

COMPATIBILIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS E INSECTICIDAS PIRETROIDES PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), VECTOR DEL DENGUE EN MÉXICO

Luis Alberto Cisneros-Vázquez, Américo David Rodríguez, Patricia Penilla y María Guadalupe Vázquez-Martínez. Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública. 4ª. Norte y 19 Poniente s/n, Colonia Centro, C.P. 30700. Tapachula, Chiapas, México. mguadalu@insp.mx.

RESUMEN: En el presente trabajo se evaluó la compatibilidad “*in vitro*” de dos hongos entomopatógenos nativos de Chiapas *Gliocladium virens* y *Trichoderma longibrachiatum* con dos insecticidas comerciales: Aqua Reslin® Super y Anvil®, cada uno a las concentraciones de 1.5, 2 y 2.5%. La compatibilidad se estimó mediante efectos en las variables germinación conidial, crecimiento vegetativo y esporulación de cada uno de los hongos entomopatógenos. Las tres concentraciones de Aqua Reslin® Super fueron compatibles con los dos hongos entomopatógenos, mientras que las concentraciones del insecticida Anvil® fueron moderadamente tóxico y tóxico para los dos hongos entomopatógenos. La concentración de 1.5% del insecticida Aqua Reslin® Super con los hongos *G. virens* y *T. longibrachiatum* fueron las mejores combinaciones que podrían ser propuestas como una estrategia integrada en el control de *Aedes aegypti*, el principal vector del dengue en México.

Palabras clave: Compatibilidad, hongos entomopatógenos, insecticidas, control, *Aedes aegypti*.

Compatibility of entomopathogenic fungi and insecticides pyrethroid for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

ABSTRACT: In the present study was evaluated “*in vitro*” compatibility of two native entomopathogenic fungi of Chiapas *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* with two commercial insecticides: Aqua Reslin® Super and Anvil®, each at 1.5, 2 and 2.5% concentrations. Compatibility was estimated by effects on conidial germination, vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. The three concentrations of Aqua Reslin® Super were compatible with the two entomopathogenic fungi, while concentrations of the insecticide Anvil® were moderately toxic and toxic for the two entomopathogenic fungi. The concentration of 1.5% of the insecticide Aqua Reslin® Super with fungi *G. virens* and *T. longibrachiatum* were the best combinations that might be proposed as a strategy integrated in the control of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue in Mexico.

Key words: Compatibility, entomopathogenic fungi, insecticides, control, *Aedes aegypti*.

Introducción

El dengue, una de las principales enfermedades transmitidas por vector en el mundo, es causada por un virus de la familia Flaviviridae y transmitida principalmente por la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti* Linneo (Diptera: Culicidae) (Gubler, 2011). En México, el dengue es un problema de salud pública que va en aumento, en el año 2012 se reportaron 50,368 casos mientras que en 2013 los casos aumentaron a 62,330 (SINAVE, 2013).

El desarrollo de resistencia a insecticidas por parte de los mosquitos (García *et al.*, 2009), ha conducido a la búsqueda de métodos alternativos como el control biológico mediante el uso de agentes entomopatógenos, que además de eliminar a los mosquitos, minimiza los problemas de contaminación ambiental y desarrollo de resistencia (Tamez *et al.*, 2001). De los agentes entomopatógenos, los hongos tienen algunas ventajas respecto a otros agentes de control biológico y químico, como por ejemplo: producción a bajo costo utilizando sustratos económicos como arroz (Rosas-Acevedo *et al.*, 2008), mayor persistencia en el ambiente al convertir al insecto muerto en una nueva fuente de inóculo

(Lecuona *et al.*, 1997); son específicos ya que no dañan organismos no blanco (Tanada y Kaya, 1993) y no necesitan ser ingeridos por el insecto para promover su capacidad infectiva (Carruthers y Hural, 1990). Se recomienda el uso de cepas nativas de hongos para evitar un desequilibrio ecológico, además que una cepa foránea requiere adaptarse al medio y en ese proceso puede perder su capacidad infectiva (Castillo, 2006). En el sureste de México se realizó el aislamiento de cepas nativas de hongos asociadas a insectos vectores de enfermedades y con patogenicidad sobre mosquitos (Vázquez-Martínez *et al.*, 2008, Vázquez-Martínez *et al.*, 2013), de estas cepas *Trichoderma longibrachiatum* y *Gliocladium virens* demostraron ser infectivas en mosquitos *A. aegypti* en bioensayos de laboratorio (Cisneros-Vázquez, 2010).

