



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN
EN RECURSOS NATURALES Y AMBIENTE

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**AISLAMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
NATIVOS DE TRIATOMA DIMIDIATA Y SU UTILIZACIÓN
COMO CONTROL BIOLÓGICO**

INFORME FINAL

Licda. María Eunice Enríquez Cottón

GUATEMALA 2002

1. Título

Aislamiento de hongos entomopatógenos nativos de *Triatoma dimidiata* y su utilización como control biológico.

2. Integrantes del equipo de investigación

a. Licda. María Eunice Enríquez Cottón	Coordinadora
b. Br. Franklin Herrera (2do. Semester)	Auxiliar de Investigación
c. Roberto Cáceres (1er. semestre)	Auxiliar de investigación
d. M. Sc. María Carlota Monroy Escobar	Personal de apoyo
e. Licda. Antonieta Guadalupe Rodas R.	Personal de apoyo
f. Licda. Liliana Acevedo	Personal de Apoyo
g. M. Sc. María del Carmen Brand	Personal del Apoyo
h. Dra. Conchita Toriello	Asesora internacional

3. Fecha

9 de Enero del 2,001

4. Instituciones participantes o financiantes

- Dirección General de Investigación -DIGI-, PUIRNA.
- Instituto de investigaciones Químicas y Biológicas –IIQB-

5. Índice

6. Resumen	2
7. Introducción	2
8. Antecedentes	3
9. Justificación	3
10. Objetivos	4
11. Revisión de literatura	5
11.1 Mal de Chagas	5
11.2 Vectores	5
11.3 Métodos de control utilizados en Guatemala	5
11.4 Control Biológico	6
11.5 Agentes de control biológico	6
12. Metodología	8
13. Presentación de Resultados	11
14. Discusión	14
15. Conclusiones	15
16. Recomendaciones	16
17. Bibliografía	17
18. Agradecimientos	19

6. Resumen

Triatoma dimidiata, coloniza las casas nuevamente cuando termina el efecto residual del insecticida utilizado para su eliminación ya que ésta especie también vive de forma selvática y se da una migración (principalmente por reproducción). Por lo que es necesario buscar alternativas de control que se caractericen por su permanencia a largo plazo además de su seguridad y economía. En el presente proyecto se aislaron 13 géneros de hongos de *T. dimidiata*: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Sacopulariopsis*, *cladosporium*, *Fusarium*, *paecilomyces*, *trichophyton*, *Circinella*, *syncephalastrum* y *Acremonium*. Sin embargo solamente *Fusarium*, *Mucor* y *Paecilomyces* son reportados como patógenos de insectos. Es necesario identificar hasta especie estos hongos entomopatógenos aislados para así poder realizar las pruebas de virulencia de los mismos y de esa manera saber que hongo se podría utilizar para un programa de control biológico del principal vector del mal de Chagas.

7. Introducción

El control biológico puede definirse como la utilización de enemigos naturales para el control de insectos plaga. Los agentes de control biológico son aquellos enemigos naturales de las plagas, que son utilizados en programas de control biológico. Estos pueden ser parasitoides, depredadores, hongos, bacterias, virus, nemátodos, etc. Los hongos entomopatógenos pertenecen a los grupos: PHYCOMYCETES, ASCOMYCETES, BASIDIOMYCETES y HONGOS IMPERFECTOS. Estos penetran por la cutícula del huésped y se desarrollan dentro del cuerpo que se llena de micelios causando la muerte del huésped. Después de la muerte, si las condiciones son óptimas, el cuerpo se cubre de micelios y las esporas se dispersan.

En el presente estudio se tenía como objetivo primordial el aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos nativos de *Triatoma dimidiata*, principal vector del mal de Chagas en Guatemala. Para lo cual se colectaron vectores en los principales departamentos afectados por el mal de Chagas. Los insectos vivos se cultivaron para la realización de los posteriores bio-ensayos y a los insectos muertos se les realizó un procedimiento de aislamiento de hongos entomopatógenos. Se encontraron un total de 13 géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Sacopulariopsis*, *cladosporium*, *Fusarium*, *paecilomyces*, *trichophyton*, *Circinella*, *syncephalastrum* y *Acremonium*. Sin embargo solamente *Fusarium*, *Mucor* y *Paecilomyces* son géneros reportados como entomopatógenos que se podrían utilizar para la realización de los bioensayos; para comprobar su virulencia y la posibilidad de usarlos como bio-insecticidas del principal vector del mal de Chagas en Guatemala.

8. Antecedentes

Existen dos razones primordiales por las cuales se están buscando alternativas para el control de triatomíneos en toda Latinoamérica: una es la aparición de poblaciones resistentes a los insecticidas y otra es la recolonización de las viviendas por vectores que vienen de hábitats silvestres. Es por esta razón que se está enfocando, hoy en día, al estudio de hongos patógenos de triatomíneos. (Luz & Fargues, 1998)

En Argentina, investigaciones previas con *Bauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* confirmaron la patogenicidad de estos hongos sobre *Triatoma infestans* (principal vector del mal de Chagas en ese país) y llevó a la selección de una cepa nativa virulenta por primera vez, con el propósito de desarrollar un bioinsecticida para el control de este vector. (Lecuona, 2001)

Se han realizado estudios de preliminares sobre la formulación y aplicación en el campo de *B. bassiana* para el control de *T. infestans* (Luz et al. 1999). Se han evaluado diferentes cepas de *B. bassiana* para su utilización como agentes de control biológico de *T. infestans* y *R. prolixus* en Argentina (Lecuona, 2001 & Romaña, 1992). Así como los factores que afectan la producción de conidios de *B. bassiana* de cadáveres de *R. prolixus* muertos por hongos para un mejor control. (Luz & Fargues, 1998)

No se ha estudiado la posibilidad de utilizar otros hongos entomopatógenos para el control de triatomíneos; no se ha hecho ningún aislamiento de cepas de hongos nativos ni bioensayos con hongos entomopatógenos conocidos para el control de *Triatoma dimidiata* principal vector de Chagas en Guatemala.

