante estos hongos causantes de enfermedades de insectos (Payne, 1988). El primer intento exitoso de usar el hongo *M. anisopliae* como agente de control biológico en el campo ocurrió entre 1884 y 1888, y esto ha sido considerado como el principio del control biológico con microorganismos (Zimmermann, 1993).

Casi todos los hongos entomopatógenos pueden ser fácilmente cultivados en medios artificiales; ya sea en la superficie de medios sólidos, o sumergidos en medios líquidos (Zimmermann, 1993).

La unidad infecciosa en la mayoría de ellos es una espora, usualmente un conidio (Payne, 1988; Roberts y Yendol, 1971); más específicamente, un conidio aéreo (espora producida en aire en células conidiógenas). La mayoría de hongos entomopatógenos producen masas densas de estos conidios, hidrofóbicos y pequeños (< 10 μ m) (Wraight *et al.*, 2001).

Las ventajas que ofrecen son las siguientes: a) bajo costo de producción, b) bajo impacto ambiental; posibilidad de uso donde no se desee emplear productos químicos (áreas protegidas...), c) facilidad de eliminación de los excedentes, ya que basta con exponer el producto un par de días al sol para que las esporas sean casi totalmente inactivadas, y la persistencia solo es de 8 a 10 días [Jenkins *et al.*, 1998 a,

b; Lomer y Langewald, 2001; Milner, 2002 b; Milner y Hunter, 2001; todos citados por Barrientos (sin año)].

3.2.2.1 Hongos más comúnmente usados contra insectos

Hay aproximadamente 100 géneros de hongos entomopatógenos importantes. De ellos, los que se incluyen entre los deuteromicetos –hongos cuya única forma conocida es asexual (Zimmermann, 1993)– han recibido la mayor parte de atención debido a la facilidad de su producción *in vitro* y a que varios tienen un amplio rango de huéspedes. A manera de ejemplo: *M. anisopliae* cuenta con más de 200 huéspedes conocidos, incluyendo algunos del orden Hemiptera (21 especies, según Zimmermann, 1993). Sin embargo, hay muchas cepas de cada especie de hongo, y algunas varían considerablemente en sus rangos de huéspedes y en su patogenicidad (Payne, 1988; Roberts y Yendol, 1971).

La mayoría de publicaciones acerca de micosis de insectos se han referido a *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora* o *Metarhizium*, los géneros más comúnmente encontrados en la naturaleza. De estos, *B. bassiana* es la especie más usada, seguida por *M. anisopliae*, y la mayoría de intentos exitosos en control biológico utilizados hasta principios de los setentas habían utilizado una de estas dos especies o alguna del género *Entomophthora* (Roberts y Yendol, 1971; Taborsky, 1992). Está demostrado que *M. anisopliae* puede ser un agente de control biológico eficiente, ya que ha sido usado contra muchas plagas de insectos, en muchos países. Se ha investigado su virulencia, sus mecanismos bioquímicos de patogenicidad, así como su formulación y aplicación en estrategias de control biológico (Zimmermann, 1993).

3.2.2.1.1 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

En el género *Metarhizium* solo se conoce la forma conidial asexual; se trata de conidios cilíndricos, verdes, producidos en cadenas que forman una capa compacta (Zimmermann, 1993, citado por Hernández, 2003). La especie *M. anisopliae* puede distinguirse de *M. flavoviride* (Gams & Rozypal) por la forma y el tamaño de fiálides y conidios (Lomer *et al.*, 1997, citados por Hernández, 2003),

así como por características bioquímicas y moleculares (Bridge *et al.*, 1993, Leal *et al.*, 1994 y Driver *et al.*, 2000, todos citados por Hernández, 2003). De *M. anisopliae* son bien conocidas dos variedades: *M. anisopliae* var. *majus* (Johnston) Tulloch, con conidios de 10 a 14 μm , y *M. anisopliae* var. *anisopliae* Tulloch, con conidios de 5 a 8 μm .

3.2.2.2 Inicio y desarrollo de la micosis del insecto

En general, la enfermedad es inducida por estos hongos de la siguiente forma. Los conidios suelen germinar sobre la cutícula o forman apresorios y luego penetran. Al germinar, uno o más tubos de germinación (hifas cortas) se producen por cada espora; estos pueden crecer sobre la superficie del insecto por distancias cortas o pueden empezar a penetrar la cutícula inmediatamente (Roberts y Yendol, 1971). El insecto muere (generalmente después de más de cuatro días) cuando ha habido un crecimiento de hifas substancial o se han producido suficientes toxinas. Infecciones inaparentes ocurren frecuentemente (Payne, 1988).

3.2.2.3 Factores influyentes en el desarrollo de epizootias del hongo entomopatógeno

3.2.2.3.1 Atributos del patógeno

El primer atributo importante es la capacidad de dispersión. Las esporas de muchos hongos son ampliamente diseminadas por el viento; también las gotas de lluvia las esparcen (Roberts y Yendol, 1971). Después de la invasión del insecto por el hongo, pueden producirse conidióforos que irrumpen a través de la cutícula y produzcan esporas en el exterior del insecto (Payne, 1988; Roberts y Yendol, 1971). Cabe resaltar que es raro que hongos introducidos se esparzan ampliamente durante varias estaciones en el sitio de introducción. Por ello, el método más frecuente de uso para controlar plagas de insectos es la aplicación regular (Payne, 1988).

Otro atributo del patógeno influyente en el desarrollo de epizootias es su viabilidad. Según pruebas realizadas entre 8 y 25°C, la viabilidad de los conidios

de varias especies –incluyendo a *M. anisopliae*– es menor mientras más elevada es la temperatura de almacenamiento. En estos experimentos, después de que los conidios de *M. anisopliae* fueron expuestos a la luz, menos de ellos germinaron y sobrevivieron más tiempo a humedades extremadamente altas o bajas, que a humedades cercanas a 45%. El almacenamiento es más eficaz a temperaturas de aproximadamente 4°C, en la oscuridad y a muy baja humedad (Roberts y Yendol, 1971).

El tamaño del inóculo es otro factor por tomar en cuenta. Aun en condiciones favorables, los conidios no son altamente infecciosos individualmente (Wraight *et al.*, 2001). Se necesita que un número mínimo de unidades infecciosas (esporas) contacte a un huésped para que la enfermedad sea inducida (Roberts y Yendol, 1971). Esto, en gran parte, ha sido la causa de las altas dosis típicamente requeridas (10^{13} a 10^{14} esporas/ha) para controlar plagas en el campo (Bartlett y Jaronski, 1988, citados por Wraight *et al.*, 2001).

Finalmente, la virulencia del patógeno también determina el desarrollo de una epizootia. Se entiende por virulencia “la propiedad de un agente patógeno infectante de provocar una enfermedad en un huésped determinado” (MedCiclopedia, disponible en la página <http://www.iqb.es/diccio/v/vi.htm>). Una misma especie de hongo puede englobar cepas muy divergentes en virulencia (Roberts y Yendol, 1971).

3.2.2.3.2 *Susceptibilidad del huésped a la micosis*

No todas las poblaciones de una especie de insecto son idénticas (Roberts y Yendol, 1971). En el caso de *T. dimidiata*, una reciente investigación (Panzera *et al.*, 2006) reveló que puede representar un complejo de especies crípticas, es decir, reproductivamente aisladas aunque con morfología indistinguible. Se definió que existen tres grupos o citotipos, restringidos a diferentes áreas geográficas; en Guatemala los tres han sido reportados.

La disponibilidad y cantidad de fuentes alimenticias determinan la densidad de población de los triatominos (Schofield, 1985, citado por Monroy, com. pers. 2007); poblaciones con pocas fuentes alimenticias serían más susceptibles al ataque por hongos (Monroy, com. pers., 2007). Cabe agregar que una población sobreviviente a epizootias de hongos debería ser más resistente a la enfermedad que una población pre-epizoótica (Roberts y Yendol, 1971).

Además, la composición de la cutícula de cada individuo varía con la nutrición y el grado de hacinamiento, y esos cambios pueden alterar la susceptibilidad de un insecto. De hecho, insectos muy emparentados entre sí o con comportamiento similar pueden presentar distintos grados de susceptibilidad a un hongo dado (Roberts y Yendol, 1971).

3.2.2.3.3 *Ambiente*

En cuanto a los hongos, ellos son probablemente los entomopatógenos que más dependen de condiciones apropiadas de microclima para su éxito (Payne, 1988): la luz solar, la temperatura, la humedad, el sustrato y la presencia de pesticidas químicos influyen en su estabilidad y persistencia. Estos factores afectan a los inóculos de hongo ya sea de manera independiente o colectiva; indirectamente – a través del insecto huésped– o directamente (Ibrahim *et al.*, 1999).

Necesitan, en particular, de una elevada humedad para la germinación de las esporas: 90% o más (Payne, 1988; Roberts y Yendol, 1971). Entre los deuteromicetos que infectan insectos terrestres, el límite inferior para la germinación de las esporas probablemente está cercano al 92% de humedad, y algunos requieren una película de agua (Payne, 1988). Además, la humedad afecta la longevidad de las esporas. Asimismo, una alta humedad se necesita para inducir la enfermedad, aunque solo en las primeras 48 horas de la infección (Roberts y Yendol, 1971).

Como ya se dijo, después de la invasión del insecto por el hongo, pueden producirse conidióforos que irrumpen a través de la cutícula y produzcan esporas

en el exterior del insecto. En el caso de Fungi Imperfecti, los conidióforos y los conidios no son producidos a menos que el insecto muerto esté en un ambiente muy húmedo (Roberts y Yendol, 1971). De hecho, la humedad relativa es más importante para la esporulación en cadáveres que para la penetración e infección del insecto (Lecuona *et al.*, 2001). En un estudio citado por Roberts y Yendol (1971), *M. anisopliae* pudo germinar sobre la cutícula solo con agua presente. Las epizootias suelen estar asociadas con períodos de alta humedad, particularmente períodos lluviosos, y el control biológico en general es exitoso cuando la aplicación del hongo tiene lugar un poco antes del tiempo húmedo (Roberts y Yendol, 1971).

Además, las condiciones ambientales, particularmente la humedad y la luz solar (presuntamente la luz ultravioleta), pueden matar a las esporas durante el transporte. La luz afecta tanto la longevidad de las esporas como la esporulación en el cadáver. Tomando en cuenta el poder letal de la luz solar, la formulación y aplicación del hongo por la tarde es recomendable (Roberts y Yendol, 1971). Asimismo, es conveniente que se aplique en lugares resguardados de la luz (Payne, 1988).

La infección por hongo está limitada por temperaturas extremas (Wraight *et al.*, 2001). Por ejemplo, temperaturas demasiado altas pueden causar lisis en el hemocele del insecto (Ibrahim *et al.*, 1999). En general, el rango de temperatura para el crecimiento oscila entre 5 y 35°C (Roberts y Yendol, 1971), y los valores óptimos caen entre 20 y 30°C para la mayoría de deuteromicetos (Payne, 1988; Roberts y Yendol, 1971). Cabe enfatizar que las temperaturas que causan crecimiento moderado de un hongo son adecuadas para el inicio y el desarrollo de la enfermedad (Roberts y Yendol, 1971).

3.2.2.4 Micoinsecticidas

3.2.2.4.1 Formulación

La formulación es la preparación del producto que se pondrá a prueba (Robertson *et al.*, 2003). En el caso de los micoinsecticidas, han sido formulados en sustratos secos, como talco, flúor, leche en polvo (Roberts y Yendol, 1971), o caolín, como ha hecho el ingeniero agrónomo Ronald Estrada en Agrícola El Sol. También han sido formulados en aceite, con lo cual se eliminan los riesgos asociados a los bioinsecticidas en polvo, como la facilidad de inhalación o de contacto con los ojos, que podrían provocar respuestas alérgicas (Wraight *et al.*, 2001).

Soluciones a base de aceite han demostrado ser prometedoras para el control de algunas plagas (Prior *et al.*, 1988, citados por Ibrahim *et al.*, 1999; ver tabla 1). Los aceites, por ser compatibles con los conidios –lipofílicos– han sido usados para la aplicación con atomizadores. Para aplicaciones de ultra bajo volumen, son ingredientes esenciales, capaces de ser atomizados en gotitas de 50 a 100 μ l, que no se evaporan antes de llegar al sitio deseado. Las gotillas de aceite se adhieren más fuertemente a la cutícula lipofílica de los insectos que las de agua. Los aceites se esparcen rápidamente, pudiendo acarrear conidios hasta áreas del cuerpo protegidas de condiciones ambientales desfavorables (Ibrahim *et al.*, 1999; Wraight *et al.*, 2001).

