



# INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

---

---

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

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

**TESIS**

**Requisito parcial para obtener el grado de:**

**Maestra en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en  
Enfermedades Transmitidas por Vector**

**Presenta:**

**Biol. Mercedes Nathalie Mendoza Ledesma**

**Directora de Tesis:**

**Dra. María Guadalupe Vázquez Martínez.**

**Asesores:**

**Dr. Américo David Rodríguez Ramírez.**

**Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro**

**Tapachula, Chiapas; Febrero 2014**

## **Dedicatoria**

A mis padres  
Mercedes Adriana Ledesma Ríos  
Manuel de Jesús Mendoza

A mis abuelitos  
Ernesto de la Rosa  
Gloria Ríos Aguilar

A mi tía  
Gloria Patricia Ledesma Ríos

A mis hermanas  
Adriana Guadalupe Mendoza Ledesma  
Gloria Esther Mendoza Ledesma  
Génesis del Carmen Mendoza Ledesma

A mi sobrino  
Emilio Mendoza Ledesma

A Bianca

Por todo su apoyo incondicional, porque sin Ustedes no estaría en el lugar que actualmente me encuentro, ¡Gracias!

## **Agradecimientos**

A la Dra. María Guadalupe Vázquez Martínez por todo el apoyo en la revisión, sugerencias y correcciones durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Américo David Rodríguez Ramírez, a la Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro y al Dr. José Luis Torres Estrada por sus correcciones en la escritura de este trabajo.

A la Q.F.B. Alma Delia López Solís, al Q.F.B. Francisco Solís Santoyo y a la C. Octavia Pérez Medina por todo el apoyo técnico en el Laboratorio de Insecticidas e Insectario, por sus consejos y su amistad.

A la Q.F.B. Olga Ruth Gálvez Coutiño y al C. Amílcar Zúñiga Ambrosy por el apoyo técnico brindado en el Laboratorio de Patógenos y Vectores.

A Josselin, Arturo y Luis compañeros de la Maestría, por todo su apoyo, consejos y principalmente por su amistad.

Al Instituto Nacional de Salud Pública y en particular al Centro Regional de Investigación en Salud Pública.

Al proyecto SALUD-CONACYT No.182722, “Evaluación de hongos entomopatógenos en conjunto con insecticidas químicos como una estrategia de control integrado de *Aedes aegypti*, vector del dengue en México”, por todo el apoyo brindado para concluir el trabajo de tesis a través de la beca No. S0008-12-01-182722-02-048.

## Contenido

I. Resumen	02
II. Introducción	03
III. Materiales y métodos	05
3.1 Insecticidas	05
3.2 Mosquitos	05
3.3 Cepas de hongos	05
3.4 Pruebas de línea base y compatibilidad	06
3.4.1 Germinación	06
3.4.2 Esporulación	06
3.4.3 Crecimiento vegetativo	06
3.4.4 Análisis estadístico	07
IV. Resultados	07
4.1 Línea base de malatión y clorpirifos-etil con mosquitos de <i>Ae. aegypti</i> susceptibles (cepa New Orleans) y resistentes a organofosforados (cepa Loma Zapatero)	07
4.2 Compatibilidad de malatión y clorpirifos-etil evaluada sobre la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de <i>T. longibrachiatum</i> , <i>G. virens</i> y <i>M. anisopliae</i>	07
4.2.1 Germinación	07
4.2.2 Esporulación	08
4.2.3 Crecimiento vegetativo	08
V. Discusión	09
VI. Conclusión	11
VII. Referencias	12
VIII. Anexos de tablas	16

## I. Resumen

El control de *Aedes aegypti*, vector del dengue en México, está basado en la aplicación de insecticidas. Dado los problemas de resistencia a los insecticidas usados es necesaria la implementación de nuevas estrategias de control. Los hongos entomopatógenos son ampliamente utilizados como agentes de control de un extenso grupo de insectos, incluyendo mosquitos. Una estrategia para mejorar la eficacia de los hongos es combinar el uso de hongos entomopatógenos con insecticidas; sin embargo, es necesario probar que exista compatibilidad entre el hongo y el insecticida a utilizar debido a que los insecticidas pueden generar un efecto adverso sobre los hongos. En el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de formulados de los insecticidas malatión y clorpirifos-etil sobre la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de *Gliocladium virens*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Metarhizium anisopliae*. Clorpirifos-etil fue el insecticida que mostró mayores efectos tóxicos sobre los tres hongos. De acuerdo a la clasificación de compatibilidad (Alves *et al.*, 1998) *Gliocladium virens* fue compatible con malatión a las concentraciones 0.84%, 0.85% y 0.88% mientras que *Metarhizium anisopliae* fue compatible con malatión a las concentraciones de 0.85% y 2.31%. Esta compatibilidad podría considerarse como un elemento más en la alternativa del control integrado de *Ae. aegypti*.

**Palabras clave:** *Gliocladium virens*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Metarhizium anisopliae*; malatión; clorpirifos-etil; hongo entomopatógeno; compatibilidad.

## II. Introducción

El Dengue es una infección vírica producida por el virus dengue del cual se conocen cuatro serotipos (DENV 1, DENV 2, DENV 3 y DENV 4). Esta enfermedad es transmitida por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. En los últimos años, la incidencia y la gravedad de la enfermedad han aumentado rápidamente en Latinoamérica y el Caribe (OMS, 2014) y por el elevado número de personas afectadas está considerada la enfermedad vírica más importante transmitida por artrópodos (San Martín y Brathwaite-Dick, 2007).

