



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CEBOS PARA EL CONTROL DE LA CUCARACHA ALEMANA *Blattella germanica* (DICTYOPTERA: BLATTELLIDAE) FORMULADOS CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y ÁCIDO BÓRICO

GABRIELA HERNÁNDEZ RAMÍREZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **CEBOS PARA EL CONTROL DE LA CUCARACHA ALEMANA *Blattella germanica* (DICTYOPTERA: BLATTELLIDAE) FORMULADOS CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y ÁCIDO BÓRICO** realizada por la alumna: **Gabriela Hernández Ramírez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dra. Raquel Alatorre Rosas

ASESOR



Dr. Juan Cibrián Tovar

ASESOR



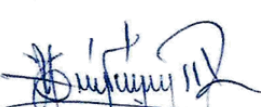
Dr. Esteban Rodríguez Leyva

ASESOR



Dr. Ariel Wilbert Guzmán Franco

ASESOR



Dr. Tito Roque Vásquez Rojas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2013

CEBOS PARA EL CONTROL DE LA CUCARACHA ALEMANA *Blattella germanica*
(DICTYOPTERA: BLATTELLIDAE) FORMULADOS CON HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS Y ÁCIDO BÓRICO

Gabriela Hernández Ramírez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2013

Blattella germanica (Dictyoptera: Blattellidae) es la especie más importante de las cucarachas sinantrópicas en el mundo. En este trabajo se evaluó la patogenicidad de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, *M. pingshaense* y *Beauveria bassiana* en ninfas y adultos de *B. germanica*. Para ofrecer una alternativa al uso de insecticidas en el manejo de *B. germanica*, se desarrolló una formulación de cebo en polvo y pellet. Se determinó la preferencia de adultos de esta cucaracha, a diferentes dosis de azúcar glas (0.125, 0.25, 0.5, 0.75M) como fagoestimulante y se evaluó la compatibilidad del ácido bórico con los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* en estos cebos. Finalmente, se evaluó vía oral, la virulencia de cebos formulados con azúcar glas 0.5 M, ácido bórico (0.5, 1, 2, 4%) y esporas de aislamientos de *M. anisopliae* (Ma2, Ma3, Ma7) y *M. pingshaense* (Ma5) contra ninfas de quinto instar de *B. germanica*. Se confirmó la diferencia de susceptibilidad de ninfas y adultos de la cucaracha alemana a estos hongos y se demostró que las ninfas de quinto instar de *B. germanica* son menos susceptibles a la infección por estos entomopatógenos. El valor de CL₅₀ para los aislamientos fue de 1 - 3 x 10⁷ esporas / mL. La concentración de azúcar glas más atractiva fue 0.5 M. La combinación de 2% de ácido bórico (AB) con esporas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* no afectó la viabilidad de estos hongos. Los resultados de la evaluación oral de los cebos con ácido bórico y *Metarhizium* sobre ninfas de la cucaracha alemana causó mortalidades de 100% y el mejor TL₅₀ fue 10 d para los cebos con 2% de ácido bórico. La mejor formulación fue, pellet con 2% AB y 2 x 10⁸ esporas / g de cebo. Estos resultados demuestran un efecto sinérgico entre el AB y *Metarhizium* y ofrecen una alternativa potencial para el manejo de *B. germanica*.

Palabras clave: cucaracha alemana, hongo entomopatógeno, plagas urbanas, virulencia.

**BAIT FOR CONTROL OF THE GERMAN COCKROACH *Blattella germanica*
(DICTYOPTERA: BLATTELLIDAE) MADE WITH ENTOMOPATHOGENIC FUNGI
AND BORIC ACID**

Gabriela Hernández Ramírez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2013

Blattella germanica (Dictyoptera: Blattellidae) is the most important specie of synanthropic cockroaches in the world. In this study we evaluated the pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae*, *M. pingshaense* and *Beauveria bassiana* in nymphs and adults of *B. germanica*. To offer an alternative to the use of insecticides in the control of *B. germanica*, developed a bait formulation in powder and pellet. We determined the preference of adults of this cockroach, at different doses of sugar (0.125, 0.25, 0.5, 0.75M) as phagostimulant and assessed the compatibility of boric acid with the fungus *M. anisopliae* and *B. bassiana* on these baits. Finally, we evaluated orally baits virulence 0.5M formulated with sugar, boric acid (0.5, 1, 2, 4%) and spore of *M. anisopliae* (Ma2, Ma3, MA7) and *M. pingshaense* (MA5) against fifth-instar nymphs of *B. germanica*. Differences in susceptibility of nymphs and adults of the German cockroach to these entomopathogenic fungi were confirmed and shown that fifth instar nymphs of *B. germanica* are less susceptible to infection. The LC₅₀ value for the isolates was 1 to 3 x 10⁷ spores / mL. Sugar concentration was 0.5 M more attractive. The combination of 2% boric acid (AB) with spores of *M. anisopliae* and *B. bassiana* did not affect the viability of these fungi. The oral evaluation results of boric acid baits and *Metarhizium* on German cockroach nymphs caused 100% mortality and LT₅₀ was 10 d for baits with 2% boric acid. The best formulation was, pellet with 2% AB and 2 x 10⁸ spores / g of bait. These results demonstrate a synergistic effect between the AB and *Metarhizium* and offer a potential alternative for the management of *B. germanica*.

Keywords: German cockroach, entomopathogenic fungi, pathogenicity, urban pest

“Esta investigación y todo el aprendizaje que obtuve al recorrer este camino lo dedico a ti, porque has sido mi fortaleza y me has enseñado que la rectitud de corazón y el trabajo hacen digno al ser humano” ¡Gracias Padre!

A mis Padres...

Con todo mi amor les agradezco y brindo este esfuerzo compartido. Gracias por todas las bendiciones que dan a mi vida. A mis dos hermanos y sobrinas. Con quienes siempre será un placer compartir mis triunfos, los admiro, respeto y les agradezco todo el cariño y cada momento que me han llenado de su presencia.

A Mary, Isra y Fabián quienes estuvieron junto a mí apoyándome en las largas jornadas para realizar los experimentos.

Especialmente a mis profesores miembros del Consejo Particular...

Por compartir sus conocimientos y experiencia, no solo en el trabajo sino en el gran camino de la vida. Y porque sin ellos la culminación de este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. Francisco Hernández Rosas porque desde aquel 2001 que nos conocimos, ha creído en mí y su confianza me ha impulsado a seguir adelante en mi preparación profesional y ahora también soy Entomóloga

Y a ti Israel... ¡Mi Grande Amor!

Por llegar en el momento justo a alegrar mi VIDA, darme la oportunidad de conocer el amor en pareja y disfrutar juntos la aventura de vivir.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (49625) para realizar mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, personal técnico y administrativo por las facilidades otorgadas para el desarrollo de la presente investigación.

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

A todos los miembros de mi consejo particular, por su asesoría, confianza y aportes en la realización de este trabajo, **Dra. Raquel Alatorre Rosas, Dr. Esteban Rodríguez L., Dr. Juan Cibrián T., Dr. Tito R. Vásquez R. y Dr. Ariel W. Guzmán F.** Al Dr. Hussein Sánchez Arroyo, por haber financiado esta investigación.

Al Dr. **Francisco Hernández Rosas** por sus acertadas sugerencias y por motivarme a terminar con el compromiso adquirido, su apoyo y consejos para finalizar esta meta.

A mis amigos; Lupita, Nuvia, Caro, Fabián, Julio, Jorge, Jhony, Nico, Ausencio, que me brindaron su cariño, apoyo y confianza.

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

¡ GRACIAS !

CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	xii
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	xiv
III. CAPÍTULO 1	
REVISIÓN DE LITERATURA	
1.1 Las cucarachas.....	1
1.1.1 Descripción de <i>Blattella germanica</i>	1
1.1.2 Biología y reproducción.....	2
1.1.3 Comportamiento y hábitat.....	4
1.1.4 Importancia económica y médica de <i>Blattella germanica</i>	5
1.2 Manejo de <i>Blattella germanica</i>	7
1.2.1 Insecticidas convencionales.....	8
1.2.2 Insecticidas inorgánicos y polvos.....	9
1.2.3 Cebos y Atrayentes.....	11
1.3 Control Biológico de cucarachas.....	13
1.3.1 Hongos entomopatógenos.....	13
1.3.1.1 Aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> , en el manejo de la cucaracha alemana.....	15
1.3.1.2 Aplicación de <i>Metarhizium anisopliae</i> en el manejo de la cucaracha alemana.....	17
1.4 LITERATURA CITADA.....	21
IV. CAPÍTULO 2	
Susceptibilidad de ninfas y adultos de <i>Blattella germanica</i> (Dictyoptera: Blattellidae) a <i>Metarhizium</i> (Ascomycota: Hypocreales) y <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill	
2.1 INTRODUCCIÓN.....	27

2.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.2.1	Insectos.....	28
2.2.2	Obtención del inóculo.....	30
2.2.3	Virulencia de <i>Metarhizium</i> , en tres edades de <i>B. germanica</i>	31
2.2.4	Virulencia de <i>Beauveria bassiana</i> , en tres edades de <i>B. germanica</i>	31
2.2.5	Dosis-Respuesta de <i>Metarhizium</i> , aplicados a ninfas de quinto ínstar (E2) de <i>B. germanica</i>	31
2.2.6	Análisis estadístico.....	32
2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
2.3.1	Virulencia de <i>Metarhizium</i> , en tres edades de <i>Blattella germanica</i>	32
2.3.2	Virulencia de <i>Beauveria bassiana</i> , en tres edades de <i>Blattella germanica</i>	36
2.3.3	Dosis-Respuesta de <i>Metarhizium</i> , aplicados a ninfas de E2 de la cucaracha <i>B. germanica</i>	43
2.4	LITERATURA CITADA.....	45

CAPÍTULO 3

Determinación de concentraciones ácido bórico-azúcar glas con cebos para el manejo de *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) bajo condiciones de laboratorio

3.1	INTRODUCCIÓN.....	50
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
3.2.1	<i>Blattella germanica</i>	52
3.2.2	Aislamientos de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	52
3.2.3	Preferencia de adultos de <i>B. germanica</i> , a cebos formulados con azúcar glas.....	52
3.2.4	Dosis-respuesta del ácido bórico, sobre ninfas quinto ínstar de <i>B. germanica</i>	53
3.2.5	Efecto del ácido bórico (AB), sobre la germinación de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	54
3.2.6	Análisis estadístico.....	55

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
3.3.1 Preferencia de adultos de <i>B. germanica</i> , a cebos formulados con azúcar glas.....	55
3.3.2 Dosis-respuesta del ácido bórico, sobre ninfas de quinto ínstar de <i>B.</i> <i>germanica</i>	58
3.3.3 Efecto del ácido bórico (AB), sobre la germinación de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	62
3.4 LITERATURA CITADA.....	64

V. CAPÍTULO 4

Efecto sinérgico del ácido bórico y hongos entomopatógenos sobre el comportamiento y sobrevivencia de ninfas de *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae).

4.1 INTRODUCCIÓN.....	68
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	70
4.2.1 Insectos.....	70
4.2.2 Obtención del inóculo.....	70
4.2.3. Virulencia de cebos, formulados con <i>Metarhizium</i> y ácido bórico sobre <i>B. germanica</i>	71
4.2.4. Efecto del comportamiento de agregación de <i>B. germanica</i> , en la mortalidad por cebos formulados con <i>Metarhizium</i> y ácido bórico.....	72
4.2.5 Análisis estadístico.....	73
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
4.3.1 Virulencia de cebos, formulados con <i>Metarhizium</i> y ácido bórico sobre <i>B. germanica</i>	73
4.3.2 Comportamiento de agregación de <i>B. germanica</i> y su influencia en la mortalidad por cebos formulados con <i>Metarhizium</i> y ácido bórico.....	79
4.4 LITERATURA CITADA.....	85
VI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 2

1. Curvas de Supervivencia de aislamientos de *M. anisopliae* (Ma1, Ma2, Ma3, Ma6, Ma7) y *M. pingshaense* (Ma4, Ma5) sobre los grupos de edad E1, E2 y E3 de *B. germanica*..... 34
2. Curvas de Supervivencia de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre los grupos de edad E1, E2 y E3 de *B. germanica*..... 39
3. Curvas de Supervivencia de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre los grupos de edad E1, E2 y E3 de *B. germanica*..... 40
4. Curvas de Dosis-Respuesta de *M. anisopliae* (Ma2, Ma3, Ma7) y *M. pingshaense* (Ma5) sobre ninfas de la edad E2 (quinto ínstar) de la cucaracha alemana, *Blattella germanica*..... 44

CAPITULO 3

- 5 Respuesta de elección de adultos (ambos sexos) de *B. germanica* a diferentes concentraciones de azúcar glas, en cebos formulados polvo y pellet..... 56
- 6 Tiempo de Ingesta de adultos de *B. germanica*, a diferentes concentraciones de azúcar glas en los cebos formulados polvo y pellet..... 57
- 7 Curvas de Dosis-Respuesta del ácido bórico, sobre ninfas de quinto ínstar de la cucaracha *B. germanica* en la formulación de cebo en polvo..... 59
- 8 Curvas de Dosis-Respuesta del ácido bórico, sobre ninfas de quinto ínstar de la cucaracha *B. germanica* en la formulación de cebo en pellet..... 61
- 9 Porcentaje de germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el cebo en polvo, con diferentes concentraciones de ácido bórico..... 62
- 10 Porcentaje de germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el cebo en pellet con diferentes concentraciones de ácido bórico..... 63

CAPÍTULO 4

11	Curvas de Supervivencia de ninfas de quinto ínstar de <i>B. germanica</i> , tratadas con cebos en pellet, formulados con ácido bórico y <i>M. anisopliae</i> (Ma2, Ma3 y Ma7) ó <i>M. pingshaense</i> (Ma5).....	76
12	Curvas de Supervivencia de ninfas de quinto ínstar de <i>B. germanica</i> , tratadas con cebos en polvo, formulados con ácido bórico y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma2, Ma3 y Ma7) o <i>M. pingshaense</i> (Ma5).....	78
13	Mortalidad de ninfas de <i>B. germanica</i> , en las diferentes combinaciones cebo-ácido bórico.....	80
14	Mortalidad de ninfas de <i>B. germanica</i> , en las combinaciones cebo-aislamientos de <i>Metarhizium</i>	81
15	Mortalidad de ninfas de <i>B. germanica</i> en las combinaciones aislamiento – concentración de ácido bórico.....	82

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO 2

1	Aislamientos de <i>Metarhizium</i> empleados en esta investigación.....	29
2	Aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> , utilizados en esta investigación.....	30
3	Mortalidad de ninfas y adultos de <i>B. germanica</i> , tratados con <i>M. anisopliae</i> y <i>M. pingshaense</i>	33
4	Mortalidad de ninfas y adultos de <i>B. germanica</i> , tratados con <i>B. bassiana</i>	38
5	Mortalidad y CL ₅₀ de <i>M. anisopliae</i> y <i>M. pingshaense</i> , en ninfas de quinto ínstar de <i>B. germanica</i>	45

CAPITULO 3

6	CL ₅₀ y Mortalidad de ninfas de quinto ínstar de la cucaracha <i>B. germanica</i> por el ácido bórico, en dos formulaciones.....	59
7	Mortalidad de ninfas de quinto ínstar de <i>B. germanica</i> , tratadas con ácido bórico en dos formulaciones.....	60

CAPITULO 4

8	Origen de los aislamientos de <i>M. anisopliae</i> y <i>M. pingshaense</i> utilizados.....	70
9	Mortalidad y tiempo letal medio (TL ₅₀) de ninfas de <i>B. germanica</i> , expuestas a cebos formulados con <i>Metarhizium</i> sp y ácido bórico.....	74

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La cucaracha alemana, *Blattella germanica* (L.), es una plaga de importancia económica en áreas urbanas porque está estrechamente asociada con el ser humano, y su presencia deja la sospecha de una amenaza a la salud humana por los patógenos con los que se asocia. Entre los organismos patógenos que se han aislado de cucarachas recolectadas en ambientes domésticos y peridomésticos están *Salmonella*, *Staphilococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Shigella disenteriae* y los protozoarios que causan la *Toxoplasmosis parasitica* (Brenner, 2002).

Entender la biología y el comportamiento básico de las cucarachas es esencial para su manejo. Tradicionalmente, las cucarachas se han controlado usando una variedad de sustancias tóxicas aplicadas como plaguicidas residuales. Estos incluyen insecticidas organofosforados, carbamatos, e insecticidas de origen botánico como piretrinas y piretroides (Pachamuthu y Kamble, 2000). Actualmente, el uso de cebos tóxicos se emplea extensivamente en el control de cucarachas en forma de estaciones cebadas, que se colocan dentro y fuera de las áreas afectadas, para reducir la exposición humana a los agentes químicos (Gore *et al.*, 2004).

Algunas de las ventajas de los cebos (tabletas o gel) es que se aplican en forma más localizada al origen de la plaga, hendiduras, orificios o grietas, y así las toxinas son menos diseminadas y riesgosas para el ser humano. Los cebos de ácido bórico tienen un largo historial como insecticidas en el manejo de plagas urbanas, y han demostrado ser una alternativa efectiva a los insecticidas neurotóxicos (Ebeling *et al.*, 1966; Strong *et al.*, 1983; Cochran, 1995; Gore y Schal, 2004).

El control biológico también se ha planteado como una alternativa viable para el combate de las cucarachas. Los hongos entomopatógenos son uno de los grupos con potencial para su uso como agentes de control biológico para insectos vectores de enfermedades como las moscas, mosquitos y cucarachas (Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Milner y Pereira, 2007; Lopes y Alves, 2011). A pesar de que los hongos entomopatógenos tienen la capacidad patogénica para ser agentes potencialmente efectivos, el tiempo requerido para controlar a las cucarachas es el factor más importante que limita su aplicación. Por esta razón, surgió la necesidad de reforzar la actividad biológica de los hongos entomopatógenos con la integración de dosis subletales de insecticidas (Pachamuthu *et al.*, 1999).

Una de las opciones para mejorar la eficacia de los hongos entomopatógenos ha sido la combinación con insecticidas organosintéticos como imidacloprid, clorpirifos, propetamfos y ciflutrin (Kaakeh *et al.*, 1996; Pachamuthu *et al.*, 1999; Pachamuthu y Kamble, 2000). Asimismo, algunos otros productos como el ácido bórico pueden intensificar el poder infectivo de patógenos como *Bacillus thuringiensis* (Tanada y Kaya, 1993) y *Metarhizium anisopliae* (Zurek *et al.*, 2002).

Los estudios de compatibilidad *in vitro* entre entomopatógenos e insecticidas se han dirigido sobre todo para el control de plagas agrícolas, pero aún no se han evaluado ampliamente para el control de *Blattella germanica*. Esta integración de agentes biológicos con concentraciones subletales de insecticidas puede reducir la contaminación de los hábitats urbanos, mejorando la seguridad del hombre (Pachamuthu *et al.*, 1999; Pachamuthu y Kamble, 2000; Zurek *et al.*, 2002). En esta investigación se planteó entender las interacciones de un cebo formulado con azúcar glas como fagoestimulante, dosis subletales de ácido bórico y esporas de hongos entomopatógenos para evaluar su potencial sobre *Blattella germanica*.

Objetivo general

Determinar el efecto del ácido bórico, sacarosa como fagoestimulante y los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre su actividad patogénica contra *Blattella germanica*.

Objetivos específicos

- Determinar la patogenicidad de aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre ninfas y adultos de *B. germanica* en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el efecto del ácido bórico sobre la actividad patogénica de *M. anisopliae* y *B. bassiana*.
- Determinar la efectividad de cebos formulados con diferentes concentraciones de ácido bórico y esporas de *M. anisopliae* y *M. pingshaense*, contra ninfas de quinto ínstar de *B. germanica*.

Hipótesis

La combinación de hongos entomopatógenos, ácido bórico y un fagoestimulante en un cebo contribuye a incrementar la actividad de virulencia de estos agentes de control biológico, al incrementar mortalidad y reducir el tiempo letal medio (TL₅₀), sobre *Blattella germanica*.

CAPÍTULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Las cucarachas. Las cucarachas son los insectos más primitivos que existen, se sabe que han estado presentes en la tierra desde hace aproximadamente 350 millones de años, a partir del periodo Siluriano, y comparten el mismo ancestro común con los mántidos y las termitas (Brenner, 2002). Las cucarachas se clasifican dentro del Orden Blattaria y la mayoría de especies no están directamente asociadas con el hombre, solo algunas han evolucionado en proximidad a los asentamientos humanos. Sus hábitos omnívoros han contribuido a su estrecha relación física entre poblaciones con los seres humanos (Appel, 1995).

Hay más de 4,000 especies de cucarachas en el mundo, alrededor de 50 se encuentran en interacción con humanos, 17 de estas especies son plagas con diferentes grados de importancia económica y cinco familias de especies de cucarachas son consideradas plagas domésticas e incluyen a la mayoría de especies de las familias Blattidae, Blattellidae y Blaberidae y solo algunos miembros de las familias Polyphagidae y Cryptocercidae, que raramente llegan a ser considerados como plagas urbanas (Bennett *et al.*, 1997).

1.1.1 Descripción de *Blattella germanica*. La cucaracha alemana, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae), procede de África o de Asia, pero se ha diseminado mediante el intercambio comercial a todo el mundo. Es de color café claro, los adultos miden de 10 a 16 mm de largo y tiene antenas largas. Esta especie se distingue por tener 2 líneas oscuras en el pronoto. Requiere de condiciones húmedas y cálidas (30 a 33 °C)

próximas a alimento. Principalmente se encuentran en ambientes urbanos como cocinas y alacenas, con focos secundarios en baños y otras estructuras (Brenner, 2002). Su alta capacidad adaptativa alimenticia (omnívora) y de comportamiento la hace una de las plagas más resistentes a plaguicidas (Bennett *et al.*, 1997).

1.1.2. Biología y reproducción. *Blattella germanica* se caracteriza por ser un insecto hemimetábolo, es decir, de metamorfosis incompleta y su ciclo de vida presenta tres estados de desarrollo: huevo, ninfa y adulto. Los sexos pueden separarse fácilmente porque existe dimorfismo sexual, la hembra presenta una coloración oscura y es de mayor tamaño (Ross y Mullins, 1995).

Huevo. La cápsula de huevos u ooteca se parece a una pequeña bolsa esclerosada, color marrón. Mide 8 mm de largo, 3 mm de alto, y 2 mm de ancho. Los embriones se encuentran en compartimentos individuales, dos en cada lado en la ooteca a excepción de los huevos individuales que están en los extremos. Las ootecas se comprimen lateralmente, son convexas en la superficie exterior y planas en la superficie interior. Poseen pequeños espacios de aire con aberturas a la superficie exterior o en forma de quilla, que proporcionan aire a los embriones que se desarrollan dentro (Bennett *et al.*, 1997).

El número de embriones en el interior de una ooteca varía con la cepa de cucarachas, la edad de la hembra y de las condiciones del medio ambiente. El número de embriones presente en la primera y segunda ootecas de una hembra es generalmente similar, pero tiende a disminuir a partir de la tercera, cuarta y quinta, donde frecuentemente tienen menos de 30 embriones.

La ooteca permanece unida al cuerpo de la hembra hasta que las ninfas se incuban y son liberadas poco antes del periodo embrionario que va de 20 a 30 días; sin embargo, en algunas ocasiones las ninfas neonatas pueden romper la ooteca, mientras aún está pegada al cuerpo de la hembra. Normalmente una ooteca llega a producir de 30 a 40 ninfas y las hembras durante su vida producen alrededor de 4 a 8 ootecas, aunque algunas de éstas serán infértiles (Ross y Mullins, 1995).

Ninfa. Esta especie presenta 5 a 6 instares ninfales e infrecuentemente exhibe un séptimo instar, el cual se puede presentar por la pérdida de antenas o patas durante los primeros estadios. El número de mudas de *B. germanica* se determina a partir de la tercera etapa ninfal, donde las cucarachas son relativamente pequeñas. La etapa de ninfa tiene una duración de aproximadamente 50 a 60 días en condiciones normales y es afectada por la variación de la temperatura (Ross y Mullins, 1995).

Adulto. Los adultos emergen de la última muda ninfal, y existe un claro dimorfismo sexual entre macho y hembra. La maduración sexual de ambos sexos ocurre en los primeros 7-10 días del estado adulto. Los machos son de color amarillo marrón, de abdomen largo y delgado que frecuentemente se extiende más allá de las alas. Las hembras tienen alas oscuras con pelos que cubren totalmente el abdomen. Las hembras son receptivas a los 5-6 días de la muda. Los machos copulan varias veces y las hembras sólo una sola vez (Cochran, 1989). Las hembras presentan mayor longevidad, la cual varía de 140 a 280 d; en cambio, los machos viven aproximadamente de 90 a 140 d (Ross y Mullins, 1995).

Uno de los rasgos más interesantes y significativos evolutivamente de la biología en las cucarachas es la reproducción. Estos insectos forman una estructura de protección denominada ooteca y de acuerdo al tipo de reproducción pueden clasificarse en

ovíparas, ovovivíparas y vivíparas. *B. germanica* presenta una reproducción ovípara. La hembra retiene la ooteca dentro de su cámara genital y se distingue porque es mucho menos rígida que la de otras cucarachas; además, es permeable al agua, la cual es proporcionada por la hembra para conservar la viabilidad de los embriones. Posteriormente, la hembra deposita la ooteca sobre un sustrato bajo condiciones de alta humedad para que suceda la eclosión, la emergencia de las ninfas y de esta manera evitar muerte por desecación (Roth, 1985).

