

Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos

Dalmiro Cazorla* & Pedro Morales Moreno

Como parte de un proyecto global para seleccionar los mejores patotipos fúngicos a ser implementados en futuros programas de Manejo Integrado de Plagas de Triatominae, se evaluó la compatibilidad "in vitro" de formulaciones de 13 aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con insecticidas químicos organofosforados (Malatión, fenitrotión) y piretroides (cipermetrina, deltametrina). Los aislamientos fúngicos se ensayaron a 1×10^7 conidias/mL y los insecticidas a dos concentraciones. La evaluación de la compatibilidad se hizo mediante prueba de germinación conidial en medio sólido (Sabouraud), que se observó a las 24 horas. Las formulaciones ensayadas afectaron significativamente ($P < 0,0000$) la germinación conidial, aunque de una manera diferencial dependiendo del aislamiento fúngico, el insecticida y la dosis. El porcentaje promedio de germinación fue afectado en $>90\%$, especialmente a las dosis recomendadas, en todos los aislamientos, con respecto al testigo (control). La cipermetrina manifestó a ambas dosis un comportamiento francamente esporocida sobre todos los 13 aislamientos, y la deltametrina la mayor compatibilidad, particularmente a la mitad de la dosis recomendada.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, insecticidas, compatibilidad, hongo entomopatógeno, Manejo Integrado de Plagas.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas representa un grave problema de salud con altos índices de mortalidad, millones de personas a riesgo de adquirir la protozoosis o infectadas, y una elevada pérdida anual de años de vida ajustada por discapacidad (AVAD) (OMS, 2007).

La transmisión de la protozoosis a los humanos se realiza usualmente por los triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae). El uso de insecticidas residuales de origen químico es la medida más práctica y rápida para interrumpir la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, siendo la aplicación de los

plaguicidas dentro de las viviendas el método más tradicional (Zerba, 2004; OMS, 2007). El combate químico de los triatomíneos comenzó con el uso de los organoclorados (Dieldrín, HCH) en las décadas 50-60 del siglo XX, y continuó con la aplicación de organofosforados (Fenitrotión, Malatión) en la década de 1970. Desde 1980-90, se sustituyeron éstos casi exclusivamente por piretroides, lo que permitió bajar las dosis de uso entre 10 y 20 veces; en la actualidad, preferentemente se utilizan piretroides sintéticos de tercera generación (cianopiretroides) con base acuosa y de aplicación foable, incluyendo deltametrina, beta-cipermetrina, beta-ciflutrina y lambda-cihalotrina (Zerba, 2004; OMS, 2007). La ocurrencia de epizootias en las zonas endémicas chagásicas después de la aplicación de los rociamientos de los insecticidas químicos, indujo a pensar en la posibilidad de utilizar estos productos dentro de un protocolo o filosofía de trabajo de Manejo Integrado de Plagas (MIP), de manera tal que al aplicarse en subdosis o dosis bajas los insectos se estresen y se tornen más susceptibles hacia los microorganismos patógenos, tales como los

Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (L.E.P.A.M.E.T.), Centro de Investigaciones Biomédicas (C.I.B.), Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" (UNEFM), Apdo. 7403, Coro 4101, Estado Falcón, Venezuela.

* Autor de correspondencia: lutzomyia@hotmail.com

hongos entomopatógenos (e.g., *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*), los cuales han mostrado ser una alternativa potencial para el control biorracional de los vectores de la tripanosomiasis americana, especialmente hacia aquellas especies triatominas de hábitos peridomésticos y selváticos, donde los insecticidas de origen químico resultan ecológicamente inviables o han resultado poco efectivos o impráctico en el control de las poblaciones de éstos (Alzogaray *et al.*, 1998; Luz *et al.*, 2004). Además, esta asociación entre los biopesticidas y los agentes químicos selectivos, permite la reducción de las cantidades de los insecticidas aplicados, así como también de los efectos adversos para la salud humana y animal y al medio ambiente en general, y de la aparición de poblaciones de insectos resistentes (Bajan *et al.*, 1995; Alzogaray *et al.*, 1998; Tavares, 2002). Por ello, una de las variables que se debe determinar cuando un producto biológico como el caso de los hongos entomopatógenos, es evaluado bajo condiciones de campo es su interacción con los insecticidas de origen químico. Estudio éste que se hace necesario, toda vez que se ha demostrado que este tipo de insecticidas pueden afectar la capacidad de los hongos entomopatógenos para ocasionar epizootias naturales, ya sea de una manera antagónica o sinérgica (Lecuona & Díaz, 1996; Alzogaray *et al.*, 1998).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar "*in vitro*" el efecto de varios insecticidas de origen químico, incluyendo dos organofosforados (malatión y fenitrotión) y dos piretroides (deltametrina y cipermetrina), sobre la germinación de 13 aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, los cuales han demostrado ser, especialmente en formulaciones aceitosas, altamente virulentos contra *Rhodnius prolixus*, principal vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela (OMS, 2007), alcanzando % de mortalidad y TL_{50} entre 73-100% y 3-7 días, respectivamente, con % de conidiación de cadáveres >90% (Cazorla *et al.*, 2005; Cazorla, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos fúngicos