En el año 1999 se hizo un estudio de la eficacia del uso de *Telenomus fariai* (parasitoide de huevos) como control biológico de *Triatoma dimidiata*. Aunque este parasitoide podría ser efectivo, se ve la necesidad de utilizar otro tipo de agentes de control biológico de ninfas y adultos del principal vector del mal de Chagas en Guatemala. Los hongos entomopatógenos pueden utilizarse como suplemento de algunos tipos de insecticidas y de otros agentes de control biológico.

9. Justificación

En el año 2001 JICA (Agencia de Cooperación Internacional del Japón) y el Ministerio de Salud Pública culminaron el primer año del plan nacional de control de los vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala; que tiene una duración de dos años. Se realizó en los departamentos de Chiquimula, Zacapa, Jutiapa y Santa Rosa, los departamentos de más riesgo. Sin embargo se conoce que *Triatoma dimidiata* coloniza las casas nuevamente cuando termina el efecto residual del insecticida utilizado ya que ésta especie también vive de forma selvática y hay una migración de éstos a las casas en el período entre la época seca y la época lluviosa.

Por lo anterior es necesario buscar métodos de control alternativos a largo plazo y que además se caractericen por su economía y ante todo por su seguridad para el ambiente y los seres humanos. Esta tarea se comenzó a llevar a cabo en el año 1999 donde se realizó un estudio de la eficacia del uso de *Telenomus fariai* (parasitoide de huevos) como control biológico de *Triatoma dimidiata*. Sin embargo este parasitoide tiene un inconveniente; ataca solamente una de las etapas de desarrollo

de los vectores de la enfermedad de chagas, los huevos, dejando sin control los 5 estados ninfales y los adultos. Por lo que podría utilizarse solamente como parte complementaria de algún tipo de control que sí afecte todos los estadíos del insecto. Por lo anterior se ve la necesidad de utilizar otro tipo de agentes de control biológico de ninfas y adultos del principal vector del mal de Chagas en Guatemala y los hongos entomopatógenos son una alternativa ya que estos presentan varias ventajas: 1) no infectan a los insectos por la vía alimentaria o tracto respiratorio sino por la cutícula, lo que es cien veces más efectivo y rápido; 2) Es posible reproducirlos en grandes cantidades en el laboratorio a un bajo costo porque se utiliza un medio artificial de reproducción y no necesitan a los insectos hospederos para tales fines; y 3) Para su producción, formulación y aplicación es factible utilizar equipo convencional de aspersión con agroquímicos. Por todo lo anterior es necesario comenzar el estudio de la utilización de hongos entomopatógenos para el control de triatomíneos vectores del mal de Chagas.

En otros países se han hecho pruebas de susceptibilidad de los triatomíneos a los hongos entomopatógenos más famosos (*Bauveria* y *Metharizium*) aislados de plagas de cultivos agrícolas, más sin embargo nadie ha aislado los hongos entomopatógenos que afectan naturalmente a estos insectos u hongos nativos que podrían ser más efectivos y sin alterar el equilibrio natural existente.

Es por todo lo anterior que creemos necesario el estudio de estos hongos entomopatógenos nativos de *Triatoma dimidiata* y ofrecer una alternativa de control de éstos vectores del mal Chagas diferente a la utilización de insecticidas.

10. Objetivos

10.1 General

a. Evaluar el potencial de los hongos entomopatógenos nativos de *Triatoma dimidiata* para su uso como control biológico en éste triatomíneo.

10.2 Específicos

a. Búsqueda, aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos nativos de *Triatoma dimidiata*.

b. Sugerir la utilización de un hongo entomopatógeno para la realización de bioensayos.

11. Revisión de literatura

11.1 Mal de Chagas

La enfermedad de Chagas es una parasitosis que puede lesionar seriamente el corazón, aparato digestivo y sistema nervioso. Esta enfermedad estaba primitivamente circunscrito a los mamíferos silvestres, existiendo desde la Patagonia hasta el sur de los Estados Unidos. Los reservorios silvestres conviven con las chinches silvestres y mantienen el parásito responsable de la enfermedad, *Trypanosoma cruzi*. Cuando el hombre invade los bosques ocurre un desequilibrio y las chinches son desalojadas de su ecotópo, invadiendo las viviendas rústicas del hombre, es así como la enfermedad llega al humano y animales domésticos. Hoy en día la OMS indica que de 16 a 18 millones de personas están infectadas, y otros 90 millones en riesgo, lo que representa una prevalencia media del 4% de la población total de Latinoamérica. (Schofield C, 1994)

11.2 Vectores

Los principales vectores del mal de chagas en Guatemala son: *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma nitida*. Se considera que el vector más importante y de mayor distribución es *Triatoma dimidiata*, ya que tiene una distribución muy amplia y ha sido encontrado en casi todos los departamentos con excepción de Sololá, Chimaltenango y Totonicapán. *Rhodnius prolixus* es un vector que alcanza densidades domiciliarias altas, pero con distribución restringida. *Triatoma nitida* es el menos distribuido y con densidades intradomiciliares medias (Monroy et al. 1996).

