

COMPATIBILIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS E INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Mercedes Nathalie Mendoza-Ledesma, Américo D. Rodríguez-Ramírez, Rosa Patricia Penilla-Navarro, ✉ María Guadalupe Vázquez-Martínez.

Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud Pública. 4ª. Norte y 19 Poniente s/n, Colonia Centro C.P. 30700. Tapachula, Chiapas, México.

✉ Correo: mguadalu@insp.mx.

RESUMEN. El control integrado, utilizando la combinación de insecticidas con hongos entomopatógenos, puede incrementar la eficacia del control de mosquitos *Aedes aegypti*, vectores de dengue. En el presente estudio se evaluó el efecto de seis concentraciones de formulados de los insecticidas malatión (0.84, 0.85, 0.88, 2.31, 2.62 y 3.29%) y clorpirifos-etil (0.41, 0.60, 0.98, 5.10, 5.70 y 7.50%) sobre la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de *Gliocladium virens* y *Trichoderma longibrachiatum*. El formulado de clorpirifos-etil causó mayor inhibición de la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de los dos hongos evaluados, comparado con malatión. El hongo *G. virens* fue compatible con malatión a las concentraciones 0.84%, 0.85% y 0.88%. Esta compatibilidad podría considerarse como un elemento más en la alternativa del control integrado de *Ae. aegypti*.

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

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

ABSTRACT. Integrated control using the combination of insecticides with entomopathogenic fungi, can increase the effectiveness of the control of mosquitoes *Aedes aegypti*, dengue vectors. The present study evaluated the effect of six concentrations of the insecticide formulated malathion (0.84, 0.85, 0.88, 2.31, 2.62 and 3.29%) and chlorpyrifos-ethyl (0.41, 0.60, 0.98, 5.10, 5.70 and 7.50%) on the germination, sporulation and vegetative growth of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum*. The formulated chlorpyrifos-ethyl caused greatest inhibition of germination, sporulation and vegetative growth of the two fungi evaluated, compared with malathion. The fungus *G. virens* was compatible with malathion at 0.84, 0.85 and 0.88%. This compatibility could be considered as an element in the alternative of the integrated control of *Ae. aegypti*.

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

INTRODUCCIÓN

La incidencia y la gravedad del dengue han aumentado rápidamente en Latinoamérica y el Caribe en los últimos años (OMS, 2014). En la actualidad, no hay tratamiento específico ni vacuna disponible (Guardian News, 2014), por lo que el único medio para reducir las tasas de infección es a través del control del insecto vector (Paula *et al.*, 2011), el cual se ha realizado durante los últimos 40 años por métodos químicos (Montada *et al.*, 2005). Sin embargo, el desarrollo de resistencia a insecticidas constituye el principal problema operacional que afecta su control, lo que ha conducido a buscar nuevas alternativas como el control biológico. Dentro de los agentes de control biológico se encuentran los hongos entomopatógenos, los cuales son candidatos prometedores para el control de vectores, incluyendo mosquitos (Luz *et al.*, 2007).

Varios estudios han demostrado el potencial de infección de los hongos entomopatógenos sobre mosquitos vectores (Scholte *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2010; Vázquez-Martínez *et al.*, 2013). Además, uno de los aspectos prometedores del uso del control microbiano de insectos, es su integración con otras medidas de control, particularmente con métodos químicos (Neves *et al.*, 2001). Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la compatibilidad de hongos entomopatógenos e insecticidas organofosforados, con el fin de que los resultados puedan ser útiles en el desarrollo de estrategias alternativas para el control de las poblaciones de *Ae. aegypti* y con ello reducir la incidencia de Dengue.

MATERIALES Y MÉTODO

Insecticidas. Se utilizaron los insecticidas Malathion 1000 (malatión 88.7%, HPA, Productos de Higiene y Protección Ambiental S.A. de C.V.) y Tumbador (clorpirifos etil 44.5%, TACSA).

Mosquitos. Se utilizaron hembras de *Ae. aegypti* de las cepas susceptible (cepa New Orleans) y resistente a organofosforados (cepa Loma Zapatero) de 2-3 días de emergidas y alimentadas únicamente con una solución de agua azucarada al 10%, proporcionadas por el Insectario del Laboratorio de Insecticidas del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP).