Los ensayos se hicieron con 13 aislamientos de *B. bassiana*, de la micoteca del Laboratorio de Fitopatología (LF), Núcleo Universitario "Rafael Rangel" (NURR), Universidad de Los Andes (ULA), Trujillo, Estado Trujillo, Venezuela, cuya indexación y procedencia se muestran en la Tabla I.

Cultivo y mantenimiento de los aislamientos

La siembra de los hongos se llevó a cabo sobre placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo medio sólido Sabouraud-agar, a las cuales se les esparció, por rastrilleo con aguja de platino, 200 µL de suspensión fúngica ajustada, mediante hemocitómetro, a 1×10^7 conidias/mL (Goettel & Inglis, 1997). Las conidias se obtuvieron removiendo, mediante asa de platino, la superficie de cultivos esporulados de 15 días crecidos sobre medio sólido (Sabouraud), y mantenidos a temperatura 26°C y humedad relativa (HR) >90% en cámara de ambientación o climatizada. El material fúngico cosechado se suspendió en agua destilada estéril, y se filtró a través de gasa para separar el micelio de las conidias, las cuales se emplearon para el mantenimiento de los aislamientos y/o los bioensayos. La suspensión de conidias se utilizó inmediatamente.

Insecticidas

En estos bioensayos se utilizaron insecticidas químicos grado técnico empleados comúnmente en Venezuela, especialmente por la Dirección de Malariología del Ministerio de Salud, y otros países para el control de artrópodos plagas, incluyendo los triatominos (Tabla II). Los mismos fueron gentilmente suministrados por el Dr. R. Geraldo, Jefe de Endemias Rurales, Coro, estado Falcón, Venezuela.

Ensayos de germinación

En esta experiencia, al medio sólido Sabouraud se le adicionó cada insecticida independientemente, utilizándose como testigo (control) un cultivo sin plaguicida químico. Se realizaron dos experimentos. En el primero, se observó la influencia del tipo de insecticida sobre la capacidad de germinación de los aislamientos fúngicos, ensayándose los mismos a dosis sugerida o recomendada por la casa comercial fabricante de los agentes químicos o los organismos nacionales e internacionales de Salud Pública o que se emplean usualmente. En un segundo experimento, se evaluó el efecto de la dosis, comparándose la recomendada y la mitad de la misma (Tabla II). Una vez sembradas las conidias sobre las placas de Petri conteniendo medio Sabouraud, se incubaron por 24 horas a 26°C en cámara de ambientación, bajo condiciones de saturación de humedad relativa (HR) (>90%). Una vez concluido el periodo de incubación, se agregó azul de lactofenol en 5 áreas selectas de aproximadamente 2 cm² (1 cada

Tabla I. Indexación y procedencia de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Aislamiento	Hospedador	Lugar de origen	Año de Aislamiento
LF-01	<i>Rhodnius prolixus</i> (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)	Monay (Municipio Pampán), Trujillo, Venezuela	2002
LF-02	<i>Heliotaurus</i> sp. (COLEOPTERA: ALLECULIDAE)	Monay (Municipio Pampán), Trujillo, Venezuela	1993
LF-03	<i>Hypothenemus hampei</i> (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)	Cuicas (Municipio Candelaria), Trujillo, Venezuela	2002
LF-04	<i>H. hampei</i>	Cuicas (Municipio Candelaria), Trujillo, Venezuela	2002
LF06	Cucaracha no identificada (ORTHOPTERA: BLATTIDAE)	Monay (Municipio Trujillo), Trujillo, Venezuela	1998
LF-07	Triatomino sin identificar	Trujillo (Municipio Trujillo), Trujillo, Venezuela	2002
LF-08	<i>H. hampei</i>	San Cristóbal, estado Táchira, Venezuela	2001
LF-09	<i>H. hampei</i>	El Corozo (Municipio Trujillo), Trujillo, Venezuela	2002
LF-10	<i>H. hampei</i>	Villita (Municipio Trujillo), Trujillo, Venezuela	2002
LF-11	<i>H. hampei</i>	Mitón (Municipio Candelaria), Trujillo, Venezuela	2000
LF-12	<i>Premnotrypes vorax</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)	Tuñame (Municipio Urdaneta), Trujillo, Venezuela	2000
LF-13	<i>H. hampei</i>	Mitón (Municipio Candelaria), Trujillo, Venezuela	2000
LF-14	Escarabajo sin identificar (COLEOPTERA)	Monay (Municipio Pampán), Trujillo, Venezuela	1992

