

Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales)

Gabriela Hernández-Ramírez¹, Francisco Hernández-Rosas², Hussein Sánchez-Arroyo¹, Raquel Alatorre-Rosas¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Instituto de Fitosanidad, kilómetro 36.5 carretera Méx-Texcoco Montecillo, Apartado 56230. Edo. de México.

²Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, kilómetro 348 Carretera Federal Córdoba-Veracruz, Apartado Postal 94946, Veracruz, México.

Resumen

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ G, ET AL. 2007. Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). ENTOMOTROPICA 22(1): 27-36.

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 (un aislamiento) y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1976 (tres aislamientos) se aplicaron sobre ninfas y adultos de la cucaracha *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) en condiciones de laboratorio (1.1x10⁶ conidia, temperatura 24 ± 2 °C y humedad relativa (HR) 50 ± 10%. Los cuatro aislamientos probados contra ninfas y adultos de *P. americana* mostraron bajo potencial patogénico y porcentajes de mortalidad significativamente diferentes entre los aislamientos probados. Además, se observó menor mortalidad en adultos que en ninfas, en las que se presentaron cambios de conducta por la aplicación de la suspensión conidial. Los dos aislamientos más virulentos fueron seleccionados para ser probados en tres grupos de edades representativas a las etapas de desarrollo de *P. americana*. Como tendencia general se observó que la mortalidad de las cucarachas tratadas se redujo conforme aumentó su edad. Finalmente, un aislamiento de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae* se probaron en adultos de *P. americana* con HR y temperatura controlados (85 ± 10%, 27 °C). Los adultos de la cucaracha americana fueron susceptibles a *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones controladas; a HR alta (85 ± 10%) se observó mayor porcentaje de mortalidad (47%), en comparación con el bioensayo en condiciones ambientales de laboratorio, donde la mortalidad sólo fue de 3%.

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

Abstract

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ G, ET AL. 2007. Infectivity, age and relative humidity related with susceptibility on nymphs and adults of *Periplaneta americana* to *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). ENTOMOTROPICA 22(1): 27-36.

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

Additional key words: American cockroach, entomopathogenic fungus, stage.

Introducción

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

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

Los hongos entomopatógenos son fáciles de propagar y almacenar; estas características los hace atractivos para su uso en formulaciones de micoinsecticidas y podrían emplearse en la regulación de poblaciones de cucarachas. Recientemente, los hongos han recibido atención en programas de manejo de plagas urbanas, porque algunas especies son virulentas para moscas, mosquitos y cucarachas (Pachamuthu

y Kamble 2000). *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) se ha aislado de 200 especies de insectos incluyendo *Blattella germanica* y *P. americana* (Quesada-Moraga et al. 2004).

Kaakeh et al. (1996) reportan que se requieren de 26 a 30 días para causar una mortalidad de 90% de la cucaracha alemana (*B. germanica*) usando *M. anisopliae*. Quesada-Moraga et al. (2004) y Kaakeh et al. (1996) consideran que la mortalidad inicial causada por la aplicación de *M. anisopliae* puede ser seguida por una transmisión horizontal dentro de la población de la plaga, un fenómeno que puede ser favorecido por el comportamiento gregario de las cucarachas. Zukowsky y Bajan (1996) reportan también varios aislamientos de *B. bassiana* como patógenos de la cucaracha alemana, *B. germanica*. (Milner y Pereira, 2000).