Durante el 2013, en México se registraron 43, 663 casos confirmados de fiebre por dengue y 18, 667 casos confirmados de fiebre hemorrágica por dengue, resultando en total 104 defunciones (SINAVE, 2014). En la actualidad, no hay tratamiento específico ni vacuna disponible aunque a nivel mundial existen seis candidatos de vacunas del dengue en etapas de desarrollo y muchas otras en etapa pre-clínica (Guardian News, 2014), por lo tanto el único medio para reducir las tasas de infección es a través del control del insecto vector (Paula *et al.*, 2011).

En México, el vector principal del dengue es *Ae. aegypti* (L.). El control de *Ae. aegypti* ha sido realizado durante los últimos 40 años por métodos químicos (Montada *et al.*, 2005). Sin embargo, esto no ha sido suficiente para reducir las poblaciones e impactar la incidencia de la enfermedad por lo que se emplean otras estrategias para reducir los criaderos de este vector mediante programas de saneamiento ambiental (OPS, 2005).

Una de las acciones de control dirigida a las fases acuáticas del mosquito *Ae. aegypti* consiste en aplicar insecticidas organofosforados en los recipientes que constituyen criaderos mientras que para la fase adulta se aplican insecticidas piretroides y organofosforados autorizados por el CENAPRECE, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (SSA, 2009), principalmente en nebulizaciones espaciales a ultra bajo volumen (UBV).

En los últimos 30-50 años en los países de América Latina se han utilizado insecticidas organofosforados en recipientes de agua doméstica y para tratamiento residual intradomiciliario o rociado espacial para reducir las densidades de *Ae. aegypti* (Rodríguez, 2008). A partir de la década de los 90 hasta la fecha se han utilizado en la mayoría de los países de América Latina, los insecticidas piretroides para el control de adultos en presencia de altos índices de infestación del vector. *Ae. aegypti* ha desarrollado resistencia a una amplia variedad de insecticidas (OMS, 1992) lo que constituye el principal problema operacional que afecta su control.

Dada la problemática de resistencia, se genera la necesidad de buscar nuevas alternativas de control en las que se puede reducir el uso de insecticidas químicos. Dentro de las opciones disponibles y que además puede ser aplicada para el control de insectos vectores se incluye el control biológico. El uso del control biológico permite la reducción del uso de los insecticidas aplicados, así como también los efectos adversos a la salud humana y al ambiente en general y de la aparición de poblaciones de insectos resistentes (Carzola y

Morales, 2010; Motta-Delgado y Marcia-Ordoñez, 2011). El control biológico incluye el uso de organismos entomopatógenos: bacterias, virus, protozoarios, nematodos y hongos (Lacey *et al.*, 2001).

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados en todo el mundo; tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y de encontrarse en hábitats muy variados, ya sea acuático o terrestre (Lecuona *et al.*, 1996). Los hongos pueden jugar un papel muy importante en la salud humana (Lecuona *et al.*, 1996) ya que son candidatos prometedores para el control de vectores, especialmente de mosquitos, triatominos y garrapatas (Luz *et al.*, 2007). Se ha reportado que los hongos entomopatógenos afectan a poblaciones de mosquitos en todo el mundo lo que sugiere que su manipulación podría ayudar a optimizar el control en mosquitos vectores (Scholte *et al.*, 2004).

Se han realizado estudios con el objetivo de demostrar el potencial de infección de los hongos entomopatógenos sobre mosquitos vectores. Scholte *et al.* (2003) realizaron ensayos de patogenicidad con *Metarhizium anisopliae* sobre mosquitos hembras y machos de *Anopheles gambiae* y *Culex quinquefasciatus*, a través de substratos tratados con conidias y expuestos a diferentes tiempos, los resultados demostraron que *M. anisopliae* es altamente patogénico para las especies vectores utilizadas.

En estudios realizados por Mnyone *et al.* (2009) se investigó el efecto de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre hembras de *An. gambiae*, reportando que la sobrevivencia de los mosquitos varía con la concentración de conidias.

También se han realizado estudios con el fin de conocer si las especies resistentes a insecticidas son susceptibles a hongos entomopatógenos. Howard *et al.* (2010) demostraron que mosquitos *An. gambiae* resistentes a insecticidas son significativamente más susceptibles a *M. anisopliae* y *B. bassiana* en comparación a la cepa susceptible de la misma especie de mosquito.

Aunque en la mayoría de los estudios se utilizan los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* por tener una distribución geográfica muy amplia (Scholte *et al.*, 2003) es también necesario realizar estudios con cepas nativas, pues se conoce que son más efectivas que las cepas introducidas por estar adaptadas a las condiciones climáticas del lugar donde serán aplicadas (Castillo, 2006). En un estudio realizado por Vázquez-Martínez *et al.* (2013) se demostró que *M. anisopliae* y *Gliocladium virens* tienen efecto patogénico sobre larvas y adultos de *An. albimanus*.

Se ha reportado la actividad ovicida de *Isaria farinosa*, *Paecylomyces carneus*, *M. anisopliae*, *Penicillium sp.* y *B. bassiana* sobre *Ae. aegypti* (Luz *et al.*, 2007). Cisneros (2010) demostró que los hongos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum* causaron en general más del 89% de mortalidad en larvas de *Ae. aegypti*. Así mismo, se ha demostrado que los adultos de esta misma especie son altamente susceptibles a hongos como *M. anisopliae*, *I. fumosorosea*, *P. carneus* y *Lecanicillium psalliotae* (Leles *et al.*, 2010).