Tabla II. Principios activos y dosis de los insecticidas utilizados sobre 13 aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Principio activo (Grupo químico)	Nombre y casa comerciales/Permiso sanitario	Dosis (%)
Malatión 81,5% (órganofosforado)	Malathion 94ULV® Insecticidas Internacionales C.A. (INICA), Cagua, estado Aragua, Venezuela / MAT No. Sp-II-0948	1,25* 0,625**
Fenitrotión 45,80% (órganofosforado)	Fenothion 50UBV® INICA / MAT No. Sp-II-0856	0,125* 0,0625**
Deltametrina 2,5% (piretroide sintético)	Deltrac. CE® TRACKER Agroindustrial C.A., Santa Cruz de Aragua, estado Aragua, Venezuela MAT No. Sp-III-05995	0,125* 0,0625**
Cipermetrina 26,31% (piretroide sintético)	Demon TC® INICA / MAT No. Sp-II-0641/02/06/97	1,33* 0,665**

* = dosis recomendada; ** = mitad de dosis recomendada.

esquina y 1 central) para detener la germinación y dar contraste a las conidias. Se hicieron cortes del cultivo y se colocaron sobre lámina portaobjetos y cubiertos con laminilla cubreobjeto. Se realizó un diseño factorial completamente al azar con 3 repeticiones por aislamiento y dosis, contabilizándose 1000 conidias por cada repetición y 3000 por cada aislamiento/dosis. Las conidias se consideraron germinadas cuando tenían un tubo germinativo igual o superior a su diámetro.

Análisis estadístico

Como los porcentajes tienden a tener una distribución binomial en vez de una normal, antes de realizar los análisis a los datos (% de germinación) se les aplicó una transformación angular o arcoseno (Sen^{-1} raíz de X), de manera tal de homogenizar las varianzas (Steel & Torrie, 1989). Se utilizó un diseño completamente al azar. Los factores o tratamientos se dispusieron en un arreglo factorial (factores: aislamiento, dosis), siendo considerada la germinación como variable dependiente. La significancia estadística de las diferencias entre las medias de los porcentajes de germinación de los diferentes ensayos, se calculó mediante las pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías y de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (SNK). Se consideró como estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $P \leq 0,05$. Los datos se analizaron mediante paquete estadístico MINITAB versión 13.20 (MiniTab Inc., 2000).

RESULTADOS

El análisis de los resultados del primer experimento reveló que los insecticidas afectan significativamente ($F= 378,11$; $g.l.=3$; $P < 0,0000$) la germinación "*in vitro*" de los 13 aislamientos ensayados, los cuales similarmente muestran un comportamiento diferencial significativo ($F= 5,20$; $g.l.=12$; $P < 0,0000$). El insecticida cipermetrina manifestó un comportamiento esporocida sobre todos los 13 aislamientos. El porcentaje promedio de germinación fue afectado en $>90\%$, especialmente a las dosis recomendadas, en todos los aislamientos, con respecto al testigo (control), por malatión (92,8-99,9%) y fenitrotión (93,6- 100%), y en $>80\%$ (83,2-100%) por deltametrina (Tabla III). Cuando se analiza el efecto dosis, de una manera global se observa una disminución significativa ($F= 128,88$; $g.l.=1$; $P < 0,0000$) sobre la germinación conidial. Sin embargo,

este efecto fue diferencial cuando se analizan tipos de insecticidas y aislamientos fúngicos ($F= 4,76$; $g.l.=12$; $p < 0,0000$). Así, estas diferencias resultaron significativas en Malatión para 7 aislamientos (LF02, LF04, LF06, LF07 LF08, LF09 y LF12) con porcentajes promedios de reducción en algunos casos de más del 65% con la dosis recomendada; en Fenitrotión no significativas para 5 aislamientos (LF06, LF11, LF12, LF13 y LF14), con diferencias en los porcentajes promedios de reducción en algunos casos de más del 90%; y para Deltametrina sólo en el aislamiento LF11 no se observaron diferencias significativas, donde a ambas dosis el efecto fue francamente esporocida. En Cipermetrina a ambas dosis se detectó un efecto visiblemente esporocida en todos los aislamientos (Tabla III).