1.1.3. Comportamiento y hábitat. *B. germanica* es muy activa principalmente durante el atardecer y la noche, ya que permanece en sus refugios durante los períodos diurnos. La cucaracha alemana segrega un semioquímico que genera la atracción de una colonia de su especie, denominado feromona de agregación, el cual hace que los individuos de esta especie manifiesten un comportamiento gregario. Los individuos con este tipo de comportamiento regularmente se encuentran en agregaciones multigeneracionales de la misma especie (Bennett *et al.*, 1997).

La cópula en la cucaracha alemana es precedida por un complejo comportamiento de cortejo que es vital para el apareamiento. Los sexos se unen por medio de una feromona sexual volátil emitida sólo por las hembras receptivas, las cuáles muestran un comportamiento típico de llamado. Tras el contacto de las antenas del macho con la cutícula de la hembra, éste muestra el cortejo característico, se rota 180° en posición opuesta a la hembra y levanta sus alas, para exponer las *glándulas tergaes* dorsales; que sirven como reservorios de nutrientes en el séptimo y octavo terguitos, y dirige estas glándulas a antenas de la hembra y los órganos gustativos. Las secreciones de estas glándulas (proteínas, lípidos y azúcares) sirven como atrayentes y fagoestimulantes (Metzger, 1995).

Cuando el macho monta a la hembra esta se alimenta de la secreción, y se coloca en una posición adecuada para la cópula y el macho se fija mediante broches caudales de la genitalia de la hembra. El proceso de la cópula se realiza en una hora o más y durante este tiempo se forma un espermátforo, el cual es pasado a la cámara genital de la hembra (Metzger, 1995; Eliyahu, 2009).

La cucaracha alemana afecta la economía porque tiene hábitos alimenticios omnívoros y por su amplia distribución. Los hábitos omnívoros de las cucarachas son posibles porque poseen enzimas denominadas celulasas endógenas, producidas por bacterias y protozoarios endosimbióticos metanogénicos ubicados principalmente en su intestino medio. Estos protozoarios les permiten sintetizar moléculas complejas como la celulosa. Los microbios están densamente empaquetados dentro del intestino, pero de una manera predecible de disposición espacial, la comida se procesa secuencialmente por grupos de microbios específicos.

Los ácidos grasos volátiles (AGV) están presentes en el intestino grueso, lo que sugiere la degradación de celulosa y otros polisacáridos vegetales. La pared del intestino posterior de las cucarachas es permeable a los ácidos orgánicos, lo que indica que las cucarachas pueden beneficiarse directamente de los productos de la fermentación microbiana (Sabree *et al.*, 2009).

1.1.4. Importancia económica y médica de *Blattella germanica*. La cucaracha alemana es la especie sinantrópica más abundante y con una distribución cosmopolita (Schal y Hamilton, 1990). Se ha encontrado en todos los continentes en asociación con los humanos, su comida y su basura. Esta especie prefiere hábitats con abundante humedad (Appel, 1995).

Su principal característica, que les infiere la importancia económica como plagas en áreas urbanas, se debe a que infestan los lugares que habitan los seres humanos y sus áreas de trabajo, representando una asociación más íntima y crónica que la mayoría de las otras plagas de importancia médico-veterinaria (Milner y Pereira, 2007).

Altas poblaciones de cualquier especie de cucaracha puede afectar adversamente la salud humana en varias formas. Estas incluyen, contaminación de alimentos con sus excrementos, diseminación de patógenos, inducción de alergias y estrés psicológico (Brenner, 1995, 2002; Bennett, 1997).

La cucaracha alemana lleva consigo un sinnúmero de organismos patógenos (Brenner, 1995) y los puede transferir a los alimentos y superficies que tocan, además de las heces fecales que dejan a su paso. Sin embargo, el riesgo para la salud asociado con la mayoría de infestaciones de cucarachas es la producción de alérgenos. Estos alérgenos se acumulan y son transportados por el aire, e inhalados por los residentes (Brenner, 2002).

La importancia médica de *B. germanica* es controversial, a pesar de tener la capacidad para transportar **bacterias** (*Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella bredeny*), **hongos** (*Aspergillus niger*, *Mucor* sp, *Geotrichum candidum*), **protozoarios** (*Entamoeba histolytica*, *Giardia* sp), **helmintos** (*Ascaris* sp, *Enterobius vermicularis*) y **virus** (Poliomielitis, Hepatitis) nocivos en humanos no necesariamente quiere decir que funge como vector (Brenner, 1995). Aislar patógenos de las cucarachas, simplemente es indicativo de la fauna y flora microbiana en los alrededores del ambiente doméstico. No obstante, puede causar disturbios psicológicos y diferentes niveles de estrés mental (Milner y Pereira, 2007).

1.2 Manejo de *Blattella germanica*

El control de las poblaciones de cucarachas se ha logrado principalmente con el uso de insecticidas residuales de contacto, inhibidores metabólicos y reguladores de crecimiento con diferente grado de toxicidad, que se aplican en sus sitios de refugio o zonas de forrajeo (Schal y Hamilton, 1990).

El uso reiterado o continuo de estos insecticidas a menudo ha resultado en el desarrollo de la resistencia en poblaciones de cucarachas (Schal y Hamilton, 1990; Zurek *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2004). La resistencia a los insecticidas es un obstáculo importante en la aplicación de programas de manejo integrado de esta plaga. El aumento de los niveles de resistencia a los insecticidas ocasiona tratamientos múltiples y cantidades excesivas de aplicaciones, que han generado preocupaciones por la salud humana y el ambiente. Además, el número de insecticidas aprobados para combatir estos insectos probablemente se reducirá en el futuro por la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU., la Comisión Reguladora en la Unión Europea y por la Ley de Control de Agroquímicos de Corea del Sur (Chang *et al.*, 2012).

Estos problemas fundamentan la necesidad para el desarrollo de alternativas de control de *B. germanica*, particularmente a los insecticidas con acción fumigante, por lo difícil de alcanzar los refugios profundos y que muchos de estos no se pueden aplicar en entornos sensibles, como los lugares públicos, instalaciones industriales de alimentos y hospitales (Schal y Hamilton, 1990; Zurek *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2012). Aunque se han realizado propuestas para la inclusión de agentes de control biológico, la colocación de trampas y cebos tóxicos que puedan integrarse en programas de manejo de cucarachas, aún no son de uso difundido. Sin embargo, el potencial existe y se debe buscar mejoras en las formulaciones que permitan incluir a estas alternativas de control (Quesada-Moraga *et al.*, 2004).

1.2.1. Insecticidas convencionales. Los insecticidas convencionales son productos de origen químico u orgánico, formulados con ingredientes de diferentes modos de acción. Los más empleados en el manejo de cucarachas son los de acción neurotóxica, que afectan su sistema nervioso, causándoles fallas locomotoras y respiratorias. Otros son los inhibidores metabólicos, que entran al intestino durante la ingestión y son absorbidos dentro del cuerpo donde actúan sistemáticamente, afectando el sistema nervioso u otros procesos fisiológicos. Además, estos pueden actuar por contacto, produciéndoles un efecto de derribo en un tiempo corto (dos minutos o menos), mientras que los efectos crónicos que producen, se manifiestan en periodos más prolongados (una hora a varios días) y generalmente finalizan con la muerte del insecto (Rust, 1995).

Dentro de los insecticidas que se utilizan para el control de *B. germanica* se incluyen a los organofosforados, carbamatos, insecticidas de origen botánico como piretrinas y piretroides, también otros compuestos como; hidrametilona, sulfuramida y reguladores del crecimiento, cuyas formulaciones incluyen polvos humectables, concentrados emulsionables, aerosoles para hendiduras, polvos y cebos (Schal y Hamilton, 1990; Rust, 1995; Gondhalekar y Scharf 2012). Sin embargo, varios factores como el estado de desarrollo, sexo, capacidad reproductiva y status nutricional pueden influir en la toxicidad de los insecticidas y mortalidad de los insectos (Suiter *et al.*, 1993; Ross, 1997). Abd-Elghafar *et al.* (1990), señalan que la acción de los insecticidas es afectada por el sexo de las cucarachas y con sus estudios comprobaron que las hembras no grávidas de *B. germánica* son más tolerantes a la aplicación de insecticidas como amidinohidrazonas, carbamatos, organofosforados, piretroides y piretrinas que los machos, ya que estos fueron más susceptibles a dichas aplicaciones. De igual manera, Koehler *et al.* (1993) reportaron que los últimos instares ninfales de *B. germanica* fueron más tolerantes a los insecticidas Bendiocarb, Cipermetrina y Clorpirifos que los adultos y que las hembras

adultas son más resistentes a estos insecticidas que los machos. Ellos concluyeron que la susceptibilidad de las ninfas se debe a las diferencias de peso, tipo de insecticida y cepa de la que provienen.

Qian *et al.* (2010), realizaron pruebas con los insecticidas Diclorvos y Propoxur con aplicaciones tópicas a una población colectada en campo de *B. germanica*. Ellos demostraron que las ninfas de seis semanas de edad fueron más tolerantes a la acción de estos productos que los individuos de otras edades (ninfas de cuatro y cinco semanas). Esto se debe a que la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) decrece conforme aumenta la edad de las cucarachas.

Dentro de los insecticidas empleados para el control de cucarachas, también podemos mencionar a los reguladores del crecimiento, que pueden ser utilizados en el control de esta plaga para evitar que las ninfas de cucarachas lleguen al estado adulto. Entre los reguladores de crecimiento más utilizados se encuentran los análogos de la hormona juvenil y los inhibidores de la síntesis de quitina. Los análogos de la hormona juvenil regulan la maduración morfológica y el proceso de reproducción del insecto. Son específicos de artrópodos, tienen una baja toxicidad a mamíferos y son efectivos a bajas concentraciones. Entre estos compuestos se mencionan al hidropreno y el fenoxicarb. Los inhibidores de la síntesis de quitina evitan la formación normal de quitina durante la muda. Los machos que pasan al estado adulto usualmente tienen una vida corta; mientras que las hembras tienden a abortar las ootecas. Ejemplos de algunos inhibidores en el mercado son las polioxinas y benzoilfenilureas (Rust *et al.*, 1995).

1.2.2. Insecticidas inorgánicos y polvos. Los insecticidas inorgánicos comenzaron a utilizarse antes y durante la segunda Guerra Mundial para el control de cucarachas. Entre los compuestos más utilizados se encuentran los que contienen boro y flúor;

principalmente bórax, ácido bórico y el fluoruro de sodio, los cuales han sido formulados y aplicados en forma de polvos en los refugios de *B. germanica* (Appel, 1986).

El ácido bórico (H_3BO_3) es un polvo no volátil, y es de acción lenta cuando se ingiere (aplicado como polvo fino o en solución diluida), daña la cutícula de las cucarachas, debido a que es un potente abrasivo y les puede causar severas heridas en el epitelio de su intestino medio, matándolas a través de la interferencia en la absorción de nutrientes o reducción cuticular de lípidos, lo que les provoca desecación. Estos efectos son causados principalmente en adultos, ya que las ninfas pueden acelerar el proceso de muda, con lo cual evitan que el polvo se adhiera a la cutícula y les pueda causar la muerte. Además el uso del ácido bórico ofrece las ventajas de no ser absorbido a través de la piel y su toxicidad en mamíferos es relativamente baja, lo que ha contribuido a su favorable historial de seguridad como insecticida (Habes, 2006).

Otro material con propiedades insecticidas empleado para el control de *B. germanica* es la sílica inorgánica, que tiene la capacidad de absorber la humedad, lo que reduce los lípidos cuticulares y causa desecación en el insecto blanco (Appel, 1990). En investigaciones realizadas por Ebeling (1971) y Akbar *et al.* (2004) se indicó que la toxicidad de las diatomáceas depende principalmente de sus propiedades físicas, y no de su composición química. Faulde *et al.* (2006) concluyen que la absorción eficaz de los lípidos y ácidos grasos epicuticulares de los insectos son el principal modo de acción de los polvos formulados con tierras diatomeas, que provocan la desecación de los artrópodos. Los polvos inorgánicos presentan ventajas como larga duración, bajo olor, que no son volátiles, son estables, no se absorben en superficies porosas como papel y madera, además no generan repelencia (Appel *et al.*, 2004).

1.2.3. Cebos y Atrayentes Los cebos son mezclas de insecticidas con alimento o agua que atraen a las cucarachas y las matan después de que comen o beben en pequeñas porciones, o bien, son combinaciones de insecticidas con comida, olor o feromona que mata a los insectos atraídos si entran en contacto con el ingrediente activo (Reierson, 1995). Los cebos para el control de cucarachas se han evaluado por décadas, y pueden reducir la dependencia del uso de tratamientos a base de polvos y aerosoles.

Cebos que contienen algún ingrediente activo de insecticidas se han empleado extensivamente en el control de cucarachas en forma de “estaciones cebadas”, éstas se colocan dentro y fuera de las áreas afectadas para reducir la exposición humana a los agentes químicos (Reierson, 1995). Otras formulaciones de cebos en gel o en pasta se usan en puntos más dirigidos, como hendiduras y grietas o rendijas, para hacerlas inaccesibles al contacto con niños y mascotas (Gore y Schal, 2004). Algunos compuestos inorgánicos, tales como sulfato de talio, arsénico y fósforo, además del ácido bórico, bórax y el fluoruro de sodio se han utilizado en los cebos, los cuales han sido mezclados con comida o agua y colocados en los sitios donde se encuentran o refugian las cucarachas (Reierson, 1995).

Los cebos tóxicos en gel se utilizan cada vez más para controlar poblaciones de cucarachas. Para ser eficientes, las formulaciones en gel deben ser apetecibles y no repelentes, fáciles de consumir y con suficiente toxicidad. El nivel de explotación de una fuente alimenticia depende de las necesidades nutricionales del recolector, así como de los factores externos no relacionados tales como la ubicación, la cantidad, la calidad, la accesibilidad y los factores ambientales como temperatura, luz, humedad y olores (Durier y Rivault, 2003).

B. germanica consume una amplia gama de alimentos. Una fuente de alimento puede ser explotada, ya sea por un individuo o como generalmente es el caso, por un grupo de cucarachas. La probabilidad de interacciones agresivas se incrementa cuando el número de cucarachas que se alimentan juntas aumenta (Reierson, 1995).

Gore y Schal (2004) evaluaron en laboratorio soluciones de ácido bórico y azúcares en diferentes concentraciones para el control de *B. germanica*. Ellos determinaron la efectividad de tres boratos (tetraborato de sodio, octaborato disódico tetrahidratado y ácido bórico) a las concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5%. En concentraciones mayores al 2% de ácido bórico el tiempo letal TL_{90} se redujo a 4 días, mientras que para el tetraborato y el octaborato el TL_{90} fue de 6 y 7 días respectivamente. Los mismos autores probaron la efectividad de monosacáridos y disacáridos como fagoestimulantes, ellos expusieron machos o hembras de *B. germanica* durante 24 o 48 horas para elegir entre un vial con agua limpia y otro con 0.1 M de 13 azúcares (como la fructosa, sacarosa, maltosa, glucosa, ribosa, xilosa, galactosa y trealosa, entre otras), combinadas con ácido bórico al 1%. La maltosa y la sacarosa ocasionaron que los insectos consumieran cantidades letales de ácido bórico durante las 24 horas en las que estuvieron expuestos. El control fue sometido a soluciones de ácido bórico de 0.5, 1.0 y 2.0 % sin azúcares, causando una mortalidad con $TL_{90}=5.8$ días en la combinación con el ácido bórico 2% y los valores de TL_{90} rebasaron los 15 días al disminuir la concentración de ácido bórico. Los autores seleccionaron concentraciones de 0.01 al 2.0 M de los azúcares (maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa) para combinarlas en un cebo en solución acuosa con ácido bórico a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0%. En sus resultados observaron que con las combinaciones de ácido bórico al 2%, y concentraciones de azúcar mayor a 1 M, los cebos fueron rechazados por las cucarachas y en consecuencia se incrementaron los valores de TL_{90} . Los tratamientos con sacarosa y maltosa fueron los más efectivos para causar mortalidad.

1.3. Control biológico de cucarachas. El control de insectos en áreas urbanas es deseable pero la exposición a insecticidas químicos en los hogares y jardines es de gran inquietud para el público. El problema es que hay muy pocas alternativas biológicas a los insecticidas químicos disponibles para el uso público (Quesada-Moraga *et al.*, 2004). En ambientes urbanos, las cucarachas no se encuentran asociadas a sus enemigos naturales, y sus poblaciones son reguladas principalmente por los factores abióticos y algunos patógenos que han logrado coevolucionar (Schal y Hamilton, 1990).

Se han descubierto formas de control biológico para el manejo de cucarachas como el uso de los parasitoides *Comperia merceti* (Himenóptera: Evaniidae) y *Aprostocetus hagenowii* (Himenóptera: Eulofidae), avispas parasíticas o parasitoides, nematodos entomofílicos, bacterias, virus, protozoarios depredadores y hongos entomopatógenos (Milner y Pereira, 2007). Los patógenos de insectos son una alternativa posible al uso común de los insecticidas altamente tóxicos. La literatura sobre los patógenos de cucarachas fue revisada por Suiter (1997), él concluyó que la patogenicidad de muchos de los patógenos descritos no se ha probado en campo, y que los agentes con más potencial para el control de estas plagas son los hongos por su dispersión pasiva, seguridad al ambiente, su alto potencial de especificidad y porque no son detectados en los hogares.

1.3.1 Hongos entomopatógenos. La cucaracha alemana contribuye significativamente al asma infantil, la transmisión de patógenos entéricos, y disminución de bienestar psicológico. La forma más eficiente para superar estos problemas asociados con la cucaracha alemana es a través de un control eficaz. Sin embargo, la resistencia a los insecticidas es un factor limitante en el control eficiente de esta plaga (Zurek *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Lopes y Alves, 2011).

El uso de insecticidas biológicos basados en hongos entomopatógenos resulta ser una alternativa potencial para el manejo de poblaciones de *B. germanica*, porque son inócuos para el ser humano, no hay reportes de que generen resistencia en las poblaciones de esta plaga, pueden ser agregados a formulaciones en cebos (Lopes y Alves, 2011), tienen la capacidad de ser transmitidos de cucarachas enfermas a insectos sanos mediante la coprofagia lo que puede facilitar su diseminación a las poblaciones (Kaakeh *et al.*, 1996).

Los hongos entomopatógenos requieren de una humedad alta para poder infectar a su huésped, por lo que las epizootias naturales son más comunes durante condiciones de alta humedad (Tanada y Kaya, 1993). Estos microorganismos actúan por contacto, ya que causan la patogenicidad por invasión a través del integumento del insecto, por medio de la adhesión de las unidades infectivas (conidia y espora) a la superficie cuticular. En condiciones favorables de humedad y temperatura (H.R. $\geq 70\%$ y 27-32°C) las esporas que logran alcanzar al insecto forman un tubo germinativo, buscando puntos que faciliten su penetración. Esta penetración es ayudada por la formación de células apresoriales, mismas que ejercen presión física sobre el exoesqueleto, además de la producción de enzimas proteolíticas, proteasas, quitinasas y lipasas, que pueden degradar la cutícula y entrar en forma mecánica y actuar de manera sinérgica para digerir y penetrar la epicutícula (Ferron, 1978; Hajek y St. Leger, 1994).

Las principales áreas de penetración son la región bucal, el ano, las regiones intersegmentales y los espiráculos, sitios donde existe alta humedad que promueve la germinación de las esporas y permite la fácil penetración de las hifas. Posteriormente ocurre la invasión del hemocele y tejidos, que se produce a través de cuerpos hifales entre las 24 y 48 horas siguientes, lo cual finaliza con la muerte del hospedante, debido a las micotoxinas segregadas y a los daños mecánicos; luego producen sustancias

bactericidas que permiten el crecimiento de hifas en el cadáver, aprovechando los nutrientes para su desarrollo y esporulación al exterior (Hajek y St. Leger, 1994).

Dentro de los hongos entomopatógenos se encuentran especies que han sido clasificadas como generalistas (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) y específicas (*Aschersonia aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii*, *Entomophthora* spp) (Tanada y Kaya, 1993). Se considera que los hongos generalistas tienen la capacidad de infectar diferentes órdenes de insectos, mientras que en los específicos, la actividad se restringe a una especie, familia o un grupo de insectos. Los estudios han demostrado que los hongos entomopatógenos Hyphomycetes producen toxinas insecticidas importantes. Una toxina microbiana se puede definir como un veneno biológico derivado de un microorganismo; la mayoría de estas toxinas producidas por los patógenos son péptidos, pero varían ampliamente en términos de estructura, toxicidad y especificidad. Los diferentes efectos de las toxinas producidas por *B. bassiana* y *M. anisopliae* se han observado sobre diferentes especies de insectos.

1.3.1.1 Aplicación de *Beauveria bassiana* en el manejo de la cucaracha alemana. *B. bassiana* es un hongo entomopatógeno con un amplio rango de hospederos con incidencia más común que *Metarhizium* sp., en los trópicos, condiciones que comparte con el desarrollo de la cucaracha alemana. Además, se ha reportado infectando a la cucaracha americana (*P. americana*) y a *B. germanica* (Mohan *et al.*, 1999).

Se sabe que *Beauveria* produce toxinas de naturaleza peptídica, (beauvericina, beauverolide H, bassianolide, isarolide A, B, y C) a las que les atribuyen propiedades insecticidas y antimicrobiales. En cuanto a los efectos producidos por las toxinas, se ha observado que éstas influyen sobre una serie de aspectos fisiológicos del insecto e incitan una progresiva degeneración del tejido a causa de la deshidratación de sus

células. Se ha señalado que tales toxinas, además de producirle la muerte al insecto, pueden alterar procesos vitales en la metamorfosis y en la fecundidad (Taborsky, 1992). Zukowski y Bajan (1996) examinaron la patogenicidad de cepas de *Beauveria bassiana* contra *B. germanica*, el estudio incluyó cepas obtenidas por pases o reaislamientos de la cucaracha alemana. La aplicación de los tratamientos se realizó vía oral, utilizando cucarachas de diferentes sexos, adultos y ninfas de diferentes edades. Estos autores señalaron diferencias en la patogenicidad de las cepas de *B. bassiana* sobre las poblaciones estudiadas. El porcentaje de mortalidad de las cucarachas lo atribuyeron a las propiedades patogénicas de las cepas, la concentración de esporas de hongos en el alimento y al sexo de los insectos. Además, indicaron que las cepas reaisladas de *B. germanica* fueron más eficaces en su acción sobre las cucarachas que antes de los pases.

Steenberg *et al.* (1998) trabajaron con aislamientos pertenecientes a seis especies de hyphomycetes (*Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* (=Isaria) *fumosoroseus*, *Paecilomyces farinosus* (=Isaria *farinosa*) y *Verticillium* (=Lecanicillium) *lecanii*) seleccionados por ser infectivos contra cuatro especies de cucarachas sinantrópicas (*B. germanica*, *B. orientalis*, *P. americana* y *S. longipalpa*). Ellos reportaron que todos los aislamientos fúngicos fueron infectivos, pero *B. orientalis* fue notablemente menos susceptible, comparada con las otras especies. A su vez Indicaron que *M. anisopliae* (aislado de un escarabajo) fue más virulento en ninfas, hembras y machos de *B. germanica*, comparados con el homólogo de *I. fumosoroseus*. Adicionalmente señalaron que para ambas especies de hongos, las hembras de *B. germanica* fueron menos susceptibles a la infección que los machos. Sin embargo, la esporulación de los cadáveres de hembras adultas fue significativamente más alta para *P. fumosoroseus*, que produjo 10 veces más *conidia* por cadáver, comparado con *M. anisopliae*.

Mohan *et al.* (1999) evaluaron la patogenicidad de tres aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *P. americana*, basándose en los hábitos gregarios de estos insectos, para promover una infección inicial y una subsecuente diseminación. Zukowski *et al.* (1999) evaluaron la susceptibilidad de *B. germanica* con una aplicación mixta de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *I. farinosa*. En la primera etapa del experimento las cucarachas fueron infectadas con esporas de *B. bassiana* y más tarde con esporas de *I. farinosa* con una secuencia de tiempo de 24 y 72 horas. La mortalidad de las cucarachas infectadas con hongos de dos especies diferentes fue mayor que en los insectos infestados con un solo hongo. Sin embargo, estos autores reportaron un efecto muy lento causando mortalidad de 90% en hembras y 100% en machos después del transcurso de 50 días.

1.3.1.2 Aplicación de *Metarhizium anisopliae* en el manejo de la cucaracha alemana.

Pocos estudios han examinado el potencial de *Metarhizium anisopliae* como agente de control de insectos de importancia urbana, tales como termitas, hormigas y cucarachas (Kaakeh *et al.*, 1997). *M. anisopliae* es un ejemplo de un hongo que afecta ciertas especies de cucarachas. Este hongo se ha administrado a cucarachas por un número de métodos, incluyendo la aplicación directa por aspersión tópica, inmersión, inyección y por la aplicación del hongo en lugares donde viven los insectos (Kaakeh *et al.*, 1996, 1997; Pachamuthu y Kamble, 2000; Zurek *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Lopes y Alves, 2011).

