



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Agronomía
Departamento e Instituto de Zoología Agrícola



Efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912, sobre cucaracha *Periplaneta americana* (L.), en condiciones de laboratorio

Mercy D. Gutiérrez G.

Maracay, noviembre del 2019



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Agronomía
Departamento e Instituto de Zoología Agrícola



Efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912, sobre cucaracha *Periplaneta americana* (L.), en condiciones de laboratorio

Autor: Mercy D. Gutiérrez G.

Tutor: Greeys H. Centeno S.

Asesor: Nohants B. Rumbos E.

Trabajo de grado presentado como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

APROBACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO POR EL JURADO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del Jurado Examinador del Trabajo de Grado titulado **Efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912, sobre cucaracha *Periplaneta americana* (L.), en condiciones de laboratorio**, cuyo autor es la Bachiller **Mercy Dorelis Gutiérrez García**, titular de la Cédula de Identidad N° **24.057.957**, certificamos que lo hemos leído, y que en nuestra opinión reúne las condiciones necesarias de adecuada presentación, y es enteramente satisfactorio en alcance y calidad como Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, Mención Agronomía. Así mismo se postula como mejor Trabajo de Grado, del Instituto de Zoología Agrícola.

Prof^a. Greeys Centeno
C.I. V.6.227639
Tutora

Prof^a. Nereida Delgado
C.I. V. 6.363.676
Jurado Principal

Prof. Eutimio González
C.I. V.2.664.697
Jurado Principal

Prof. Gabriel Díaz
C.I. V. 15.129.708
Jurado Suplente

DEDICATORIA

A Dios, por regalarme salud y amor para culminar este proceso de cumplir mis deseos más anhelados.

A mis adorados padres, Aleira García de Gutiérrez y Juan Gutiérrez, quienes me han guiado con amor y dedicación en cada paso de mi vida, ustedes son mi fortaleza, mi luz y alegría. Igualmente, mis hermanos Juan Carlos, Julio y Juan Ernesto.

A mi gran amigo y compañero de vida Juan Carlos Barazarte, por su amor durante toda nuestra formación profesional.

A mi asesora, profesora y amiga Nohants Rumbos, a quien como un pequeño gesto de agradecimiento deseo dedicarle este trabajo de grado, por haber formado parte de la realización del mismo, no solo con sus aportes científicos en el área, sino también por el cariño y fortaleza brindada en tiempos de desesperanza, gracias por enseñarme a insistir, persistir, resistir y nunca desistir.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por darme el regalo más preciado, mi familia.

A la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, la casa que vence las sombras, a mis profesores, con especial reconocimiento a mi tutora Greeys Centeno por brindarme su apoyo incondicional, por sus consejos a nivel académico como a nivel personal, quien me cobijo con su amor durante los últimos años de la carrera.

Al Instituto de Zoología Agrícola y al Instituto de Química y Tecnología, Laboratorio de Química, y a todo el personal que allí labora.

Al profesor Eutimio González, por su colaboración en la realización de esta investigación y sus grandes aportes.

A la profesora Nereida Delgado por su ayuda en el procesamiento y comprensión de los datos estadísticos obtenidos.

A la Ing. Agr. Ana Castillo y Hecny Meneses por sus enseñanzas en los protocolos de masificación del hongo.

A mi profesor Miguel Ortega y su Esposa Edita Alonzo por incursionarme en el mundo laboral y confiar en mí.

RESUMEN

Se condujo un bioensayo bajo condiciones de laboratorio ($T= 25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, HR $75 \pm 5\%$ y Fotoperiodo 12:12), para evaluar la patogenicidad y virulencia del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin sobre adultos de cucaracha *Periplaneta americana* (L.). El hongo se desarrolló en un medio PDA enriquecido con harina de *P. americana*, obteniendo un porcentaje de germinación del 92%. Se evaluaron tres concentraciones 10^6 , 10^7 y 10^8 con/ml, a través de la aplicación tópica de 10 μl . Los insectos tratados presentaron cambios en el comportamiento por la aplicación de la suspensión conidial, El tratamiento T3 (1×10^8 con/ml) arrojó una mortalidad del 64% y un TL_{50} de 8 días; se observó en los insectos muertos el micelio emergido, colonización algodonosa de color blanco que luego se tornaron pulverulentas correspondiendo a la especie *B. bassiana*.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, cucarachas, patogenicidad, virulencia.

SUMMARY

A bioassay was conducted under laboratory conditions ($T = 25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%$ HR and 12:12 Photoperiod), to assess the pathogenicity and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on adult cockroach *Periplaneta* (L.). The fungus was grown in a PDA medium enriched with *P. americana* flour, obtaining a germination percentage of 92%. Three concentrations 10^6 , 10^7 and 10^8 were evaluated con/ml, through the topical application of 10 μl . The treated insects showed changes in behavior due to the application of the conidial suspension. The T_3 treatment (1×10^8 con/ml) showed a mortality of 64% and a TL_{50} of 8 days; In the dead insects, the mycelium emerged, cottony white colonization that later became powdery corresponding to the species *B. bassiana*.

Keywords: *Beauveria bassiana*, cockroaches, pathogenicity, virulence.

TABLA DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO POR EL JURADO	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
TABLA DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3
ANTECEDENTES	3
Características de <i>P. americana</i>	5
Ciclo de vida	6
Resistencia y adaptabilidad	7
Métodos de control	7
Hongo entomopatógeno: <i>Beauveria bassiana</i>	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Procedencia y cría de insectos	10
Selección de individuos	11
Preparación del inóculo del hongo.....	12
Prueba de viabilidad del inóculo	12
Bioensayo o Prueba de Virulencia y Patogenicidad	13
Diseño de la investigación	13
Análisis estadístico	13

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
CONCLUSIÓN	26
RECOMENDACIONES.....	27
REFERENCIAS.....	28
ANEXOS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>P. americana</i> (L.)	6
Cuadro 2. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	9
Cuadro 3. Composición nutricional porcentual de croquetas utilizadas como dieta de los insectos.	11
Cuadro 4. Análisis de Varianza de Mortalidad Acumulada.....	17
Cuadro 5. Comparación de medias de mortalidad entre tratamientos..	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Botella con sustrato cubierto por micelio de <i>B. bassiana</i>	15
Figura 2. Proceso de obtención de la harina de <i>P. americana</i>	16
Figura 3. Distribución porcentual de la mortalidad acumulada de <i>P. americana</i> causada por <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones de inóculo.....	18
Figura 4. Adultos de <i>P. americana</i> con presencia de micelio de <i>B. bassiana</i> emergiendo y colonizando a la cucaracha.	20
Figura 5. Tendencia de la respuesta del porcentaje de Mortalidad acumulada expresada en unidades Probit a los 15 días de la aplicación tópica de 1×10^8 con/ml.	22
Figura 6. <i>Beauveria bassiana</i> . A, B, C, D: colonias de 10-15 días, observadas en el haz y envés de las placas de Petri. E: hongo cubriendo densamente el hospedante. F: estructuras de cucaracha sobre PDA.	24
Figura 7. <i>Beauveria bassiana</i> . A, B, C, D: Células conidiogénicas con base globosa y raquis zig-zag. conidios globosos. Aumento: 400X.	25

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Jaulas de crías de ejemplares de <i>Periplaneta americana</i>	32
Anexo 2. Inoculación de Tópica de 10 µl de diferentes concentraciones de <i>B. bassiana</i> , mediante una micropipeta semiautomática.	32

INTRODUCCION

A nivel mundial la cucaracha [*Periplaneta americana* (L.)], es considerada una de las principales plagas urbanas, por su capacidad de proliferación y distribución de patógenos (Feizhaddad *et al.*, 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala a las cucarachas como un problema de salud pública, siendo un vector mecánico en el transporte de microorganismos como: protozoarios, hongos, virus, helmintos y bacterias; que son causantes de muchas infecciones gastrointestinales en humanos (Bonney *et al.*, 2008).

Según Salehzadeh *et al.* (2007), las cucarachas pueden transmitir a través de las patas, heces y regurgitamientos más de 45 patógenos, siendo las especies más destacadas *Escherichia coli* (Escherich 1885), *Salmonella typhi* (Lignieres 1900), *Enterobacter sakazakii* y *Klebsiella sp* (Trevisan 1885), agentes causales de gastroenteritis y contaminación de alimentos (Ponce *et al.*, 2005; García, 2012; Ruiz *et al.*, 2015). Incluso se demostró que contribuyen a la diseminación del agente causal de enfermedades como la lepra (*Mycobacterium leprae*) y la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) (Tejera, 1926).

Adicionalmente, El Colegio Americano de Alergia, Asma e Inmunología asegura que numerosos alérgenos (proteínas) que se hallan en los excrementos, saliva y mudas de estos insectos pueden causar reacciones alérgicas o desencadenar síntomas de asma, especialmente en niños (Ponce *et al.*, 2005).

El nivel de infestación que puede causar una cucaracha debido a su elevado potencial reproductivo, su capacidad para adaptarse a medios cambiantes y hostiles, su facilidad para ocultarse en lugares inaccesibles y su gran longevidad (entre 1 y 2 años de vida), les permite alcanzar elevadas densidades en muy poco tiempo, llegando a producir cada hembra, aproximadamente 30 ootecas durante su vida, representando más de 400 descendientes, constituyendo un importante problema de salud pública (Torres, 2015).

