

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

**CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR**

**Compatibilidad de hongos entomopatógenos e insecticidas
piretroides para el control de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)**

TESIS

Requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD
CON AREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES
TRANSMITIDAS POR VECTOR**

PRESENTADO POR:

Luis Alberto Cisneros Vázquez

DIRECTORA:

Dra. María Guadalupe Vázquez Martínez

ASESORES:

**Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro
Dr. Americo David Rodríguez Ramírez**

TAPACHULA, CHIAPAS.

FEBRERO 2014.

Agradecimientos

Agradezco y dedico esta tesis a mi Mamá por ayudarme a cumplir otro de mis sueños y a mis hermanos por darme su apoyo y hacerme más ameno cada día.

Agradezco a la Dra. María Guadalupe Vázquez Martínez por permitirme participar en este proyecto, por su apoyo y dirección de la tesis.

A CONACYT por brindarme apoyo (beca) para poder cursar la Maestría en Ciencias de la Salud.

A los Fondos Sectoriales Salud-CONACYT, proyecto No. 182722 por el apoyo recibido a través de la beca con No. Registro S008-12-01-182722-02-047.

Al INSP por permitirme ingresar a la maestría y al CRISP por ser mi segunda casa durante estos 2 años.

A los Doctores Patricia Penilla, José Luis Torres y Américo Rodríguez por sus atinadas aportaciones en el desarrollo y revisión de tesis.

A mis compañeros de maestría por el apoyo y amistad durante estos 2 años.

A los químicos Olga Ruth Gálvez Coutiño, Alma Delia López Solís, Francisco Solís Santoyo y Gabriel Fuentes Maldonado por su apoyo y guía en las actividades de laboratorio.

A los profesores de la maestría por formarme y por todos sus conocimientos aportados.

A Oscar, Delfino, Sleidher, Arturo y Elizabeth por todos los momentos recreativos y de pláticas des-estresantes.

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen----- | 4 |
| Introducción----- | 5 |
| Materiales y métodos ----- | 7 |
| Hongos entomopatógenos----- | 7 |
| Insecticidas----- | 7 |
| Ensayos de compatibilidad entre hongos e insecticidas----- | 8 |
| Efecto de insecticidas sobre la germinación conidial----- | 8 |
| Efecto de insecticidas sobre la esporulación de hongos----- | 8 |
| Efecto de insecticidas sobre crecimiento vegetativo----- | 9 |
| Compatibilidad----- | 9 |
| Análisis estadístico----- | 10 |
| Resultados----- | 10 |
| Concentraciones letales de Aqua Reslin® Super y Anvil® para las cepas susceptibles y resistentes de <i>Aedes aegypti</i> ----- | 10 |
| Efectos de Aqua Reslin® Super y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación conidial de <i>M. anisopliae</i> ----- | 11 |
| Efectos de Aqua Reslin® Super y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación conidial de <i>G. virens</i> ----- | 13 |
| Efectos de Aqua Reslin® Super y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación conidial de <i>T. longibrachiatum</i> ----- | 14 |
| Compatibilidad de los insecticidas Aqua Reslin® Super y Anvil® con los hongos entomopatógenos----- | 15 |
| Discusión----- | 16 |
| Referencias----- | 20 |
| Tablas y figuras----- | 27 |

Resumen

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

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

Introducción

El dengue, una de las principales enfermedades transmitidas por vector en el mundo, es causada por un virus de la familia Flaviviridae y transmitida principalmente por la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti* Linneo (Díptera:Culidae) (Black *et al.*, 2002; Gubler, 2011). El dengue en México es un problema de salud pública que va en aumento. En el año 2012 se reportaron 50,368 casos mientras que en 2013 los casos aumentaron a 62,330. El estado de Chiapas ocupó el sexto lugar con 3,250 casos de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue (SINAVE, 2013).

Hasta el momento no se cuenta con una vacuna ni tratamiento específico que proteja al humano, la más avanzada es la vacuna quimérica que se encuentra en desarrollo (Guy *et al.*, 2010). Recientemente se descubrió el quinto serotipo de dengue (Science AAAS, 2013) lo cual complica la efectividad de las vacunas desarrolladas ya que éstas solo protegen parcialmente para cuatro serotipos, debido a ello la principal estrategia para reducir la transmisión de esta arbovirosis es el control del mosquito vector (OMS & TDR, 2009) mediante la eliminación de criaderos y el uso de insecticidas químicos (NOM-032-SSA2-2010, 2010).

El desarrollo de resistencia a insecticidas por parte de los mosquitos (Biber *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009), ha conducido a la búsqueda de métodos alternativos como el control biológico mediante el uso de agentes entomopatógenos, que además de eliminar a los mosquitos, minimiza los problemas de contaminación ambiental y desarrollo de resistencia (Tamez *et al.*, 2001).

De los agentes entomopatógenos, los hongos tienen algunas ventajas respecto a otros agentes de control biológico y químico, como por ejemplo: para su producción se utilizan sustratos económicos como arroz, desechos orgánicos como cáscaras de cacahuete (Rosas-Acevedo *et al.*, 2008; Agamez *et al.*, 2008); tienen mayor persistencia en el ambiente al convertir al insecto muerto en una nueva fuente de inóculo (Lecuona *et al.*, 1997); son diseminados por los mosquitos mediante la cópula dentro de la población de dípteros (Scholte *et al.*, 2004), son específicos y que no dañan organismos no blanco (Tanada &

Kaya, 1993; Alves, 1998) y no necesitan ser ingeridos por el insecto para promover su capacidad infectiva (Carruthers & Hural, 1990).

Se ha reportado que los hongos *Metarhizium anisopliae* (Silva *et al.*, 2004), *Leptolegnia chapmanii* (Pelliza *et al.*, 2007), *Beauveria bassiana* (Miranpuri & Khachatourians, 2001) y *Aspergillus clavatus* (Seye *et al.*, 2009) provocaron mortalidades significativamente altas en larvas de *Ae. aegypti*, mientras que *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Scholte *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2008), *Paecilomyces carneus*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium* y *L. psalliotae* (Leles *et al.*, 2010) mostraron su capacidad infectiva sobre el estado adulto, así como *P. carneus*, *I. fumosorosea*, *M. anisopliae*, *B. bassiana*, entre otros, provocaron infección en huevos de *Ae. aegypti* (Luz *et al.*, 2007).

La eficiencia de los hongos entomopatógenos es bien conocida, pero se recomienda el uso de cepas nativas para evitar un desequilibrio ecológico, además que una cepa foránea requiere adaptarse al medio y en ese proceso puede perder su capacidad infectiva (Castillo, 2006). En el sureste de México se realizó el aislamiento de cepas nativas de hongos asociadas a insectos vectores de enfermedades (Vázquez-Martínez *et al.*, 2008), de estas cepas *Trichoderma longibrachiatum*, *M. anisopliae* y *Gliocladium virens* demostraron ser infectivas en mosquitos *Ae. aegypti* en bioensayos de laboratorio (Cisneros-Vázquez, 2010).