Kaakeh *et al.* (1996) reportaron de 26 a 30 días para obtener una mortalidad del 90% con *M. anisopliae*, probado en la cucaracha alemana, por el método de contacto. Ellos utilizaron la cepa del producto comercial Bio-Path® por EcoScience Corp. (Worcester, MA). Debido a la acción lenta de este hongo, la formulación comercial de *M. anisopliae* estuvo a la venta por algunos años y después se discontinuó (Pachamuthu y Kamble,

2000). Kaakeh *et al.* (1996) evaluaron la transmisión horizontal de *M. anisopliae* y el insecticida hidrametilona en poblaciones de ninfas de la cucaracha alemana. Estos autores reportaron que la principal vía de transmisión horizontal fueron las heces fecales contaminadas con ambos agentes. Esto lo demostraron combinando las heces contaminadas con la dieta de laboratorio de las cucarachas, y exponiendo a insectos sanos a su ingesta. Ellos reportaron mortalidades acumuladas de 100% (registrada a los 28 días) y un valor del TL₅₀ de 10.1 días para *M. anisopliae*, y de 12.5 días para la hidrametilona. Además, señalaron que la transmisión horizontal de ninfas muertas por ambos agentes causó una tasa de mortalidad más lenta y en menor proporción para *M. anisopliae* (77% de mortalidad y TL₅₀ de 20 d) y para la hidrametilona (67% de mortalidad y TL₅₀ de 14 d).

Kaakeh *et al.* (1997) evaluaron la actividad biológica del Imidacloprid, junto con *M. anisopliae*, sobre poblaciones mezcladas de ninfas y adultos de *Blattella germanica*. Estos autores reportaron mortalidades del 100% con las combinaciones de imidacloprid (500 ó 1000 ppm) más las concentraciones altas de *Metarhizium anisopliae* (2.5×10^7 y 2.5×10^9 esporas / mL) en un periodo de 17 días. Sin embargo, indicaron rechazo a los cebos de, y concluyeron que los cebos solos con ese insecticida tienen un potencial limitado para el manejo de la cucaracha alemana. A pesar de ello, consideraron que la combinación de *Metarhizium* y el insecticida pudieran tener un buen potencial de control, si ambos agentes se combinan en una formulación adecuada, que permita la dispersión del patógeno.

Pachamuthu *et al.* (1999) estimaron la virulencia de *M. anisopliae* (cepa Esc-1) sobre machos adultos de la cucaracha alemana, *B. germanica*, y su compatibilidad con insecticidas de uso comercial (propetanos, clorpirifos y ciflutrin). Ellos inocularon 1 µL de esporas (8×10^7 a 2×10^9 esporas/ mL), obteniendo un máximo de mortalidad de 86.3%

a la máxima concentración y reportan un valor de DL_{50} de 4.18×10^8 esporas/ mL. Además señalaron que la combinación de los insecticidas con *M. anisopliae* puede afectar negativamente su crecimiento y esporulación. Por lo tanto, recomiendan realizar estudios *in vitro* para seleccionar la concentración de insecticida adecuado que evite la inhibición en el desarrollo de este patógeno.

Zurek *et al.* (2002) combinaron la actividad del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* con el ácido bórico contra *B. germanica*. Estos autores realizaron aplicaciones tópicas de *M. anisopliae* y del ácido bórico de manera independiente. La concentración de 0.2 g de ácido bórico/m² causó una mortalidad del 100% en 15 días (TL_{50} = 5 días), mientras que las concentraciones más bajas 0.1, 0.05 y 0.25 mataron el 88, 38.5 y 9.5% respectivamente, durante los 28 días del bioensayo. La concentración más alta de *M. anisopliae* (0.40 g= 8.96×10^9 conidia/m²) eliminó al 92.5% de las cucarachas, mientras que la más baja (0.04= 8.96×10^8 conidia/m²) mató al 36.5%. Además, utilizaron diferentes combinaciones de ácido bórico y *M. anisopliae* o polvo de harina, aplicándose a una concentración alta (0.2g de ácido bórico x 0.4 g de hongo o de harina /m²), a concentración media (0.05g de ácido bórico x 0.4 g de hongo) y a concentración baja (0.025g de ácido bórico x 0.04 g de hongo/m²) y obtuvieron mortalidades más altas, que con su aplicación por separado, matando el 100% de los insectos en 8 días (TL_{50} = 3 días para la concentración alta y TL_{50} = 5 días para la concentración media).

Quesada *et al.* (2004) evaluaron cuatro concentraciones de esporas de la cepa EAMa 01/121-Su del hongo *M. anisopliae* sobre *B. germanica*. (4×10^6 , 4×10^7 , 4×10^8 y 4×10^9 esporas/ mL.) y reportaron una DL_{50} de 1.4×10^7 esporas/mL (56,000 esporas/cucaracha). Los valores más cortos de tiempos letales medios (TL_{50}) se obtuvieron a las dosis de 4×10^8 y 4×10^9 esporas/ mL respectivamente, con 14.8 y 5.3 días. Además, evaluaron la capacidad de transmisión de hongos entre cucarachas infectadas y sanas y reportaron

porcentajes de mortalidad de insectos infectados de 87.5% en una proporción de 1:10 (infectado: sano), con valor de TL_{50} de 12.2 días, lo que indicó que esa cepa se transmitió de manera horizontal y es posible que se propague rápidamente la infección en la población. También evaluaron el efecto de dosis subletales (DL_{50}) de *M. anisopliae*, realizando aplicaciones tópicas sobre la cucaracha alemana. De esta manera, este patógeno causó la reducción en el número de ootecas producidas (solo 46 a 49% respecto a testigo), viabilidad (48 - 85%) y nacimiento de ninfas de cada ooteca (22 - 35%).

Lopes y Alves (2011) encontraron diferencias de susceptibilidad en adultos y ninfas de *B. germanica* (L.) por *M. anisopliae*, a través de un experimento de virulencia del aislamiento ESALQ1037 (aislado de la hormiga de fuego *Solenopsis invicta*). Estos autores determinaron la patogenicidad del aislamiento mediante la exposición de los insectos a una superficie contaminada o en cebo comercial, combinado con esporas de *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio. Ellos indicaron valores de DL_{50} de $2,69 \times 10^5$ conidia por adulto, 15 días después de la inoculación, mientras que para las ninfas la mortalidad máxima fue inferior al 50%. Además, los cebos con esporas de *M. anisopliae* no tuvieron un efecto repelente sobre las cucarachas.

La mortalidad de adultos expuestos a los cebos fue inferior al 25%, y las ninfas no fueron susceptibles. Ellos concluyeron que la diferencia de susceptibilidad pudo relacionarse con la muda en la etapa de ninfa, que fue especialmente relevante cuando el patógeno se inoculó inmediatamente antes de la ecdisis o cuando el intervalo de tiempo entre ecdisis fue corto.

1.4 LITERATURA CITADA

- ABD-ELGHAFAR, S. F., A. G. APPEL AND T. P. MACK. 1990. Toxicity of several insecticide formulations against adult German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 83: 2290-2294.
- AKBAR W., J. C. LORD, J. R. NECHOLS, AND R. W. HOWARD 2004. Diatomaceous Earth Increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. J. Econ. Entomol. 97: 273-280.
- APPEL A. G. 1986. Smokybrown cockroaches, *Periplaneta fuliginosa* (Dictyoptera: Blattellidae), displaced from their harborages by red imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). Entomol. News 97: 61-62.
- APPEL A. G. 1990. Laboratory and field performance of consumer bait products for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control. J. Econ. Entomol. 83: 153-159.
- APPEL A. G. 1995. *Blattella* and related species. In: Rust K. M., J. M. Owens and D. A. Reiersen (Ed.), Understanding and Controlling the German cockroach. Oxford University Press Inc. pp: 1-20.
- APPEL A. G. 2004. Contamination affects the performance of insecticidal baits against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 97: 2035-2042.
- BENNETT W. G., J. M. OWENS AND R. M. CORRIGAN. 1997. Truman's scientific guide to pest control operations, 5ta ed. Advanstar communications. Cleveland OH. pp: 121-124.
- BRENNER J. R. 1995. Medical and Economic importance. In: Rust K. M., J. M. Owens and D. A. Reiersen (Ed.), Understanding and Controlling the German cockroach. Oxford University Press Inc. Cap 4 pp: 77-92.
- BRENNER J. R. 2002. Cockroaches (*Blattaria*). In: Mullen, G. and Durden, L. (Ed.), Medical and Veterinary Entomology. Academic Press, China. pp. 29-43.

- CHANG K. S., E. H. SHIN, C. PARK AND Y. H. AHN. 2012. Contact and fumigant toxicity of *Cyperus rotundus* steam distillate constituents and related compounds to insecticide-susceptible and resistant *Blattella germanica*. J. Med. Entomol. 49: 631-639.
- COCHRAN D. G. 1989. Monitoring for insecticide resistance in field collected strains of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 82: 336-341.
- COCHRAN D. G. 1995. Toxic effects of boric acid on the German cockroach. Experientia. 51: 561-563.
- DURIER V AND C. RIVAULT. 2000. Secondary Transmission of Toxic Baits in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 93: 434-440.
- EBELING W. 1971. Sorptive dust for pest control. Ann. Rev. Entomol. 16: 123-159.
- EBELING W., R. E. WAGNER AND D. A. REIERSON. 1966. Influence of repellency on the efficacy of blatticides. I. Learned modification of behavior of the German cockroach. J. Econ. Entomol. 59: 1374-1388.
- ELIYAHU D., S. NOJIMA, K. MORI AND C. SCHAL. 2009. Jail baits: how and why nymphs mimic adult females of the German cockroach, *Blattella germanica*. Anim. Behav. 78: 1097-1105.
- FAULDE K. M., J. J. SCHARNINGHAUSEN AND S. CAVALJUGA. 2006. Toxic and behavioral effects of different modified diatomeous earths on the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthóptera: Blattellidae) under simulated field conditions. J. Stored Products Res. 42: 253-263.
- FERRON P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. 23: 409-442.
- GONDHALEKAR, A. D. AND M. E. SCHARF. 2012 Mechanisms Underlying Fipronil Resistance in a Multiresistant Field Strain of the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Med. Entomol. 49: 122-131.

- GORE C. J. AND C. SCHAL. 2004. Laboratory Evaluation of Bóric Acid-Sugar Solutions as Baits for Management of German cockroach Infestations. *J. Econ. Entomol.* 97: 581-587.
- HABES D, S. MORAKCHI, N. ARIBI, J. P. FARINE, AND N. SOLTANI. 2006. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S- transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84: 17-24
- HAJEK E. A. R. AND J. ST. LEGER. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- KAAKEH W., B. L. REID, T. J. BOHNERT, AND G. W. BENNETT. 1996. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and Hydramethylnon among German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) *J. Entomol. Sci.* 31: 378–390.
- KAAKEH W., B. L. REID, T. J. BOHNERT AND G. W. BENNETT. 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). *J. Econ. Entomol.* 90: 473–482.
- KOEHLER P. G., C. A. STRONG, R. S. PATTERSON, AND S. M. VALLES. 1993. Differential susceptibility of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) Sexes and Nymphal Age Classes to Insecticides. *J. Econ. Entomol.* 86: 785-792.
- LOPES R. B. AND S. B. ALVES. 2011. Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L) (Blattodea: Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. *Neotrop. Entomol.* 40: 368-374.
- METZGER R. 1995. Chapter 3: Behavior. *In*: Rust, M.K.; J.M. Owens, D.,A. Reiersen (Ed.). *Understandings and Controlling the German cockroach*. New York: Oxford University Press, 1995. Cap 2: pp: 49-77.
- MILNER R. J., AND R. M. PEREIRA. 2007. Microbial Control of urban pests – cockroaches, ants and termites. *In*: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey, L. A. y Kaya, H. K. (Eds.) Academic Publishers. pp. 721-740.

- MOHAN M. C., A. K. LAKSHMI, K. U. DEVI. 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: 29-33.
- PACHAMUTHU P., S. T. KAMBLE AND G. Y. YUEN. 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 92: 340-346.
- PACHAMUTHU P. AND T. S. KAMBLE. 2000. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpirifos, propetamphos and cyflutrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 60-70.
- QUESADA-MORAGA E., R. S. QUIROS, P. V. GARCIA AND C. S. ALVAREZ. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 87: 51-58.
- QIAN K., X. Q. WEI, X. P. ZENG, T. LIU AND X. W. GAO. 2010. Stage dependent tolerance of the German cockroach, *Blattella germanica* for diclorvos and propoxur. *J. Insect Sci.* 10: 1-10.
- REIERSON A. D. 1995. Chapter 10: Baits and baiting. *In: Rust K. M., J. M. Owens and D. A. Reiersen (Ed.), Understanding and Controlling the German cockroach.* Oxford University Press Inc. pp: 231- 267.
- ROSS M. H. AND D. E. MULLINS. 1995. Chapter 2: Biology. *In: Rust, M.K.; J.M. Owens, D.,A. Reiersen (Ed.). Understandings and Controlling the German cockroach.* New York: Oxford University Press, 1995. Cap 2: P: 21-47.
- ROSS M. H. 1997. Evolution in behavioral resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) selected with a toxic bait. *J. Econ. Entomol.* 90: 1482-1485.

- ROTH L. M. 1985. A taxonomic revision of the genus *Blattella* Caudell (Dictyoptera: Blattaria: Blattellidae). *Scandin. Entomol.* 22: 1-221.
- RUST M. K. 1995. Chapter 7: Factors Affecting Control with Insecticides In: Rust, M. K., J. M. Owens, y D. A. Reiersen (Eds). *Understandings and Controlling the German cockroach*. New York: Oxford University Press, 1995. P: 149-170.
- SABREE Z. L., S. KAMBHAMPATIC, AND N. A. MORÁN. 2009. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 106: 19521–19526.
- SCHAL C. AND R. L. HAMILTON. 1990. Integrated suppression of synanthropic cockroaches. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 521-551.
- STEENBERG T., K. M. VAN JENSEN AND P. H. SMITS. 1998. Entomopathogenic fungi for control of German cockroach (*Blattella germanica*) and other synanthropic cockroaches. *Bulletin-OILB-SROP.* 21(4): 145-150.
- STRONG C. A., P. G. KOEHLER AND R. S. PATTERSON. 1993. Oral toxicity and repellency of borates to German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 1458-1463.
- SUITER D. R., KOEHLER AND R. S. PATTERSON. 1993. Age and Sex-related effects in German cockroaches fed an allopurinol diet (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Med. Entomol.* 30: 907-912.
- SUITER D. R., N. C. HINKLE. 1997. Biological suppression of synanthropic cockroaches. *J. Agricult. Entomol.* 14: 259-270.
- TABORSKY V. 1992. "Food and Agriculture Organizatica of the United Nations Rome". University of Agricultura Prague, Czechoslovakia. *FAO Agriculture Services Boletin No. 96 Cap 4.*
- TANADA Y AND H. K KAYA. 1993. Fungal infections. In: *Insect Pathology*. Ed. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 319-357pp.

- ZUKOWSKI K. AND C. BAJAN. 1996. The study of the usefulness of *Beauveria bassiana* in eradication of Cockroaches (*Blattella germanica*). Roczn Pzn. Panstw. Zakl. Hig. 47: 343-349.
- ZUKOWSKI K., C. BAJAN, E. POPOWSKA-NOWAK. 1999. The effect of infestation by mixed culture of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* on reduction in numbers of experimental culture *Blattella germanica* L. Rocz Panstw Zakl Hig. 50: 321-327.
- ZUREK L., D. W. WATSON AND C. SCHAL. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and Boric Acid against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Biol. Control 23: 296-302.

CAPÍTULO 2

Susceptibilidad de ninfas y adultos de *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) a *Metarhizium* (Ascomycota: Hypocreales) y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill

2.1 INTRODUCCIÓN

La cucaracha alemana, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae), representa alrededor del 80% de las infestaciones de cucarachas sinantrópicas en el mundo. Su habilidad de asociación con humanos y de contaminar los alimentos con sus heces y fluidos corporales hace a esta especie de importancia económica y médica (Brenner, 2002). *B. germanica* se controla principalmente con insecticidas organosintéticos (organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides), pero se han presentado casos de resistencia a estos productos en algunas poblaciones de esta especie (Pachamuthu y Kamble, 2000; Chai y Lee, 2010).

Para reducir el uso y la exposición a los plaguicidas en ambientes domésticos se han explorado estrategias de control biológico para el manejo de cucarachas, entre las cuales destaca el uso de los hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* (Gunner *et al.*, 1991; Andis, 1994; Pachamuthu *et al.*, 1999; Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Hernández-Ramírez *et al.*, 2007; Lopes y Alves, 2011) y *Beauveria bassiana* (Zukowski y Bajan, 1996; Mohan *et al.*, 1999; Hernández-Ramírez *et al.*, 2007). De estos trabajos se puede concluir que aunque *M. anisopliae* y *B. bassiana* tienen el potencial de ser agentes de control efectivo, su acción lenta ha limitado el uso eficaz de estos agentes bajo condiciones de campo. Se ha indicado inconsistencia en efectividad y variaciones de mortalidad de 17 a 100% en el uso de *B. bassiana* para el manejo de *P. americana* (Mohan *et al.*, 1999).

La cepa ESC-1 de *M. anisopliae* se formuló comercialmente como Bio-Path® para el control de cucarachas por Ecoscience, pero se interrumpió su comercialización debido a que ocasiona mortalidad inconstante. Al respecto, Kaakeh *et al.* (1996) informaron que esta cepa requiere 28 d para causar 85% de mortalidad sobre la cucaracha alemana. Por lo tanto, entender la biología y el comportamiento de las cucarachas es esencial para su manejo. Factores como el estado de desarrollo, el sexo, la capacidad reproductiva y el estado nutricional de los insectos, pueden influir en la toxicidad de los insecticidas (Suiter *et al.*, 1993; Ross, 1997) o la capacidad infectiva de los hongos entomopatógenos y como consecuencia causar inestabilidad y variaciones en la mortalidad de las cucarachas (Inglis *et al.*, 2001).

Las posibles limitaciones de los hongos entomopatógenos en el combate de *B. germanica* son superadas por sus ventajas, principalmente inocuidad al ser humano. Por estas razones, resulta necesario explorar la actividad patogénica de aislamientos de estos dos hongos entomopatógenos en ninfas y adultos de esta cucaracha. El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad en ninfas y adultos de *B. germanica* a *M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *B. bassiana* para seleccionar los aislamientos más virulentos sobre *B. germanica*.

2. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Insectos. El pie de cría de *B. germanica* se obtuvo de una cepa susceptible a insecticidas de la Universidad de Florida, Gainesville, FL. EE.UU., y se ha sido mantenido e incrementado por cinco años en el insectario del Posgrado en Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Las colonias se conservaron en recipientes de plástico (1.2 x 0.8 x 0.6 m), se les suministró agua en un bebedero de 500 mL, y en cada recipiente se colocaron nueve cilindros de cartón plisado (20 x 32 cm) para refugio de las cucarachas, estas se alimentaron con el producto comercial PROLAB 2500 Rodent

Diet®. La cría se mantuvo a 27 ± 2 °C, HR $\geq 60\%$ y fotoperíodo de 12:12 h (luz: oscuridad). Con el fin de obtener grupos de edad homogéneos, las hembras con ootecas se recolectaron y colocaron en un recipiente nuevo para esperar la emergencia de las ninfas.

Para el bioensayo se establecieron tres grupos de edades representativas en la población de *B. germanica*. El primer grupo incluyó a ninfas de 15 d de edad, este grupo se denominó **E1** (ninfas de segundo ínstar aproximadamente); el segundo grupo fueron ninfas de seis semanas de edad, **E2** (quinto ínstar aproximadamente) y el tercer grupo fueron adultos en proporción 1:1 (hembras y machos) de una semana de edad y se denominó **E3**.

Cuadro 1. Aislamientos de *Metarhizium* empleados en esta investigación.

Aislamiento	Clave	Huésped	Estado fisiológico	Origen
ETL	Ma1 [■]	<i>Metamasius spinolae</i>	Adulto	Tlalnepantla, Morelos
Destruxin	Ma2 [■]	Coleóptera y Homóptera	Adulto	Producto comercial LAVERLAM®
Meta-Savem	Ma3 [■]	Plagas rizófagas	—	CESAVEM *
GC 002	Ma4 [♦]	<i>Phyllophaga</i> sp.	Larva	Puruagua, Jerécuaro, Guanajuato, México
GC 001	Ma5 [♦]	<i>Phyllophaga</i> sp	Larva	Puruagua, Jerécuaro, Guanajuato, México
Saligreen	Ma6 [■]	<i>Aeneolamia postica</i>	Adulto	Producto de Colegio de Postgraduados
23 Col	Ma7 [■]	<i>Phyllophaga</i> sp.	Larva	Colima, México

■ *Metarhizium anisopliae*

♦ *Metarhizium pingshaense*

*Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México

2.2.2. Obtención del inóculo. Se emplearon cinco aislamientos de *M. anisopliae*, dos de *M. pingshaense* (Cuadro 1) y 12 de *B. bassiana* (Cuadro 2), estos se propagaron en el medio de cultivo SDAY (Sabouraud Dextrosa Agar + Extracto de Levadura 1%) y se incubaron durante 20 d a 25 ± 2 °C. Una vez que esporularon en el medio de cultivo, las esporas se recolectaron con un pincel sintético No.2 estéril (120 °C y 1.2 atm de presión). Con 0.3 g de esporas de cada aislamiento se preparó una suspensión en 10 mL de solución estéril de Tween 80® 0.03%.

Cuadro 2. Aislamientos de *Beauveria bassiana* utilizados en esta investigación

Aislamiento	Clave	Huésped	Estado fisiológico	Origen
Bb 107*	Bb1	Producto Comercial NOCON Cepa Col-P	-	Colima, México
A9 (Bb 88)	Bb2	<i>Periplaneta americana</i>	Adulto	Reaislado en laboratorio
A12 Pic	Bb3	<i>Metamasius spinolae</i>	Adulto	Tlalnepantla, Morelos
A7 (Bb 88)*	Bb4	<i>Hypothenemus hampei</i>	Adulto	Costa de Oaxaca
Bb 105 (GHA)	Bb5	Cepa GHA ®	-	Laverlam Corp. EE.UU.
A11 Pic	Bb6	<i>M. spinolae</i>	Adulto	Tlalnepantla, Morelos, México
A1 Pic	Bb8	<i>M. spinolae</i>	Pupa	Tlalnepantla, Morelos, México
A2 Pic	Bb11	<i>M. spinolae</i>	Larva	Tlalnepantla, Morelos, México
A10 Pic	Bb12	<i>M. spinolae</i>	Larva	Tlalnepantla, Morelos, México
GC 015	Bb13	<i>Phyllophaga sp</i>	Larva	S. J. Sabinos, Pénjamo, Guanajuato, México
GC 018	Bb14	<i>Phyllophaga sp</i>	Larva	S. J. Sabinos, Pénjamo, Guanajuato, México
A4 (GHA)*	Bb16	Cepa GHA ®	-	Laverlam Corp. EE.UU.

* Aislamientos monospóricos

Para homogeneizar las suspensiones, se agitaron vigorosamente usando un vórtex (Genie II®) durante 5 minutos. La concentración de las esporas de cada suspensión se determinó con una cámara de Neubauer y se ajustó a 2×10^8 esporas/mL. El porcentaje de germinación se cuantificó a las 24 h.

2. 2. 3. Virulencia de *Metarhizium* en tres edades de *B. germanica*. Siete aislamientos de *Metarhizium* (Cuadro 1) se evaluaron sobre los tres grupos de edades (E1, E2 y E3) de *B. germanica*. Para inocular a los insectos estos se inmovilizaron a -4 °C por 3, 5 y 7 min, respectivamente. La aplicación se realizó de manera tópica, depositando 2 μ L de la suspensión de esporas (2×10^8 esp/mL) entre las coxas posteriores de cada insecto. Se inocularon 10 cucarachas por tratamiento, en el testigo solo se trataron con 2 μ L de una solución de Tween 80® 0.03% estéril. Después de la aplicación, cada insecto se colocó de manera individual en recipientes de plástico de 150 mL con alimento, agua y refugio a 27 ± 2 °C y $60 \pm 10\%$ H.R. Cada recipiente previamente se perforó de la tapa y se cubrió con tela de organza para permitir la ventilación. La mortalidad se registró cada 24 h durante 20 d. Todo el experimento se repitió dos veces en el tiempo (n= 480 insectos).

2. 2. 4. Virulencia de *Beauveria bassiana* en tres edades de *B. germanica*. Con los 12 aislamientos de *B. bassiana* (Cuadro 2) se realizó la misma metodología descrita anteriormente para la obtención del inóculo y la evaluación de virulencia sobre los tres grupos de edad de *B. germanica*, bajo las mismas condiciones ambientales. La mortalidad se registró cada 24 h durante 20 d y todo el experimento se repitió dos veces en el tiempo (n= 780 insectos).

2.2.5 Dosis-Respuesta de *Metarhizium* aplicados a ninfas de quinto ínstar (E2) de *B. germanica*. Los aislamientos Ma2, Ma3, y Ma7 de *M. anisopliae* y Ma5 de *M. pingshaense* se seleccionaron por su virulencia y se probaron contra **quinto ínstar (E2)** de

B. germanica. Para preparar las suspensiones se utilizó la metodología descrita previamente. De cada aislamiento se prepararon cinco concentraciones de conidia (2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 , 2×10^9 y 2×10^{10} , esporas / mL) diluídas en 10 mL de Tween 80® 0.03% estéril. Para la inoculación, las cucarachas se inmovilizaron a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (durante 5 min) y se les aplicó tópicamente 2 μL de una suspensión de esporas entre las coxas posteriores de cada insecto. En el testigo, las ninfas se trataron con 2 μL de una solución de Tween 80® 0.03% estéril. En todos los aislamientos se trataron 10 cucarachas por cada concentración y el experimento se repitió dos veces en el tiempo. Después de la aplicación, cada ninfa se colocó de manera individual en recipientes de plástico de 125 mL con alimento, agua y refugio bajo las condiciones descritas en el experimento anterior. La mortalidad se registró cada 24 h durante 20 d.