Cepas de hongos. Se utilizaron dos cepas nativas de hongos entomopatógenos, *Trichoderma longibrachiatum* y *Gliocladium virens* proporcionadas por el Laboratorio de Patógenos y Vectores del CRISP. Cada cepa se cultivó por separado en medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) (Bioxon® Becton Dickinson) en placas petri mediante la técnica del papel celofán (Dennis y Webster, 1971).

Pruebas de línea base. Mediante pruebas de susceptibilidad para mosquitos adultos (OMS, 1981) se determinaron las concentraciones letales (CL_{15} , CL_{25} y CL_{50}) para las cepas de *Ae. aegypti* susceptible y resistente a organofosforados.

Efecto de insecticidas sobre hongos entomopatógenos. Los efectos de malatión y clorpirifos-etil se evaluaron sobre la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum* y *G. virens*. Se probaron de manera individual las dos cepas de hongos con los dos insecticidas, utilizando la CL_{15} , CL_{25} y CL_{50} de cada uno.

a) Germinación. Se sembraron 5 alícuotas de 5 μ l de una suspensión de conidias de 1×10^6 conidias mL^{-1} en placas con medio SDA con las concentraciones incorporadas de insecticida. Como control, se emplearon placas petri con medio SDA pero sin insecticidas. Se incubaron a $26 \pm 2^\circ C$ por 18-24 horas aproximadamente y luego se agregó azul de lactofenol para detener la germinación. Se cortó la porción de agar donde se inoculó la alícuota y se colocó sobre una lámina de portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio a 40X. Se contabilizaron las conidias germinadas y no germinadas y se obtuvo el porcentaje de germinación (Cañedo y Ames, 2004).

b) Esporulación. Se sembraron 5 μ l de una suspensión de conidias de 1×10^6 conidias mL^{-1} en placas petri con SDA más la concentración correspondiente de insecticida. Se incubaron a $27^\circ C$ por 10 días. Posteriormente, se extrajo un círculo central de 1 cm^2 de la colonia, se resuspendió en 5 ml de Tween al 0.01% y se sonicó para la disgregación de las conidias. El número de conidias fue contabilizado utilizando una cámara de Neübauer.

c) Crecimiento vegetativo. Se cortó aproximadamente un cm^2 del cultivo de hongo esporulado y se sembró de manera individual en el centro de placas petri con los tratamientos; se incubó a $26 \pm 2^\circ C$ y una humedad relativa de $70 \pm 5\%$. Se estimó el crecimiento de las colonias a

través de su diámetro (cm); cada valor fue obtenido del promedio de tres mediciones al día 14 y 30, posteriores a la inoculación. Para cada prueba se realizaron cuatro repeticiones y tres réplicas por tratamiento, incluyendo al control.

Compatibilidad de insecticidas y hongos entomopatógenos. La compatibilidad se calculó con la fórmula de T (Alves *et al.*, 1998): $T=20[CV] + 80[ESP]/100$. Donde: CV= crecimiento vegetativo con relación al control y ESP = porcentaje de esporulación con relación al control. Se establecieron los siguiente límites para T: 0-30% = altamente tóxico (AT); 31-45% = tóxico (T); 46-60% = moderadamente tóxico (MT); $\geq 60\%$ = compatible (C).

Análisis estadístico. Las CL_{15} y CL_{50} fueron calculadas utilizando el programa EPA (Probit Analysis Program Versión 1.5) y la CL_{25} se obtuvo utilizando el programa StatPlus 2009. Los resultados de germinación, esporulación y crecimiento vegetativo fueron sometidos a un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y una prueba de comparación de rangos utilizando el programa InfoStat versión 2013.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Línea base de malatión y clorpirifos-etil con mosquitos *Ae. aegypti*.

Las concentraciones letales (CL) obtenidas CL_{15} , CL_{25} y CL_{50} del formulado de malatión para la cepa susceptible de *Ae. aegypti* fueron 0.84%, 0.85% y 0.88% ($X^2=5.991$), respectivamente y para la cepa resistente a organofosforados fueron 2.31%, 2.62% y 3.29% ($X^2=7.815$). Las CL_{15} , CL_{25} y CL_{50} obtenidas del formulado de clorpirifos-etil para la cepa susceptible fueron 0.41%, 0.60% y 0.98% ($X^2=7.815$), mientras que para la cepa resistente a organofosforados fueron 5.10%, 5.70% y 7.50% ($X^2=7.815$). Las concentraciones letales de malatión y clorpirifos-etil antes mencionadas fueron utilizadas para los ensayos de compatibilidad con los hongos *T. longibrachiatum* y *G. virens*.