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

Materiales y Métodos

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

Cría de insectos. El pie de cría de *P. americana* se obtuvo de la Universidad de Florida, Gainesville,

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

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

E.U.A. y fue mantenido e incrementado en el insectario del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Las colonias se mantuvieron en recipientes de plástico de 1.2 x 0.8 x 0.6 m. A cada recipiente se le suministró agua en un tubo de cristal de 20 cm de longitud x 2 cm de diámetro, tapado con algodón hidrófilo para evitar escurrimientos y formación de mohos. Adicionalmente, en cada recipiente se colocaron nueve cilindros de cartón plisado (20 x 32 cm) para refugio de las cucarachas (Zurek et al. 2002). Para la alimentación de las cucarachas se suministró el producto comercial PROLAB 2500 Rodent Diet®. Los recipientes se cubrieron con tela de organza para proveer una ventilación adecuada y para evitar la fuga de los insectos, se aplicó una mezcla de vaselina-aceite (3:2) en los bordes de cada recipiente. La cría se mantuvo a temperatura de 29±2 °C, HR ≤60% y fotoperíodo de 12:12 h (luz: oscuridad).

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

Inducción y purificación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en *P. americana*. Para mantener o

incrementar la virulencia del hongo, se realizó una inducción de los cuatro aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Cuadro 1) en ninfas y adultos de *P. americana* (Schaerffenberg 1964). Se emplearon dos procedimientos: inmersión e inoculación tópica con una suspensión de esporas en Tween 80 0.01%. Las conidia se obtuvieron de cultivos esporulados a 25 ± 1 °C sobre el medio de cultivo ADS con 15 días de edad. La concentración de la suspensión se calculó con un hemocitómetro o cámara de Neubauer. El primer procedimiento consistió en sumergir 10 insectos de cada grupo de edad (E1, E2 y E3) en una suspensión de 1 x 10⁹ esp/mL. En el segundo procedimiento se hizo una inoculación tópica de una suspensión de 5x10⁹ esp/mL en el pronoto y abdomen (10 µL, en cada uno) en 10 cucarachas de las edades E1, E2 y E3. Posterior a la inoculación, cada insecto se colocó individualmente en una caja Petri, con el fondo cubierto con papel Whatman® No. 9 húmedo y se mantuvo en la cámara de incubación con las condiciones descritas para el desarrollo de las conidia.

La mortalidad se registró cada 24 h. Las cucarachas muertas se esterilizaron con etanol 70% (5 min), hipoclorito de sodio 0.5% (1 min) y lavadas con agua destilada estéril (1 min) (Zurek y Keddie 2000); luego se les colocó individualmente en cámara húmeda para monitorear el desarrollo de la micosis en cada insecto durante un periodo de 15 días. Los insectos muertos se mantuvieron en condiciones ambientales de laboratorio (24 ± 2°C y HR

de $50 \pm 10\%$). De las cucarachas micosadas, se obtuvieron aislamientos puros y éstos se mantuvieron en medio ADS suplementado con 1% de cutícula de cucaracha previamente escarificada y macerada. Para la escarificación se aplicó la técnica seguida por Kingsolver (1970) que permitió remover el tejido graso y muscular. La cutícula escarificada se deshidrató a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 h. Los aislamientos inducidos y cultivados en ADS suplementado se preservaron en tubos de criopreservación con glicerol 10% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; los insectos micosados se conservaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

Patogenicidad y selección de aislamientos infectivos contra *P. americana*. El ensayo se realizó en condiciones de laboratorio ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y HR $50 \pm 10\%$), se emplearon suspensiones de 1.1×10^8 esp/mL en Tween 80 0.01% de aislamientos que habían presentado un porcentaje de germinación a las 24 horas de 99, 97, 95 y 92% para Bb 88, *Ma* (Destruxin), *Ma* (Saligreen) y *Ma* var. *acridum*, respectivamente. Las cucarachas se inmovilizaron previamente a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (E1, 2.5 min; E2, 7.5 min; E3, 9 min). Se inocularon 10 ejemplares de *P. americana* de cada grupo de edad por tratamiento, con 10 μL de la suspensión de esporas (1.1×10^8) entre las coxas posteriores de

cada uno (Quesada-Moraga et al. 2004).

