



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

AISLAMIENTO, ANÁLISIS MOLECULAR Y METABOLITOS DE

Beauveria peruviansis CON POTENCIAL ENTOMOPATOGENO

AISLADOS DEL PICUDO DE LAS ANONÁCEAS (*Optatus palmaris*)

(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) (PASCOE 1889).

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

BEATRIZ HERNÁNDEZ MEDINA

Bajo la supervisión del:

DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN



CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO. JUNIO 2023

**Aislamiento, análisis molecular y metabolitos de Beauveria peruvienis
con potencial entomopatógeno aislados del picudo de las anonáceas
(*Optatus palmaris*) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) (PASCOE 1889).**

Tesis realizada por **BEATRIZ HERNÁNDEZ MEDINA** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

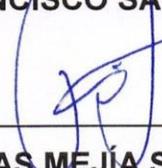
DIRECTOR: _____


DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN

Co-Director: _____


M.C. LUIS FRANCISCO SALOMÉ ABARCA

ASESOR: _____


DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

ASESOR: _____


DRA. NORMA MARINA ALARCÓN RODRÍGUEZ

CONTENIDO

CONTENIDO.....	ii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE APENDICE.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRAFICOS	ix
RESUMEN GENERAL	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVO GENERAL.....	3
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
5. HIPÓTESIS / SUPUESTO DE INVESTIGACIÓN.....	3
6. LITERATURA CONSULTADA	4
7. CAPITULO I: ESTRATEGIAS DE MANEJO DE PLAGAS EN EL CULTIVO DE GUANABANA	6
7.1.1 Generalidades de la guanábana.....	6
7.1.2 Clasificación taxonómica de la guanábana.....	7
7.1.3 Descripción botánica.....	7
7.1.4 Ciclo de maduración del fruto de la guanábana	9
7.1.5 Principales problemas fitosanitarios del cultivo de la guanábana	10
8. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Optatus palmaris</i>	11
8.1.1 Descripción morfológica y ciclo biológico del picudo de las anonáceas.....	12
8.1.2 Métodos de control del picudo de las anonáceas	13
9. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	14
10. MECANISMOS GENERALES DE INFECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	
11. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Beauveria bassiana</i>	16

11.1 Morfología de <i>Beauveria</i>	17
11.2 Metabolitos producidos por el género <i>beauveria</i>	18
12. ACTIVIDAD INSECTICIDA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS APLICADOS EN TENEBRIO MOLITOR COMO MODELO DE ESTUDIO	19
13. REFERENCIAS.....	20
14. CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR DE HONGOS CON POTENCIAL ENTOMOPATÓGENO AISLADOS DE <i>Optatus palmaris</i> PASCOE (Curculionidae: Coleoptera).....	24
15. INTRODUCCIÓN	26
16. MATERIALES Y MÉTODOS	28
16.1 Obtención del material biológico	28
16.2 Aislamiento de hongos entomopatógenos	28
16.3 Preservación de aislamientos fúngicos	29
16.4 Identificación morfológica	29
16.5 Identificación molecular	30
16.5.1 Extracción de ADN.....	30
16.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	31
16.7 Análisis de las secuencias.....	32
17. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
17.1 Identificación molecular	36
18. CONCLUSIONES	40
19. REFERENCIAS.....	40
20. CAPITULO III. GERMINACIÓN, METABOLITOS Y EFECTO INSECTICIDA DE HONGOS CON POTENCIAL ENTOMOPATÓGENO AISLADOS DE <i>Optatus palmaris</i> PASCOE (Curculionidae: Coleoptera).....	43
21.RESUMEN	43
22.INTRODUCCIÓN	45
23. MATERIALES Y MÉTODOS	47
23.1 Efecto de la temperatura en la germinación de conidios in vitro.....	47
23.2 Extracción de metabolitos y análisis por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)	48

23.3 Estimación de la virulencia del aislamiento con mejor porcentaje de germinación y mayor homogeneidad metabólica	49
23.4 Análisis estadístico.....	49
24. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
24.1 Efecto <i>in vitro</i> de la temperatura sobre la germinación de conidios de aislados de <i>Beauveria peruviansis</i>.....	50
24.2 Perfil de metabolitos de aislamientos de <i>Beauveria peruviansis</i> por HPTLC.....	54
24.3 Estimación de la patogenicidad	57
24.4 Estimación de la virulencia (análisis probit)	59
25. CONCLUSIONES	59
26. REFERENCIAS.....	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Géneros de hongos entomopatógenos relevantes de acuerdo con la FAO (2003). ¡Error! Marcador no definido.