El control de esta plaga urbana se ha basado en la aplicación de insecticidas químicos sintéticos como organofosforados, organoclorados, piretroides y carbamatos; sin embargo, se ha referido que la resistencia a estos insecticidas se ha generalizado en las poblaciones de *P. americana* (Mohan *et al.*, 1999); dificultando su uso, además de

dispersarse los residuos en el ambiente y convirtiéndose en contaminantes para los sistemas biótico y abiótico, amenazando su estabilidad y representando un peligro de salud pública (Del Puerto *et al.*, 2014). No obstante, intentos por controlar a esta plaga, han motivado el uso de métodos menos contaminantes, amigables con el ambiente y de menor riesgo para la salud, como lo son el uso extractos de algunas plantas, sin embargo, la mayoría de los reportes sobre este método no poseen rigurosidad científica, sino que proceden del saber popular. Literaturas señalan el uso de pepinos molidos y cineol o extracto de eucalipto como repelente de *P. americana* (Scriven *et al.*, 1984).

En Venezuela, la importancia que se ha dado a los estudios sobre las plagas agrícolas, ha obviado la problemática de las plagas en las ciudades, causando que el control de estos insectos sea mal manejado por las compañías fumigadoras. En la mayoría de los casos, éstas no tienen conocimientos técnicos sobre las plagas que están tratando, así como de los diferentes y adecuados controles que existen, lo cual ha generado como consecuencia el desarrollo de resistencia a insecticidas (Delgado *et al.*, 2003).

La presión que existe por reducir la contaminación en el ambiente, ha asegurado el creciente interés en estrategias alternativas para el manejo de plagas, siendo los hongos entomopatógenos una de las opciones más atractivas (Butt *et al.*, 2001). Estudios realizados han demostrado que los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* poseen potencial para control biológico de las cucarachas, y pueden contribuir con el desarrollo de estrategias para interrumpir su ciclo de vida (Hubner, 2011). El uso de estos representa una gran ventaja, por su baja inducción de resistencia comparada con los productos químicos utilizados para su control; además que, en el caso de algunos productos biológicos, se puede dar la transmisión de insecto a insecto por auto-diseminación del agente de biocontrol (Hubner *et al.*, 2013).

La proliferación de plagas urbanas son vehículos de infecciones y pudieran, si no se toman los correctivos oportunos, sumar más enfermedades y epidemias a la ya grave situación que padece la población en términos de salud pública. En este sentido, surge la búsqueda de métodos alternativos de bajo impacto ambiental y eficiente en el control de las cucarachas, con el uso de hongos entomopatógenos. Teniendo en consideración esta situación, se planteó la evaluación del hongo *Beauveria bassiana* para el control de

cucarachas, en condiciones de laboratorio, resultando esta investigación de impacto social, representando una estrategia novedosa y factible en el ámbito científico venezolano, teniendo en consideración que los resultados obtenidos podrían contribuir a mejorar la difícil lucha contra esta plaga, dada la creciente resistencia a los insecticidas y la preocupación por la seguridad en el uso de productos químicos tradicionales en el ámbito doméstico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, sobre *P. americana*, en condiciones de laboratorio.

Objetivos Específicos

1. Describir la metodología para la obtención de inóculo del hongo *B. bassiana*, bajo condiciones de laboratorio.
2. Determinar el efecto de virulencia y patogenicidad de *B. bassiana*, sobre adultos de *P. americana*, en condiciones de laboratorio.
3. Comprobar la presencia de *B. bassiana* en adultos de *P. americana* muertos por exposición a este agente patógeno.

ANTECEDENTES

El daño causado por las cucarachas, está directamente relacionado con el hábito de asociación con entornos humanos, que le proporcionan calor, humedad y alimentos, esparciendo los contaminantes presentes en estos. En este sentido, como alternativa para el control biológico, se emplean los hongos entomopatógenos, gracias a su comprobada virulencia y su amplio rango de hospederos (Jacobs, 2013).

B. bassiana ha sido utilizada con éxito en el control de diferentes plagas en diversos cultivos, principalmente en el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*, la palomilla del repollo *Plutella xylostella* y mosca blanca *Bemisia* spp. (Zambrano y García, 2003).

En Venezuela, Santander y Santander (2006) demostraron, la susceptibilidad de adultos, larvas y pupas de *Anastrepha obliqua* a este hongo a seis concentraciones diferentes, mediante aplicación tópica de 2 µl, siendo evidente un efecto de patogenicidad solo sobre adultos, con valores de mortalidad de CL₅₀ de 4,8x10⁷ con/ml y un TL₅₀ de 8,33 días. Asimismo, transcurridas las 24 horas de ubicar el cadáver en cámara húmeda se evidenciaron la emergencia y distribución de micelio blanco del hongo.

Igualmente, el estudio realizado en Venezuela por Márquez (2009), reafirmó el efecto que produce el hongo *B. bassiana* sobre *Spodoptera frugiperda*, mediante aplicación tópica de 5 µl de una suspensión del hongo de 2,80x10⁸ con/ml sobre adultos del insecto, obteniéndose un TL₅₀ de 2,331 días, el cual se incrementó en la medida que la concentración de conidios de *B. bassiana* fue menor.

En México, Hernández *et al.* (2007) confirmaron la relación entre la edad, la humedad relativa y la patogenicidad de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas y adultos de *P. americana* en condiciones de laboratorio inoculadas tópicamente con 10 µl de una suspensión de esporas de 1.1x10⁶ con/ml a una temperatura de 24 ± 2 °C y HR de 50 ± 10%, no obstante, la mortalidad se redujo conforme aumentó la edad de los insectos.

Otra alternativa fue propuesta en México por Hernández (2013), quien, al evaluar por vía oral, la virulencia de cebos en polvos y pellet formulados con esporas de aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, combinado con ácido bórico, con el fin de evaluar la patogenicidad de estos hongos en ninfas y adultos de *Blatella germanica*, obtuvo que la mejor formulación fueron los pellets elaborados con 2% de ácido bórico y 2 x10⁸ conidios *M. anisopliae* / g de cebo. La mortalidad observada durante 15 días fue del 100% en ninfas del 5° instar, lo que sugiere ser una alternativa de control para esta plaga.

Estos resultados coinciden con Gutiérrez *et al.* (2014), quienes evaluaron en Argentina la susceptibilidad de ninfas y adultos de *B. germanica* y *Periplaneta fuliginosa* a los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* por contacto directo y cebos con una concentración de 1×10^9 con/ml. En esta investigación, la aplicación de *M. anisopliae* por contacto directo produjo entre el 60 y 93% de mortalidad en ninfas y adultos con un tiempo letal medio (TL₅₀) para los adultos de 3,8 días y 8,6 días para ninfas respectivamente. No obstante, bajo este mismo método *B. bassiana* causó una mortalidad del 80% en adultos y 40% en ninfas, con un TL₅₀ de 5 y 10 días respectivamente.

Asimismo, la exposición a cebos de *B. bassiana* causó en adultos *B. germanica* una mortalidad del 40% en 21 días mientras que en ninfas de *P. fuliginosa* con *M. anisopliae* y *B. bassiana* ocasionó una mortalidad del 50% con una TL₅₀ de 22 y 27 días, respectivamente.

Mohan *et al.* (1999) evaluaron, en la India bajo condiciones de HR > 90% y 25 ± 1 °C, la patogenicidad de tres aislamientos de *B. bassiana* sobre *P. americana*, a través del contacto directo con la masa de esporas a una concentración de 4.5×10^6 con/ml, una mezcla de conidios y harina de trigo y una pulverización de una suspensión acuosa de conidios, encontrando mortalidades del 100%, entre 67-100% y entre 17-78%, en cada caso.

Características de *P. americana*

Las cucarachas son consideradas fósiles vivientes porque sus características estructurales como: forma del cuerpo, venación de las alas y aparato bucal, han permanecido casi inalterables a lo largo del tiempo, lo que demuestra una eficiencia funcional. Su aparición en la tierra data de 300 millones de años A.C. Actualmente, son conocidas en el mundo 4500 especies de cucaracha aproximadamente, sin embargo, la OMS solo considera 50 especies como plagas domésticas (Mariño, 2011).

P. americana, pertenece a la familia Blattidae y su clasificación taxonómica se señala en el cuadro 1. Esta especie junto a *Blatta orientalis* L., *B. germanica* L., *P. fuliginosa* S, y *Supella longipalpa* F. se encuentra entre las cinco especies más comunes en hogares, no obstante, es la de mayor distribución en toda América, incluida Venezuela

(Moore y Granovsky, 1983). Dentro del género *Periplaneta*, se incluyen 47 especies, de las cuales ninguna es endémica de América, sino que han sido introducidas por el hombre (Bell y Adiyodi, 1981).

Cuadro 1: Taxonomía de *P. americana* (L.)

Taxonomía	
Reino	Animal
Filum	Artrópoda
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
Infraclase	Neoptera
Orden	Dictyoptera
Familia	Blattidae
Género	<i>Periplaneta</i> Burmeister, 1838
Especie	<i>Periplaneta americana</i> (Linnaeus, 1758)

Fuente: Atkinson *et al.* (1991)

Ciclo de vida

El insecto presenta metamorfosis incompleta (hemimetábolo), es decir, huevo, ninfa en diferentes estadios y adulto. La hembra atrae al macho mediante feromonas sexuales secretadas por glándulas especializadas y, tras el reconocimiento de los sexos, el macho deposita en el orificio genital femenino el espermátforo, concluyendo así la cópula (Mariño, 2011).