2.2.6. Análisis estadístico. Con los datos de virulencia de los siete aislamientos de *Metarhizium* y los 12 de *B. bassiana* se determinaron las curvas de supervivencia. Se empleó el método Kaplan-Meier con PROC LIFETEST para calcular el tiempo medio de supervivencia ($T > t^* = 50$) o TL_{50} producido por cada aislamiento en los tres grupo de edad de la cucaracha. Además, se realizó la prueba de rangos Log-Rank para comparar los siete aislamientos y las tres edades evaluadas ($P \leq 0.05$). Los datos de mortalidad del experimento dosis-respuesta se analizaron con PROC PROBIT para estimar las CL_{50} de los aislamientos de *M. anisopliae* y *M. pingshaense* contra ninfas de la edad E2. Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico SAS para Windows V 9.2 (SAS, 2009).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Virulencia de *Metarhizium* en tres edades de *B. germanica*. El porcentaje de germinación de las esporas en los cinco aislamientos de *M. anisopliae* y los dos de *M. pingshaense* fue mayor a 93% en todos los casos.

Cuadro 3. Mortalidad de ninfas y adultos de *B. germanica* tratados con *M. anisopliae* (Ma1, Ma2, Ma3, Ma6, Ma7) y *M. pingshaense* (Ma4, Ma5)

Aislamiento	Edad	Mortalidad (%)	TL ₅₀ (días)	L. I. L. S.		P-value
				95%		
Ma1	E1	80	5.00	3	13	
	E2	60	12.00	6	ND	0.0134*
	E3	45	-	-	-	
Ma2	E1	80	5.50	2	16	
	E2	60	16.50	8	ND	0.0157*
	E3	95	8.00	3	10	
Ma3	E1	80	9.00	3	18	
	E2	70	13.00	5	ND	0.2849
	E3	95	10.00	6	13	
Ma4	E1	65	6.50	3	ND	
	E2	40	-	-	-	0.0171*
	E3	85	11.50	7	16	
Ma5	E1	55	12.00	6	ND	
	E2	75	7.00	4	19	0.0902
	E3	90	7.00	4	13	
Ma6	E1	90	6.50	3	12	
	E2	70	13.50	8	-	0.0087*
	E3	100	7.00	5	9	
Ma7	E1	85	5.00	4	10	
	E2	100	5.50	4	9	0.2745
	E3	100	5.00	5	6	

*Indica diferencias significativas de cada aislamiento en las tres edades ($P \leq 0.05$) $n = 420$ cucarachas.

E1 ninfas del 2° ínstar, E2 ninfas de 5° ínstar, E3 adultos. Inoculación tópica con una dosis de 2×10^5 esporas / insecto.

En la presente investigación se comprobó la capacidad infectiva de los aislamientos de *M. anisopliae* (Ma1, Ma2, Ma3, Ma6 y Ma7) y *M. pingshaense* (Ma4 y Ma5) sobre tres edades diferentes de *B. germanica*.

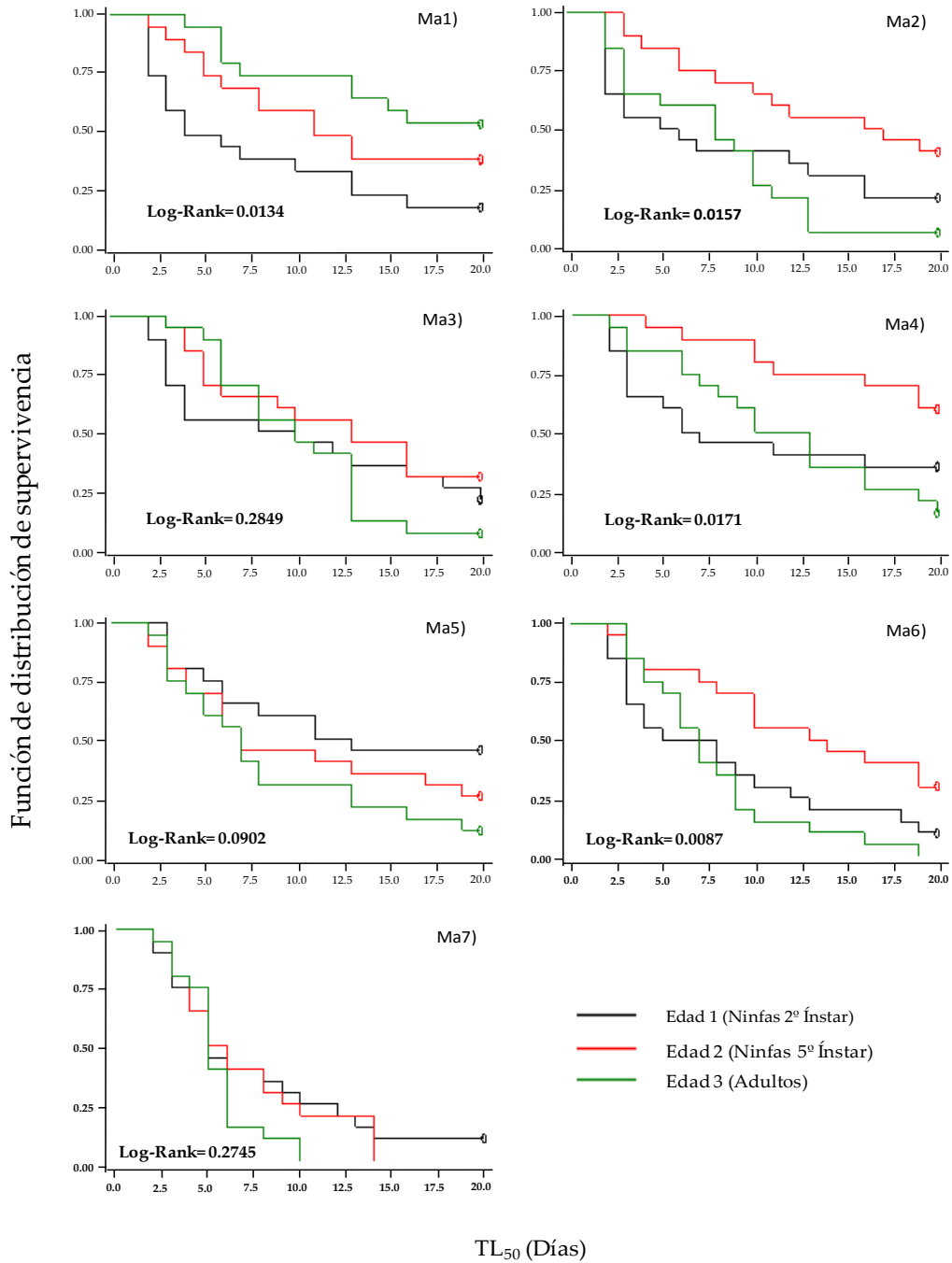


Figura 1. Curvas de Supervivencia de aislamientos de *M. anisopliae* (Ma1, Ma2, Ma3, Ma6, Ma7) y *M. pingshaense* (Ma4, Ma5) sobre los grupos de edad E1, E2 y E3 de *B. germanica*

La efectividad de aislamientos de *M. anisopliae* sobre esta plaga se ha documentado en más de una ocasión (Gunner *et al.* 1991, Andis 1994, Zukowski y Bajan 1996, Mohan *et al.* 1999, Pachamuthu *et al.* 1999, Quesada-Moraga *et al.* 2004).

La virulencia de los aislamientos contra *B. germanica* resultó diferente (Log-Rank <0.0001). El aislamiento que causó mayor mortalidad sin diferencias significativas en las tres edades evaluadas fue el Ma7 (Cuadro 3). Además, este aislamiento registró los TL₅₀ más bajos; 5 d (E1 y E3) y 5.5 d (E2). Se observaron valores de TL₅₀ similares para la E1 con los aislamientos Ma1 y Ma2 (5 y 5.5 d respectivamente). El aislamiento Ma4 causó la menor mortalidad en los adultos (40%), y el Ma1 la menor mortalidad (45%) de ninfas de quinto ínstar (E2).

En la mayoría de los aislamientos se observaron diferencias de susceptibilidad en las tres edades. Sin embargo, la infección causada por los hongos no fue diferente en todos los casos (Figura 1). La mortalidad causada por Ma3, Ma5 y Ma7 en las tres edades no mostró diferencias estadísticas (P-value = 0.2849, 0.0902 y 0.4139, respectivamente). Los aislamientos Ma2, Ma3, Ma4, Ma5, y Ma6 provocaron menor mortalidad en las ninfas del quinto ínstar (E2). Además, los valores de TL₅₀ mayores para esta edad fueron los de los aislamientos Ma2 con TL₅₀=16.5 d y para Ma6, TL₅₀=13.5 d (Cuadro 3). A diferencia de los TL₅₀ calculados para las ninfas de segundo ínstar (E1), TL₅₀=5.5 d para Ma2 y TL₅₀=6.5 d para Ma6.

La patogenicidad es la habilidad cualitativa de un patógeno para causar enfermedad, y es determinada por una variedad de factores que incluyen la fisiología del hongo, del huésped y el ambiente (Inglis *et al.*, 2001). Zimmermann (2007) afirmó que el origen, la distribución geográfica, y el genotipo de los aislamientos de *Metarhizium* son factores que influyen en la especificidad de este hongo. El complejo *Metarhizium* consiste en un grupo diverso de especies de hongos entomopatógenos asexuales (Roberts y St. Leger, 2004).

M. anisopliae es la especie más abundante y ampliamente distribuida en el género y está presente en el suelo de diferentes entornos (Zimmermann, 2007). Este patógeno se ha registrado infectando de manera natural a más de 200 especies de insectos económicamente importantes (Hajek y St. Leger, 1994).

Ferron (1978) indicó que existen cepas de *M. anisopliae* con adaptaciones muy estrictas para su huésped original, y otras pueden tener un espectro de actividad heterogéneo. En otras palabras, aislamientos individuales o especies crípticas pueden exhibir diferencias en su rango de hospederos (Bischoff *et al.*, 2009). Las variaciones en la patogenicidad y virulencia causadas por *M. anisopliae* y *M. pingshaense* sobre *B. germanica* podrían estar relacionadas con esta diversidad de especies, es decir, la susceptibilidad de ninfas y adultos de la cucaracha alemana a los aislamientos de *Metarhizium* puede estar relacionada con la variabilidad intraespecífica de este género.

Otro factor que afecta a la mortalidad puede ser lo mencionado por Hajek y St. Leger (1994). Ellos indicaron que las poblaciones del insecto blanco no son genéticamente estáticas en su respuesta a la infección por los hongos, dicho de otro modo, el insecto huésped puede ejercer una presión de selección que favorezca a pocos genotipos del patógeno. Por lo tanto, la diferencia de susceptibilidad registrada en las tres edades de *B. germanica* a *M. anisopliae* y *M. pingshaense* puede estar vinculada con la diversidad genética en la relación patógeno-huésped.

2.3.2 Virulencia de *Beauveria bassiana* en tres edades de *B. germanica*. Los doce aislamientos de *B. bassiana* resultaron ser patógenos para las ninfas y adultos de la cucaracha alemana. Todos los aislamientos causaron mayor mortalidad que el testigo (5% en la E1), excepto Bb13 que provocó solamente el 5% de mortalidad en la E3.

Se observó una tendencia generalizada de resistencia en las ninfas de la E2 (quinto ínstar) a la infección por *B. bassiana*, ya que todos los aislamientos causaron porcentajes de mortalidad menores al 40% (Cuadro 4), excepto los aislamientos Bb2 y Bb12 (50%, 85% respectivamente). La diferencia de susceptibilidad en las ninfas de la E2 también se observó en la mortalidad causada por los aislamientos de *M. anisopliae* y *M. pingshaense* (Cuadro 3).

En los tratamientos de *B. bassiana* sobre la E2, se observaron valores de TL_{50} mayores a 12 d (Figuras 2 y 3). La mayoría de los aislamientos de *B. bassiana* fueron más virulentos para los adultos, causando la máxima mortalidad de 95% el aislamiento Bb8. En cambio, los aislamientos Bb5 y Bb11 causaron mayor mortalidad sobre la E1 (70 y 75% respectivamente). Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el experimento con *Metarhizium*, se confirma esta misma tendencia sobre la mortalidad en los adultos con mortalidades mayores a 85%, excepto el Ma1 que solo mató el 40% de las cucarachas tratadas.

Existe un complejo conjunto de factores bióticos y abióticos que influyen en la susceptibilidad de los insectos plaga a los hongos entomopatógenos. Por ejemplo; la densidad de población, el comportamiento, la edad, la nutrición, genética y el modo de exposición a los patógenos (Siva-Jothy *et al.*, 2005; Inglis *et al.*, 2001; Ferron, 1978).

La edad y el estado fisiológico de las cucarachas pudieron influir en la eficacia y patogénesis de los aislamientos de *Metarhizium* y *B. bassiana*. Fue claro que se presentaron diferencias en la susceptibilidad a los aislamientos dependiendo de la edad (Figuras 1, 2 y 3). Preponderantemente los adultos (E3), y en menor proporción las ninfas jóvenes (E1, segundo ínstar) resultaron más susceptibles a la infección por estos entomopatógenos que las ninfas desarrolladas (E2, quinto ínstar).

Cuadro 4. Mortalidad de ninfas y adultos de *Blattella germanica* tratados con *Beauveria bassiana*

Aislamiento	Edad	Tiempo de Supervivencia (Días)		Mortalidad	P-value
		TL ₅₀	L. C. (95%)		
Bb1	E1	13.5	(7 - N.D.)	65 ± 1.58	0.0017*
	E2	-	-	20 ± 0	
	E3	11.5	(7 -17)	75 ± 4.7	
Bb2	E1	8.5	(3 - N.D.)	65 ± 1.58	0.0528
	E2	-	-	50 ± 6.32	
	E3	13	(10 - 15)	90 ± 3.16	
Bb3	E1	-	-	25 ± 1.58	0.0001*
	E2	-	-	25 ± 1.58	
	E3	12.5	(8 - 18)	85 ± 1.58	
Bb4	E1	-	-	50 ± 3.16	0.0037*
	E2	-	-	40 ± 3.16	
	E3	11.5	(9 - 17)	90 ± 3.16	
Bb5	E1	13	(6 - N.D.)	70 ± 0	0.0052*
	E2	-	-	20 ± 3.16	
	E3	-	-	50 ± 6.32	
Bb6	E1	8	(3 - 13)	80 ± 3.16	0.0109*
	E2	-	-	40 ± 6.32	
	E3	10	(8 - 15)	85 ± 4.74	
Bb8	E1	13	(6 - 17)	90 ± 0	0.0002*
	E2	-	-	30 ± 3.16	
	E3	13	(8 - 17)	95 ± 1.58	
Bb11	E1	9	(7 - 16)	75 ± 1.58	0.0009*
	E2	-	-	20 ± 3.16	
	E3	14	(3 - N.D.)	70 ± 3.16	
Bb12	E1	-	-	85 ± 1.58	0.1321
	E2	12	(8 - 15)	85 ± 1.58	
	E3	15	(9 - N.D.)	65 ± 1.58	
Bb13	E1	-	-	45 ± 4.74	0.0046*
	E2	-	-	5 ± 1.58	
	E3	18	(15 - N.D.)	55 ± 1.58	
Bb14	E1	-	-	75 ± 7.91	0.2097
	E2	-	-	30 ± 3.16	
	E3	18	(12 - N.D.)	60 ± 0	
Bb16	E1	9.5	(3 - N.D.)	60 ± 3.16	0.0757
	E2	-	-	35 ± 1.58	
	E3	15	(9 - N.D.)	70 ± 3-16	

*Indica diferencias significativas de cada aislamiento en las tres edades ($P \leq 0.05$) $n = 780$ cucarachas.

E1 ninfas del 2º ínstar, E2 ninfas de 5º ínstar, E3 adultos. Inoculación tópica con una dosis de 2×10^5 esporas / insecto.

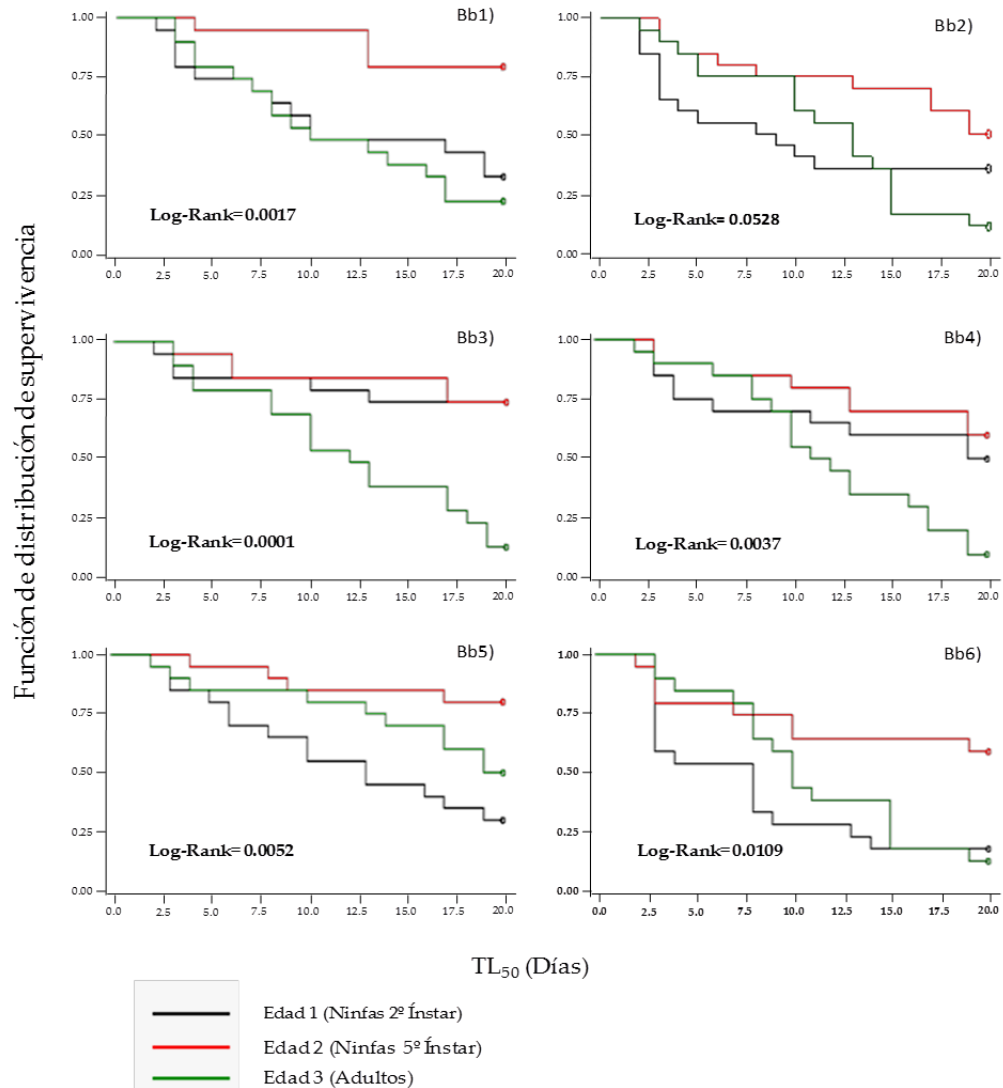


Figura 2. Curvas de Supervivencia de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre los grupos de edad E1, E2 y E3 de *B. germanica*

La diferencia de susceptibilidad de acuerdo con el estado fisiológico del huésped puede estar relacionada con la muda de la cutícula en los estados ninfales. Este proceso es un importante mecanismo de resistencia que emplean los insectos contra la infección por hongos, eliminando el inóculo a través de la exuvia, particularmente cuando los intervalos de tiempo entre ecdisis sucesivas son cortos, o por el gasto energético durante la digestión de la procutícula (Fransen *et al.*, 1987; Reynolds y Samuels, 1996).

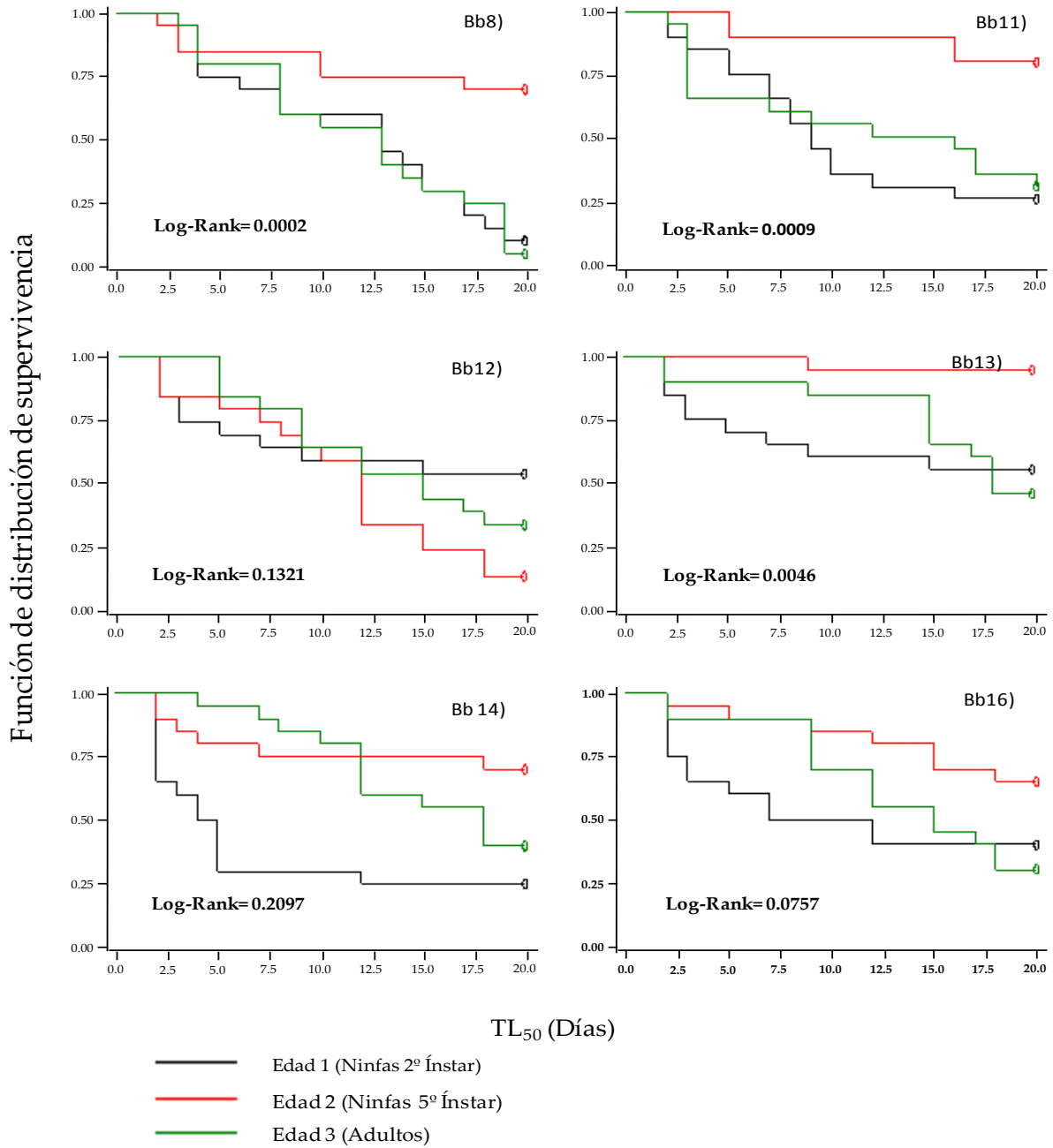


Figura 3. Curvas de Supervivencia de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre los grupos de edad E1, E2 y E3 de *B. germanica*

En algunos casos los estados inmaduros son más susceptibles a la infección que los insectos maduros. Por ejemplo, larvas jóvenes del barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*) son más susceptibles a *B. bassiana* que las larvas del último ínstar (Feng *et al.*,

1985). Por el contrario, los adultos del trips occidental (*Frankliniella occidentalis* Pergande) fueron más susceptibles a *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* que las larvas (Vestergaard *et al.*, 1995). Vey y Fargues (1977) infectaron larvas de *Leptinotarsa decemlineata* con *Beauveria bassiana* y demostraron que algunos insectos mueren en el inicio del proceso de muda, mientras que otros tienen éxito en escapar de la infección por la acción lítica de los fluidos producidos durante la muda. Feng *et al.* (1985) también atribuyeron la disminución de la capacidad del hongo entomopatógeno, para penetrar la cutícula de los últimos instares, como consecuencia del incremento de sustancias antifúngicas producidas durante el transcurso de la muda, mismas que podrían inhibir el proceso de germinación y penetración del hongo.