Después de la aplicación, los insectos se colocaron en cajas de cristal ($0.2 \times 0.2 \times 0.3$ m) y se mantuvieron en las mismas condiciones que el pie de cría. En el testigo, las cucarachas sólo se inocularon con 10 μL de solución de Tween 80 0.01%. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento, incluyendo al testigo, se cuantificó la mortalidad cada 24 h durante 15 días. Las cucarachas muertas se colocaron en cámara húmeda, hasta observar la esporulación de los hongos. Los datos de mortalidad acumulada durante los 15 días de la prueba se transformaron ($\arcseno\sqrt{\text{porcentaje}}$), sometidos a la prueba de normalidad y homogeneidad de Bartlett y se analizaron mediante un diseño completamente al azar. La selección de los hongos se basó en la información obtenida del PROC ANOVA en SAS para Windows 8.01 (SAS Institute 2000) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en diferentes estados de desarrollo de *P. americana* y HR ambiental. Destruxin-Ma y Bb 88 se probaron sobre las etapas de desarrollo de *P. americana* E1, E2 y E3. Para ello, se utilizaron los aislamientos inducidos con las cucarachas, se propagaron en ADS y se incubaron 15 días a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las esporas se colectaron y utilizaron para preparar una suspensión en Tween 80 0.01% con una concentración de 1.1×10^8 esp/mL. El porcentaje de germinación a las 24 h fue de 96% para ambos hongos. La prueba consistió en aplicar una dosis de 1.1×10^6 esp/cucaracha, 10 μL de la suspensión tópicamente entre las coxas posteriores a 20 insectos por bloque de edad; las cucarachas previamente se inmovilizaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, como se describió en el bioensayo de selección. En el testigo, los insectos se inocularon con 10 μL de una solución de Tween 80 0.01%. Todos los tratamientos del experimento tuvieron tres repeticiones. Después de la aplicación, los insectos se colocaron en cajas de cristal ($0.2 \times 0.2 \times 0.3$ m) con alimento, agua y refugio en

condiciones de 26 ± 2 °C y HR $50 \pm 10\%$. Se registró la mortalidad cada 24 h durante 15 días. Los porcentajes de mortalidad se normalizaron con la transformación $\sqrt{\text{porcentaje}}$ y se analizaron con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3 (aislamiento-edad). Las combinaciones tratamiento-edad y comparación de la patogenicidad de los dos hongos se analizaron con PROC ANOVA y las comparaciones de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) en SAS para Windows 8.01 (SAS Institute, 2000).

Patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos de *P. americana* en condiciones controladas de HR. Debido a que en la prueba con HR baja ($\geq 55\%$) los adultos presentaron baja mortalidad, se realizó una prueba para comparar la patogenicidad de Bb88 (*B. bassiana*) y Destruxin (*M. anisopliae*) en condiciones de alta humedad (HR $85 \pm 10\%$). Los porcentajes de germinación fueron de 97% y 99% para Destruxin y Bb 88, respectivamente. Para su manipulación, las cucarachas se inmovilizaron en frío a -20 °C durante 9 min. En medio del tercer par de coxas de 100 cucarachas adultas de *P. americana* (hembras y machos de un mes aproximadamente) se aplicaron 10 μL de una suspensión de 5×10^8 esp/mL). Después de la aplicación, los insectos se colocaron en cajas de cristal (0.2 x 0.2 x 0.3 m) con alimento, agua y refugio. Cada caja se incubó en una cámara con condiciones controladas de 27 °C y HR $85 \pm 10\%$. La HR se registró con un datalogger HOB0®, que se calibró para tomar lecturas cada hora. El registro de mortalidad se hizo cada 24 h durante 15 días. Todo el experimento se repitió 3 veces. El análisis se realizó con un diseño completamente al azar, de igual manera que para el bioensayo de selección.