11.3 Métodos De Control Utilizados En Guatemala

Mejoramiento de vivienda : Carlos Chagas observó que las chinches vivían en grietas y hendiduras en casas rurales de mala calidad, concluyó que sin tales grietas no habría ningún nicho doméstico para las chinches (Schofield C, 1994), esto incluye transformación de las paredes en piedra, block o repellos con cal y ceniza, cemento, bajareque pintado con cal o pintura, etc. de esta manera las chinches son más susceptibles a depredadores al ser más visibles en una superficie lisa y blanca y es más difícil encontrar un lugar para oviponer . Este efecto higiénico mecánico explica como los repellos y emplastos de pared disminuyen la población de chinches vectoras (Monroy et al., 1993).

Insecticidas : Otra forma efectiva para prevenir la enfermedad de Chagas es el control de las poblaciones de insectos con insecticidas, rociando las paredes dentro de la vivienda. Las chinches son muy susceptibles a organofosforados y piretroides, entre ellos Lambda-cyhalothrin (ICON) funciona muy bien y no irrita ojos y nariz. (Rodas A, 1995 ; Tabaru J, 1995).

Participación comunitaria : Consiste en dar educación a la población en riesgo, sobre la biología y comportamiento de los vectores para propiciar su ayuda en la erradicación del mismo. (Schofield C, 1994)

11.4 Control Biológico

El control biológico puede definirse como la utilización de enemigos naturales para el control de insectos plaga. (Sterh F, 1990) El control biológico natural es en el que el hombre no maneja activamente a los enemigos naturales y el control biológico aplicado o clásico es donde el hombre sí manipula los enemigos naturales. Entre las ventajas del control biológico está su seguridad, permanencia y economía. (Sterh F, 1990)

Una desventaja menor es que lleva mucho tiempo implantarlo debido a la investigación que se requiere para ponerlo en marcha, sin embargo para patentar un insecticida también se necesitan años de investigación. (Sterh F, 1990)

El difícil manejo de las plagas debido a la resistencia de las mismas , la contaminación ambiental, efectos trágicos en el hombre, la contaminación de alimentos con residuos (en el caso de plagas agrícolas) y el uso excesivo de plaguicidas, han contribuido al impulso de nuevas alternativas de control de plagas de importancia económica, en los últimos cinco años en Guatemala se han creado instituciones privadas y comerciales que han impulsado fuertemente el control biológico de plagas de este tipo. (Hernandez A, 1992)

11.5 Agentes de Control biológico

Agentes de control biológico se le llama a los enemigos naturales de las plagas, que son utilizados en programas de control biológico. Estos pueden ser parasitoides, depredadores, hongos, bacterias, virus, nemátodos, etc.

Entomopatógenos

Ciertos patógenos provocan epizootias a altas densidades de poblaciones. Pueden resultar en mortalidades muy altas, en algunos casos casi el 100%. Otras enfermedades solamente debilitan a los insectos, haciéndolos más susceptibles a otros factores de mortalidad. (Schotman & Lacayo, 1989)

El potencial de dispersión de los patógenos depende de varios factores : la virulencia del microorganismo, susceptibilidad de huésped y transmisión de un individuo a otro o de una población a otra. La mayoría de los patógenos dependen para su movilidad de factores físicos (agua, viento) o bióticos. (Schotman & Lacayo, 1989)

Bacterias : La mayoría de las bacterias asociadas con los insectos son inofensivas. Pocas causan la muerte del huésped. Las infecciones inician generalmente por la ingestión de bacterias patógenas. La infección causa la muerte del huésped y esporas

o células vegetativas son producidas en el cadáver y liberados en el ambiente. A veces las enfermedades bacteriales son transmitidas por parásitos que introducen bacterias directamente en la hemocele del huésped. La ocurrencia de epizootias depende de la densidad poblacional y temperatura. Los insectos atacados por bacterias patógenas presentan los siguientes síntomas: Pérdida completa del apetito; diarrea y regurgitación, descoordinación, parálisis y muerte. El cadáver tiene muchas veces el color característico: generalmente gris, luego café o negro. (Poinar & Thomas, 1978)

Virus Son entidades patogénicas submicroscópicas. Los virus patógenos de insectos son en su mayoría *Baculovirus*: poliedrosis nuclear, poliedrosis citoplasmática y granulosis. Forman entidades que contienen muchas partículas de virus que se pueden distinguir con microscopio compuesto. La infección del insecto ocurre después de la ingestión de las partículas de virus. Estas pasan a los tejidos susceptibles y se multiplican. A veces la infección puede estar oculta. La activación como condiciones de altas densidades poblacionales del insecto, puede producir epizootias explosivas. Las larvas de lepidópteros con poliedrosis nuclear tienen la tendencia de subir a los puntos más altos de la planta, se ponen flácidas, mueren y el contenido del cuerpo se desintegra, la cutícula se vuelve frágil y al tocarla sale un líquido lechoso. En larvas de lepidóptera con poliedrosis citoplasmática el crecimiento es retardado, el intestino es visible a través del integumento como un área amarillo pálido o blanco. Después los poliedros vírales salen por regurgitación o por los excrementos. La cutícula normalmente no se pone frágil como en el caso de la poliedrosis nuclear. Los síntomas de los virus granulosis no son específicos y varían considerablemente de un insecto a otro. Generalmente el insecto se vuelve pálido, pierde apetito y la hemolinfa se vuelve lechosa. El integumento no se vuelve frágil, excepto en los casos donde la epidermis está infectada por el virus. (Schotman & Lacayo, 1989)