Ante el incremento de la resistencia a insecticidas por parte de los mosquitos, se está valorando el uso de combinaciones de insecticidas y hongos entomopatógenos para reducir las cantidades que se utilizan de insecticidas, disminuir la probabilidad de aparición de resistencia y mejorar las estrategias de control, incluso de los mosquitos resistentes. En el área agrícola, se ha reportado compatibilidad entre los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con insecticidas piretroides (Cazorla y Morales-Moreno, 2010; Schumacher y Poehling, 2012). Por lo que en este estudio, el objetivo fue evaluar la compatibilidad entre piretroides sintéticos y hongos entomopatógenos nativos que pudieran utilizarse en estrategias de control integrado de mosquitos *A. aegypti* vectores de dengue.

Materiales y Método

Bioensayos. Se utilizaron dos marcas de insecticidas piretroides: Aqua Reslin® Super y Anvil®, en tres diferentes concentraciones: 1.5, 2 y 2.5%. Se evaluaron dos cepas nativas de hongos: *G. virens* y *T. longibrachiatum* proporcionadas por el Laboratorio de Patógenos y Vectores del CRISP. Los hongos se crecieron en el medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (SDA, Becton Dickinson®) a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% HR con fotoperiodo de 12:12h L: O. Se prepararon placas de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) adicionadas con las concentraciones a evaluar de los insecticidas, para el control se usaron placas de SDA sin insecticida.

Efecto de insecticidas sobre la germinación conidial. Para determinar la germinación conidial se sembraron cinco alícuotas de 5µl de la suspensión de conidias de los hongos *T. longibrachiatum* y *G. virens* en cinco puntos de placas Petri, las cuales contenían medio SDA con los respectivos tratamientos. La germinación conidial se determinó por el método de Cañedo y Ames (2004).

Efecto de insecticidas sobre la esporulación de hongos. En cada placa de los respectivos tratamientos se sembró una alícuota de 5µl de una suspensión de conidias de los hongos a probar (*T. longibrachiatum* y *G. virens*), y se incubaron a las condiciones ya descritas. A los 10 días de incubación, de cada placa se colectó un disco de 1 cm de diámetro y se colocó en 5ml de solución tween 80 al 0.01% y se mezcló en un sonicador de baño de agua a 28°C por 15 minutos. La esporulación de hongos (concentración de conidias) se determinó mediante conteos en una cámara de Neubauer.

Efecto de insecticidas sobre crecimiento vegetativo. A partir de placas esporuladas sin insecticidas, se tomaron discos de 1 cm de diámetro y se colocaron en el centro de placas Petri con los diferentes tratamientos. Las placas se incubaron y se midió el diámetro del desarrollo del cultivo a los 14 y 30 días después de la inoculación. Se realizaron tres mediciones con un Vernier y se obtuvo el promedio.

Compatibilidad. La compatibilidad de cada insecticida con los hongos entomopatógenos se calculó según el valor del índice biológico (IB) propuesto por Alves *et al.* (2007), en base a las variables: porcentaje de inhibición del crecimiento, el efecto sobre la esporulación y crecimiento

vegetativo, a través de la fórmula: $IB = [47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GER)]/100$. Dónde: IB: Valor corregido para la clasificación del producto, CV: Porcentaje de crecimiento vegetativo con relación al testigo, ESP: Porcentaje de esporulación respecto al testigo y GER: Germinación. El resultado de índice biológico (IB) se categorizó y de acuerdo al rango donde se ubique el IB se determinó si el insecticida y el hongo son compatibles: $IB > 66$ compatible, $IB = 42-66$ moderadamente tóxico, $IB < 42$ tóxico.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza para los resultados de esporulación de *G. virens* expuesto a ARS y Anvil y para *T. longibrachiatum* expuesto a ARS. Para el resto de los bioensayos se realizó el test no paramétrico Kruskal Wallis. Para elegir las mejores combinaciones (compatibles) se tomaron los resultados de los índices biológicos y se acomodaron en un diseño de bloques completamente al azar.

Resultados

Efecto de insecticidas sobre la germinación conidial. La germinación de *G. virens* a la concentración 1.5% de ARS no tuvo diferencias significativas con el control ($P > 0.05$). Las concentraciones de 2 y 2.5% de ARS causaron una reducción del 3% en la germinación conidial. Las concentraciones 1.5 y 2% de Anvil no causaron efectos negativos en la viabilidad de *G. virens*, mientras que la concentración de 2.5% redujo 1.5% la viabilidad ($P = 0.0165$). La germinación de *T. longibrachiatum* no fue afectada por las concentraciones 1.5 y 2% de ARS ($P > 0.05$), y tampoco por las tres concentraciones de Anvil ($P > 0.05$).