Resultados

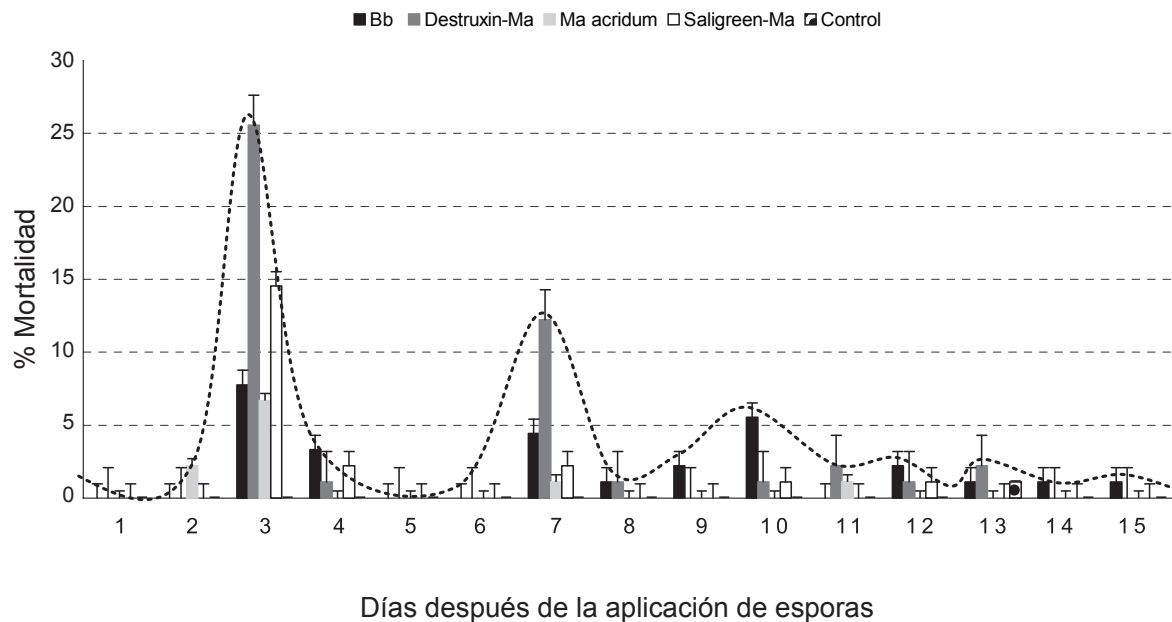
Inducción y purificación. De los insectos sumergidos en la suspensión de esporas (1×10^9 esp/mL) de los cuatro aislamientos,

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

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

Patogenicidad y selección del aislamiento infectivo contra *P. americana*. Los cuatro aislamientos probados fueron infectivos para *P. americana*, con efectos que se observaron a partir de las 48 h de la inoculación. Después de la aplicación, las cucarachas mostraron disminución en la movilidad y alimentación; en algunos tratamientos con *M. anisopliae* las cucarachas mantuvieron conducta agresiva y golpeteo contra las paredes de los recipientes de cristal, así como canibalismo contra las cucarachas muertas e incluso con las que presentaban síntomas de enfermedad. El mayor porcentaje de mortalidad se registró a las 72 h posteriores a la inoculación; sin embargo, la

Figura 1. Mortalidad diaria de *P. americana* con *M. anisopliae* y *B. bassiana* inoculados de manera tópica (1.1×10^6 esp/cucaracha).



mortalidad disminuyó en el transcurso de los 15 días de observación (Figura 1). Esto puede estar relacionado con la susceptibilidad de cada cucaracha a la infección causada por los hongos entomopatógenos o con la pérdida de viabilidad de los hongos a lo largo del tiempo.

Los aislamientos que produjeron mayor porcentaje de mortalidad fueron *B. bassiana*, con $30.0 \pm 3.81\%$, y Destruxin (*M. anisopliae*), con $46.66 \pm 8.03\%$, la mortalidad fue significativamente diferente de la del testigo, pero no entre ellos (Figura 2). Entre 50 y 70% de las ninfas muertas de *P. americana* presentaron micosis generalizada y mayor esporulación, mientras que en los adultos el desarrollo de la micosis fue menor y se observó la presencia de bacterias en la parte abdominal. Los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey permitieron seleccionar los aislamientos de Bb 88 y Destruxin como los mejores candidatos para subsecuentes experimentos con la cucaracha americana (Figura 2).