Por otro lado, se ha demostrado en el área agrícola que la combinación de concentraciones sub-letales de insecticidas con hongos entomopatógenos aumenta la eficiencia del hongo para el control de insectos plagas (Santos *et al.*, 2007). Además, *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron compatibles con insecticidas piretroides (Cazorla & Morales-Moreno, 2010; Schumacher & Poehling, 2011).

Ante el incremento de la resistencia a insecticidas por parte de los mosquitos, se está valorando el uso de combinaciones de insecticidas y hongos entomopatógenos para reducir las cantidades que se usan de insecticidas, disminuir la probabilidad de aparición de resistencia y mejorar las estrategias de control, incluso de los mosquitos resistentes (Moino & Alves, 1998; Quintela & MaCoy, 1998). Adicionalmente, cualquier estrategia que preserve o revierta a un estado de susceptibilidad a piretroides a las poblaciones resistentes

de *Ae. aegypti*, es de suma importancia ya que al ser los piretroides los insecticidas sintéticos más seguros para la salud humana y ambiental, seguirían siendo una buena alternativa en brotes epidémicos de grandes proporciones. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la compatibilidad entre piretroides sintéticos y hongos entomopatógenos.

Materiales y métodos

Hongos entomopatógenos

Se evaluaron tres hongos entomopatógenos: dos cepas nativas de Chiapas *Gliocladium virens* y *T. longibrachiatum* y una cepa foránea *M. anisopliae* donada por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Todas las cepas fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de Patógenos y Vectores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP). Los hongos se crecieron en el medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (SDA, BectonDickinson®) a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% HR con fotoperiodo de 12:12h L:O. Para los experimentos se prepararon suspensiones de conidias en tween 80 al 0.01%, de 1×10^6 conidias mL^{-1} y con viabilidad mayor a 90%.

Insecticidas

Se utilizaron los insecticidas comerciales conteniendo piretroides sinergizados con butóxido de piperonilo Aqua Reslin® Super (Bayer CropScience AG) y Anvil® Unomex 2+2 ULV (Public Health Supply and Equipment de México S.A. de C.V.). La formulación Aqua Reslin® Super (ARS) contiene como ingrediente activo Permetrina (10.87%), Esbioaletrina (0.15%) y el sinergista butóxido de piperonilo (11%), mientras que la formulación Anvil® el ingrediente activo es d-fenotrina (2%) y butóxido de piperonilo,

Se eligieron las formulaciones ARS y Anvil debido a que son insecticidas recomendados para el control de vectores, ARS está recomendado por la OMS (WHO, 2012) para el control de vectores en el mundo y Anvil está recomendado por CENAPRECE para el combate de vectores en México (CENAPRECE, 2014).

Con el propósito de elegir las concentraciones a utilizar de los insecticidas en los bioensayos de compatibilidad con hongos entomopatógenos, se realizaron pruebas de

susceptibilidad de mosquitos *Ae. aegypti* susceptibles (cepa Nueva Orleans) y resistentes a insecticidas piretroides (Cepa Progreso), se siguió la metodología propuesta por la OMS (WHO,1998). Las cepas de mosquitos fueron proporcionadas por el insectario del laboratorio de insecticidas del CRISP. Se realizaron líneas base de los formulados ARS y Anvil para determinar las CL₁₅, CL₂₅ y CL₅₀ en las cepas susceptible y resistente a piretroides a utilizarse en las pruebas de compatibilidad. Con los datos de mortalidad, se calcularon las concentraciones letales utilizando el programa EPA (Probit Analysis Program, versión 1.5) y SPSS 15.0.

Ensayos de compatibilidad entre hongos e insecticidas

Para lo bioensayos de compatibilidad se utilizaron las dos marcas de insecticidas ARS y Anvil en tres diferentes concentraciones: 1.5, 2 y 2.5%, de acuerdo a los resultados del análisis probit. Se prepararon placas de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) adicionadas con las concentraciones a evaluar de los insecticidas, para el control se usaron placas de SDA sin insecticida.

Efecto de insecticidas sobre la germinación conidial

Para determinar la germinación conidial se sembraron cinco alícuotas de 5µl de la suspensión de conidias de los hongos *M. anisopliae*, *T. longibrachiatum* y *G. virens* en cinco puntos de placas Petri, las cuales contenían medio SDA con los respectivos tratamientos para cada hongo de forma individual. Las placas se incubaron a 27±2°C hasta el momento de la germinación conidial. La germinación conidial se determinó por el método de Cañedo & Ames (2004).

Efecto de insecticidas sobre la esporulación de hongos

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

esporulación de hongos (concentración de conidias) se determinó mediante conteos en una cámara de Neübauer.

Efecto de insecticidas sobre crecimiento vegetativo

A partir de placas esporuladas sin insecticidas, se tomaron discos de 1 cm de diámetro y se colocaron en el centro de placas Petri con los diferentes tratamientos. Las placas se incubaron en una cámara ambiental a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% HR con fotoperiodo de 12:12h L:O. Se midió el diámetro del desarrollo del cultivo a los 14 y 30 días después de la inoculación. Se realizaron tres mediciones con un Vernier y se obtuvo el promedio. El efecto de los insecticidas sobre el crecimiento vegetativo se expresó como el porcentaje de inhibición del desarrollo de los hongos (Hokkanen & Kotiluoto, 1992) y se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$X = (Y-Z/Y) \times 100$$

Dónde:

X, porcentaje de inhibición del desarrollo

Y, crecimiento radial del hongo en el control no tratado

Z, crecimiento radial del hongo en el medio con insecticida

Compatibilidad

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

$$\text{IB} = [47 \times (\text{CV}) + 43 (\text{ESP}) + 10 (\text{GER})] / 100$$

Dónde:

IB: Valor corregido para la clasificación del producto

CV: Porcentaje de crecimiento vegetativo con relación al testigo

ESP: Porcentaje de esporulación respecto al testigo

GER: Germinación

El resultado de índice biológico (IB) se categorizó y de acuerdo al rango donde se ubique el IB se determinó si el insecticida y el hongo son compatibles.

IB=>66 compatible

IB= 42-66 moderadamente tóxico

IB= <42 tóxico

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para ver el efecto de las concentraciones de ARS y Anvil sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación (viabilidad) de cada hongo. Para elegir las mejores combinaciones (compatibles) se tomaron los resultados de los índices biológicos y se acomodaron en un diseño de bloques completamente al azar.