Tabla 2. Mortalidad y valores de significancia estadística en adultos de *Tenebrio molitor* a los 15 días después de ser incubados con el aislamiento 1 (L1P7-C3). - ¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Guanabana (*Annona muricata* L.) (SADER, 2020), B) Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) (SADER 2017). ----- 7
- Figura 2.** A) Daño de floración, B) Daño en fruto, C) Daño por hongos y bacterias (Imágenes tomadas por Pineda- Rios, 2020). ----- 11
- Figura 3.** A) Patas anteriores de *O. palmaris*, B) Rostro de *O. palmaris*, C) Vista lateral de *O. palmaris* (Maldonado, 2013). ----- 13
- Figura 4.** Ciclo de infección de *Beauveria bassiana* (Casmayor, 1998) ----- 16
- Figura 5.** A) Características macroscópicas, B) Características microscópicas de *Beauveria* sp. - 17
- Figura 6. espécimen micosado de un adulto del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*). ----- 33
- Figura 7.** Aislamientos obtenidos y purificados de especímenes de *Optatus palmaris*. **A)** L1P10-C4; **B)** L1-P7-C3; **C)** L2P4-C3. ----- 34
- Figura 8.** Estructuras fúngicas de aislamientos obtenidos de adultos de *Optatus palmaris*. **(A)**, Hifas; **(B)**, conidios (maduración de un conidióforo); **(c)**, proliferación simpoidal; **(D)**, conidioforo simple; **(E)** y **(F)**, conidios. ----- 35
- Figura 9.** Reconstrucción filogenética para la agrupación de los aislamientos L1P4-C3, L2P10-C4 Y L1P7-C3 de *Beauveria* sp. (comparado con 11 aislamientos del GenBank del NCBI) basado en la región ITS (5.8S), construido con el método de ML (Máxima Verosimilitud; Bootstrap 1000 repeticiones) y distancias por Kimura-2parametros). Los porcentajes de réplica se muestran al inicio de cada rama. ----- 38
- Figura 10.** Reconstrucción filogenética para la agrupación de los aislamientos L1P4-C3, L2P10-C4 y L1P7-C3 de *Beauveria* sp. (comparado con 11 aislamientos del GenBank del NCBI) basado en la región BLOC (B22-B822L)(), construido con el método de ML (Máxima Verosimilitud; Bootstrap

1000 repeticiones) y distancias por Kimura-2 parámetros. Los porcentajes de réplicas se muestran al inicio de cada rama.	39
Figura 11. Influencia de la temperatura en la germinación <i>in vitro</i> del aislamiento 1 de <i>Beauveria peruviansis</i> (L1p7-c3), inoculados por 16 h. la barra de error representa el 95% de confiabilidad. Temperatura 1 = 25°C, Temperatura 2 = 27°C, Temperatura 3 =30°C.	51
Figura 12. Influencia de la temperatura en la germinación <i>in vitro</i> del aislamiento 2 de <i>Beauveria peruviansis</i> (L2P10-C4) Incubados por 16h. la barra de error representa el 95% de confiabilidad. Temperatura1=25°C, Temperatura 2 = 27° C, Temperatura 3 =30°C.	52
Figura 13. Influencia de la temperatura en la germinación <i>in vitro</i> del aislamiento 3 de <i>Beauveria peruviansis</i> (L1P4-C3) incubado por 16 h. La barra de error representa el 95% de confiabilidad. Temperatura 1 =25°C, Temperatura 2= 25°C, Temperatura 3= 30°C.	53
Figura 14. (A) , Análisis del perfil de metabolitos de aislado de <i>Beauveria peruviansis</i> por HPTLP. (B) , Análisis de componentes principales de los perfiles de metabolitos analizados por HPTLC de aislados de <i>Beauveria peruviansis</i>	56
Figura 15. Porcentaje de mortalidad acumulada de adultos de <i>Tenebrio molitor</i> de acuerdo con la concentración. T1=1x10 ³ , T2=1X10 ⁶ , T3=1X10 ⁸ conidios/ML. Testigo=testigo.	58
Figura 16. (A) Adulto de <i>Optatus palmaris</i> micosado, (B) Adulto de <i>Tenebrio molitor</i> micosado al finalizar el bioensayo de virulencia del aislado L1P7-C3.	58

LISTA DE APENDICE

APÉNDICE 1. Imagen de fragmentos amplificados de las regiones ITS4 e ITS5 mediante PCR y detección mediante electroforesis en gel de agarosa.	63
APÉNDICE 2. Imagen de fragmento amplificado de la región del gen BLOC mediante electroforesis en gel de agarosa.	64

DEDICATORIA

Con cariño a mis Padres: Aurelia Medina Hernández y Andrés Hernández Villeda. Por su amor brindado, porque creyeron en mí y siempre me impulsaron para salir adelante.

A mi hermano José Ignacio Hernández Medina, por apoyarme y darme fuerza en los momentos difíciles, animarme a seguir y concluir esta meta.

A mi familia por darme motivación para seguir, apoyarme en todo momento y aconsejarme.

A mis amigos y compañeros Alba Solís, Ana María, Cristian Ali, Erika, Víctor, Jhonatan, Wendy, yessica, Jorge Ortiz, Andrés, pascual Antonio, Juan Carlos, Guillermo, y Cecilio, que me brindaron su apoyo y su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico (Numero de becario:791557) que me otorgó durante la estancia en la maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad brindada para llevar a cabo mi especialización en Maestría en ciencias en protección vegetal por apoyarme durante mi investigación.