La diferencia de susceptibilidad que se observó en los resultados de este estudio en *B. germanica* también se presenta con insecticidas. Kaakeh y Bennett (1999) probaron la actividad biológica de diferentes ingredientes activos de cebos en varios estados y sexos de dos poblaciones de la cucaracha alemana, una susceptible y otra resistente. Ellos concluyeron que las ninfas maduras fueron menos susceptibles a los cebos que las ninfas jóvenes y que factores fisiológicos, de comportamiento, estado de desarrollo, género, edad, capacidad reproductiva y estado nutricional pueden influir en la toxicidad causada por insecticidas a estos insectos. Koehler *et al.* (1993) mencionaron que en la distribución de clases de edad, en las poblaciones naturales de *B. germanica*, las ninfas representan de 60 a 80% y estas son responsables de la dispersión y movimiento entre las colonias. El gran movimiento de ninfas, en contraste con la relativa inmovilidad de los adultos, asegura que éstas tienen mayor contacto con las aplicaciones residuales y cebos para su manejo. Probablemente por esta razón, la diferencia de susceptibilidad entre clases de edad de ninfas a insecticidas puede explicar una de las más frecuentes situaciones en el control de plagas urbanas, se combaten adultos pero sobreviven ninfas de los últimos instares.

En este estudio se confirmó esta información, ahora aplicada al uso de los hongos entomopatógenos *Metarhizium* y *B. bassiana* como agentes causales de mortalidad, y se considera que una apropiada formulación y desarrollo de estrategias de liberación pueden lograr que estos patógenos lleguen a ser un importante agente de control para el manejo de *B. germanica*. Se logró observar las diferencias de susceptibilidad en las tres edades de la cucaracha alemana, y se registró mayor mortalidad con los aislamientos de *Metarhizium*. Los resultados de este trabajo de investigación coinciden con lo reportado por Lopes y Alves (2011), y se demuestra que las ninfas de los últimos instares sobreviven en mayor proporción a la infección causada por *M. anisopliae*. Esta diferencia puede ser el resultado de la inhibición al tratamiento con este patógeno a través del proceso de muda, especialmente cuando el hongo se ha inoculado antes que suceda la **“ecdisis”**.

Estos efectos en la mortalidad indican que la edad de la cucaracha puede ser un factor determinante para la eficacia de su manejo con hongos entomopatógenos, y se debe remarcar la importancia de elegir un aislamiento que ocasione mayor mortalidad sobre las ninfas de la E2 (quinto instar), que fueron las menos susceptibles. El aumento de mortalidad en las ninfas de la E2 tratadas con *Metarhizium* en contraste con las bajas mortalidades causadas por *B. bassiana* podría estar relacionado con lo expuesto por Reynolds y Samuels (1996). Ellos resaltaron la importancia de la actividad de las enzimas proteolíticas, producidas por *M. anisopliae* durante el proceso de penetración de la cutícula con el éxito de la infección.

El hongo necesita penetrar la cutícula tan rápido como le sea posible, y aprovechar las lesiones tegumentarias producidas en la histólisis de la hipodermis y el desprendimiento de la exuvia. Esto explicaría la rápida mortalidad causada por Ma7 en un lapso de 5 días, pues su valor de TL_{50} fue el menor de todos los aislamientos

probados sobre la cucaracha alemana, y además se observó que en las ninfas de la E2 tratadas con este aislamiento al menos un 45% murieron cuando efectuaban su proceso de muda.

2.3.3. Dosis-Respuesta de *Metarhizium* aplicados a ninfas de E2 (quinto ínstar) de *B. germanica*. Se seleccionaron tres aislamientos de *M. anisopliae* (Ma2, Ma3 y Ma7) y uno de *M. pingshaense* (Ma5), los más virulentos en un experimento anterior sobre E2 de *B. germanica*, para establecer la dosis-respuesta en este estado de desarrollo que se considera el más resistente. El porcentaje de viabilidad de esporas fue mayor a 95% para los cuatro aislamientos utilizados. Ma6 provocó una mortalidad de 86.67%, pero al ser reproducido en placa presentó esporulación muy baja, situación por la cual se descartó para su evaluación en este bioensayo. De las suspensiones del aislamiento Ma2, la concentración de 2×10^{10} esp / mL causó la mayor mortalidad (95%). Se puede observar que la aplicación de la concentración más baja (2×10^6 esp / mL) causó mortalidades menores, de 15% a 35% (Figura 4).

En las curvas dosis-respuesta (Figura 4) se observa que la mortalidad de las cucarachas se incrementa a medida que se aumenta la concentración de esporas. El aislamiento que causó mayor mortalidad fue el Ma2, con un promedio de mortalidad del 63%, y su DL_{50} también fue la más baja 5.34×10^4 esporas / cucaracha (Cuadro 5). La media de los porcentajes de mortalidad de las cinco concentraciones evaluadas fue mayor al 50%, excepto la provocada por el aislamiento Ma5 (42%). Además, este aislamiento requirió una concentración alta de esporas para causar mortalidad, pues su DL_{50} fue 3.53×10^7 esporas/cucaracha, comparada con los otros tres aislamientos donde su DL_{50} osciló entre 5.34×10^4 y 9.55×10^4 esporas/cucaracha.

Al probar los tres aislamientos seleccionados de *M. anisopliae* (Ma2, Ma3 y Ma7), y uno de *M. pingshaense* (Ma5), contra ninfas de *B. germanica* con las cinco suspensiones de esporas se observó un incremento de la mortalidad de insectos debido al aumento de concentración del hongo.

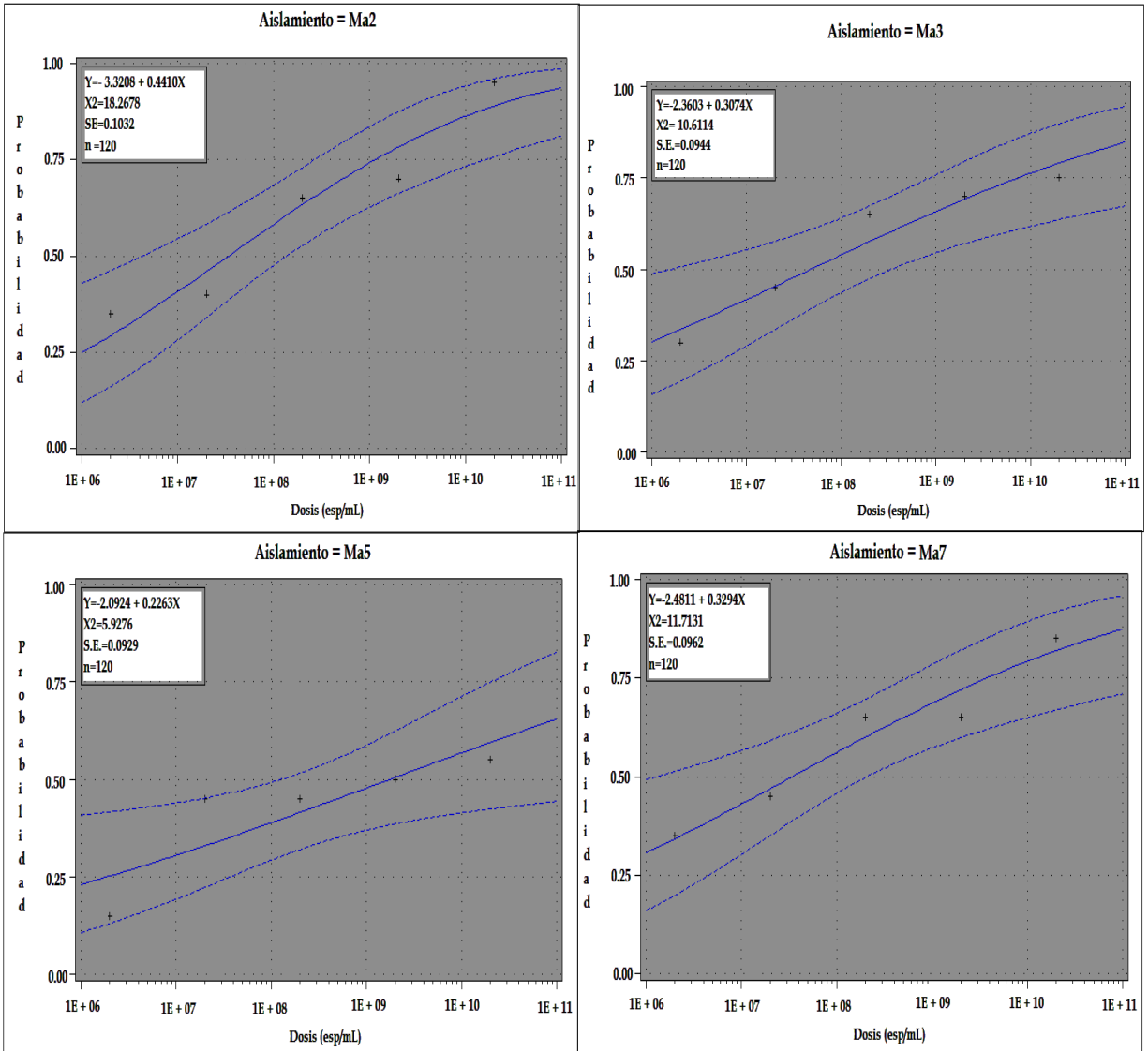


Figura 4. Curvas de Dosis-Respuesta de *Metarhizium anisopliae* (Ma2, Ma3, Ma7) y *M. pingshaense* (Ma5) sobre ninfas de la edad E2 (quinto ínstar) de *B. germanica*

Estos resultados concuerdan con lo realizado por Quesada-Moraga *et al.* (2004) con concentraciones que iban de 4.2×10^6 a 4.2×10^9 esporas/mL, ellos reportaron mortalidades de 42.3 a 93.3%, y valores DL_{50} de 1.4×10^7 esporas /mL (56,000 esporas por cucaracha). Sus resultados fueron similares a los obtenidos con el aislamiento Ma2, con mortalidades de 35 - 95% y un valor de DL_{50} de 3.30×10^4 esp /mL (65,902 esporas por cucaracha), y el Ma7 con una mortalidad de 35% a 85% y su valor de DL_{50} de 6.82×10^4 esp /mL (68,204 esporas por cucaracha).

Cuadro 5. Mortalidad, y CL_{50} de *Metarhizium anisopliae* y *M. pingshaense* en ninfas de quinto ínstar de *Blattella germanica*

Aislamiento	CL_{50} (esp/mL)	Límites Fiduciales 95%	Mortalidad \pm E.E. (%)
Ma2	2.6707×10^7	$(3.6033 \times 10^6 - 1.0116 \times 10^8)$	63.0 ± 1.9494
Ma3	4.7763×10^7	$(1.5892 \times 10^6 - 3.3880 \times 10^8)$	57.0 ± 1.303
Ma5	1.7650×10^{10}	$(1.2906 \times 10^9 - 3.5892 \times 10^9)$	42.0 ± 1.1180
Ma7	3.4102×10^7	$(1.2961 \times 10^6 - 2.0894 \times 10^8)$	59.0 ± 0.7416

n=480 cucarachas

Considerando estos resultados se puede decir que los mejores candidatos para el manejo de poblaciones y desarrollo de una formulación eficaz contra la cucaracha alemana fueron los aislamientos Ma2, con un TL_{50} de 8.2 días y el Ma7 con TL_{50} 3.8 días.

2.4. LITERATURA CITADA

ANDIS M. 1994. The Bio-Path cockroach control chamber uses nature to control nature's pests. Pest Control 62: 44-48.

- BISCHOFF J. F., REHNER S. A. AND HUMBER R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycol.* 101: 512-530.
- BRENNER J. R. 2002. Cockroaches (*Blattaria*). In: Mullen, G. and Durden, L. (Ed.), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, China. pp. 29-43.
- CHAI R. Y. AND C. Y LEE. 2010. Insecticide resistant profiles and synergism in field populations of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) from Singapore. *J. Econ. Entomol.* 103: 460-471.
- FENG Z, R. I. CARRUTHERS, D. W ROBERTS AND D. S ROBSON. 1985. Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 46: 259-264.
- FERRON P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23: 409-442.
- FRANSEN J. J., K. WINKELMAN, J. C. VAN LENTEREN. 1987. The differential mortality at various life stages of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homóptera: Aleyrodidae), by infection with the fungus *Aschersonia Aleyrodii* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *J. Invertebr Pathol.* 50: 158-165.
- GUNNER H. B., F. A. SILVA AND C. A. JOHNSON. 1991. Method and device for biological control of Cockroaches. U.S Patent 5057135.
- HAJEK E. A, R. AND J. ST. LEGER 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- HERNÁNDEZ-RAMÍREZ G, HERNÁNDEZ ROSAS F, SÁNCHEZ ARROYO H, ALATORRE ROSAS R. 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). *Entomotrópica.* 22: 27-36.

- INGLIS D. G., M. S. GOETTEL AND T. M. BUTT. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pest. *In*: Butt T. M.; C.W. Jackson, N. Magan. (Eds.). Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. CABI Publishing. pp: 23-69.
- KAAKEH W., B. L. REID, T. J. BOHNERT, AND G. W. BENNETT. 1996. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and Hydramethylnon among German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) *J. Entomol. Sci.* 31: 378–390.
- KAAKEH W, G. W. BENNETT. 1999. Developmental Stage-and Gender-Dependent Differential Susceptibility of German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) to various Commercial Baits. *J. Agric. Urban. Entomol.* 16: 9-24.
- KOEHLER P. G., C. A. STRONG, R. S. PATTERSON, AND S. M. VALLES. 1993. Differential susceptibility of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) Sexes and Nymphal Age Classes to Insecticides. *J. Econ. Entomol.* 86: 785-792.
- LOPES R. B. AND S. B. ALVES. 2011. Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L) (Blattodea: Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. *Neotrop. Entomol.* 40: 368-374.
- MOHAN M. C., K. A LAKSHMI, U. K DEVI. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Sci. Techn.* 9: 29-33.
- PACHAMUTHU P., S. T. KAMBLE, G. Y. YUEN. 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 92: 340–346.
- PACHAMUTHU P. AND T. S. KAMBLE. 2000. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with

- sublethal doses of chlorpirifos, propetamphos and cyflutrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 60-70.
- QUESADA-MORAGA E., R. S. QUIROS, P. V. GARCIA AND C. S. ALVAREZ. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 87: 51-58.
- REYNOLDS E. S. AND R. I. SAMUELS. 1996. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv. Insect. Physiol.* 26: 157-232.
- ROBERTS D. W. AND R. J. ST. LEGER. 2004. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological aspects. pp. 1 - 70. *In: Advances in Applied Microbiology.* (A.I. Laskin, J.W. Bennett, and G. Gadd, eds.). Elsevier Inc., London, U.K. Vol. 54. 400 pp.
- ROSS M. H. AND D. E. MULLINS. 1995. Chapter 2: Biology. *In: Rust, M.K.; J.M. Owens, D.,A. Reiersen (Ed.). Understandings and Controlling the German cockroach.* New York: Oxford University Press, 1995. Cap 2: pp: 21-47.
- SAS. 2009. Statistical Analysis System. Version 9.2 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SIVA-JOTHY T. M., Y. MORET AND J. ROLFF. 2005. Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. *Adv. Insect Physiol.* 32: 1-48.
- SUITER D. R., KOEHLER AND R. S. PATTERSON. 1993. Age and Sex-related effects in German cockroaches fed an allopurinol diet (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Med. Entomol.* 30: 907-912.
- VESTERGAARD S., T. M. BUTT, A. T. GILLESPIE, G. SCHREITER AND J. EILEBERG. 1995. Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Sci. Techn.* 5: 185-192.

VEY A. AND FARGUES J. 1977. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during. J. Invertebr. Pathol. 30: 207-215.

ZIMMERMANN G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Sci. Techn.17: 879-920.

ZUKOWSKI K. AND C. BAJAN. 1996. The study of the usefulness of *Beauveria bassiana* in eradication of Cockroaches (*Blattella germanica*). Roczn Pzn. Panstw. Zakl. Hig. 47: 343-349.

CAPÍTULO 3

Toxicidad del ácido bórico sobre *Blattella germanica* y la actividad patogénica *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en cebos formulados con azúcar glas como fagoestimulante

3.1. INTRODUCCIÓN

La cucaracha alemana, *Blattella germanica* L., es una especie ampliamente distribuida, que sobrevive en asociación con entornos humanos que le proporcionen calor, humedad y comida (Bennett *et al.*, 1997). Estos insectos son controlados principalmente con el empleo de insecticidas organosintéticos (organofosforados, carbamatos y piretroides), pero factores como la resistencia a insecticidas, los riesgos a la salud humana y ambiental, y el costo excesivo para el desarrollo de nuevas formulaciones neurotóxicas han intensificado la búsqueda de métodos de control efectivos y con menos riesgos asociados (Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Milner y Pereira, 2007).

Una de las posibles alternativas al uso de insecticidas organosintéticos incluye a los hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* (Kaakeh *et al.*, 1996; Lopes y Alves, 2011) y *Beauveria bassiana* (Zukowski y Bajan, 1996; Mohan *et al.*, 1999). Aunque estos hongos poseen el potencial para el control de plagas en ámbitos urbanos, se ha limitado su uso por su modo de acción lenta (Kaakeh *et al.*, 1997; Pachamuthu *et al.*, 1999; Quesada-Moraga, 2004). Por esta razón, se comenzaron a explorar alternativas para incrementar su actividad biológica. Por ejemplo, estos patógenos se pueden integrar en un cebo que se mezcla con insecticidas inorgánicos como ácido bórico (Zurek *et al.*, 2002). Este ejemplo se ha empleado para el combate de plagas urbanas como la cucaracha alemana (Ebeling, 1966; Strong *et al.*, 1993; Kaakeh *et al.*, 1996; Zurek *et al.*, 2003; Gore y Schal, 2004).

La mezcla de ácido bórico con hongos entomopatógenos se ha combinado, frecuentemente, con fagoestimulantes, como el azúcar, para evitar la repelencia de las cucarachas. Gore y Schal (2004) evaluaron cebos líquidos con ácido bórico y azúcares, a diferentes concentraciones, contra *B. germanica*. Ellos encontraron que 0.1 a 1 M de sacarosa aumentaba la atracción a los cebos formulados con ácido bórico. Zurek *et al.* (2002) determinaron el sinergismo entre *M. anisopliae* y el ácido bórico aplicados en polvo y solución acuosa. La aplicación del hongo solo requirió 28 días para causar 92% de mortalidad en cucarachas ($TL_{50} = 10$ d). En contraste, la combinación de ácido bórico (12.5%) - *M. anisopliae* causaron el 100% de mortalidad de cucarachas en 8 d.

La integración de un aislamiento fúngico con un insecticida requiere conocimiento de la compatibilidad entre estos, particularmente en el porcentaje de germinación de las esporas (Pachamuthu *et al.*, 1999, 2000). Aunque la compatibilidad *in vitro* entre entomopatógenos e insecticidas como clorpirifos, propetamfos y ciflutrin, se ha evaluado para el manejo de *Blattella germanica*, esta relación no se ha determinado con el ácido bórico y los hongos entomopatógenos. La evaluación de combinaciones de ácido bórico y aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* proporcionará información básica para seleccionar las dosis de ácido bórico que pueden favorecer el efecto de los hongos entomopatógenos *in vivo*.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar la concentración de azúcar glas como fagoestimulante, evaluar la toxicidad del ácido bórico sobre ninfas de 5to ínstar de *Blattella germanica* y determinar *in vitro* (porcentaje de germinación de esporas) la compatibilidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con diferentes concentraciones de ácido bórico.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. *Blattella germanica*. El pie de cría de *B. germanica* se obtuvo de una cepa susceptible a insecticidas de la Universidad de Florida, Gainesville, FL. EE.UU., y se ha sido mantenido e incrementado por cinco años en el insectario del Posgrado en Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Para la realización de los experimentos se utilizaron ninfas de seis semanas de edad (quinto ínstar aproximadamente). La cría se mantuvo a 27 ± 2 °C, HR \leq 60% y fotoperiodo de 12:12 h (luz: oscuridad). Las colonias de *B. germanica* se conservaron y alimentaron en condiciones descritas previamente en el Capítulo 2.

3.2.2. Aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Se emplearon dos aislamientos; uno de *M. anisopliae* (Ma2) y uno de *B. bassiana* (Bb2). En estudios preliminares ambos crecieron y esporularon en medio de cultivo Agar Dextrosa Saboraud suplementado con extracto de levadura 1% (SDAY), y adicionado con ácido bórico (1, 2, 4%). El cultivo y propagación de los hongos se realizó en el medio de cultivo SDAY y se incubaron durante 20 d a 25 ± 2 °C.

3.2.3 Preferencia de adultos de *B. germanica* a cebos formulados con azúcar glas. Se probó la preferencia de machos y hembras de *B. germanica* a dos tipos de cebos, polvo y pellet, formulados con diferentes concentraciones de azúcar glas como fagoestimulante. La formulación en polvo consistió en una mezcla de alimento molido PROLAB 2500 Rodent Diet®, gnetina 12% y azúcar glas a las concentraciones de 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M y 0.75 M. El cebo en pellet (pequeños comprimidos de alimento) se preparó utilizando los mismos ingredientes del cebo en polvo, pero se adicionó agua destilada 25% (P/V). Esta mezcla se puso a calentar en un frasco de cristal (50 mL) con tapa para

evitar la evaporación del líquido y con esta se rellenaron popotes de plástico. Cuando se solidificó el comprimido este se dividió en porciones de 1 cm de largo (0.5 g de peso).

El experimento se realizó dentro de una caja de cristal (40cm x 25cm x 22cm), se distribuyeron en la periferia, de forma aleatoria, ocho cebos a las diferentes concentraciones de azúcar glass (cuatro en polvo y cuatro en pellet). Una vez que se estableció esa arena se colocó en el centro de la caja una cucaracha, una vez introducido cada ejemplar se registró, por un periodo de 10 min, el número de veces que se desplazó hacia los cebos, y el tiempo de ingesta de cada cebo. Cada individuo se consideró una repetición, y se realizaron 60 repeticiones (30 hembras y 30 machos). Debido a que *Blattella germanica* es de hábitos nocturnos durante los ensayos se colocó papel celofán color azul sobre la lámpara que proporcionaba luz en la habitación, donde se realizó el experimento, para simular el periodo nocturno.

3.2.4 Dosis-respuesta del ácido bórico sobre ninfas de quinto ínstar de *B. germanica*.

Para medir la toxicidad del ácido bórico (AB), y determinar si las concentraciones altas causan repelencia sobre ninfas de quinto ínstar de la cucaracha alemana, se evaluaron los cebos en polvo y pellet del experimento anterior. A cada cebo se le adicionó azúcar glass 0.5 M y AB a las concentraciones de 1, 2, 4, 8, 10 y 16%. Estas concentraciones se determinaron en base a la sugerencia de la presentación comercial de ácido bórico Roach Kill® (4.88 g/m²), el cual se utilizó en todos los experimentos. En cada tratamiento se colocó una ración (1g) de los cebos (polvo o pellet) y el equivalente en una porción del alimento PROLAB 2500 Rodent Diet® como comida alternativa (testigo) Después de la colocación de los cebos las cucarachas se mantuvieron a 27 ± 2 °C y $60 \pm 10\%$ H.R. En el testigo absoluto, solamente se colocaron los cebos sin ácido bórico y el alimento alternativo. La mortalidad se registró cada 24 h durante 15 d. Cada

tratamiento tuvo 5 réplicas por concentración de ácido bórico (n=700 insectos). Todo el experimento se repitió dos veces en el tiempo.

3.2.5 Efecto del ácido bórico (AB) sobre la germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

Para evaluar el efecto del ácido bórico (AB) sobre la germinación de esporas y la viabilidad de los hongos entomopatógenos, *M. anisopliae* (Ma2) y *B. bassiana* (Bb2), se determinó el porcentaje de germinación en los cebos formulados (polvo y pellet). Se combinaron esporas de Ma2 o Bb2 con AB a las concentraciones 1, 2 y 4%. La concentración de esporas (inóculo) en los pellets o en el polvo se determinó preparando una suspensión con 1 g de cebo diluido en 10 mL de Tween 80® 0.03%, la cual se homogeneizó en el vórtex durante 1 min. La cuantificación de esporas, en ambos casos, se determinó utilizando una cámara de Neubauer. De cada tratamiento se realizaron diluciones para ajustar la concentración a 1×10^5 esporas/ mL. Se aplicaron 50µL de la suspensión hongo-Acido bórico en el centro de una caja petri (90 mm de diámetro) con medio de cultivo SDAY y se dispersó con una varilla de cristal, para favorecer la distribución uniforme de las esporas y el porcentaje de germinación. Todos los tratamientos se incubaron a 25 ± 2 °C. Después de 48 h de inoculación a cada caja se le agregó lactofenol - azul de metileno, para detener el crecimiento del hongo.

Una vez que se detuvo el crecimiento en el medio de cultivo se extrajeron al azar, con un sacabocados, tres rodajas (7 mm de diámetro) que se colocaron sobre un portaobjetos para observar la germinación de las esporas en un microscopio compuesto (40x). Se consideró que la *conidia* había germinado si la longitud del tubo germinativo era por lo menos la mitad de la longitud de la espora. La germinación se evaluó a las 24 horas de haber preparado los cebos y a los 15 días posteriores. En el transcurso de estos días los cebos se mantuvieron a temperatura ambiente.

3.2.6. Análisis estadístico. En el experimento de preferencia de cebos, formulados con azúcar glas, se efectuó un análisis completamente al azar para evaluar las variables número de veces elegido, y tiempo de ingesta de cada cebo (polvo y pellet). Se realizó un arreglo factorial cebo:concentración de azúcar (2 x 4) para determinar la mejor concentración de azúcar. Los datos de mortalidad del experimento dosis-respuesta se analizaron con PROC PROBIT para estimar las CL₅₀ del ácido bórico contra ninfas de quinto ínstar de *B. germanica*.