Hongos Los hongos patógenos penetran por la cutícula del huésped y se desarrollan dentro del cuerpo que se llena de micelios causando la muerte del huésped. El insecto enfermo pierde apetito, muchas veces cambia de color y la cutícula puede tener manchas negras que indican los lugares donde penetró el hongo. Después de la muerte, si las condiciones son óptimas, el cuerpo se cubre de micelios. El cadáver muchas veces se momifica y se vuelve completamente duro y otras veces toma una consistencia como la del queso (Poinar & Thomas, 1978). Las esporas se dispersan por el viento, agua o insectos vivos. La especificidad de huéspedes varía según la especie. La ocurrencia de epizootias depende de la densidad de población del huésped y de las condiciones climáticas especialmente humedad y temperatura. (Schotman & Lacayo, 1989)

La mayoría de publicaciones sobre hongos en insectos menciona a *Entomophthora*, *Beauveria*, *Metarrhizium*, o *Aspergillus* que son generalmente los más comunes encontrados en la naturaleza. Los cuatro más grandes grupos de hongos verdaderos contienen especies entomopatógenas. Los taxa fungales más frecuentemente asociados con enfermedades de insectos son PHYCOMYCETES (*Entomophthora* y *Massospora*), ASCOMYCETES (*Cordyceps*), BASIDIOMYCETES

(*Septobasidium*K), HONGOS IMPERFECTOS (*Aspergillus*, *Beaveria*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Metharrizium*, *Paecilomyces* y *Spicaria*). Muchos de estos géneros son principalmente o exclusivamente asociados con escamas y escarabajos. El rango de hospederos de algunas especies de *Coelomyces*, *Entomophthora*, *Massospora*, *Hirsutella* y *Septobasidium* son limitados a una familia, genero o a pocas especie de insectos pero la regla con la mayoría de los hongos patogénicos aislados es un amplio rango de hospederos. (Roberts D.W. et al, 1971)

12. Metodología

12.1 BUSQUEDA DE *Triatoma dimidiata* EN EL CAMPO

Se realizaron un total de 16 giras de campo. Las siguientes localidades son del oriente del país (área endémica del mal de Chagas) donde se buscaron chinches domésticas: San José Acatempa, la perla y Moyuta del departamento de Jutiapa; El Salitre, Primera Sabana, Chapas y Santa Barbara del departamento de Santa Rosa; y Esquipulas del departamento de Chiquimula. En las siguientes localidades se colectaron vectores silvestres: Yaxhá del departamento del Petén y Lachúa, Cobán del departamento de Alta Verapaz. También se visitó San Andres Sajcabajá del departamento de Quiché. Estas giras de campo se realizaron para colectar huevos, ninfas y adultos de *Triatoma dimidiata* vivos y muertos de forma natural. Todo esto con dos objetivos: 1) para reproducirlas masivamente en el laboratorio y posteriormente realizar los bioensayos de virulencia del hongo encontrado y 2) para la realización del aislamiento de hongos entomopatógenos nativos de dichos insectos plaga.

La búsqueda de los vectores se realizó de la siguiente manera: entre las grietas de las paredes, debajo de los colchones y detrás de los cuadros con la ayuda de una linterna de mano. Posteriormente se colocaron dentro de un recipiente plástico, conteniendo papeles doblados en forma de acordeón, cerrado con una malla y un hule. Se colocó en el frasco una etiqueta que contenía los datos de colecta (lugar, fecha, lugar donde se encontró la chinche y nombre del dueño de la casa). Los insectos muertos encontrados, se colocaron en un recipiente por aparte con los mismos datos de colecta. Al llegar al laboratorio los insectos muertos y los que se murieron durante el transporte se ingresaron a una base de datos para posteriormente ser sometidos al procedimiento de aislamiento de hongos entomopatógenos.

12.2 CRIANZA DE RATONES Y CONEJOS

Se inició y mantuvo la crianza de siete ratones y dos conejos para la alimentación de *T. dimidiata* en estado de ninfa y adulto. Los ratones se mantuvieron dentro de cajas de plástico transparente cubiertos con una tapadera de malla metálica. Como sustrato se utilizó aserrín, se alimentaron con concentrado y agua. Los conejos se mantuvieron en unas jaulas especiales de mayor tamaño y al igual que a

los ratones se les alimentó con concentrado y agua. Tanto a los conejos como a los ratones se les cambió comida, sustrato y agua dos veces por semana. (Ochoa A et. al, 1996)

12.3 CULTIVO MASIVO DE *T. dimidiata*

El pie de cría para el cultivo de *Triatoma dimidiata* provino de colectas hechas en el 2,000 provenientes de los departamentos de Santa Rosa y Jutiapa. Además se fue incrementando con las chinches obtenidas durante cada gira de campo. Estas chinches fueron mantenidas a temperatura controlada dentro de una cámara ambiental a 26.5 ° C y 60% de humedad. Se alimentaron cada semana, ofreciéndoles ratones y conejos de laboratorio inmovilizados con una malla metálica, en total oscuridad, donde ellas les succionaron la sangre. Para alimentar a los 3ros., 4tos., 5tos. estadios y adultos se utilizó un conejo y para alimentar a los 1ros. Y 2dos. estadios se utilizó ratones. Las chinches permanecieron en envases de plástico blanco o de vidrio, debidamente etiquetados (señalando su procedencia exacta y fecha de colecta), tapados con una tela de gasa. Dentro de los frascos se colocaron papeles doblados en forma de acordeón, para que de esa manera se protegieran de la luz directa (los hábitos de los triatominos son nocturnos) y tuvieran mayor superficie donde reposar. (Tabaru Y, 1995)

Actualmente se cuenta con más de 1,000 chinches vectores del mal de Chagas de cultivo de laboratorio para poder realizar los bioensayos para comprobar la virulencia de los hongos entomopatógenos aislados.