La hembra adulta es ovípara y coloca los huevos en una especie de cápsula denominada ooteca, dividida por un tabique longitudinal, a cada lado del cual se encuentran pequeñas cámaras verticales conteniendo un huevo cada una (Torres, 2015). Puede producir hasta dos ootecas por semana, 1 a 2 días después de la formación de la ooteca la hembra la deposita en un lugar seguro, cerca de fuentes de alimento, ocultándola y cubriéndola con una masa hecha a través de la masticación de madera, cartón u otro material con ayuda de la secreción bucal (Yeh, 1995).

Las ninfas eclosionan después de un período de incubación de la ooteca, que a 30 ± 1°C varía entre 30 y 45 días. El período de embriogénesis está fuertemente influenciado

por la temperatura. A mayor temperatura se acelera el desarrollo de los embriones, mientras que las temperaturas bajas aumentan el tiempo de incubación de los huevos o pueden aún impedir su desarrollo (Vianna *et al.*, 2001).

Las ninfas necesitan de 5 a 15 meses para llegar a la fase adulta, por lo cual sufren varias mudas hasta alcanzar la fase adulta. La cantidad de mudas necesarias para completar el desarrollo depende tanto de factores bióticos como de abióticos (Vianna *et al.*, 2001). Los machos pueden vivir en promedio, dos años y medio, las hembras aproximadamente tres años y cuatro meses (Bell y Adiyodi, 1981; Vianna *et al.*, 2001).

Resistencia y adaptabilidad

Las cucarachas pueden permanecer a una temperatura de -4 °C sin morir; pasados 20 minutos vuelven a su normalidad. Además, pueden adaptarse a un ayuno total de agua y comida por un mes, manteniéndose en estado de diapausa (casi detención total de actividades metabólicas), soportan dos meses con sólo agua y cinco meses a base de comida, ya que pueden absorber la humedad directamente de los alimentos a través de su cuerpo (Mariño, 2011).

Estos insectos tienen poder adaptativo a la acción de los insecticidas, por acción de ciertas enzimas que desdoblán e inactivan el mismo, transformándolos en sustancias inocuas y por la capacidad de mutación de algunas proteínas del sistema nervioso que al cambiar su configuración química bloquean la acción de los insecticidas (Mariño, 2011).

Métodos de control

- Control Químico: Los insecticidas químicos son el primer recurso contra este tipo de plaga urbana. Sin embargo, el uso permanente de estos productos ha sido cuestionado debido a resultados insatisfactorios, contaminación del ambiente e intoxicación de personas y animales domésticos (Alarcón *et al.*, 2005). Entre los ingredientes comúnmente utilizados, se pueden mencionar los neurotóxicos residuales de contacto como piretroides, carbamatos y organofosforados (Nasirian, 2010)

Control Físico: Los polvos desecantes son sustancias que desecan cualquier insecto o animal que tenga contacto con ellas. El cuerpo de un insecto se compone de sustancias líquidas, donde el desecante acaba con la capa cerosa que los protege (Guerrero y cadena, 2016). El efecto de desecación ocurre principalmente en adultos, ya que en las ninfas pueden acelerar el proceso de muda, con lo que evitan que el polvo se adhiera a la cutícula y les pueda causar la muerte (Habes *et al.*, 2006).

El ácido bórico es el desecante más empleado en el control de las cucarachas, logrando su control sin riesgo de toxicidad ni impacto negativo ambiental, siendo un producto de baja toxicidad (Romero *et al.*, 2012). Otro producto desecante probado por su capacidad insecticida, bajo condiciones de laboratorio es la tierra diatomea, en una dosis de 0.7g/Kg de trigo, causó la muerte del 100% de los insectos evaluados (Torres, 2011).

- Control Biológico: El control biológico representa una alternativa eficiente para el manejo integrado de insectos plaga, basado en la utilización de organismos vivos o sus productos, con capacidad de infectar o intoxicar al insecto induciendo la muerte, o alterar su metabolismo para afectar su longevidad y/o reproducción (Hoffmann y Frodsham, 1993).

Dentro de este control se encuentra el microbiológico, que consiste en el uso de los microorganismos como predadores de los insectos plaga. Los hongos entomopatógenos pueden regular las poblaciones a través de aplicaciones inundativas, inoculativas o dispersivas (Mahdavi *et al.*, 2013).

Debido a que las cucarachas son insectos sociales, su control con empleo de entomopatógenos le confiere una ventaja, ya que a diferencia de los químicos, donde no existe tal transmisión, la dispersión de los microorganismos puede permanecer por un tiempo prolongado, ampliando el periodo de control (Jeanson y Deneubourg, 2006).

Sin embargo, presentan desventajas como la sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas, a las temperaturas extremas, la desecación y la radiación ultravioleta, factores que evitan la eliminación súbita a la plaga. Por esta razón,

los productos con estos microorganismos requieren condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar la pérdida de la patogenicidad (Cañedo y Ames, 2004).

Aunque generalmente se consideran inocuos para los vertebrados y particularmente en mamíferos, siempre debe tenerse presente que los hongos entomopatógenos, especialmente *B. bassiana*, ha sido reportado, aunque en casos aislados, como patógenos oportunistas, tanto en humanos como animales (Zimmermann, 2007).

Hongo entomopatógeno: *Beauveria bassiana*

Es un hongo Ascomycota cosmopolita y su clasificación taxonómica se presenta en el cuadro 2. Es capaz de habitar en el suelo como saprófito, endófito en las plantas y como un entomopatógeno cuando afecta a los insectos, es haploide y normalmente se reproduce asexualmente, aunque puede reproducirse sexualmente en un estado teleomórfico, llamado *Cordyceps bassiana* (Boomsma *et al.*, 2014).

Cuadro 2: Taxonomía de *Beauveria bassiana*

Taxonomía	
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	Beauveria
Especie	<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin

Fuente: Sung *et al.* (2007)

Ciclo de la infección del insecto por *B. bassiana*

El desarrollo de la patogénesis inicia cuando el conidio entra en contacto con su hospedador, el ciclo de vida de este hongo se divide en dos fases: la parasítica y la saprofítica (Valero, 2016). La primera fase inicia cuando el conidio de *B. bassiana*, por contacto, se adhiere a la cutícula del insecto por mecanismos hidrofóbicos para inducir la germinación y la formación de un tubo germinativo. Posteriormente, las áreas

esclerosadas y membranosas de la cutícula deben ser rotas para la penetración física de las hifas al interior del cuerpo del insecto (Ortiz *et al.*, 2010).

Después de la penetración el hongo cambia al crecimiento de blastósporas para colonizar el hemocele del huésped, las células blastósporas circulan libremente a través del hemocele, donde explotan la hemolinfa para la nutrición y secretan toxinas que facilitan la muerte del huésped. Finalmente, cuando el huésped muere (fase final de la enfermedad) la cutícula debe ser rota nuevamente desde el interior para permitir la salida de los conidios del cuerpo del insecto y esporular en el cadáver (Valero, 2016).

En la fase saprofita el crecimiento micelial del hongo entomopatógeno emerge de los costados del insecto y de las partes membranosas de la región bucal, el conjunto de conidióforos alcanzan a cubrir todo el cuerpo excepto las áreas quitinizadas y la parte superior del pronoto; en último lugar, los conidios se dispersan al ambiente y se inicia un nuevo proceso de infección (Valero, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Microbiología, del Instituto de Química y Tecnología, y el Laboratorio de la Unidad de Asesoramiento y Evaluación de Plaguicidas del Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía (FAGRO), Universidad Central de Venezuela (UCV), Maracay (10° 17' 03" LN y 67° 36' 16" LO), estado Aragua. Se trabajó bajo las condiciones de $T = 25 \pm 1^\circ$ C, $75 \pm 5\%$ HR y fotoperiodo 12:12.

Procedencia y cría de insectos

Los insectos se obtuvieron de la colección del insectario, del Instituto de Zoología Agrícola de FAGRO, UCV.

La crianza de los insectos se realizó en jaulas, diseñadas en el Laboratorio de Bioensayo para las Moscas de la Fruta (LAMOFRU), por el profesor González Eutimio. Las jaulas fueron construidas con botellas de plástico de 5 litros, con tapa de rosca (anexo 1), acondicionadas con alimento, agua, cavidades de refugio, orificios de

entrada de aire fresco y un máximo de 15 insectos por jaula para su adecuado confort. La alimentación consistió de croquetas comerciales para perros a razón de 50 gr por jaula cada 5-7 días, según el consumo. La composición del alimento suministrado se señala en el cuadro 3. Para las cavidades o sitios de refugio se utilizaron embalajes de cartón para huevos y para el suministro de agua se usaron esponjas de poliuretano humedecidas con agua potable.

Cuadro 3: Composición nutricional porcentual de croquetas utilizadas como dieta de los insectos.