Uno de los aspectos prometedores del uso del control microbiano de insectos, es su integración con otras medidas de control, particularmente con métodos químicos (Neves *et al.*, 2001), por lo cual, se han realizado estudios para demostrar los efectos de los insecticidas sobre los hongos entomopatógenos (Mohamed *et al.*, 1987; Lecuona y Díaz, 1996; Oliveira *et al.*, 2003; Anhalt *et al.*, 2010; Schumacher y Poehling, 2012). Un ejemplo de lo anterior es el estudio realizado por Paula *et al.* (2011) en el que se evaluó el uso combinado de *M. anisopliae* con concentraciones subletales de imidacloprid (Confidor®, Bayer, Brasil) sobre hembras de *Ae. aegypti*. La concentración subletal de 0.1 ppm combinado con  $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup> redujo la sobrevivencia de *Ae. aegypti* comparado con el uso del insecticida o el hongo de manera individual.

También Xu *et al.* (2002) mencionaron que la aplicación combinada de insecticidas químicos y hongos entomopatógenos ha demostrado su eficacia para el control de plagas y puede tomar ventajas de ambos ya que logra reducir el uso de insecticidas y desacelerar el desarrollo de resistencia. Para una determinada plaga, la estrategia requiere no solo un hongo candidato, sino también un insecticida seleccionado cuidadosamente con base a su compatibilidad biológica con el agente fúngico involucrado (Xu *et al.*, 2002). Desafortunadamente, existe poco conocimiento de la compatibilidad de insecticidas comerciales con agentes fúngicos (Shi *et al.*, 2005). El conocimiento de la compatibilidad entre hongos entomopatógenos e insecticidas puede facilitar la elección de productos para Programas de Manejo Integrado de Vectores (MIV) (Neves *et al.*, 2001).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la compatibilidad de hongos entomopatógenos nativos e insecticidas organofosforados, con el fin de que los resultados puedan ser útiles en el desarrollo de medidas alternativas para el control de las poblaciones de *Ae. aegypti* y con ello reducir la incidencia de Dengue.

### **III. Materiales y métodos**

#### **3.1 Insecticidas**

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

#### **3.2 Mosquitos**

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

#### **3.3 Cepas de hongos**

Se utilizaron tres cepas de hongos entomopatógenos, dos cepas nativas *Trichoderma longibrachiatum* y *Gliocladium virens* proporcionadas por el Laboratorio de Patógenos y

Vectores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) y una cepa foránea de *Metarhizium anisopliae*, donada por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Cada cepa se cultivó por separado en medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) en placas petri mediante la técnica del papel celofán (Dennis y Webster, 1971).

### **3.4 Pruebas de línea base y compatibilidad**

Se determinaron las concentraciones letales ( $CL_{15}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{50}$ ) para las cepas susceptible y resistente a organofosforados de *Ae. aegypti*. Se probaron de manera individual las tres cepas de hongos con los dos insecticidas, utilizando la  $CL_{15}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{50}$  de cada uno. La compatibilidad de malatión y clorpirifos-etil se evaluó sobre la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum*, *G. virens* y *M. anisopliae*.

#### **3.4.1 Germinación**

Para evaluar el efecto del insecticida sobre la germinación se sembraron 5 alícuotas de 5  $\mu$ l de una suspensión de conidias de  $1 \times 10^6$  conidias  $mL^{-1}$  en placas con medio SDA con las concentraciones incorporadas de insecticida. Como control, se emplearon placas petri con el mismo medio de cultivo pero sin insecticidas. Se incubaron a 25-28°C por 18-24 horas aproximadamente y luego se agregó azul de lactofenol para detener la germinación. Se cortó la porción de agar donde se inoculó la alícuota y se colocó sobre una lámina de portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio a 40X. Se contabilizaron las conidias germinadas y no germinadas y se obtuvo el porcentaje de germinación (Cañedo y Ames, 2004).

#### **3.4.2 Esporulación**

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

#### **3.4.3 Crecimiento vegetativo**

Se cortó aproximadamente un  $cm^2$  del cultivo de hongo esporulado y se sembró de manera individual en el centro de la placa petri con cada tratamiento; se incubó a 25-28°C y una humedad relativa de  $70 \pm 5\%$ . Se estimó el crecimiento de las colonias a través de su diámetro (cm); cada valor fue obtenido del promedio de tres mediciones al día 14 y 30, posteriores a la inoculación. Para cada prueba, se realizaron cuatro repeticiones y tres réplicas por tratamiento, incluyendo al control.

### 3.4.4 Análisis estadístico

Las CL fueron calculadas utilizando el programa EPA (Probit Analysis Program Versión 1.5), aplicando una prueba de chi-cuadrada.

Los resultados de germinación y esporulación fueron expresados en porcentaje y para el crecimiento radial el diámetro fue expresado en centímetros. A los resultados de germinación (% de germinación) se les aplicó una transformación arcoseno ( $\text{Sen}^{-1}$  raíz de X). Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño aleatorizado y las medias fueron comparadas utilizando una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) en el programa InfoStat versión 2013.

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

## IV. Resultados

### 4.1 Línea base de malatión y clorpirifos-etil con mosquitos de *Ae. aegypti* susceptibles (cepa New Orleans) y resistentes a organofosforados (cepa Loma Zapatero).

Las concentraciones letales obtenidas (CL)  $CL_{15}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{50}$  del formulado de malatión para la cepa susceptible fueron 0.84%, 0.85% y 0.88%, respectivamente y para la cepa resistente a organofosforados fueron 2.31%, 2.62% y 3.29%. Las  $CL_{15}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{50}$  obtenidas del formulado de clorpirifos-etil para la cepa susceptible fueron 0.41%, 0.60% y 0.98% mientras que para la cepa resistente a organofosforados fueron 5.10%, 5.70% y 7.50% (Tabla 1).

