

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUBPROGRAMA EDC-BIOLOGÍA

**INFORME FINAL DE LA PRÁCTICA DE EDC
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA APLICADA Y PARASITOLOGÍA
(LENAP)
2006**

MARIELE JOHANNA PELLECCER ZEHNTNER
LICDA. EUNICE ENRÍQUEZ
LICDA. ANTONIETA RODAS

Vo.Bo. ASESOR INSTITUCIONAL

INDICE

I. Introducción	1
II. Cuadro Resumen de las Actividades de EDC	2
III. Actividades Realizadas Durante la Práctica de EDC	4
A. Actividades de Servicio	4
B. Actividades de Docencia	6
C. Actividades No Planificadas	8
D. Actividades de Investigación	11
IV. Anexos	15
V. Bibliografía	33
Informe Final de Investigación “Evaluación de la Virulencia de Diferentes Cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisoplae</i> para el Control Biológico de <i>Blattella germanica</i> L.”	

INTRODUCCIÓN

El Subprograma de Experiencias Docentes con la Comunidad para Biología es una oportunidad de aplicar el conocimiento teórico acumulado, a lo largo de aproximadamente la mitad del estudio de la carrera, en un área de interés del estudiante en un ambiente profesional. De esta manera el estudiante puede acumular conocimiento y tener experiencias prácticas en resolver problemas en los ámbitos tecnológicos (capacitaciones), humanísticos (docencia) y científica (investigación).

La realización de un informe final permite tanto al supervisor de práctica como al estudiante hacer una recapitulación sobre las actividades realizadas. De esta manera se puede observar si la ejecución de servicio, docencia e investigación fue acorde a los objetivos y calendarización propuesta. Además proporciona a otros estudiantes interesados en hacer sus prácticas en la misma Unidad de Práctica información sobre esta y la actividades a realizar en ella.

CUADRO RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DE EDC

Programa Universitario	Fecha Propuesta	Horas EDC asignadas	Horas EDC acumuladas	% de Horas de EDC de avance/acumuladas
A. Servicio: -Herbario BIGU	23.1.2006- Finales Febrero, Principios Marzo 2006	60	60	100%
Servicio: (275 horas asignadas)				
-Limpieza Bioterio y Mantenimiento de Ratones	Febrero-Enero 2007	22	32	11.64%
-Cultivo de Chinchas	Marzo-Enero 2007	44	44	16%
-Herborización, Montaje e Identificación de Plantas	Sujeta a colecta de plantas en cada proyecto.	85	11.5	4.18%
-Identificación de Abejas y Otros Polinizadores, Ingreso de Datos.	Sujeta a colecta de abejas en cada proyecto.	85	28	10.18%
- Acetólisis y Preparación de Láminas Fijas.	Mayo, junio y julio 2006	80	22.5	8.18%
-Visitas al Meliponario, Conteo de Actividad de Piqueras y Alimentación de Colmenas. (No planificada)	Marzo-Enero 2007	-----	50	18.18%
-Montaje de Abejas. (No planificada)	-----	-----	33.5	12.18%
-Reunión del LENAP	-----	-----	3	1.1%
-Proyecto de Virus de Abejas.	-----	-----	10.5	3.82%
-Biblioteca de Abejas Nativas del LENAP.	-----	-----	13.5	4.91%
- Gira de Campo: Proyecto Polinizadores Lachúa.	-----	-----	67	24.36%
- Gira de Campo: Colecta de Abejas para Docencia.	-----	-----	12.25	4.45%
- Reunión de los Integrantes de Abejas	-----	-----	2	0.73%

Nativas sin Aguijón, LENAP.				
- Instrucciones sobre el Uso de la Base de Datos de Abejas.	-----	-----	2	0.73%
- Información sobre Procedimientos en Caso de Mordedura de Serpientes.	-----	-----	3.5	1.27%
-Varios.	-----	-----	25	9.09%
TOTAL			360	130.91%
B. Docencia: (155 horas asignadas)				
-Taller de Meliponicultura	22-23 de febrero del 2006	10	10	6.45%
- Semana Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación 2006.	27-30 de marzo del 2006	-----	8	5.16%
-Seminario-Taller “Cultura Turística”	20 de junio del 2006	-----	8	5.16%
-Curso de Sistemática y Biogeografía de Apoidea.	6 y 7 de julio del 2006	16	16	10.32%
-Curso “Entomología Tropical”	12-15 de julio del 2006	32	32	20.65%
- X Congreso de la Sociedad Mesoamericana para la Biología y la Conservación	29 de octubre al 2 de noviembre del 2006	-----	50	32.26%
TOTAL			124	80%
C. Investigación: (350 horas asignadas)				
-Perfil de Investigación	14 de marzo del 2006	20	20	5.71%
-Protocolo de Investigación	18 de abril del 2006	50	50	14.29%
-Cultivo de <i>Blattella germanica</i> .	Mayo-Agosto 2006	32	45	12.86%
- Primer Bioensayo	17 de agosto del 2006	-----	50	14.29%
- Primer Bioensayo con Diferente Metodología	28 de septiembre del 2006	-----	50	14.29%
- Segundo Bioensayo	12 de octubre del 2006	-----	50	14.29%
- Tercer Bioensayo	19 de diciembre del 2006	-----	50	14.29%
- Elaboración del Informe Final	Octubre 2006- Enero 2007	50	50	14.29%
TOTAL			365	104.29%
D. Socialización		200	200	100%
GRAN TOTAL		1040	1040	100%

ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRÁCTICA DE EDC

A. Actividades de Servicio

No. 1 Servicio en Herbario BIGU

Objetivo: Contribuir con la realización de las actividades de herbario durante 60 horas para ayudar al funcionamiento del mismo.

Procedimiento: Se realizan actividades de etiquetado, montaje, intercalado de ejemplares del Herbario BIGU, para mantener en orden y buen estado la colección.

Resultados: Realización de todas las actividades del Herbario BIGU que se requirieron. Horas de servicio asignadas, 60 horas, completadas.

Objetivos alcanzados: Se contribuyó durante 60 horas con las actividades asignadas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 2 Limpieza Bioterio y Mantenimiento de Ratonos.

Objetivo: Mantener en buenas condiciones los ratones de laboratorio utilizados para alimentar las chinches. Colaborar con la limpieza del Bioterio.

Procedimiento: Los ratones son colocados en cajas limpias, a las cuales se le agrega viruta limpia y concentrado. Se lavan los bebederos y se rellenan, colocándolos en las cajas limpias. Los ratones se regresan a estas cajas y se les coloca una tapadera de malla.

En la limpieza del Bioterio se sacuden las mesas de trabajo, se barre el piso, se ordenan los frascos, se coloca el material seco, se lava el material sucio y se deja secando.

Resultados: Se ha realizado los días 24 de febrero, 24 de marzo, 24 y 25 de abril, 24 de mayo, 21 de junio, 2 de septiembre, 4 de diciembre del 2006, la limpieza de Bioterio y mantenimiento de los ratones.

Objetivos alcanzados: Se mantiene una población y producción de ratones saludable. El Bioterio se mantiene limpio y en orden para que se puedan realizar las actividades programadas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 3 Cultivo de Chinches.

Objetivo: Contribuir con un cultivo de chinches para los diferentes proyectos de investigación que se realizan en el laboratorio.

Procedimiento: Para la alimentación de las chinches se utilizan cajas de plástico, donde se colocan las chinches de determinado cultivo. Posteriormente se toma un ratón, el cual se inmoviliza dentro de una malla metálica. Se coloca el ratón dentro de la caja de plástico con las chinches durante una hora dentro de una cámara ambiental. Después de este tiempo se retira el ratón, regresándolo a su caja, las chinches se colocan en sus respectivos frascos.

Resultados: Se mantienen tres cultivos: Una caja en la que se encuentran chinches en estadios ninfales. Éstas son de la localidad de Sonsonate, Salvador y la primera fecha de alimentación que presenta la caja es 16 de noviembre del 2005.

Se empezaron a alimentar el 24 de febrero del 2006. Se alimentaron el 10, 20 de marzo, 3, 5, 21, 25 de abril, 8, 18 de mayo, 5, 21 de junio, 10, 20 de julio, 18 de agosto, 12 de

septiembre, 4 de octubre, 6 de noviembre, 4, 18 de diciembre del 2006, 19, 26 de enero del 2007.

El segundo cultivo consta de una chinche adulta, de género masculino. Se colectó en la Aldea Pajales, la primera alimentación reportada es el 16 de agosto del 2005.

Se empezaron a alimentar el 24 de febrero del 2006. Se alimentó el 10, 20 de marzo 3, 5, 21 de abril, 8, 18 de mayo, 5, 21 de junio, 10, 20 de julio del 2006.

El tercer cultivo consta de una chinche adulta, hembra. Colectada por el Proyecto de Malaria, primera alimentación fue el día de entrega, 21 de abril del 2006. Se alimentó subsiguientemente 25 de abril, 8, 18 de mayo, 5, 21 de junio, 10, 20 de julio, 18 de agosto, 12 de septiembre, 4 de octubre, 6 de noviembre del 2006.

Objetivos alcanzados: Se han mantenido saludables los cultivos asignados.

Limitaciones o dificultades presentadas: Del primer cultivo de chinches en estadios ninfales, de la localidad de Sonsonate, Salvador han muerto algunas chinches pero en general se encuentra saludable el cultivo. El segundo cultivo de una chinche adulta, de género masculino murió a finales de julio del 2006. El tercer cultivo de una chinche adulta, hembra murió a finales de noviembre del 2006. Colectada por el Proyecto de Malaria, Se colectó en la Aldea Pajales.

No. 4 Herborización, Montaje e Identificación de Plantas.

Objetivo: Contribuir con los proyectos que se ejecutan en la Unidad de Abejas Nativas, en donde además de muestras de miel, abejas y otros polinizadores se recolectarán plantas, para conocer las especies vegetales que visitan las abejas.

Procedimiento: Secar en el anexo del herbario BIGU las muestras vegetales. Identificarlas hasta especie, de ser posible, con la ayuda del Ingeniero Mario Véliz (BIGU), Lic. Julio Morales (USCG). Montar y etiquetar las muestras vegetales para ingresarlas al herbario BIGU.

Resultados: Separación de plantas colectadas en Lachua por el Proyecto de Polinizadores. Llevar las plantas secas para que el Ingeniero Véliz las identifique.

Objetivos alcanzados: El Ing. Véliz identificó las plantas, por lo que se pueden ingresar a la base de datos.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 5 Identificación de Abejas y Otros Polinizadores. Actualización de Base de Datos de Abejas de Guatemala.

Objetivo: Contribuir con los diferentes proyectos en la identificación de abejas y otros polinizadores colectados y mantener actualizada la base de datos de Abejas de Guatemala.

Procedimiento: Identificar con claves taxonómicas las abejas u otros polinizadores. Ingresar datos de colecta, nombre científico, datos de la especie vegetal en donde se colectó, a la base de datos.

Resultados: Identificación de abejas colectadas por Aldana, con ayuda de claves taxonómicas y Gabriela Armas. Al estar presente el Dr. Ricardo Ayala (UNAM) se realizó la identificación de las abejas de la colección pertenientes a la familia Halictidae. Se realizaron sus respectivas etiquetas con los datos de colecta y los nombres científicos.

Objetivos alcanzados: Se identificaron las abejas, se etiquetaron.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 6 Acetólisis y Preparación de Láminas Fijas.

Objetivos: Obtener por medio de la técnica de acetólisis muestras de polen de la miel. Obtener láminas fijas para la observación del polen y su identificación.

Procedimiento: Por medio de la técnica de acetólisis, se elimina el material que recubre la exina de los granos de polen y permite ver la ornamentación. Se fija el polen en las láminas, con glicerina y parafina.

Resultados: Se separaron las muestras de miel colectada para procesarlas en acetólisis. Se preparó el equipo y reactivos necesarios para la acetólisis. Se realizó la acetólisis para las muestras de miel y para las abejas colectadas por Mabel Vásquez.

Objetivos alcanzados: Se obtuvieron muestras de polen de miel y abejas por medio de acetólisis.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

B. Actividades de Docencia

No. 1 Taller de Meliponicultura.

Objetivo: Contribuir con los preparativos del taller. Asistir y aprender sobre técnicas para la crianza de abejas sin aguijón.

Procedimiento: Ayudar con lo que se necesite en los preparativos del taller. Asistir como participante al taller y ayudar con lo requerido en el momento.

Resultados: Se asistió al taller en horario de 8:00-13:00 los dos días que duró el taller (22-23 de febrero del 2006). Se ayudó con varias cosas como preparación de café, arreglo de sillas, etc. En el segundo día del taller se aprendió el traslado de colmenas de meliponinos de troncos a las cajas para su colocación en el meliponario.

Objetivos alcanzados: Se contribuyó con los preparativos del taller. Se asistió y aprendió sobre técnicas para la crianza de abejas sin aguijón.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 2 Semana Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación 2006.

Objetivo: Informarse de los temas expuestos en la Semana Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación 2006.

Procedimiento: Asistir a las conferencias y conocer de los temas expuestos en las exposiciones.

Resultados: Se asistió a la jornada del 29 de marzo del 2006. Se observaron las exposiciones y se asistió a una conferencia.

Objetivos alcanzados: Se conocieron de los temas expuestos en la Semana Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación 2006.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 3 Seminario-Taller “Cultura Turística”.

Objetivo: Informarse sobre los enfoques y tácticas de turismo y alternativas de ecoturismo realizados por el Inguat.

Procedimiento: Se asistió al taller en horario de 9:00-17:00 el 20 de junio del 2006.

Resultados: Aprender los enfoques y tácticas de turismo y alternativas de ecoturismo realizados por el Inguat.

Objetivos alcanzados: Se conocieron los enfoques y tácticas de turismo y alternativas de ecoturismo realizados por el Inguat.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 4 Curso de Sistemática y Biogeografía de Apoidea.

Objetivo: Contribuir con los preparativos previos al taller. Asistir y aprender sobre la sistemática de abejas.

Procedimiento: Se asistió al taller en horario de 9:00-17:00 los dos días que duró el taller (6 y 7 de julio del 2006).

Resultados: Se asistió al curso, obteniendo conocimiento sobre la biología, así como sobre los caracteres de importancia en la identificación de familias de Apoidea.

Objetivos alcanzados: Se aprendió sobre la sistemática y biogeografía de abejas.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 5 Entomología Tropical (Biología, Ecología e Importancia Económica de los Insectos).