Se realizó un análisis de varianza para los resultados de crecimiento vegetativo y esporulación de *M. anisopliae* afectados por el insecticida Anvil; también para la esporulación de *G. virens* expuesto a ARS y Anvil y, por último se realizó un ANOVA a los datos de esporulación de *T. longibrachiatum* expuesto a ARS. Para el resto de los bioensayos se realizó el test no paramétrico Kruskal Wallis. Los datos de esporulación se transformaron mediante la transformación logarítmica (log X) debido a su gran variación (Escuela profesional de Ingeniería Agronómica, 2009).

Resultados

Concentraciones letales de Aqua Reslin® Super y Anvil® para las cepas susceptibles y resistentes de *Aedes aegypti*.

El análisis Probit estimó que las concentraciones letales del insecticida ARS para mosquitos susceptibles de *Ae. aegypti* (cepa Nueva Orleans) fueron CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₅ de 1.44 1.26 y 1.175%, respectivamente (Tabla 1), mientras que para Anvil la CL₅₀ fue de 1.48%, CL₂₅ de 1.27% y la CL₁₅ de 1.17% (Tabla 1).

Las concentraciones CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₅ de ARS para mosquitos resistentes a piretroides (cepa Progreso) fueron 36.529, 30.286 y 27.388%, respectivamente (Tabla 1). Se realizaron pruebas preliminares con estas dosis y no creció ninguno de los tres hongos; mientras que para Anvil no se determinaron las concentraciones letales debido a que a una concentración del 60% (superiores a las concentraciones de ARS utilizadas en las pruebas preliminares) del insecticida apenas se obtuvo el 5% de mortalidad en los mosquitos.

En base a que los valores obtenidos para las concentraciones letales con la cepa resistente fueron muy elevadas, en las pruebas de compatibilidad se utilizaron las CL₅₀ de los insecticidas ARS y Anvil para la cepa susceptible (cepa Nueva Orleans), y a partir de ésta se elevó 0.5 y 1%, debido a que la concentración recomendada para ARS es 0.5% mayor a la CL₅₀, y para uniformizar criterios en las concentraciones, se dejaron estas mismas concentraciones para el insecticida Anvil, quedando las concentraciones de 1.5, 2 y 2.5% para ARS y Anvil.

Efectos de Aqua Reslin® Super y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación conidial de *M. anisopliae*.

Crecimiento vegetativo de *M. anisopliae*. Las tres concentraciones del insecticida ARS redujeron del 2.86 al 12.74% del crecimiento vegetativo de *M. anisopliae* a los 14 días de exposición, mientras que los tratamientos con el insecticida Anvil causaron disminuciones del 33.44 al 42.73% (Tabla 2). El análisis de resultados para ARS mostró que hubieron diferencias significativas entre los tratamientos ($H=11.49$, $P=0.0085$), obteniendo que la concentración de 1.5% de ARS fue la menos agresiva para el crecimiento vegetativo de *M. anisopliae* ya que no tuvo diferencias significativas con el control ($P>0.05$). El análisis también muestra un grupo formado por las concentraciones 1.5, 2 y 2.5% (Tabla 2). Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en el bioensayo con el insecticida Anvil ($F=23.361$, $gl=3$, $P=.000$); al contrastar los tratamientos se formaron tres grupos, el primero formado por el control, el segundo constituido por las concentraciones 1.5 y 2% de ARS ($P=0.272$), por último el tercer grupo formado por las concentraciones 2 y 2.5% ($P=0.119$) (Tabla 2). A los 30 días, el porcentaje de reducción causado por ARS fue menor al causado a los 14 días, la concentración de 1.5 no causó reducción, la concentración de 2% redujo el 4.23% y la concentración de 2.5 redujo el 2.69

y no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P>0.05$). Las concentraciones 1.5 y 2% del insecticida Anvil causaron reducción del crecimiento vegetativo del 13.31 y 28.96%, respectivamente, estos porcentajes son menores a los causados por estas mismas concentraciones a los 14 días, mientras que la concentración de 2.5% aumentó el porcentaje de reducción a un 43.84% (1.11% más que la causada por esta misma concentración a los 14 días), los tratamientos mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) y se formaron dos grupos, el primero integrado por el control y las concentraciones 1.5 y 2 ($P>0.05$), mientras que el segundo fue compuesto por las concentraciones 2 y 2.5% ($P>0.05$).

Esporulación de *M. anisopliae*. La esporulación de *M. anisopliae* fue incrementada del 0.4 al 1.35% por las concentraciones 2 y 1.5 %, respectivamente del insecticida ARS, mientras que la concentración 2.5% la redujo 0.85%; el análisis demostró que todos los tratamientos incluyendo al control no tuvieron diferencias significativas entre sí ($H=1.23$, $P=.7450$) (Tabla 2). El insecticida Anvil ocasionó reducciones en la esporulación de *M. anisopliae* que fueron desde el 99.62 al 99.82%, se encontró que las concentraciones y el control presentaban diferencias significativas ($F=910.371$, $gl=3$ $P=.000$), al realizar las comparaciones entre tratamientos se encontraron tres grupos, uno conformado por el control; el segundo grupo fue establecido por la concentración 1.5%; el tercer grupo conformado por las concentraciones 2 y 2.5% ($P=0.247$) (Tabla 2).

Germinación conidial de *M. anisopliae*. Los tratamientos 1.5 y 2% de ARS no redujeron la viabilidad de *M. anisopliae*, mientras que la concentración de 2.5% la redujo 4.75%, con diferencias significativas entre los tratamientos ($H=8.47$, $P=0.0021$). Se formaron dos grupos, uno integrado por el control y las concentraciones 1.5 y 2% que no presentaron diferencias estadísticas entre ellos ($P>0.05$) y otro grupo con la concentración 2.5% (Tabla 2). Por otro lado, el insecticida Anvil a las concentraciones de 1.5 y 2% no causó ningún efecto sobre la viabilidad de *M. anisopliae*, en contraste la concentración 2.5 la redujo 8.25%, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($H=8.47$, $P=0.22$). Al comparar los tratamientos se establecieron dos grupos; el primero conformado por el control, y las concentraciones de 1.5 y 2%, las cuales no tuvieron diferencias significativas ($P>0.05$), y el segundo conformado únicamente con la concentración 2.5% (Tabla 2).

Efectos de Aqua Reslin® Super y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación conidial de *G. virens*.

Crecimiento vegetativo de *G. virens*. El crecimiento vegetativo de *G. virens* a los 14 días no fue afectado por las tres concentraciones de ARS, las cuales se mantuvieron en 0% de reducción, no se encontró diferencias significativas entre tratamientos ($P=1.000$). Por otro lado las concentraciones del insecticida Anvil tampoco causaron reducción y mantuvieron el mismo comportamiento que las concentraciones de ARS sobre el crecimiento vegetativo de *G. virens* (Tabla 3). El crecimiento del hongo a los 14 días cubrió toda la placa (5.2 cm), por lo que a los 30 días no hubo reducción en el crecimiento vegetativo.