DISCUSIÓN

Cuando se analiza el efecto de los organofosforados, particularmente a la dosis recomendada, se tiene que el malatión y el fenitrotión inhibieron la germinación de las conidias de casi todos los aislamientos de *B. bassiana* ensayados, y a la mitad de la recomendada, con la excepción de pocos aislamientos, similarmente fue altamente tóxico para el hifomiceto, aunque este efecto fue menos pronunciado con el fenitrotión, que tendió a ser menos esporocida, "*i.e.*", más compatible. Cuando se compara estos resultados con los reportados por otros investigadores, de una vez resaltan los contrastes. En este sentido Ramarajah *et al.* (1967) encontraron que el malatión estimula la germinación de *B. bassiana*, mientras que Rivera (1993) y Rivera *et al.* (1994) demostraron que la aplicación del malatión y el fenitrotión tuvieron un efecto fungistático sobre esta especie de hongo entomopatógeno, el cual aumenta con el tiempo, y Mohamed *et al.* (1987) y Tamai *et al.* (2002) detectaron que el malatión y el fenitrotión son altamente tóxicos para la esporulación y crecimiento de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana*, respectivamente.

Es bien conocido que los organofosforados actúan en los insectos mediante la inhibición de la acetil-colina esterasa (Villate *et al.*, 1998), la cual no se detecta en los hongos; sin embargo, cabe la posibilidad de que estos compuestos químicos se encuentren inhibiendo a otras enzimas de tipo esterasa de los aislamientos fúngicos, las cuales se han detectado en *B. bassiana* y otros hongos entomopatógenos (Estrada *et al.*, 1997; Estrada, 2006).

Tabla III. Porcentaje de germinación relativo de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* sometidos a varios insecticidas y dosis, y mantenidos 26°C y HR >90%.

$\bar{X}^*$ (%) DE GERMINACIÓN $\pm$ D.S.														
INSECTICIDA (DOSIS: %)	LF01	LF02	LF03	LF04	LF06	LF07	LF08	LF09	LF10	LF11	LF12	LF13	LF14	
Control	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	100 $\pm$ 0,0 ^{A,a}	
Malatión 0,625++	0,3 $\pm$ 0,4 ^{A,b}	13,1 $\pm$ 9,9 ^{B,b}	2,3 $\pm$ 0,4 ^{A,b}	28,6 $\pm$ 41 ^{C,b}	67,8 $\pm$ 53 ^{D,e}	4,5 $\pm$ 1,3 ^{A,b}	22,7 $\pm$ 11,8 ^{E,b}	11,6 $\pm$ 2,8 ^{B,b}	2,1 $\pm$ 1,4 ^{A,b}	2,9 $\pm$ 2,4 ^{A,b}	34,6 $\pm$ 6,1 ^{C,b}	1,2 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	2,3 $\pm$ 1,9 ^{A,b}	
1,25+	0,1 $\pm$ 0,2 ^{A,b}	0,2 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	0,1 $\pm$ 0,3 ^{A,b}	7,2 $\pm$ 8,2 ^{B,c}	0,1 $\pm$ 0,2 ^{A,b}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{A,b}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{A,b}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	0,1 $\pm$ 0,2 ^{A,b}	0,2 $\pm$ 0,3 ^{A,b}	
Fenitrotión 0,0625++	23 $\pm$ 17 ^{A,c}	10,0 $\pm$ 5 ^{B,b}	25,0 $\pm$ 9 ^{A,c}	42,5 $\pm$ 4 ^{C,d}	4,3 $\pm$ 1,8 ^{D,c}	11,4 $\pm$ 9,7 ^{B,d}	14,1 $\pm$ 1,1 ^{B,d}	10,0 $\pm$ 3,1 ^{B,b}	30,5 $\pm$ 12 ^{E,c}	2,4 $\pm$ 0,4 ^{D,b}	5,5 $\pm$ 2,4 ^{D,c}	3,1 $\pm$ 1,5 ^{D,b}	1,2 $\pm$ 1,3 ^{D,b}	
0,125+	0,4 $\pm$ 0,5 ^{A,b}	2,0 $\pm$ 1,3 ^{A,c}	1,4 $\pm$ 1,1 ^{A,b}	6,4 $\pm$ 3,0 ^{B,c}	5,9 $\pm$ 6,3 ^{B,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	6,3 $\pm$ 2,5 ^{B,e}	2,5 $\pm$ 2,9 ^{A,c}	2,3 $\pm$ 2,6 ^{A,b}	0,5 $\pm$ 0,4 ^{A,b}	2,4 $\pm$ 1,6 ^{A,c}	0,5 $\pm$ 0,4 ^{A,b}	0,2 $\pm$ 0,2 ^{A,b}	
Deltametrina 0,0625++	52 $\pm$ 38 ^{A,d}	26,8 $\pm$ 39 ^{B,d}	52,8 $\pm$ 3 ^{A,d}	33,2 $\pm$ 26 ^{B,b}	45,3 $\pm$ 39 ^{C,d}	29,7 $\pm$ 41 ^{B,e}	90,2 $\pm$ 3,2 ^{D,f}	21,8 $\pm$ 18 ^{E,d}	9,9 $\pm$ 4,4 ^{F,d}	2,0 $\pm$ 1,5 ^{G,b}	62,9 $\pm$ 3 ^{H,e}	21,7 $\pm$ 14,5 ^{E,c}	70,6 $\pm$ 6,7 ^{I,c}	
0,125+	0,2 $\pm$ 0,2 ^{A,b}	0,2 $\pm$ 0,4 ^{A,c}	16,8 $\pm$ 6,4 ^{B,e}	3,4 $\pm$ 4,4 ^{A,c}	7,6 $\pm$ 11,0 ^{C,c}	0,03 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	0,1 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	14,6 $\pm$ 20 ^{B,e}	0,5 $\pm$ 0,6 ^{A,b}	10,4 $\pm$ 7,7 ^{C,d}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	15,7 $\pm$ 23,0 ^{B,d}	
Cipermetrina 0,665++	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,2 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	0,2 $\pm$ 0,4 ^{A,b}	0,1 $\pm$ 0,2 ^{A,d}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,1 $\pm$ 0,2 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,1 $\pm$ 0,3 ^{A,b}	
1,33+	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,d}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,c}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	0,0 $\pm$ 0,0 ^{A,b}	