Objetivo: Contribuir con los preparativos previos al taller. Asistir y aprender sobre la Biología, Ecología e Importancia Económica de los Insectos.

Procedimiento: Se asistió al taller en horario de 9:00-17:00 los días que duró el taller (12 al 15 de julio del 2006).

Resultados: Se asistió al curso, obteniendo conocimiento sobre la biología, ecología e importancia económica de los insectos.

Objetivos alcanzados: Se aprendió sobre la biología, ecología e importancia económica de los insectos.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 6 X Congreso de la Sociedad Mesoamericana para la Biología y la Conservación.

Objetivo: Contribuir como voluntaria en los preparativos del taller y en las actividades asignadas. Asistir y aprender a los diversas platicas y foros expuestos.

Procedimiento: Se asistió al taller en horario de 8:00-18:00 los días que duró el taller (29 de octubre al 2 de noviembre del 2006).

Resultados: Se realizaron todas las actividades asignadas como voluntaria. Se asistió a los diversos temas expuestos, obteniendo conocimiento sobre la biodiversidad mesoamericana.

Objetivos alcanzados: Se aprendió sobre la biodiversidad mesoamericana.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

C. Actividades No Planificadas

No. 1 Visitas al Meliponario, Conteo de Actividad de Piqueras y Alimentación de Colmenas.

Objetivos: Monitorear y mantener en buenas condiciones las colmenas de abejas nativas sin aguijón que se encuentran en el Meliponario que se encuentra en el Jardín Botánico.

Procedimiento: En las mañanas cada dos días (tres veces por semana) se visita el meliponario. Se hace un conteo de las abejas que salen e ingresan por la piquera a su colmena por minuto. Se observa cada colmena para detectar cucarachas, moscas u otros patógenos. Algunas colmenas que se encuentran en el meliponario están con alimentación artificial (mezcla de azúcar con agua). Esta mezcla se les agrega en unas jeringas sin aguja, selladas en este extremo, invertidas y selladas con algodón, el cual absorbe el líquido, este extremo va insertado en un orificio en la caja para que dentro de la colmena puedan extraer el alimento.

Resultados: Se realizaron visitas los días 10,13,15, 20, 22, 27, 29 de marzo, 24, 26, 28 de abril, 17, 19, 21 de julio, 7, 9 y 11 de agosto, 21, 23 y 25 de agosto, octubre y diciembre del 2006. En la primera visita se aprendieron estas técnicas con la ayuda de Gabriela Armas. Las siguientes visitas se realizaron sin supervisión. Se realizaron todas las actividades mencionadas.

Objetivos alcanzados: Se monitoreó y mantuvo en buenas condiciones las colmenas de abejas nativas sin aguijón que se encuentran en el Meliponario que se encuentra en el Jardín Botánico.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 2 Montaje de Abejas.

Objetivo: Montar abejas y otros polinizadores colectados. Realizar etiquetas con datos de campo.

Procedimiento: Las abejas colectadas se encuentran en frascos con alcohol, se tienen que secar y luego montar con agujas entomológicas en un cuadro de duropor con su etiqueta de campo.

Resultados: Se montaron abejas que se encontraban en tubos Eppendorf con alcohol. Esta actividad se realizó el 24 de febrero y el 2 de mayo del 2006. Se dejaron en el cuadro de duropor solo con datos de campo. El 2 y 5 de junio del 2006 se montaron aproximadamente 150 abejas colectadas en la gira de mayo de polinizadores de Lachúa. El 5 de julio del 2006 se montaron aproximadamente 80 abejas colectadas en Pueblo Nuevo Viñas, Cerro Alux y dentro de la Universidad de San Carlos de Guatemala para su uso en docencia en el curso de Sistemática y Biogeografía de Apoidea.

Se realizaron aproximadamente 900 etiquetas con datos de campo.

Objetivos alcanzados: Se montaron y etiquetaron abejas colectadas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 3 Reunión del LENAP.

Objetivo: Informar a todo el personal sobre las actividades que se llevan a cabo y del progreso de las investigaciones en los diversos proyectos.

Procedimiento: Se reúne a todo el equipo de trabajo para discutir sobre temas según agenda preparada previamente. Se tratan temas como nuevos proyectos, resultados parciales o finales de los proyectos en curso, revisión de la página web, actualizaciones de los programas antivirus de las computadoras, limpieza general del Bioterio, mantenimiento del cultivo de chinches.

Resultados: La reunión se realizó el día 3 de abril del 2006. Se obtuvo conocimiento de los proyectos actuales del LENAP, sus resultados parciales, dificultades. Se discutió sobre la actualización de los programas antivirus de las computadoras, la necesidad de renovar la página web. Así como se recibieron instrucciones sobre el mejor cuidado de los cultivos de chinches.

Objetivos alcanzados: Se obtuvo conocimiento de todas las actividades e investigaciones del LENAP.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 4 Proyecto de Virus de Abejas.

Objetivo: Ayudar en el proyecto de virus de abejas a cargo de la Licda. Patricia Landaverde.

Procedimiento: Apoyo en la extracción de ARN de abejas colectadas para poder realizar el PCR. Con estos datos luego se desea establecer la presencia del virus en las colmenas de las cuales se colectaron las abejas.

Resultados: Se realizó la extracción de ARN de abejas colectadas en el 2005 que ya se les había realizado este proceso pero se tuvo que repetir.

Objetivos alcanzados: Se asistió en la extracción de ARN a la Licda. Landaverde.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 5 Biblioteca de Abejas Nativas del LENAP.

Objetivo: Mantener actualizada la Biblioteca de Abejas Nativas del LENAP.

Procedimiento: Ingresar nuevos libros y artículos a la Biblioteca y actualizar estas entradas en la base de datos.

Resultados: Se ingresaron varios artículos nuevos, algunos se imprimieron de CDs de Talleres o del Internet. Varios libros permanecían en la Biblioteca sin ser ingresados, por lo que se revisó toda la biblioteca para poder ingresarlos en el orden correcto.

Objetivos alcanzados: Se actualizó la Biblioteca y la base de datos.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 6 Gira de Campo: Proyecto Polinizadores Lachúa.

Objetivos: Contribuir con la colecta de insectos polinizadores de cultivos en la Ecoregión Lachúa.

Procedimiento: El proyecto realiza colectas mensuales en Pataté, San Luis y Tzetoc, en cultivos de caramomo, maíz, y en guamil y bosque. Las colectas de insectos se realizan sobre flores, tomándose una muestra de la planta para poder identificar la especie de éstas.

Resultados: Los días 29, 30 y 31 de mayo y el 1 de julio del 2006 se realizó la gira del mes de mayo, en el cual se realizaron las colectas en Pataté el día 30 de mayo y en las otras localidades el día 31 de mayo del 2006. La gira del mes de junio se realizó los días 26, 27,

28 y 29 de junio. En esta ocasión solamente se pudo colectar en Pataté, ya que al estar lloviendo, las abejas no salen de sus colmenas.

Objetivos alcanzados: Se obtuvieron abejas y otros insectos para este proyecto.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 7 Gira de Campo: Colecta de Abejas para Docencia.

Objetivos: Contribuir con la colecta de abejas para su uso en docencia en el curso de polinizadores de Sistemática y Biogeografía de Apoidea.

Procedimiento: Colectas en Pueblo Nuevo Viñas, Cerro Alux y dentro de la Universidad de San Carlos de Guatemala para su uso en docencia en el curso de Sistemática y Biogeografía de Apoidea.

Resultados: El día 15 de junio del 2006 se hizo el viaje a Pueblo Nuevo Viñas para recoger unas muestras de miel y se hicieron colectas de abejas en las cercanías y en una parada en el camino. El día 16 de junio del 2006 se colectó en el Cerro Alux. El día 4 de julio se realizó una colecta de dentro de Universidad de San Carlos de Guatemala. En total se obtuvieron aproximadamente 60 abejas.

Objetivos alcanzados: Se obtuvieron abejas para su uso en docencia.

Limitaciones o dificultades esperadas: Ninguna.

No. 8 Reunión de los Integrantes de Abejas Nativas sin Aguijón, LENAP.

Objetivo: Informar al personal sobre las actividades que se llevan a cabo y del progreso de las investigaciones en los diversos proyectos.

Procedimiento: Se reúne a todo el equipo de trabajo para discutir sobre temas según agenda preparada previamente. Se tratan temas como nuevos proyectos, resultados parciales o finales de los proyectos en curso.

Resultados: La reunión se hizo el día 9 de junio del 2006. Se obtuvo conocimiento de los proyectos actuales de los integrantes de abejas nativas sin aguijón, LENAP, sus resultados parciales, dificultades.

Objetivos alcanzados: Se obtuvo conocimiento de todas las actividades e investigaciones de los integrantes de abejas nativas sin aguijón, LENAP.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 9 Instrucciones sobre el Uso de la Base de Datos de Abejas.

Objetivo: Informar al personal que hace uso de la base de datos de abejas sobre el funcionamiento y correcto uso de ésta.

Procedimiento: El programador explica los procedimientos para el ingreso de especímenes a la base de datos.

Resultados: Se recibieron las instrucciones de como ingresar datos sobre un espécimen a la base de datos, se realizó un ejemplo y se hicieron comentarios sobre como mejorar el programa.

Objetivos alcanzados: Se obtuvo conocimiento del uso correcto de la base de datos de abejas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 10 Información sobre Procedimientos en Caso de Mordedura de Serpientes.

Objetivo: Informar al personal que hacer en caso de mordedura de serpientes.

Procedimiento: El expositor da una introducción al tema de serpientes y luego da instrucciones sobre como reaccionar en caso de una mordedura de serpiente y que antídotos hay disponibles en Guatemala.

Resultados: Se recibieron las instrucciones de como reaccionar en caso de una mordedura de serpiente y que antídotos hay disponibles en Guatemala.

Objetivos alcanzados: Se obtuvo conocimiento de los procedimientos en caso de mordedura de serpientes.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 11 Varios.

Objetivo: Contribuir a realizar diversas actividades.

Procedimiento: Colaborar en actividades que surgen sin que se hayan planificado.

Resultados: Se realizaron compras en Hiper Paíz (masking tape, bolsas de basura) y Arceyuz (lámpara UV) (22.5.06). Limpieza de estantes en la oficina del LENAP (6.6.06) Revisión bibliográfica y en internet sobre abejas en época precolombina y colonial (19.6.06). Se acompañó a la Dr. Monroy, Licda. Rodas y Gabriela Armas cuando donaron sangre en el Hospital Hermano Pedro, para manejar de regreso a la Universidad en caso la Dr. Monroy luego de donar no se sintiera bien (23.6.06).

Objetivos alcanzados: Se contribuyó en lo que se requirió en cada caso.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

D. Actividades de Investigación

Título: Evaluación de la Virulencia de Diferentes Cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae* en *Blattella germanica* L. para su uso como Control Biológico

No.1 Perfil de Investigación.

Objetivos: Llevar a cabo el perfil de investigación.

Procedimiento: Elaborar el perfil de investigación con ayuda del asesor de investigación.

Resultados: Se elaboró el perfil de investigación. El tema escogido al principio de la práctica de EDC se cambió, así como el asesor de investigación.

Objetivos alcanzados: Se llevó a cabo el perfil de investigación.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 2 Protocolo de Investigación.

Objetivos: Llevar a cabo el protocolo de investigación.

Procedimiento: Elaborar el protocolo de investigación con ayuda del asesor de investigación.

Resultados: Se elaboró el protocolo de investigación.

Objetivos alcanzados: Se llevó a cabo el protocolo de investigación.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 3 Cultivo de *Blattella germanica*.

Objetivo: Mantener un cultivo de cucarachas para la investigación.

Procedimiento: En un frasco de vidrio grande se mantienen las cucarachas con agua fresca, alimento (Incaparina, papa, pan o concentrado de perros). El cuello del frasco tiene vaselina para evitar que puedan escapar, además está cubierto con una tapadera con pequeños orificios para ventilación. Se les pone cartones para simular paredes y además proveer de una superficie adecuada para que depositen las ootecas.

Resultados: Se ha mantenido el cultivo de cucarachas. Se perdieron aproximadamente 10 cucarachas cuando se trató de bajarles el metabolismo para su manipulación, al mantenerlas en refrigeración. La temperatura resultó ser fatal.

Objetivos alcanzados: Mantener los cultivos de cucarachas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 4 Primer Bioensayo

Objetivo: Obtener datos de mortalidad acumulada, tiempo medio letal para las cepas de hongos entomopatógenos.

Procedimiento: Sumergimos una rueda de papel filtro en la solución, en condiciones de esterilidad. La rueda saturada de la solución de conidios la colocamos dentro de una caja de Petri alta, estéril, en la cual pusimos los diez individuos de *B.germanica*. En total por bloque realizamos dos cajas de Petri de este tipo para los tratamientos y una caja Petri con papel filtro saturado de la solución sin conidios para el grupo control.

Las cajas Petri incluyen un papel filtro, estéril, doblado en forma de acordeón y les suministramos agua en algodón humedecido, todo previamente esterilizado. Estas cajas las colocamos dentro de una bandeja de acero inoxidable. A su vez esta bandeja la colocamos dentro de una cámara húmeda que consiste en una caja camisera (desinfectada con alcohol e irradiada con rayos ultravioleta) con 500ml de agua destilada estéril. Estas cámaras húmedas las colocamos dentro de una incubadora a 27°C. Identificamos cada tratamiento con: fecha, especie de hongo, cepa de hongo, concentración y estadio de la cucaracha. (Romaña & Farges, 1992, citado por Enríquez, 2004)

Resultados: La mortalidad acumulada, al final del bioensayo, para los dos tratamientos de MET.MB y MET.GC y del control fue del 100%. No observamos crecimiento micelial y esporulación sobre ninguno de los organismos muertos. La viabilidad para MET.MB fue de 99% de conidios germinados y para MET.GC de 98.5%. Para la cepa MET.MB obtuvimos el 100% de mortalidad al día 19, para la cepa MET.GC al día 16 y para el control al día 18.

Objetivos alcanzados: Se ensayó una metodología para la inoculación de cucarachas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Un factor limitante en la ejecución de este estudio fue la obtención de las cucarachas, *Blattella germanica*. Conseguimos individuos de *B.germanica* por colecta los cuales debían representar el pie de cría, pero encontramos varias dificultades para establecer una población de cucarachas. Para los bioensayos se necesitaba una población sincrónica para usar individuos en el mismo estadio. Logramos formar una población sincrónica con ayuda de la relación entre alimentación y muda descrita por Kunkel, (1966). Esta población murió en su totalidad en un período de dos días cuando los organismos se encontraban entre el tercer y quinto estadio. No hemos determinado la causa de la muerte, que puede ser bacteriana, fúngica o viral. La población se encuentra en refrigeración para ser procesado según las técnicas de aislamiento de bacterias y hongos entomopatógenos.