12.4 AISLAMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

La metodología de aislamiento se cambio tres veces durante el transcurso del año buscando una menor contaminación ambiental y una mayor probabilidad de aislar los hongos entomopatógenos. Sin embargo el principio se mantuvo desde el comienzo. La metodología de aislamiento utilizada fue la siguiente : Se preparó un mechero y se desinfectó en área a utilizar con fenol o alcohol. Cada uno de los insectos muertos se lavó durante 30 seg. en agua destilada, se lavo 1 min. en hipoclorito de sodio al 10%, se lavó 30 seg. en alcohol al 70%, se lavó 1 min. en solución salina o agua estéril, se lavó 1 min. en estreptomycin al 0.05 % y luego se lavó 30 seg. con agua estéril. Posteriormente los insectos se colocaron en una cámara húmeda estéril conformada por una caja de petrí con papel filtro humedecido con una gota de agua y sellada con parafilm. Se etiquetaron la cajas de petrí con la información correspondiente. Posteriormente se dejaron las cajas a temperatura ambiente durante 7-10 días para inducir el crecimiento de hongos en caso de encontrarse presentes. (Estrada R, 2000 com. Pers; Sagar, 1999 & Toriello C, 2001)

En el presente proyecto se realizó un total de 483 aislamientos de diferentes estadios del vector *Triatoma dimidiata*.

12.5 IDENTIFICACION DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

Siete días después del aislamiento se revisaron las cámaras húmedas. Cuando se observaron cuerpos fructíferos o micelios de hongos cubriendo el cuerpo del insecto, dentro de la cámara húmeda, se sembró el hongo en tubos con medio de cultivo PDA o Sabourauou y se esperó de 7 a 10 días para que creciera el hongo. Posteriormente Se tomó una porción del mismo y se colocó en un portaobjetos, se le colocó una gota de azul de lactofenol, cubreobjetos y se observó al microscopio. Se dibujaron y describieron los elementos reproductivos sexuales y asexuales por ejemplo : esporas , conidias y conidióforos con sus formas características. Posteriormente se identificaron hasta genero utilizando una clave dicotómica de los principales hongos entomopatógenos y con la ayuda de la licda. Liliana Acevedo, especialista en hongos micromicetos (Escuela de química biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). Cuando las estructuras no se observaron muy bien se procedió a realizar un microcultivo o cultivo en lámina que consiste en lo siguiente : sembrar una porción del hongo en un cuadro de medio de cultivo de 1cm² que se encuentra sobre un portaobjetos en una cámara húmeda, se coloca el cubreobjetos y se espera de 3 a 5 días. De aquí se sacan dos láminas a las cuales se les agrega una gota de azul de lactofenol y se observan a microscopio. De esta manera se observaron muy bien los conidióforos y facilitó la identificación de los mismos. Cuando se identificaron los géneros de los hongos aislados se enviaron al laboratorio de Micología de la Universidad autónoma de México para la identificación hasta especie. Sin embargo este es un procedimiento lleva por lo menos 6 meses por lo que no se tiene conocimiento de las especies de hongos aisladas. (Bustillo A, 1989 & Toriello C, 2001)

12.6 ALMACENAMIENTO DE LOS HONGO AISLADOS

Los hongos aislados y de nuestro interés porque posiblemente son entomopatógenos se sembró en un tubito plástico conteniendo medio de cultivo Papa Dextrosa Agar -PDA- . Después que el hongo creció se le colocó aceite mineral estéril. Se colocó en la refrigeradora a - 4 grados centígrados. (Smith, D. 1994)

13. Presentación de resultados

13.1 Listado de Hongos Aislados

Número	Genero	Descripción
1	Penicillium	Principal contaminante
2	Rhizopus	Saprophyto
3	Fusarium	Entomopatígeno
4	Aspergillus	Principal contaminante
5	Gliocladium	Saprophyto
6	Mucor	Entomopatígeno
7	Cladosporium	Saprophyto
8	Scopulariopsis	Saprophyto
9	Acremonium	Saprophyto
10	Syncephalastrum	Saprophyto
11	Trichophyton	Saprophyto
12	Circinella	Saprophyto
13	Paecilomyces	Entomopatígeno

13.2 Porcentaje de Aparición en los aislamientos:

Número	Genero	Porcentaje de aparición en los aislamientos
1	Penicillium	27.6
2	Rhizopus	3.9
3	Fusarium	3.9
4	Aspergillus	21.05
5	Gliocladium	1.3
6	Mucor	10.5
7	Cladosporium	14.5
8	Scopulariopsis	9.2
9	Acremonium	1.3
10	Syncephalastrum	1.3
11	Trichophyton	1.3
12	Circinella	1.3
13	Paecilomyces	2.6

13.3 Descripción de los géneros más importantes

a. **PENICILLIUM** Link: conidióforos que salen del micelio individualmente o menos frecuentemente en sinemas ramificados cerca del ápice, peniciliado, terminando en un grupo de filidios; conidias (filosporas) hialinas o brillantemente coloreadas en masa, unicelulares, mayormente globoso u ovoide, en cadenas secas basipedales. (Barnett, 1998)

b. **PAECILOMYCES** Bain: conidióforos y ramas más divergentes que *Penicillium*; conidias (filosporas) en cadenas secas basipedales, unicelulares, ovoides o fusoides, hialinas; saprofito. (Barnett, 1998)