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

HR ambiental. Al comparar la susceptibilidad de los grupos de edad E1, E2 y E3 de *P. americana* expuestos a Bb 88 y Ma- Destruxin, se observaron diferencias significativas entre adultos y ninfas, pero no hubo diferencias significativas entre los dos aislamientos probados. En la interacción aislamiento-edad, las combinaciones de Bb 88 y Destruxin con los grupos de edad E1 y E2 no mostraron diferencias estadísticas entre ellas, pero sí con E3 y en la interacción de las tres edades con el testigo. Estos resultados sugieren que la mortalidad puede compararse por grupos de edades dentro de un mismo aislamiento, por las diferencias significativas observadas en la combinación edad-aislamiento (Figura 3). En la misma figura se aprecia una disminución de la mortalidad, conforme la edad de las cucarachas aumenta. El grupo de las ninfas (E1) presentó el mayor porcentaje de mortalidad, donde los insectos micosados permanecieron libres de bacterias y del crecimiento de otros hongos contaminantes saprófitos, como *Aspergillus* sp. (Micheli, Link 1809), *Penicillium* sp. (Link 1809) y *Mucor* sp. (Micheli, Saint-Amans 1821), que

estuvieron presentes en algunas ninfas muertas del grupo E2.

Patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos de *P. americana* en condiciones controladas de HR. Los resultados del experimento con HR controlada permiten confirmar la influencia de la HR sobre la patogenicidad de los hongos, ya que una HR de $85 \pm 10\%$ indujo mortalidades hasta de 54% (Figura 4), donde no hubo diferencias significativas entre los dos aislamientos probados; en contraste, en la prueba realizada con HR $50 \pm 10\%$ la mortalidad alcanzó sólo 3%. Sin embargo, a pesar de que las cucarachas esporularon a humedades mayores de 95%, el alimento de las cucarachas empezó a ablandarse, lo que provocó presencia de contaminantes (hongos saprófitos y bacterias) sobre el cuerpo de las cucarachas muertas.

Discusión

El presente estudio permitió confirmar la relación de la edad, la HR y la patogenicidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre ninfas y adultos de *P. americana*. Los resultados de este estudio corroboran investigaciones similares sobre los factores involucrados en el desarrollo de los hongos entomopatógenos. Se observó que no es necesario un periodo de exposición en alta humedad para que la infección pueda ocurrir. Ramoska, (1984) mencionó que la HR es el factor predominante que influye en la eficacia de *B. bassiana* contra la chinche *Blissus leucopterus* (Say 1832) y concluyó que los hongos entomopatógenos no pueden ser un agente de control eficaz estando en ambientes secos. Sin embargo, Ferron (1977) reportó que humedades relativas tan bajas como 51% permitieron la infección de larvas del escarabajo *Scolytus scolytus* (Fabricius 1793). Por lo anterior, Ramoska, (1984) sugiere que la HR atmosférica y la HR microambiental que provee el integumento del insecto pueden influir de diferente manera en el desarrollo de la infección. La conidiogénesis requiere humedades mayores

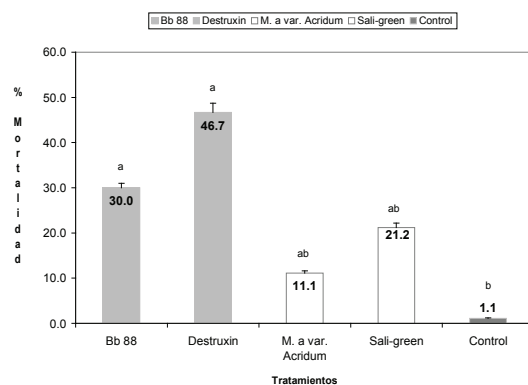


Figura 2. Mortalidad acumulada (a los 15 días) de *P. americana* tratadas con *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