Esporulación de *G. virens*. La concentración 1.5, 2 y 2.5% redujeron la esporulación de *G. virens* en 14.93, 27.76 y 40.96% respectivamente, hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos ($F=7.374$, $gl=3$, $P=0.005$) y al comparar los tratamientos se formaron tres grupos, uno conformado por el control y 1.5% de ARS los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($P=0.105$), un segundo grupo compuesto por la concentración de 1.5 y 2% ($P=.213$) y el último grupo con las concentraciones de 2 y 2.5% ($P=0.175$) (Tabla 3). En contraste las reducciones causadas por las concentraciones de Anvil fueron de 98.32 a 98.55%, presentando diferencias significativas entre los tratamientos ($F=4985.239$, $gl=3$, $P=.000$), y se formaron tres grupos, el primero integrado únicamente por el control, el segundo establecido por la concentración de 1.5% y el tercer grupo por las concentraciones de 2 y 2.5% ($P=2.38$) (Tabla 3).

Germinación conidial de *G. virens*. La viabilidad de *G. virens* no fue afectada por la concentración de 1.5 de ARS, pero sí fue afectada por las concentraciones de 2 y 2.5%, en donde ambas causaron una reducción del 3%. Los tratamientos exhibieron diferencias significativas ($H=8.65$, $P=0.0141$) y se crearon dos grupos, un grupo conformado por el control y la concentración de 1.5% ($P>0.05$), el otro grupo por las concentraciones 2 y 2.5% ($P>0.05$) (Tabla 3). Por otro lado, las concentraciones 1.5 y 2% de Anvil no causaron efectos negativos en la viabilidad de *G. virens*, mientras que la concentración de 2.5% redujo 1.5% la viabilidad de *G. virens*. El análisis encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($H=4.76$, $P=0.0165$) pero no se pudo realizar la prueba de la mediana (comparación entre grupos) (Tabla 3).

Efectos de Aqua Reslin® Super y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación conidial de *T. longibrachiatum*.

Crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum*. El crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum* a los 14 días no fue afectado por la concentración de 1.5% de ARS, mientras que las concentraciones 2 y 2.5% sí la redujeron 0.48% cada una, el análisis demostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($H=2.82$, $P=0.1794$) (Tabla 4). Por otro lado, el insecticida Anvil afectó al crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum*, con una reducción menor de 5.61% causada por la concentración 1.5 y la mayor reducción fue de 43.59% causada por la concentración de 2.5. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($H=10.90$, $P=0.0093$) y se formaron dos grupos el primero compuesto por el control, 1.5 y 2% ($P>0.05$) y el segundo creado por las concentraciones 2 y 2.5% ($P>0.05$) (Tabla 4). Por otro lado, *T. longibrachiatum* bajo el efecto de ARS a los 30 días disminuyó su porcentaje de reducción del 0.48 al 0.19 en la concentración 1.5 y del 0.48 al 0% en la concentración 2.5, en lo que respecta a la concentración 1.5% el porcentaje de reducción se mantuvo en 0% igual que a los 14 días, los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas ($P>0.05$). El efecto del insecticida Anvil sobre el crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum* permaneció igual a los 14 y 30 días.

Esporulación de *T. longibrachiatum*. La esporulación de *T. longibrachiatum* se vio afectada por la acción del insecticida ARS, dentro del cual la concentración 1.5 causó una reducción de 18.91%, la concentración 2% ocasionó una reducción de 44.34% y por último la concentración de 2.5 redujo el 52.54% la esporulación. Se encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($F=8.171$, $gl=3$, $P=0.003$) y se formaron tres grupos, el primero integrado por el control y la concentración 1.5% ($P=0.094$), el segundo grupo establecido por las concentraciones 1.5 y 2% ($P=0.83$) y el tercer grupo por las concentraciones 2 y 2.5% ($P=0.435$) (Tabla 4). Por otra parte, el insecticida Anvil redujo desde el 99.84% hasta el 99.89% la esporulación de *T. longibrachiatum*, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos ($H=8.62$, $P=0.0283$) y al compararlos se crearon dos grupos, el primero formado por las concentraciones 1.5, 2 y 2.5% ($P>0.05$) y el otro constituido únicamente por el control (Tabla 4).

Germinación conidial de *T. longibrachiatum*. La concentración de 1.5% del insecticida ARS no afectó la viabilidad de *T. longibrachiatum*, mientras que la concentración 2% redujo el 22.5% y la concentración 2.5% la redujo 45.91%. Se encontraron diferencias significativas en los efectos de los tratamientos sobre la viabilidad ($H=9.89$, $P=0.0072$) y se agruparon en dos conjuntos, el primero formado por el control y las concentraciones 1.5 y 2% ($P>0.05$) y el segundo establecido por las concentraciones 2 y 2.5% ($P>0.05$) (Tabla 4). Por otro lado, el insecticida Anvil afectó de manera diferente la viabilidad de *T. longibrachiatum*, la concentración 1.5 redujo la viabilidad 5.88%, mientras que la concentración de 2% la redujo 6.21% y por último la concentración 2.5 la redujo 8.29%, pero estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($H=7.08$, $P=0.0585$) (Tabla 4).

Compatibilidad de los insecticidas Aqua Reslin® Super y Anvil® con los hongos entomopatógenos.

De acuerdo a la clasificación de compatibilidad calculada mediante el índice biológico propuesto por Alves y colaboradores (2007) las tres concentraciones del insecticida ARS fueron compatibles con *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum* (Tabla 5). En contraste, la clasificación de las concentraciones usadas del insecticida Anvil fueron de moderadamente tóxicas a tóxicas para los tres hongos entomopatógenos (Tabla 5). Se utilizó el crecimiento vegetativo medido a los 14 y 30 días para calcular el índice biológico, y en ambos se obtuvo la misma clasificación tóxica, debido a esto solo se presentan los resultados a los 14 días.

Al comparar los índices biológicos de ARS se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F=11.58$, $gl=3$, $P=0.0217$) y se encontró que la concentración de 1.5% mostró diferencias estadísticamente significativas con las concentraciones 2 y 2.5% (Figura 1). Por otro lado, también hubieron diferencias significativas en los índices biológicos entre los hongos entomopatógenos ($F=13.80$, $gl=3$, $P=0.0160$), siendo *M. anisopliae* y *G. virens* los hongos con los mejores índices (Figura 2). Por lo anterior, las combinaciones con mejor compatibilidad son *M. anisopliae* con 1.5% de ARS y *G. virens* con 1.5% de ARS.

Discusión

El insecticida ARS fue compatible con los hongos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*, mientras que el insecticida Anvil fue tóxico para los tres hongos entomopatógenos.