Ante este impedimento decidimos usar las ninfas de una sola ooteca, que se podrían llevar sincrónicamente hasta tercer estadio, para un bioensayo con dos cepas y un control, o sea un número de individuos mínimo de 30. Una ooteca de *B. germanica* contiene de 30-40 huevos (Kunkel, 1966) (Valles, 2005), pero sólo 28 a 32 eclosionan y este número disminuye al aumentar la edad de la hembra (número de veces que ha portado una ooteca) (Cruz, 1994).

No. 5 Primer Bioensayo con Diferente Metodología

Objetivo: Obtener datos de mortalidad acumulada, tiempo medio letal para las cepas de hongos entomopatógenos.

Procedimiento: Adaptación del método utilizado por Enríquez, (2004) para inoculación de *Triatoma dimidiata*. Colocamos la solución de conidios en un vaso de precipitados, al que le habíamos pulido una franja de vaselina de aproximadamente dos centímetros de ancho en la orilla superior en la parte interna, para evitar escape de las cucarachas (com. pers. Kunkel, 2006). Dejamos caer, en grupos de tres individuos, las cucarachas en la solución permaneciendo de 3 a 6 segundos en la solución. Esto lo repetimos hasta haber inoculado el grupo entero para cada tratamiento y lo realizamos de igual forma con la solución control de dH₂O con Tween 20.

Luego retiramos los individuos de la solución y los colocamos en cajas Petri de vidrio estéril. Estas cajas de Petri, le habíamos pulido la franja de vaselina para mantener las cucarachas dentro (com. pers. Kunkel, 2006). Las cajas Petri incluyen un papel filtro, estéril, doblado en forma de acordeón y les suministramos agua en algodón humedecido, todo previamente esterilizado. Estas cajas las colocamos dentro de una bandeja de acero inoxidable. A su vez esta bandeja la colocamos dentro de una cámara húmeda que consiste en una caja camisera (desinfectada con alcohol e irradiada con rayos ultravioleta) con 500ml de agua destilada estéril. Estas cámaras húmedas las colocamos dentro de una incubadora a 27°C. Identificamos cada tratamiento con: fecha, especie de hongo, cepa de hongo, concentración y estadio de la cucaracha. (Romaña & Farges, 1992, citado por Enríquez, 2004)

Resultados: Los resultados para el primer bioensayo usando la metodología B fueron de una mortalidad acumulada contra ninfas de *Blattella germanica* de tercer estadio de 73.3% (a los 28 días post-infección) para la cepa de *Metarhizium anisopliae* MET.MB y de 28.57% para la cepa MET.GC. El tiempo de respuesta-mortalidad para MET.MB LT50 fue de 8.231 días y para MET.GC un LT50 de 61.850 días. La mortalidad dentro del grupo control, al que aplicamos una solución de dH₂O conteniendo Tween 20, fue de cero individuos. Anotamos la mortalidad cada día, aislando los individuos muertos para la comprobación del hongo. El crecimiento micelial se presentó al cuarto día post-infección para MET.MB, seguido de esporulación al día ocho; para MET.GC el crecimiento micelial ocurrió al sexto día y la esporulación al día diez. La viabilidad expresada en conidios germinados fue de 98.5% para MET.MB y de 99% para MET.GC.

Objetivos alcanzados: Se ensayó una metodología para la inoculación de cucarachas. Se obtuvo datos de mortalidad acumulada y de tiempo de respuesta-mortalidad.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 6 Segundo Bioensayo

Objetivo: Obtener datos de mortalidad acumulada, tiempo medio letal para las cepas de hongos entomopatógenos.

Procedimiento: Igual que el utilizado en numeral 5.

Resultados: El segundo bioensayo, presentó una mortalidad acumulada contra ninfas de *Blattella germanica* de tercer estadio de 28.57% para la cepa de *Metarhizium anisopliae* MET.GC y de 14.29% para la cepa MET.MB. Para la cepa de *Beauveria bassiana* BB.GC fue de 7.14% y la cepa BB.MB no presentó mortalidad. La mortalidad dentro del grupo control, al que se le aplicó una solución de dH₂O conteniendo Tween 20, fue de cero individuos. No se observó crecimiento micelial o esporulación sobre los individuos muertos. La viabilidad expresada en conidios germinados fue de 97.75% para MET.MB, de 99.75% para MET.GC, de 99.25% para BB.GC y de 96.25% para BB.MB.

Objetivos alcanzados: Se ensayó una metodología para la inoculación de cucarachas.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 7 Tercer Bioensayo

Objetivo: Obtener datos de mortalidad acumulada, tiempo medio letal para las cepas de hongos entomopatógenos.

Procedimiento: Igual que el utilizado en numeral 5.

Resultados: El tercer bioensayo, presentó una mortalidad acumulada contra ninfas de *Blattella germanica* de tercer estadio de 71.43% para la cepa de *Metarhizium anisopliae* MET.GC y de 85.71% para la cepa MET.MB. Para la cepa de *Beauveria bassiana* BB.GC fue de 21.43% y la cepa BB.MB no presentó mortalidad. La mortalidad dentro del grupo control, al que se le aplicó una solución de dH₂O conteniendo Tween 20, fue de cero individuos. Anotamos la mortalidad cada día, aislando los individuos muertos para la comprobación del hongo. El crecimiento micelial se presentó al octavo día post-infección para MET.MB, seguido de esporulación al día catorce para MET.GC. Para la cepa BB.GC no se observó crecimiento micelial o esporulación. La viabilidad expresada en conidios germinados fue de 99.25% para MET.MB, de 98% para MET.GC, de 99.5% para BB.GC y de 97% para BB.MB.

Objetivos alcanzados: Se ensayó una metodología para la inoculación de cucarachas. Se obtuvo datos de mortalidad acumulada y de tiempo de respuesta-mortalidad.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

No. 8 Informe Final de Investigación.

Objetivos: Llevar a cabo el informe final de investigación.

Procedimiento: Elaborar el informe final de investigación con ayuda del asesor de investigación.

Resultados: Se elaboró el informe final de investigación.

Objetivos alcanzados: Se llevó a cabo el informe final de investigación.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

BIBLIOGRAFÍA

Alquijay B., Enríquez E. 2006. Guía para la Elaborar el Informe Bimensual de la Práctica de EDC Integrado. Sin pp.

ANEXOS

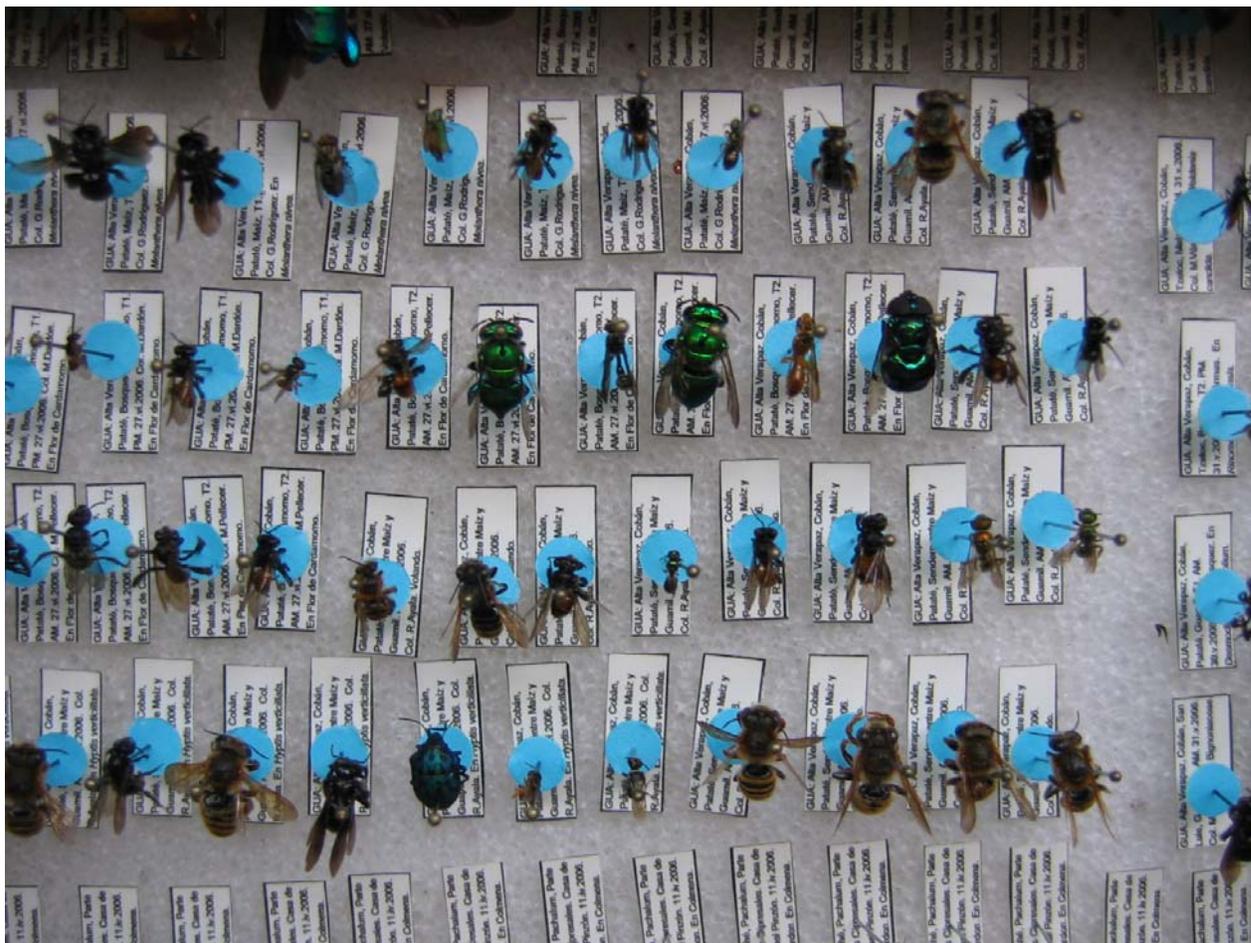
Limpieza Bioterio y Mantenimiento de Ratones



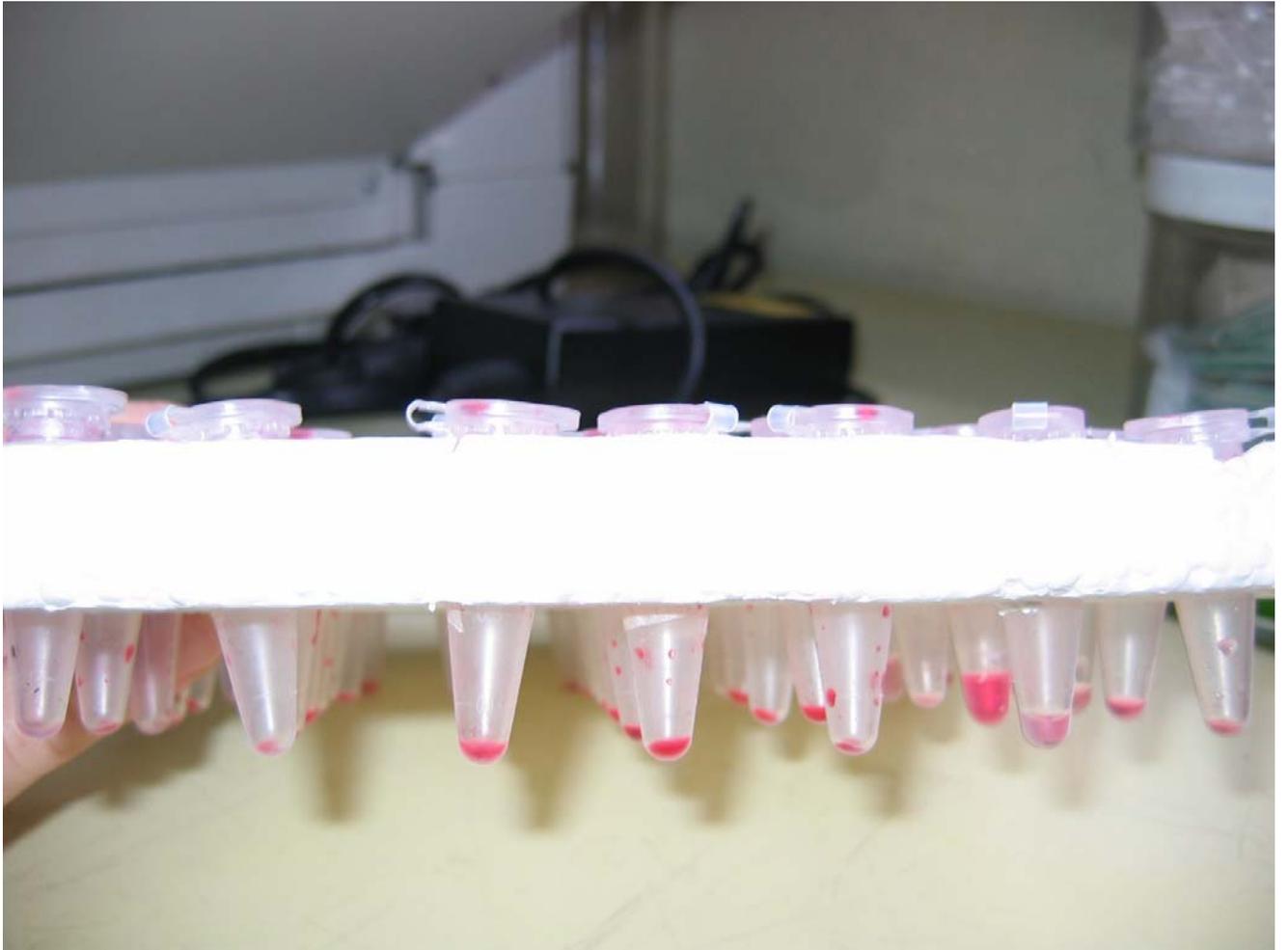
Cultivo de Chinchas



Montaje de Abejas



Proyecto de Virus de Abejas



Biblioteca de Abejas Nativas del LENAP



Gira de Campo: Proyecto Polinizadores Lachúa



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUBPROGRAMA EDC-BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN
Evaluación de la Virulencia de Diferentes Cepas de
Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae
para el Control Biológico de *Blattella germanica* L.