Otra ventaja de utilizar aceite es que evitan la deshidratación de los conidios favoreciendo la germinación cuando la humedad relativa es baja, por lo que son efectivos aun en condiciones de aridez (Prior *et al.*, 1998; Mercandier y Khachatouridus, 1987, ambos citados por Barrientos, sin año).

Ciertas desventajas de los aceites son: que incrementan el peso del insecticida, y que algunos pueden tener propiedades fitotóxicas. Los aceites vegetales pueden ponerse rancios y dejar residuos pegajosos que bloqueen el atomizador. Los aceites de parafina, no obstante, se evaporan rápido y dejan

menos residuo. Pueden ser usados para que los aceites vegetales y minerales viscosos sean más fluidos (Wraight *et al.*, 2001).

Se sabe que los aceites vegetales minimizan la sedimentación de las esporas de *M. anisopliae* var. *acridum*, debido a su alta viscosidad (Milner y Hunter, 2001, citados por Barrientos, sin año); no obstante, un exceso de viscosidad tampoco es conveniente (Barrientos, sin año).

Tabla 1
Aceites utilizados como vehículos exitosos de conidios de *M. anisopliae*

Aceite o mezcla de aceites	Disponibilidad en Guatemala	% de viabilidad (o germinación) y condiciones de almacenamiento de conidios	Otras observaciones	Referencias
Aceite de maíz + <i>Summer Spray Oil</i>	Aceite de maíz: disponible		90 % de control de <i>Chortoicetes terminifera</i> al día 14 post-rociamiento, en Australia. Poblaciones de <i>Locusta migratoria manillensis</i> declinaron en un 65 a 97%, en China.	APLC, 2006* Long y Hunter, 2005 Milner y Hunter, 2001
Citrolina (aceite mineral de uso agrícola en México)	Disponibilidad desconocida.	>80%, después de 40 días, tanto a 6±1 como a 27°C	Los conidios no fueron deshidratados.	Hernández-Velásquez, 2003 Hernández-Velásquez <i>et al.</i> , 2000
Aceite de maní o de soya o Edelex (aceite mineral producido por Shell), cuando se les añade gel de sílice	Aceite de maní: disponible. Aceite de soya: disponible. Edelex: no disponible.	90% después de un año, a 8°C		Estudio citado por Hernández-Velásquez, 2003
Ondina (aceite mineral producido por Shell)	Disponible.	>95% después de 24 h, a temperatura ambiente	Los conidios sí fueron deshidratados.	Ibrahim <i>et al.</i> , 1999
Aceite de maní + queroseno	Aceite de maní: disponible. Queroseno: disponible.	80% después de cuatro meses, a 12°C	Conidios producidos en medio difásico, con 4 o 5% de CH.	Hedgecock <i>et al.</i> , 1995, citados por Hernández-Velásquez, 2003
Soya o queroseno	Aceite de soya: disponible. Queroseno: disponible.	Viabilidad mayor que en muchos otros aceites después de ocho semanas (y hasta 18 semanas) a 25°C, pero mucho menor a 80%	Algunos de los aceites superados fueron los de maní, algodón, palma, uva, y oliva, Shellsol y la parafina líquida.	Stathers <i>et al.</i> , 1993

*Documento de la *Australian Plague Locust Commission*, disponible en Internet (*Information on the Bio-insecticide Green Guard*®).

3.2.2.4.2 Consideraciones relacionadas con la virulencia de la cepa utilizada

Dado que las diversas cepas de una misma especie de hongo pueden variar mucho en virulencia, y que las transferencias de un cultivo a otro aumentan la

probabilidad de mutación espontánea de un hongo, deben usarse cultivos provenientes de una sola espora en experimentos (Roberts y Yendol, 1971); dicho en otras palabras, debe partirse de un cultivo monospórico para restringir la variabilidad del hongo empleado.

La virulencia de una cepa de hongo entomopatógeno disminuye con cada transferencia de este; sin embargo, puede ser restaurada por medio del paso a través de insectos huéspedes (Roberts y Yendol, 1971).

3.2.2.5 Estudios de hongos entomopatógenos utilizados contra triatominos

Al notar que el control de los triatominos no solo depende de acciones dirigidas a mejorar las condiciones socioeconómicas, sino también del uso de métodos de control más eficientes y menos tóxicos que los tradicionales, varios autores estudiaron hongos patógenos para dichos insectos, potencialmente útiles para el control biológico de la plaga (Lecuona *et al.*, 2001).

Ya en la década de los 80 se hicieron observaciones sobre el control de los triatominos con hongos entomopatógenos. Se estudió el efecto de *M. anisopliae* sobre algunos triatominos (Sherlock y Guitton, 1982, citados por Lecuona *et al.*, 2001), y la sensibilidad de las ninfas de *R. prolixus* a los hifomicetos entomopatógenos (Romaña y Fargues, 1987, citados por Lecuona *et al.*, 2001).

En 1992, se estudió la susceptibilidad de *R. prolixus* a *B. bassiana* (Romaña y Fargues, 1992). En el mismo año se publicó una tesis de doctorado, de la Universidad de Montpellier, titulada "Investigaciones sobre las potencialidades de los hifomicetos entomopatógenos (Fungi Imperfecti) en la lucha contra los Triatominae (Heteroptera)" (Romaña, 1992, citado por Luz *et al.*, 1999b).

A finales de los años 90 y principios del presente siglo, Luz centró la atención en *B. bassiana* como patógeno de los vectores de la enfermedad de Chagas (Luz *et al.*, 1998, citados por Lecuona *et al.*, 2001; Luz *et al.*, 1999a; Luz *et al.*, 1999b), pero sobre todo, de *R. prolixus* (Luz y Fargues, 1997 y 1998, Fargues y Luz, 1998, citados

por Lecuona *et al.*, 2001; Luz, 1994 y 1998, citados por Luz *et al.*, 1999b; Luz *et al.*, 2003). Asimismo, en 1998 se probó el hongo mencionado, además de *M. anisopliae*, contra *Triatoma infestans* (Klug) (Luz *et al.*, 1998).

Recientemente, Lecuona y colaboradores estudiaron la patogenicidad de *B. bassiana* contra *T. infestans* (Lecuona *et al.*, 2001; Lecuona *et al.*, 2005).

En el año 2001 Enríquez realizó un estudio sobre el aislamiento de hongos entomopatógenos nativos de *T. dimidiata* (Enríquez, 2002). Posteriormente llevó a cabo un proyecto evaluando la virulencia de cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el control de *T. dimidiata*. Como parte de los bioensayos realizados en esa ocasión, se probaron soluciones en cuatro concentraciones sobre ninfas de 3º estadio: 2×10^5 , 2×10^6 , 1×10^7 y 2×10^7 conidios/ml. En el caso de *M. anisopliae*, la concentración más eficaz (la única que permitió matar al 100% de las chinches, y que actuó más rápidamente) fue la de 2×10^7 conidios/ml, pero los valores calculados de LD₅₀ (dosis letal para matar al 50% de los individuos) y LD₉₀ (dosis letal para matar al 90% de los individuos) fueron de solo 1.25×10^6 y 9.6×10^6 , respectivamente. Algunas de las conclusiones de ese proyecto fueron las siguientes: las cepas aisladas en Guatemala actuaron en menos tiempo que una cepa aislada en México; de las cepas aisladas en Guatemala que fueron probadas, las proporcionadas por “Agrícola El Sol” son las más apropiadas para el control biológico de *T. dimidiata*; y la cepa de *M. anisopliae* que fue utilizada presentó mayor capacidad que la cepa de *B. bassiana* para matar los huevos de *T. dimidiata* (Enríquez, 2004).

3.2.2.5.1 Fase preliminar al bioensayo definitivo

Antes de evaluar dos formulaciones de *M. anisopliae* como bioinsecticidas contra *T. dimidiata*, se realizaron varias pruebas, de julio a octubre de 2007, empleando soluciones con conidios de *M. anisopliae* en un compuesto aceitoso parafinado no fitotóxico –de marca *SprayTex*– (Estrada, com. pers., 2007) y en aceite de maíz, de marca *Arcor*. Estas pruebas se resumen a continuación.

En julio de 2007, tomando en cuenta que es recomendable reducir el contenido de humedad de los conidios para su almacenamiento a largo plazo (Hernández, 2003), se probó la drierita como agente deshidratante, ya que no se contaba con silicagel (Luz *et al.*, 1999b). Tanto en aceite de maíz *Arcor* como en *SprayTex*, se elaboraron soluciones con conidios deshidratados y no deshidratados, y se comparó la viabilidad de ambos grupos de conidios. Los conidios deshidratados con drierita germinaron en un porcentaje de 0%, en comparación con 91.25 y 97.25% en el caso de los conidios no deshidratados en aceite de maíz *Arcor* y en *SprayTex*, respectivamente. Al parecer, la drierita inhibe la germinación de los conidios de *M. anisopliae*.

En agosto de 2007, se realizó una prueba con cajas de adobe infestadas artificialmente con individuos de tercer estadio de *T. dimidiata*. Como vehículos de aplicación de los conidios de *M. anisopliae* se probaron los mismos compuestos: aceite de maíz *Arcor* y *SprayTex*, cada uno en una caja distinta. La concentración de ambas soluciones fue de 1×10^7 conidios/ml, con base en los valores de LD₅₀ y LD₉₀ calculados previamente por Enríquez (2004). En las cuatro paredes de cada caja se aplicó el equivalente a 1×10^{13} conidios/ha, la menor de las dosis típicamente requeridas para controlar plagas en el campo, reportadas por Bartlett y Jaronski (1988, citados por Wraight *et al.*, 2001). En otras dos cajas se aplicaron los controles: aceite de maíz *Arcor* sin conidios y *SprayTex* sin conidios. Cada caja contenía 15 chinches. Al terminar las tres semanas de observación, se dismantelaron las cajas para recuperar todas las chinches y contar las muertas. Estas fueron solo siete: dos en el tratamiento de *SprayTex* con conidios, una en el de *Arcor* con conidios, una en el control de *SprayTex* y tres en el control de *Arcor*. Las chinches muertas fueron lavadas para eliminar bacterias y esporas superficiales (tal y como se describe en la sección 7.3.8) y fueron incubadas en cajas de Petri con medio de cultivo (PDA), para comprobar si estaban infectadas por *M. anisopliae*. De acuerdo con esta prueba, ninguna lo estaba. El experimento fue puramente descriptivo. Con base en las observaciones realizadas en esta fase, se tomaron las siguientes decisiones: a) sustituir las cajas de adobe por cajas con ladrillos de adobe, b) aumentar la dosis de conidios aplicados y c) incubar a las chinches

muertas no sobre medio de cultivo, sino en cámaras húmedas. La elección de cajas con ladrillos de adobe se debió a las dificultades de transporte, desplazamiento y cubrimiento (con cedazo) de las pesadísimas cajas de adobe (de aproximadamente 0.5 m x 0.5 m x 0.5 m), en las cuales, además, era imposible observar diariamente a todas las chinches del interior (estas se refugiaban en las profundas grietas). Las fotografías de dichas cajas pueden apreciarse en el anexo 1. La dosis aplicada debía ser aumentada debido al fracaso de la primera: al parecer, el hongo no infectó a ninguna chinche, a pesar de la alta viabilidad de las esporas empleadas (97% en el caso del *Arcor* y 95% en el caso del *SprayTex*). Por último, la búsqueda de una alternativa a la incubación de las chinches muertas en medio de cultivo se debió a que en este se desarrollaron muchos cultivos de bacterias que entorpecieron el desarrollo de hongos.