El presente estudio es el primer reporte en trabajos de compatibilidad con hongos de la especie *G. virens* y *T. longibrachiatum*, también es el primer trabajo con los insecticidas ARS y Anvil. Los insecticidas piretroides ARS y Anvil a las concentraciones de 1.5, 2 y 2.5% causaron reducciones significativas sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación conidial de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*.

Las concentraciones letales de ARS en los mosquitos resistentes (cepa Progreso) fueron 36.529 % (CL₅₀), 30.286 % (CL₂₅) y 27.388 % (CL₁₅) %. En trabajos de compatibilidad previos con otros piretroides a concentraciones de 0.001 y 0.0055% (concentraciones menores a las concentraciones letales de ARS en la cepa resistente a piretroides) (Soares & Monteiro, 2011; Oliveria *et al.*, 2003) fueron tóxicos para los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* respectivamente. Debido a que con concentraciones menores los piretroides fueron tóxicos, nosotros descartamos las concentraciones letales del piretroide en la cepa resistente, para los bioensayos de compatibilidad, toda vez que las concentraciones letales de ARS encontradas en éste estudio superan por mucho a las previamente reportadas como tóxicas.

Soares & Monteiro (2011) reportaron una esporulación de 76.20×10^6 conidias/ml para *M. anisopliae* en el control, mientras que cuando se expuso este hongo a la concentración recomendada (0.001%) del insecticida piretroide Barrage® (Cipermetrina), la esporulación fue de 1.29×10^6 conidias/ml, con una reducción del 80.80%. Esos resultados contrastan fuertemente con los resultados obtenidos en el presente estudio, en donde ARS al 2.5% causó reducciones del 0.85% en la esporulación de *M. anisopliae*, además ARS con las concentraciones 1.5 y 2% causó un incremento en la esporulación de 1.35 y 0.4% respectivamente en *M. anisopliae*. Los porcentajes de reducción de conidias en *M. anisopliae* fueron causados por concentraciones mayores a la utilizada por Soares,

evidenciando que ARS es más compatible con el hongo. El insecticida Anvil causó reducciones en la esporulación de *M. anisopliae* del 99.62 al 99.82 % mayores a las reportadas por el grupo de Soares.

Niassy y colaboradores (2012) demostraron que el crecimiento vegetativo de *M. anisopliae* expuesto a la concentración recomendada por el fabricante del piretroide Duduthrin® (L-cyhalothrin) fue de 16.5 mm (1.65cm) a los 19 días, mientras que en el presente estudio con un tiempo de mayor exposición (30 días) a la concentración de ARS recomendada (2%) por Bayer, *M. anisopliae* presentó un crecimiento vegetativo de 4.98 mayor a lo reportado por Niassy y colaboradores. O bien, la concentración no descrita es demasiado alta comparada con la de ARS y por ello el crecimiento vegetativo fue solo de 19 días, o de nuevo podemos asumir que ARS es menos tóxico permitiendo un mayor crecimiento vegetativo.

Por otro lado, la germinación conidial de *B. bassiana* fue reducida hasta el 22.22, 83.60 y 80.70% por la mitad de la dosis recomendada por el fabricante (no reportada) de la formulación Decis (Deltamethrin) (Oliveira *et al.* 2003), mientras que en el presente estudio ARS a la dosis recomendada causó reducciones en la germinación conidial de *M. anisopliae* y *G. virens* de 0 y 3 % menores a las causadas en *B. bassiana*.

El insecticida Anvil en el presente estudio no afectó la germinación conidial de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *G.virens* y *T. longibrachiatum*, pero sí afectó el crecimiento vegetativo y esporulación, concordando con lo que sugiere Zimmerman (1975) [citado por Cazorla & Morales-Moreno (2010)], el cual menciona que la inhibición del crecimiento de un hongo por parte de un producto químico, no es indicativo de la reducción de su esporulación o viceversa, por lo anterior en el presente estudio se midieron los parámetros de esporulación a los 10 días, y crecimiento vegetativo a los 14 y 30 días después de la exposición o aplicación del insecticida.

En este estudio, Anvil redujo un 43.59% el crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum*, superior a lo reportado por Gampala & Pinnamaneni (2010), en el cual encontraron una reducción del 20% en el crecimiento vegetativo de *T. viride*, mientras que ARS redujo el crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum* solo un 0.48%.

Por otro lado, el insecticida Anvil no fue compatible con los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*, este comportamiento concuerda con otros piretroides los cuales fueron tóxicos para *M. anisopliae* (Khan *et al.*, 2012; Niassy *et al.*, 2012) con la diferencia que ellos no incluyeron la variable germinación conidial. Por ejemplo la concentración recomendada por el fabricante del piretroide Barrage (Cipermetrina) fue tóxica para el hongo *M. anisopliae* (Soares & Monteiro, 2011). Batista y colaboradores (2001) reportaron que el piretroide Decis® 25 CE (Deltametrina) fue compatible y moderadamente tóxico para el hongo *M. anisopliae*, pero no incluyeron la variable germinación conidial. En este trabajo el insecticida ARS fue compatible con los tres hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*, lo que puede permitir un uso combinado de estos productos.

En el presente estudio decidimos incluir la clasificación toxicidad de un insecticida propuesto por Alves y colaboradores (2007) el cual incluye la variable germinación conidial, debido a que la germinación conidial es el primer paso para que un hongo entomopatógeno atraviese la cutícula del insecto y la inhibición de la germinación podría afectar considerablemente la eficacia del hongo entomopatógeno (Anderson & Roberts 1983).

A pesar de que los insecticidas ARS y Anvil son piretroides, ARS fue compatible y Anvil de moderadamente tóxico a tóxico para los hongos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*, similar a lo reportado por Alves (2013) en el cual Karate Zeon (Lambda-cyhalothrin) fue compatible y Nor-trin (Cypermethrin) fue tóxico para *M. anisopliae*. ¿Cuáles son las diferencias entre ARS y Anvil para que uno fuera compatible y el otro tóxico a las mismas especies de hongos entomopatógenos? La primera variable a considerar es el ingrediente activo, por lo que se tienen que realizar bioensayos de compatibilidad donde solo se utilice el ingrediente activo de cada formulación para ver si son tóxicos de manera individual. Schumacher & Poehling (2011) demostraron que la permetrina (ingrediente activo de ARS) fue compatible en un rango de dosis de 0.32ppm a 200ppm. La segunda variable es el resto de sustancias que utilizan los fabricantes para hacer el formulado. Tamai y colaboradores (2002) mencionan que existen productos comerciales con el mismo ingrediente activo pero de diferentes fabricantes, pudiendo presentar desigual

comportamiento debido a las diferentes sustancias usadas para formular por cada fabricante. Anderson & Roberts (1983) también mencionan que los aditivos que se usan para la formulación de un insecticida podrían estar afectando a los hongos entomopatógenos. Además, otra variable a considerar es la variabilidad genética por parte de los hongos, Cazorla & Morales-Moreno (2010) reportaron una amplia variedad de respuesta de 13 aislamientos de *B. bassiana* hacia los insecticidas químicos, evidenciando que la variabilidad genética a nivel de cepas de la misma especie afecta la respuesta hacia el insecticida. Esto podría explicar por qué en el presente trabajo los índices biológicos entre los hongos entomopatógenos expuestos al mismo insecticida fue diferente, lo que nos lleva a suponer que es por la variabilidad genética inter-específica, y se corroboró al analizar a los hongos entomopatógenos por bloques y encontrando diferencias significativas entre éstos al ser expuestos a ARS (Figura 2).