Nutriente	%
Proteína Cruda (min.)	19,0
Grasa Cruda (min.)	7,5
Fibra Cruda (máx.)	5,0
Humedad (máx.)	12,0
Minerales (máx.)	9,0
Fósforo (min. / máx.)	0,8

Fuente: PURINA® KNINA® 2019

Selección de individuos

Con el fin de obtener insectos de edad homogénea para el bioensayo se seleccionaron ejemplares adultos sanos (de comportamiento activo y libre de parasitoides), machos y hembras con un peso promedio de 0,8 y 1,4 g; respectivamente. Para la realización del pesaje de los individuos se inmovilizaron a 3°C por 15min. Los sexos no eran proporcionales entre los tratamientos.

Obtención de inóculo del hongo *B. bassiana*

El ensayo se realizó a partir de una cepa comercial del hongo *B. bassiana* (BMC-13) aislada de Broca del Café. La misma fue replicada por estriación en placas con papa dextrosa agar (PDA) como medio de cultivo e incubado a 25°C durante 15 días. Transcurrido ese tiempo se describieron macroscópicamente las colonias obtenidas, según las características culturales (color, aspecto y presencia de estructuras reproductivas), y se realizaron impresiones en cinta adhesiva del crecimiento micelial.

Para la masificación del hongo se realizaron siembras en el medio arroz y medio PDA con el fin de realizar ensayos preliminares para la estandarización de metodología en la obtención de inóculo

La preparación del medio arroz fue artesanal, mezclando 50 gr de arroz con 60 ml de agua destilada en botellas de 222ml de capacidad, tapadas con algodón y gasa, esterilizadas a vapor abierto por 40 minutos.

Adicionalmente y bajo las mismas condiciones de crecimiento, el hongo fue replicado por estriación en placas Petri con medio PDA enriquecido con 1 % de harina de cucaracha.

Preparación del inóculo del hongo

Las concentraciones utilizadas se obtuvieron a partir de un cultivo de 15 días de crecimiento sobre medio PDA dispuesto en tubo al cual se le añadieron 10 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,1%, luego se raspó el crecimiento superficial del hongo y se filtró a través de gasa estéril. La suspensión de esporas obtenida representó la suspensión de esporas madre a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-2} . De la última dilución y previa agitación se separó 1ml en un tubo de prueba y se le añadió una gota de azul de lactofenol como colorante de contraste. De esta suspensión se colocaron 10 μ l en cada compartimiento de la cámara de Neubauer y en 400X del microscopio óptico compuesto marca Nikon, se contabilizó el número total de esporas presentes en los 5 cuadrantes.

El valor obtenido, se utilizó para calcular la concentración de esporas/ml de la suspensión madre, según lo indicado por French y Hebert (1980). Partiendo de esta concentración se seleccionaron las diluciones seriadas correspondientes a 10^6 , 10^7 y 10^8 con/ml que se utilizaron en el ensayo.

Prueba de viabilidad del inóculo

Para evaluar la viabilidad del inóculo, a partir de una suspensión del hongo de 10^5 conidios/ml se tomaron alícuotas de 5 μ l y se sembraron en 5 puntos equidistantes

marcados al dorso de placas Petri contentivas de agar agua al 1,5% y luego se incubaron a 25°C durante 24 h.

Se cortó el área de cada alícuota se aplicó azul de lactofenol, se colocaron entre porta y cubreobjetos, y se observaron bajo lente de 40X ca. de 100 esporas totales a través de toda la alícuota. Se consideró como espora germinada aquella cuyo tamaño del tubo germinativo fue el doble del diámetro mayor de la espora (Chirinos *et al.*, 2010).

El porcentaje de germinación o viabilidad del inóculo se calculó como:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Número de esporas germinadas}}{\text{Número total de esporas}} \times 100$$

Bioensayo o Prueba de Virulencia y Patogenicidad

Para la manipulación de los insectos, se inmovilizaron a 3°C por 15min, mediante un dispositivo con sistema semiadiabático (Santander y Santander, 2006), provisto de H₂O_(L) y H₂O_(S). La aplicación se realizó siguiendo la metodología de Saume (1992) de manera tópica (Anexo 2) mediante una micropipeta semiautomática, depositando 10 µl (Hernández *et al.*, 2007), de la suspensión de esporas en la parte ventral del abdomen de cada insecto. Luego de la aplicación, los insectos se colocaron en recipientes de plástico transparente de 19x15 cm (285 cm²), con orificios para la entrada de oxígeno, alimento y agua.

El registro de mortalidad se realizó cada día (24h) durante 15 días continuos. Realizando observaciones periódicas del comportamiento de los insectos tratados.

Diseño de la investigación

La investigación fue de tipo experimental, bajo un diseño estadístico completamente aleatorizado, con tres concentraciones del hongo a evaluar T₁= 1x10⁶ con/ml; T₂= 1x10⁷ con/ml; T₃= 1x10⁸ con/ml y un testigo absoluto, para un total de 4 tratamientos, con 3 repeticiones y empleándose por cada unidad experimental 15 individuos adultos sin sexar.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante las herramientas informáticas Microsoft® Excel 2019 y el paquete estadístico Statistix versión 8.0. Los datos de porcentaje de mortalidad se transformaron a $\arcseno(\sqrt{X})/100$, realizó un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorio y se aplicó la prueba de la mínima diferencia significativa entre tratamientos (MDS), con un nivel de significancia $\alpha=0,05$. Adicionalmente se realizó un análisis Probit con el fin de determinar el tiempo requerido para ocasionar la muerte del 50% de las cucarachas tratadas con una dosis determinada.

Reislamiento del hongo en adultos de *P. americana* muertos, para comprobar la presencia de *B. bassiana*

Una vez muertos los insectos, fueron colocados individualmente en cámaras húmedas, mediante una capsula Petri con papel filtro humedecido, agua destilada estéril, sellados con papel film e incubados a 25 ° C hasta observar la esporulación del hongo en los insectos. A partir de los insectos con evidente colonización por hongos se reisló *B. bassiana* colocando trozos de órganos de los mismos (patas o antenas) en placas Petri contentivas de medio de cultivo PDA e incubadas a 25°C durante 12 días. Transcurrido ese tiempo se describieron las características macroscópicas de las colonias desarrolladas y realizaron impresiones del hongo sobre cinta adhesiva para observar las estructuras de valor taxonómico.

Las características obtenidas fueron comparadas mediante descripciones publicadas y claves morfológicas (Hoog ,1972; Samson *et al.*, 1982), a fin de constatar la identidad del hongo *B. bassiana*. Las estructuras fúngicas observadas fueron: micelio (color, diámetro), conidióforos (color, números de septos, largo y ancho), células conidiógenas (ubicación, color, forma, superficie, número de células conidiógenas, tipo de ontogenia conidial, tipo de proliferación, largo y ancho) y conidios (color, forma, superficie, número de septos, largo y ancho).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de inóculo del hongo *B. bassiana*

Una vez identificado el hongo, se replicó en medio arroz (Figura 1) contenido en botellas de vidrio para lo cual se tomaron trozos de la cepa original y se colocaron directamente sobre el medio de cultivo, luego de 15 días de incubación, se realizó un raspado del crecimiento micelial y filtrado para la cuantificación del inóculo, no obstante no se obtuvo un filtrado satisfactorio, por lo cual se masificó en medio PDA + 1% de Harina de cucaracha para favorecer la patogenicidad y virulencia de la cepa.

Para la obtención de la harina, se colectaron del insectario animales muertos, se desecaron naturalmente, se maceraron en mortero de cerámica y se tamizaron en colador plástico, como se observa en la Figura 2. La harina así preparada fue añadida al medio de cultivo antes de la esterilización del mismo a 15 libras de presión durante 15 minutos (adaptación del método utilizado por Hernández *et al.*, 2007). Finalmente se tomaron porciones de micelio (discos) utilizando el extremo superior de pipetas Pasteur estériles y colocadas en viales con agua destilada estéril para ser conservados a temperatura ambiente como cepario de largo plazo, según el método de Castellani (1963).



Figura 1. Botella con sustrato cubierto por micelio de *B. bassiana*.



Figura 2. Proceso de obtención de la harina de *P. americana*.

Virulencia y patogenicidad de *B. bassiana*, sobre adultos de *P. Americana*

Durante los primeros 2 días de ensayo posterior a la inoculación se observaron algunos cambios en el comportamiento de las cucarachas, caracterizado por el incremento del acicalamiento de antenas y patas.

Esta conducta fue referida por Roberts y Humber (1984); Fransen *et al.*, (1987), sugiriendo que el constante acicalamiento es una forma de remover las esporas de sus cuerpos y así protegerse de alguna manera contra la infección.

Sin embargo, según la distribución de la colonización del hongo observada en este bioensayo, se podría inferir que este incremento de acicalamiento puede contribuir a la distribución de la estructura del hongo hacia sus antenas, piezas bucales y patas.

Seguidamente se observó la disminución del consumo de alimento, conductas agresivas entre los insectos y canibalismo. El comportamiento descrito, se corresponde a las observaciones señaladas por Berlanga *et al.* (2016). En condiciones normales los insectos suelen ser voraces, por lo cual su desinterés por alimentarse es señal de este tipo de comportamiento, además de su irritabilidad y la dispersión o agregación inusual.

En las cucarachas muertas se evidenció desecación y rigidez. Estas observaciones coinciden con la investigación de Hernández *et al.* (2007). Con el sustrato enriquecido con harina de cucarachas, se obtuvo un promedio de conidias germinadas de 92%.