Dado que las soluciones evaluadas en agosto de 2007 no habían sido suficientemente virulentas, en octubre del mismo año se realizó una prueba con conidios provenientes de otro cultivo (monospórico) en soluciones de 2×10^7 conidios/ml, la dosis de *M. anisopliae* que había sido más eficaz contra chinches de 3º estadio durante los bioensayos hechos por Enríquez (2004). Al igual que en aquellos bioensayos (Enríquez, 2004), las chinches fueron sumergidas, durante unos segundos, directamente en las soluciones y en sus respectivos controles, pero en vez de utilizar agua con *tween* 20 se volvió a emplear aceite de maíz *Arcor* y *SprayTex*. Todas murieron instantáneamente, seguramente por obstrucción de las tráqueas; esto no les había ocurrido en bioensayos con soluciones acuosas, las cuales son mucho menos viscosas. La viabilidad de las esporas fue de 95.75% en el aceite de maíz *Arcor* y 97% en *SprayTex*; posteriormente, *M. anisopliae* esporuló en todas las chinches que habían sido sumergidas en soluciones con conidios; por ello en la presente tesis se siguió trabajando con cultivos provenientes del mismo cultivo monospórico. Sin embargo, el potencial virulento de las soluciones con conidios quedó pendiente de ser evaluado, porque tanto en estas como en los controles, las chinches murieron ahogadas.

A raíz de esta prueba se decidió: a) comparar una solución aceitosa con una acuosa ya evaluada y b) probar un nuevo aceite. La utilidad de comparar una solución aceitosa con una acuosa reside en que la capacidad letal de los conidios en agua con *tween* 20 ya fue demostrada previamente en chinches sumergidas en dicha solución, y una concentración adecuada ya había sido determinada (Enríquez, 2004). Por otra parte, la elección de un nuevo aceite obedeció a la necesidad de emplear uno que, además de estar reportado como un vehículo exitoso de *M. anisopliae*, permitiera reducir los costos al mínimo.

En el año 2008, se realizó un primer experimento comparando el aceite de soya y el agua con *tween* 20, como vehículos para aplicar conidios de *M. anisopliae*. Las condiciones de ese experimento fueron casi iguales a las del bioensayo definitivo descrito más adelante (ver Métodos). Se utilizaron ladrillos de adobe para probar si las dos formulaciones eran eficaces contra ninfas de *T. dimidiata* que pudieran refugiarse en grietas, como lo hacen en las viviendas infestadas. Los adobes se colocaron en cajas camiseras. En cada caja camisera, se colocaron dos ladrillos de adobe y 15 ninfas de tercer estadio de *T. dimidiata*. Al momento de aplicar las soluciones, las ninfas ya estaban instaladas sobre los adobes o en sus grietas. Se emplearon cuatro cajas que correspondían a los cuatro tratamientos evaluados: aceite de soya con conidios, aceite de soya sin conidios (control), solución acuosa con conidios y solución acuosa sin conidios (control). En los adobes, se aplicó una dosis de 1×10^6 esporas viables/cm², la mayor de las dosis típicamente requeridas para controlar plagas en el campo, reportadas por Bartlett y Jaronski (1988, citados por Wraight *et al.*, 2001). Diariamente se contaron las chinches muertas, durante 30 días.

Para confirmar la presencia del hongo en las chinches muertas, cada una fue lavada y colocada en una caja de Petri con un algodón (de más de 1 cm de diámetro) y una rueda de papel filtro humedecidos. Durante la revisión bibliográfica no se encontró la cantidad exacta de agua que debía aplicarse al papel filtro y al algodón. Se aplicaron 150 µℓ y el hongo no creció en ninguna chinche muerta. Tomando en cuenta esto, durante el bioensayo definitivo la

prueba se realizó con un algodón de aproximadamente 1 cm de diámetro y aplicando 200 μl de agua, y pocas chinches muertas desarrollaron el hongo (ver Resultados). La prueba se repitió con las chinches del experimento preliminar (que no habían desarrollado el hongo), para ver si se producía algún cambio. En un grupo de cajas de Petri (tratamiento "acuoso con conidios") se aplicaron 200 μl de agua y en otro grupo (tratamiento "aceite con conidios") se aplicaron 500 μl para observar lo que sucedía. En esa ocasión el hongo sí se desarrolló en algunas chinches: cuatro en las cajas de Petri con 200 μl de agua, y dos en las cajas con 500 μl . Eso demuestra que el grado de humedad influye en el resultado de la prueba, ya que con las primeras condiciones, el hongo no se había desarrollado en esas mismas chinches.

4 JUSTIFICACIÓN

4.1 Importancia de *T. dimidiata*

El mal de Chagas constituye uno de los mayores problemas de salud humana en la mayoría de países latinoamericanos (Lecuona *et al.*, 2001). Esta enfermedad puede tener manifestaciones mortales y provocar secuelas crónicas irreversibles (Chin, 2001), por lo que su combate es de suma importancia. En Guatemala, el número de personas infectadas se estima en aproximadamente 7.3% de la población y la incidencia anual corresponde a aproximadamente 0.3%. Millones de personas están en riesgo de contraer el mal (Hashimoto *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2003).

En Guatemala, el principal vector del mal de Chagas es *T. dimidiata*, el único que ha sido encontrado en todas las regiones del país; además, es una especie nativa (Hashimoto *et al.*, 2006, Nakagawa *et al.*, 2003). *T. dimidiata* es también uno de los tres vectores más importantes de la enfermedad en el continente, por lo que se hace urgente controlarlo. Su área de distribución parte de México y atraviesa todos los países de Centroamérica, incluyendo además poblaciones en Sudamérica. Ocupa una amplia diversidad de hábitats, incluyendo ambientes domésticos, peridomésticos y selváticos (Lent y Wygodzinsky, 1979; Zeledón, 1981; Tabaru *et al.*, 1998; todos citados por Panzera *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2003). La variedad de ecotopos que habita hace difícil su erradicación (Panzera *et al.*, 2006).

T. dimidiata puede representar un complejo de especies crípticas, es decir, con morfología indistinguible pero aisladas reproductivamente, por lo que se definió que existen tres grupos o citotipos, restringidos a diferentes áreas geográficas. El llamado "citotipo 1" es el más importante en términos epidemiológicos (es el único comúnmente asociado con ambientes domésticos y peridomésticos, y es el de mayor distribución geográfica) (Panzera *et al.*, 2006). En el presente trabajo, se emplearán ninfas de cultivos de Jutiapa y El Quiché, departamentos donde se sabe que se encuentra dicho citotipo (Panzera *et al.*, 2006). Se priorizará al departamento de Jutiapa, debido a que, desde mediados de la década de 1990, es el departamento con mayor índice de infestación para *T. dimidiata* (Hashimoto *et al.*, 2006).

4.2 Necesidad de nuevas medidas de control

Aunque se han tomado algunas medidas para controlar a los vectores de la enfermedad –cambios en la construcción de las viviendas y uso de ciertos insecticidas químicos–, se sabe que *T. dimidiata* migra a las casas al inicio de la época lluviosa (Monroy, com. pers., 2007), lo cual contribuye a que vuelva a colonizarlas después de terminado el efecto residual de los insecticidas químicos. Además, el costo de rociar las casas con insecticidas es relativamente alto en Guatemala, comparado con el de los países sudamericanos. De hecho, en este país el costo del insecticida resulta mayor que los costos de transporte y de salarios del personal implicado (Nakagawa *et al.*, 2003).

El control biológico es una opción alternativa que puede permitir un bajo costo y una alta inocuidad para el ambiente (Payne, 1988), y por ende, para los humanos. Un micoinsecticida podría ser prometedor si se aplica un poco antes de la migración estacional de *T. dimidiata* (Monroy, com. pers., 2007), ya que, por estar empezando la época lluviosa, se satisfaría la necesidad de humedad del hongo. En otros países se han hecho pruebas de susceptibilidad de los triatominos a hongos entomopatógenos (ver 3.2.2.5), pero no se tiene conocimiento de pruebas en *T. dimidiata*. Este estudio pretende complementar las investigaciones para el control biológico de *T. dimidiata* desarrolladas por el LENAP: Monroy y Enríquez, 1999; Enríquez, 2002; y Enríquez, 2004 (ver 3.2.2.5).

5 OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la efectividad insecticida de dos formulaciones de *M. anisopliae* aplicadas en adobe infestado con *T. dimidiata*.

5.2 Específicos

5.2.1 Poner a prueba el efecto entomopatígeno de conidios de *M. anisopliae* aplicados en uno de los materiales que caracterizan el entorno doméstico de *T. dimidiata*.

5.2.2 Comparar la efectividad insecticida de una formulación acuosa y una aceitosa de *M. anisopliae* aplicadas en adobe infestado con *T. dimidiata*.

6 HIPÓTESIS

6.1 La aplicación de soluciones con conidios de *M. anisopliae*, en adobe infestado por chinches de *T. dimidiata*, incrementa la mortalidad de estas.

6.2 El aceite de soya y el agua con emulsificador difieren en su efectividad como vehículos para aplicar conidios de *M. anisopliae* en adobe infestado por *T. dimidiata*.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo

La población de interés es el conjunto de individuos domésticos y peridomésticos de *T. dimidiata* de Jutiapa y El Quiché.

La muestra estaba constituida por 180 chinches de tercer estadio de *T. dimidiata* cultivadas en el laboratorio. Dichas chinches eran descendientes de insectos colectados en Jutiapa y El Quiché.

7.2 Materiales

7.2.1 Cristalería

- § Agitador de vidrio
- § Cajas de Petri de vidrio
- § Cámara de newbauer para conteos de conidios, para hacer diluciones
- § Beakers
- § Embudos
- § Erlenmeyers
- § Frascos pequeños sin tapadera
- § Portaobjetos
- § Probetas
- § Tubitos de vidrio con tapadera
- § Varillas de vidrio dobladas en "L"

7.2.2 Equipo

- § Autoclave (modelo no. 25X de *All American*)
- § Balanza electrónica (modelo A-160 de la *Denver Instrument Company*)
- § Calentador/ventilador de escritorio HT 2090, marca *Airmate*

- § Campana microbiológica clase II (PREMLAB SAFETY CABINET, hecha por SERPROMA-LAB)
- § Estufa eléctrica
- § Incubadora de convección mecánica (*Precision*)
- § Microscopio óptico (*Nikon YS2-T*)
- § Refrigeradora (modelo no. FPD14TLLO)
- § Vórtex (Cat. No. 12-812)

7.2.3 Instrumentos

- § Asa de nicromo
- § Bisturí
- § Micropipetas y puntas (de 10 a 100 μ l y de 100 a 1000 μ l)
- § Mortero para macerar
- § Pinzas
- § Termohigrómetro digital
- § Tijeras

7.2.4 Reactivos

- § Aceite de soya *Crisco*
- § Agar de dextrosa Sabouraud. Método de preparación (indicado en la etiqueta del producto): por cada litro de agua, se agregan 65 g del polvo. Se mezcla y se hierve durante 1 min. Enseguida la mezcla se autoclavea por 15 min.
- § Agarosa. Método de preparación: se disuelve en agua una masa adecuada para obtener la densidad deseada, y se calienta.
- § Agua corriente
- § Agua desmineralizada (para autoclavear)
- § Agua destilada
- § Alcohol, para esterilizar área de trabajo
- § “Estreptomicina” (sulfato de estreptomicina)
- § Etanol

- § “Hipoclorito de sodio” (blanqueador comercial)
- § Medio a base de agar de papa y dextrosa (PDA). Método de preparación (indicado en la etiqueta del producto): por cada litro de agua, se agregan 39 g del PDA. Se mezcla y se hierve durante 1 min. Enseguida la mezcla se autoclavea por 15 min.
- § Solución salina
- § *Tween* 20 (monolaurato de polioxietileno-sorbitan)

7.2.5 Otros

- § Atomizadores
- § Algodón
- § Cajas plásticas transparentes (“camiseras”) de 13.5 cm x 26 cm x 36 cm
- § Cajas de Petri plásticas tipo “60 mm x 15 mm” y tamaño estándar (“90 mm x 10 mm”)
- § Calculadora
- § Cartón
- § Cubreobjetos
- § Encendedor o fósforos
- § Etiquetas o maskin tape
- § Frascos; gasa y hules para taparlos
- § 24 ladrillos de adobe de aproximadamente 10 cm x 11 cm x 22 cm
- § Malla metálica
- § Marcadores permanentes, para rotular
- § Mascarillas
- § Mecheros
- § Papel aluminio
- § Papel filtro
- § Papel mayordomo, para limpiar área de trabajo
- § Papel parafilm
- § Tubos plásticos autoclaveables con tapadera

7.2.5.1 Seres vivos

- § Cepa AES.Met.mb del hongo *M. anisopliae*, aislada de mosca blanca, en Guatemala, por Agrícola El Sol.
- § Especímenes de *T. dimidiata* colectados en Jutiapa y El Quiché por el equipo del LENAP o donados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, cultivados en el laboratorio.
- § Ratones (*Mus musculus* Linnaeus) y ratas (*Rattus norvegicus* (Berkenhout)) donados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

7.3 Métodos

7.3.1 Elección de la cepa de hongo

En un estudio reciente realizado en el LENAP (Enríquez, 2005), se realizaron bioensayos con cuatro cepas de hongos entomopatógenos, aisladas en Guatemala por Agrícola El Sol: dos de *M. anisopliae* y dos de *B. bassiana*. Las dos de *M. anisopliae* eran AES.Met.mb (aislada de mosca blanca) y AES.Met.gc (aislada de gallina ciega); las dos de *B. bassiana* eran AES.Bb.mb y AES.Bb.gc. En este trabajo que toma en cuenta los resultados de dicho estudio, se usó *M. anisopliae*, que presentó mayor capacidad que *B. bassiana* para matar los huevos de *T. dimidiata*.