MARIELE JOHANNA PELLECCER ZEHNTNER
LICDA. EUNICE ENRÍQUEZ
LICDA. ANTONIETA RODAS

Vo.Bo. ASESOR DE INVESTIGACIÓN

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
A. Control Biológico	2
B. Hongos Entomopatógenos	3
C. Cucarachas	7
1. Generalidades	7
2. <i>Blattella germanica</i>	7
3. Importancia Médica y Económica	8
4. Resistencia a Insecticidas	8
III. Planteamiento del Problema	10
IV. Justificación	11
V. Objetivos	11
A. General	11
B. Específicos	11
VI. Hipótesis	11
VII. Materiales y Métodos	12
A. Diseño	12
1. Población	12
2. Muestra	12
3. Control	12
4. Cultivo de <i>Blattella germanica</i>	12
5. Insectos Utilizados en los Bioensayos	12
6. Descripción de las Cepas de Hongos Entomopatógenos	13
7. Siembra de las Cepas de Hongos Entomopatógenos	13
8. Elaboración de las Soluciones de Conidios	13
9. Tratamiento de <i>Blattella germanica</i> para los Bioensayos	13
9.1 Metodología A	13
9.2 Metodología B	14
10. Bioensayo	14
B. Técnicas a Usar en el Proceso de Investigación	15
1. Comprobación de la Infección del Hongo	15
2. Análisis Estadístico	15
VIII. Resultados	16
A. Metodología A: Primer Bioensayo	16
B. Metodología B: Primer Bioensayo	16
C. Metodología B: Segundo Bioensayo	17
D. Metodología B: Tercer Bioensayo	18
IX. Discusión	19
A. Cultivo de <i>Blattella germanica</i>	19
B. Metodología A: Primer Bioensayo	20
C. Metodología B: Primer Bioensayo	21
D. Metodología B: Segundo Bioensayo	21
E. Metodología B: Tercer Bioensayo	21
F. Factores que pudieron haber influido en las diferencias en la mortalidad entre el primer y segundo bioensayo	21

X. Conclusiones	23
XI. Recomendaciones	23
XII. Referencias Bibliográficas	24
XIII. Anexos	27

I. INTRODUCCIÓN

El manejo integrado de plagas son todas las prácticas realizadas para disminuir la incidencia de enfermedades y patógenos. El control biológico es exclusivamente el uso de organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo. Estos organismos pueden ser microorganismos (hongos, bacterias, virus), predadores y parasitoides.

La relación entre estos antagonistas y los organismos plaga en la naturaleza es de tipo continua, manteniendo un balance entre ambos. Al haber cambios en la estructura de estas interacciones una población se puede ver beneficiada y crecer sin control, convirtiéndose para la población humana en una plaga, ya que son organismos vectores de enfermedades, y causantes de daño económico.

Los hongos entomopatógenos presentan muchos beneficios para su uso en control biológico, ya que son fáciles de producir en laboratorio, se pueden almacenar y se caracterizan por su permanencia en el medio ambiente.

Pero como con cualquier antagonista usado en el control biológico, se deben considerar que tan específico es para el patógeno que se desea controlar o erradicar y cuántas otras especies podrían ser afectadas.

Las cucarachas han sido uno de los organismos que ha tenido mayor adaptación y es una plaga que se encuentra en casi todas partes donde el ser humano se halla.

Su denominación de plaga se lo debe a las capacidades de invadir todo nicho, reproducirse con gran facilidad y en gran número, resistencia y ser muy flexibles en adaptarse a todo tipo de cambios. Son considerados una plaga ya que se ha encontrado que son portadores de bacterias y otros microorganismos dañinos al ser humano. Su ubicuidad los hace contaminantes de lugares, objetos y alimentos.

No todas las especies del orden Blattodea deben ser consideradas dañinas, ya que muchas especies son silvestres y son importantes en el ciclo de reciclaje (descomposición) de la materia orgánica.

En el presente trabajo se pretendió establecer la virulencia de cuatro cepas de hongos entomopatógenos en el control de *Blattella germanica* L. (Dictyoptera, Blattellidae).

Las cepas a utilizar están siendo comercializadas en Guatemala para control de plagas de cultivos y las cucarachas, tanto *Periplaneta americana* como *Blattella germanica*. Estos productos se están empleando sin ningún estudio experimental controlado previo. En *Triatoma dimidiata* (Hemiptera, Reduviidae) se han realizado pruebas a nivel de laboratorio para un posible uso en el control biológico de la chinche vector del mal de Chagas.

El experimento se realizó con grupos de ninfas de *Blattella germanica* en tercer estadio. Los grupos se expusieron a una solución de conidios de cada cepa estudiada y se estableció la respuesta-mortalidad (LT50 y LT90) y porcentaje de mortalidad acumulado, contra un grupo control.

De esta manera se deseaba establecer la virulencia de estos entomopatógenos contra una especie de insecto común y muy resistente.

II. ANTECEDENTES

A. Control Biológico

Control biológico es el uso específico de un organismo para el control de una peste o plaga.

Los objetivos del manejo y control de plagas de insectos son crear y mantener condiciones que impidan que los insectos causen problemas en la economía o salud. Estos objetivos se pueden lograr ya sea evitando que se establezcan o diseminen las plagas de insectos, mediante el control de las infestaciones a un nivel en que no provoquen daño o que éste sea no significativo. (Rodríguez de la Torre, 1982)

Entre los beneficios del control biológico se encuentran la reducción de los problemas ambientales y de seguridad pública que presentan los insecticidas químicos. Además puede constituir una opción más económica. Al contrario de los insecticidas, la mayoría de los antagonistas usados como control biológico son específicos al hospedero, por lo que otros insectos beneficiosos, animales y humanos no se ven afectados por su uso. El control biológico así mismo presenta menos riesgos al medio ambiente y la calidad del agua. (Orr, *et al.* 1997)

Entre las desventajas del control biológico está el tiempo y la intensidad de la investigación, planificación y el manejo. El control biológico exitoso conlleva un mejor entendimiento de la biología tanto del insecto plaga como de su enemigo. Muchos de los entomopatógenos son sensibles a pesticidas, por lo que es necesario un programa de manejo integrado de plagas; en algunos casos el precio es mayor al de un pesticida. Los resultados o los efectos son más lentos que los de un insecticida químico. La misma ventaja de la especificidad por el hospedero puede ser considerada como desventaja por no tener la capacidad de un pesticida de amplio espectro. (Orr, *et al.* 1997)

Existen miles de especies de plagas de insectos difundidas en la mayoría de las regiones terrestres donde pueden vivir animales poiquilotermos, cada una de las especies de la plaga se limita a los lugares accesibles que les proporcionan comida y elementos biológicos y físicos esenciales. (Rodríguez de la Torre, 1982)

Enemigos naturales de insectos, denominados agentes de control biológico, incluyen predadores, parasitoides y patógenos. Predadores son generalmente de vida libre y consumen una gran cantidad de presas durante su tiempo vital, los parasitoides son especies que su etapa inmadura se desarrolla sobre o dentro de un insecto hospedero, matando así al mismo, patógenos como las bacterias, hongos y virus, producen enfermedades, que debilitan o matan al hospedero y son relativamente específicos a cierto grupo de insectos. (Hoffmann y Frodsham, 1993)

Un enemigo o antagonista natural debe tener una tasa de reproducción alta, buenas habilidades para la localización del hospedero, ser específico para éste y estar sincronizado con él y ser adaptable a diferentes condiciones ambientales. (Hoffmann y Frodsham, 1993)

Existen tres tipos amplios de control biológico que muchas veces se traslapan: conservación, control biológico clásico (introducción de enemigos naturales a una nueva localidad) y aumento.

La conservación de enemigos naturales es probablemente el control biológico más importante y disponible en la práctica de los agricultores. Los antagonistas se encuentran en

todos los sistemas de producción, desde el jardín a las tierras cultivadas. Están bien adaptados al ambiente local y al hospedero, la conservación es bastante simple y de bajo presupuesto. (Hoffmann y Frodsham, 1993) Esto involucra identificar factores que limitan la efectividad del enemigo natural y cambiarlos de manera de beneficiar a éstos. La conservación de antagonistas implica la reducción de agentes que interfieren en su población (p.ej. insecticidas) o proveer de los recursos que ayudarían a su propagación. (Orr, *et al.* 1997)

El control biológico clásico es la práctica de importar y liberar enemigos naturales para controlar plagas introducidas. Los pasos necesarios para el buen uso de organismos para el control de plagas son: Primero es la identificación del origen de la plaga y coleccionar los antagonistas apropiados asociados al insecto o especies relacionadas. El enemigo natural es pasado por un proceso de cuarentena para evitar la introducción de otros organismos no deseados (hiperparasitoides), luego se crían, idealmente en grandes cantidades, y son liberados. Estudios de seguimiento se conducen para determinar si se logró establecer con éxito y evaluar el beneficio a largo plazo de su presencia. (Hoffmann y Frodsham, 1993)

El control biológico clásico es de larga duración y de bajo costo, ya que cuando un enemigo natural se establece, casi no requiere de mantenimiento y continua matando los insectos plaga. Por otra parte algunas veces no es efectivo para plagas nativas, pero sí para las introducidas, las razones de este comportamiento muchas veces se desconocen, pero pueden incluir la liberación de muy pocos individuos, pobre adaptación a las condiciones del ambiente y falta de sincronización entre el ciclo vital del antagonista con el del hospedero. (Hoffmann y Frodsham, 1993)

El aumento es el tercer tipo de control biológico que conlleva el incremento de la población de un enemigo natural, éste se logra por la producción en masa en un laboratorio y la liberación en un período específico (cuando está especialmente vulnerable el insecto plaga). Otro método es la crianza y selección de antagonistas más específicos y virulentos. Adicionalmente se puede modificar el sistema de siembras para favorecer a los enemigos naturales, esta práctica se denomina manipulación del hábitat. De esta manera se introducen plantas que pueden beneficiar a los predadores o parasitoides como fuentes de néctar y como refugios.

B. Hongos Entomopatógenos

Los requerimientos de alta humedad relativa y alta temperatura para desarrollarse adecuadamente durante muchos años ha limitado el uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas. (Street y Henry, 1990)

Los primeros trabajos sobre hongos entomopatógenos se reportaron en 1836, a partir de las observaciones de A. Bassi sobre la muscardina del gusano de la seda *Bombix mori* L. que era el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. En tanto que en 1879 Metchnikoff utiliza el hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin para el control de poblaciones de *Anisoplia austriaca* (Herbst.) Karassiltschick en 1888 y Girard en 1889 continúan las investigaciones sobre *B. bassiana*. (Rosas, 2002)

Los hongos entomopatógenos se han comercializado para plagas de cultivos como ácaros, áfidos, broca del grano, gallina ciega y otros.

Se han realizado estudios con *B. bassiana* para su posible uso en el control biológico de la mosca *Musca domestica* (Leucona, *et al.* 2005), de garrapatas *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, e *Ixodes scapularis* (Kirkland, *et al.* 2004).

En Guatemala se han realizado pruebas de laboratorio para determinar la virulencia de varias cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* para proponer su uso contra *Triatoma dimidiata*, vector del Mal de Chagas. (Enríquez, 2004)

Existen varios factores biológicos y ambientales que regulan el proceso de infección de los hongos, éstos implican al patógeno, al insecto plaga y al ambiente.

1. Factores relacionados al patógeno: En estos la manifestación de la infección esta dada de acuerdo al tipo de inóculo, la dosis, la virulencia del patógeno, su persistencia y la capacidad de dispersión.
2. Factores relacionados al insecto: La infección del hongo puede también depender de la especie plaga, la edad del insecto, el período de intermudas, el hábito migratorio y sus niveles poblacionales.
3. Factores ambientales: Los que regulan drásticamente el proceso de infección son la temperatura, humedad, la radiación solar (UV principalmente), el viento y la lluvia. (Rosas, 2002)

El control con hongos para algunas plagas no es fácil, ya que se requiere contar con material susceptible al insecto que se desea regular, hacer selección por bioensayo del material más agresivo y comprobar su grado de virulencia en campo. Para esta fase se requieren a la par, los protocolos de seguridad, que incluyen pruebas de infectividad, alergenicidad, toxicidad y mutagenicidad, que garanticen que su liberación masiva al ambiente no afectará a insectos benéficos, ni a animales superiores incluyendo al hombre. (Hall, *et al.* 1982; Goettel, *et al.* 2001; Goettel y Hajek, 2001)

Las propiedades de los hongos que los hacen interesantes como alternativa para el control de plagas son:

- a) Su alto poder patogénico.
- b) La conservación de la virulencia en la preparación, antes de su aplicación y después de un período de almacenaje.
- c) La especificidad que presentan (definida como la adaptación recíproca entre el entomopatógeno y su hospedero, en relación a las condiciones del medio en el cual se encuentran).
- d) Sus posibilidades de multiplicación y conservación en condiciones económicamente rentables.
- e) Su poder residual. (Rosas, 2002)

Los síntomas tempranos de las enfermedades fúngicas son difíciles de observar. Por lo que se deben incubar en condiciones húmedas los insectos muertos para evidenciar la presencia del hongo por medio de la presencia de hifas. (Rosas, 2002)

En forma general los hongos presentan las siguientes fases de desarrollo sobre los hospederos: germinación, penetración, colonización y reproducción del patógeno.

En todos los casos la unidad infectiva es la espora (reproducción sexual) o el conidia (reproducción asexual). La invasión al hospedero se produce con la adherencia del conidio

a la cutícula del insecto. Posteriormente éste produce un tubo germinativo y un apresorio, como producto de la dilatación de la hifa. En la penetración están presentes dos procesos principales: el físico, debido a la presión de la hifa, la cual rompe las áreas membranosas esclerosadas y el químico, resultante de la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas), lo cual facilita la penetración mecánica.

En el área de la procutícula alrededor de la penetración, aparecen síntomas de histólisis (descomposición del tejido por acción enzimática).

A partir de la penetración se inicia el proceso de colonización, en el cual la hifa sufre un engrosamiento y se ramifica en la cavidad general del cuerpo. A partir de ese momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales (blastosporos), sin embargo no ocurre gran crecimiento hifal antes de la muerte del insecto.

Recientes estudios con *Metarhizium anisopliae* demostraron claramente que la proteasa es el factor clave en la penetración la cutícula del insecto por el hongo (St. Leger, *et al.* 1988). Después de la muerte del insecto, el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por hifas filamentosas.