Las  $CL_{15}$  y  $CL_{50}$  se determinaron a través de un análisis Probit; dado que el análisis Probit no calcula la  $CL_{25}$ , ésta se obtuvo utilizando el programa StatPlus 2009. Las concentraciones letales de malatión y clorpirifos-etil antes mencionadas fueron utilizadas para los ensayos de compatibilidad con los hongos *T. longibrachiatum*, *G. virens* y *M. anisopliae*.

### 4.2 Compatibilidad de malatión y clorpirifos-etil evaluada sobre la germinación, esporulación y crecimiento vegetativo de *T. longibrachiatum*, *G. virens* y *M. anisopliae*.

#### 4.2.1 Germinación

La germinación de *G. virens* varió significativamente ( $F = 872.03$ ;  $gl = 12$ ,  $P = 0.0001$ ) (Tabla 2) entre los diferentes tratamientos con insecticida. *T. longibrachiatum* únicamente presentó germinación en las tres concentraciones más bajas de malatión (0.84, 0.85 y 0.88%) ( $F = 1972.75$ ,  $gl = 12$ ,  $P = 0.0001$ ) (Tabla 3). A pesar de tener valores de

concentración muy cercanos, la germinación en el tratamiento 0.85% fue mayor que en el de 0.84% y 0.88%. La germinación de *M. anisopliae* varió (54.25-96.36%) significativamente entre los tratamientos de malatión y clorpirifos-etil ( $F=622.82$ ,  $gl= 12$ ,  $P=0.0001$ ) (Tabla 4); sin embargo, esta variación en la germinación no solo fue debida a la concentración de insecticida sino también al tiempo. *T. longibrachiatum* y *G. virens* no presentaron germinación en ninguna de las seis concentraciones usadas de clorpirifos-etil, mientras que *M. anisopliae* no presentó germinación en ninguna de las tres concentraciones más altas de clorpirifos-etil (5.1%, 5.7% y 7.5%) después de 120 h.

#### 4.2.2 Esporulación

El porcentaje de esporulación varió dependiendo del hongo. Para el caso de *G. virens* únicamente se registró esporulación en los tratamientos con las tres concentraciones más bajas de malatión (0.84%, 0.85% y 0.88%) habiendo una diferencia significativa ( $F=206.84$ ,  $gl=12$ ,  $P=0.0001$ ) cuando se compararon individualmente con el control (Tabla 2). *T. longibrachiatum* no registró esporulación en ninguno de los tratamientos de malatión ni de clorpirifos-etil (Tabla 3); mientras que *M. anisopliae* presentó esporulación en la mayoría de los tratamientos, variando (2.52-100%) significativamente ( $F= 59.43$ ,  $gl=12$ ,  $P=0.0001$ ) entre ellos (Tabla 4). Se pudo observar que un aumento en la concentración no resultó en la disminución de la producción de conidias, obteniendo resultados contradictorios.

#### 4.2.3 Crecimiento vegetativo

La inhibición del crecimiento vegetativo se evaluó en dos tiempos (a los 14 y 30 días post-inoculación) encontrando que los diferentes niveles de inhibición dependieron del tiempo y de las concentraciones usadas. No obstante, se registró menor inhibición del crecimiento vegetativo a los 30 días post-inoculación.

El crecimiento de *G. virens* fue menos afectado por las concentraciones de malatión, el cual inhibió como máximo 16.5% a los 30 días a la concentración de 3.29% mientras que en el mismo tiempo clorpirifos-etil inhibió hasta un 80.07% del crecimiento a una concentración de 0.98%. Tanto a los 14 como a los 30 días, todos los tratamientos tuvieron reducción del crecimiento el cual fue significativamente diferente ( $F= 984.42$ ,  $gl=12$ ,  $P=0.0001$ ) al del control. *T. longibrachiatum* también fue más afectado por clorpirifos-etil al presentar una inhibición del 83.04% en la concentración de 0.98%; sin embargo, con la concentración mayor de malatión (3.29%) se presentó una inhibición del crecimiento del 49.93%. Al igual que *G. virens*, el crecimiento de *T. longibrachiatum* en los tratamientos con insecticida fue significativamente diferente ( $F= 987.21$ ,  $gl=12$ ,  $P=0.0001$ ) comparado con el control a los 14 días, mientras que a los 30 días, únicamente el tratamiento de malatión al 0.85% no tuvo diferencia significativa ( $F=1258.09$ ,  $gl=12$ ,  $P=0.0001$ ) cuando se comparó con el control. El crecimiento vegetativo del control de *M. anisopliae* fue significativamente diferente ( $F= 63.97$ ,  $gl= 12$ ,  $P=0.0001$ ) a todos los tratamientos con malatión y clorpirifos-etil tanto al día 14 como al día 30.

Las tres concentraciones más altas de clorpirifos-etil (5.1%, 5.7% y 7.5%) manifestaron un efecto muy tóxico sobre *T. longibrachiatum*, *G. virens* y *M. anisopliae* inhibiendo

totalmente su crecimiento. Al igual que en la esporulación, en general, un aumento de la concentración no dio como resultado una mayor disminución del crecimiento micelial.

Considerando la fórmula propuesta por Alves *et al.* (1998) para la clasificación de productos químicos de acuerdo a su toxicidad sobre los hongos entomopatógenos probados, se obtuvo que malatión al 0.84%, 0.85% y 0.88% fue compatible con *G. virens*, mientras que al 0.85% y 3.21% fue compatible con *M. anisopliae*.

## V. Discusión

Los resultados indican que de acuerdo a la fórmula propuesta por Alves *et al.* (1998) *M. anisopliae* es compatible con malatión a las concentraciones 0.85% y 2.31% mientras que *G. virens* es compatible con malatión a las concentraciones 0.84%, 0.85% y 0.88%.