* En el análisis de comparación múltiple (SNK), cuando dos medias posean letras mayúsculas iguales en las filas o minúsculas en las columnas, sus diferencias resultaron estadísticamente no significativas ($P > 0,05$). = media aritmética; D.S. = Desviación Standard. += dosis recomendada; ++= mitad de dosis recomendada.

A la luz de lo discutido, se tiene que a las concentraciones probadas los organofosforados malatión y fenitrotión no son compatibles con todos los aislamientos de *B. bassiana* ni a todas las concentraciones, por lo que su posible aplicación en un eventual programa de MIP con estos dependerá de ambos parámetros. Esta información es crucial documentarla, toda vez que en algunas áreas de Venezuela en los últimos 30 años se ha implementado en el control de la enfermedad de Chagas solamente insecticidas organofosforados y carbamatos; además de que se ha detectado poblaciones de *R. prolixus* resistentes hacia los mismos (Zerba, 2004; OMS, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que la efectividad del fenitrotión hacia *Triatoma maculata*, vector alternativo de la enfermedad de Chagas en Venezuela (OMS, 2007), es dosis-dependiente, teniendo una DL_{99} menor que los piretroides, lo que hace pensar una buena efectividad a nivel de campo (Reyes *et al.*, 2007). Adicional a esto, debe tenerse en cuenta y resaltarse los hallazgos de Zibae *et al.*, (2009), quienes detectaron que *B. bassiana* puede afectar la resistencia de *Eurygaster integriceps* hacia el fenitrotión, el cual es un hemíptero como los triatominos, aunque de la familia Scutellariidae. Estos investigadores reportan que la infección fúngica disminuye la susceptibilidad de este insecto-plaga hacia este organofosforado, infiriendo la posible existencia de enzimas desintoxicantes en el desarrollo de resistencia.

El hallazgo en Venezuela de poblaciones de *R. prolixus* resistentes al pesticida piretroide cipermetrina (Vassena *et al.*, 2000; Zerba, 2004), demanda la ejecución de estudios sobre su compatibilidad con otros insecticidas, incluyendo a los de tipo biológico como los hongos entomopatógenos. A ambas dosis, la cipermetrina tuvo un efecto altamente esporocida sobre las conidias de los 13 aislamientos de *B. bassiana*, al inhibir por completo la germinación de los mismos. Por lo tanto, este insecticida es incompatible con estos agentes microbianos y aparentemente no deberían, al menos a las dosis ensayadas, aplicarse conjuntamente en un programa de MIP de Triatominae. Resultados similares a estos reportó Durán (1998), cuando estudió la compatibilidad de una cepa de *B. bassiana* (B447) de Costa Rica con insecticidas, encontrando que la cipermetrina afectaba significativamente la germinación (0,22%) y crecimiento del hifomiceto. Por contraste, Lecuona & Díaz (1996) trabajando "*in vitro*" con dos cepas de *B. bassiana* (Bb1 y Bb5) de Argentina, concluyeron que la Cipermetrina posee un

efecto fungistático sobre ambas cepas, inhibiéndoles el crecimiento radial y la producción de conidias; mientras que Pedroza & Silva (1999) no observaron efectos fungitóxicos sobre *M. anisopliae*, al exponerlo a dosis de hasta 3000 µg/mL de este piretroide. En este mismo sentido, Tavares (2002) encontró que la cipermetrina estimuló la germinación de una cepa brasileña de *M. anisopliae* (CG423), aunque disminuyó su crecimiento lineal y su esporulación, mientras que este insecticida no afectó estos dos últimos parámetros en *Paecylomyces farinosus*, otro hongo entomopatógeno (Vanninen & Hokkanen, 1988). Contrario a lo comentado, Camargo (1983) sostiene que dentro de un grupo de piretroides ensayados en *M. anisopliae* de Brasil, la cipermetrina fue el que menos afectó este hongo entomopatógeno, y que la deltametrina la que más significativamente lo inhibió.