La colonización de los diferentes órganos se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráqueas. La muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, cambios patológicos en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo, secundario al crecimiento de las hifas. Después de 48 a 60 horas de la muerte del insecto, las hifas comienzan a emerger por los espiráculos, ano y boca a través de las áreas más débiles (regiones intersegmentales).

Los hongos entomopatógenos poseen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedero. El estudio de esta toxina (dextruxinas, dimetildextruxina y protodextruxina) es de suma importancia ya que se pueden sintetizar productos químicos de baja toxicidad y de elevada acción insecticida, acariciada y nematocida.

Es posible también seleccionar aislamientos de hongos altamente toxicogénicos que se encuentran en forma natural o bien ser mejoradas genéticamente con relación a ese aspecto. (Roberts 1966)

Hay una diferencia sutil pero importante entre los términos virulencia, infecciosidad y patogenicidad. Virulencia es la capacidad relativa de un microorganismo para vencer las defensas corporales del huésped. Infecciosidad es la aptitud para producir infección-tendencia a propagarse rápidamente de un huésped a otro. Patogenicidad es la capacidad para ocasionar la enfermedad (reacción mórbida del huésped) y es una cualidad fija inherente al microorganismo en relación con cada huésped potencial que se considere. En la patología de insectos, la virulencia se debe considerar con dos capacidades: la aptitud para invadir al huésped y la posibilidad para multiplicarse y matar al mismo. (Rodríguez de la Torre, 1982)

Beauveria bassiana es un hongo imperfecto que pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, caracterizado por la formación de micelio septado con producción de conidias de aproximadamente 0.5 a 0.8 micras de diámetro o formas de reproducción asexual, en conidióforos que nacen a partir de hifas ramificadas.

El ciclo biológico del *Beauveria bassiana* comprende dos fases: una patogénica y otra saprofítica. La fase de patogénesis ocurre cuando el hongo entra en contacto con el tejido

vivo del huésped y la humedad en el microclima es del 85% o más. La temperatura óptima para su desarrollo es 23-25°C. (Rosas, 2002)

B. bassiana es parásito facultativo, el cual posee conidias que constituyen la unidad infectiva del hongo. El proceso infectivo que lleva al insecto atacado por el hongo a morir se cumple en tres fases: La primera fase de germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedero ocurre a través de la cutícula o por vía oral. Cuando la penetración se da por la cutícula intervienen lipasas, quitinasas y proteasas. El tubo germinativo de la conidia invade directamente, produciendo apresorios que penetran la epicutícula, dando lugar a cuerpos hifales, los cuales se desarrollan en el hemocele y circulan en la hemolinfa.

La patogenicidad del hongo sobre los insectos depende de una compleja relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y la fortaleza del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del hongo. Esta relación se debe a factores muy concretos incluyendo las diferencias cuticulares, la penetración cuticular y las reacciones inmunes. El desarrollo del hongo sobre el insecto puede ser influenciado por la eficacia de los hemocitos en encapsular y melanizar el patógeno. Casi siempre los hematocitos se agregan al lugar de la penetración cuticular, formando algunas veces nódulos alrededor de las esporas inyectadas. En el interior de los insectos la germinación usualmente procede de esporas que están fuera de la agregación de hematocitos pero para que se desarrollen siempre deben de estar afuera del agregado

La segunda fase es la invasión de los tejidos por parte del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto, dura de 2 a 3 días. Durante el proceso de invasión del hongo se producen una gran variedad de metabolitos tóxicos. *Beauveria bassiana* produce metabolitos secundarios, como son: Beauvericin, Beauveriloides, Bassianolide, Isarolide, Enniatinas y Oosporeina. Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, incoordinación de movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere queda momificado. Algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas que corresponden a los sitios de penetración de las conidias en el tegumento.

Finalmente sigue la tercera fase, la esporulación y el inicio de un nuevo ciclo. El micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta finalmente cubrirlo. Tras la muerte del insecto y bajo unas condiciones de humedad relativa alta las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con material fungoso característico. (Laverlam, 2006)

Metarhizium anisopliae denominada muscardina verde es tan común y ampliamente distribuido como *B. bassiana* con un amplio número de hospederos (200 especies de insectos). Metchnikoff (1879) aisló el hongo a partir del escarabajo *Anisoplia austriaca* y sugirió su uso como agente microbiano en contra de algunos insectos. El género *Metarhizium* se caracteriza por tener conidios secos, catenulados, acomodados densamente. La colonia de *M. anisopliae* aparece blanca cuando joven, pero cuando los conidios maduran, el color se torna verde oscuro. Los conidioforos son ramificados y el conidio inicial es producido por simple obstrucción en el extremo distal del conidioforo. Una cadena de conidios es formada en cada conidioforo, estando el conidio más joven adyacente al conidioforo. La temperatura óptima de crecimiento de este hongo es de 27°-28°C. (Rosas, 2002)

C. Cucarachas

1. Generalidades

Las cucarachas son insectos del orden Blattodea, se les denomina asimismo Blattaria. El nombre del orden se deriva del griego blatta significando “cucaracha”. Existen aproximadamente 3500 especies ordenadas en seis familias. Las cucarachas se distribuyen mundialmente, con excepción de las regiones polares y elevaciones sobre los 2000 metros.

Los registros más antiguos sobre fósiles de organismos muy parecidos a las cucarachas datan del Carbonífero, entre 354-295 millones de años atrás. Estos fósiles difieren de la cucaracha moderna al tener largos ovopositores, se consideran los ancestros de las cucarachas actuales así como de las termitas y mantodeas. El primer fósil de la cucaracha “moderna” con ovopositor corto aparece en el Cretácico temprano. (Frost, 2001)

El cuerpo de las cucarachas es comprimido dorso-ventralmente, lo cual les facilita esconderse en rendijas y agujeros durante el día, ya que son nocturnas. Las cucarachas son omnívoras, exceptuando el género de *Cryptocercus* que se alimenta de madera.

El ciclo de vida consiste en huevo, ninfa y adulto, en condiciones favorables las cucarachas tienen un gran potencial de reproducción. Una hembra deposita de 18-30 huevos en una cápsula protectora, la ooteca, que es depositada en un lugar protegido. Una sola hembra puede producir de 4-20 ootecas en su vida. La ooteca protege los huevos durante el tiempo en que maduran. Muchas de las medidas de erradicación consideran a los adultos pero una fuente importante de reinfestación son las ootecas. Las ninfas de las cucarachas son el estadio de mayor consumo de alimento del ciclo vital. Con abundante comida, humedad y calor las ninfas desarrollan los diferentes estadios o mudas con mayor rapidez. (Houseman, 2001)

2. *Blattella germanica*

La cucaracha “alemana” se encuentra en todo el mundo en asociación con humanos. No sobreviven en lugares lejos de actividad humana. El factor limitante para la sobrevivencia de *Blattella germanica* aparentemente son las bajas temperaturas. Los recursos limitantes además son comida, agua y refugio, su alimentación es omnívora.

Los huevos son transportados por la hembra en la ooteca hasta la eclosión. Se puede observar la ooteca sobresaliendo de la parte posterior (cámara genital) de la hembra. Las ninfas muchas veces salen de los huevos al estar la ooteca todavía sujeta a la hembra, éste es considerado como un aspecto que asegura la eclosión exitosa de las ninfas, ya que no depositan la ooteca como la mayoría de las cucarachas, donde muchas veces son destruidas.

La larva o ninfa es el estadio que comienza al eclosionar y termina con la aparición del adulto luego de la última muda. Las ninfas tienen un color café-negro con distintivas líneas paralelas a lo largo del pronoto. Las ninfas no poseen alas. El número de mudas requeridas para alcanzar el estadio adulto varía, pero el número más reportado es seis. A temperatura ambiente (25°C) las ninfas completan su desarrollo en aproximadamente 60 días. Todos los estadios buscan activamente agua y alimento.

El adulto mide de 10-15 mm, tienen un color café-negro con distintivas líneas paralelas a lo largo del pronoto. Los sexos se pueden distinguir por las siguientes características: Macho-cuerpo delgado, abdomen posterior estrecho, segmentos terminales

del abdomen visibles, no cubiertos por tegmina; hembra-cuerpo corpulento, abdomen posterior redondeado, abdomen entero cubierto por tegmina.

Blattella germanica como todas las cucarachas presenta tres estadios con metamorfosis incompleta: huevo, ninfa y adulto. El ciclo entero se completa en aproximadamente 100 días, factores como temperatura, nutrición y estrés pueden influenciar el tiempo requerido para la completación. Se reproducen continuamente con varias generaciones traslapándose. Bajo condiciones ideales el crecimiento poblacional es exponencial. (Valles, 2005)

3. Importancia Médica y Económica

Las cucarachas pueden transportar patógenos de lugares como los basureros o desagües a áreas limpias como mesas, platos, cubiertos y alimentos. Los patógenos son transportados tanto sobre el cuerpo como internamente y contaminan por contacto o por medio de las heces y al regurgitar, cosa que realizan varias veces al alimentarse. (Houseman, 2001)

Esto representa un riesgo sanitario ya que se han aislado numerosas bacterias sobre cucarachas *Periplaneta americana* y *Blattella germanica*, dos de las más comunes. (Pai, *et al.* 2005)

La transmisión de enfermedades nosocomiales (infecciones adquiridas en hospitales) es en gran parte por contacto humano, pero la diseminación microorganismos patogénicos por medio de las cucarachas no puede ser excluida. Estos insectos se encuentran muchas veces en grandes cantidades en las diferentes áreas de los hospitales y su alimentación omnívora y deposición indiscriminada de heces los hace agentes de transmisión. Más de 100 especies de bacterias se ha aislado del tracto digestivo de las cucarachas. Microorganismos patogénicos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Micrococci* se han aislado de *Blattella germanica* capturadas en hospitales. Además se han encontrado especies de hongos como *Candida*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria* y *Aspergillus*. De cucarachas recolectadas en hospitales se han obtenido bacterias con resistencia a múltiples drogas, así como especies de *Klebsiella* resistentes a antibióticos. (Pai, *et al.* 2004)

Otros estudios han demostrado un incremento en casos de asma en hogares con una infestación de ambas especies de cucarachas. La alergia a cucarachas se ha reconocido por más de 30 años y se han realizado numerosas investigaciones que han demostrado una asociación entre asma y el desarrollo de anticuerpos específico IgE. Se han identificado y purificado varios antígenos de *Periplaneta americana* y *Blattella germanica*. Siendo de mayor importancia los antígeno de *Blattella germanica* (Bla g1 y Bla g2) y Per a1 de *Periplaneta americana*, con extensas reacciones entre éstos. En pruebas de reactividad de punción y respuesta a IgE en muestras de sangre de asmáticos se ha demostrado respuesta a estos antígenos de cucarachas. También se ha demostrado un incremento de linfocitos en respuesta a antígenos Bla g2 asociados a niveles altos de Blag1 o Bla g2. (Sarinho, *et al.* 2004)

4. Resistencia a Insecticidas

Blattella germanica ha desarrollado resistencia fisiológica y metabólica a todos los insecticidas tradicionales (organofosfatos, carbamatos y piretroides) y resistencia cruzada

para muchos de los nuevos insecticidas. Se ha identificado el papel de una enzima desconocida detoxificadora que le confiere resistencia a los insecticidas en *Blattella germanica*. Esta sustancia localizada en el retículo endoplasmático, denominada esterasa, “secuestra” los insecticidas (especialmente pyretroides), previniendo que el tóxico llegue a los sitios donde esta haga daño. (Valles, 2001)

En investigaciones relacionadas de Valles y colaboradores (1998) se ha estudiado lo que se denomina “knockdown resistance (kdr)”, un mecanismo de resistencia a insecticidas causadas por mutaciones en proteínas del sistema nervioso de ciertos insectos. Identificaron una mutación asociada al kdr en 83% de *Blattella germanica* analizada. Luego descubrieron dos nuevas mutaciones que le infieren a las cucarachas aún más resistencia a los pyretroides e insecticidas asociados.

Cebos de geles ha sido uno de los métodos más usados para el control de *Blattella germanica* por su bajo costo y más seguros en su uso que insecticidas en aerosol. Cuando el ingrediente activo es incorporado a un cebo apetecible, las cucarachas consumen una dosis letal en una sola comida. De esta manera se considera menos probable la selección de resistencia. Se empezaron a observar casos de resistencia conductual, aversión a la comida, específicamente a la glucosa. Poblaciones enteras de *B.germanica* no se alimentaban de los cebos por lo que se empezó a investigar los mecanismos de este tipo de resistencia. (Wang, 2004)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pesticidas son sustancias químicas que son utilizados contra plagas como insectos, patógenos de plantas, hierbas malas, nemátodos y microorganismos. Los pesticidas son usualmente, aunque no siempre, dañinos a la salud del ser humano.

El control biológico es una alternativa más ecológica y menos contaminante que el uso de pesticidas.

Entomopatógenos que ocurren de forma natural son de gran importancia en la regulación de las poblaciones de insectos. Organismos entomopatógenos utilizados para control biológico incluyen bacterias, virus, hongos, protozoos y nemátodos. Cuando se realiza una comparación entre los entomopatógenos y los insecticidas químicos convencionales, es en base a la eficacia y el costo. Cuando se consideran beneficios medioambientales, incluyendo seguridad para la población humana y otros organismos no blancos, reducción de residuos pesticidas en alimentos, aumento de actividad en otros enemigos naturales y de la biodiversidad de los ecosistemas, las ventajas son numerosas. Muchos entomopatógenos son específicos a ciertas especies o grupos de plagas de insectos y algunos tienen el potencial de proveer un control a largo plazo. Presentan ciertas desventajas más que todo ligadas a la persistencia, especificidad (rango de hospedero muy amplio o demasiado restringido) y costo relativo a insecticidas convencionales. (Lacey, 2001)

En Guatemala se está usando hongos entomopatógenos para el control de plagas de cultivos y para cucarachas. Estos productos se comercializan pero no han sido sometidos a experimentos controlados para establecer virulencia y especificidad.