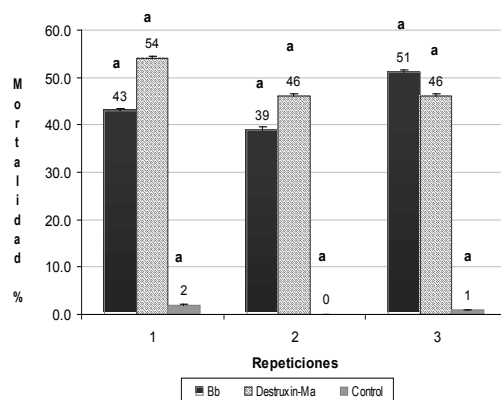


Figura 3. Mortalidad Aislamiento-Edad en cucarachas de las edades E1, E2 y E3 infectadas con Bb 88 y Destruxin-Ma con la dosis de 1.1×10^6 esp/cucaracha. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

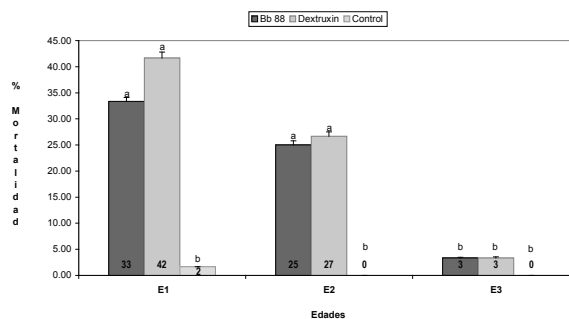


Figura 4. Mortalidad acumulada (15 días) en adultos de *P. americana* probada en condiciones controladas de $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y HR ($85 \pm 10\%$), inoculados de manera tópica la dosis de 5×10^6 esp/cucaracha con *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Letras iguales indican no diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

de 70% (Schaerffenberg, (1964); sin embargo, la esporulación sobre las cucarachas muertas fue independiente de las fluctuaciones de HR, en tanto que el cuerpo de las cucarachas no se desecó; esto se manifiesta en las ninfas E2, las cuales presentan mayor masa corporal que las de la E1 y que esta característica influyó en una mayor conidiogénesis (70 - 90%), comparada a la observada en las ninfas de E1 (40 - 60%). Este suceso podría contribuir a la transmisión horizontal y diseminación de la infección causada por los hongos entomopatógenos probados.

Luz et al. (1998) compararon la patogenicidad de aislamientos *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra *Triatoma infestans* (Klug, 1834) en dos condiciones de HR, cercana a la saturación y 50%; el método de aplicación fue la inmersión de los insectos en una suspensión de 108 esporas/mL, durante 6 s. Sus resultados muestran que en baja HR (50%) la virulencia fue significativamente menor a los 15 días posteriores a la aplicación, variando del 17.5% a 97.5%, entre las dos condiciones que ellos probaron. En el presente estudio se registró infectividad de los hongos entomopatógenos probados a HR baja (50%) y humedades relativas mayores que al 70% sobre adultos de *P. americana* por lo que se sugiere que los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* pueden proveer un nivel aceptable de control contra adultos de *P. americana* en su ambiente natural (climas tropicales con $HR \geq 60\%$). La mortalidad expresada en las cucarachas tratadas confirma la patogenicidad de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre ninfas y adultos de *P. americana*, aun cuando el ambiente no contaba con condiciones de alta humedad ($HR 50 \pm 10\%$). La infección pudo favorecerse por el microhábitat provisto por la humedad del cuerpo de las cucarachas después de la inoculación, lo que permitió la germinación de las esporas y la invasión de la cutícula (Doberski, 1981).