Por otra parte, como se mencionó antes, las cepas de una misma especie de hongo pueden variar considerablemente en sus rangos de huéspedes. En el caso de *M. anisopliae*, este hecho ha sido ampliamente reportado, así que se ha enfatizado la necesidad de realizar bioensayos para seleccionar la cepa más virulenta contra un insecto determinado (Zimmermann, 1993). En este caso, se tomó como referencia el estudio recién mencionado (Enríquez, 2005), según el cual la cepa AES.Met.mb (aislada de mosca blanca) presentó la ventaja de tener menores valores de LT_{50} y LT_{90} (tiempos letales para que muera el 50 y el 90% de los individuos, respectivamente) que la otra cepa. Esto se ha observado también en bioensayos más recientes (Pellecer, com. pers., 2007).

7.3.2 Cultivo y almacenamiento de la cepa elegida

La obtención de conidios de *M. anisopliae* es posible cultivándolo en la superficie de agar nutritivo o de otras materias orgánicas (Zimmermann, 1993). En esta investigación, se empleó preferentemente agar de dextrosa Sabouraud, base para el cultivo de hongos. Ocasionalmente se empleó medio a base de agar de papa y dextrosa (PDA), el cual se usa especialmente para que los hongos formen conidios (Enríquez, 2004).

La germinación de *M. anisopliae* ha demostrado ser mayor en medios con extracto de insecto, presuntamente porque la cutícula de este contiene sustancias que estimulan la germinación (Ibrahim *et al.*, 1999). Por ello, en los medios para cultivar la cepa elegida (AES.Met.mb) se añadió 0.5 o 1% de macerado de chinches (0.5 o 1g por cada 100 ml de agua) (Toriello, citada por Enríquez, com. pers., 2006). El hongo se sembró en condiciones de esterilidad (en una campana microbiológica) y se emplearon cajas de Petri plásticas pequeñas (tipo “60 mm x 15 mm”) para reducir aún más la probabilidad de contaminación.

El almacenamiento de *M. anisopliae* es más eficaz a temperaturas de aproximadamente 4°C, en la oscuridad y a muy baja humedad (Roberts y Yendol, 1971). Por eso se refrigeraron todas las cajas de Petri donde se cultivó la cepa; la humedad relativa mantenida en la refrigeradora era de aproximadamente 18.5%.

7.3.3 Obtención y reproducción de un cultivo monospórico

Las cepas de una misma especie de hongo pueden variar mucho en virulencia. Además, las transferencias de un cultivo a otro aumentan la probabilidad de mutación espontánea de un moho (Roberts y Yendol, 1971). Por ello, en este estudio se usaron cultivos provenientes de una sola espora, para restringir la variabilidad del hongo empleado (ver 3.2.2.4.2).

Para obtener cultivos monospóricos (cultivos provenientes de una espora), se aplicó el método de Goettel e Inglis de 1997, con algunas modificaciones. Se

prepararon soluciones de *tween* al 0.5% (estériles) con 1×10^4 conidios/ml. Se colocaron 1.5 ml de agarosa al 1.5% sobre un portaobjetos. Se aplicaron 10 μ l de la suspensión (es decir, 100 conidios) sobre la agarosa; se esparcieron con una varilla de vidrio doblada en "L". Todo lo anterior se hizo en condiciones de esterilidad, en una campana microbiológica. Se observó a través de un microscopio, rodeado por mecheros. Al localizar un conidio, este se centraba en el campo. Se cerraba el diafragma hasta que solo se viera un haz de luz (de aproximadamente 2 mm de diámetro) sobre la región del conidio. Con un bisturí, se cortaba un cuadrado que incluyera el área iluminada y por lo tanto, el conidio. Se verificaba que el área contuviera solamente un conidio. Se tomaba la fracción de agarosa y se colocaba en una caja de Petri con medio a base de agar de papa y dextrosa (PDA). Las cajas se incubaron a una temperatura de entre 24 y 30°C por dos semanas (Navarro *et al.*, 2001, citados por Enríquez, com. pers., 2006).

Una vez obtenidos varios cultivos monospóricos, se eligió uno que presentaba abundante esporulación (el mismo que se utilizó en la prueba realizada en agosto de 2007, en la cual esporuló en todos los insectos muertos; ver 3.2.2.5.1) Una vez elegido, se sembró en otras cajas de Petri que también contenían medio (agar de dextrosa Sabouraud). Al igual que en las siembras anteriores, el proceso se desarrolló en esterilidad. Las cajas fueron refrigeradas hasta el momento de emplear las esporas.

7.3.4 Formulación de las soluciones con conidios de *M. anisopliae*

Se probaron dos maneras de formular las esporas de *M. anisopliae*: una, en solución acuosa; la otra, en aceite. La solución acuosa consistió en agua destilada con *tween* al 0.01%, para que este actuara como emulsificador (Enríquez, 2004). El aceite empleado fue aceite de soya de marca *Crisco*, el cual no contiene ningún antioxidante. Se prefirió emplear ese, tomando en cuenta que los antioxidantes disminuyen la germinación de *M. anisopliae acridum* en aceite de soya (Moore *et al.*, 1995, citados por Hernández, 2003).

Ambas soluciones tenían la misma concentración: 2×10^7 conidios/ml, cantidad adecuada según estudios previos hechos por el LENAP (Enríquez, 2004). Tomando en cuenta el poder letal de la luz solar, la formulación se realizó por la tarde (Roberts y Yendol, 1971). Para determinar una relación de cantidad de conidios/mg de hongo, se realizaron ocho mediciones de esa relación y el promedio fue de aproximadamente 3×10^7 conidios/mg. Con base en ese valor, se calculó la masa necesaria para obtener la concentración adecuada. El material utilizado para formular dichas soluciones puede apreciarse en el anexo 2.

7.3.5 Evaluación de la viabilidad de las esporas en las soluciones

El porcentaje de viabilidad de las esporas debe ser calculado antes de usarlas (Roberts y Yendol, 1971). De las soluciones originales se prepara una dilución de 1×10^6 conidios/ml. De esta solución se toman 100 μ l que se aplican sobre una caja de Petri con medio de cultivo; la caja debe ser suficientemente grande (tipo "90 x 10") para permitir la posterior manipulación en el microscopio (Toriello, 2005, citada por Enríquez, com. pers., 2006). Los 100 μ l son distribuidos uniformemente sobre el medio, con ayuda de una varilla de vidrio doblada en forma de "L" y estéril. Se coloca la caja de Petri en una incubadora a aproximadamente 27°C, durante 16 horas. Luego de este período la caja de Petri se divide en cuatro partes, trazando dos líneas perpendiculares con un marcador. Se observa en el microscopio. En cada una de las cuatro partes se cuentan 100 conidios (Hernández-Velásquez *et al.*, 2000). El hecho de realizar cuatro conteos es estándar, y ha sido reportado por otros autores (Luz *et al.*, 1999b; Lecuona *et al.*, 2001). De cada 100 conidios se cuenta cuántos tienen un tubo germinativo mayor de la mitad del largo del conidio (y por tanto se consideran germinados) y cuántos no lo tienen. De los cuatro porcentajes de germinación obtenidos se calcula el promedio (Toriello, com. pers, 2006); al menos el 80% de las esporas debe germinar para que la viabilidad se considere satisfactoria (Barrientos, sin año).

7.3.6 Diseño experimental del bioensayo

En condiciones de laboratorio, se realizó un bioensayo para evaluar la efectividad insecticida de las dos soluciones formuladas (ver anexo 3). Se utilizaron ladrillos de adobe para probar si las dos formulaciones eran eficaces contra ninfas de *T. dimidiata* que pudieran refugiarse en grietas, como lo hacen en las viviendas infestadas. Los adobes se colocaron en cajas camiseras.

En cada caja camisera, se colocaron dos ladrillos de adobe y 15 ninfas de tercer estadio de *T. dimidiata*. “La mayoría de bioensayos para evaluar la virulencia de hongos entomopatógenos se realizan sobre ninfas de 3er estadio” (Enríquez, 2004). Las chinches eran descendientes de insectos de Jutiapa y El Quiché (colectados por el personal de LENAP o del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social), cultivadas en el laboratorio. Al momento de aplicar las soluciones, las ninfas tenían siete u ocho días de ayuno y ya estaban instaladas sobre los adobes o en sus grietas.

Se hicieron tres réplicas. En cada réplica, se emplearon cuatro cajas que correspondían a los cuatro tratamientos evaluados (tabla 2): aceite de soya con conidios, solución acuosa con conidios, aceite de soya sin conidios (control) y solución acuosa sin conidios (control). La elección de la caja que recibiría cada tratamiento se hizo de forma aleatoria.

Tabla 2
Tratamientos asignados a las cajas con adobes

	Con conidios		Controles	
	Aceite de soya	Solución acuosa	Aceite de soya	Solución acuosa
Réplica 1	Caja 1a	Caja 2a	Caja 3a	Caja 4a
Réplica 2	Caja 1b	Caja 2b	Caja 3b	Caja 4b
Réplica 3	Caja 1c	Caja 2c	Caja 3c	Caja 4c

La dosis de conidios que debía aplicarse en los adobes era de 1×10^{14} esporas/ha o 1×10^6 esporas/cm², la mayor de las dosis típicamente requeridas para controlar plagas en el campo, reportadas por Bartlett y Jaronski (1988, citados por Wraight

et al., 2001). Como el área que debía rociarse en cada caja (cinco caras de cada adobe) era de aproximadamente 924 cm², se aplicaron aproximadamente 41.2 ml de solución a cada ladrillo (92.4 ml para los dos ladrillos de cada caja). Estas soluciones y sus controles fueron aplicados por medio de atomizadores. Las aplicaciones se llevaron a cabo por la tarde (Roberts y Yendol, 1971) o por la noche (a partir de las 17:15), para evitar que la luz solar matara a las esporas.

Por esta misma razón, las cajas estaban ubicadas en un lugar resguardado de la luz solar (Payne, 1988). Para evitar que el sitio aislado en que se encontraban las cajas alcanzara temperaturas demasiado bajas, casi todos los días se encendió un calentador durante aproximadamente media hora (Rodas, com. pers., 2008), excepto cuando la temperatura ambiental ya era alta o cuando alguna interrupción del fluido eléctrico lo impidió. Las cajas fueron cubiertas con cedazo y una tapadera plástica, para evitar que las chinches pudieran escapar.

En cada réplica, diariamente se contaron las chinches muertas, durante 30 días. Las chinches se alimentaron cada siete días. Para alimentarlas, se les ofrecía un ratón de laboratorio inmovilizado con una malla metálica, colocado en total oscuridad, para que las chinches succionaran la sangre (Enríquez, com. pers., 2006). El ratón permanecía a su alcance durante media hora.

7.3.7 Registro de los resultados

Cada día se anotaron los siguientes datos:

- § temperatura mínima y máxima registradas desde la revisión anterior;
- § humedad relativa mínima y máxima registradas desde la revisión anterior;
- § número de chinches muertas, número de chinches vivas restantes y otras observaciones con respecto a cada tratamiento (número de chinches que se veían alimentadas; aspecto y olor de los adobes).

Se llevó un registro de la temperatura y la humedad por su importancia con respecto a la sobrevivencia de las chinches y de las esporas.