Varios autores señalan que el porcentaje de germinación a las 24 h debe ser superior al 85% (Vélez, 1997; Chacón, 2003), indicando que la cepa del hongo empleada se encuentra en óptimas condiciones para la realización del ensayo.

Al comparar la susceptibilidad de adultos de *P. americana* expuestos a diferentes concentraciones de una suspensión de *B. bassiana* durante 15 días, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), tal como se muestra en el Cuadro 4, sin embargo, al realizar la prueba de medias de mínima diferencia significativa (MDS), se encontró que el porcentaje de mortalidad en el T3 es significativamente mayor de la del testigo, pero no entre ellos, como se aprecia en el cuadro 5.

Cuadro 4. Análisis de Varianza de mortalidad acumulada.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadros	Media cuadrática	F	Probabilidad
<i>Tratamiento</i>	3	1,02687	0,34229	2,85	0,1053
<i>Error</i>	8	0,96223	0,12028		
<i>Total</i>	11	1,98910			

Valores transformados en $\arcseno(\sqrt{X})/100$.
Nivel de significancia del 5%.

Cuadro 5. Comparación de medias de mortalidad entre tratamientos de MDS.

Tratamientos (con/ml)	Media (%)	Desviación Estándar	Grupos homogéneos
$T_3 = 1 \times 10^8$	64,00	23,06	a
$T_2 = 1 \times 10^7$	39,66	46,71	ab
$T_1 = 1 \times 10^6$	13,33	11,54	ab
<i>Testigo</i>	6,33	6,50	b

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre medias a un nivel de significancia de $p=0,05$.

De manera tal que al incrementar la concentración del inóculo se observa un aumento en la mortalidad de los individuos, como se muestra en la Figura 3, alcanzando un 64% de mortalidad, por lo cual la cepa utilizada fue patogénica.

Sí consideramos que, la patogenicidad está determinada por diversos factores como la fisiología del hongo, del huésped y el ambiente (Callejas, 2018).

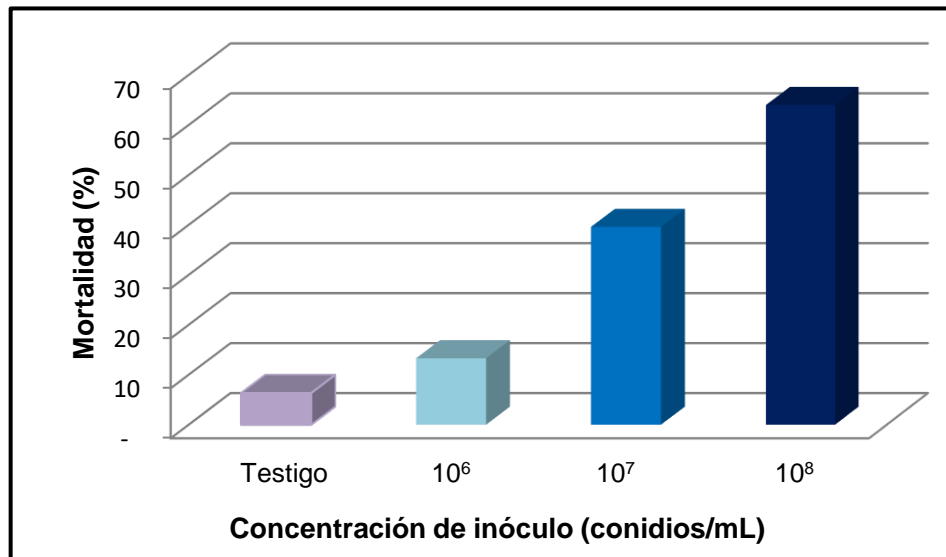


Figura 3. Distribución porcentual de la mortalidad acumulada de *P. americana* causada por *B. bassiana* a diferentes concentraciones.

Por consiguiente la infectividad varía con la composición genética de la cepa para la producción de toxinas fúngicas, obstrucción física de la circulación sanguínea, el agotamiento de nutrientes o por la variabilidad innata del hongo para invadir al insecto huésped (Callejas, 2018).

Estos resultados son comparables con los obtenidos por diversos autores como Pineda *et al.* (2002) mostraron que el hongo *B. bassiana* sobre *Rhodnius ecuadoriensis*, produjo una mortalidad del 50% de en 7 días; a una concentración de 3×10^8 con/ml. Hernández *et al.* (2007), observaron el 44% de mortalidad en adultos, mediante la aplicación tópica de una suspensión de conidios de 1×10^6 con/ml de *B. bassiana*.

Así mismo, Mudo *et al.* (2017) quienes experimentaron con *B. bassiana* inoculando 1×10^7 con/ml en adultos de *P. americana*, obtuvieron una mortalidad del 26% a los 9 días después del tratamiento.

Evaluaciones realizadas por Calleja (2018), confirman la susceptibilidad de *P. americana* expuestos a *B. bassiana* a una concentración de 1×10^8 con/ml, alcanzando el 50% de mortalidad.

Estos resultados permiten inferir que *B. bassiana* puede considerarse un buen elemento en el manejo integrado de plagas de importancia en la salud pública, como es el caso del vector de la enfermedad de Chagas y control de cucarachas.

La infección causada por el hongo, fue confirmada a partir del día 3, por la presencia de micelio y conidios creciendo sobre la cutícula de las cucarachas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Mohan *et al.* (1999); Hubner (2011) y Márquez (2009), quienes al tercer día de incubación de los cadáveres registraron la emergencia y distribución de micelio blanco algodonoso y estructuras típicas de *B. bassiana*.

El 70% de las cucarachas muertas desarrollaron esporulación parcial especialmente en antenas, patas y tórax. Cuando el hongo esporuló en los cadáveres de las cucarachas adquirieron un aspecto pulverulento como se observa en la Figura 4.



Figura 4. Adultos de *P. americana* con presencia de micelio de *B. bassiana* emergiendo y colonizando a la cucaracha.

El análisis probit se realizó para calcular el TL₅₀ del tratamiento T3, con un porcentaje de mortalidad superior al 50%. En el Cuadro 6 se aprecia los valores de mortalidad observada y mortalidad esperada, a los 15 días de la aplicación tópica en adultos de *P. americana*, por lo cual se observó que no existían diferencias significativas entre los valores de mortalidad observados y esperados para comparar la recta log₁₀ – Probit.

Cuadro 6: Unidades Probit y Porcentajes de Mortalidad acumulada, expresadas como mortalidad observada y mortalidad esperada a los 15 días de la aplicación tópica de *B. bassiana* (1x10⁸ con/mL) en adultos de *P. americana*.

Tratamiento	Tiempo (Días)	Mortalidad Acumulada (%)	Mortalidad Observada	Mortalidad Esperada
T3	1	0	0	3,36
	2	13,0	3,87	3,91
	3	19,7	4,16	4,22
	4	26,7	4,39	4,45
	5	35,0	4,61	4,63
	6	46,3	4,90	4,77
	7	48,7	4,97	4,89
	8	48,7	4,97	5,00
	9	50,7	5,03	5,09
	10	55,3	5,13	5,17
	11	57,7	5,20	5,25
	12	60,0	5,25	5,32
	13	64,0	5,36	5,38
	14	64,0	5,36	5,44
	15	64,0	5,36	5,49

n= 180 insectos, Ecuación de la recta $Y=3,35 + 1,81 X$.
 χ^2 (0,05 - 13 g.l.) = 12,95.

En la figura 5 se ilustra la tendencia de la mortalidad (unidades probit), en términos generales se puede apreciar que a mayor tiempo transcurrido se incrementa la mortalidad hasta el día 13 que se estabiliza, denotando inicialmente durante los primeros 5 días un crecimiento exponencial, a partir del día 8 cuando se obtiene el TL₅₀ y a pesar de seguir aumentando la mortalidad, el efecto es menor, en comparación a los valores obtenidos inicialmente. Esto puede estar vinculado a la respuesta inmunológica en una proporción de la población tratada, como reacción a la infección

causada por el hongo, así pues para una invasión exitosa requiere que las células fúngicas evadan o superen la respuesta inmune del huésped.

Se ha investigado sobre los mecanismos relacionados a la resistencia de este insecto ante agentes entomopatógenos fúngicos y su persistencia en el ambiente; Tal como lo refieren los autores Calleja (2018); Kong *et al.* (2016); Callewaert y Michiels (2010), quienes señalaron la importancia de la enzima antimicrobiana (lisozima) en la defensa de insectos, ya que tienen la capacidad genética para producirla de diferentes tipos dependiendo del microorganismo. El sistema inmunológico de tipo celular y humoral se activa significativamente ante la infección, siendo la expresión del gen de *lisozima* tipo I más alta en el intestino de la cucaracha hembra que en macho ante la presencia de *B. bassiana*. (Calleja, 2018).

Otra explicación a una menor infectividad del hongo entomopatógenos, podría ser la pérdida de viabilidad de las cepas a lo largo del tiempo (Hernández *et al.*, 2007).