Por otro lado, los piretroides actúan a nivel de canales de sodio en mosquitos y en general en todos los insectos (Soderlund, 1997; Soderlund & Knipple, 1999; Vais *et al.*, 2001) y hay reportes que mencionan que el hongo *Saccharomyces cerevisiae* contiene proteínas de membrana que tiene funciones parecidas a la de los canales iónicos (Teng *et al.*, 2008), por lo que se podría contemplar que los piretroides actúen de manera similar en los hongos entomopatógenos.

En conclusión, el insecticida Anvil a las concentraciones 1.5, 2 y 2.5% no puede ser considerado para usarse en combinación con los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*. Por el contrario, las tres concentraciones del insecticida ARS fueron compatibles con los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*, siendo la concentración de 1.5% la mejor combinación tanto con *M. anisopliae* como con *G. virens*. Basados en estos resultados estas combinaciones podrían ser usadas en estrategias de control integrado de *Ae. aegypti*, aunque es necesario realizar su validación a nivel de laboratorio para demostrar la efectividad de alguna de estas combinaciones sobre mosquitos *Ae. aegypti* o un posible efecto sinergista.

Referencias

- Agamez EY, Zapata RI, Oviedo LE & Barrera JL (2008) Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp.* Revista Colombiana de Biotecnología 8(2): 23-34.
- Alves da Silva R, Dias Quintela E, MouraMascarin G, FreitasBarrigosi JA & Moraes Liao L (2013) Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Scientia Agricola 70(3):152-160.
- Alves SB (1998) Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. En: Controle Microbiano de Insetos. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil: Ed Alves SB, pp. 21-38.
- Alves SB, Haddad ML, Faion M, de Baptista GC & Rossi-Zalaf LS (2007) Novo índicebiológico para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatógenicos. En: X Simposio de Controle Biológico – 30 de Junho a 04 de julho de 2007, Brasília. Disponible en: <http://www.seb.org.br/eventos/SICONBIOL/XSiconbiol/XSiconbiol-resumos.pdf>
- Anderson TE & Roberts DW (1983) Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. Journal of Economic Entomology 76: 1437-1441.
- Batista AF, Almeida JEM & Lamas C (2001) Effect of Thiamethoxam on Entomopathogenic Microorganisms. Neotropical Entomology 30(3):437-447.
- Biber P, Rondan-Dueñas J, Ludueña-Almeida F, Gardenal C & Almirón W (2004) Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to Temephos. Journal of Medical Entomology 41(4): 712-717.
- Black CW, Bennet K, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury C, Fernandez-Salas, & Muñoz ML (2002) Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Archives of Medical Research 33(4): 379-388.

- Cañedo V & Ames T (2004) Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Primera Edición Lima, Perú.1-60.
- Carruthers IR & Hural K (1990) Fungi as a natural occurring entomopathogens. En: Baker RR, Dunn PE (Ed.) New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Nueva York pp.115-138.
- Castillo ZS (2006) Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (Aeneolamiaspp. y Prosapia spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en el Petén Guatemala. Tesis, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba.
- Cazorla D & Morales-Moreno P (2010) Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. Boletín de malariología y salud ambiental 2: 261-270.
- CENAPRECE (2014) Lista actualizada de insumos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir del 2014. Disponible en:
http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/lista_insumos_recomendados_vectores2014.pdf
- Cisneros-Vázquez LA (2010) El potencial entomopatógeno de diferentes cepas nativas de hongos sobre *Aedes aegypti* Tesis, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.
- Escuela profesional de Ingeniería Agronómica (2009) Experimentación agrícola. Universidad José Carlos Mariátegui.1-116.
- Flores A, Salomón-Grajales J, Fernández-Salas I, Ponce-García G, Loaiza-Becerra MH, Lozano S, *et al* (2006) Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* from Quintana Roo, southern México. Journal of the American Mosquito Control Association 22(4): 672-677.

- Gampala y Pinnamaneni (2010) Studies on the compatibility of *Trichoderma viride* with certain Agro-chemicals. *Current World Environment* 5(1):155-158.
- García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solís G, *et al* (2009) Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2009 3(10): e531. doi:10.1371/journal.pntd.0000531
- Gubler DJ (2011) Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st century. *Tropical Medicine and Health* 39(4):3-11.
- Guy B, Saville M & Lang J (2010) Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Human Vaccines* 6: 696–705.
- Hokkanen HMT & Kotiluoto R (1992) Bioassay of the side effects of pesticides on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*: standardized sequential testing procedure. *IOBC/WPRS Bull.*, XI (3):148-151.
- Khan S, Bagwan NB, Fatima S & Asef Iqbal M (2012) *In vitro* Compatibility of Two Entomopathogenic Fungi with Selected Insecticides, Fungicides and Plant Growth Regulators. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 3 (1): 36-41.
- Lecuona R, Clement JL, Riba G, Joulie C & Juarez MP (1997) Spore germination and hyphal growth of *Beauveria sp.* on insect lipids. *Journal Economic Entomology* 89: 119-123.
- Leles RN, Almeida N, Nunes LF, Santos AH, Garcia HH & Luz C (2010) Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 107: 1271-1274.
- Luz C, Tai M, Santos A, Rocha L, Albernaz D & Silva H (2007) Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23(2):50-57.

- Miranpuri GS & Khachatourians GG (2001) Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larva of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59(1):19-27.
- Moino Jr A & Alves SB (1998) Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. nocomportamento de limpeza de *Heterotermestenuis* (Hagen). *Ann. Soc. Entomol. Brasil* 27: 611–619.
- Niassy S, Maniania NK, Subramanian S, Gitonga ML, Maranga R, Obonyo AB, & Ekesi S (2012) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* isolate ICIPE 69 with agrochemicals used in French bean production. *International Journal of Pest Management* 58(2): 131-137.
- NORMA Oficial Mexicana (NOM-032-SSA2-2010). Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5192591&fecha=01/06/2011
- Oliveira CN, Neves PM & Sueki Kawakoze L (2003) Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola* 60(4): 663-667.
- OMS & TDR (2009) Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
- Paula AR, Souza E, Ronald C, Pinheiro M & Ian R (2008) Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology* (10): 1017-1025.
- Pelliza S, López-Lastra C, Becnel J, Bisaro V & Garcia J (2007) Biotic and abiotic factors affecting *Leptogenia chapmanii* infection in *Aedes aegypti*. *Journal of the American Control Association* 23(2): 177-81.