Los resultados mostraron que clorpirifos-etil fue el organofosforado más tóxico para el crecimiento vegetativo, la esporulación y la germinación de *T. longibrachiatum*, *G. virens* y *M. anisopliae*. Mohamed *et al.* (1987) también observaron un efecto tóxico de clorpirifos, (5,000, 10,000 y 25,000 ppm de ingrediente activo), sobre el crecimiento micelial y esporulación de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Por su parte, Lecuona y Díaz (1996) observaron el mismo efecto tóxico de clorpirifos (Lorsban®, clorpirifos 48%) sobre *Beauveria bassiana*, inhibiendo más del 80% del crecimiento micelial y reduciendo más del 96.5% de la producción de conidias. En el caso de los hongos ensayados en este trabajo se observó que el crecimiento vegetativo de *G. virens* presentó una inhibición de 56.83% a 80.07%, *T. longibrachiatum* de 70.49% a 83.04% y *M. anisopliae* de 42.24% a 57.92%. En *G. virens* y *T. longibrachiatum* la esporulación se vio inhibida en el 100%, mientras que en *M. anisopliae* la esporulación se inhibió de 69.63 a 97.48%.

Oliveira *et al.* (2003) reportaron que la formulación de clorpirifos (Lorsban® 480) a la concentración recomendada en campo, la mitad y doble de esta concentración inhibe el 100% de la germinación de *B. bassiana* cepa CG 425. En este trabajo *G. virens* tuvo una inhibición de la germinación de 3-12.03%, *M. anisopliae* de 6.63-9.1% y *T. longibrachiatum* presentó el 100% de inhibición de la germinación. Igual Ramzan-Asi *et al.* (2010) reportaron que clorpirifos (Lorsban® 40EC) causa una inhibición elevada del crecimiento y germinación de *M. anisopliae* así como una inhibición del crecimiento y una reducción de la germinación del 85.43% de *Paecilomyces fumosoroseus*. Babu *et al.* (2014) reportaron que clorpirifos (Hilban®) a 0.1 de la concentración recomendada en campo es compatible con *M. anisopliae*. No obstante, esa concentración fue mucho más baja a las utilizadas en este trabajo (0.41% -7.5%).

Por otro lado, malatión resultó ser menos tóxico para el crecimiento micelial que para la esporulación en todos los hongos usados en este trabajo, lo que concuerda con Mohamed *et al.* (1987) quien al evaluar el efecto de malatión (5,000, 10,000 y 25,000 ppm) sobre el crecimiento micelial y esporulación de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, encontró que a 5,000 ppm la tasa de esporulación fue alta mientras que a 10,000 y 25,000 ppm la tasa de esporulación de *M. anisopliae* fue baja; sin embargo, no utilizaron formulaciones sino el ingrediente activo disuelto en acetona a  $\leq 1\%$ . Carzola y Morales (2010) evaluaron la

germinación de 13 aislamientos de *B. bassiana* en presencia de malatión (Malathion 94ULV®, INICA) utilizando dos concentraciones (1.25% y 0.625%). Reportaron que a 1.25% se inhibió la germinación en todos los aislamientos, mientras que a 0.625% el porcentaje de germinación varió de 0.3% a 67.8% entre los diferentes aislamientos. En este trabajo *G. virens* presentó germinación únicamente en las tres concentraciones más bajas de malatión (0.84, 0.85 y 0.88%) y esta varió de 88.62% a 91.39%. *T. longibrachiatum* también tuvo germinación solamente en las tres concentraciones más bajas de malatión y la germinación varió de 93.17% a 97.67%. *M. anisopliae* presentó germinación en los seis tratamientos de malatión y su germinación varió de 54.25% a 96.36%. La diferencia en que en este trabajo se reporte mayor porcentaje de germinación que en el trabajo de Carzola y Morales (2010) puede ser debido a que además de que son diferentes especies de hongos las utilizadas en ambos trabajos, en este trabajo se monitoreó la germinación hasta por 70 horas post-inoculación mientras que ellos reportaron la germinación de todos los aislamientos solo a las 24 horas.

Hirose *et al.* (2001), sugirieron que la diferencia entre los resultados de los diferentes estudios puede derivar parcialmente de los diferentes aditivos de las formulaciones usadas para cada producto y adicionalmente de la alta variabilidad de la cantidad de ingrediente activo. Así mismo, Anderson *et al.* (1989), sugirieron que el efecto de un insecticida sobre el crecimiento del hongo respecto al control podría adjudicarse al tipo de formulación, ya que señalan que la formulación del insecticida es más importante que el ingrediente activo, pues formulaciones en polvos humectables no causan inhibición de la germinación de *B. bassiana* mientras que los concentrados emulsionables inhiben la germinación.

La germinación de *G. virens* fue inhibida en las tres concentraciones más altas tanto de malatión como de clorpirifos-etil, mientras que en *T. longibrachiatum* la germinación se inhibió en las tres concentraciones más altas de malatión y en todas las concentraciones usadas de clorpirifos-etil. Por otro lado la germinación en *M. anisopliae* únicamente se vio inhibida en las tres concentraciones más altas de clorpirifos-etil. La germinación es un parámetro altamente importante, porque refleja la viabilidad del hongo como el comienzo del proceso de infección (Schumacher y Poehling, 2012); por lo tanto, el efecto de los insecticidas sobre la germinación es el aspecto más importante para evaluar compatibilidad entre insecticidas y hongos (Neves *et al.*, 2001). Moore-Landecker (1982) encontró que la presencia de productos químicos puede bloquear las funciones metabólicas de la conidia y por lo tanto afectar drásticamente la germinación. De acuerdo a Gardner y Storey (1985) la inhibición de la germinación pero no del crecimiento micelial puede tener un impacto benéfico en la epizootiología del hongo entomopatógeno, conservando el inóculo infectivo. Neves *et al.* (2001) señalaron que el crecimiento vegetativo puede ocurrir o ser inhibido sólo dentro del hospedero y que la concentración del químico dentro del insecto es probablemente más pequeña que las utilizadas en las pruebas de laboratorio. La germinación es severamente más afectada que el crecimiento vegetativo de hongos entomopatógenos en presencia de insecticidas (Hall, 1981). Las diferencias observadas entre la germinación y la inhibición del crecimiento son probablemente debido a cierta reducción en el tiempo del efecto de los insecticidas en el medio de cultivo (Ramzan-Asi *et al.*, 2010) pues la germinación fue evaluada a partir las 12 h hasta las 120 h post-inoculación, mientras que el crecimiento vegetativo se evaluó al día 14 y 30 post-inoculación tanto en *T. longibrachiatum*, como en *G. virens* y *M. anisopliae*.