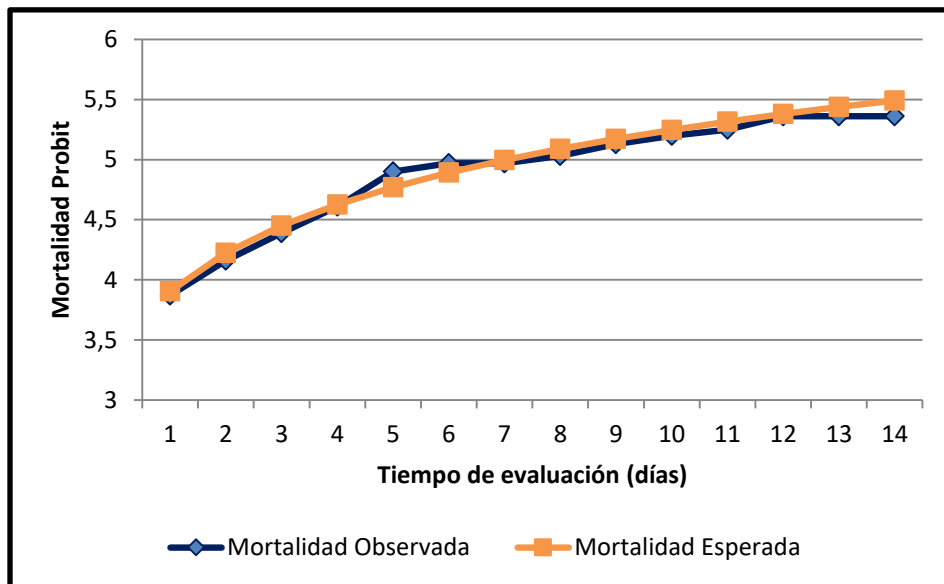


Figura 5. Tendencia de la respuesta del porcentaje de mortalidad acumulada en *P. americana*, expresada en unidades Probit a los 15 días de la aplicación tópica de 1×10^8 con/ml de *B. bassiana*.

El aislamiento de *B. bassiana* con el cual se trabajó, se consideró virulento al producir la muerte del 50% de los individuos en 8 días, como es de esperarse en el uso de los entomopatógenos para diferentes insectos.

En el bioensayo realizado por Merino (2017), se reporta la virulencia de *B. bassiana* a través de un TL₅₀ de 9 días para *H. hampei*, logrando un 50% de mortalidad a una concentración 1x10⁸ conidios/ml. Hernández (2013), trabajando con *B. germánica* y cepas de *B. bassiana*, a través inoculación tópica de 2x10⁵, señalan un TL₅₀ igual a 10 días. Igualmente, Márquez (2009) señala que a menor concentración de conidios de *B. bassiana*, el tiempo letal se incrementa.

Presencia de *B. bassiana* en adultos de *P. americana* muertos por exposición a este agente patógeno

Para constatar la mortalidad de las cucarachas debido al hongo, se colocó cada insecto muerto en cámara humedad y posteriormente con evidente colonización por un hongo de color blanco se tomaron trozos de antena y/o patas y se sembraron directamente sobre medio PDA para su caracterización macro y microscópica. Las características observadas fueron:

- Colonias: sobre el insecto, de color blanco a tonalidades amarillas, aspecto aterciopelado a pulverulento, compactas, cubriendo densamente el hospedante. Las colonias en el medio de PDA + 1% de harina de cucaracha, de blancas a tonalidades suaves de amarillo, reverso de pálido a amarillo intenso, como se observa en la Figura 6.
- Micelio: hifas septadas, hialinas, lisas de 0,7 - 5,3 μm de diámetro, emergiendo a través de la cutícula, articulación y aberturas naturales del insecto.
- Conidióforos: no diferenciados, abundantes, hialinos, lisos, de 1,2 – 2,6 μm de ancho, células conidiógenas apiñadas en racimos densos.
- Células conidiógenas: hialinas, lisas, unicelulares, fuertemente agrupadas en verticilos o solitarias, en forma de botellas, con bases globosas, de 1,8 – 5,4 μm de largo y 1 - 2,8 μm de ancho, con raquis en zigzag hasta 23,9 μm de largo por 1 μm de ancho.
- Conidios: llevados en dentículos, unicelulares, hialinos, globosos, subglobosos, elipsoidales, un extremo apiculado, de 1,4 – 3,0 μm de largo a 1,3 – 2,8 μm de ancho.

Todas las características de las estructuras de valor taxonómico evaluadas, coinciden con lo expuesto por Hoog (1972) y Samson *et al.* (1982), que identifican al hongo como *B. bassiana*, Figura 7. Por lo cual, se corrobora que el agente causal del 64% de mortalidad, corresponde al hongo entomopatógeno *B. bassiana*.

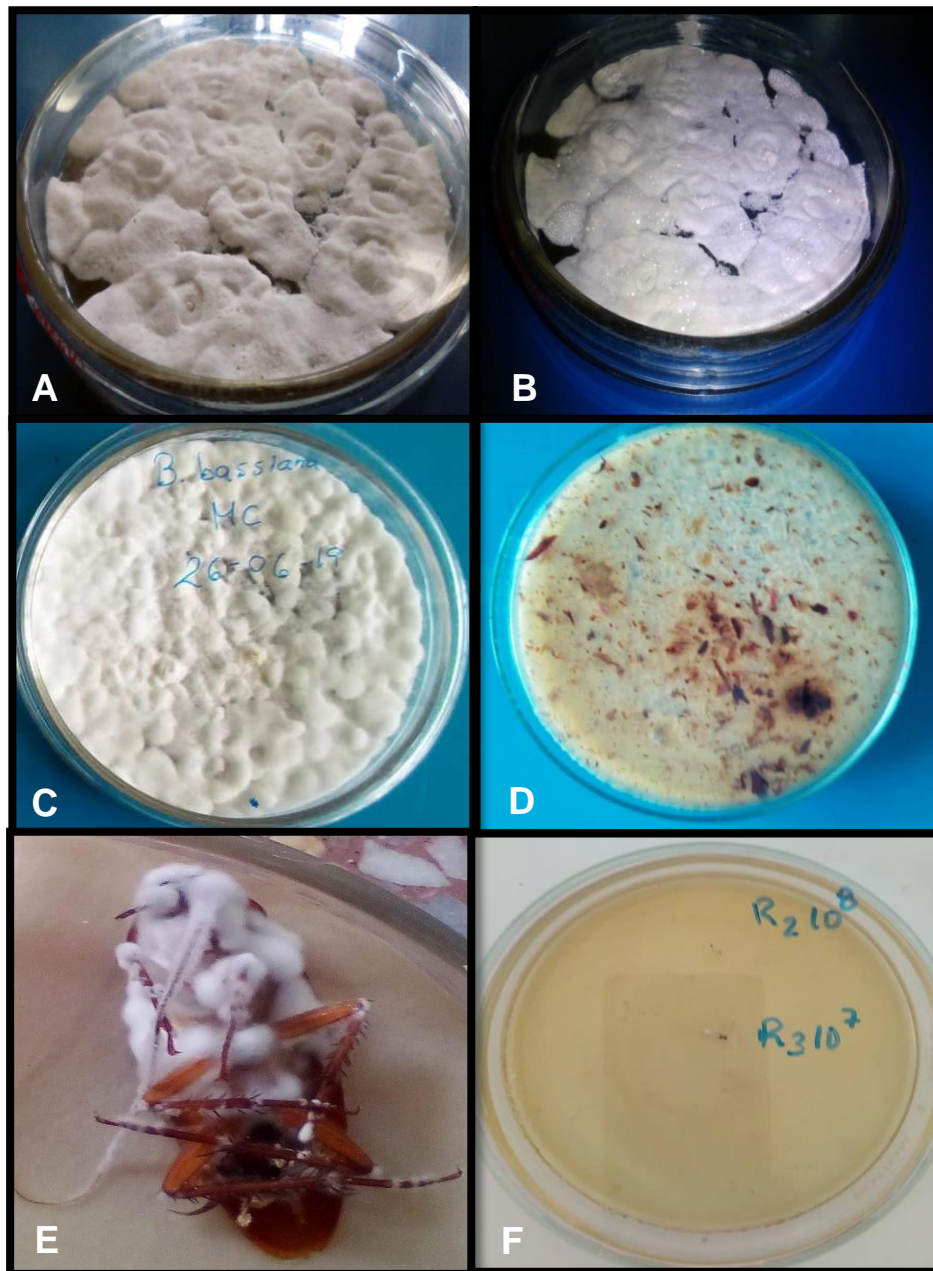


Figura 6. *Beauveria bassiana*. **A, B, C, D:** colonias de 10-15 días, observadas en el haz y envés de las placas de Petri. **E:** hongo cubriendo densamente al hospedante. **F:** estructuras de cucaracha sobre PDA.