- Quintela ED & McCoy CW (1998) Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus*(Coleoptera: Curculionidae) in soil. J. Econ. Entomol. 91: 110–122.
- Rosas- Acevedo JL, Avalos OR, Rosas-Acevedo AY, Sánchez-Infante A & Sampedro-Rosas L (2008) Utilización de desechos orgánicos como sustrato para la producción de un fungicida natural en la región cafetalera del municipio de Tuxtepec, Oaxaca y Zihuatanejo, Gro. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 4(2): 256-258.
- Santos, AV, Olivera BL & Samuels RI (2007) Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant, *Atta sexdensrubropilosa*Forel (Hymenoptera: Formicidae). Mycopathologia 163: 233 - 240.
- Scholte EJ, Knols B & Takken W (2004) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae*s.s. Malaria Journal 3(45): 1-6.
- Scholte EJ, Takken W & Bart GJ (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Acta Trop 102(3): 151-158.
- Schumacher V & Poehling HM (2012) In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. Fungal biology 116:121-132.
- Science AAAS (2013) First New Dengue Virus Type in 50 years. Disponible en <http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>
- Seye F, Faye O, Ndiaye M, Njie E & Afoutou JM (2009) Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. Journal of Insect Science 11: 1-7.

- Silva R, Silva H & Luz C (2004) Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Revista de Patología Tropical* 33(2): 207-16.
- SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue (2013) Panorama epidemiológico de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue Semana epidemiológica 52. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem52_sem2013.pdf
- Soares FB & Monteiro AC (2011) Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo 78(3):385-391.
- Soderlund DM & Knipple DC (1999) Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism. *Ann. Ent. Soc. Am.* 92: 909–915.
- Soderlund DM (1997) Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Sjut, V. (Ed.), *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals*. Springer, Berlin. 21–56.
- Tamai M, Alves S, Lopes R, Faion M & Padulla L (2002) Toxicidade de productos fitosanitarios para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arq. Inst. Biol.* 69:89-96.
- Tamez GP, Galán W, Nedrano R, Garcia GC, Rodriguez P & Gomez RA (2001a) Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México, *Ciencia UANL* 4 (2):143-152.
- Tanada Y & Kaya HK (1993) *Insect pathology*, New York: Academic Press Inc.1993. pp.666
- Teng J, Goto R, Iida K, Kojima I & Iida H (2008) Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium-channel homologue Cch1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 154:3775-3781.

Vais H, Williamson MS, Devonshire AL & Usherwood PNR (2001) The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Management Science* 57: 877-888.

Vázquez-Martínez MG, Rodríguez-Meneses A & Rodríguez-López MH (2008) Patogenicidad de diferentes cepas de hongos sobre el mosquito *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) vector de paludismo. *Entomología mexicana* 7: 760-763.

WHO (2012) WHO recommended insecticides for space spraying against mosquitoes. Disponible en:

http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf

World Health Organization (1998) Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bioefficacy and persistence of insecticides on treated surfaces, WHO/CDS/CPC/MAL/98.12, Geneva 1998:1-45 .

Zimmermann G. (1975) Über die Wirkung systemischer Fungizide auf verschiedene insektenpathogene Fungi imperfecti in vitro. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Berl.)* 27: 113–117.

Tablas y figuras

Tabla 1. Concentraciones letales (CL₅₀, CL₂₅, CL₁₅) estimadas de los insecticidas Aqua Reslin® Super (ARS) y Anvil® para mosquitos *Aedes aegypti* susceptibles (cepa Nueva Orleans) y resistentes a piretroides (cepa Progreso).

| Tratamiento | CL | Estimación | Límite inferior | Límite superior | χ^2 calculada | χ^2 Tablas |
|------------------------|----|------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| ARS en Nueva Orleans | 15 | 1.175 | 1.019 | 1.27 | 7.005 | 7.815 |
| | 25 | 1.262 | 1.132 | 1.349 | | |
| | 50 | 1.44 | 1.346 | 1.547 | | |
| Anvil en Nueva Orleans | 15 | 1.173 | 1.117 | 1.22 | 4.646 | 7.815 |
| | 25 | 1.272 | 1.224 | 1.314 | | |
| | 50 | 1.48 | 1.438 | 1.525 | | |
| ARS en progreso | 15 | 27.388 | 21.838 | 30.415 | 6.748 | 7.815 |
| | 25 | 30.286 | 25.802 | 33.039 | | |
| | 50 | 36.529 | 33.552 | 40.452 | | |

Tabla 2. Efecto de los insecticidas Aqua Reslin® Super (ARS) y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación de *M. anisopliae*.

| | Crecimiento vegetativo | | Esporulación | | Germinación | | |
|---------|------------------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|---------------|-------|
| | Cm | (%) reducción | X × 10* | (%) reducción/incremento | % | (%) reducción | |
| Control | 5.20.13±0.05a | 0 | 3.18×10 ⁷ ±1444745.23a | 0 | 100a | 0 | |
| ARS | 1.5 | 5.025±0.13ab | -2.86 | 3.22×10 ⁷ ±1093160.56a | +1.35 | 100a | 0 |
| | 2 | 4.516±0.36b | -12.74 | 3.19×10 ⁷ ±549241.902a | +0.4 | 100a | 0 |
| | 2.5 | 4.47±0.43b | -10.53 | 3.15×10 ⁷ ±170171.482a | -0.85 | 95.25±1.5b | -4.75 |
| Control | 4.99±0.18a | 0 | 6.31×10 ⁷ ±8508574.11a | 0 | 100a | 0 | |
| Anvil | 1.5 | 3.316±0.36b | -33.44 | 2.37×10 ⁵ ±32274.86b | 99.62 | 100a | 0 |
| | 2 | 3.116±1.13bc | -37.71 | 1.31×10 ⁵ ±23935.68c | 99.79 | 100a | 0 |
| | 2.5 | 2.866±0.63c | -42.73 | 1.12×10 ⁵ ±32274.86c | 99.82 | 91.75±2.75b | -8.25 |

Letras iguales indican no diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3. Efecto de los insecticidas Aqua Reslin® Super (ARS) y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación de *G. virens*.