Efecto de insecticidas sobre la esporulación de hongos. La concentración 1.5 y 2.5% de ARS no afectó la esporulación de *G. virens* ya que no tuvo diferencias significativas con el control ($P > 0.05$). En contraste, las reducciones causadas en la esporulación por las tres concentraciones de Anvil tuvieron diferencias significativas con el control ($P < 0.05$). La concentración 1.5 de ARS no afectó la esporulación de *T. longibrachiatum* ($P > 0.05$). En cambio, las tres concentraciones de Anvil afectaron significativamente la esporulación de *T. longibrachiatum* ($P < 0.05$).

Efecto de insecticidas sobre crecimiento vegetativo. El crecimiento vegetativo de *G. virens* (14 y 30 días) no fue afectado por las concentraciones de ARS, ni por Anvil ($P = 1.000$). El crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum* a los 14 días no fue afectado por las tres concentraciones de ARS ($P = 0.1794$). Mientras que las concentraciones 1.5 y 2% de Anvil no tuvieron diferencias significativas con el control ($P > 0.05$), por lo que no afectaron el crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum*. A los 30 días, ni ARS y Anvil, afectaron el crecimiento vegetativo de los hongos ($P > 0.05$).

Compatibilidad. El resultado de los índices biológicos (IB) calculados con las variables de crecimiento vegetativo, esporulación y germinación, indicaron que las concentraciones 1.5, 2 y 2.5% del insecticida ARS fueron compatibles ($IB > 66$) con *G. virens* y *T. longibrachiatum*. En contraste, las concentraciones del insecticida Anvil fueron moderadamente tóxico ($IB: 42-66$) y tóxico ($IB < 42$) para los hongos entomopatógenos (Cuadro 1).

Discusión y Conclusión

El insecticida ARS fue compatible con los hongos *G. virens* y *T. longibrachiatum*, mientras que el insecticida Anvil fue tóxico para los dos hongos entomopatógenos. Este comportamiento concuerda con otros piretroides los cuales fueron tóxicos para el hongo *M. anisopliae* (Soares y Monteiro, 2011; Niassy *et al.*, 2012). Por otro lado, Batista y colaboradores (2001) reportaron que el piretroide Decis®

25 CE (Deltametrina) fue compatible y moderadamente tóxico para *M. anisopliae*. En los estudios anteriores no incluyeron la variable germinación conidial para determinar la toxicidad.

Cuadro 1. Clasificación de la compatibilidad de Aqua Reslin® Super (ARS) y Anvil® con *G. virens* y *T. longibrachiatum*.

ARS	<i>G. virens</i>		<i>T. longibrachiatum</i>	
%	IB	Clasificación	IB	Clasificación
1.5%	93.5784605	C	91.8688451	C
2%	87.762893	C	78.4545081	C
2.5%	82.0868903	C	72.5927879	C
Anvil	<i>G. virens</i>		<i>T. longibrachiatum</i>	
%	IB	Clasificación	IB	Clasificación
1.5%	57.0722059	MT	53.8454513	MT
2%	57.0656456	MT	51.6054983	MT
2.5%	56.9124099	MT	35.7394499	T

En el presente estudio se utilizó la clasificación de toxicidad de un insecticida propuesta por Alves y colaboradores en el 2007, la cual incluye la variable germinación conidial, debido a que la germinación conidial es el primer paso para que un hongo entomopatógeno atraviese la cutícula del insecto y la inhibición de la germinación podría afectar considerablemente la eficacia del hongo entomopatógeno (Anderson y Roberts 1983). En este trabajo el insecticida ARS fue compatible con los dos hongos entomopatógenos *G. virens* y *T. longibrachiatum*, lo que puede permitir un uso combinado de este producto químico con los hongos.

Aunque ARS y Anvil pertenecen al mismo grupo toxicológico (piretroides), en este estudio uno fue compatible y el otro tóxico a las mismas especies de hongos entomopatógenos. Tamai y colaboradores (2002) mencionan que existen productos comerciales con el mismo ingrediente activo pero de diferentes fabricantes, pudiendo presentar desigual comportamiento debido a las diferentes sustancias usadas para formular por cada fabricante. Además, otra variable a considerar es la variabilidad genética por parte de los hongos, Cazorla y Morales-Moreno (2010) reportaron una amplia variedad de respuesta de 13 aislamientos de *B. bassiana* hacia los insecticidas químicos, evidenciando que la variabilidad genética a nivel de cepas de la misma especie afecta la respuesta hacia el insecticida. Esto podría explicar por qué en el presente trabajo los índices biológicos entre los hongos entomopatógenos expuestos al mismo insecticida fue diferente, lo que nos lleva a suponer que es por la variabilidad genética inter-específica.