A nivel de laboratorio se ha evaluado la patogenicidad de cuatro cepas de *Metarhizium* y tres cepas de *Beauveria* sobre ninfas de primer estadio de *Triatoma dimidiata*, vector del Mal de Chagas. Seis de estas cepas fueron aisladas en Guatemala y una aislada en México. Posteriormente se evaluó la virulencia de dos de las cepas más patógenas sobre diferentes estadios de *Triatoma dimidiata*. Se consideraron las cepas aisladas en Guatemala como más apropiadas para ser usadas en el control de *T. dimidiata* por ser nativas y por presentar la mayor patogenicidad contra ninfas de primer estadio. Las ninfas de 5to estadio tienen algún grado de resistencia hacia la infección de los hongos entomopatógenos, y en especial a la cepa *Metarhizium*. (Enríquez, 2004)

Las cucarachas han sido estudiadas como vectores/portadores de varios patógenos como bacterias, hongos y parásitos que transmiten por contacto. Se han identificado sobre las especies *Periplaneta americana* y *Blattella germanica* microorganismos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, y *Micrococci*. Se han colectado especies de *Klebsiella* con resistencia antibacteriana de *Blattella germanica*. (Pai, 2004, 2005)

La resistencia a insecticidas, así como cambios en el comportamiento de las cucarachas para evitar cebos (Wang, 2004) invita a investigar la patogenicidad de cepas, que han resultado tener virulencia sobre especies de plagas de cultivos, por pruebas de laboratorio en *Triatoma dimidiata*, y que no se han probado en cucarachas como *Blattella germanica*, en un experimento controlado.

IV. JUSTIFICACIÓN

Blattella germanica es un vector mecánico de enfermedades bacterianas y parasitarias. El insecto es resistente a insecticidas por lo que hay que probar otras medidas de control.

Los insecticidas no son específicos, por lo que pueden ocasionar daño a otros insectos benéficos, animales y al humano. Esto resulta en disminución de diversidad en los lugares tratados con insecticidas y en un grave peligro de salud para la población humana. Los insecticidas contaminan el medio ambiente, no sólo en el momento de su aplicación, muchos son residuales con el objetivo de controlar la plaga a largo plazo, pero esto resulta en contaminación de alimentos, agua, suelos. Por estas limitaciones y riesgos de los plaguicidas químicos se debe buscar alternativas de control para disminuir la contaminación por éstos.

El control biológico es seguro, contamina menos, es específico, por lo que permite mayor biodiversidad. Debido a la interdependencia entre los agentes de control biológico y sus huéspedes o presas, se dice que el control biológico es autosostenible, permanente por lo que es importante el estudio en este campo.

En este estudio se espera establecer si algunas de las cepas de hongos entomopatógenos muestran virulencia ante *B. germanica* para su posible uso como control biológico contra este insecto.

V. OBJETIVOS

A. General

Evaluar la virulencia de diferentes cepas de hongos entomopatógenos en *Blattella germanica* para su uso como control biológico.

B. Específicos

Determinar la mortalidad acumulada para el tercer estadio de *Blattella germanica* en cada una de las cepas de hongos entomopatógenos utilizada.

Determinar el tiempo letal medio para el tercer estadio de *Blattella germanica* en cada una de las cepas de hongos entomopatógenos utilizada.

VI. HIPÓTESIS

Al menos una de las cuatro cepas de *Metarhizium* y de *Beauveria* presenta virulencia sobre el tercer estadio de *Blattella germanica*.

La mortalidad acumulada de *B. germanica* sometidas a las cepas de hongos entomopatógenos es mayor al 50%.

El tiempo letal medio de *B. germanica* sometida a las cepas de hongos entomopatógenos es menor de cinco días.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Diseño

1. Población

Cultivo de *Blattella germanica* del que seleccionamos los individuos que se encontraban en el tercer estadio.

2. Muestra

Seleccionamos grupos de diez individuos que se encontraban en el tercer estadio de *Blattella germanica* para la inoculación con los hongos entomopatógenos.

3. Control

Seleccionamos grupos de diez individuos que se encontraban en el tercer estadio de *Blattella germanica* sin tratamiento de hongos entomopatógenos, cada grupo lo adjudicamos a los grupos de la muestra.

4. Cultivo de *Blattella germanica*

La colecta se realizó con trampas (frascos con cebo de mantequilla, pan, papa, etc.) puestas en cocinas y baños.

En un frasco de vidrio grande se mantienen las cucarachas con agua fresca, alimento (Incaparina, papa, pan o concentrado de perros). El cuello del frasco tenía vaselina para evitar que escaparan, además estaba cubierto con una tapadera con pequeños orificios para ventilación. Les pusimos cartones para simular paredes y además proveer de una superficie adecuada para que depositen las ootecas.

5. Insectos Utilizados en los Bioensayos

Cucarachas, de la especie *Blattella germanica*, del 3er estadio, obtenidos de los huevos de los especímenes capturados en casas.

Hicimos tres grupos de diez individuos para someterlos al tratamiento con dos cepas de hongos entomopatógenos y un grupo control. Realizamos dos réplicas de tres planificadas para este bioensayo.

El número de individuos por grupo se calculó con

$$n_j = (2NC^2\sigma^2)/\Delta^2$$

Siendo σ^2 la varianza (tiempo de muerte) y Δ el límite de error (distancia mínima entre dos tratamientos para considerarlos diferentes).

Considerando $\sigma/2 = \Delta$ queda $n_j = 4NC^2$

NC siendo el nivel de confianza, $NC = Z_{1-\sigma/2} + Z_{1-\beta}$ (siendo $Z_{1-\beta}$ despreciable),

$$NC = Z_{1-\sigma/2} = 2.58$$

Así, $n_j = 4NC^2 = 4(2.58)^2 = 27 = 30$.

El diseño es de bloques al azar. (com. pers. Nave, 2006)

6. Descripción de las Cepas de Hongos Entomopatógenos

Las cepas de hongos que utilizamos en el estudio fueron aisladas en Guatemala de gallina ciega y mosca blanca, por la empresa “Agrícola del Sol”:

a. Cepas de *Metarhizium anisopliae*

Cepa AES.MET.GC

Cepa AES.MET.MB

b. Cepas de *Beauveria bassiana*

Cepa AES.Bb.GC

Cepa AES.Bb.MB

7. Siembra de las Cepas de Hongos Entomopatógenos

El medio para la siembra de los hongos entomopatógenos es Papa Dextrosa Agar - PDA- el cual se utiliza para cultivo de hongos en general, especialmente para que estos hongos formen conidios. A este medio le añadimos extracto de levadura al 0.5%.

El medio de cultivo que utilizamos es en base a un compuesto ya elaborado a nivel comercial. Para preparar las cajas de Petri esterilizamos el medio y posteriormente en la campana llenamos las cajas. (com.pers. Toriello, 2001, citado por Enríquez, 2004)

El inóculo de los hongos entomopatógenos lo semabramos en cajas de Petri que contenían el medio con ayuda de un asa de nicromo en total esterilidad, esto lo realizamos en una campana microbiológica. Los hongos entomopatógenos a utilizar se mantuvieron en una incubadora a 26°C durante 15 días.

8. Elaboración de las Soluciones de Conidios

Para estandarizar la concentración de conidios realizamos lo siguiente: Raspamos el cultivo de cada una de las cepas y colocamos las esporas dentro de un tubo con 10ml de agua destilada más tween al 0.01% (surfactante), agitamos la solución con ayuda de un agitador eléctrico (vortex), para lograr una suspensión homogénea. Luego realizamos el conteo de conidios en una cámara de Neubauer (para conteo de glóbulos rojos), para definir la concentración de conidios en esa solución (solución original), posteriormente hicimos las diluciones necesarias para llegar a la concentración de conidios deseada para el bioensayo (1×10^7 conidios/ml). (Sagar, 1999 & Estrada, 2000 com. pers., citado por Enríquez, 2004)

9. Tratamiento de *Blattella germanica* para los Bioensayos

9.1 Metodología A

Sumergimos una rueda de papel filtro en la solución, en condiciones de esterilidad. La rueda saturada de la solución de conidios la colocamos dentro de una caja de Petri alta, estéril, en la cual pusimos los diez individuos de *B.germanica*. En total por bloque realizamos dos cajas de Petri de este tipo para los tratamientos y una caja Petri con papel filtro saturado de la solución sin conidios para el grupo control.

Las cajas Petri incluyen un papel filtro, estéril, doblado en forma de acordeón y les suministramos agua en algodón humedecido, todo previamente esterilizado. Estas cajas las colocamos dentro de una bandeja de acero inoxidable. A su vez esta bandeja la colocamos

dentro de una cámara húmeda que consiste en una caja camisera (desinfectada con alcohol e irradiada con rayos ultravioleta) con 500ml de agua destilada estéril. Estas cámaras húmedas las colocamos dentro de una incubadora a 27°C. Identificamos cada tratamiento con: fecha, especie de hongo, cepa de hongo, concentración y estadio de la cucaracha. (Romaña & Farges, 1992, citado por Enríquez, 2004)

9.2 Metodología B

Adaptación del método utilizado por Enríquez, (2004) para inoculación de *Triatoma dimidiata*. Colocamos la solución de conidios en un vaso de precipitados, al que le habíamos pulido una franja de vaselina de aproximadamente dos centímetros de ancho en la orilla superior en la parte interna, para evitar escape de las cucarachas (com. pers. Kunkel, 2006). Dejamos caer, en grupos de tres individuos, las cucarachas en la solución permaneciendo de 3 a 6 segundos en la solución. Esto lo repetimos hasta haber inoculado el grupo entero para cada tratamiento y lo realizamos de igual forma con la solución control de dH₂O con Tween 20.

Luego retiramos los individuos de la solución y los colocamos en cajas Petri de vidrio estéril. Estas cajas de Petri, le habíamos pulido la franja de vaselina para mantener las cucarachas dentro (com. pers. Kunkel, 2006). Las cajas Petri incluyen un papel filtro, estéril, doblado en forma de acordeón y les suministramos agua en algodón humedecido, todo previamente esterilizado. Estas cajas las colocamos dentro de una bandeja de acero inoxidable. A su vez esta bandeja la colocamos dentro de una cámara húmeda que consiste en una caja camisera (desinfectada con alcohol e irradiada con rayos ultravioleta) con 500ml de agua destilada estéril. Estas cámaras húmedas las colocamos dentro de una incubadora a 27°C. Identificamos cada tratamiento con: fecha, especie de hongo, cepa de hongo, concentración y estadio de la cucaracha. (Romaña & Farges, 1992, citado por Enríquez, 2004)

10. Bioensayo

La concentración de la solución de conidios para los dos tratamientos fue de 1×10^7 , el control lo expusimos a una solución sin conidios.

No.	Especie	Cepa	No. Individuos <i>Blattella germanica</i>		
			Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AES.MET.GC	10	10	10
2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AES.MET.MB	10	10	10
3	<i>Beauveria bassiana</i>	AES.Bb.GC	10	10	10
4	<i>Beauveria bassiana</i>	AES.Bb.MB	10	10	10
5	CONTROL		10	10	10

B. Técnicas a Usar en el Proceso de Investigación

1. Comprobación de la Infección del Hongo

Los insectos muertos durante los bioensayos los colocamos en una cámara húmeda (bajo condiciones de esterilidad): Colocamos la cucaracha muerta en una caja de Petri que contiene una rueda de papel filtro y un algodón humedecido con agua (todo esterilizado previamente) y posteriormente sellamos con parafilm a manera de cámara húmeda. Etiquetamos la caja de Petri con la información correspondiente. Dejamos las cajas en una incubadora a 27°C de 7-10 días para inducir el crecimiento de hongos en caso de encontrarse presentes. (com.pers. Toriello, 2001, citado por Enríquez, 2004) Posteriormente verificamos si se produjo la esporulación del hongo utilizado en los bioensayos sobre la superficie del insecto, lo que indica que éste fue la causa de su muerte. (Romaña & Farges, 1992, citado por Enríquez, 2004)

Revisamos diariamente la mortalidad de *Blattella germanica* expuesta a las dos diferentes cepas, durante un período de 30 días. Utilizamos una boleta con la siguiente información: Proyecto, Fecha, Cepa de hongo, Estadio, Participantes; días (1-30), número de muertos acumulados, % mortalidad acumulada, confirmación de crecimiento del hongo, observaciones. (Anexo, Tabla No.1) (Enríquez, 2004)

2. Análisis Estadístico

Realizamos el análisis de varianza, ANDEVA, para comprobar que hay diferencia significativa en los diferentes porcentajes de mortalidad. En las cepas que presente esta diferencia se haría la prueba de Dunnett que son comparaciones pareadas contra un control, lo cual no fue necesario, ya que el control no tuvo mortalidad.

En los grupos que dieron diferencia calculamos el tiempo de respuesta-mortalidad LT50 y LT90 por medio de regresión no paramétrica, utilizando la transformación probática (método de Probit). (com. pers. Nave, 2006)

VIII. RESULTADOS

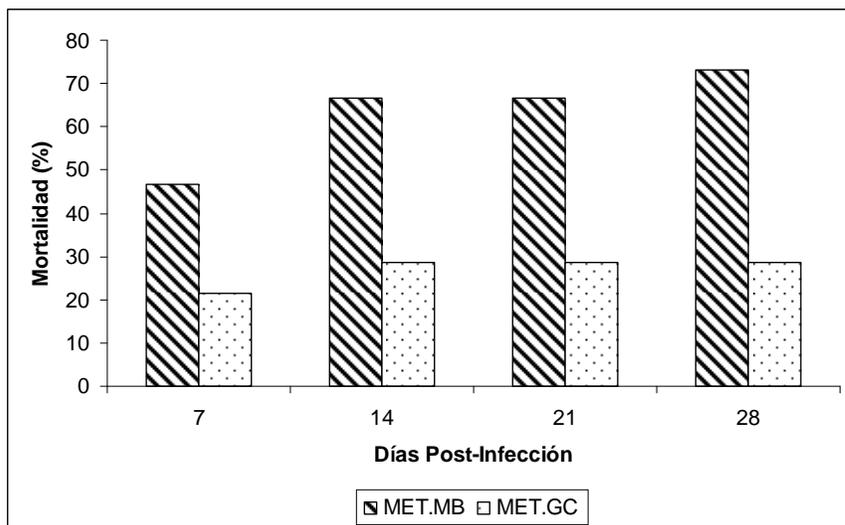
A. Metodología A: Primer Bioensayo

El primer bioensayo se realizó con la metodología A, en donde se mantuvo a las cucarachas por treinta días post-infección en cajas de Petri con papel filtro con la solución de conidios. La mortalidad acumulada, al final del bioensayo, para los dos tratamientos (MET.MB y MET.GC) y del control fue del 100%. No se observó crecimiento micelial ni esporulación sobre ninguno de los organismos muertos. La viabilidad para MET.MB fue de 99% de conidios germinados y para MET.GC de 98.5%. Para la cepa MET.MB se obtuvo el 100% de mortalidad al día 19, para la cepa MET.GC al día 16 y para el control al día 18.