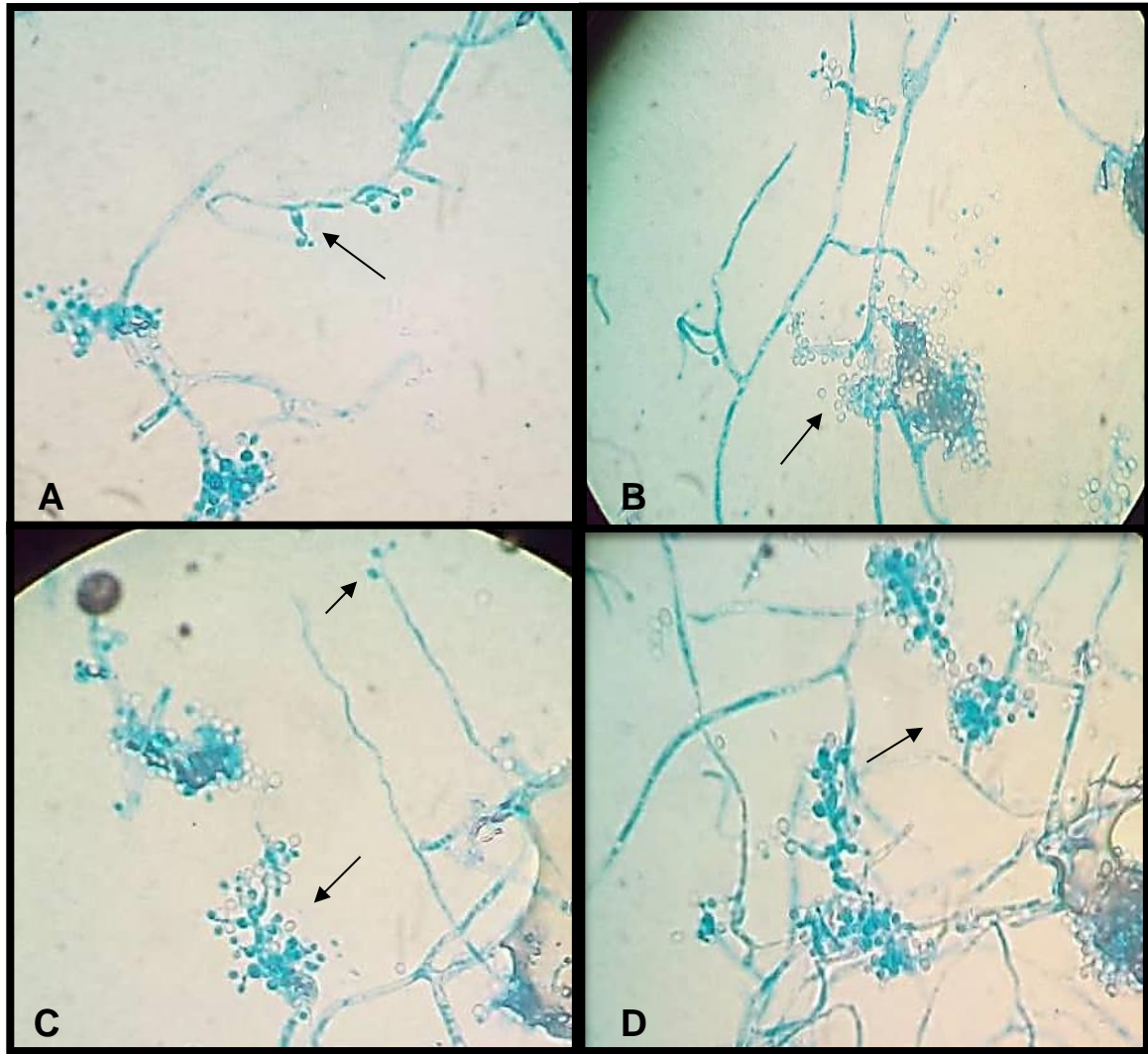


Figura 7. *Beauveria bassiana*. **A, B, C, D:** Células conidiogénicas con base globosa y raquis zig-zag. conidios globosos. Aumento: 400X.

CONCLUSIONES

1. Al enriquecer el medio PDA con 1 % de harina de cucaracha se obtuvo un promedio de conidias germinadas de 92%, facilitando la viabilidad en el crecimiento del hongo para su uso.
2. A pesar del comprobado desarrollo del hongo *B. bassiana* sobre el medio arroz como un método artesanal, el medio PDA ofreció mejores cualidades para el trabajo microbiológico y obtención de la concentración de inóculo adecuada.
3. La mayor mortalidad de adultos de *P. americana* durante los 15 días fue de 64%, con una concentración de 1×10^8 con/ml. Comprobándose la patogenicidad del hongo sobre el insecto.
4. Se estimó un TL_{50} de 8 días a una concentración de 1×10^8 con/mL de *B. bassiana*. Luego del día 15 no se produjeron muerte en los insectos.
5. Por medio de la mortalidad observada se comprobó la virulencia del hongo *B. bassiana* hacia adultos de *P. americana*.
6. El reislamiento de *B. bassiana* a partir de adultos de *P. americana* muertos, comprobó la colonización del hongo sobre este insecto plaga.

RECOMENDACIONES

1. Para efectos de próximos ensayos, la concentración de inóculo debe ser mayor a 1×10^8 con/ml, con el fin de evaluar una mayor efectividad del hongo.
2. Estandarizar la metodología para el enriquecimiento del medio nutritivo con el uso de harina de insectos, que mejoré el desarrollo y viabilidad del hongo.
3. Investigar sobre algún tipo de resistencia fisiológica de *P. americana* hacia las cepas de *B. bassiana*, en función al tiempo de exposición.
4. Evaluar la patogenicidad y virulencia de diferentes cepas de *B. bassiana* sobre adultos sexados y ninfas de *P. americana*.
5. Experimentar sobre la efectividad de cebos alimenticios formulados con esporas de *B. bassiana* contra *P. americana*.

REFERENCIAS

1. Atkinson; H. Thomas; G. Philip; R. Koehler; S. Patterson. 1991. Catalog and Atlas of the Cockroaches of North America North of Mexico. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America 78:1-85.
2. Alarcón, W.; G. Calvert; J. Blondell; L. Mehler; J. Sievert; M. Propeck; D. Tibbetts; A. Becker; M. Lackovic. S. Soileau; R. Das; J. Beckman; D. Male; C. Thomsen; M. Stanbury. 2005. Acute illnesses associated with pesticide exposure at schools. Journal of the American Medical Association 294(4):455-465.
3. Bell, W.; K. Adiyodi. 1981. Reproduction. In: The American Cockroach. Chapman & Hall, London. 343-370.
4. Berlanga, A.; M. Ayala; R. Montesinos; J. Rodríguez. 2016. Manual de Exploración para la Colecta de Hongos Entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. SENASICA. Tecoman, Colima, México 54 p.
5. Bonnefoy, X.; H. Kampen; K. Sweeney. 2008. Public Health Significance of Urban Copenhagen, Denmark. 569 p.
6. Boomsma, J.; A. Jensen; N. Meyling; J. Eilenberg. 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. Annu Rev Entomol 59: 467-485.
7. Butt, T.; C. Jackson; N. Magan. 2001. Fungal biological control agents: Progress, Problems and Potential CABI, Wallingford, Oxon.
8. Calleja, P. 2018. Efecto de *Beauveria bassiana* (bals.) Villemin sobre parámetros inmonológicos de la cucaracha *Periplaneta americana* L. Tesis de Maestría. México; Universidad Autónoma de Nueva León 47 p.
9. Callewaert, L.; C. Michiels. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. Journal of biosciences 35(1):127-160.
10. Cañedo, V.; T. Ames. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima-Perú. 62 p.
11. Castellani, A. 1963. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. Mycopathol et Mycol Appl. 20:1-6.
12. Chacón, H. 2003. Evaluación de la calidad de diferentes productos biológicos a base de *Trichoderma* spp., comercializados en Venezuela. Trabajo de Grado. Universidad Nacional Experimental del Táchira. San Cristóbal, Venezuela. 77 p.
13. Chirino, Y.; I. Rodríguez; J. García. 2010. Diagnóstico de la calidad de un biopreparado comercial del hongo *Trichoderma harzianum*. Fitopatol. Venez. 24:14-19.
14. Del Puerto. A.; S. Suárez; D. Palacio. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología 52(3):372-387.
15. Delgado, N.; S. Issa; J. Perozo. 2003. Situación de la Entomología en Venezuela: Entomología Urbana. Sociedad Venezolana de Entomología. Maracay, Venezuela. 28p. Congreso de
20. Feizhaddad, M.; H. Kassiri; H. Sepand; F. Ghasemi. 2012. Bacteriological Survey of American Cockroaches in Hospitals. Middle-East journal of scientific research 12(7):985-989.
21. Fransen, J.; K. Winkelman; J. Van. 1987. The differential mortality at various Life Stages of the Greenhouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:

- Aleyrodidae) by Infection with the Fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *J Inverteb Pathol* 50:158-165.
22. French, E.; T. Hebert. 1980. *Métodos de Investigación Fitopatológica*. Costa Rica, IICA. 289 pp.
 23. García, F.; J. Notario. J. Cabanás; R. Jordano; L. Medina. 2012. Incidencia de bacterias de interés para la salud pública transmitidas por las cucarachas en diferentes entornos relacionados con los alimentos. *J Med Entomol* 49(6):1481-1484.
 24. Goettel, M.; G. Inglis. 1997. *Fungi: Hyphomycetes. Manual of techniques in insect pathology* 5:213-248.
 25. Guerrero, L.; L. Cadena. 2016. Evaluación del control biológico de *Periplaneta americana* (Blattidae, Linnaeus) por ingestión del hongo *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae, Metchnikoff) y ácido bórico. Tesis de pregrado. Bogotá, Colombia, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 92p.
 26. Gutiérrez, A; J. García; R. Alzogaray; M. Urrutia; C. López. 2014. Susceptibility of different life stages of *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) and *Periplaneta fuliginosa* (Blattodea: Blattidae) to entomopathogenic fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3(12):614-621.
 27. Habes, D.; S. Morakchi; N. Arabi; Farine; N. Soltani. 2006. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol* 85(1):17-24.
 28. Hamilton, L.; C. Schal. 1990. Sublethal effects of chlorpyrifos-methyl on reproduction in female german cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 83(2): 441-443.
 29. Hernández, G. 2013. Cebos para el control de la cucaracha alemana *Blattella germanica* formulados con hongos entomopatógenos y ácido bórico. Tesis de Doctorado. Texcoco, México. Institución de Enseñanzas e Investigación en Ciencias Agrícolas. 90 p.
 30. Hernández, G.; F. Hernández; H. Sánchez; R. Alatorre. 2007. Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Entomotropica*. 22(1):27-36.
 31. Hoffmann, M.; A. Frodsham. 1993. The need, status, and potential for biological control. *En: Natural Enemies of Vegetable Insect Pests*. Cooperative extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63 p.
 32. Hoog, G. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology* 1: 1- 41.
 33. Hubner, R. 2011. Efeito de fungos entomopatogênicos em *Periplaneta americana*. Tesis de Maestría. Goiânia, Brasil, Universidad e Federal de Goiás. 41 p.
 34. Hubner, R.; R. Leles; J. Rodrigues; C. Luz. (2013). Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. *Parasitology International*, 62(6), 517-521.
 35. Jacobs, E. 2013. Cucarachas americanas *Periplaneta americana* (L). Notas entomológicas. Universidad de Pennsylvania.