Efecto de insecticidas sobre hongos entomopatógenos.

a) Germinación. La germinación de los dos hongos ensayados varió significativamente entre los diferentes tratamientos ($H= 144.66$; $gl=12$; $P=0.0001$). El insecticida clorpirifos-etil fue el que más afectó la germinación, pues ni *T. longibrachiatum* ni *G. virens* presentaron germinación en ninguna de las seis concentraciones usadas después de 120 h. En presencia de malatión, *G. virens* presentó una germinación que varió de 88.62% a 91.39% (Tabla 1) y en *T. longibrachiatum* varió de 93.17% a 97.67% (Tabla 2). Carzola y Morales (2010) reportaron que malatión inhibe $>90\%$ de la germinación de *B. bassiana* a las 24 h. La diferencia de los resultados puede ser debido a que en este trabajo se monitoreó la germinación hasta por 70 h post-inoculación, mientras que Carzola y Morales sólo 24 h, además son diferentes especies de hongos las que se utilizaron en los ensayos.

b) Esporulación. *T. longibrachiatum* no registró esporulación en ninguno de los tratamientos de malatión ni de clorpirifos-etil (Tabla 2). La esporulación de *G. virens* varió significativamente entre los tratamientos ($H= 36.45$; $gl=12$; $P=0.0001$) (Tabla 1). Se observó que un aumento en la concentración no resultó en la disminución de la producción de conidias, como se esperaría. Moino y Alves (1998) sugieren dos posibles explicaciones para esta conducta: la primera indica que los hongos, como un mecanismo de resistencia, pueden metabolizar los insecticidas y liberar compuestos que pueden ser usados por el hongo como nutrientes secundarios, y la segunda que en un medio tóxico, el hongo podría estar haciendo un esfuerzo reproductivo, incrementando la producción de conidias.

Tabla 1. Efecto de malatión y clorpirifos-etil sobre la germinación, crecimiento vegetativo y esporulación de *Gliocladium virens*.

Tratamiento	% de germinación	Crecimiento vegetativo (cm) al día 14/30	% de inhibición de CV al día 14/30	% de esporulación	T al día 14/30	Clasificación
Control	94.93±2.55 ^c	8.5 ^f /8.49±0.06 ^g	0/0	100 ^b		
Malatión 0.84	88.62±2.10 ^b	6.32±0.54 ^{de} /8.28±0.11 ^{fg}	25.59/2.61	72.91±10.44 ^{ab}	73.21/77.1	C
Malatión 0.85	89.10±2.10 ^b	6.51±0.84 ^e /8.08±0.23 ^{ef}	23.43/4.90	61.85±14.70 ^{ab}	64.79/68.5	C
Malatión 0.88	91.39±0.89 ^b	6.05±0.63 ^{ab} /7.64±0.40 ^{def}	28.89/10.09	60.13±16.64 ^{ab}	62.33/66.09	C
Malatión 2.31	0 ^a	6.01±0.55 ^{de} /7.84±0.26 ^{def}	29.31/7.55	0 ^a	14.14/18.49	AT
Malatión 2.62	0 ^a	5.89±0.58 ^{cde} /7.89±0.24 ^{def}	30.75/7.16	0 ^a	13.85/18.57	AT
Malatión 3.29	0 ^a	3.43±0.64 ^{bcd} /7.10±0.85 ^{cde}	59.64/16.50	0 ^a	8.07/16.7	AT
Clorpirifos 0.41	97.00±2.26 ^c	2.28±0.37 ^{bc} /3.67±0.77 ^{bcd}	73.20/56.83	0 ^a	5.36/8.63	AT
Clorpirifos 0.60	97.11±2.63 ^c	1.81±0.33 ^{ab} /2.60±0.50 ^{abc}	78.69/69.38	0 ^a	4.26/6.12	AT
Clorpirifos 0.98	87.97±2.20 ^b	1.17±0.07 ^{ab} /1.69±0.23 ^{ab}	86.24/80.07	0 ^a	2.75/3.99	AT
Clorpirifos 5.1	0 ^a	0 ^a /0 ^a	100/100	0 ^a	0/0	AT
Clorpirifos 5.7	0 ^a	0 ^a /0 ^a	100/100	0 ^a	0/0	AT
Clorpirifos 7.5	0 ^a	0 ^a /0 ^a	100/100	0 ^a	0/0	AT

Medias seguidas por una letra común no son significativamente diferente (P>0.05). ¹ Altamente tóxico (AT); tóxico (T); moderadamente tóxico (MT); compatible (C) (Alves et al. 1998).