7.3.8 Detección de la presencia de hongo en las chinches muertas

Durante la primera réplica, los insectos muertos del tratamiento “aceite de soya con conidios” (y de su control) no fueron refrigerados inmediatamente, para ver si el hongo esporulaba en la superficie del cuerpo. Sin embargo, como esto no sucedió, durante las otras réplicas los insectos muertos fueron refrigerados inmediatamente (excepto cuando alguna interrupción del fluido eléctrico lo impidió); para ello fueron colocados en frasquitos individuales, limpios.

Posteriormente, se realizó una prueba para verificar que los insectos muertos estuvieran infectados por *M. anisopliae*. Las chinches muertas fueron lavadas para matar bacterias e impedir que estas entorpecieran el desarrollo del hongo. Cada insecto muerto se sumergió durante 30 segundos en agua destilada, 1 minuto en blanqueador comercial ("hipoclorito de sodio") al 10%, 30 segundos en alcohol al 70%, 1 minuto en solución salina, 1 minuto en "estreptomycin" (sulfato de estreptomycin) al 0.05% y 30 segundos en agua estéril (Enríquez, 2002). Cada chinche lavada se colocó en una caja de Petri tipo “60 mm x 15 mm” que contenía una rueda de papel filtro humedecida con agua; esto se hizo en condiciones de esterilidad. La caja se selló con papel parafilm para constituir una cámara húmeda (Hernández-Velásquez *et al.*, 2000); también se colocó un algodón humedecido. Con marcador, se indicó el número de réplica, el tratamiento y la fecha correspondientes. Luego, las cajas de Petri se incubaron a aproximadamente 27°C (de 24 a 30°C) durante siete a diez días (en general, nueve) para inducir el crecimiento de hongos, en caso de encontrarse presentes (Toriello, 2001, citada por Enríquez, 2004). La cantidad total de agua aplicada al papel filtro y al algodón de cada caja fue de 200 μl el algodón era de aproximadamente 1 cm de diámetro.

Finalmente, se supuso que la esporulación del hongo sobre la superficie de los insectos muertos indicaba que el hongo había sido la causa de su muerte (Romaña y Fargues, 1992).

7.3.9 Análisis estadístico

7.3.9.1 ANDEVA

Las mortalidades fueron analizadas por medio del ANDEVA (Luz *et al.*, 1999b; Lecuona *et al.*, 2001). Se realizaron dos tipos de ANDEVA de dos vías para un diseño de bloques aleatorizados (tomando a los meses como bloques): uno de libre distribución (prueba de Friedman) y uno “paramétrico” (Daniel, 2006 y Zar, 1999), con ayuda de los programas Minitab 15 (Daniel, 2006) e InStat. Para el “paramétrico”, los porcentajes de mortalidad fueron transformados mediante la transformación del arcoseno (Romaña y Fargues, 1992; Zar, 1999) (ver tabla 6). Como se detectó diferencia entre los cuatro tratamientos, se realizaron las pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett (programa InStat), Tukey y Fisher (programa Minitab 15).

7.3.9.2 Análisis de regresión para estimar valores de dosis letal y tiempo letal

Se realizó un análisis de regresión para estimar valores de dosis letal (LD_{50} , LD_{90} y LD_{99}) y tiempo letal (LT_{50} , LT_{90} y LT_{99}) por medio de una transformación logarítmica de los datos, de acuerdo al modelo de Probit (Romaña y Fargues, 1992 y Fortuny, 1999, ambos citados por Enríquez, 2004), para lo cual se empleó el programa PoloPlus (Toriello, com. pers., 2006).

Para calcular las dosis letales, el programa PoloPlus fue empleado con dos conjuntos de datos: 1) los datos de mortalidad y 2) la cantidad de chinches que sí desarrollaron *M. anisopliae* durante la prueba de incubación en cámaras húmedas. Es decir, se compararon los resultados arrojados por el programa al considerar: 1) que la mortalidad era indicadora de la acción de *M. anisopliae* y 2) que solo el desarrollo de ese hongo durante la prueba de incubación de las chinches muertas en cámaras húmedas era indicador de su acción. En ambos casos, en vez de usar solo dos valores de dosis (0 conidios/cm² en el caso de los controles y 1×10^6 conidios/cm² en el caso de las otras cajas), lo cual es insuficiente para hacer este tipo de análisis, se tomó en cuenta el porcentaje de germinación de las esporas de

cada réplica. Así, las dosis se expresaron en conidios viables/cm² para tener varias parejas de dosis-mortalidad.

Para calcular el tiempo letal en cada tratamiento, primero se emplearon los 30 datos de mortalidad acumulada obtenidos durante cada réplica (correspondientes a los 30 días de observación) (Enríquez, 2004). Ese total de datos permitió comparar la rapidez de la acción de los dos bioinsecticidas, en términos relativos. Sin embargo, de acuerdo con la Guía del Usuario del programa PoloPlus (Robertson *et al.*, 2003), para que el uso del análisis Probit sea válido, los datos de cada período de tiempo deben ser independientes y para ello debe contarse con un grupo distinto de individuos para cada uno (por ejemplo, un grupo de chinches para medir la mortalidad el día 1, la semana 1 o el mes 1, un segundo grupo de chinches para medir la mortalidad el día 2, la semana 2 o el mes 2 y así sucesivamente...). Tomando en cuenta esto, el análisis se repitió con un solo dato por réplica: de la réplica 3 se observó la mortalidad a los 10 días, de la réplica 1 se observó la mortalidad a los 20 días y de la réplica 2 se observó la mortalidad a los 30 días (la elección de la réplica que se asociaría con cada tiempo se hizo al azar). Todo ello se repitió con los valores obtenidos en los controles, para comparar los resultados.

8 RESULTADOS

8.1 Evaluación de la viabilidad de las esporas en las soluciones

Los resultados de la prueba de viabilidad de los conidios en ambas soluciones se presentan en la tabla 3, donde puede observarse que todos los porcentajes de germinación fueron superiores a 80%; no obstante, el que corresponde al tratamiento “solución acuosa con conidios” de la tercera réplica fue relativamente bajo.

Tabla 3
Porcentaje de germinación de los conidios después de 16 horas de incubación

	Aceite de soya	Solución acuosa
Réplica 1	95.5%	96.5%
Réplica 2	93.75%	96.5%
Réplica 3	89.75%	80.1%
Promedio	93%	91.03%
Desviación estándar	2.947	9.469

8.2 Resultados del bioensayo

Todos los individuos de los tratamientos aceitosos murieron en el lapso de los 30 días después de las aplicaciones. La mortalidad obtenida en los controles fue alta: 100% en el tratamiento “aceite de soya sin conidios” y entre 60 y 86.67% en el tratamiento “solución acuosa sin conidios” (tabla 4).

Tabla 4
Porcentajes de mortalidad acumulada de *T. dimidiata* de tercer estadio, 30 días después de expuestas a distintas soluciones, sobre ladrillos de adobe

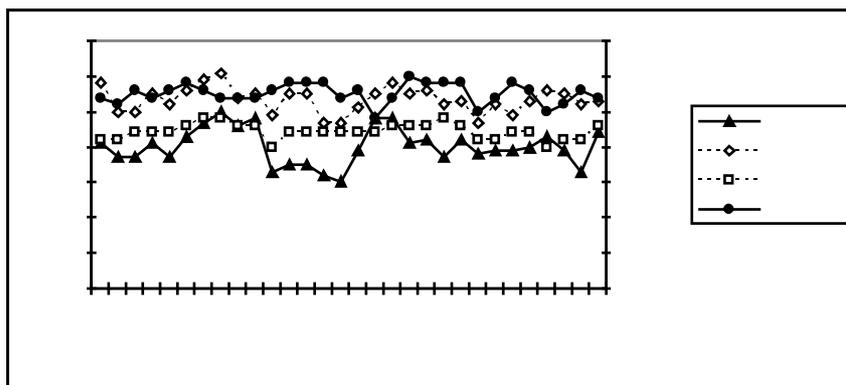
	Con conidios		Controles	
	Aceite de soya	Solución acuosa	Aceite de soya	Solución acuosa
Réplica 1	100	60	100	73.33
Réplica 2	100	93.33	100	86.67
Réplica 3	100	93.33	100	60
Promedio	100	82.22	100	73.33
Desviación estándar	0	19.24	0	13.33

8.3 Temperatura, humedad y otras observaciones registradas durante el bioensayo

En la réplica 1, la humedad relativa varió entre 30% y 61%; la temperatura osciló entre 20°C y 30°C (el valor de 30°C se reportó una sola vez, las temperaturas máximas más frecuentes fueron de 27, 28 y 29°C; gráfica 1). En la réplica 2, la humedad relativa estuvo en el rango de 30% a 61%; la temperatura varió de 21°C a 30°C (el valor de 30°C se reportó una sola vez, las temperaturas máximas más frecuentes fueron de 27 y 28°C; gráfica 2). En la réplica 3, la humedad relativa osciló entre 39% y 74%; la temperatura estuvo en el rango de 21°C a 30°C (el valor de 30°C se reportó una sola vez, las temperaturas máximas más frecuentes fueron de 26 y 27°C; gráfica 3).

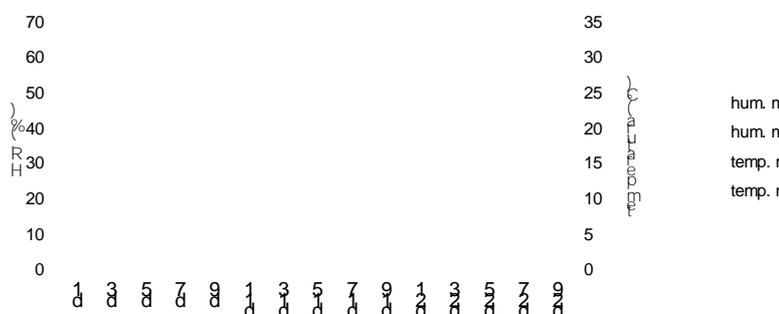
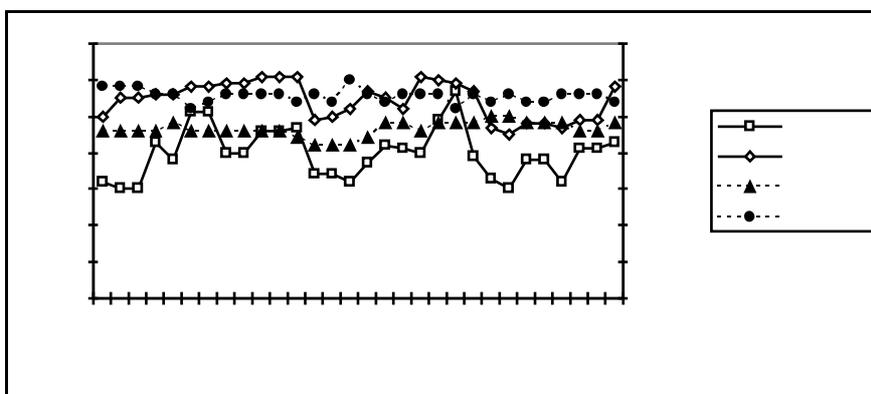
Gráfica 1

Humedad relativa y temperatura reportadas diariamente durante la réplica 1



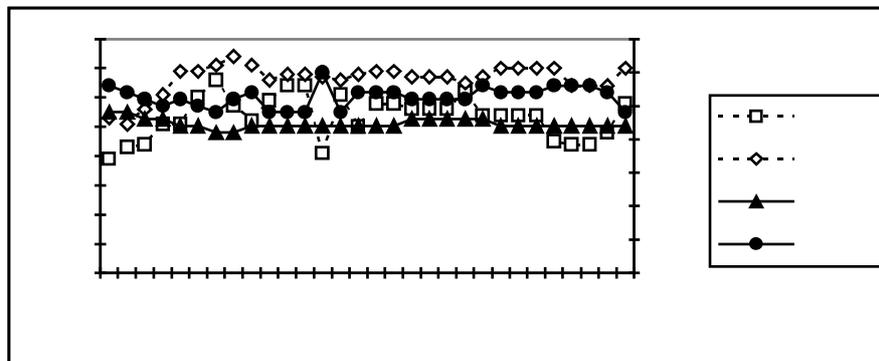
Gráfica 2

Humedad relativa y temperatura reportadas diariamente durante la réplica 2



Gráfica 3

Humedad relativa y temperatura reportadas diariamente durante la réplica 3



Se observó que los rastros del aceite de soja permanecían visibles durante mucho tiempo sobre los ladrillos de adobe, con olor a rancio. En los tratamientos acuosos, en cambio, el olor a tierra mojada duró un máximo de seis días y los rastros de solución visibles en los adobes duraron menos de tres días.