La deltametrina es un piretroide sintético de tercera generación ampliamente utilizado para el control químico de los vectores de la enfermedad de Chagas (Zerba, 2004), por lo que es perentorio estudiar su compatibilidad con los micoinsecticidas, los cuales, como ya se comentó, han mostrado ser una alternativa válida para el manejo de las poblaciones triatominas (Alzogaray *et al.*, 1998; Luz *et al.*, 2004). En el caso de los 13 aislamientos de *B. bassiana* ensayados en la presente investigación, los mismos mostraron un rango de respuesta muy variable frente al piretroide deltametrina; así, se encontró aislamientos en los cuales el efecto resultó ser esporocida a ambas dosis o a la dosis recomendada, mientras que en otros se observaron tasas de germinación >90%, aunque en la dosis recomendada ningún aislamiento exhibió tasas germinativas >17%. Por lo tanto, la compatibilidad de los 13 aislamientos de *B. bassiana* hacia este piretroide es diferencial, dependiendo del aislamiento y la dosis a emplear. Alzogaray *et al.*, (1998) encontraron una reducción significativa de la tasa de germinación de la cepa brasileña CG306 de *B. bassiana*, que es altamente virulenta hacia *T. infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur (OMS, 2007), cuando la expusieron a 5 dosis de deltametrina, detectándose un efecto esporocida a la mayor concentración del piretroide. Un hallazgo importante de estos investigadores, fue que observaron que la exposición de ninfas III de *T. infestans* a concentraciones subletales de deltametrina no alteró de forma significativa la virulencia de esta cepa del hifomiceto. Por su parte, Lecuona & Díaz (1996) observaron en las cepas Bb1 y Bb5 de *B. bassiana*,

que la deltametrina inhibe el crecimiento micelial en alrededor del 50% y la producción de conidias en tasas mucho menores. Como ya se comentó anteriormente, en Brasil la deltametrina resultó ser el pesticida más altamente tóxico para *M. anisopliae*, cuando se expusieron sus conidias a varias clases de piretroides (Camargo, 1983). Por contraste, Tamai *et al.* (2002) similarmente en Brasil, observaron que la deltametrina es compatible con el aislamiento PL63 de *B. bassiana*.

Los piretroides son neurotóxicos para los insectos, afectándoles los canales de sodio dependientes del voltaje (Costa *et al.*, 2008), por lo que se podría especular que estas moléculas actúan a nivel celular de los hongos entomopatógenos de una manera similar, afectando proteínas de membrana que tengan funciones parecidas a la de los canales iónicos (Arce *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2008).

Cuando se hace el análisis del “efecto dosis”, como ya se mencionó, sólo con la aplicación de la cipermetrina a cualquiera de la dosis, se observó una inhibición total de la capacidad germinativa de todos los aislamientos. En los restantes insecticidas, sí se detectaron diferencias significativas entre ambas dosis, aunque el efecto fue diferencial dependiendo del insecticida y del aislamiento fúngico. Similares resultados a los del presente estudio observaron Lecuona & Díaz (1996) en dos cepas argentinas de *B. bassiana*, cuando las expusieron, entre otros insecticidas, a deltametrina y la cipermetrina. Contrastando con estos resultados, Tavares (2002) no encontró diferencias significativas en tasas de germinación de *M. anisopliae* entre 5 dosis de cipermetrina. De esta discusión se desprende la conclusión de que el “efecto de dosis” depende del insecticida y del aislamiento/cepa (Lecuona & Díaz, 1996), por lo que aplicar un “sistema de clasificación de compatibilidad” a todos los casos, como el propuesto en Brasil por Alves (1986), no puede extrapolarse a todos los aislamientos/cepas en general, debiéndose analizar cada caso en particular.

La amplia variabilidad de respuesta detectada en el presente trabajo de los 13 aislamientos de *B. bassiana* hacia los insecticidas químicos, así como la reportada por otros investigadores en otros aislamiento y/o especies fúngicas, podría deberse a varios factores. En efecto, por un lado se tiene la amplia variabilidad genética intraespecífica en las especies de hongos entomopatógenos, no sólo en su respuesta hacia los productos químicos sintéticos, sino que también hacia

diversos parámetros físicos y biológicos (Olmert & Kenneth, 1974; Paccola-Meirelles & Azevedo, 1990; Liu *et al.*, 1993; Todorova *et al.*, 1998; Tamai *et al.*, 2002). Por otra parte, como bien lo señalan Tamai *et al.* (2002), se debe tomar en cuenta que los productos comerciales elaborados con la misma molécula química, tienen fabricantes diferentes, pudiendo presentar comportamientos distintos.