En conclusión, las tres concentraciones del insecticida ARS fueron compatibles con los hongos entomopatógenos *G.virens* y *T. longibrachiatum*, siendo la mejor combinación la concentración de 1.5% con *G. virens*. Esta combinación podría ser usada en estrategias de control integrado de *A. aegypti*, aunque es necesario realizar su validación a nivel de laboratorio para demostrar la efectividad de alguna de estas combinaciones sobre mosquitos *A. aegypti* o un posible efecto sinergista.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que financió el presente estudio a través del proyecto SALUD-CONACYT No.182722.

Literatura Citada

- Alves, S. B., Haddad, M. L., Faion, M., de Baptista, G. C. é L. S. Rossi-Zalaf. 2007. Novo índice biológico para classificacao da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogénicos. En: X Simposio de Controle Biológico – 30 de Junho a 04 de julho de 2007, Brasilia. Disponible en: <http://www.seb.org.br/eventos/SICONBIOL/XSiconbiol/XSiconbiol-resumos.pdf>.
- Anderson, T. E. and D. W. Roberts. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. J. Econ. Entomol. 76:1437-1441.
- Batista, A. F., Almeida, J. E. M. and C. Lamas. 2001. Effect of Thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. Neotrop. Entomol. 30:437-447.
- Cañedo, V. y T. Ames. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Primera Edición Lima, Perú. 1-60.
- Carruthers, I. R. and K. Hural. 1990. Fungi as a natural occurring entomopathogens. En: Baker RR, Dunn PE (Ed.) New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Nueva York pp.115-138.
- Cazorla, D. y P. Morales-Moreno. 2010. Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. Bol. Mal. salud Amb. 2: 261-270.
- Cisneros-Vázquez, L. A. 2010. El potencial entomopatógeno de diferentes cepas nativas de hongos sobre *Aedes aegypti*. Tesis, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.
- García, G. P., Flores, A. E., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solís, G. 2009. Recent Rapid Rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. PLoS Negl.Trop.Dis. 3: e531. doi:10.1371/journal.pntd.0000531
- Gubler, D. J. 2011. Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st century. Trop. Med.Health. 39:3-11.
- Lecuona, R., Clement, J. L., Riba, G., Joulie, C. and M. P. Juarez. 1997. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria sp.* on insect lipids. J. Econ. Entomol. 89:119-123.
- Niassy, S., Maniania, N. K., Subramanian, S., Gitonga, M. L., Maranga, R., Obonyo, A. B., and S. Ekesi. 2012. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* isolate ICIPE 69 with agrochemicals used in French bean production. Int. J. Pest Manage. 58:131-137.
- Rosas- Acevedo, J. L., Avalos, O. R., Rosas-Acevedo, A. Y., Sánchez-Infante, A. y L. Sampedro-Rosas. 2008. Utilización de desechos orgánicos como sustrato para la producción de un fungicida natural en la región cafetalera del municipio de Tuxtepec, Oaxaca y Zihuatanejo, Gro. Rev. Latin. Rec. Naturales. 4:256-258.
- Schumacher, V. and H. M. Poehling. 2012. In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. Fungal Biol. 116:121-132.
- SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue. 2013. Panorama epidemiológico de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue Semana epidemiológica 52. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem52_sem2013.pdf
- Soares, F. B. é A. C. Monteiro. 2011. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 78:385-391.

- Tamai, M., Alves, S., Lopes, R., Faion, M. y L. Padulla. 2002. Toxicidade de productos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arq. Inst. Biol. 69:89-96.
- Tamez, G. P., Galán, W., Nedrano, R., Garcia, G. C., Rodriguez, P. y R. A. Gomez. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL. 4:143-152.
- Tanada, Y. H. K. Kaya. 1993. Insect pathology, New York: Academic Press Inc.1993. pp. 666.
- Vázquez-Martínez, M. G., Rodríguez-Meneses, A. y M. H. Rodríguez-López. 2008. Patogenicidad de diferentes cepas de hongos sobre el mosquito *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) vector de paludismo. Entomol. Mex. 7: 760–763.
- Vázquez-Martínez, M. G., Rodríguez-Meneses, A., Rodríguez, A. D. and M. H. Rodríguez. 2013. Lethal effects of *Gliocladium virens*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the malaria vector *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Biocontrol Sci. Techn. 23(9): 1098-1109.