Colonia de incolora a pigmentada (pero nunca negra, café u oliva); células conidiógenas (filidios) con un cuello distintivo, con forma de botela a cántaro, portados individualmente o en verticilos en los conidióforos sobre ramas laterales cortas o en verticilos apicales, conidias aseptadas, hialina a coloreada en cadenas secas divergentes. Clamidosporas o aleurosporas producidas sólo por algunas especies. (Humber. 1997)

c. **ASPERGILLUS** Link: conidióforos hacia arriba, simples, terminando en un abultamiento globoso o clavado, porta filidios en el ápice o radiando desde el ápice o sobre toda la superficie; conidias (filosporas) unicelulares, globosas, a menudo de varios colores en masas, en cadenas secas basipedales. (Barnett. 1998)

d. **GILOCALDIUM** Corda: conidióforos hialinos, la porción superior porta ramas peniciliadas, formando un "cepillo" compacto como en *Penicillium*; conidias (filosporas) hialinas o brillantemente coloreadas en masa, unicelulares, producidas apicalmente en forma sucesiva, colectándose en "gotas" mucilaginosas, saprofitas, comunes en el suelo. (Barnett. 1998)

e. **SCOPULARIOPSIS** Bain: conidióforos mayormente ramificados o producen en el ápice un racimo de células conidiógenas que proliferan después de producirse la conidia siguiente, dejando elevaciones en las puntas; conidias (anelosporas) hialinas o subhialinas, unicelulares globosas con base truncada, producidas en cadenas basipedales; colonias de otro color que verde o azul; saprofitas en el suelo. (Barnett. 1998)

f. **CLADOSPORIUM** Link: conidióforos altos y oscuros, creciendo hacia arriba, varias ramificaciones cerca del ápice, en racimos o simple; conidias (blastosporas) oscuras, de una a dos células, variables en forma y tamaño, ovoides a cilíndricas o irregulares, algunas típicamente con forma de limón, a menudo en cadenas acropetalosas simples o ramificadas, parásitas en plantas superiores o saprofitas. (Barnett. 1998)

g. **TRICHOPHYTON** Malmsten: microconidias hialinas, pequeñas, unicelulares, a los lados de la hifa, macroconidias (aleurosporas) grandes, multicelulares, de pared

delgada, hialinas , clavadas con ápice redondeado causan dermatomisis en el hombre. (Barnett. 1998)

h. FUSARIUM Link: micelio extensivo parecido al algodón en cultivos, a menudo con tintes de rosa, púrpura o amarillo en el medio del micelio; conidioforas variables, delgadas y simples, o robustas y cortas, irregularmente ramificadas portando un verticilo de filidios, solas o agrupadas en esporodoquios ; conidias (fialosporas) hialinas, variables, principalmente de dos tipos, a menudo contenidas en pequeñas cabecillas húmedas; macroconidias multicelulares, ligeramente curvadas o dobladas hacia las puntas, típicamente con forma de canoa; microconidias unicelulares, ovales u oblongas, portadas simples o en cadenas; algunas conidias intermediarias, de 2 a 3 células, oblongos o ligeramente curvos; parásitas de plantas superiores o saprofitas de material vegetal en descomposición. (Barnett. 1998, Humber. 1997)

i. SYNCEPHALASTRUM Schroet: micelio de rápido crecimiento, ramas abundantes; conidióforos (esporangióforos) erectos, de puntas alargadas, portando una cabeza de esporangiolos con forma de bastón, cada uno produce una fila de conidias casi esféricas; la pared del esporangiole se disuelve para dar lugar a las conidias; saprofitos. (Barnett. 1998)

13.4 Fotografías y Esquemas de los géneros encontrados

Ver anexos 2 y 3

14. Discusión

Se puede observar en los resultados que los hongos más comunes son *Aspergillus* y *Penicillium* (48.65%) que son los principales contaminantes debido a que las esporas de estos hongos se encuentran en casi todos lados y producen una gran cantidad de esporas que es difícil librarse de ellas. A pesar de que se toman las precauciones debidas durante el aislamiento de los hongos entomopatógenos; casi el 50 % se contamina con una de estas dos especies. Sin embargo si se utilizan medios para eliminar estos hongos contaminantes es muy probable que se eliminen los hongos entomopatógenos que son menos abundantes por lo que hay que aprender a convivir con esta clase de contaminación.

Paecylomyces, *Fusarium* y *Mucor* que forman un 17 % de los hongos aislados pertenecen a géneros reportados como entomopatógenos. El resto de los hongos aislados (34.35 %) pertenecen a una gran gama de hongos saprofitos u oportunistas que se encuentran conviviendo dentro del cuerpo de las chinches.

Aunque se realizó el procedimiento de aislamiento a un total de 483 chinches *T. dimidiata*, solamente unas cuantas eran chinches encontradas muertas dentro de las viviendas por lo que con esto se reduce la probabilidad de encontrar con mayor facilidad los hongos entomopatógenos deseados. Esto se debe probablemente a que el ciclo de vida de *Triatoma dimidiata* es muy largo (más de un año) y aunque esta especie se encuentra distribuida en casi todo el territorio nacional las poblaciones dentro de las casas es de varias decenas (sin embargo la transmisión de la enfermedad es muy efectiva ya que basta que una chinche sea portadora de *Tripanosoma cruzi* para que infecte a toda la familia) por lo que esto dificulta tanto el proceso de aislamiento como el contar con muchas chinches para la realización de los bioensayos para comprobar la virulencia de los hongos entomopatógenos encontrados.