Los datos de porcentaje de germinación, registrada en los tiempos de lectura de cada cebo, se analizaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 x 4 (tiempo de lectura-aislamiento-concentración de AB) y la comparación de medias con la prueba de Tukey (P≤0.05). Además se analizaron las interacciones hongo-concentración-tiempo de lectura para ver la tendencia del efecto del ácido bórico sobre los dos aislamientos probados antes y después de 15 días. Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico SAS para Windows V 9.2 (SAS, 2009).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Preferencia de adultos de *B. germanica* a cebos formulados con azúcar glas. La eficacia de cebos se determina por la combinación del rendimiento de sus componentes, incluyendo los ingredientes activos, ingredientes inertes, la base alimenticia, atrayentes, y la formulación. De ahí la importancia de una adecuada elección en la concentración del fagoestimulante, en este caso el azúcar glas. En los resultados se observó diferencia en la preferencia alimenticia de hembras y machos de *B. germanica* a las dos formulaciones (polvo y pellet), tanto en el número de veces que se eligió (P-value=0.0010), como en el tiempo de ingesta (P-value=0.0364). También se encontraron diferencias entre las concentraciones de azúcar glas en ambos cebos (Figuras 5 y 6).

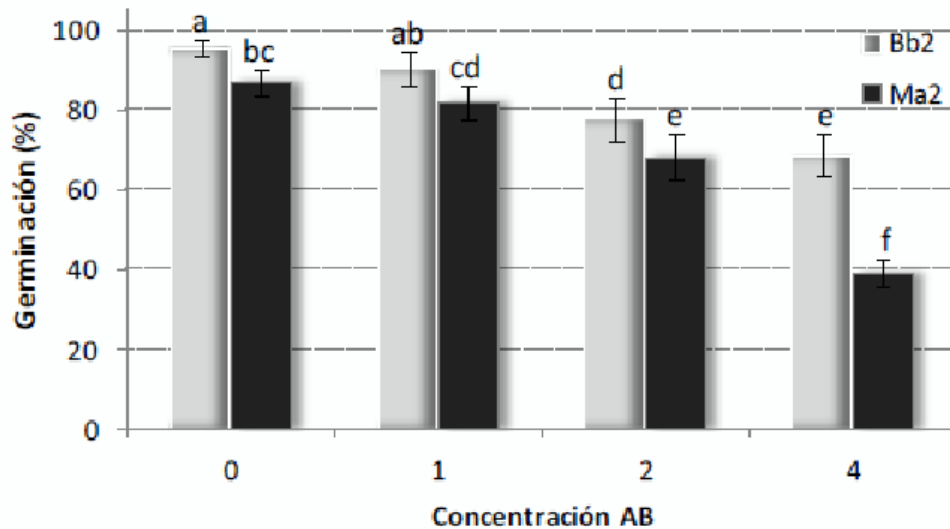


Figura 5. Respuesta de elección de adultos (ambos sexos) de *B. germanica* a diferentes concentraciones de azúcar glas en cebos formulados en polvo y pellet.

La concentración 0.5M del cebo en polvo fue la más elegida (53 veces) por las cucarachas. En contraste, en el pellet la concentración más atractiva resultó ser 0.75M (Figura 5).

Se considera que un buen fagoestimulante es aquel que promueve la alimentación (Nalyanya *et al.*, 2001). La evaluación de los tiempos de ingestión en los cebos, permitió determinar que las concentraciones de azúcar glas agregada, pueden intensificar la atracción de *B. germanica*. Adicionalmente, se observó una tendencia de atracción a las dos formulaciones, a medida que aumentó la concentración de azúcar. No obstante, el cebo en polvo resultó ser el más atractivo. Los tiempos de ingestión para este cebo fueron 34.62 min, a la concentración 0.5M y 21.20 min para 0.75M. En el pellet, también se registraron los tiempos de ingestión más altos para las mismas concentraciones de azúcar, 0.5M=14.82 min y 0.75M=12.95 min (Figura 6).

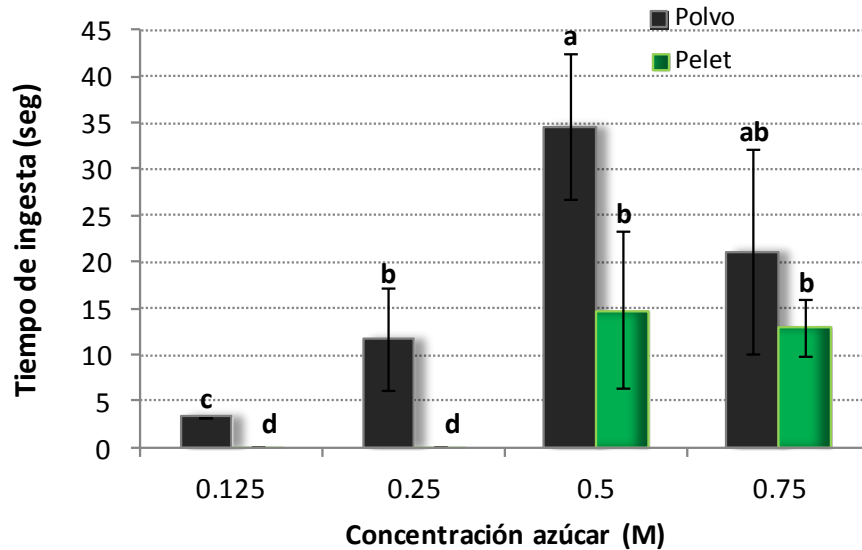


Figura 6. Tiempo de ingesta de adultos de *B. germanica* a diferentes concentraciones de azúcar glas en cebos formulados en polvo y pellet.

Esta diferencia en la atracción a las formulaciones de los cebos puede estar relacionada con lo mencionado por Durier y Rivault (1999), ellos atribuyeron el nivel de explotación de un recurso alimenticio depende de sus propias características, la calidad del recurso, así como la energía y necesidades del insecto explotador. Los resultados de esta investigación concuerdan con los reportados por Gore y Schal (2004), quienes probaron la efectividad de monosacáridos y disacáridos como fagoestimulantes, ellos expusieron machos o hembras de *B. germanica* durante 24 o 48 horas para elegir entre un vial con agua limpia y otro con 0.1 M de 13 azúcares (como la fructosa, sacarosa, maltosa, glucosa, ribosa, xilosa, galactosa y trealosa, entre otras). Estos autores indicaron que la sacarosa fue altamente estimulante para la alimentación de hembras o machos adultos de la cucaracha alemana, con las concentraciones 0.1M o 1M.

Appel (1990) mencionó que para ser eficaces, las formulaciones deben ser apetitosas, no repelentes y fáciles de consumir. La base alimenticia, incluyendo a los atrayentes o

fagoestimulantes, comprenden la fracción más grande de la formulación de un cebo y juegan un papel vital en la eficacia de los ingredientes activos contra la plaga objetivo (Appel, 1990; Nalyanya *et al.*, 2001). Por lo tanto, la importancia de determinar la concentración adecuada de un fagoestimulante es para favorece la eficacia de la formulación de un cebo.

3.3.2 Dosis-respuesta del ácido bórico sobre ninfas de quinto ínstar de *B. germanica*.

Un cebo se define como una sustancia que incorpora un insecticida en un alimento atractivo y agradable para el insecto blanco (Appel, 1990). En el experimento anterior se evaluó el azúcar glas como atrayente alimenticio en las formulaciones en polvo y pellet.

Para conocer la eficiencia de estos cebos en combinación con el ácido bórico (AB), en esta parte del trabajo se determinó la respuesta de aceptación y repelencia de *B. germanica* a estas formulaciones (polvo y pellet) y se construyeron las curvas de dosis-respuesta a seis concentraciones de ácido bórico (1, 2, 4, 8, 10 y 16%) sobre ninfas de quinto ínstar de *B. germanica*. De las dos formulaciones comparadas, el cebo en polvo causó la mayor mortalidad ($59.14 \pm 3.43\%$) sobre las ninfas de *B. germanica*, y el cebo en pellet mató solo el $51.14 \pm 2.80\%$. Con el valor de la CL_{50} se confirmó que el cebo en polvo fue la formulación más eficaz contra ninfas de *B. germanica*, el valor de CL_{50} fue 2.2% de AB, por otro lado el pellet tuvo una CL_{50} de 3.5% de AB (Cuadro 6).

El ácido bórico se ha utilizado, principalmente, como formulación en polvo para el manejo de las cucarachas. Ebeling *et al.* (1966) señalaron que las formulaciones en polvo tienen la ventaja de que pueden aprovechar los hábitos de higiene de estos insectos. De esta manera el ácido bórico se ingiere después de haber sido retirado de antenas y otros apéndices. Esta explicación puede ayudar a explicar los resultados favorables de la formulación en polvo. Los insecticidas inorgánicos en polvo presentan ventajas como

larga duración, bajo olor, no son volátiles, son estables, no se absorben en superficies porosas como papel y madera, y además no generan repelencia (Appel *et al.*, 2004).

Cuadro 6. CL₅₀ y mortalidad de ninfas de quinto ínstar de *B. germanica* por ácido bórico en dos formulaciones.

CEBO (Formulación)	Mortalidad	CL ₅₀ (% AB)	Límites Fiduciales 95% (L.I. – L.S.)	P-value
Pellet	51.14 ± 2.80	3.46228	(3.07442 – 3.87247)	< 0.0001
Polvo	59.14 ± 3.43	2.22503	(1.85158 – 2.60336)	< 0.0001

En las curvas dosis-respuesta de la formulación polvo (Figura 7) y pellet (Figura 8), se observó que la mortalidad de las ninfas de la cucaracha alemana se incrementa a medida que aumenta la concentración de ácido bórico. Sin embargo, en el cebo en polvo, la mortalidad no alcanzó el 100%.

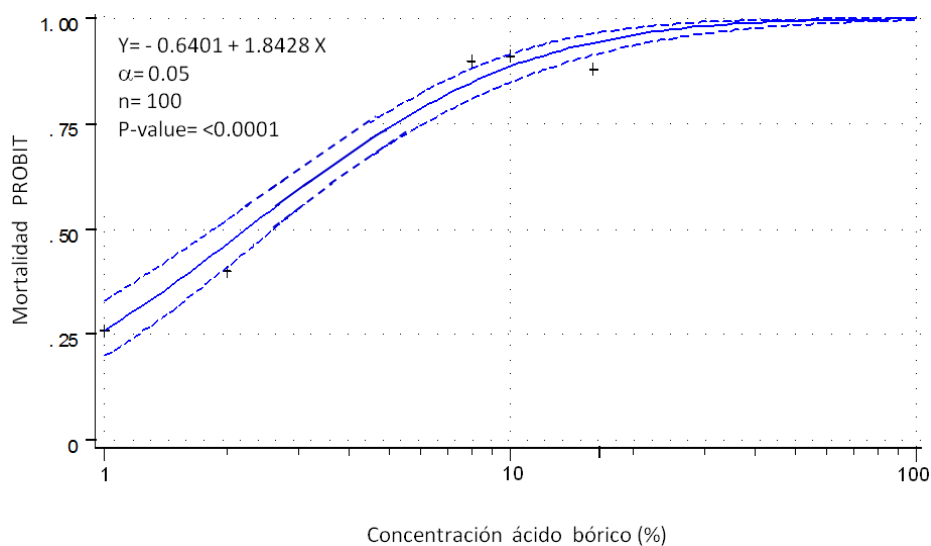


Figura 7. Curvas de Dosis-Respuesta del ácido bórico sobre ninfas de quinto ínstar de *B. germanica* en la formulación de cebo en polvo

La máxima mortalidad en este cebo fue de $91 \pm 0.57\%$, ocasionada por la concentración de 10% (Cuadro 7). Como el bioensayo se realizó con una fuente alterna de

alimentación, el alimento PROLAB 2500 Rodent Diet®, se observó que 16% de AB causó un efecto de repelencia a las ninfas de la cucaracha y ello provocó disminución en mortalidad ($88 \pm 1.14\%$).

En este caso los insectos evadían el cebo, y prefirieron alimentarse del testigo. A pesar de que el cebo en pellet sólo mató el 40% de las cucarachas a la concentración de 4%, la concentración más alta de AB (16%) causó la mortalidad máxima de 100% y no se observó repelencia a la formulación (Figura 8).

Cuadro 7. Mortalidad de ninfas de quinto ínstar de *B. germanica* tratadas con ácido bórico en dos formulaciones

Tratamiento	Mortalidad \pm D.E.	
	Formulación	
	Pellet	Polvo
0% AB	2 ± 0.42	5 ± 0.7071
1% AB	8 ± 0.79	26 ± 1.071
2% AB	36 ± 0.97	40 ± 1.333
4% AB	48 ± 1.48	74 ± 1.84
8% AB	75 ± 1.27	90 ± 0.94
10% AB	89 ± 1.29	91 ± 0.57
16% AB	100	88 ± 1.14

D.E.=Desviación estándar; AB= ácido bórico.

Con estos resultados se confirma lo expuesto por Strong *et al.* (1993), ellos informaron que el uso de ácido bórico en cebos formulados como comprimidos (pellet) a concentraciones menores 25% de AB no generaban repelencia sobre *B. germanica*. También se insiste en una ventaja del ácido bórico respecto al uso de bórax o el octaborato disódico tetrahidratado (DSOBTH), ya que este no es repelente a la cucaracha alemana cuando se usa adecuadamente como polvo (Ebeling *et al.*, 1996) o

como cebo (Strong *et al.*, 1993). Con los resultados de esta investigación se demostró que el ácido bórico es eficaz como un tratamiento independiente para el manejo de *B. germanica*.

Reierson (1995) mencionó otra característica del comportamiento de *B. germanica* que puede favorecer el uso de cebos. Cuando una cucaracha de esta especie es atraída a una fuente alimenticia, ésta puede ser explotada por un individuo o, como generalmente es el caso, por un grupo de individuos. La probabilidad de estas interacciones incrementa el número de cucarachas atraídas. Por lo tanto, la estimulación de la alimentación del cebo con una combinación como el azúcar glas pudiera resultar en una mayor competencia por la fuente alimenticia, o prolongar el periodo de ingestión y como resultado mayor eficacia del cebo.

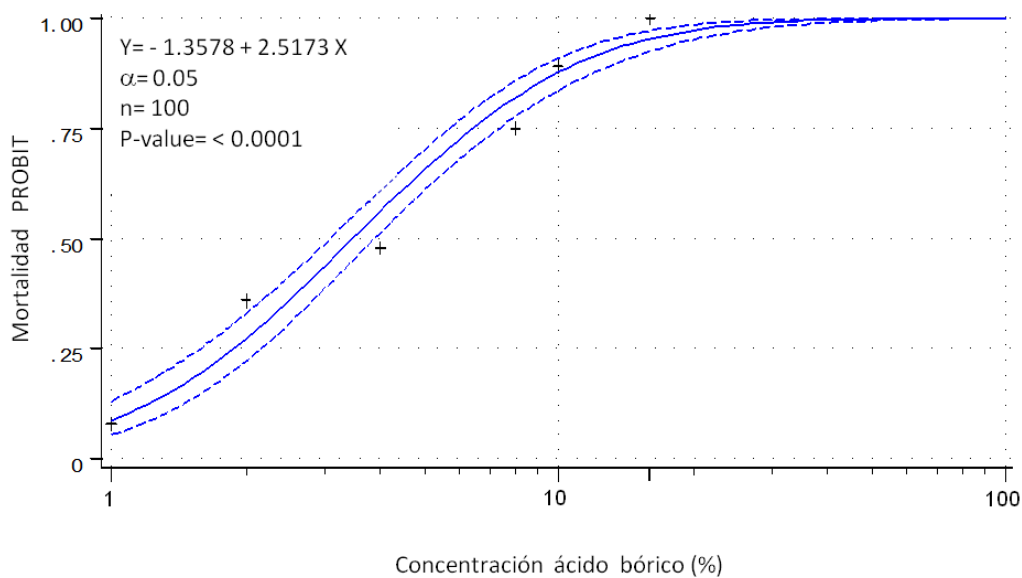


Figura 8. Curvas de Dosis-Respuesta del ácido bórico sobre ninfas de quinto ínstar de *B. germanica* en la formulación de cebo en pellet.

3.3.3 Efecto del ácido bórico (AB) sobre la germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

En estudios preliminares se observó que la germinación de las esporas con los tratamientos del ácido bórico a las 24 horas eran menores al 50%, por esta razón se decidió tomar las lecturas del porcentaje de germinación a las 48 h. Este estudio permitió evaluar la viabilidad de los hongos entomopatógenos, *M. anisopliae* (Ma2) y *B. bassiana* (Bb2), combinados con diferentes concentraciones de ácido bórico (AB), en una formulación de cebo en polvo o pellet y azúcar glas 0.5M (sacarosa) como fagoestimulante. La combinación de agentes biológicos con dosis de insecticidas demanda el conocimiento de la compatibilidad entre los dos agentes (Pahamuthu *et al.*, 1999). El porcentaje de germinación de *M. anisopliae* (Ma2) y *B. bassiana* (Bb2) disminuyó al aumentar la concentración de AB en los cebos (Figura 9 y 10).

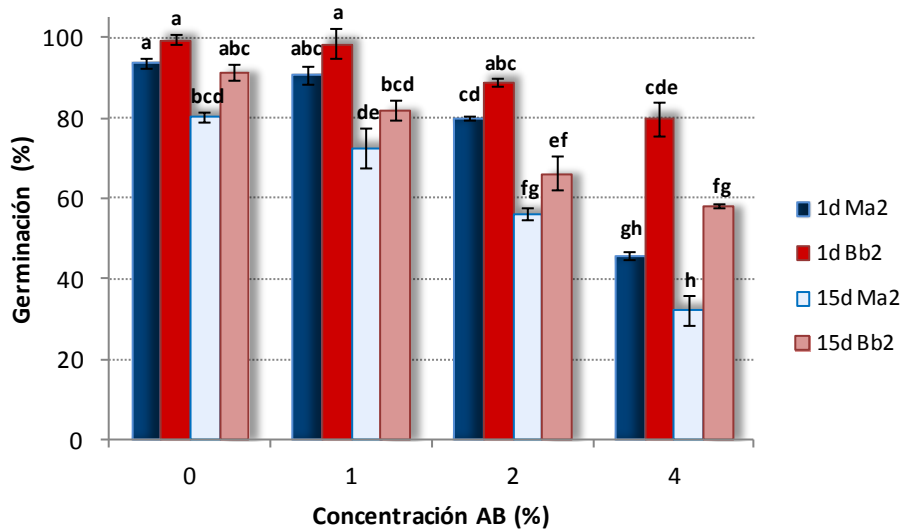


Figura 9. Porcentaje de germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el cebo en polvo con diferentes concentraciones de ácido bórico.

Además, se advirtió que la viabilidad de Ma2 se afectó más que la de Bb2 al paso de 15 d. El porcentaje de germinación del Ma2 en el cebo en polvo se redujo a más de la mitad ($32.33 \pm 3.80\%$) con la concentración 4% AB, comparado con el testigo ($80.39 \pm 1.34\%$).

A pesar de que el efecto del ácido bórico sobre Bb2 también es visible, este aislamiento alcanzó $58.02 \pm 0.51\%$ de germinación (Figura 9). Una pérdida de viabilidad se presentó también en la formulación en pellet, Bb2 y Ma2 disminuyeron su porcentaje de germinación a menos del 20% con la concentración más alta de ácido bórico (Figura 10). A los 15 d el porcentaje de germinación de Ma2 disminuyó hasta $8.06 \pm 0.90\%$ y las esporas de Bb2 sólo germinaron $9.3 \pm 1.66\%$ (Figura 10).

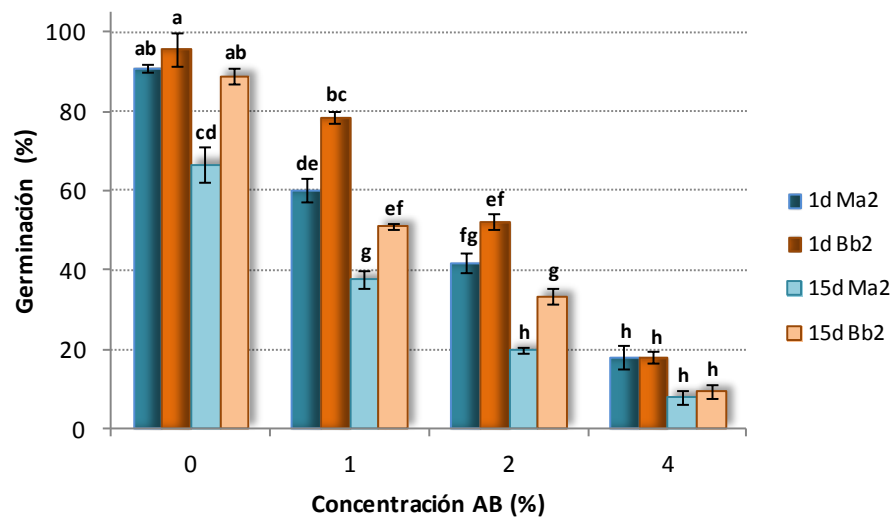


Figura 10. Porcentaje de germinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el cebo en pellet con diferentes concentraciones de ácido bórico.

La disminución en la viabilidad de los dos aislamientos (Ma2 y Bb2) está directamente relacionada con la combinación de dosis altas de AB. La viabilidad de *M. anisopliae* fue la más afectada. Al respecto de la mezcla de insecticidas y hongos, St Leger *et al.* (1989) afirmaron que en el caso de *M. anisopliae* podía presentar problemas en la formación del apesorio y la diferenciación de las hifas. Por lo tanto será necesario explorar las interacciones antagonicas; fungicidas o fungiestáticas del ácido bórico sobre las esporas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* a través del tiempo.

En trabajos futuros será conveniente evaluar los efectos de esta combinación sobre la viabilidad de estos patógenos y diseñar experimentos in vitro para medir el porcentaje de germinación, unidades formadoras de colonia, desarrollo micelial y esporulación. No obstante, se puede mencionar que si se pretende agregar el ácido bórico a dosis subletales en los cebos estudiados contra *B. germanica*, se recomienda trabajar con dosis máximas de 2%; con esta concentración se obtuvieron porcentajes de germinación mayores a 50% con los dos aislamientos.

Es importante enfatizar que se ha documentado que el ácido bórico aplicado en polvo es más efectivo como un veneno estomacal que como insecticida de contacto; el polvo se adhiere a la cutícula de las cucarachas por carga electrostática y las mata principalmente por ingestión durante el acicalamiento, y de manera secundaria por penetración al exoesqueleto (Ebeling *et al.*, 1966; Strong *et al.*, 1993). Por lo tanto, se podría sugerir que el ácido bórico en concentraciones de 2% es un agente que puede ser integrado a un cebo combinándolo con un agente biológico como *M. anisopliae* o *B. bassiana*.

A manera de conclusión, la adición de fagoestimulantes como el azúcar glas 0.5M promueve la atracción de ninfas de *B. germanica* a cebos formulados con ácido bórico. Además, el ácido bórico formulado en cebos contra las cucarachas ofrece ventajas tales como baja toxicidad a mamíferos, no se volatiliza y baja absorción a través de la piel de los humanos. Finalmente, es posible combinar ácido bórico a concentraciones de 2% o menores con *M. anisopliae* o *B. bassiana* en el cebo en polvo.

3.4. LITERATURA CITADA

APPEL A .G. 1990. Laboratory and field performance of consumer bait products for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 83: 153-159.

- APPEL A. G. 2004. Contamination affects the performance of insecticidal baits against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 97: 2035-2042.
- BENNETT W. G., J. M. OWENS AND R. M. CORRIGAN. 1997. Truman's scientific guide to pest control operations, 5ta ed. Advanstar communications. Cleveland OH. Pág 121-124.
- COCHRAN D. G. 1983. Food and water consumption during the reproductive cycle of female German cockroaches. Entomol. Exp. Appl. 34: 51-57.
- DURIER V. AND C. RIVAULT. 1999. Food bait preference in German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests. W. H. Robinson, F. Rettich and G. W. Rambo (Eds.) pp: 113-119.
- EBELING W., R. E. WAGNER, Y D. A. REIERSON. 1966. Influence of repellency on the efficacy of blatticides. I. Learned modification of behavior of the German cockroach. J. Econ. Entomol. 59: 1374-1388.
- GORE J. C. AND C. SCHAL. 2004. Laboratory evaluation of boric acid-sugar solutions as baits for management of German cockroach infestations. J. Econ. Entomol. 97: 581-587.
- KAAKEH W; B. L. REID, T. J. BOHNERT AND BENNETT. G. W. 1996. Horizontal Transmission of the entomophatogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (imperfect fungus Hyphomycetes) and hydramethylnon among German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Entomol. Sci. 31: 378-390.
- KAAKEH W.; B. L. REID, T. J. BOHNERT Y BENNETT G. W. 1997. Toxicity of Imidacloprid on the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and the Synergism Between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes). J. Econ. Entomol.90: 473-482.
- LOPES R. B. AND S. B. ALVES. 2011. DIFFERENTIAL SUSCEPTIBILITY OF ADULTS AND NYMPHS OF *Blattella germanica* (L) (Blattodea: Blattellidae) to infection by

- Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. Neotrop. Entomol. 40: 368-374.
- MILNER R. J., AND R. M. PEREIRA. 2007. Microbial Control of urban pests – cockroaches, ants and termites. *In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.* Lacey, L. A. y Kaya, H. K. (Eds.) Academic Publishers. pp. 721-740.
- MOHAN M. C., K. A LAKSHMI, U. K DEVI. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). Biocon. Sci. Technol. 9: 29-33.
- NALYANYA G. D. LIANG, R. J. KOPANIC J. R. AND C. SCHAL. 2001. Attractiveness of Insecticide Baits for Cockroach Control (Dictyoptera: Blattellidae): Laboratory and Field Studies J. Econ. Entomol. 94: 686-693.
- PACHAMUTHU P, S. T KAMBLE AND G. Y YUEN. 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. J. Econ. Entomol. 92: 340-346.
- PACHAMUTHU P. AND T. S. KAMBLE. 2000. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpirifos, propetamphos and cyflutrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 93: 60-70.
- QUESADA-MORAGA E, R. S QUIRÓS, P. V GARCÍA, C. S. ÁLVAREZ. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Invertebr. Pathol. 87: 51-58.
- REIERSON A. D. 1995. Chapter 10: Baits and baiting. *In: Rust K. M., J. M. Owens and D. A. Reiersen (Ed.), Understanding and Controlling the German cockroach.* Oxford University Press Inc. pp: 231- 267.