B. Metodología B: Primer Bioensayo

Los resultados para el primer bioensayo usando la metodología B dio una mortalidad acumulada contra ninfas de *Blattella germanica* de tercer estadio de 73.3% (a los 28 días post-infección) para la cepa de *Metarhizium anisopliae* MET.MB y de 28.57% para la cepa MET.GC. La mortalidad dentro del grupo control, al que se aplicó una solución de dH₂O conteniendo Tween 20, fue de cero individuos. La mortalidad anotada cada día, aislando los individuos muertos para la comprobación del hongo. El crecimiento micelial se presentó al cuarto día post-infección para MET.MB, seguido de esporulación el día ocho; para MET.GC el crecimiento micelial ocurrió al sexto día y la esporulación al día diez. La viabilidad expresada en conidios germinados fue de 98.5% para MET.MB y de 99% para MET.GC.

En espacios de 7 días la mortalidad entre los dos grupos se reflejó de la siguiente manera:



Gráfica No.1: Primer Bioensayo: Mortalidad acumulada para ninfas de tercer estadio de *Blattella germanica* inoculadas con las cepas de *Metarhizium anisopliae* MET.MB y MET.GC.

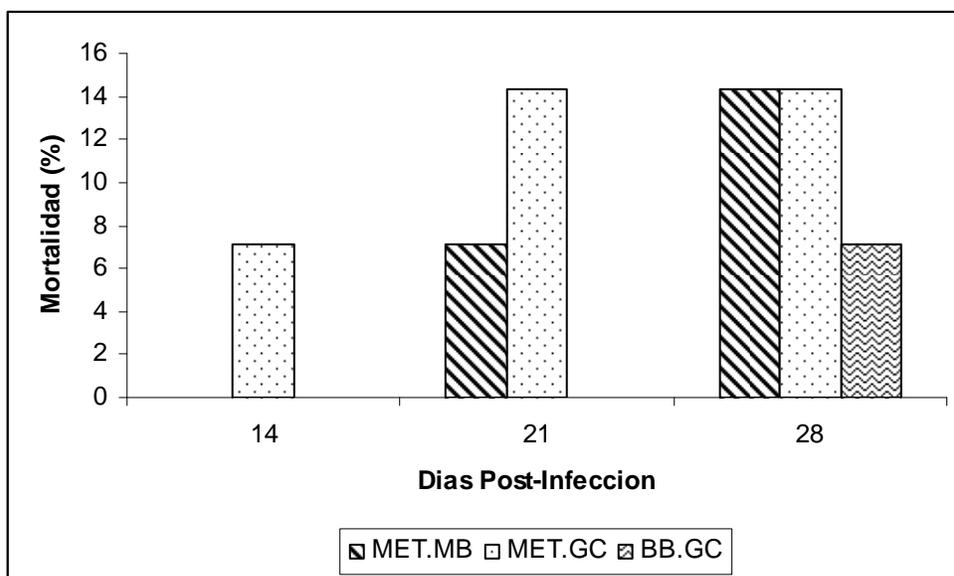
La cepa MET.MB de *M. anisopliae* causó una mortalidad significativamente mas alta que la cepa MET.GC (ANOVA, $p=2.427E-10$).

Tabla No.1: Primer Bioensayo: Cálculo del tiempo de respuesta-mortalidad LT50 y LT90 por medio de regresión no paramétrica, utilizando la transformación probática (método de Probit).

Cepa	LT50	LT90
MET.MB	8.231	62.804
MET.GC	61.850	1142.936

C. Metodología B: Segundo Bioensayo

El segundo bioensayo, presentó una mortalidad acumulada de 28.57% contra ninfas de *Blattella germanica* de tercer estadio para la cepa de *Metarhizium anisopliae* MET.GC y de 14.29% para la cepa MET.MB. Para la cepa de *Beauveria bassiana* BB.GC fue de 7.14% y la cepa BB.MB no presento mortalidad. La mortalidad en el grupo control, al que se le aplicó una solución de dH₂O conteniendo Tween 20, fue de cero individuos. No se observó crecimiento micelial o esporulación sobre los individuos muertos. La viabilidad expresada en conidios germinados fue de 97.75% para MET.MB, de 99.75% para MET.GC, de 99.25% para BB.GC y de 96.25% para BB.MB.

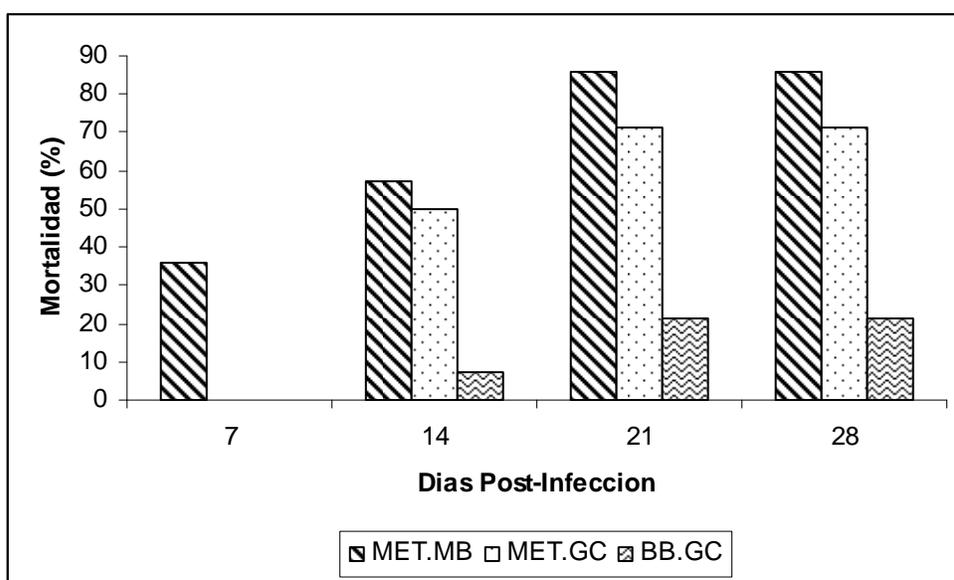


Gráfica No.2: Segundo Bioensayo: Mortalidad acumulada para ninfas de tercer estadio de *Blattella germanica* inoculadas con las cepas de *Metarhizium anisopliae* MET.MB, MET.GC y con la cepa de *Beauveria bassiana* BB.GC.

No se calcularon tiempo de respuesta-mortalidad LT50 y LT90 ya que en ninguna cepa se alcanzó el 50% de mortalidad.

D. Metodología B: Tercer Bioensayo

El tercer bioensayo, presentó una mortalidad acumulada contra ninfas de *Blattella germanica* de tercer estadio de 71.43% para la cepa de *Metarhizium anisopliae* MET.GC y de 85.71% para la cepa MET.MB. Para la cepa de *Beauveria bassiana* BB.GC fue de 21.43% y la cepa BB.MB no presentó mortalidad. La mortalidad en el grupo control, al que se le aplicó una solución de dH₂O conteniendo Tween 20, fue de cero individuos. Se anotó la mortalidad cada día, aislando los individuos muertos para la comprobación del hongo. El crecimiento micelial se presentó al octavo día post-infección para MET.MB, seguido de esporulación al día catorce para MET.GC. Para la cepa BB.GC no se observó crecimiento micelial o esporulación. La viabilidad expresada en conidios germinados fue de 99.25% para MET.MB, de 98% para MET.GC, de 99.5% para BB.GC y de 97% para BB.MB.



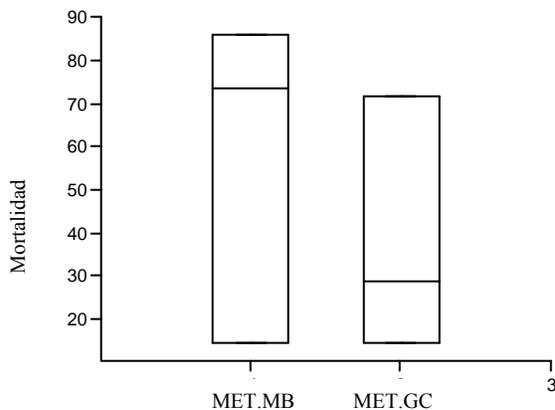
Gráfica No.3: Tercer Bioensayo: Mortalidad acumulada para ninfas de tercer estadio de *Blattella germanica* inoculadas con las cepas de *Metarhizium anisopliae* MET.MB, MET.GC y con la cepa de *Beauveria bassiana* BB.GC.

La cepa MET.MB de *M. anisopliae* no causó una mortalidad significativamente más alta que la cepa MET.GC (ANOVA, $p=0.051332685$).

Tabla No.2: Tercer Bioensayo: Cálculo del tiempo de respuesta-mortalidad LT50 y LT90 por medio de regresión no paramétrica, utilizando la transformación probática (método de Probit).

Cepa	LT50	LT90
MET.MB	10.221	32.599
MET.GC	15.766	32.783

La cepa BB.GC no alcanzó el 50% de mortalidad.



Gráfica No.4: Mortalidad acumulada para ninfas de tercer estadio de *Blattella germanica* inoculadas con las cepas de *Metarhizium anisopliae* MET.MB y MET.GC para los tres bioensayos.

IX. DISCUSIÓN

El uso de hongos entomopatógenos como control biológico contra plagas se basa en la relativa facilidad de su producción y manejo a nivel de laboratorio, así como su aparente inocuidad contra vertebrados y algunos insectos benéficos para el ser humano. (Leathers *et al.* 1993) (Rosas, 2002)

Se han realizado estudios con los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en la mosca doméstica (Leucona, 2005), garrapatas (Kirkland *et al.*, 2004), en la chinche *Triatoma dimidiata*, vector del Mal de Chagas. (Enríquez, 2004). En estos estudios algunas cepas de éstos hongos se han perfilado como virulentos para estos insectos plaga. Las cucarachas consideradas una plaga por ser vectores mecánicos de diversas enfermedades al contaminar superficies y alimentos (Houseman, 2001) y presentan riesgos sanitarios en hospitales (Pai, 2005). Por esto se pueden considerar un insecto objetivo o blanco para el uso de hongos entomopatógenos para su control, ya que presentan mecanismos etológicos como fisiológicos para desarrollar resistencia a insecticidas químicos. (Valles, *et al.* 1998) (Valles y Strong, 2001)

A. Cultivo de *Blattella germanica*

Un factor limitante en la ejecución de este estudio fue la obtención de las cucarachas, *Blattella germanica*. Se consiguieron individuos de *B. germanica* por colecta los cuales debían representar el pie de cría, pero se encontró varias dificultades para

establecer una población de cucarachas. Para los bioensayos se necesitaba una población sincrónica para usar individuos en el mismo estadio. Se logró formar una población sincrónica con ayuda de la relación entre alimentación y muda descrita por Kunkel, (1966). Esta población murió en su totalidad en un período de dos días cuando los organismos se encontraban entre el tercer y quinto estadio. No se ha determinado la causa de la muerte, que puede ser bacteriana, fúngica o viral. La población se encuentra en refrigeración para ser procesada según las técnicas de aislamiento de bacterias y hongos entomopatógenos.

Ante este impedimento se decidió usar las ninfas de una sola ooteca, que se podrían llevar sincrónicamente hasta tercer estadio, para un bioensayo con dos cepas y un control, o sea un número de individuos mínimo de 30. Una ooteca de *B. germanica* contiene de 30-40 huevos (Kunkel, 1966) (Valles, 2005), pero sólo 28 a 32 eclosionan y este número disminuye al aumentar la edad de la hembra (número de veces que ha portado una ooteca) (Cruz, 1994).

B. Metodología A: Primer Bioensayo

Los resultados del 100% de mortalidad, tanto de los tratamientos como del control, del primer bioensayo con la metodología A, indican un factor externo al de la acción entomopatógena de los hongos utilizados. Al aplicar la solución de conidios al papel filtro dentro de la caja de Petri, las cucarachas permanecieron durante aproximadamente 20 días en un lugar húmedo, en donde su refugio hecho de papel filtro absorbió la humedad, dejándolas sin un lugar seco. Las cucarachas prefieren lugares con alta humedad (Kunkel, 1966), pero no anegados, por lo que se les encuentra en cocinas, alcantarillados, baños, ya que necesitan de agua, pero se esconden en rendijas y en los espacios entre los muebles y la pared (Valles, 2005). Las cucarachas en las cajas de Petri bajo este tratamiento no tenían la oportunidad de escapar la humedad extrema, inundación, en que se encontraban, lo cual puede haber resultado en debilitamiento, enfermedades.

No se encontró una metodología específica para bioensayos de hongos entomopatógenos con cucarachas, por lo que después de los resultados del bioensayo A (cuya metodología fue propuesta por nosotros), se decidió adaptar la metodología utilizada para *Triatoma dimidiata* por Enríquez, (2004). Ya que las cucarachas tienen un nivel de actividad superior al de las chinches no se podía sumergirlas dentro de la solución sostenidas por una extremidad con una pinza, además que esto resulta en el desprendimiento de esta extremidad. No se pudo probar la anestesia con CO₂ (Cruz, 1994) ya que los tanques son de uso industrial, de cantidades muy grandes y caras. Otro problema en los bioensayos con cucarachas es la habilidad de éstas de trepar en superficies verticales de vidrio (u otros materiales) y por ello escaparse fácilmente de los vasos de precipitados o las cajas de Petri. Por comunicación personal vía correo electrónico con Kunkel, (2006) se obtuvo la recomendación de hacer una franja, de dos centímetros aproximadamente, puliendo con vaselina sólida, en el borde interno superior del recipiente. La vaselina pulida permite que la superficie esté lisa y ya no existan pequeños poros en donde las cucarachas se puedan sujetar. Las cucarachas se les dejaba caer en el vaso de precipitados con la solución y se retiraban de manera que las cucarachas se subían a la pinza, y se transportaban a la caja de Petri, de este modo no se corre el riesgo de lastimar el organismo con demasiada presión con las pinzas.

C. Metodología B: Primer Bioensayo

Las mortalidades del primer bioensayo fueron significativamente mayores (73.3%) para la cepa MET.MB y menor para MET.GC 28.57% ($p = 2,42749E-10$). En ninguna de las cepas aún luego de 30 días de observación post-infección resultó en un 100% de mortalidad. En la cepa MET.MB si se obtiene un dato para LT50 de 8.231 días, que concuerda con los días en que observamos la mortalidad del 50% de la población. Pero el LT90 para MET.MB y LT50 y LT90 para MET.GC son proyecciones realizadas por el programa, ya que la regresión asume un comportamiento (mortalidad) continuo.