Tabla 2. Efecto de malatión y clorpirifos-etil sobre la germinación, crecimiento vegetativo y esporulación de *Trichoderma longibrachiatum*.

Tratamiento	% de germinación	Crecimiento vegetativo (cm) al día 14/30	% de inhibición de CV al día 14/30	% de esporulación	T al día 14/30	Clasificación
Control	93.40±1.99 ^b	8.46±0.13 ^f /8.5 ^f	0/0	100		
Malatión 0.84	93.44±2.00 ^b	6.69±1.27 ^{de} /7.54±0.74 ^{de}	21.31/11.27	0	15.74/17.75	AT
Malatión 0.85	97.67±2.46 ^b	7.64±0.34 ^{ef} /8.06±0.17 ^e	10.13/5.20	0	17.97/18.96	AT
Malatión 0.88	93.17±2.82 ^b	7.26±0.36 ^{de} /7.49±0.45 ^{de}	14.58/11.93	0	17.08/17.61	AT
Malatión 2.31	0 ^a	3.49±0.70 ^{cde} /5.32±0.50 ^{cde}	58.92/37.35	0	8.22/12.53	AT
Malatión 2.62	0 ^a	3.40±0.54 ^{cd} /4.99±0.52 ^{cde}	60.03/41.31	0	7.99/11.74	AT
Malatión 3.29	0 ^a	2.86±0.51 ^{bcd} /4.26±0.92 ^{bcd}	66.34/49.93	0	6.73/10.01	AT
Clorpirifos 0.41	0 ^a	1.42±0.12 ^{bc} /2.51±0.25 ^{bc}	83.33/70.49	0	3.33/5.90	AT
Clorpirifos 0.60	0 ^a	1.18±0.09 ^{abc} /1.85±0.20 ^{abc}	86.18/78.28	0	2.76/4.34	AT
Clorpirifos 0.98	0 ^a	1.09±0.05 ^{ab} /1.44±0.12 ^{ab}	87.16/83.04	0	2.57/3.39	AT
Clorpirifos 5.1	0 ^a	0 ^a /0 ^a	100/100	0	0/0	AT
Clorpirifos 5.7	0 ^a	0 ^a /0 ^a	100/100	0	0/0	AT
Clorpirifos 7.5	0 ^a	0 ^a /0 ^a	100/100	0	0/0	AT

Medias seguidas por una letra común no son significativamente diferente (P>0.05). ¹ Altamente tóxico (AT); tóxico (T); moderadamente tóxico (MT); compatible (C) (Alves et al. 1998).

c) Crecimiento vegetativo. La inhibición del crecimiento vegetativo dependió del tiempo y de las concentraciones usadas de insecticida, registrándose menor inhibición del

crecimiento vegetativo a los 30 días post-inoculación. En *G. virens*, con la concentración más baja de malatión (0.84%), se registró una inhibición del crecimiento vegetativo de 2.61% y al 3.29% se obtuvo una inhibición del 16.5% (Tabla 1) a los 30 días. En *T. longibrachiatum*, igualmente a los 30 días, se registró una inhibición de 5.2% a 49.93% en los tratamientos de malatión al 0.85% y 3.29% (Tabla 2), respectivamente. Con clorpirifos-etil se detectó un efecto muy tóxico al inhibir hasta el 100% del crecimiento vegetativo en los dos hongos ensayados. El efecto tóxico de clorpirifos ha sido reportado sobre *M. anisopliae* (Mohamed *et al.*, 1987) y *Beauveria bassiana* (Lecuona y Díaz, 1996) inhibiendo el crecimiento micelial en ambos hongos.

Compatibilidad de malatión y clorpirifos-etil con *G. virens* y *T. longibrachiatum*.