8.4 Detección de la presencia de hongo en las chinches muertas

En la primera réplica, a pesar de que los insectos muertos del tratamiento “aceite de soja con conidios” (y de su control) no fueron refrigerados inmediatamente, el hongo no esporuló en la superficie de los cuerpos.

Los resultados de la prueba de incubación de las chinches muertas en cámaras húmedas se presentan en la tabla 5. De las 90 chinches expuestas a *M. anisopliae* (45 en el tratamiento “aceite de soja con conidios” y 45 en el de “solución acuosa con conidios”), murieron 81, pero durante la prueba solamente en 20 de ellas se desarrolló el hongo (lo suficiente como para verlo en la superficie del insecto; ver anexo 4).

Tabla 5
Resultados de la prueba de incubación en cámaras húmedas

Réplica	Resultado	Soluciones con conidios		Controles		Total de chinches muertas	
		Aceitosa	Acuosa	Aceitoso	Acuoso		
1	<i>M. anisopliae</i>	2	4	0	0	6	50
	Otros hongos	10	5	6	4	25	
	Ningún hongo	3	0	9	7	19	
2	<i>M. anisopliae</i>	4	6	0	0	10	57
	Otros hongos	11	6	11	2	30	
	Ningún hongo	0	2	4	11	17	
3	<i>M. anisopliae</i>	4	0	0	0	4	49
	Otros hongos	6	1	3	2	12	
	Ningún hongo	5	12	10	6	33	
Total de chinches muertas		45	36	43	32		

8.5 Análisis estadístico

8.5.1 ANDEVA

Los resultados de la prueba de Friedman realizada por los programas InStat y Minitab 15 coincidieron entre sí. De acuerdo con esta prueba, sí hay diferencia ($p=0.0438$) entre los cuatro tratamientos (aceite de soya con conidios, solución acuosa con conidios, aceite de soya sin conidios y solución acuosa sin conidios). De las pruebas de comparaciones múltiples realizables por dichos paquetes estadísticos (de Dunnet, en el caso de InStat; de Tukey y de Fisher en el caso de Minitab 15), la de Fisher fue la única que detectó diferencias significativas ($p<0.05$ en los intervalos de confianza individuales; nivel de confianza simultáneo: 82.43%) entre dos pares de tratamientos: a) "solución acuosa sin conidios" y "aceite de soya sin conidios" y b) "solución acuosa sin conidios" y "aceite de soya con conidios". En otras palabras, el tratamiento "solución acuosa sin conidios" es estadísticamente distinto a los tratamientos de "aceite de soya", independientemente de que estos tuvieran conidios o no. Es notable que la diferencia entre los tratamientos "solución acuosa con conidios" y "solución acuosa sin conidios" no sea estadísticamente significativa (con un nivel de confianza de 95% en los intervalos individuales y un nivel de confianza simultáneo de 82.43%).

Con los datos obtenidos por medio de la transformación del arcoseno (tabla 6), se realizó un ANDEVA de dos vías para un diseño de bloques al azar. Esta prueba fue efectuada por medio del programa Minitab 15. Como sí se detectó diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0.007$), se realizaron las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Fisher. La primera prueba detectó solamente las mismas diferencias que la de Fisher con los datos no transformados: el tratamiento “solución acuosa sin conidios” difiere de los dos tratamientos aceitosos ($p<0.0126$ para los intervalos de confianza individuales; nivel de confianza simultáneo: 95%). No obstante, en esta ocasión la prueba de Fisher arrojó resultados interesantes: detectó diferencias significativas ($p<0.05$ en los intervalos de confianza individuales; nivel de confianza simultáneo: 82.43%) entre todos los pares de tratamientos con distinto vehículo, y no encontró diferencia entre los dos tratamientos aceitosos ni entre los dos acuosos; en otras palabras, de acuerdo con esta prueba, hay diferencia entre el aceite de soya y el agua con *tween*, pero no la hay entre la presencia o ausencia de conidios de *M. anisopliae*.

Tabla 6
Datos (tabla 4) obtenidos por medio de la transformación del arcoseno

	Con conidios		Controles	
	Aceite de soya	Solución acuosa	Aceite de soya	Solución acuosa
Réplica 1	90	50.77	90	58.89
Réplica 2	90	75	90	68.61
Réplica 3	90	75	90	50.77
Promedio	90	66.92	90	59.42
Desviación estándar	0	13.99	0	8.93

8.5.2 Análisis de regresión para estimar valores de dosis letal y tiempo letal

8.5.2.1 Valores de dosis letal

Cuando se usaron los datos de mortalidad (tabla 7) para calcular las dosis letales con el programa PoloPlus, este no calculó los valores deseados (LD_{50} , LD_{90} y LD_{99}).

Tabla 7

Datos de mortalidad empleados para calcular valores de LD₅₀, LD₉₀ y LD₉₉ con el programa PoloPlus

Vehículo	Réplica	Dosis (millones de esporas viables/cm ²)	Individuos totales	Individuos muertos
Aceite de soya	Réplica 1	0.955	15	15
		0	15	15
	Réplica 2	0.9375	15	15
		0	15	15
	Réplica 3	0.8975	15	15
		0	15	15
Solución acuosa	Réplica 1	0.965	15	9
		0	15	11
	Réplica 2	0.965	15	14
		0	15	13
	Réplica 3	0.801	15	14
		0	15	9

Cuando se repitió el análisis, usando las cantidades de chinches que sí habían desarrollado *M. anisopliae* durante la prueba de incubación en cámaras húmedas (tabla 8), el programa tampoco calculó los valores deseados.

Tabla 8

Datos de la prueba de incubación de las chinches muertas en cámaras húmedas empleados para calcular valores de LD₅₀, LD₉₀ y LD₉₉ con el programa PoloPlus

Vehículo	Réplica	Dosis (millones de esporas viables/cm ²)	Individuos totales	Individuos con infección por <i>M. anisopliae</i> comprobada
Aceite de soya	Réplica 1	0.955	15	2
		0	15	0
	Réplica 2	0.9375	15	4
		0	15	0
	Réplica 3	0.8975	15	4
		0	15	0
Solución acuosa	Réplica 1	0.965	15	4
		0	15	0
	Réplica 2	0.965	15	6
		0	15	0
	Réplica 3	0.801	15	0
		0	15	0

8.5.2.2 Valores de tiempo letal

Cuando se emplearon los 30 datos de mortalidad acumulada (correspondientes a los 30 días de observación) obtenidos durante cada réplica y en cada tratamiento, para comparar la rapidez de la acción de los dos bioinsecticidas, se obtuvieron los valores presentados en la tabla 9. Puede notarse que los valores de LT para los controles son mayores que los de los tratamientos correspondientes. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, los valores obtenidos para ambas soluciones acuosas (aun la que contenía conidios) son mayores que los obtenidos para ambos tratamientos de aceite de soya (aun el control).

Tabla 9
Valores de LT_{50} , LT_{90} y LT_{99} (expresados en días)
calculados por el programa PoloPlus

	LT_{50}	LT_{90}	LT_{99}
Aceite de soya con conidios	2.118	15.377	77.416
Solución acuosa con conidios	16.096	55.538	152.434
Aceite de soya sin conidios	3.465	20.189	84.944
Solución acuosa sin conidios	17.872	55.747	140.927

Cuando se repitió el análisis con un solo dato por réplica (la mortalidad a los 10, 20 y 30 días tomada –aleatoriamente– de la réplica 3, 1 y 2, respectivamente), el programa producía el mensaje “ERROR 27. Una preparación tiene menos de 3 grupos de dosis”. Es necesario aclarar que el programa siempre habla de “dosis” aunque se trate de “tiempos” y de “LD” aunque se trate de “LT”. Normalmente, dicho mensaje es producido cuando se cuenta con menos de tres datos (aparte de los controles) (Robertson *et al.*, 2003). Este no era el caso, ya que se contaba justo con tres datos por tratamiento (tabla 10); sin embargo, los esfuerzos para que el programa corriera con esa mínima cantidad de datos (agregando el dato correspondiente a 0 días, por ejemplo) fueron infructuosos. Lo mismo sucedió cuando se repitió el proceso con los controles (dosis nula), cuyos datos pueden consultarse en la tabla 11.

Tabla 10

Datos de mortalidad independientes, empleados para calcular valores de LT_{50} , LT_{90} y LT_{99} con el programa PoloPlus, para una dosis de 1×10^6 conidios/cm²

	Tiempo (días)	Individuos totales	Individuos muertos	Datos tomados aleatoriamente de...
Aceite de soya con conidios	10	15	13	Réplica 3
	20	15	15	Réplica 1
	30	15	15	Réplica 2
Solución acuosa con conidios	10	15	4	Réplica 3
	20	15	7	Réplica 1
	30	15	14	Réplica 2

Tabla 11

Datos de mortalidad independientes, empleados para calcular valores de LT_{50} , LT_{90} y LT_{99} con el programa PoloPlus, para una dosis de 0 conidios/cm² (controles)

	Tiempo (días)	Individuos totales	Individuos muertos	Datos tomados aleatoriamente de...
Aceite de soya sin conidios	10	15	8	Réplica 3
	20	15	15	Réplica 1
	30	15	15	Réplica 2
Solución acuosa sin conidios	10	15	4	Réplica 3
	20	15	8	Réplica 1
	30	15	13	Réplica 2

9 DISCUSIÓN

La mortalidad de las chinches durante el bioensayo fue alta, incluso en las cajas testigo. Las chinches que no murieron a causa de los conidios de *M. anisopliae* pudieron haber muerto por falta de alimentación, por otros parásitos, por las temperaturas más elevadas o, en el caso de los tratamientos en que se aplicó aceite de soya, por la presencia misma de este. A continuación se discuten esas posibles causas.

La falta de alimentación parece ser uno de los factores más importantes, de acuerdo con las siguientes observaciones: en tres casos (en el control acuoso de la réplica 1 y de la réplica 3, así como en el tratamiento “solución acuosa con conidios” de la réplica 1), los insectos que sobrevivieron hasta el final parecen ser los que aceptaron alimentación; en dos casos (en el tratamiento “solución acuosa con conidios” de la réplica 2, así como en el control aceitoso de la réplica 3), las chinches que sobrevivieron al final de cada semana parecen ser las que habían comido en la alimentación más reciente, y en dos casos (los tratamientos “aceite de soya con conidios” y “solución acuosa con conidios” de la réplica 3), la chinche que sobrevivió más tiempo parece ser la única que había comido las últimas veces.

A juzgar por el desarrollo de otros hongos durante la prueba de incubación de las chinches muertas en cámaras húmedas, es posible que otros hongos entomopatógenos hayan sido responsables de por lo menos alguna muerte. Sin embargo, varios de esos otros hongos pudieron haber entrado en contacto con las chinches cuando ya estaban muertas y no ser la causa de su muerte. Para dilucidar esto, es necesario identificarlos, lo cual está fuera del alcance de los objetivos de esta tesis.

Otro factor que pudo haber influido en la mortalidad de *T. dimidiata* fue la temperatura. Para la especie *T. infestans*, cercana a *T. dimidiata*, está reportado que la supervivencia diaria disminuye progresivamente a temperaturas superiores a 26-27°C. Es posible que ocurra algo parecido con *T. dimidiata* y que las temperaturas más altas

que se alcanzaron durante los experimentos definitivos (28, 29 y excepcionalmente 30°C) hayan incidido en la mortalidad.