- RUST M. K. 1995. Factors Affecting Control with Insecticides In: Rust, M. K., J. M. Owens, y D. A. Reiersen (Eds). Understandings and Controlling the German cockroach. New York: Oxford University Press, 1995. pp: 149-170.
- ST. LEGER R. J., BUTT T. M., GOETTEL M. S., STAPLES, R. C. AND ROBERTS D. W. 1989. Production in vitro of appresoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Exp. Mycol 13:274-288.
- SAS. 2009. Statistical Analysis System. Versión 9.2 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- STRONG C. A., P. G. KOEHLER, AND R. S. PATTERSON. 1993. Oral toxicity and repellency of borates to German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 86: 1458-1463.
- ZUREK L, D. W WATSON, C. SCHAL. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Biol. Con. 23: 296-302.
- ZUKOWSKI K. AND C. BAJAN. 1996. The study of the usefulness of *Beauveria bassiana* in eradication of Cockroaches (*Blattella germanica*). Roczn Pzn. Panstw. Zakl. Hig. 47: 343-349.

CAPÍTULO 4

Efecto sinérgico del ácido bórico y hongos entomopatógenos sobre el comportamiento y sobrevivencia de ninfas de *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae)

4.1 INTRODUCCIÓN

La cucaracha alemana, *Blattella germanica* (L) (Dictyoptera: Blattellidae), es una plaga sinantrópica que se distribuye a nivel mundial (Bennett, 1997). Para efectuar su control se han utilizado una diversidad de sustancias tóxicas, aplicadas como plaguicidas residuales, formuladas con ingredientes de acción neurotóxica (Pachamuthu y Kamble, 2000). Sin embargo, esta plaga ha generado resistencia a diferentes insecticidas, como bendiocarb, cipermetrina, permetrina, propoxur y clorpirifos (Cochran, 1989; Phillips *et al.*, 2010; Gondhalekar y Scharf, 2012). En el manejo de esta plaga, no sólo se han utilizado insecticidas, sino también otros productos como el ácido bórico (Schal y Hamilton, 1990; Gore y Schal, 2004) que cuando es ingerido por las cucarachas daña el epitelio de su intestino y las mata, probablemente por desecación (Ebeling *et al.* 1966; Habes, 2006; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009).

En los últimos años para el combate de estos insectos se han empleado cebos formulados con insecticidas, por su acción rápida y actividad residual, como abamectina, fipronil, hidrametilona, imidacloprid e indoxacarb (Gondhalekar y Scharf, 2012). Sin embargo, el uso de insecticidas químicos contra la cucaracha alemana representa un riesgo para la salud humana, por lo cual se ha optado por desarrollar investigaciones enfocadas hacia alternativas biológicas (Zukowski y Bajan, 1996; Mohan *et al.*, 1999; Quesada-Moraga *et al.*, 2004, Milner y Pereira, 2007), como son el uso de los

hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin.

Los hongos entomopatógenos se han utilizado para el control de diferentes plagas de importancia económica (Zimmermann, 2007), incluidas las especies de cucarachas *Periplaneta americana* (Zukowski y Bajan, 1996; Mohan *et al.*, 1999) y *Blattella germanica* (Quesada-Moraga *et al.*, 2004). La cepa ESC-1 de *M. anisopliae* se formuló comercialmente como Bio-Path®, pero su uso se suspendió debido a que causaba mortalidad inconsistente. (Kaakeh *et al.*, 1996, 1997). Aunque *M. anisopliae* tiene el potencial para combatir a *B. germanica*, el tiempo prolongado para causar mortalidad puede considerarse desventajoso; quizá también sea el factor más importante en el fracaso de la aplicación de este agente microbiano para el manejo de poblaciones de *B. germanica*. Por lo tanto, hay una necesidad crítica para mejorar la actividad biológica de estos entomopatógenos, quizá integrándolos a formulaciones de cebos que pudieran incrementar su efectividad.

Para mejorar la actividad biológica de estos agentes se han combinado con productos como el ácido bórico y fagoestimulantes, en ocasiones con resultados satisfactorios (Zurek *et al.*, 2002); estos autores combinaron la actividad de *M. anisopliae* con el ácido bórico contra adultos de *B. germanica*, y obtuvieron mortalidades de 100% en 15 d. Gore y Schal (2004) evaluaron, en laboratorio, soluciones de ácido bórico y azúcares como fagoestimulantes para el control de esta cucaracha. Ellos concluyeron que el ácido bórico fue más eficaz en concentraciones mayores de 2% a 5%. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad de cebos formulados en polvo y comprimidos (=pellet), y combinar la acción insecticida del ácido bórico y la virulencia de *Metarhizium sp.*, sobre ninfas de quinto instar de *B. germanica*.

4. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Insectos. El pie de cría de *B. germanica* se obtuvo de una cepa susceptible a insecticidas de la Universidad de Florida, Gainesville, FL EE.UU., y se ha mantenido e incrementado por cinco años en el insectario del Posgrado en Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Para este bioensayo se emplearon ninfas de quinto ínstar (E2), debido a que fue la edad menos susceptible a la infección por hongos entomopatógenos en las pruebas de virulencia previas (Capítulo 2).

Cuadro 8. Origen de los aislamientos de *M. anisopliae* y *M. pingshaense* utilizados

Aislamiento	Clave	Huésped	Estado fisiológico	Origen
Destruxin	Ma2 [■]	Coleóptera y Homóptera	Adulto	Producto comercial LAVERLAM®
Meta-Savem	Ma3 [■]	Plagas rizófagas	—	CESAVEM *
GC 001	Ma5 [♦]	<i>Phyllophaga sp</i>	Larva	Puruagua, Jerécuaro, Guanajuato, México
23 Col	Ma7 [■]	<i>Phyllophaga sp</i>	Larva	Colima, México

■ *Metarhizium anisopliae*

♦ *Metarhizium pingshaense*

* Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México

4.2.2. Obtención del inóculo. Se emplearon tres aislamientos de *M. anisopliae* y uno de *M. pingshaense* (Cuadro 6). Estos aislamientos se seleccionaron por su virulencia sobre el quinto ínstar (E2) de *B. germanica* (Capítulo 2). Además, por su fácil propagación y alta esporulación sobre el medio de cultivo SDAY. Para su desarrollo se incubaron durante 15 d a 25 ± 2 °C. Una vez que esporularon, se calculó el porcentaje de germinación de cada aislamiento, considerando la formación del tubo germinativo a las 24 h de haber sido inoculado.

4.2.3. Virulencia de cebos formulados con *Metarhizium* y ácido bórico sobre *B. germanica*. Para evaluar el efecto del ácido bórico (AB) combinado con el hongo *M. anisopliae* (Ma2, Ma3, Ma7), y *M. pingshaense* (Ma5), se utilizaron ninfas de quinto ínstar (E2) de *B. germánica*. Se formularon dos tipos de cebos; la formulación se realizó en polvo (a) o en pellet (b). **a) cebo en polvo**, este se constituyó de una mezcla de alimento molido PROLAB 2500 Rodent Diet® 50%, azúcar glas 0.5 M, AB a las concentraciones de 0, 0.5, 1, 2 y 4%, , grenetina 12%, y esporas de *M. anisopliae* a una concentración de 3×10^8 esp/g. **(b) cebo en pellet** (pequeños comprimidos de alimento) este se preparó utilizando los mismos ingredientes del cebo en polvo, adicionando agua destilada 25% (P/V). Esta mezcla se puso a calentar en un frasco de cristal (50 mL) con tapa para evitar la evaporación del líquido y con esta se rellenaron popotes de plástico. Cuando se solidificó, el comprimido se dividió en porciones de 5 mm de largo de (0.5g de peso).

Con el fin de homogeneizar la concentración del inóculo en los cebos, se pesaron esporas de cada aislamiento (0.4 - 0.6 g) para ajustar la concentración a 3×10^8 esp / 6 g de cebo. Para cubrir cada pellet con las esporas de los hongos, estos se depositaron en un tubo de cristal con tapa (1.8 x 15 cm) en donde se encontraban las esporas, se agitaron en un vórtex (Maxi Mix II by Thermolyne®) durante 3 min. La concentración de esporas en los pellets u en el polvo se calculó agregando el equivalente a 1 g en 10 mL de Tween 80® 0.03%, para formar una suspensión de esporas, la cual se homogeneizó agitando en el vórtex durante 1 min. La cuantificación de esporas en ambos casos se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

Para aclimatar a las cucarachas, dos días antes del inicio de los ensayos, las ninfas de 5º ínstar de *B. germánica* se inmovilizaron a -4 °C (durante 5 min) y cada insecto se colocó de manera individual en dispositivos que les abastecieran refugio y alimento. Estos consistieron en recipientes de plástico de 250 mL, con la tapa perforada (orificio de 4

cm²) y cubierta con tela de organza para proporcionar ventilación. Dentro de cada recipiente se colocó agua en un tubo para micro centrífuga de 2 mL (CLG®), tapado con un algodón hidrófilo, un pellet de alimento (PROLAB 2500 Rodent Diet®) y un cartón corrugado enrollado (10 cm de largo x 3 cm de ancho) que sirvió de refugio a las cucarachas. Transcurrido el periodo de aclimatación de 48 h, se cambió el alimento por los cebos preparados con AB y *M. anisopliae*.

Los tratamientos (cebos dos niveles, hongos cuatro niveles y ácido bórico cinco niveles) se aplicaron de la siguiente manera. En cada cebo (polvo o pellet) se agregaron las esporas de *M. anisopliae* (Ma2, Ma3 o Ma7), *M. pingshaense* (Ma5) y una concentración de ácido bórico (0, 0.5, 1, 2 o 4%), en total se evaluaron 48 tratamientos, incluyendo el testigo absoluto (sin AB ni hongo). La unidad experimental fue un insecto con 10 réplicas por tratamiento (n = 480 cucarachas). La exposición a los cebos se realizó durante 20 días y se registró la mortalidad diariamente. Todo el experimento se repitió dos veces. Las condiciones de humedad relativa (65.5 ± 7.8 %) y temperatura (27 ± 1.5 °C) se registraron cada hora (datalogger HOBO®).

4.2.4. Efecto del comportamiento de agregación de *B. germanica* en la mortalidad por cebos formulados con *Metarhizium* y ácido bórico. Con el objetivo de evaluar si el comportamiento gregario de *B. germanica* tiene efecto sobre la mortalidad, por exposición a cebos formulados con *M. anisopliae* y ácido bórico, se realizó un experimento utilizando grupos de ninfas de quinto ínstar (E2) alimentadas con cebos (polvo y pellet) durante 20 días. Se utilizaron los mismos tratamientos que en el bioensayo anterior, y bajo las mismas condiciones, pero la diferencia fue que en cada recipiente de plástico se colocaron 10 cucarachas para poder observar la conducta

gregaria de esta especie. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y todo el experimento se repitió dos veces en el tiempo.

4.2.5 Análisis estadístico. Los datos del registro diario del tiempo de mortalidad en el primer experimento se utilizaron para establecer las curvas de supervivencia, empleando el método Kaplan-Meier con PROC LIFETEST, para obtener los valores de tiempo letal medio (TL_{50}) de los cebos, aislamientos y las concentraciones de ácido bórico. Además, los datos de la mortalidad acumulada, registrada durante 20 d, se analizaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo tres factorial $2 \times 4 \times 5$ (cebo-aislamiento-concentración de AB).

La información obtenida del PROC ANOVA, y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), de los efectos principales y las combinaciones de los tres factores se analizaron para identificar las diferencias entre tratamientos. De acuerdo con Quintela y Mc Coy (1997, 1998), para evaluar si la combinación AB + hongo entomopatógenos causa un efecto sinérgico o aditivo sobre la mortalidad de las ninfas tratadas, el modelo se consideró aditivo si en los análisis factoriales de la interacción AB * aislamiento no son significativo ($P\text{-value} \geq 0.05$). Es decir, mortalidad = efecto del hongo + efecto del AB. En cambio, el modelo se consideró sinergista si la interacción es significativa, entonces la mortalidad es el resultado de la interacción de los dos agentes (mortalidad = efecto de hongo + efecto de AB + efecto de la interacción). Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico SAS para Windows V 9.2 (SAS, 2009).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Virulencia de cebos formulados con *Metarhizium* y ácido bórico sobre *B. germanica*. Este estudio permitió evaluar el desarrollo de los aislamientos de *M.*

anisopliae (Ma2, Ma3, Ma7) y *M. pingshaense* (Ma5), combinados con diferentes concentraciones de ácido bórico (AB) en cebos formulados con grenetina y azúcar glas como fagoestimulante.

Cuadro 9. Mortalidad y Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de ninfas de *B. germanica* expuestas a cebos formulados con *Metarhizium* sp. y ácido bórico.

Tratamiento	Tiempo de supervivencia (días)			
	Mortalidad ± E. E.	TL ₅₀ ± E. E.	L.F. (95%)	Log-Rank
Cebo en pellet				
Aislamientos				
Ma2	73.64 ± 9.62	11 ± 0.05	(9 - 12)	≤ 0.0001
Ma3	71.82 ± 9.78	12 ± 0.0498	(11 - 13)	
Ma5	54.55 ± 11.86	16 ± 0.0498	(14 - 20)	
Ma7	65.45 ± 10.42	13 ± 0.0502	(10 - 15)	
Ácido bórico				
0% AB	47.50 ± 5.47	-	-	≤ 0.0001
0.5% AB	47.50 ± 4.77	-	-	
1% AB	75.00 ± 2.31	14 ± 0.0558	(12 - 16)	
2% AB	96.25 ± 1.29	11 ± 0.0548	(10 - 12)	
4% AB	98.33 ± 1.02	10 ± 0.0558	(9 - 11)	
Cebo en polvo				
Aislamientos				
Ma2	46.00 ± 8.59	-	-	0.1672
Ma3	59.00 ± 8.36	14.5 ± 0.05	(10 - ND)	
Ma5	53.00 ± 8.03	18 ± 0.05	(15 - ND)	
Ma7	51.00 ± 4.82	18.5 ± 0.05	(13 - ND)	
Ácido bórico				
0% AB	32.50 ± 3.20	-	-	≤ 0.0001
0.5% AB	37.50 ± 1.77	-	-	
1% AB	42.50 ± 3.95	-	-	
2% AB	68.75 ± 5.07	13 ± 0.0557	(11 - 17)	
4% AB	78.33 ± 4.3	10 ± 0.0556	(9 - 13)	

TL₅₀ se calculó con el Método de Kaplan-Meier.

ND: No determinado por el método;

AB: ácido bórico.

En los resultados del tiempo de supervivencia hubo diferencias de TL₅₀ entre los dos cebos (P-value <0.0001). Por lo tanto, se realizó la prueba de rangos (Log-Rank) para conocer las diferencias entre aislamientos y concentraciones de ácido bórico en cada

tipo de cebo. Se observaron diferencias de mortalidad y TL_{50} entre los aislamientos del pellet, Ma2 provocó mayor mortalidad (73.64 ± 9.62). Además, su valor de TL_{50} fue el más corto, de 11 ± 0.05 d (Cuadro 9). Por el otro lado, en el caso del cebo en polvo no se encontraron diferencias entre los cuatro aislamientos. En este caso los valores de TL_{50} fueron mayores, y se presentaron menores porcentajes de mortalidad (46.00 ± 8.59). La diferencia de mortalidad en los aislamientos de *M. anisopliae*, comparada con el aislamiento *M. pingshaense* puede ser consecuencia de la especificidad de los aislamientos a partir de su huésped original o su origen geográfico. Esto se puede relacionar con los estudios de Wirebeck *et al.* (2011); estos autores señalaron que el origen de los aislamientos, ya sea por su distribución geográfica o por ser aislados de cierto género de insectos, muestran asociaciones específicas con algunos huéspedes o patosistemas.

Con la aplicación combinada de AB (0.5, 1, 2, y 4%) y esporas de *Metarhizium* (3×10^8 esp / 6 g de cebo), sobre ninfas de quinto ínstar de *B. germanica*, se logró una mortalidad más alta y rápida que cuando se suministró el cebo sin ácido bórico (tratamiento testigo: 0% AB + esporas de *Metarhizium*), esto sugiere que existe compatibilidad entre ambos agentes. De los dos cebos (polvo y pellet) contra *B. germanica*, el mejor fue el pellet con 4% AB, causando una mortalidad de 98.33 ± 1.02 , mientras que el polvo a la misma concentración de AB solo mató $78.33 \pm 4.3\%$ (Cuadro 9). Un factor que quizá afectó estos resultados fue la formulación, se indica esto porque durante los primeros días de establecidas las unidades experimentales se observó que las ninfas mostraron un comportamiento de abstinencia a la ingestión de los cebos en polvo con 4% AB.

Algo similar reportaron Strong *et al.* (1993), ellos evaluaron cebos con ácido bórico (6.25, 12, 25 y 50%) y alimento para perro formulados en polvo y en comprimidos contra machos de *B. germanica*. En su escrito ellos indicaron repelencia a los cebos en polvo,

excepto en la concentración de 6.25% AB ($TL_{50} = 11.85$ d); además mencionaron que la mortalidad de las cucarachas con este cebo fue causada principalmente por contacto. Con los comprimidos, a pesar de que no hubo repelencia se observó una TL_{50} mayor (TL_{50} mayores a 21 d). Los mismos autores indicaron que se necesitó la ingestión de este cebo para causar la mortalidad.

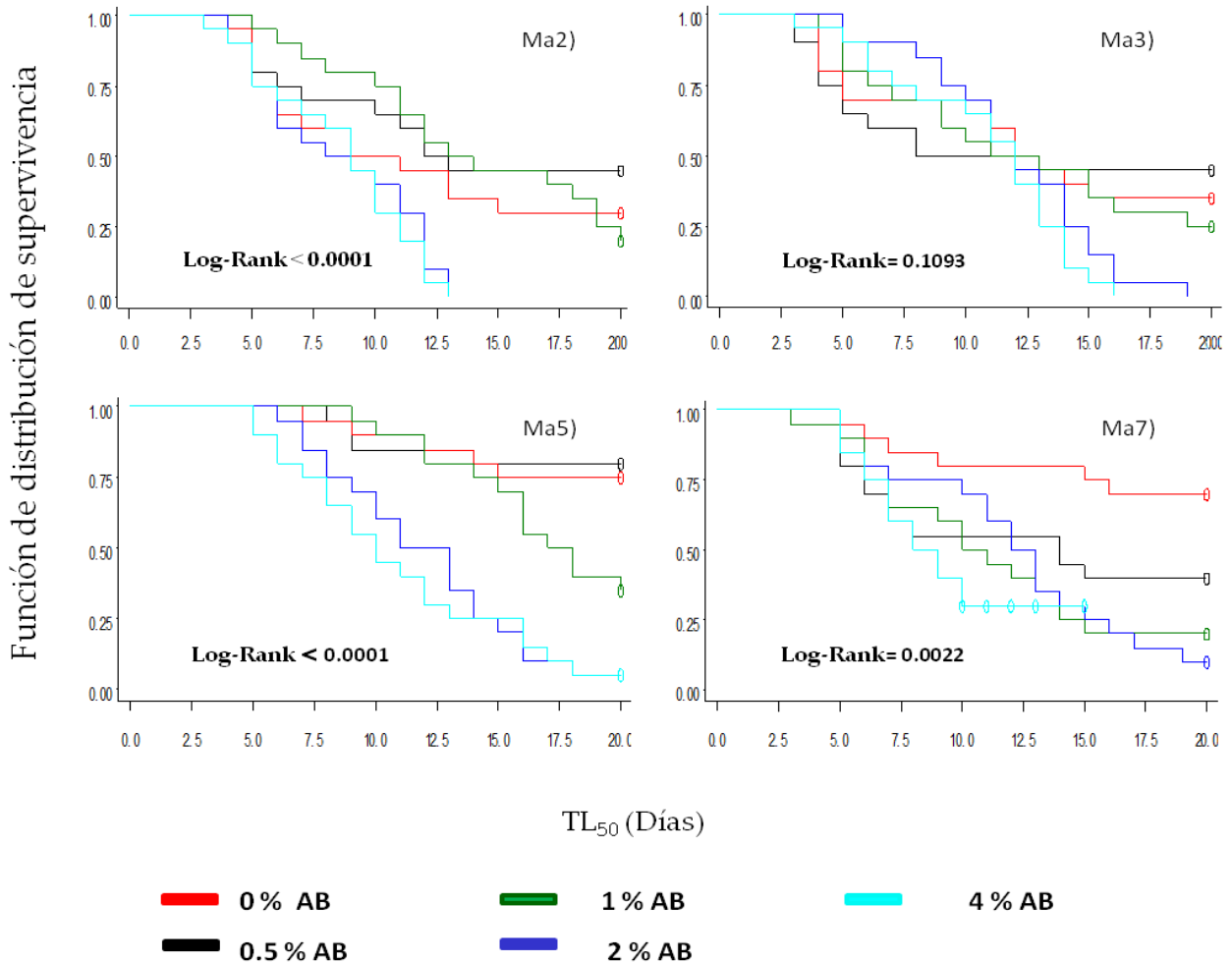


Figura 11. Curvas de Supervivencia de ninfas de quinto ínstar de *B. germanica* tratadas con cebos en pellet formulados con ácido bórico, y *M. anisopliae* (Ma2, Ma3 y Ma7) o *M. pingshaense* (Ma5).

Con los resultados de este trabajo se corroboró que al aumentar la concentración de ácido bórico en los cebos, también se disminuyó los valores de TL_{50} para matar a las

cucarachas (Figuras 11 y 12). Los mejores tratamientos fueron a la concentración de 4% AB con el Ma3 en polvo, y el Ma7 en pellet que mataron el 100%, la TL_{50} fue de 8.5 ± 0.1118 para ambos.

Con estos resultados se puede sugerir que los cebos con ácido bórico, y mezclados con atrayentes alimenticios, pueden ofrecer una alternativa excepcional para el manejo de *B. germanica*. A diferencia de otros insecticidas inorgánicos y orgánicos (muchos de acción rápida), se demostró que el ácido bórico no fue repelente para la cucaracha alemana cuando se usó a bajas concentraciones, ya sea como polvo o pellet. Sin embargo, el rechazo puede suceder a concentraciones superiores al 25% (Strong *et al.*, 1993).

Una característica importante y adicional del ácido bórico es que se puede humedecer y secar en el ambiente sin perder sus propiedades insecticidas, cosa que no sucede con el bórax y otros polvos (Ebeling *et al.*, 1971; Strong *et al.*, 1993). Dicha propiedad también debe considerarse para contribuir a su eficacia a largo plazo. Además, este insecticida inorgánico tiene la ventaja de contar con un registro favorable de seguridad en humanos, y no existen casos de resistencia en la cucaracha alemana (Ebeling *et al.*, 1971; Zurek *et al.*, 2002). La mezcla de ácido bórico con harina o azúcares, en cebos de polvo o líquido, se ha reportado como una estrategia para aumentar su atracción e ingestión (Strong *et al.*, 1993; Gore y Schal, 2004). Los resultados del bioensayo desarrollado en este trabajo evidenciaron la ventaja de este tipo de mezclas a partir de cebos formulados con ácido bórico (2% y 4%), azúcar glas 0.5 M, y hongos entomopatógenos. Además, no se detectó actividad repelente por esas concentraciones, pues en todos los tratamientos se observó la ingestión constante de los cebos.