Considerando la fórmula propuesta por Alves *et al.* (1998) para la clasificación de productos químicos de acuerdo a su toxicidad sobre los hongos entomopatógenos probados, se obtuvo que malatión al 0.84%, 0.85% y 0.88% fue compatible con *G. virens* (Tabla 1). Anderson *et al.* (1989), sugirieron que el efecto de un insecticida sobre el crecimiento del hongo podría adjudicarse al tipo de formulación, ya que señalan que la formulación del insecticida es más importante que el ingrediente activo. En este estudio se evaluó el efecto de los productos formulados de insecticidas organofosforados (Malathion 1000® y Tumbador®) sobre la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de *G. virens* y *T. longibrachiatum*, por lo que el resultado obtenido es consecuencia de la aplicación del producto químico utilizado que incluye tanto al ingrediente activo como a los aditivos de cada formulación.

Por otro lado, para la aplicación en campo, se recomienda el uso de cepas nativas, ya que son más efectivas que las introducidas por estar adaptadas a las condiciones climáticas del lugar donde serán aplicadas (Castillo, 2006). En este estudio, el hallazgo de la compatibilidad de la cepa nativa *G. virens* con el insecticida malatión (a 0.84, 0.85 y 0.88%) brinda la posibilidad de ofrecer alternativas que mejoren los resultados en una estrategia de control integrado. En conclusión, la combinación del insecticida malatión y del hongo entomopatógeno *G. virens* podría ser recomendada para ser utilizada en programas de manejo integrado para el control de mosquitos *Ae. aegypti*, vectores de dengue.

AGRADECIMIENTOS

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

LITERATURA CITADA

- Cañedo, V. y T. Ames. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. 62 pp.
- Castillo, Z. S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en el Petén, Guatemala. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Carzola, D. y M. P. Morales. 2010. Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. Bol. Mal. Salud Amb. 2: 261-270.

- Dennis, C. y J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Production on non-volatile antibiotic. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57:25-39.
- Guardian News (2014). Preparing for a dengue fever vaccine: why Brazil's ahead of the game. http://www.theguardian.com/global-development-professionals-network/2014/jan/27/dengue-fever-vaccine-development-brazil?CMP=tw_t_gu Fecha de consulta: 24 de febrero de 2014.
- Howard, A. F. V., Koenraadt, C. J. M., Farenhorst, M., Knols, B. G. J. y W. Takken. 2010. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malar. J.* 9:168.
- Lecuona, R. E. y B. M. Díaz. 1996. Compatibilidad de dos cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con distintos insecticidas químicos. *RIA. INTA. Buenos Aires, Argentina.* 26(1):77-82.
- Luz, C., Tai, M. H. H., Santos, A. H., Rocha, L. F. N., Albernaz, D. A. S. y H. H. G. Silva. 2007. Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 44(5): 799-804.
- Mohamed, A. K. A., Pratt, J. P. y F. R. S. Nelson. 1987. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathol.* 99: 99-105.
- Montada, D. D., Castex, R. M., Suárez, D. S., Figueredo, S. D. y S. M. Leyva. 2005. Estado de la resistencia a insecticidas en adultos del mosquito *Aedes aegypti* del municipio de Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 57(2): 137-142.
- Neves, P. M. O. J., Hirose, E., Tchujo, P. T. y A. Moino. 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotrop. Entomol.* 30: 263-268.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. 2014. <http://www.who.int/features/qa/54/es/>. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2014.
- Paula, A. R., Carolino, A. T., Paula, C. O. y R. I. Samuels. 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors.* 4(8): 1-8.
- Ramzan-Asi, M., Bashir, M. H., Afzal, M., Ashfaq, M. y S. T. Sahi. 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. *Pak. J. Bot.* 42(6): 4207-4214.
- Schumacher, V. y H. M. Poehling. 2012. *In vitro* effect of pesticides on germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biol.* 116: 121-132.
- Scholte, E. J., Njiru, B. N., Smallegange, R. C., Takken, W. y B. G. J. Knols. 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar. J.* 2(29): 1-8.
- Vázquez-Martínez, M. G., Rodríguez-Meneses, A., Rodríguez, A. D. y M. H. Rodríguez. 2013. Lethal effects of *Gliocladium virens*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the malaria vector *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Sci. Techn.* 23(9): 1098-1109.