Por otro lado, para el crecimiento vegetativo y la esporulación no se obtuvo mayor inhibición del crecimiento vegetativo y/o esporulación conforme se aumentó la concentración de insecticida. Moino y Alves (1998) sugieren dos posibles explicaciones para estos resultados: la primera indica que los hongos, como un mecanismo de resistencia, pueden metabolizar los insecticidas y liberar compuestos que pueden ser usados por el hongo como nutrientes secundarios, y la segunda que en un medio tóxico, el hongo podría estar haciendo un esfuerzo reproductivo, incrementando la producción de conidias.

Por otro lado, Castillo (2006) recomienda el uso de cepas nativas, ya que son más efectivas que las cepas introducidas por estar adaptadas a las condiciones climáticas del lugar donde serán aplicadas, esto permite obtener mejores resultados. La combinación del malatión y *G. virens* podría ser recomendada para ser utilizada en programas de manejo integrado tanto en el control de vectores como de plagas. Sin embargo, Alves *et al.* (1998) señalaron que cuando el insecticida y el hongo entomopatógeno son compatibles en pruebas de laboratorio, existen fuertes evidencias acerca de su selectividad en condiciones de campo. Igualmente, una alta toxicidad en laboratorio no siempre significa que lo mismo puede ocurrir en campo pero muestra una posibilidad para que esto ocurra; por ello, es necesario realizar estudios de campo con estos agentes de control ya que pueden generar información adicional que podría utilizarse en un manejo integrado.

## **VI. Conclusión**

*G. virens* es compatible con las concentraciones 0.84%, 0.85% y 0.88% de malatión y *M. anisopliae* es compatible con las concentraciones 0.85% y 2.31% de malatión. Esta compatibilidad podría considerarse como un elemento más en la alternativa del control integrado de *Ae. aegypti*.

## VII. Referencias

- Alves SB, Moino Jr A, Almeida JEM (1998) Produtos fitossanitários e entomopatógenos. p. 217-238. En Neves PMOJ, Hirose E, Tchujo PT, Moino A (2001) Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*. 30:263-268.
- Anhalt FA, Azevedo JL, Sugayama RL, Specht A, Barros NM (2010) Potential of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycetes, hipocreales) in the control of *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera, Tortricidae) and its compatibility with chemical insecticides. *Brazilian Journal of Biology*. 70(4): 931-936.
- Babu MN, Usha J, Padmaja V (2014) *In-vitro* evaluation of the entomopathogenic fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* for compatibility with pesticides, fungicides and botanicals. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 5(1): 102-113.
- Castillo ZS (2006) Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control del salivazo (*Aeneolamia spp.* y *Prosapia spp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en el Petén, Guatemala. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Tropical Agricultural Research and Higher Education Center. Turrialba, Costa Rica.
- Carzola D & Morales MP (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.
- Cisneros VLA (2010) Potencial entomopatógeno de diferentes cepas nativas de hongos sobre *Aedes aegypti*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Químicas. Campus IV. México.
- Gardner W & Storey GW (1985) Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. *Journal of Economic Entomology*. 78: 1275-1279.
- Gómez-Dantés H (2013) Dengue in México. DVI Early Countries introducing Dengue Vaccine. Bangkok, Thailand.
- Guardian News (2014) Preparing for a dengue fever vaccine: why Brazil's ahead of the game. [http://www.theguardian.com/global-development-professionals-network/2014/jan/27/dengue-fever-vaccine-development-brazil?CMP=tw\\_t\\_gu](http://www.theguardian.com/global-development-professionals-network/2014/jan/27/dengue-fever-vaccine-development-brazil?CMP=tw_t_gu)  
Fecha de consulta: 24 de febrero de 2014.
- Hirose E, Neves P, Zequi JAC, Martins LH, Peralta CH, Moino A (2001) Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*

- (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Brazilian Archives of Biology and Technology. 44: 419-423.
- Howard AFV, Koenraadt CJM, Farenhorst M, Knols BGJ, Takken W (2010) Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Malaria Journal. 9:168.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK., Vail P (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do they have a future? Biological Control. 21: 230-248.
- Lecuona RE, Díaz BM (1996) Compatibilidad de dos cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con distintos insecticidas químicos. Revista de Investigaciones Agropecuarias. Buenos Aires, Argentina. 26(1): 77-82.
- Lecuona RE, Papierok B, Riba G (1996) Hongos entomopatógenos. En Lecuona R. E. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina. Pp. 35-60.
- Leles RN, Almeida SN, Nunes RLF, Santos AH, García SHE, Luz C (2010) Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). Parasitology Research. 107: 1271-1274.
- Luz C, Bastos NMC, Nunes RLF (2007). In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. Mycopathologia. 164: 39-47.
- Luz C, Tai MHH, Santos AH, Rocha LFN, Albernaz DAS, Silva HHG (2007) Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) under laboratory conditions. Journal of Medical Entomology. 44(5): 799-804.
- Mahmood F. 1998. Laboratory bioassay to compare susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as affected by their feeding rates. Journal of the American Mosquito Control Association. 14(1): 69-71.
- Mnyone LL, Kirby MJ, Lwetoijera DW, Mpingwa MW, Knols BGJ, Takken W, Russell TL (2009) Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. Malaria Journal. 8:309.
- Mohamed AKA, Pratt JP, Nelson FRS (1987) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. Mycopathologia. 99: 99-105.
- Moino Jr. A & Alves SB (1998) Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 27:611-619.