| | Crecimiento vegetativo | | Esporulación | | Germinación | | |
|---------|------------------------|---------------|---|-----------------------------------|-------------|---------------|------|
| | Cm | (%) reducción | X × 10* | (%) reducción | % | (%) reducción | |
| Control | 5.2a | 0 | 5.17×10 ⁷ ±11918779 ^a | 0 | 100a | 0 | |
| ARS | 1.5 | 5.2a | 0 | 4.28×10 ⁷ ±5531632.5ab | -14.93 | 100a | 0 |
| | 2 | 5.2a | 0 | 362×10 ⁷ ±3385016ab | -27.76 | 97±0.82b | -3 |
| | 2.5 | 5.2a | 0 | 2.91×10 ⁷ ±3869619.9b | -40.96 | 97±2.16b | -3 |
| Control | 5.2a | 0 | 6.31×10 ⁷ ±314576.4 ^a | 0 | 100 | 0 | |
| Anvil | 1.5 | 5.2a | 0 | 4.12×10 ⁵ ±32274.9b | -98.32 | 100 | 0 |
| | 2 | 5.2a | 0 | 3.75×10 ⁵ ±20412.4c | -98.47 | 100 | 0 |
| | 2.5 | 5.2a | 0 | 3.56×10 ⁵ ±23935.7c | -98.55 | 98.5±1.39 | -1.5 |

Letras iguales indican no diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4. Efecto de los insecticidas Aqua Reslin® Super (ARS) y Anvil® sobre el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación de *T. longibrachiatum*.

| | Crecimiento vegetativo | | Esporulación | | Germinación | | |
|-------------------|------------------------|---------------|------------------------|-------------------------|-------------|---------------|-------|
| | cm | (%) reducción | X × 10* | (%) reducción | % | (%) reducción | |
| Control | 5.2a | 0 | 1.67×10 ⁷ a | 0 | 100a | 0 | |
| Aqua Reslin Super | 1.5 | 5.2a | 0 | 1.27×10 ⁷ ab | 18.91 | 100a | 0 |
| | 2 | 5.18a | -0.48 | 8.72×10 ⁶ bc | 44.34 | 77.5ab | 22.5 |
| | 2.5 | 5.18a | -0.48 | 7×10 ⁶ c | 52.54 | 54.09b | 45.91 |
| Control | 5.2a | 0 | 6.31×10 ⁷ a | 0 | 100a | 0 | |
| Anvil | 1.5 | 4.91a | -5.61 | 2.37×10 ⁵ b | 99.84 | 94.12a | 5.88 |
| | 2 | 4.67ab | -10.26 | 1.31×10 ⁵ b | 99.89 | 93.79a | 6.21 |
| | 2.5 | 2.93b | -43.59 | 1.12×10 ⁵ b | 99.87 | 91.71a | 8.29 |

Letras iguales indican no diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5. Clasificación de la compatibilidad de Aqua Reslin® Super (ARS) y Anvil® con *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum* con las concentración utilizadas.

| Índice biológico para la clasificación de Aqua Reslin Super | | | | | | |
|---|----------------------|---------------|------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| ARS | <i>M. anisopliae</i> | | <i>G. virens</i> | | <i>T. longibrachiatum</i> | |
| % | IB | Clasificación | IB | Clasificación | IB | Clasificación |
| 1.5% | 98.9972612 | C | 93.5784605 | C | 91.8688451 | C |
| 2% | 93.9961656 | C | 87.762893 | C | 78.4545081 | C |
| 2.5% | 91.8512999 | C | 82.0868903 | C | 72.5927879 | C |

| Índice biológico para la clasificación de Anvil | | | | | | |
|---|----------------------|---------------|------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| Anvil | <i>M. anisopliae</i> | | <i>G. virens</i> | | <i>T. longibrachiatum</i> | |
| % | IB | Clasificación | IB | Clasificación | IB | Clasificación |
| 1.5% | 41.4466191 | MT | 57.0722059 | MT | 53.8454513 | MT |
| 2% | 39.3671031 | T | 57.0656456 | MT | 51.6054983 | MT |
| 2.5% | 36.1723242 | T | 56.9124099 | MT | 35.7394499 | T |

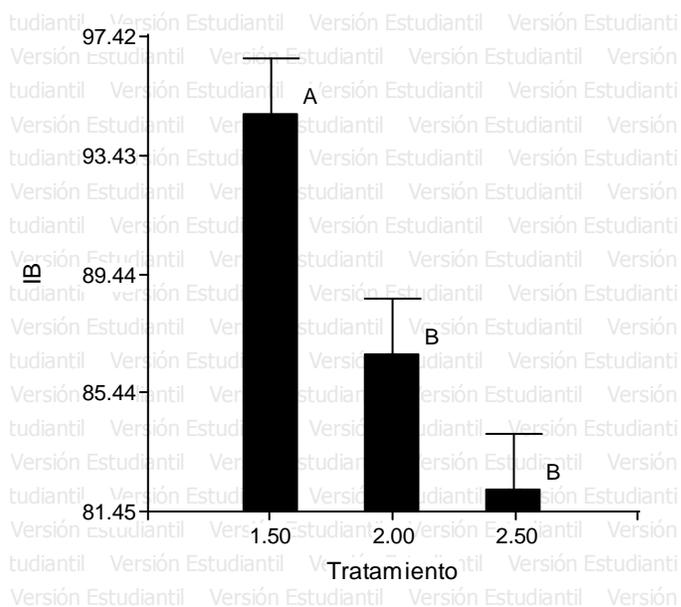


Figura 1. Índices biológicos de las concentración 1.5, 2 y 2.5% de Aqua Reslin® Super.

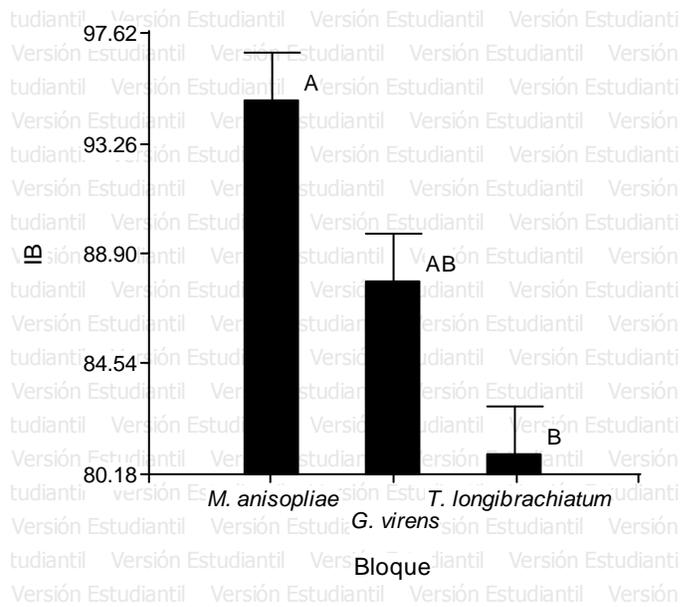


Figura 2. Índices biológicos de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *G. virens* y *T. longibrachiatum*.