La edad se ha considerado como uno de los factores que determinan la mortalidad, por lo que Boucias y Pendland (1984) reportaron que existe una edad de maduración de la respuesta inmune. Debido a esto, los primeros instares de desarrollo de los insectos son mayormente afectados por las infecciones causadas por los entomopatógenos. Mohan et al. (1999) reportaron diferencias de virulencia entre aislamientos de *B. bassiana* sobre dos edades de *P. americana* y mortalidad a los tres días de inoculados por aspersión, inmersión y de manera tópica, en condiciones de $HR > 90\%$ y $25 \pm 1^\circ C$. Fransen et al. (1987) probaron la infectividad de *Aschersonia aleyrodinis* (Webber, 1897) en diferentes estados de desarrollo de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) y aplicaron por aspersión una suspensión de esporas (4×10^6 esp/mL) en condiciones controladas de HR(70%) y temperatura ($20^\circ C$), observaron, que la infección causada por *A. aleyrodinis* disminuyó al incrementar la edad de las moscas blancas. Este suceso es visto como un fenómeno general del retraso de la mortalidad en las edades maduras y que puede estar asociado con las interacciones entre el integumento del insecto invadido por el hongo y el proceso de muda del hospedante que ocurre en los estadios ninfales. (Vandenberg et al. 1998).

Vandenberg et al. (1998) también concluyen que algunos insectos emplean el cambio de muda como un mecanismo de defensa, lo que conduce a la pérdida del inóculo mediante la exuvia y fallas en el subsecuente desarrollo de la enfermedad. El constante acicalamiento de las cucarachas adultas observado durante el desarrollo de esta investigación, también pudo remover las esporas de sus cuerpos y así protegerse de alguna manera contra la infección (Roberts y Humber, 1984; Fransen et al. 1987). Con estos resultados se puede inferir que la edad del hospedante puede ser un factor restrictivo para el progreso de la enfermedad causada por los hongos contra *P. americana*. Romaña y Fargues (1992) sugieren

que la edad, generalmente, se considera como un factor de alta variabilidad en los valores de tiempo letal (TL), similar a lo observado en los datos de mortalidad, esto sugiere que cada TL puede compararse entre grupos de edad.

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

En los tres estados de desarrollo probados se observa la tendencia de disminución en la mortalidad al aumentar la edad de las cucarachas. Por otra parte, la capacidad del hongo para infectar a un insecto puede estar influenciada por el estado fisiológico del hospedante, ya que muchos hongos pueden infectar específicamente a un estado particular de desarrollo, y se sabe que la cutícula posee sustancias de inactivación desfavorables para los hongos (Boucias y Pendland 1984). Maniania y Odulaja (1998) determinaron que la edad del hospedante tiene un efecto pronunciado sobre la susceptibilidad a la infección causada por Hyphomycetes y concluyen que en la interacción hospedante-patógeno se encuentran los mecanismos para entender los factores involucrados durante el inicio y desarrollo de la enfermedad.

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

como agente de control biológico para la regulación de poblaciones de *P. americana*.