Zimmerman (1975) señala que la inhibición por parte de un producto químico del crecimiento de un hongo, no necesariamente es un indicativo de la reducción de su esporulación o de la viabilidad conidial y viceversa, por lo tanto, en futuros ensayos deberá medirse estos parámetros, incluyendo el crecimiento radial, las tasas de esporulación y germinación, especialmente a las 48 y 72 h después de la aplicación del insecticida químico, en un intento por tener una panorámica más definitiva y conclusiva acerca de la compatibilidad de los 13 aislamientos fúngicos con los pesticidas químicos evaluados en esta investigación.

Los resultados del presente estudio permitió demostrar cuáles insecticidas son compatibles con los 13 aislamientos de *B. bassiana*, destacando que los mismos pertenecen a diversos grupos químicos (organofosforados, piretroides). Esto es importante resaltarlo, toda vez que al tener estos diferentes modos de acción entomocida, permite mantener su rotación cuando se apliquen a nivel de campo en el combate de Triatominae en un futuros proyectos de MIP en conjunto con los micopesticidas, manejándose de una manera más eficiente el fenómeno de resistencia (Tamai *et al.*, 2002).

A pesar de que los resultados obtenidos “*in vitro*” nos dan una idea de la compatibilidad de los aislamientos con los insecticidas de origen químico evaluados, no obstante, es necesario demostrar esta compatibilidad bajo las condiciones ecológicas de las zonas endémicas chagásicas, realizándose para ello ensayos experimentales de campo que traten de simular al máximo las condiciones reales de contacto entre el hifomiceto y los plaguicidas usualmente implementados. Esto permitirá reducir al mínimo el uso de agentes químicos y controlar las poblaciones triatominas dentro de un MIP que involucre a las comunidades afectadas, y siendo más segura para los ecosistemas.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Carmen Castillo del Laboratorio de Fitopatología, NURR, ULA, Trujillo, Estado Trujillo, Venezuela, por cedernos los aislamientos fúngicos.

Compatibility of 13 *Beauveria bassiana* isolates pathogenic to *Rhodnius prolixus* (Triatominae) with insecticides

SUMMARY

As part of a global project under current implementation aimed to search optimal fungal pathotypes to be used in integrate pest management (IPM) against Triatomine vectors, the "in vitro" compatibility of 13 native *Beauveria bassiana* isolates with organophosphate (malatión, fenitrothion) and pyrethroids (cipermethrine, deltamethrin) insecticides were evaluated. Fungal isolates were assayed to 1×10^7 conidias/mL and insecticides with two different concentrations. Compatibility of the fungal agents was evaluated based on conidial germination in a solid medium (Sabouraud Dextrose Agar) at 24 h. The results demonstrated that formulations significantly affect ($P < 0,0000$) the conidial germination, according to fungal isolate, insecticide and doses. Average germination percentages of all fungal isolates were adversely affected in $>90\%$, especially at recommended doses, as compared with control ones. Cipermethrine had a clearly esporocide effect on 13 fungal isolates in both doses, and deltamethrin was the most compatible with them, especially at half the recommended doses.

Key Words: *Beauveria bassiana*, insecticides, compatibility, entomopatogenic fungi, Integrated Pest Management.

REFERENCIAS

- Alazogaray R., Luz C., Ionizete G., Silva I., Lecuona R. & Tigano M. (1998). Effect of Deltamethrin on Germination and Virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on *Triatoma infestans* (Klug). *An. Soc. Entomol. Brasil.* **27**: 663- 667.
- Alves, S. (1986). *Controle microbiano de insectos*. 1ª ed. Edit. Manole. Sao Paulo, Brasil.
- Arce V., Catalina P. & Mallo F. (2006). *Endocrinología*. 1ª ed. Universidades de Vigo y Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.
- Bajan C., Fedorko A. & Kmitowa K. (1995). Reactions of entomopathogenic fungi to pesticides. *Pol. Ecol. Stud.* **21**: 69-88.
- Camargo L. de A. (1983). Efeito de alguns piretróides sobre o fungo entomopatogénico *Metarhizium anisopliae* (Metchs) Sorokin. *Biológico, São Paulo.* **49**: 65-68.
- Cazorla D. (2010). *Caracterización morfo-fisiológica de 13 aislamientos autóctonos de Beauveria bassiana (Ascomycota) y patogenicidad en Rhodnius prolixus (Triatominae)*. Trabajo de Ascenso, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, estado Falcón, Venezuela.
- Cazorla D., Morales P., Salas P., Yáñez Y., Castillo C. & Acosta M. (2005). *Patogenicidad de un aislamiento autóctono de Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra Rhodnius prolixus y Triatoma maculata (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae)*. XIX Congreso Venezolano de Entomología "Dr. Carlos Pereira Núñez". San Felipe, Venezuela.
- Costa L., Giordano G., Guizzetti M. & Vitalone A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience.* **13**: 1240-1249.
- Durán J. (1998). *Uso de Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) como alternativa de control del picudo del chile Anthonomus eugenii cano (Coleoptera: Curculionidae)*. Trabajo de grado de Maestría, CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Estrada M. (2006). Variabilidad de las isoenzimas esterases de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Fitosanidad.* **10**: 279-283.
- Estrada M., Piñón D. & Capote M. (1997). Variabilidad de las esterases de *Metarhizium anisopliae*. *Rev. Iberoam. Micol.* **14**: 29-30.
- Goettel M. & Inglis G. (1997). Fungi: Hyphomycetes. pp.213-249. En: *Manual of techniques in insect pathology*. Ed. L. Lacey. Academic Press. San Diego, California, Estados Unidos de América.