Por todo lo anterior el procedimiento para encontrar un hongo entomopatógeno requiere mucho más tiempo del que se cree, sin embargo vale la pena hacer el esfuerzo para encontrar alternativas de control más amigables con el ambiente y la salud del ser humano. Para comprobar la efectividad de un agente de control biológico de una plaga se necesita realizar mucha investigación previa para asegurarnos de que funcione para controlar la plaga y al mismo tiempo asegurarnos de su inocuidad y seguridad hacia los seres humanos principalmente si son plagas de importancia médica donde la aplicación de los bioinsecticidas se debe realizar dentro de las casas.

Otra razón por la cual se cree que es difícil el aislamiento de hongos entomopatógenos de *Triatoma dimidiata* es porque la gente utiliza muchas clases de insecticidas dentro de las casas para controlar muchas de las plagas que las acechan. Por lo que eliminan a los agentes de control biológico que podrían actuar dentro de las casas para el control de las mismas. Principalmente aquí en Guatemala donde se utilizan muchos insecticidas que están prohibidos en los países desarrollados por causar daños al hombre y al ambiente.

Los hongos entomopatógenos también se encuentran en el suelo por lo que se podrían aislar del mismo, para esto existen técnicas especiales las cuales se pueden emplear para tal fin.

Otra forma de aislar hongos entomopatógenos es propiciar la infección de los mismos hacia las chinches lo que se podría lograr aumentando la humedad relativa del ambiente para que las chinches más débiles sean las afectadas por estos hongos entomopatógenos que también se encuentran en el aire.

También es necesario realizar búsquedas de agentes de control biológico en los ambientes silvestres ya que en estos aún se guarda el equilibrio depredador presa porque no se ha interrumpido el equilibrio ecológico. Por lo contrario en los ambientes perturbados por el hombre se dan todas las condiciones para que las plagas se desarrollen mediante la eliminación de sus enemigos naturales.

Se debe aumentar el esfuerzo de colecta de *Triatoma dimidiata* para aumentar la probabilidad de encontrar chinches muertas que en efecto su muerte haya sido provocada por un hongo entomopatógeno lo que requeriría realizar más giras de campo de los que se efectuaron en este trabajo.

Por ultimo quisiera resaltar la importancia de aislar cepas nativas de las plagas que queremos controlar debido a que muy probablemente son más virulentas que las cepas aisladas de otros organismos o aisladas del mismo organismo pero proveniente de otra región o país. Esto se debe a que durante mucho tiempo han estado conviviendo, coevolucionando y los hongos entomopatógenos están adaptándose constantemente a aniquilar a su presa. Además si se utiliza una cepa nativa es muy probable que no existan muchos efectos colaterales y que se afecten otros organismos que podrían ser beneficiosos.

15. Conclusiones

a. Los hongos más comunes son *Aspergillus* y *Penicillium* (48.65%) que son los principales contaminantes debido a que las esporas de estos hongos se encuentran en casi todos lados y producen una gran cantidad de esporas que es difícil librarse de ellas.

b. *Paecylomyces*, *Fusarium* y *Mucor* que forman un 17 % de los hongos aislados pertenecen a géneros reportados como entomopatógenos. El resto de los hongos aislados (34.35 %) pertenecen a una gran gama de hongos saprofitos u oportunistas que se encuentran conviviendo dentro del cuerpo de las chinches.

c. De las chinches a las que se les realizó el procedimiento de aislamiento muy pocas fueron encontradas muertas dentro de las viviendas por lo que con esto se reduce la probabilidad de encontrar con mayor facilidad los hongos entomopatógenos deseados.

d.El procedimiento para encontrar un hongo entomopatógeno requiere mucho más tiempo del que se cree, sin embargo vale la pena hacer el esfuerzo para encontrar alternativas de control más amigables con el ambiente y la salud del ser humano.

e. Para comprobar la efectividad de un agente de control biológico de una plaga se necesita realizar mucha investigación previa para asegurarnos de que funcione para controlar la plaga y al mismo tiempo asegurarnos de su inocuidad y seguridad hacia los seres humanos principalmente si son plagas de importancia médica donde la aplicación de los bioinsecticidas se debe realizar dentro de las casas.

f. El difícil el aislamiento de hongos entomopatógenos de *Triatoma dimidiata* también se debe a que la gente utiliza muchas clases de insecticidas dentro de las casas para controlar muchas de las plagas que las acechan. Por lo que eliminan a los agentes de control biológico que podrían actuar dentro de las casas para el control de las mismas. Principalmente aquí en Guatemala donde se utilizan muchos insecticidas que están prohibidos en los países desarrollados por causar daños al hombre y al ambiente.

g. La importancia de aislar cepas nativas de las plagas que queremos controlar radica en que muy probablemente son más virulentas que las cepas aisladas de otros organismos o aisladas del mismo organismo pero proveniente de otra región o país. Esto se debe a que durante mucho tiempo han estado conviviendo, coevolucionando y los hongos entomopatógenos están adaptándose constantemente a aniquilar a su presa. Además si se utiliza una cepa nativa es muy probable que no existan muchos efectos colaterales y que se afecten otros organismos que podrían ser beneficiosos.