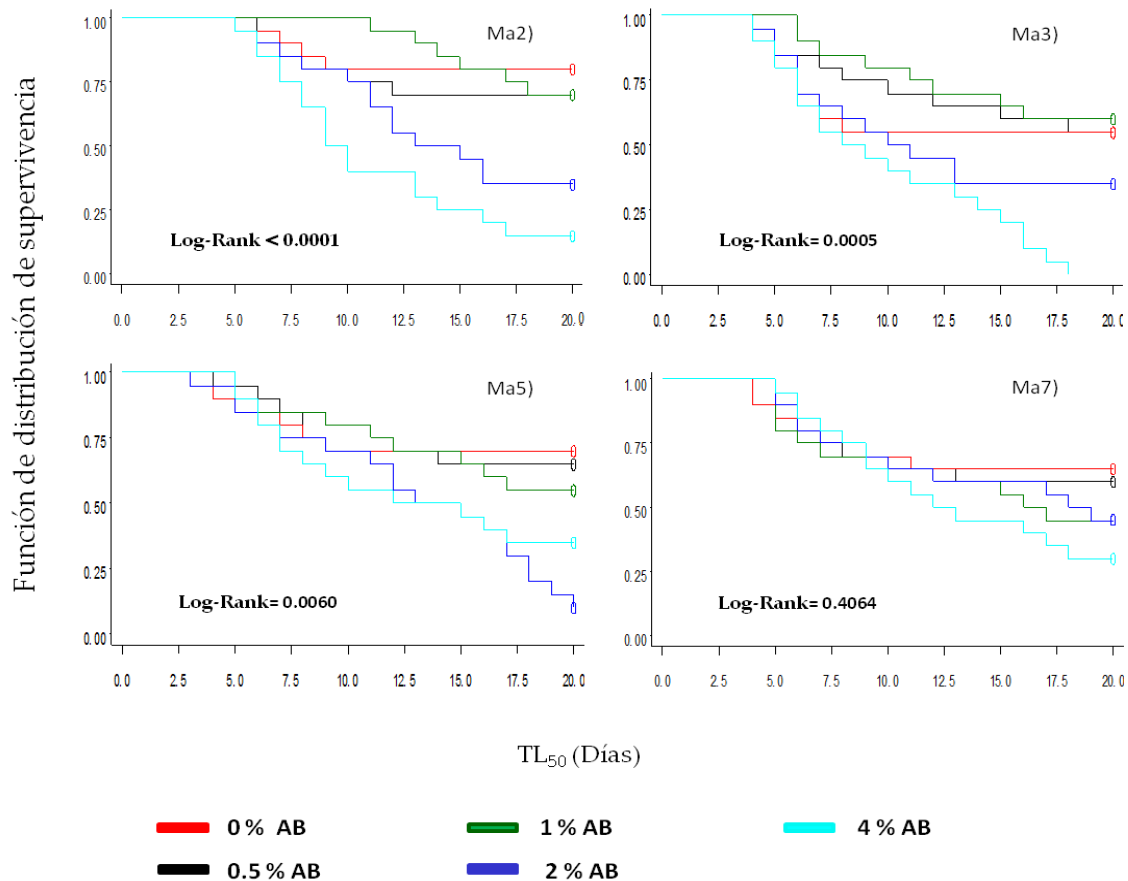


Figura 12. Curvas de Supervivencia de ninfas de quinto ínstar de *B. germanica* tratadas con cebos en polvo formulados con ácido bórico, y *M. anisopliae* (Ma2, Ma3 y Ma7) ó *M. pingshaense* (Ma5).

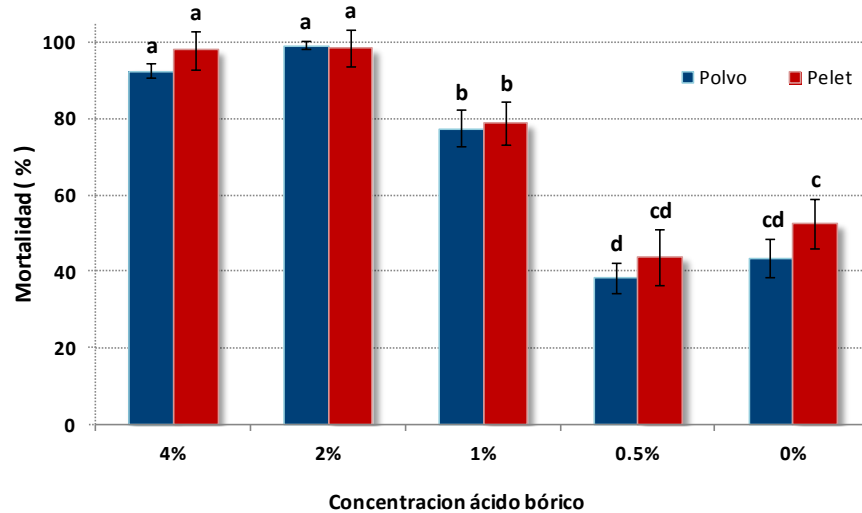
Por lo tanto, se puede indicar que estas combinaciones pueden ofrecer una buena opción para el manejo de esta plaga, pues en los tratamientos con estas formulaciones se observaron mortalidades arriba del 90%. En cambio, en los tratamientos sin ácido bórico los aislamientos de *Metarhizium* mataron sólo el $47.50 \pm 5.47\%$ de los insectos (Cuadro 9). Aunque el principio de la sinergia entre el ácido bórico y *Metarhizium* no está determinado, es evidente que las cucarachas tratadas con la combinación de estos agentes las hace más susceptibles a la infección del hongo. De igual manera, Zurek *et al.* (2002) reportaron una interacción sinérgica entre el ácido bórico (12.5%) y *M. anisopliae*

(8.96×10^9 conidia/m²) con un rápido modo de acción (TL₅₀ = 10 d) sobre adultos de la cucaracha alemana.

4.3.2. Comportamiento de agregación de *B. germanica* y su influencia en mortalidad por cebos formulados con *Metarhizium* y ácido bórico. En este ensayo se exploró si el comportamiento gregario de *B. germanica* influía en la mortalidad ocasionada por los mismos tratamientos, cebos con ácido bórico y *Metarhizium*, que se probaron sobre insectos individuales (4.3.1). La mortalidad ocasionada por los cebos en pellet y polvo fue diferente ($P \leq 0.0017$). El pellet mató $74.25 \pm 2.42\%$, mientras que el polvo, $70.17 \pm 2.81\%$. Estos resultados contrastaron con los del bioensayo anterior, donde el cebo formulado en polvo solo mató 52.23% de los insectos. El incremento de la mortalidad en el cebo en polvo puede significar que esta formulación se ve favorecida por los hábitos de las cucarachas, y que el AB puede funcionar en este cebo con sus diferentes modos de acción: como insecticida de contacto, que genera un efecto abrasivo y ocasiona heridas en el exoesqueleto, seguidas de desecamiento lento (Ebeling, 1966; Strong *et al.*, 1993) o por medio de la ingestión donde puede ocasionar alteraciones estructurales en el intestino medio, y causar la muerte por el daño mecánico del tracto digestivo, o septicemias originadas por los endoparásitos de las cucarachas (Habes *et al.*, 2006). En este caso, se puede inferir que el incremento en la mortalidad de los insectos puede ser favorecido por un efecto de desgaste o abrasión de la cutícula en el momento del acicalamiento, conducta que se observó entre las cucarachas tratadas con cebos en polvo.

En el análisis de las concentraciones de AB no se encontraron diferencias significativas en los cebos con 2 y 4%. El cebo en polvo con 2% provocó $99.17 \pm 1.03\%$ de mortalidad. Al comparar las diferencias entre los factores cebos-ácido bórico (AB), se puede observar que al incrementar la dosis de AB, también se aumenta la mortalidad de las

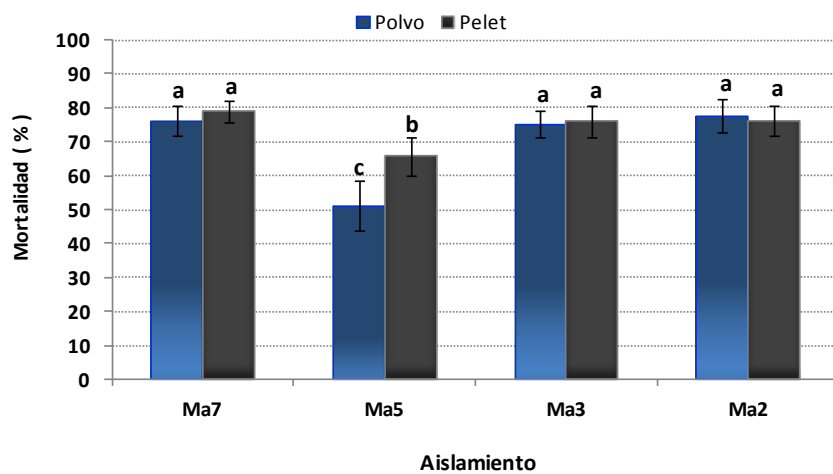
cucarachas, excepto para el cebo con 0.05% AB, que causó una mortalidad similar a la de los tratamientos con el hongo solo (0% AB) (Figura 13). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el experimento anterior, donde los mejores resultados se obtuvieron con los pellets de 4% AB (Cuadro 9). Se observó que las cucarachas expuestas a las formulaciones en polvo presentaban superficies corporales visiblemente contaminadas con las esporas y partículas del cebo como las regiones intersegmentales del tórax, el abdomen y las patas. Comportamientos como el contacto entre las cucarachas y el acicalamiento de unas a otras, después de haberse impregnado con las partículas del AB, o las esporas de *Metarhizium* en la formulación en polvo, son factores que pudieron beneficiar la ingestión del cebo después de haber sido retirado de las patas, antenas y otros apéndices. También puede hipotetizarse que el contacto con el polvo favoreció la adhesión de una cantidad mayor de esporas sobre la cutícula de las cucarachas, sobre todo en áreas del cuerpo en donde la limpieza era difícil, lo que provocó el incremento de la mortalidad.



Letras iguales indican que no hay diferencias. Tukey (DMS=9.18, GLE=200, $\alpha=0.05$, n=24)

Figura 13. Mortalidad de ninfas de *B. germanica* en las diferentes combinaciones cebo-ácido bórico.

Los resultados de las combinaciones cebo-aislamiento indican que no existieron diferencias entre los aislamientos probados de *M. anisopliae* en los dos cebos estudiados, en cambio, el aislamiento de *M. pingshaense* si actuó de manera diferente en los dos cebos (Figura 14). Este provocó mayor mortalidad en las ninfas tratadas con el cebo en pellet (65.67 ± 3.48%) y el cebo en polvo fue el menos efectivo, éste sólo alcanzó el 51.33 ± 7.25% de mortalidad.



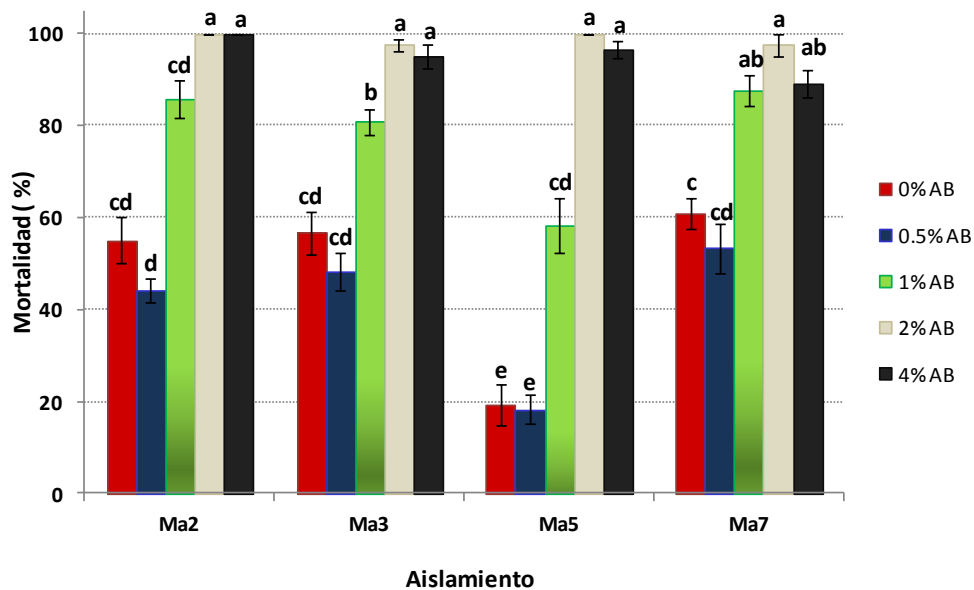
Letras diferentes indican diferencias. Tukey (DMS=7.86, GLE=200, $\alpha=0.05$, n=30)

Figura 14. Mortalidad de ninfas de *B. germanica* en las combinaciones cebo-aislamientos de *Metarhizium*

La presencia de ácido bórico en los cebos parece tener un efecto sobre la cucaracha y el hongo. Al comer los cebos, las cucarachas muestran mayor susceptibilidad a la invasión por el hongo. Algunos autores mencionan que la ingestión de bajas concentraciones de ácido bórico destruye la cubierta celular del intestino medio (Cochran, 1995), este efecto puede ser suficiente para causar la muerte del insecto o hacerlo susceptible a la invasión del entomopatógeno. Los daños físicos en la cutícula, o la alteración del pH de la hemolinfa, podrían disminuir la respuesta inmunológica del insecto y como consecuencia facilitar la infección. Se observó que la virulencia de los aislamientos fue

reforzada con el ácido bórico, se podría inferir que la penetración de la cutícula de *B. germanica* es favorecida por la acción abrasiva de este insecticida. Aunque la infección también puede ocurrir a través de aberturas naturales, como la boca, al parecer no fue la forma más importante de causar la infección, las cucarachas expuestas a los cebos en polvo fueron más propensas a adquirir cantidades mucho más altas de esporas que las que se alimentaron con los pellets.

En el análisis de las combinaciones aislamientos - concentración de ácido bórico se observó interacción significativa entre factores (Figura 15). Quintela y Mc Coy (1997, 1998) indican que cuando se emplea la combinación de dos agentes con acción insecticida se puede evaluar si existe efecto sinérgico entre ambos si la interacción es positiva. Por lo tanto, con estos resultados se puede demostrar que existe una interacción sinérgica entre el ácido bórico y *Metarhizium* en los cebos estudiados.



Letras diferentes indican diferencias. Tukey (DMS=10.46, GLE=200, $\alpha=0.05$, n=12)

Figura 15. Mortalidad de ninfas de *B. germanica* en las combinaciones aislamiento – concentración de ácido bórico.

La virulencia de *Metarhizium* se incrementó con la combinación de ácido bórico. Las concentraciones de 2 y 4% de AB no fueron diferentes en todos los aislamientos y causaron mayor mortalidad (89.17 a 100%), comparada con los tratamientos sin AB (19.17 a 56.67%). La naturaleza de la interacción ácido bórico y el hongo sigue estando en la especulación, podría ser una respuesta físico-química o inmunológica. El ácido bórico podría dañar la cutícula físicamente, facilitando la penetración de *M. anisopliae*; también podría reducir el pH de la hemolinfa y alterar la presión osmótica a favor de la infección fúngica (Zurek *et al.*, 2002). También se ha propuesto que el ácido bórico o el hongo reduzcan la capacidad de defensa de las cucarachas, traducida en una deficiencia en el sistema inmunológico, es decir, que la combinación de estos dos agentes ocasione susceptibilidad a la infección con sus microorganismos simbióticos, y morir por bacteriemias o toxemias.

Durante el desarrollo del ensayo se observó que ninfas tratadas morían momificadas sobre los cebos durante la alimentación, o sobre su depósito de agua, adoptando su posición natural. Este comportamiento se ha observado en diferentes insectos tratados con hongos entomopatógenos, característica observable en la fase saprofita de los hypocreales después de la muerte del huésped (Tanada y Kaya, 1993). Algunas de las cucarachas muertas presentaron el abdomen distendido, esta característica se considera sintomatología, antes y después, de la muerte causada por la ingestión de tratamientos con ácido bórico (Strong *et al.*, 1993).

En la realización de este experimento algunas ninfas de *B. germanica* mudaron al estado adulto, y se observaron conductas de apareamiento entre cucarachas sobrevivientes. Sin embargo, las ootecas fueron deformes o las hembras las liberaron prematuramente. Estos datos coinciden con lo reportado por Kilani-Morakchi *et al.* (2009), quienes atribuyen efectos subletales del ácido bórico sobre la reproducción de *B. germanica*,

incluyendo la caída prematura de las ootecas y la reducción en el éxito de eclosión de las mismas, en consecuencia a la disminución en la absorción de nutrientes causado por la destrucción de las células epiteliales del intestino medio, razón por la que se afecta el proceso de vitelogénesis. Además Quesada-Moraga (2004) indicó que la reducción en el número de ootecas producidas por hembras sobrevivientes a la infección por *M. anisopliae* podría estar relacionada a la reducción en la longevidad de los adultos tratados. De hecho, se ha reportado que el número de ootecas producidas por las hembras orthopteroides está directamente relacionada con su longevidad (Ross y Mullins, 1995).

Es importante señalar que la esporulación en las cucarachas muertas se monitoreó. Para ello se colocó cada cucaracha (después de haber muerto) en una cámara húmeda tres días. Se observó una disminución de la esporulación en los casos de insectos que murieron por cebos con 2 y 4% de ácido bórico. En los cebos con 2% esporularon el $77 \pm 1.08\%$, en cambio al 4%, la esporulación se redujo hasta el $45 \pm 2.59\%$. En algunas cucarachas. La esporulación se presentó en partes localizadas, como apéndices bucales y abdomen, pero ésta fue acompañada por la presencia de bacterias o desarrollo de hongos saprófitos contaminantes como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

Es importante considerar la esporulación para elegir la concentración del ácido bórico en la formulación de los cebos, debido a que si existe una esporulación reducida, limitaría una cualidad importante en los hongos entomopatógenos, que es la transmisión horizontal. Esta capacidad se ha reportado en estudios realizados con diferentes aislamientos de *M. anisopliae* probada en ninfas (Lopes y Alves, 2011) y adultos de la cucaracha alemana (Kaakeh, 1996; Quesada Moraga, 2004). Al respecto, Kaakeh *et al.* (1996) encontraron que la tasa de mortalidad aumentó significativamente al aumentar la proporción de cucarachas infectadas junto con las cucarachas no

expuestas al hongo y esto lo atribuyeron a la transmisión horizontal, a través de ingestión de heces fecales contaminadas. La coprofagia se ha reportado en ninfas y adultos de la cucaracha alemana. Kopanic y Schal (1999) apoyan la hipótesis de que la coprofagia facilita la transmisión horizontal en poblaciones de cucarachas tratadas con cebos formulados con insecticidas tóxicos. Por lo tanto, el uso de cebos formulados con ácido bórico y *Metarhizium*, planteado en este estudio, permitirían regresar a las cucarachas a sus sitios de refugio y transmitir la enfermedad y de esta manera favorecer la transmisión horizontal.

Quesada-Moraga *et al.* (2004) complementaron esta idea señalando que el canibalismo y necrofagia, observadas en la cucaracha alemana (Durier y Rivault, 2000), están dentro de las principales formas que facilitan la muerte secundaria de cucarachas sanas de *B. germanica*. Al mismo tiempo, ellos sugieren que las condiciones de humedad, que prevalecen en los nichos ecológicos de las cucarachas, benefician el desarrollo de la infección y la micosis en las cucarachas muertas por *Metarhizium* y como consecuencia la propagación de la infección sea más rápida en las poblaciones de *B. germanica*.

La eficacia de un cebo está determinada por el rendimiento global de sus componentes, incluidos los ingredientes activos e inertes. La evaluación de la eficacia de cebos formulados con ácido bórico y *Metarhizium* en grupos de ninfas (quinto ínstar) de *B. germanica* favoreció la virulencia de este hongo, y se observó un aumento de la mortalidad en las cucarachas.

4.4. LITERATURA CITADA

BENNETT W. G., J. M. OWENS AND R. M. CORRIGAN. 1997. Truman's scientific guide to pest control operations, 5ta ed. Advanstar communications. Cleveland OH. Pág 121-124.

- COCHRAN D. G. 1989. Monitoring for insecticide resistance in field collected strains of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 82: 336-341.
- COCHRAN D. G. 1995. Toxic effects of boric acid on the German cockroach. Cel. Mol. Life Sci. 5: 561-563
- DURIER V. AND C. RIVAULT. 2000. Secondary transmission of toxic baits in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 93: 434-440.
- EBELING W., WAGNER R. E. AND REIERSON D. A. 1966. Influence of repellency of blatticides. I. Laboratory experiments with German cockroaches. J. Econ. Entomol. 59: 1374-1388.
- EBELING W. 1971. Sorptive dust for pest control. Annu. Rev. Entomol. 16: 123-159.
- GORE C. J. AND C. SCHAL. 2004. Laboratory Evaluation of Boric Acid-Sugar Solutions as Baits for Management of German cockroach Infestations. J. Econ. Entomol. 97: 581-587.
- HABES D, S. MORAKCHI, N. ARIBI, J. P. FARINE, AND N. SOLTANI. 2006. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S- transferase activity. Pestic. Biochem. Physiol. 84: 17-24
- INGLIS D. G, M. S GOETTEL AND T. M BUTT. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: Butt T. M.; C.W. Jackson, N. Magan. (Eds.). Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. CABI Publishing. pp: 23-69.
- KAAKEH W, B. L REID, T. J BOHNERT AND G. W BENNETT. 1996. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and Hydramethylnon among German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) J. Entomol. Sci. 3: 378-390.

- KAAKEH W, B.L REID, T.J BOHNERT AND G.W BENNETT. 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). J. Econ. Entomol. 90: 473–482.
- KILANI-MORAKCHI S, N. ARIBI AND N. SOLTANI. 2009. Activity of boric acid on German cockroaches: Analysis of residues and effects on reproduction. Afr. J. Biotechnol. 8: 703-708.
- KOPANIC R. J. JR. AND C. SCHAL. 1999. Coprophagy Facilitates Horizontal Transmission of Bait Among Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). Environ. Entomol. 28: 431-438.
- LOPES R. B AND S. B. ALVES. 2011. Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L) (Blattodea: Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. Neotrop. Entomol. 40: 368-374.
- MILNER R. J AND R. M. PEREIRA. 2007. Microbial Control of urban pests – cockroaches, ants and termites. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers. pp. 721-740.
- MOHAN M. C., K. A LAKSHMI AND U. K DEVI. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). Biocon. Sci. Technol. 9: 29-33.
- PACHAMUTHU P. AND S. T KAMBLE. 2000. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpirifos, propetamphos and cyflutrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 93: 60-70.
- PHILLIPS A. K., A. G. APPEL AND S. R. SIMS. 2010. Topical Toxicity of Essential Oils to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 103: 448-459.

- QUESADA-MORAGA E, R. S. QUIROS P. V. GARCIA AND C. S. ALVAREZ. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Invertebr. Pathol. 87: 51-58.
- QUINTELA, E. D. AND C. W. MC COY. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. Environ. Entomol. 26: 1173–1182.
- QUINTELA, E. D. AND C. W. MC COY. 1998. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. J. Econ. Entomol. 91: 110–122.
- ROSS, M. H. AND D. E. MULLINS. 1995. Chapter 2: Biology. In: Rust, M.K.; J.M. Owens, D.,A. Reiersen (Ed.). Understandings and Controlling the German cockroach. New York: Oxford University Press, 1995. Cap 2: P: 21-47.
- SAS, 2009. Statistical Analysis System. Version 9.2 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SCHAL C. AND HAMILTON R. L. 1990. Integrated suppression of synantropic cockroaches. Annu. Rev. Entomol 35: 521-551.
- STRONG C. A., P. G. KOEHLER AND R. S. PATTERSON. 1993. Oral toxicity and repellency of borates to German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 86: 1458-1463.
- TANADA Y. AND H. K. KAYA. 1993. Fungal infections. In: Insect Pathol. Ed. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 319-357pp.
- WYREBEK M., C. HUBER R. K. SASAN AND M. J. BIDOCHKA. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. Microbiol. 157: 2904–2911.

ZIMMERMANN M. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocon. Sci. Technol.* 17: 879-920.

ZUKOWSKI K. AND C. BAJAN. 1996. The study of the usefulness of *Beauveria bassiana* in eradication of Cockroaches (*Blattella germanica*). *Roczn Pzn.* 47: 343-349.

ZUREK L., D. W. WATSON AND C. SCHAL. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and Boric Acid against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Biol. Con.* 23: 296-302.

VI. CONCLUSIÓN GENERAL.

Se comprobó la capacidad infectiva de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, *M. pingshaense* y *B. bassiana* en ninfas y adultos de la cucaracha alemana, siendo las ninfas de quinto ínstar las menos susceptibles. Los mejores candidatos para el manejo de poblaciones y desarrollo de una formulación eficaz contra la cucaracha alemana fueron los aislamientos de *M. anisopliae*, Ma2 con un TL₅₀ de 8.2 días y el Ma7 con TL₅₀ 3.8 días.

La adición de fagoestimulantes como el azúcar glas 0.5M promueve la atracción de ninfas de *B. germanica* a cebos formulados con ácido bórico. Se demostró que el ácido bórico es eficaz como un tratamiento independiente para el manejo de *B. germanica*. No obstante, la combinación del ácido bórico a concentraciones de 2% con *M. anisopliae* o *B. bassiana* no afecta la viabilidad de estos hongos.

Se comprobó un efecto sinérgico entre el ácido bórico y el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Los aislamientos con mayor capacidad infectiva probados en cebos combinados con ácido bórico contra *B. germánica* fueron Ma7, Ma3 y Ma2. La mejor formulación fueron los pellets combinados con 2% de ácido bórico con los aislamientos Ma2 y Ma3, sin que afecte la esporulación de las cucarachas muertas por la ingestión de estos cebos y por consiguiente a la transmisión horizontal.

Finalmente, los cebos probados sobre ninfas de quinto ínstar de *B. germanica*, tienen un alto potencial para el manejo de las poblaciones de esta cucaracha. Sin embargo, es importante desarrollar una metodología apropiada para evaluar su estabilidad y aplicación en campo sobre la cucaracha alemana.