- Lecuona R. & Díaz B. (1996). Compatibilidad de dos cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con distintos insecticidas químicos. *RIA*. **26**: 77-82.
- Liu Z., Milner R., McRae C. & Lutton G. (1993). The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. *J. Invertebr. Pathol.* **62**: 248-251.
- Luz C., Rocha L., Nery G., Magalhaes B. & Tigano M. (2004). Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **99**: 211-218.
- Mohamed A., Pratt J. & Nelson F. (1987). Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathologia*. **99**: 99-105.
- Olmert I. & Kenneth R. (1974). Sensitivity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium* sp. to fungicides and insecticides. *Environ. Entomol.* **3**: 33-38.
- OMS (2007). *Reporte sobre la enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR) UNICEF/PNUD/BancoMundial/OMS. Documento en línea: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf. (Consultado: 2010, Abril 14).
- Paccola-Meirelles L. & Azevedo J. (1990). Variabilidade natural no fungo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. *Arq. Biol. Tecnol.* **33**: 657-672.
- Pedroza M. & Silva J. (1999). *Compatibilidade de alguns fungicidas e inseticidas em Metarhizium anisopliae*. XIV Encontro de genética do Nordeste. Recife, Brasil.
- Ramarajeh N., Govindu H. & Shivashankara K. (1967). The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **9**: 398-403.
- Reyes M., Angulo V. & Sandoval C. (2007). Efecto tóxico de b-cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). *Biomédica*. **27 (supl.1)**: 75-82.
- Rivera M. (1993). Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Rev. Colomb. Entomol.* **19**: 151-158.
- Rivera M., Bustillo P. & Marin M. (1994). Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. En mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Rev. Colomb. Entomol.* **20**: 209-214.
- Steel R. & Torrie J. (1989). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2ª edición. McGraw-Hill. D.F., México.
- Tamai M., Alves S., Lopes R., Faion M. & Padulla L. (2002). Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arq. Inst. Biol.* **69**: 89-96.
- Tavares A. (2002). *Efeito de carrapaticidas químicos e observações citológicas em Metarhizium anisopliae var. Acridum*. Trabajo de grado de Maestría, Universidad Federal de Pernambuco. Recife, Brasil.
- Teng J., Goto R., Iida K., Kojima I. & Iida H. (2008). Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium-channel homologue Cch1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **154**: 3775-3781.
- Todorova S., Coderre D., Duchesne R. & Côté J. (1998). Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. *Environ. Entomol.* **27**: 427-433.
- Vanninen I. & Hokkanen H. (1988). Effects of pesticides on four species of entomopathogenic fungi in vitro. *Annales Agriculturae Fenniae*. **27**: 345-353.
- Vassena C., Piccollo M. & Zerba E. (2000). Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med. Vet. Entomol.* **14**: 51-55.

- Villatte F., Marcel V., Estrada-Mondaca S. & Fournier D. (1998). Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosens. Bioelectron.* **13**: 157-64.
- Zerba E. (2004). Factores que influyen en la resistencia de triatomíneos a los insecticidas. Documento en línea: www.conhu.org.pe/chagas/E.Zerba.pdf. (Consultado: 2009, Noviembre 19).
- Zibae A., Bandani A. & Tork M. (2009). Effect of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, and its secondary metabolite on detoxifying enzyme activities and acetylcholinesterase (AChE) of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae). *Biocontrol Sci. Technol.* **19**: 485-498.
- Zimmermann, G. (1975). Über die Wirkung systemischer Fungizide auf verschiedene insektenpathogene Fungi imperfecti in vitro. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Berl.)*. **27**: 113-117.

Recibido el 26/07/2010
Aceptado el 08/11/2010