Por otra parte, los resultados y los análisis estadísticos indican que el aceite de soya, por sí solo, tuvo un efecto tóxico: aun sin conidios causó 100% de mortalidad (ver tabla 4) y actuó en mucho menos tiempo que la solución acuosa con conidios (ver tabla 9). En los casos en que las chinches se empaparon totalmente desde el principio, murieron rápidamente, posiblemente por bloqueo de las tráqueas. Las que solo se humedecieron o permanecieron aparentemente secas también murieron en un tiempo relativamente corto. En la revisión bibliográfica posterior, se encontró que el aceite de soya ha sido usado como ingrediente activo de insecticidas contra mosquitos y termitas (EPA, 1993; Pest Management Regulatory Agency, 1999). Se cree que su modo de acción consiste en que bloquea el olfato de los insectos (y, por ende, altera su comportamiento de búsqueda de alimento) y hace disminuir la temperatura superficial de su cuerpo, aunque estas hipótesis aún no han sido comprobadas (Pest Management Regulatory Agency, 1999). En otras publicaciones acerca de control biológico con *Metarhizium*, solamente se mencionan ciertas ventajas del aceite de soya como vehículo de aplicación de las esporas: su viscosidad es adecuada para aplicaciones de UBV (ultra bajo volumen); no es fitotóxico; no es inflamable; tiene un bajo costo (Milner, 2000). En dichas publicaciones, el poder letal de las formulaciones de *Metarhizium* en emulsiones con aceite de soya se atribuye al carácter patógeno de los conidios. Sin embargo, los resultados de este bioensayo sugieren que el aceite de soya podría utilizarse para amplificar el efecto letal de los bioinsecticidas.

Con respecto a los vehículos probados aquí con fines puramente experimentales, pudo notarse que la apariencia y el olor a rancio de los rastros que deja el aceite sobre el adobe son algunas de las razones evidentes por las que este tipo de vehículo no podría emplearse solo, sino en emulsión. En el presente trabajo se pretendía estudiar el efecto de ese factor estando aislado, lo cual no habría sido posible si hubiera estado mezclado con agua y un surfactante distinto al de la solución acuosa.

A continuación se discute la presencia del hongo en las chinches muertas. En la primera réplica, a pesar de que los insectos muertos del tratamiento "aceite de soya

con conidios” (y de su control) no fueron refrigerados inmediatamente, el hongo no esporuló en la superficie de los cuerpos, a pesar de que las temperaturas eran propicias (ver gráfica 1): los valores óptimos caen entre 20 y 30°C para el desarrollo de la mayoría de deuteromicetos (Payne, 1988; Roberts y Yendol, 1971). El factor determinante parece haber sido la humedad: la máxima diaria osciló entre 47% y 61%, y la mínima diaria varió entre 30% y 50%. Para Fungi Imperfecti, los conidióforos y los conidios no son producidos a menos que el insecto muerto esté en un ambiente muy húmedo (Roberts y Yendol, 1971)]. En el caso del entomopatógeno *B. bassiana*, por ejemplo, Luz *et al.* (1994, citados por Luz *et al.*, 1999b) reportaron que, en condiciones fluctuantes, es necesario que la HR sea de 97% en el microhábitat del insecto durante al menos 12 h para que el hongo pueda esporular en cadáveres.

Durante la prueba de incubación en cámaras húmedas, pocas chinches muertas desarrollaron el hongo. Esto parece indicar que *M. anisopliae* causó poca mortalidad, lo cual puede deberse a la poca virulencia de la cepa utilizada; también podría deberse a que la dosis administrada fue insuficiente o excesiva, la forma de aplicación fue inadecuada, o los factores ambientales no fueron propicios al hongo. A continuación se discuten esas posibles causas.

Con respecto a la virulencia, la misma cepa utilizada en la presente tesis había causado 100% de mortalidad de chinches de primer y segundo estadio en bioensayos previos hechos por LENAP (Enríquez, 2005), en los que estos insectos habían sido sumergidos en soluciones de agua con *tween* con 1×10^7 conidios/ml. Esta diferencia de resultados tiene varias explicaciones posibles. En primer lugar, Luz *et al.* (1999b) ya habían observado que la mortalidad de chinches expuestas a superficies con conidios era mucho menor que la mortalidad obtenida al sumergirlas en una solución con conidios (aunque su experiencia fue con triatominos de la especie *T. infestans* y con *B. bassiana*). En segundo lugar, los cultivos utilizados en los bioensayos previos no provenían de ningún cultivo monospórico; puede ser que el cultivo monospórico empleado en esta ocasión no fuera apropiado. De hecho, se eligió solo con base en su esporulación (ya fuera en medio de cultivo o en insectos muertos), y no en su virulencia, la cual no había sido puesta a prueba adecuadamente. En tercer lugar, es posible que la cepa tantas veces transferida de medio en medio haya perdido

virulencia, a pesar de haberse utilizado medio de cultivo con chinche macerada (ver 7.3.2). De hecho, la disminución en los porcentajes de germinación podría indicar, justamente, el efecto negativo de las transferencias: en el caso de los conidios en aceite, su viabilidad fue de 95.5% en la primera réplica, 93.75% en la segunda y 89.75% en la tercera; en el caso de las soluciones acuosas, la viabilidad de los conidios fue de 96.5% en las dos primeras y de 80.1% en la tercera.

En cuanto a la dosis (1×10^6 conidios/cm²), se administró la máxima que se encontró en la literatura para *M. anisopliae*. Sin embargo, si se toma en cuenta el porcentaje de germinación de los conidios empleados, en realidad se aplicaron dosis inferiores (en aceite: 0.955×10^6 conidios viables/cm², 0.9375×10^6 conidios viables/cm² y 0.8975×10^6 conidios viables/cm² en las réplicas 1, 2 y 3 respectivamente; en solución acuosa: 0.965×10^6 conidios/cm², de nuevo 0.965 conidios viables/cm² y 0.801 conidios viables/cm² en las réplicas 1, 2 y 3 respectivamente). Es posible que la viabilidad haya sido un factor determinante, haciendo que la dosis fuera insuficiente. Ahora bien, en distintas especies de hongo se ha demostrado que existen compuestos que inducen una auto-inhibición de la germinación a dosis elevadas del inóculo (Luz *et al.*, 1999b). Con base en esto, es necesario realizar bioensayos tanto con dosis mayores como con dosis menores, para dilucidar si se trató de una dosis insuficiente o excesiva. Es posible que fuera insuficiente, dado que Luz *et al.* (1999b) encontraron que, en el campo (y no en el laboratorio), la dosis de 1×10^7 conidios/cm² de *B. bassiana* (dosis muchísimo más elevada que las normalmente usadas en el campo), causó una baja mortalidad en los triatominos de su interés (*T. infestans*).

Con respecto a la forma de aplicación, la que más se encontró en la literatura es la de UBV, la cual ha sido exitosa en el control de las langostas (Luz *et al.*, 1999b). No obstante, Luz *et al.* (1999b) señalan que esta aplicación no parece adecuada para las casas y que lo más prometedor para controlar a los triatominos son métodos de aspersión que permitan una mayor penetración de la solución con conidios en la zona tratada. En el caso de la presente tesis, los atomizadores comunes que se emplearon sí permitían aplicar las soluciones en las grietas; sin embargo, la alta viscosidad del aceite de soya le impidió penetrar en las más pequeñas.

En cuanto a las variables ambientales, la humedad pudo haber sido el factor limitante, ya que se necesita que su valor sea elevado para inducir la enfermedad, aunque solo en las primeras 48 horas de la infección (Roberts y Yendol, 1971). Roberts y Yendol (1971) ya habían observado a los conidios de *M. anisopliae* sobrevivir más tiempo a humedades extremadamente altas o bajas, que a humedades cercanas a 45%; en este caso, los valores de humedad relativa estuvieron muchas veces cercanos a 45%. Además, los hongos entomopatógenos necesitan de una elevada humedad para la germinación de las esporas: 90% o más (Payne, 1988; Roberts y Yendol, 1971). Entre los deuteromicetos que infectan insectos terrestres, el límite inferior para la germinación de las esporas probablemente está cercano al 92% de humedad, y algunos requieren una película de agua (Payne, 1988). Ahora bien, a pesar de que los aceites son más efectivos cuando la humedad relativa es baja (Bateman, 1992, citado por Hernández, 2003), y protegen a los conidios de *M. anisopliae* (var. *acridum*) del estrés ambiental (Jenkins y Thomas, 1996, citados por Hernández, 2003), en este caso el aceite de soya no parece haberlos protegido lo suficiente para asegurar su efectividad.

Como ya se dijo (ver 3.2.2.5.1), es posible que la prueba de incubación de los insectos muertos en cámaras húmedas haya sido inadecuada, por lo que es necesario realizarla aplicando distintas cantidades de agua al papel filtro y al algodón, para identificar la cantidad más adecuada para la esporulación de *M. anisopliae*. Tomando en cuenta esto y que infecciones inaparentes ocurren frecuentemente (Payne, 1988), es probable que la cantidad de chinches infectadas por el hongo fuera mayor de la comprobada.

De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Fisher realizada con los datos obtenidos por medio de la transformación del arcoseno, hay diferencia significativa ($p < 0.05$ en los intervalos de confianza individuales; nivel de confianza simultáneo: 82.43%) entre los dos vehículos empleados (aceite de soya y solución acuosa), pero no entre la presencia o ausencia de *M. anisopliae*. En otras palabras: el aceite de soya tuvo un efecto más tóxico que la solución acuosa, pero aparentemente *M. anisopliae* no incrementó la mortalidad de las chinches.

El cálculo de los valores de LD₅₀, LD₉₀, LD₉₉, LT₅₀, LT₉₀ y LT₉₉ no fueron posibles: al intentar calcular los de dosis letal, el programa arrojó resultados incompletos. Según la Guía del Usuario, "si la razón t de cualquier pendiente es menor a 1.96, la regresión no es significativa y el tratamiento no tiene efecto, y el conjunto de datos debe ser excluido de posteriores análisis" (Robertson *et al.*, 2003). Al tratar de obtener los valores de tiempo letal, el programa respondió como si hubiera menos de tres datos por tratamiento (cuando, en realidad, había exactamente tres); al parecer, la cantidad de datos fue demasiado baja. Los valores de tiempo letal que se obtuvieron al emplear los 30 datos disponibles para cada tratamiento solo son útiles para comparar la rapidez relativa de las soluciones empleadas, ya que, como se explicó anteriormente (ver 7.3.9.2) para que el uso del análisis Probit sea válido, los datos de cada período de tiempo deben ser independientes y para ello debe contarse con un grupo distinto de individuos para cada uno (por ejemplo, un grupo de chinches para medir la mortalidad el día 1, la semana 1 o el mes 1, un segundo grupo de chinches para medir la mortalidad el día 2, la semana 2 o el mes 2 y así sucesivamente...) (Robertson *et al.*, 2003).

Es necesario seguir investigando a los hongos entomopatógenos como posible control de *T. dimidiata*. Hace falta poner a prueba distintas especies, cepas, otros métodos de cultivo de los hongos, formulaciones, dosis y formas de aplicación. Además, se necesita poner a prueba la efectividad de este tipo de bioinsecticidas en condiciones ambientales similares a las de las regiones de interés. En particular, habría que reproducir las condiciones previas a la estación lluviosa, tomando en cuenta que, según Roberts y Yendol (1971), las epizootias suelen estar asociadas con períodos de alta humedad, particularmente períodos lluviosos, y que el control biológico suele ser exitoso cuando la aplicación del hongo tiene lugar un poco antes del tiempo húmedo. Como es raro que hongos introducidos se esparzan ampliamente durante varias estaciones en el sitio de introducción (Payne, 1988), también es necesario hacer bioensayos con cadáveres en que el hongo entomopatógeno haya esporulado, para ver si su presencia incrementa la mortalidad de las demás chinches, provocando un efecto en cadena.