16. Recomendaciones

a. Aislar hongos entomopatógenos que se encuentran en el suelo utilizando técnicas especiales las cuales se pueden emplear para tal fin.

b. Aislar hongos entomopatógenos propiciando la infección de los mismos hacia las chinches lo que se podría lograr aumentando la humedad relativa del ambiente para que las chinches más débiles sean las afectadas por estos hongos entomopatógenos que también se encuentran en el aire.

c. Es necesario realizar búsquedas de agentes de control biológico en los ambientes silvestres ya que en estos aún se guarda el equilibrio depredador presa porque no se ha interrumpido el equilibrio ecológico. Por lo contrario en los ambientes perturbados por el hombre se dan todas las condiciones para que las plagas se desarrollen mediante la eliminación de sus enemigos naturales.

d. Se debe aumentar el esfuerzo de colecta de *Triatoma dimidiata* para aumentar la probabilidad de encontrar chinches muertas que en efecto su muerte haya sido provocada por un hongo entomopatógeno lo que requeriría realizar más giras de campo de los que se efectuaron en este trabajo.

17. Bibliografía

1. Bustillo A. 1989. En Andrews K. & Quezada J. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura : estado actual y futuro. Departamento de protección vegetal escuela agrícola panamericana. El Zamorano, Honduras, Centroamérica.
2. Barnett, H. & Hunter B. 1,998. Illustrated genera of Imperfect Fungi. 4 ed. APS press. Minnesota, USA. 218 pp.
3. Estrada R. 2,000. Comunicación personal.
4. Fortuny A. 1998. Informe sobre el entrenamiento : "Evaluación de Efectividad y Resistencia a Insecticidas en Vectores de la Enfermedad de Chagas". Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, CIPEIN (CITEFA-CONICET). Buenos Aires, Argentina.
5. Hernandez A. 1,992. Pasado, presente y Futuro del Control Biológico en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, FAUSAC. Sin publicar.
6. Humber, R. 1,997. Fungi: Identification. En Lacey, L. 1,997. Manual of techniques in insect pathology. Academic press, Inc. California, USA. 409 pp.
7. Lecuona RE, Edelstein JD, Berreta MF, La Rossa FR & Arcas JA. 2,001. Evaluation of *Bauveria bassiana* (hyphomycetes) strains as potencial agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Entomological Society of America. Vol.38, no.2. 172-179.
8. Luz C & Fargues J. 1,998. Factors affecting conidial produccion of *Bauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. Journal of invertebrate pathology. 72, 97-103.
9. Luz C, Silva IG, Magalhaes IP, Cordeiro C & Tigano MS. Control of *Triatoma infestans*. Prelimina assays on formulation and application in the field. 1,999. An. Soc. Entomol. Brasil. 28 (1). 101-110.
10. Monroy C, Mejia M, Rodas A y Tabaru Y. 1996. Resultados preliminares de la situación actual en la distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas a nivel nacional. Enf. Trop. en Guat. No.5, 143-150.

11. Monroy C. et al .1993. Pinturas y emplastos de pared como formas de control de los Vectores de la Enfermedad de Chagas. *Enf. Trop. en Guatemala*. No.2, 116-117.
12. Ochoa A. et al . 1996. Investigaciones epidemiológicas del vector de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatan, Santa Rosa. *Enf. Trop. en Guatemala*. No. 5, 110-115.
13. Poinar GO & Thomas. 1984. *Laboratory Guide to insect Pathogens and parasites*. Plenum press, New York.
14. Rodas A. et. al. 1995. Estudios Preliminares con Insecticidas para el Control de los Vectores de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. *Enf. Trop. en Guatemala*. No.2, 126-131.
15. Roberts, D. , Yeldon, W. 1971. En Burges H.D., Hussey N.W. *Microbial Control of Insects and mites*. Academic Press Inc. London. 861 pp.
16. Romaña C, Fargues J. 1992. Relative susceptibility of diferent stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Bauveria bassiana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 87 (3) : 363-368, Jul./ Sep.
17. Sagar, 1999. Apéndice técnico de la NOM-049-FITO-1995, por la que se establece la campaña contra la langosta. SAGAR-CONASAG-DGSV. Série de apéndices técnicos. Apendice 3. México, DF.
18. Schofield CJ. 1994. *Triatominae; Biología y control*. Tims Sylvia, Trad. USA: Eurocomunica Publicatións. 80pp.
19. Schotman & Lacayo, 1989. En Andrews K. & Quezada J. *Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura : estado actual y futuro*. Departamento de protección vegetal escuela agrícola panamericana. El Zamorano, Honduras, Centroamérica.
20. Smith D & Onions AHS. 1,994. *The preservation and maintenance of living fungi*. 2 nd. Edition. CAB Internacional. UK. 122 pp.
21. Stehr F.1990. *Parasitos y Depredadores en el Manejo de Plagas*. En R. Metcalf . 1990. *Introducción al Manejo de Plagas de Insectos* . Editorial Limusa .
22. Tabaru Y. 1995. *Métodos de prevención de la enfermedad de Chagas*. No publicado.

23. Toriello, C. 2,001. Comunicación personal. Laboratorio de Micología, Universidad Autónoma de México.
24. Weiser J & Briggs J . 1971. En Burges H.D., Hussey N.W. Microbial Control of Insects and mites. Academic Press Inc. London. 861 pp.

18. Agradecimientos

1. Mis más sinceros agradecimientos a la Licda. Carlota Monroy y Licda Antonieta Rodas por su apoyo en la realización de la presente investigación.
2. Le agradezco a la Licda. María del Carmen Brand por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio de Microbiología de la Escuela de Química Biológica.
3. Le agradezco a la Licda. Liliana Acevedo por la identificación de los hongos y por la toma de las fotografías del presente informe.
4. Le agradezco a la Licda. Julieta Pezarozzi por permitirme utilizar las instalaciones de la Escuela de Química.
5. Le agradezco a los Br. Roberto Cáceres y Franklin herrera por su gran ayuda en la realización del proyecto.