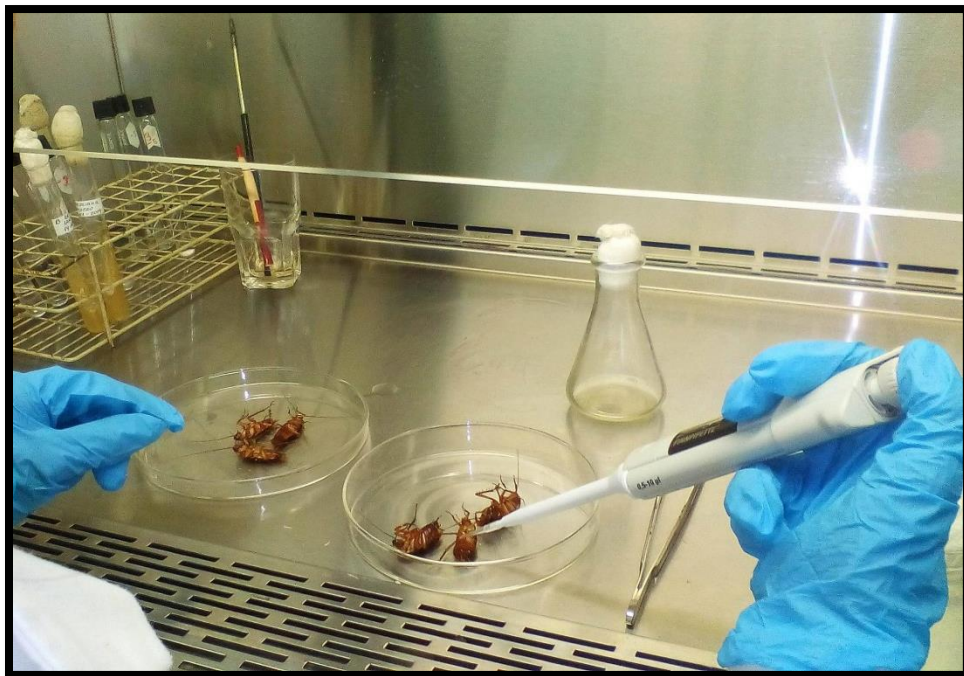
36. Jeanson, R.; J. Deneubourg. 2006. Path selection in cockroaches. *J. Exp. Biol* 209:4768-4775.
37. Kong, H.; M. Lv; N. Mao; C. Wang; Y. Cheng; L. Zhang; X. Jiang; L. Luo, 2016. Molecular characterization of a lysozyme gene and its altered expression profile in crowded beet webworm (*Loxostege sticticalis*). *PloS One*, 11(8).
38. Mahdavi, V.; M. Saber; H. Rafiee; A. Mehrvar. 2013. Susceptibility of the Hymenopteran parasitoid, *Habrobracon hebetor* (Say) (Braconidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* Sorokin. *J. J. Biol. Scien.* 6:17-20.
39. Mariño, E. 2011. Fosiles vivientes: Cucarachas. CONABIO. Biodiversitas. 97:6-9.
40. Márquez, E. 2009. Susceptibilidad de una población de *Spodoptera frugiperda* (Smith) a *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 63 p.
41. Merino, C. 2017. Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin sobre un insecto plaga. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Lima, peru.
42. Mohan, C.; K. Lakshmi; K. Devi. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the american cockroach (*Periplaneta americana*) Biocontrol. *Science and Technology* 9(1):29-33.
43. Moore, W.; T. Granovsky. 1983. Laboratory comparisons of sticky traps to detect and control five species of cockroaches (Orthoptera: Blattidae and Blatellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 76(4):845-849.
44. Mudoj, A.; P. Das; L. Hazarika. 2017. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (KR855715) against *Periplaneta americana* (L.). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(4)1516-1519.
45. Nasirian, H. 2010. An overview of german cockroach, *Blattella germanica*, studies conducted in Iran. *Pakistan Journal of Biological Science.* 1077-1084.
46. Ortiz, A.; L. Riveiro; C. Santiago; E. Quesada. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105:270-278.
47. Pineda, F.; Y. Saldarriaga; C. Gomez. 2002. Susceptibilidad de *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae) de IV estadio de desarrollo a la acción de *Beauveria bassiana*. *Revista Colombiana de Entomología* 28(1):9-12.
48. Ponce, G; P. Cantú; A. Flores; M. Badii; A. Barragán; R. Zapata; I. Fernández. 2005. Cucarachas: Biología e importancia en salud pública. *Rev. Salud pública nutr.* 6(3):1-11.
53. Roberts, D.; R. Humber. 1984. Entomopatogenic Fungi. The Rokefeller Foundation N. Y., USA 1-12.
54. Romero, D.; C. Martínez; L. Montero; B. Baro; H. Torres; L. Sandalio. 2012. Efectividad de una formulación con ácido bórico como ingrediente activo para el control de blátidos (*Blattella germánica* y *Periplaneta americana*). *Rev. Elec. Vet.* 13(5):1-30.
55. Ruiz, X.; J. Hernández. B. Díaz; C. Dávila. 2015. Enterobacteriáceas en partes externas del estadio adulto de *Periplaneta americana* "cucaracha" capturadas en el mercado Modelo, Iquitos, Perú *Ciencia amazónica (Iquitos)* 5(1):35-41.

56. Salehzadeh, A.; P. Tavacol; H. Mahjub. 2007. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. *J Vector Borne Dis.* 44(2):105-110.
57. Samson, R.; H. Evans. 1982. Two new *Beauveria* spp. From South America. *J. Invert. Pathol.* 39:93-97.
58. Santander, A.; Santander, G. 2006. Susceptibilidad de una población de *Anastrepha obliqua* (Macquart) a *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Lamofrú. 127 p.
59. Saume, F. 1992. Introducción a la química y toxicología de insecticidas. Industria Gráfica Integral C.A. 212 p.
60. Scriven, R.; C. Meloan. 1984. (E, Z)-2, 6-Nonadien-1-al and (E)-2-nonen-1-al present in crushed cucumbers are natural repellents for the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Ohio J Sci* 84(3):82-85.
64. Stange, L. 1978. *Evania appendigaster* (L.) (Hymenoptera:Evaniidae), a cockroach egg parasitoid. Fla. Dept. Agric. Consum. Serv. Div. Entomol. Circ. 131: 1-2.
65. Sung, G.; N. Hywel; J. Sung; J. Luangsa; B. Shrestha; J. Spatafora. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. In Mycol.* 57: 5-59.
67. Tejera, E. 1926. Las cucarachas como agentes de diseminación de agentes patógenos. *Rev Soc Argent Biol* 2(4):243-256.
68. Torres B., A. 2011. Efectividad de la tierra de diatomeas en el control de tres plagas de almacén. Trabajo de grado Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. 52p.
69. Torres, P. 2015. Orden Blattodea. *Revista IDE@ SEA* (48):1–13.
70. Valero, C. 2016. A multidisciplinary approach to study virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* towards malaria mosquitoes. PhD thesis, Nederland, Wageningen University. 133 p.
71. Vélez, P.; F. Posada; P. Marín; M. González; E. Osorio; A. Bustillo. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No 17. CENICAFE. Chinchina-Caldas. Colombia. 37 p.
72. Vianna, E.; M. Berne; P. Ribeiro. 2001. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattidae). *Rev Bras Agroci* 7: 111-115.
73. Yeh, C. 1995. Oviposition concealment behavior of *Periplaneta americana* L. and its application on oothecal trap in the laboratoy. *Chin J Entomol* 15: 153-161.
74. Zambrano, C.; R. Garcia. 2003. Manejo integrado de plagas en frutales tropicales. INIA. 334 p.
75. Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Tech.* 17: 553-596.

ANEXO



Anexo 1. Jaulas de crías de ejemplares de *Periplaneta americana*.



Anexo 2. Inoculación de Tópica de 10 μ l de diferentes concentraciones de *B. bassiana*, mediante una micropipeta semiautomática.