10 CONCLUSIONES

- 10.1 Los conidios de la cepa AES.Met.mb que fueron aplicados en los ladrillos de adobe no incrementaron significativamente ($p > 0.05$ para las diferencias entre los tratamientos con conidios y sin conidios) la mortalidad de *T. dimidiata*.
- 10.2 El aceite de soya (con conidios o sin ellos) tuvo un poder letal más rápido que la solución acuosa con conidios. El aceite de soya puro, que ha sido utilizado como ingrediente activo de insecticidas, parece incrementar la mortalidad de *T. dimidiata*.
- 10.3 La alta viscosidad del aceite de soya puro, que le impide penetrar en pequeñas grietas, así como los rastros visibles y el olor a rancio que deja sobre los ladrillos de adobe, son algunas de las razones por las que no se recomendaría aplicarlo puro en las viviendas.
- 10.4 La cepa AES.Met.mb fue menos virulenta contra las chinches de tercer estadio de *T. dimidiata* en los bioensayos con ladrillos de adobe, rociados con soluciones de 2×10^7 conidios/ml, que en los bioensayos previos, de inmersión de individuos (de primer y segundo estadio) directamente en soluciones de 1×10^7 conidios/ml.
- 10.5 Las repetidas transferencias del hongo en medios de cultivo pudo haber tenido un efecto negativo en su viabilidad, a pesar de que los medios utilizados contenían 0.5 o 1% de macerado de chinches.
- 10.6 La dosis empleada, de 1×10^6 conidios/cm², a pesar de ser la máxima que se encontró en la literatura en el caso de *M. anisopliae*, no causó 100% de mortalidad. Es posible que la viabilidad haya influido en que la dosis fuera insuficiente; también es posible que la dosis fuera excesiva y ciertos compuestos hayan inducido una auto-inhibición de la germinación.
- 10.7 La baja cantidad de chinches con infección comprobada también puede deberse al uso de atomizadores comunes para la aplicación de los conidios, a la baja humedad del ambiente o simplemente a que la prueba de incubación de las chinches muertas en cámaras húmedas se hizo con una cantidad inadecuada de humedad.
- 10.8 El aceite de soya puro no parece haber protegido lo suficiente a los conidios de la deshidratación para garantizar su virulencia y esporulación en las chinches muertas.

11 RECOMENDACIONES

- 11.1 Asegurarse de que los insectos empleados en este tipo de bioensayo estén sanos, para reducir la probabilidad de muerte por causas ajenas a las de los experimentos.
- 11.2 Probar otros vehículos, tomando en cuenta que en aceite, se eliminan los riesgos asociados a los bioinsecticidas en polvo, como la facilidad de inhalación o de contacto con los ojos, que podrían provocar respuestas alérgicas.
- 11.3 Poner a prueba las presuntas propiedades insecticidas del aceite de soya y su modo de acción como ingrediente activo de insecticidas.
- 11.4 Realizar este tipo de bioensayos con hongos entomopatógenos nativos de *T. dimidiata* y con otras cepas de *M. anisopliae*. Aislar las cepas utilizadas de chinches muertas (para asegurar una mayor virulencia) y hacer pruebas con diversos cultivos monospóricos, para elegir el mejor no solo con base en las características visibles, sino tomando en cuenta su virulencia.
- 11.5 Probar otros métodos de cultivo y almacenamiento del hongo, particularmente los ya reportados como exitosos.
- 11.6 Probar dosis tanto inferiores como superiores a la de 1×10^6 conidios/cm², expresadas en términos de conidios viables/cm².
- 11.7 Probar otras formas de aplicación que permitan una mayor penetración de la solución con conidios en la zona tratada.
- 11.8 Hacer pruebas reproduciendo la temperatura y humedad de las regiones más afectadas por *T. dimidiata*, para encontrar un bioinsecticida que sea eficaz en esas condiciones. En particular, reproducir las condiciones previas a la estación lluviosa.
- 11.9 Realizar la prueba de incubación de las chinches muertas en cámaras húmedas con diferentes grados de humedad, para encontrar la más efectiva. Para evitar que el hongo entomopatógeno muera dentro de la chinche antes de realizar la prueba, esta debe realizarse lo más pronto posible. Además, para evitar que proliferen hongos saprófitos durante dicha prueba, se debe refrigerar cada chinche inmediatamente después de muerta y lavarla cuanto antes.

- 11.10 Hacer este tipo de bioensayo con un mínimo de cinco dosis y un mínimo de cinco réplicas, de tal forma que se cuente con un mínimo de cinco valores de dosis (para calcular LD) o de tiempos (para calcular LT).
- 11.11 Hacer bioensayos con cadáveres en que el hongo entomopatógeno haya esporulado, para ver si su presencia incrementa la mortalidad de las demás chinches.
- 11.12 Es necesario seguir poniendo a prueba la inocuidad de *M. anisopliae*. Se recomienda a los investigadores usar lentes y mascarilla para evitar reacciones alérgicas.
- 11.13 En caso de encontrar una formulación exitosa que pueda aplicarse en las casas infestadas con *T. dimidiata*, debe aplicarse regularmente.

12 REFERENCIAS

- 12.1 Barrientos L. Uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas en campo; comercialización, uso actual y futuro de hongos entomopatógenos. Doc. no publicado.
- 12.2 Chin J, ed. El control de las enfermedades transmisibles. 17 ed. Washington, DC: OPS, 2001. 748p.
- 12.3 Daniel WW. Bioestadística; base para el análisis de las ciencias de la salud. 4 ed. León F, trad. México: Limusa, 2006. xvi+755p.
- 12.4 Dumonteil E, Ruiz-Piña H, Rodríguez-Félix E, Barrera-Pérez M, Ramírez-Sierra MJ, Rabinovich JE, Menu F. Re-infestation of Houses by *Triatoma dimidiata* after Intra-domicile Insecticide Application in the Yucatán Peninsula, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:253-256.
- 12.5 Enríquez E. Aislamiento de hongos entomopatógenos nativos de *T. dimidiata*, principal vector del mal de Chagas en Guatemala. Guatemala: Dirección General de Investigación, USAC. Informe final, 2002. 27p.
- 12.6 Enríquez ME. Evaluación de la virulencia de diferentes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de *Triatoma dimidiata*, principal vector del mal de Chagas en Guatemala. Guatemala: CONCYT, SENACYT, FONACYT y USAC. Doc. Tec. Proyecto FODECYT No. 35 - 01, 2004. 38p.
- 12.7 Enríquez E. Informe de actividades, Control Biológico, Proyecto Chagas-Canadá. Guatemala. Doc. no publicado. 2005. 2p.
- 12.8 EPA. R.E.D. FACTS; Flower and Vegetable Oils. EEUU: EPA. Doc. Tec. (EPA-738-F-93-027), 1993. 4p.
- 12.9 Hashimoto K, Córdón-Rosales C, Trampe R, Kawabata M. Impact of single and multiple residual sprayings of pyrethroid insecticides against *Triatoma dimidiata* (Reduviidae; Triatominae), the principal vector of Chagas disease in Jutiapa, Guatemala. Am. S. Trop. Med. Hyg. 2006;75:226-230.
- 12.10 Hernández Velásquez VM. Efecto del contenido de humedad de conidios formulados de *Metarhizium anisopliae acridum* (Hyphomycete) sobre la viabilidad y producción de exudados de almacenamiento y virulencia sobre *Schistocerca*

- piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae). Tecomán, Col., México: Universidad de Colima (tesis de doctorado en ciencias), 2003. vi + 119p.
- 12.11 Hernández-Velásquez VM, Berlanga-Padilla AM, Barrientos-Lozano L. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* to control the Central American Locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walter) (Orthoptera: Acrididae). J. Orthoptera Res. 2000;9:223-227.
- 12.12 Ibrahim L, Butt TM, Beckett A, Clark SJ. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 1999;7:901-907.
- 12.13 Lecuona RE, Edelstein JD, Berretta MF, La Rossa FR, Arcas JA. Evaluation of *B. bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potential Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. 2001;38:172-179.
- 12.14 Lecuona RE, Rodríguez J, La Rossa FR. Effect of Constant and Cyclical Temperatures on the Mortality of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) Treated with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes). Neotrop. Ent. 2005;34:675-679.
- 12.15 Long Z, Hunter DM. Laboratory and field trials of Green Guard® (*Metarhizium anisopliae* var. *acidum*) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*) (Orthoptera: Acrididae) in China. J. Orthoptera Res. 2005;14:27-30.
- 12.16 Luz C, Fargues J, Romaña C. Influence of starvation and blood meal-induced moult on the susceptibility of nymphs of *Rhodnius prolixus* Stål (Hem., Triatominae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. infection. J. Appl. Ent. 2003;127:153-156.
- 12.17 Luz C, Silva IG, Cordeiro CMT, Tigano MS. Sporulation of *Beauveria bassiana* on Cadavers of *Triatoma infestans* alter Infection at Different Temperatures and Doses of Inoculum. J. I. Pa. 1999a;73:223-225.
- 12.18 Luz C, Silva IG, Magalhaes BP, Cordeiro CMT, Tigano MS. Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary Assays on Formulation and Application in the Field. An. Soc. Entomol. Brasil 1999b;28:101-110.
- 12.19 Luz C, Tigano MS, Silva IG, Cordeiro CMT, Aljanabi SM. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:839-846.

- 12.20 Milner R. Control of Locusts and Grasshoppers; Development of *Metarhizium* as a Mycoinsecticide. Rural Industries Research and Development Corporation. Doc. Tec. (Publication No 00/190), 2000. viii+51p. (p. viii).
- 12.21 Milner RJ, Hunter DM. Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locust and grasshoppers in Australia. *J. Orthoptera Res.* 2001;10:271-276.
- 12.22 Monroy C, Enríquez E. Evaluación de la eficacia de *Telenomus fariai* como control biológico de *T. dimidiata*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Informe final, 1999. 58p.
- 12.23 Nakagawa J, Córdón-Rosales C, Juárez J, Itzep C, Nonami T. Impact of Residual Spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the Department of Zacapa in Guatemala. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:277-281.
- 12.24 Panzera F, Ferrandis I, Ramsey J, Ordóñez R, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, Monroy MC, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE, Angulo VM, Jaramillo N, Córdón-Rosales C, Gómez D, Pérez R. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop. Med. and Internac. Health.* 2006;11:1092-1103.
- 12.25 Payne CC. Pathogens for the control of insects: where next? *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1988;B18:225-248.
- 12.26 Pest Management Regulatory Agency. Proposed Regulatory Decision Document; Soybean Oil. Ottawa: Submission Management and Information Division. Doc. Tec. (PRDD99-02), 1999. 25p.
- 12.27 Pintureau B. Introducción al control biológico contra insectos y ácaros fitófagos. p. 35-43. (En Basso C, Ribeiro A, eds. *Enemigos naturales como reguladores de poblaciones de insectos, Biodiversidad, conservación y manejo.* Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía, Universidad de la República, 2002. XVI+182p.)
- 12.28 Roberts DW, Yendol WG. Use of Fungi for Microbial Control of Insects. p. 125-149. (In Burges HD, Hussey NW, eds. *Microbial control of insects and mites.* London: Academic Press, Inc., 1971. 861p.)
- 12.29 Robertson JL, Preisler HK, Russell RM. PoloPlus; Probit and Logit Analysis; User's Guide. LeOra Software. Doc. digital, 2003. 36p.

- 12.30 Romaña CA, Fargues JF. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992;87:363-368.
- 12.31 Schofield CF. Triatominae; Biología y control. Tims S, trad. USA: Eurocomunica Publications, 1994. 80 p.
- 12.32 Taborsky V. Small-scale processing of microbial pesticides. Roma: FAO Agricultural Services. Boletín No. 96, 1992.
- 12.33 Wraight SP, Jackson MA, de Kock SL. Production, Stabilization and Formulation of Fungal Biocontrol Agents. p. 253 – 281. (In Butt TM, Jackson C, Magan N, eds. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. UK: CAB International. 2001. 398p.)
- 12.34 Zar JH. Biostatistical Analysis. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. xii + 663p.
- 12.35 Zimmermann G. The Entomopathogenic Fungus *M. anisopliae* and its Potential as a Biocontrol Agent. Pestic. Sci. 1993;37:375-379.

ANEXOS

Anexo 1

Cajas de adobe empleadas en una prueba preliminar



Caja cubierta con una plancha de duroport y con cedazo



Vista interna de una de las cajas

Anexo 2

Formulación de las soluciones con conidios de *M. anisopliae*



Balanza electrónica empleada para pesar las esporas



Campana microbiológica utilizada para preparar las soluciones



Uso de mascarilla para evitar la inhalación de las esporas



Vortex empleado durante la preparación de las soluciones

Anexo 3

Procedimiento durante cada réplica del bioensayo realizado



Selección de cuatro grupos de chinchas de tercer estadio



Colocación de las chinchas en cajas con ladrillos de adobe



Aplicación de las soluciones testigo (sin conidios) y con conidios de *M. anisopliae*



Cubrimiento de cada caja con cedazo y tapadera plástica

Anexo 4

Ninfas de *T. dimidiata* infectadas con *M. anisopliae*



Ninfa infectada por el aceite de soya con conidios



Ninfa infectada por la solución acuosa con conidios