Referencias

- ANDIS M. 1994. The Bio-Path cockroach control chamber uses nature to control nature's pests. *Pest Control*. 62(7):44-48.
- ATKINSON TH, KOEHLER PG, AND PATTERSON RS. 1991. Catalog and Atlas of the Cockroaches (Dictyoptera) of North America north of Mexico. *Miscellaneous Entomol. Soc. Am.* 78: 1-86
- BOUCIAS DG, PENDLAND JC. 1984. Host recognition and Specificity of Entomopathogenic Fungi. In: Roberts D. and Aist, J. (eds.) *Infection Process of Fungi*. The Rockefeller Foundation. USA. pp.185-196.
- BRENNER R J. 2002. Cockroaches (Blattaria). In: Mullen, G. and Durden, L. (ed.), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, China. pp. 29-43.
- DOVERSKI JW. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus* to Larvae and Adults of *S. scolytus*. *J Inverteb Pathol* 37:188-194.
- FRANSEN JJ, WINKELMAN K, VAN LENTEREN JC. 1987. The differential mortality at various Life Stages of the Greenhouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) by Infection with the Fungus *Ashersonia aleyrodii* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *J Inverteb Pathol* 50:158-165.
- FERRON P. 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (fungi imperfecta Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides octectus* (Col: Bruchidae). *Entomophaga* 2:393-396.
- FUXA RJ, TANADA Y. 1987. The pathogen population. En: R.J. Fuxa y Y. Tanada (eds.), *Epizootiology of Insects Diseases*. JohnWiley & Sons, New Cork., NY. pp 113-157.
- KAAKEH W, REID BL, BOHNERT TJ, BENNETT GW. 1996. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (imperfect fungus Hyphomycetes) and hydramethylnon among German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae). *J Entomol Sci* 31: 378-390.
- KINGSLOVER JM. 1970. A study of male genitalia in Bruchidae (Coleoptera). *Proc Entomol Soc Washington* 72: 370-386.
- MANIANIA NK, ODULAJA A. 1998. Effect of species, age, and sex of tsetse on response to infection by *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol* 43:311-323.
- MILNER RJ, PEREIRA RM. 2000. Microbial Control of urban pests – cockroaches, ants and termites. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers. pp. 721-740.

- MILLER DM, KOEHLER PG. 2003. Least Toxic Methods of Cockroach Control In: Series of the Entomology and Nematology ENY-258. Department, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- MOHAN MC, LAKSHMI AK, DEVI KU. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Sci Technol* 9(1):29-33.
- PACHAMUTHU P, KAMBLE ST. 2000. In vivo study on Combined Toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with Sublethal Doses of Chlorpirifos, Propetamphof and Cyflutrin Against German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 93(1): 60-70.
- QUESADA-MORAGA E, QUIRÓS RS, GARCÍA PV, ÁLVAREZ CS. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J Inverteb Pathol* 87:51-58.
- RAMOSKA WA. 1984. The Influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the Chinch Bug, *Blissus leucopterus*. *J. Inverteb. Pathol.* 43:389-394.
- ROBERTS D, HUMBER R. 1984. Entomopathogenic Fungi In: Roberts D. and Aist, J. (Eds.) *Infection Processes of Fungi*; A Bellagio Conference March 21-25 1983. The Rockefeller Foundation N. Y., USA. pp.1-12.
- ROMAÑA CA, FARGUES JF. 1992. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the Entomopathogenic Hyphomycete *Beauveria bassiana*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87:363-368.
- SCHAERFFENBERG B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *J. Insect Pathol.* 6: 8-20.
- SCHAL C, HAMILTON RL. 1990. Integrated suppression of synanthropic cockroaches. *Ann. Rev. Entomol.* 35:521-551
- SAS INSTITUTE. 2000. SAS User's Guide, Version 8.02. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- SUITER DR, AND HINKLE NC. 1997. Biological suppression of synanthropic cockroaches. *J Agric Entomol* 14(3): 259-270.
- VANDEBERG JD, RAMOS M, ALTRE AJ. 1998 Dose-Response and Age-temperature-related susceptibility of the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). *J Environ Entomol* 27: 1017-1021.
- ZUKOWSKI K, BAJAN C. 1996. Studies of the usefulness of *Beauveria bassiana* for eradication of cockroaches (*Blattella germanica* L.) *Rocz Panstw Zakl Hig* 47:343-349.
- ZUREK L, KEDDIE BA. 2000. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a promising microbial control agent of the Satin Moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Biocontr Sci Technol* 10: 641-644.
- ZUREK L, WATSON DW, SCHAL C. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hypomycetes) and boric acid against the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Biol Contr* 23: 296-302.