D. Metodología B: Segundo Bioensayo

En el segundo bioensayo (aun sin concluir) se esperaba una confirmación de estos datos, o sea mortalidades para cada una de las cepas en proporciones similares. Además se realizó el primer bioensayo para las cepas de *Beauveria bassiana*. Para la cepa de *Beauveria bassiana* BB.GC fue de 7.14% y la cepa BB.MB no presentó mortalidad. Las mortalidades en las cepas de *Metarhizium anisopliae* no alcanzaron el 50 % de mortalidad, siendo el 28.57% para la cepa de *Metarhizium anisopliae* MET.GC y de 14.29% para la cepa MET.MB. Dadas las bajas mortalidades no se calcularon tiempos medios letales.

E. Metodología B: Tercer Bioensayo

El tercer bioensayo, la cepa MET.MB obtuvo una mortalidad similar (71.43%) a la presentada en el primer bioensayo (73.3%) y la cepa MET.GC alcanzó una mortalidad del 85.71%. Las cepas de *Beauveria bassiana* mantuvieron una baja mortalidad, BB.GC fue de 21.43% y la cepa BB.MB no presentó mortalidad.

F. Factores que pudieron haber influido en las diferencias en la mortalidad

Posible resistencia hacia hongos entomopatógenos presente en algunos individuos de la población. Debido a que no se tomó datos del origen de la hembra no se puede inferir sobre el lugar y la influencia de esto sobre su posible resistencia a los hongos entomopatógenos. Pero sí se sabe con seguridad que los progenitores fueron diferentes para cada grupo utilizado en los bioensayos. Para el primer bioensayo utilizamos un grupo de cucarachas en tercer estadio resultado de la eclosión de una ooteca. En el segundo bioensayo se utilizaron individuos de la eclosión de dos ootecas de dos hembras (tiempo entre las eclosiones: dos días), todos del tercer estadio.

Se podría especular sobre una resistencia genética a ciertos patógenos, presente en algunas cucarachas y ausente en otras. Se ha estudiado extensamente la resistencia de las cucarachas a insecticidas (Valles y Ke Dong, 1998) (Valles, 2001), pero no hay investigaciones sobre resistencia a hongos entomopatógenos.

La relativamente baja mortalidad en todos los bioensayos (ya que no se alcanzó el 100% de mortalidad en ninguna de las cepas) podría indicar cierta resistencia de las cucarachas ante estos entomopatógenos. De manera de comparación, para estas mismas cepas de hongos en

un bioensayo paralelo realizado por Benítez y Enríquez (2006, no publicado) con *Triatoma dimidiata* de primer estadio, utilizando las mismas soluciones de conidios, se obtuvo un 100% de mortalidad en ambas cepas en los días 7-9 post-infección.

La disponibilidad de comida pre-inoculación o período de hambruna antes del bioensayo y su relación con la muda (Kunkel, 1966), puede haber influido la mortalidad. En el primer y tercer bioensayo las cucarachas se encontraban en el recipiente con la hembra (madre), agua y comida, hasta el momento de la inoculación. Estas cucarachas mudaron a las 12-24 horas post-infección. En el segundo bioensayo separamos las ninfas 36 horas antes del bioensayo y las colocamos en un recipiente solamente con agua, de esta manera no tuvieron comida disponible 36 horas antes del bioensayo. Observamos las primeras mudas de estos grupos a los días 3, 4 y 5 post-infección. En ambos bioensayos 24 horas luego de la inoculación les proporcionamos comida, la cual les retiramos a las 24 horas.

La muda seguida al momento de inoculación en corto tiempo, podría disminuir la mortalidad al desechar el exoesqueleto infectado. Pero resultó en mayor mortalidad. Esto podría explicarse que las ninfas recién mudadas, cuando la nueva cutícula no se ha endurecido, estado teneral, se encuentra más vulnerable a la reinfección con otras cucarachas con cutícula vieja (inoculada) y con la propia cutícula desechada.

El proceso de muda ya pudo haber estado iniciado en el momento en que las inoculamos. La muda involucra reacciones endocrinas para la formación de la nueva cutícula y desprendimiento de la vieja, que son accionadas por la ingesta de comida (Kunkel, 1966). En la etapa de apólisis donde la cutícula vieja se separa, pero todavía no es desechada, podría haberse ya inoculado la cutícula nueva. En ambos bioensayos la mortalidad igual a cero en ambos controles supone que la solución de dH₂O + Tween 20 no tiene efecto negativo en las cucarachas dentro o fuera del proceso de muda.

La distensión de la cutícula luego de la ingesta podría proveer una superficie de infección más grande, resultando en una mortalidad más alta (Kirkland, *et al.*, 2004)

Para la preparación de la solución de conidios para cada bioensayo se utilizó un nuevo cultivo de hongos (siempre del mismo cepario y las mismas cepas), pero no procedente de un cultivo monospórico. De esta manera podríamos suponer que los conidios utilizados en el primer bioensayo tuvieran una virulencia mayor hacia las cucarachas, que los del segundo bioensayo, aunque en ambos presentaran una viabilidad similar.

En ninguno de los bioensayos realizamos la revigorización de las cepas, lo cual puede haber influido en la mortalidad baja (menor que el 100%) en ambos bioensayos.

Se utilizó una concentración única de 10⁷ conidios por ml, no se realizaron bioensayos previos para encontrar la concentración crítica. Esto podría indicar que la concentración mínima letal (100% mortalidad) es mayor a la utilizada.

La cepa MET.MB demostró una relativamente alta mortalidad en el primer y tercer bioensayo, los datos del segundo bioensayo difieren, posiblemente debido a alguno o varios de los factores mencionados. En el tercer bioensayo se obtuvo con MET.GC una mayor mortalidad, que no es comparable con ninguno de los dos datos anteriores obtenidos para esta cepa anteriormente. Lo cual impide establecer a una de estas dos cepas como la más virulenta, ya que existe una variación demasiado grande en los datos. En los dos bioensayos realizados con *Beauveria bassiana* BB.GC presentó baja mortalidad y BB.MB ninguna.

X. CONCLUSIONES

No habiendo metodología para bioensayos con cucarachas y hongos entomopatógenos, se probó dos adaptaciones de otras metodologías. En la primera metodología utilizada se obtuvo un 100% de mortalidad para los tratamientos y el control, el factor de mortalidad en estos tratamientos pudo deberse a alta humedad (inundación) dentro de las cajas de Petri y no a las cepas de *Metarhizium anisopliae*. La segunda metodología empleada dio mejores resultados, se presentó mortalidad sólo en los tratamientos y no en los controles.

Existió una gran variación en los datos obtenidos entre los bioensayos. Estas diferencias en la mortalidad pueden haber sido causadas por la posible resistencia a hongos entomopatógenos dentro de la población de cucarachas. Otro factor podría haber sido el tiempo de hambruna pre-inoculación a las que estaban expuestos los grupos de cucarachas, y su efecto en la muda. La virulencia contra cucarachas puede diferir entre cultivos de una misma cepa, cuando ésta no proviene de un cultivo monospórico. La concentración mínima letal debe ser mayor a la utilizada (10^7 conidios por ml).

Las cepas de *Metarhizium anisopliae* demostraron ser significativamente más virulentas que las cepas de *Beauveria bassiana*. Con los datos hasta el momento no se puede aceptar o rechazar la hipótesis, ya que existen variaciones dentro de los bioensayos, aun utilizando la misma metodología. La mortalidad ha sido muy baja para establecer LT50 confiables. En la cepa MET.MB en el primer bioensayo que sí alcanzó la mortalidad del 50%, fue al día 8.231, contrario a los cinco días propuestos en la hipótesis.

XI. RECOMENDACIONES

Realizar bioensayos con cultivos monospóricos y con revigorización de las cepas. Obtener la concentración crítica por medio de bioensayos en varias concentraciones inoculando diferentes estadios de *Blattella germanica*.

Diseñar un estudio para probar o no la existencia de algún tipo de resistencia de *Blattella germanica* hacia las cepas de *Metarhizium anisopliae*.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrientos, L. 2002. Uso de Hongos Entomopatógenos en el Control de Plagas en Campo; Comercialización, Uso Actual y Futuro de Hongos Entomopatógenos. Curso Internacional de Patología de Insectos. Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. México.
- Cruz, C.I. Técnica de Cría para la Cucaracha *Blattella germanica* (L.) (Dyctioptera: Blattellidae), contenido en: Bautista, N., Vejar, G. y Carrillo, J. 1994. Técnicas para la Cría de Insectos. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Instituto de Fitosanidad, México.
- Benítez, L. y Enríquez, E. 2006. Evaluación de la Virulencia Diferentes Cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae* en el Control Biológico de *Triatoma dimidiata* Principal Vector del Mal de Chagas en Guatemala. Proyecto Fodecyt. No Publicado.
- Enríquez, E. 2004. Evaluación de la Virulencia Diferentes Cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae* en el Control Biológico de *Triatoma dimidiata* Principal Vector del Mal de Chagas en Guatemala. Proyecto Fodecyt No. 35-01. Laboratorio De Entomología Aplicada Y Parasitología (LENAP). Guatemala.
- Estrada, R. 2006. Agrícola el Sol. <http://www.agricolaelsol.com>
- Frost, P. 2001. Largest Fossil Cockroach Found; Site Preserves Incredible Detail. Research Communications. Ohio State University. 31(9).
- Fortuny, A. 1998. Informe sobre el entrenamiento: “Evaluación de Efectividad y Resistencia en Vectores de la Enfermedad de Chagas”. Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, CIPEIN (CITEFA-CONICET). Buenos Aires, Argentina.
- Goettel, M.S., Hajek, A.E. 2001. Evaluation of Non-Target Effects on Pathogens used for mangement of Arthropods. En: Evaluating Indirect Ecological Effects of Biological Control. (E. Wajnberg; J.K. Scout and P.C. Quimbly. Eds) Cap.5 CAB Internacional.
- Goettel, M.S., Hajek, A.E., Siegel, J.P. y Evans, H. 2001. Safety of Fungal Biocontrol Agents En: Fungi as Biocontrol Agents. Evaluating Indirect Ecological Effects of Biological Control. (T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan. Eds.) Cap.13 CAB Internacional.
- Hall, R.A., Zimmermann, G. y Vey, A. 1982. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticidas. Entomophaga. 27(2):121-127
- Hoffmann, M.P. y Frodsham, A.C. 1993. Natural Enemies of Vegetable Insect Pests. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. Estados Unidos de América. 63 pp. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/info/biocont.html>
- Houseman, R. 2001. Insects and Diseases: Cockroaches. MU Guide Agricultural. Department of Entomology. University Of Missouri-Columbia. Estados Unidos de América.
- Kirkland, B.H., Westwood, G.S. y Keyhani, N.O. 2004. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisoplae* to Ixodidae Tick Species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. J. Med. Entomol. 41(4): 705-711.
- Kunkel, J. 1966. Development And The Availability Of Food In The German Cockroach, *Blattella Germanica* (L.). Insect Physiol., 1966, Vol. 12, pp. 227 to 235. Pergamon Press Ltd. Printed in Great Britain
- Kunkel, J. 2006. Comunicación personal por medio de correo electrónico.

- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. y Vail, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* 21, 230–248.
- Leathers, T. D., S. C. Gupta, and N. J. Alexander. 1993. Mycopesticides: status, challenges, and potential. *J. Indust. Microbiol.* 12: 69-75.
- Leucona, R.E., Turica, M., Tarocco, F. y Crespo, D.C. 2005. Microbial Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with Selected Strains of *Beauveria bassiana*. *Journal of Medical Entomology.* 42(3): 332-336.
- Nave, F. 2006. Comunicación Personal. Unidad De Informática, Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacia, Universidad De San Carlos De Guatemala.
- Orr, D., Bambara, S. y Baker, J. 1997. Biological Pest Control: An Introduction. Department of Entomology, North Carolina State University. Estados Unidos de América. <http://cipm.ncsu.edu/ent/biocontrol/introduction.html>
- Pai, H.H., Chen, W.C., Peng, C.F. 2004. Cockroaches As Potential Vectors Of Nosocomial Infections. *Infection Control And Hospital Epidemiology.* 25(11): 979-984.
- Pai, H.H., Chen, W.C., y Peng, C.F. 2005. Isolation of bacteria with antibiotic resistance from household cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*). *Acta Trop.* 93(3):259-65.
- Sarinho, E., Schor, D., Veloso, M.A. y Rizzo, J.A. 2004. There are more asthmatics in homes with high cockroach infestation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 37:503-510.
- St. Leger, R. J., Durrands, P. K., Charnley, A. K. y Cooper, R. M. 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 52, 285-293.
- Street, D.A. y Henry, J.E. 1990. Microbial Control of Locusts and Grasshoppers in the Semiarid Tropics. *Actas de la 5ª Reunión Internacional de la Sociedad de Ortopterólogos.* Julio 17-20, 1989, Valsain (Segovia) España. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas (fuera de serie)* 20: 21-27.
- Roberts, D. W. 1966. Toxins from entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* II. Symptoms and detection in moribund hosts. *Journal of Invertebrate Pathology.* 8, 222-227.
- Rodríguez de la Torre, M. 1982. Manejo y Control de Plagas en Insectos, Vol. III. Primera edición. Editorial Limusa. México. pp.522
- Romaña, C. Fargues, J. 1992. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Bauveria bassiana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.87 (3):* 363-368, Jul./Sep.
- Rosas, J.L. 2002. Hongos Entomopatógenos. Curso Internacional de Patología de Insectos. Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. México.
- Valles, S., Ke Dong, Sharf, M.E., Zeichner, B. y Bennett, G.W. 1998 The Knockdown Resistance (kdr) Mutation in Pyrethroid-Resistant German Cockroaches. *Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology.* 60(3):195-204.
- Valles, S. y Strong, C. 2001. A Microsomal Esterase Involved in Cypermethrin Resistance in the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology.* 71(1):56-67.
- Valles, S. 2005. Featured Creatures: *Blattella germanica* (Linnaeus) (Insecta: Blattodea: Blattellidae) Department of Entomology and Nematology, University of Florida. Estados Unidos de América. <http://creatures.ifas.ufl.edu/urban/roaches/german.htm>

Wang, C., Scharf, M.E., y Bennett, G.W. 2004. Behavioral and physiological resistance of the German cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). *J Econ Entomol.* 97(6):2067-72.

XIII. ANEXOS

Cultivo de *Blattella germanica*