- Montada DD, Castex RM, Suárez DS, Figueredo SD, Leyva SM (2005) Estado de la resistencia a insecticidas en adultos del mosquito *Aedes aegypti* del municipio de Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 57(2): 137-142.
- Moore-Landecker E (1982) Spores, p. 398-403. *Fundamentals of the fungi*. New Jersey, Prentice Hall, 780 p. En: Oliveira RC, Neves PMOJ (2004) Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. *Neotropical Entomology*. 33(3): 353-358.
- Motta-Delgado PA, Murcia-Ordóñez B (2011) Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente y Agua*. 6(2): 77-90.
- Neves PMOJ, Hirose E, Tchujo PT, Moino A (2001) Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*. 30:263-268.
- Oliveira CN, Neves PMOJ, Kawazoe LS (2003) Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*. 60(4): 663-667.
- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2014) <http://www.who.int/features/qa/54/es/>. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2014.
- Organización Mundial de la Salud [OMS] (1992) Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. 15°. Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y Lucha antivectorial. OMS, Serie de Informes técnicos 818. Ginebra, Suiza.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS] (2005) Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. Guía para su control. Publicación No. 548.
- Paula AR, Carolino AT, Paula CO, Samuels RI (2011) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors*. 4(8): 1-8.
- Ramzan-Asi M, Bashir MH, Afzal M, Ashfaq M, Sahi ST (2010) Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. *Pakistan Journal of Botany*. 42(6): 4207-4214.
- Rodríguez CMM (2008) Estudio de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). Tesis de Doctorado. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. La Habana, Cuba.
- San Martín JL, Brathwaite-Dick O (2007) La estrategia de Gestión Integrada para la Prevención y el Control del Dengue en la Región de las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 21(1): 55-63.

- Schumacher V & Poehling HM (2012) *In vitro* effect of pesticides on germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. Fungal Biology. 116: 121-132.
- Secretaría de Salud [SSA] (2009) Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. México, Diario Oficial de la Federación, 04 de noviembre de 2009.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. SINAVE/DGE/SALUD/ Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue (2014) [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS\\_2014/panodengue\\_sem\\_07\\_2014.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2014/panodengue_sem_07_2014.pdf). Fecha de consulta: 26 de febrero de 2014.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. Journal of Insect Science. 4:19.
- Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BGJ (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Malaria Journal. 2(29): 1-8.
- Shi WB, Jiang Y, Feng MG (2005) Compatibility of ten acaricides with *Beauveria bassiana* and enhancement of fungal infection to *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) egg by sublethal application rates of pyridaben. Applied Entomology and Zoology. 40(4): 659-666.
- Vázquez-Martínez MG, Rodríguez-Meneses A, Rodríguez AD, Rodríguez MH (2013) Lethal effects of *Gliocladium virens*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the malaria vector *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Biocontrol Science and Technology. 23(9): 1098-1109.
- Xu ST, Ying SH, Feng MG (2002). Biological compatibility of ten comercial pesticides with *Beauveria bassiana* conidia. Acta Phytophyl Sinica. 29: 158-162.

## VIII. Anexos

**Tabla 1.** Valores estimados de las concentraciones letales de malatión y clorpirifos-etil con mosquitos de *Ae. aegypti* susceptibles (cepa New Orleans) y resistentes a organofosforados (cepa Loma Zapatero).

Insecticida	Concentración Letal (CL)	Cepa susceptible (IC 95%)	Cepa resistente (IC 95%)
Malatión	CL <sub>15</sub>	0.84 (0.773-0.787)	2.31 (2.048-2.257)
	CL <sub>25</sub>	0.85	2.62
	CL <sub>50</sub>	0.88 (0.821-0.829)	3.29 (2.992-3.145)
	X <sup>2</sup>	5.991	7.815
Clorpirifos-etil	CL <sub>15</sub>	0.41 (0.123-0.249)	5.10 (2.256-2.478)
	CL <sub>25</sub>	0.6	5.70
	CL <sub>50</sub>	0.98 (0.373-0.548)	7.50 (3.435-3.610)
	X <sup>2</sup>	7.815	7.815

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

Tratamiento	% de germinación	Crecimiento vegetativo (cm) al día 14/30	% de inhibición de CV al día 14/30	% de esporulación	T al día 14/30	Clasificación
Control	94.93±2.55C	8.5G/8.49±0.06H	0/0	100C	-	-
Malatión 0.84	88.62±2.10B	6.32±0.54EF/8.28±0.11GH	25.59/2.61	72.91±10.44B	73.21/77.1	C
Malatión 0.85	89.10±2.10B	6.51±0.84F/8.08±0.23FGH	23.43/4.90	61.85±14.70B	64.79/68.5	C
Malatión 0.88	91.39±0.89B	6.05±0.63EF/7.64±0.40F	28.89/10.09	60.13±16.64B	62.33/66.09	C
Malatión 2.31	0A	6.01±0.55EF/7.84±0.26FG	29.31/7.55	0A	14.14/18.49	AT
Malatión 2.62	0A	5.89±0.58E/7.89±0.24FG	30.75/7.16	0A	13.85/18.57	AT
Malatión 3.29	0A	3.43±0.64D/7.10±0.85E	59.64/16.50	0A	8.07/16.7	AT
Clorpirifos 0.41	97.00±2.26CD	2.28±0.37C/3.67±0.77D	73.20/56.83	0A	5.36/8.63	AT
Clorpirifos 0.60	97.11±2.63D	1.81±0.33C/2.60±0.50C	78.69/69.38	0A	4.26/6.12	AT
Clorpirifos 0.98	87.97±2.20B	1.17±0.07B/1.69±0.23B	86.24/80.07	0A	2.75/3.99	AT
Clorpirifos 5.10	0A	0A/0A	100/100	0A	0/0	AT
Clorpirifos 5.70	0A	0A/0A	100/100	0A	0/0	AT
Clorpirifos 7.50	0A	0A/0A	100/100	0A	0/0	AT

Medias seguidas por diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) del control. <sup>1</sup> Altamente tóxico (AT); tóxico (T); moderadamente tóxico (MT); compatible (C) (Alves *et al.*, 1998).

**Tabla 3.** Efecto de malatión y clorpirifos-etil sobre la germinación, crecimiento vegetativo y esporulación de *Trichoderma longibrachiatum*.

Tratamiento	% de germinación	Crecimiento vegetativo (cm) al día 14/30	% de inhibición de CV al día 14/30	% de esporulación	T al día 14/30	Clasificación
Control	93.40±1.99B	8.46±0.13G/8.5G	0/0	100	-	-
Malatión 0.84	93.44±2.00B	6.69±1.27E/7.54±0.74F	21.31/11.27	0	15.74/17.75	AT
Malatión 0.85	97.67±2.46C	7.64±0.34F/8.06±0.17G	10.13/5.20	0	17.97/18.96	AT
Malatión 0.88	93.17±2.82B	7.26±0.36F/7.49±0.45F	14.58/11.93	0	17.08/17.61	AT
Malatión 2.31	0A	3.49±0.70D/5.32±0.50E	58.92/37.35	0	8.22/12.53	AT
Malatión 2.62	0A	3.40±0.54CD/4.99±0.52E	60.03/41.31	0	7.99/11.74	AT
Malatión 3.29	0A	2.86±0.51C/4.26±0.92D	66.34/49.93	0	6.73/10.01	AT
Clorpirifos 0.41	0A	1.42±0.12B/2.51±0.25C	83.33/70.49	0	3.33/5.90	AT
Clorpirifos 0.60	0A	1.18±0.09B/1.85±0.20B	86.18/78.28	0	2.76/4.34	AT
Clorpirifos 0.98	0A	1.09±0.05B/1.44±0.12B	87.16/83.04	0	2.57/3.39	AT
Clorpirifos 5.10	0A	0A/0A	100/100	0	0/0	AT
Clorpirifos 5.70	0A	0A/0A	100/100	0	0/0	AT
Clorpirifos 7.50	0A	0A/0A	100/100	0	0/0	AT

Medias seguidas por diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) del control. <sup>1</sup> Altamente tóxico (AT); tóxico (T); moderadamente tóxico (MT); compatible (C) (Alves *et al.*, 1998).

**Tabla 4.** Efecto de malatión y clorpirifos-etil sobre la germinación, crecimiento vegetativo y esporulación de *M. anisopliae*.

Tratamiento	% de germinación	Crecimiento vegetativo (cm) al día 14/30	% de inhibición de CV al día 14/30	% de esporulación	T al día 14/30	Clasificación
Control	95.52±2.37DE	6.65±1.69F/7.06±1.28F	0/0	100F	-	-
Malatión 0.84	92.98±1.06CD	3.45±1.08CDE/3.93±0.80CD	49.99/46.64	52.67±11.65DE	52.14/52.81	MT
Malatión 0.85	96.11±2.42E	2.91±0.73BCD/3.39±0.54BC	57.88/53.89	100F	88.42/89.22	C
Malatión 0.88	95.47±2.17DE	3.96±1.09DE/4.32±1.01CDE	42.66/41.36	51.68±6.96DE	52.81/53.07	MT
Malatión 2.31	91.30±2.27C	4.51±1.23E/5.06±1.26DE	42.41a/36.20	68.31±26.88E	66.17/67.41	C
Malatión 2.62	96.36±2.46E	4.42±1.08E/5.49±0.86E	43.54a/30.74	32.29±22.45CD	37.12/39.68	T
Malatión 3.29	54.25±5.13B	3.86±1.28DE/4.12±1.21CD	50.71a/48.04	12.49±17.16ABC	19.85/20.38	AT
Clorpirifos 0.41	93.37±1.54CD	2.11±1.02BC/3.17±0.94BC	53.63/42.24	30.37±9.16BCD	33.57/35.85	T
Clorpirifos 0.60	92.20±1.87C	2.13±1.10BC/3.29±0.87BC	53.32/40.11	2.52±0.50AB	11.35/13.99	AT
Clorpirifos 0.98	90.90±1.54C	1.53±0.54B/2.31±0.69B	66.42/57.92	0A	6.72/8.42	AT
Clorpirifos 5.10	0A	0A/0A	100/100	14.56±10.78ABC	11.65/11.65	AT
Clorpirifos 5.70	0A	0A/0A	100/100	0A	0	AT
Clorpirifos 7.50	0A	0A/0A	100/100	0A	0	AT

Medias seguidas por diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) del control. <sup>1</sup> Altamente tóxico (AT); tóxico (T); moderadamente tóxico (MT); compatible (C) (Alves *et al.*, 1998).