Al posgrado en Maestría en Ciencias en Protección Vegetal y al Departamento de Parasitología Agrícola por apoyo a la investigación.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Samuel Ramírez Alarcón por el apoyo y seguimiento de esta investigación. Dr. Luis Francisco Salomé Abarca por su apoyo y valiosa aportación en el desarrollo de la investigación y análisis. Al Dr. Dimas Mejía Sánchez por su apoyo y observaciones y la Dra. Norma Marina Alarcón.

A la Dra. María Guadalupe Carrillo Benítez por su invaluable apoyo y enseñanzas para culminar el proyecto de tesis. Al Dr. José Manuel Pineda Ríos por brindar el material biológico, compartir sus conocimientos y apoyo.

A Maribel Espejel Cervantes por su apoyo en cuestiones administrativas, por sus buenos consejos y amistad.

Al † M.C. Antonio Segura Miranda por apoyarme y creer en mí, brindarme su amistad y apoyo.

DATOS BIOGRAFICOS



Beatriz Hernández Medina Nació el 27 de julio de 1994 en el municipio de Ixmiquilpan Hidalgo. Realizó sus estudios de nivel básico en la Escuela primara Pedro Romero de Terreros (2000-2006). El nivel medio básico en la Escuela Telesecundaria 139 (2006-2009). Los estudios medio superior en el Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario (CBTa no.67)” (2011-2014). Cursó estudios de nivel superior en el Instituto Tecnológico Superior de Huichapan (ITESHU) y se graduó con el título de Ingeniero en Innovación Agrícola Sustentable (2014-2018). Comenzó sus estudios de Maestría en Ciencias en el año 2021 en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

Hace diez años se reportó por primera vez al picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe) en plantaciones de guanábana (*Annona muricata* L.). Este insecto produce pérdidas de hasta el 40 % en su producción. El control químico no ha sido suficiente para controlar a este picudo. Por ello, es necesario explorar esquemas de manejo alternativos al control químico. En este sentido, el uso de hongos entomopatógenos ha mostrado eficacia contra numerosas plagas insectiles y es usado más frecuentemente. Por ello, el objetivo de esta investigación fue caracterizar y evaluar aislamientos nativos de hongos con potencial entomopatógeno aislados del picudo de las anonáceas. Para ello, los aislamientos fúngicos obtenidos se caracterizaron morfológicamente y molecularmente. Posteriormente, se analizaron sus perfiles de metabolitos y se evaluó su germinación a diferentes temperaturas. Finalmente, el mejor aislado fue probado contra *Tenebrio molitor*. Se obtuvieron 24 aislados fúngicos. Tres aislados mostraron caracteres morfológicos que se mantuvieron estables a lo largo del tiempo. El análisis de los iniciadores ITS4, ITS5 que codifican las regiones ITS1 8.5S ITS2, indicaron que los aislados tienen un porcentaje de 98.2% de similitud al género *Beauveria*. La caracterización de un fragmento del gen bloc mostró que estos pertenecían a la especie *B. peruviana*. Mediante la creación de un árbol filogenético se determinó que los aislados P7 y P4 mantienen una relación filogenética más cercana. Esto se confirmó mediante la caracterización de sus perfiles de metabolitos. No obstante, la cepa P7 mostró una producción de metabolitos más homogénea. Esto también ocurrió en la evaluación del porcentaje de germinación de los tres aislados. El aislado P7 mostró el mejor porcentaje de germinación a 27 °C. Este aislado fue elegido para ser probado contra *T. molitor*. Los experimentos mostraron una mortalidad promedio alrededor del 90 %. Por ello, se concluye que el aislamiento *B. peruviana* P7 posee alto potencial entomopatógeno para ser evaluado contra el picudo de las anonáceas.

Palabras clave: *Beauveria*, *Optatus palmaris*, hongos entomopatógenos, Guanábana, metabolitos.

ABSTRACT

IMPORTANCE OF SOURSOP (*Annona muricata*) AND LIMITATIONS IN PRODUCTION

Ten years ago, the annonaceae weevil (*Optatus palmaris* Pascoe) was reported as a pest in soursop orchards (*Annona muricata* L.). This weevil causes up to 40 % losses to the soursop yield. Chemical control has not been enough for controlling this pest. Thus, there is the need to explore alternative management schemes. In this regard, the use of entomopathogenic fungi has been successful against several insect pest. Therefore, the aim of this research was to characterize and evaluate fungal isolates with entomopathogenic potential obtained from annonaceae weevil specimens. To carry out such a task, the isolates were morphologically and molecularly characterized. Moreover, their metabolic profiles and germination were also evaluated. The best isolate was chosen for being tested against *Tenebrio molitor*. A total of 24 fungal isolated were obtained from annonaceae weevil specimens. Three of them showed stable morphological features through time. The analysis of the ITS4, ITS5 primers that encode the ITS1 8.5S ITS2 regions, indicated that the isolates have a percentage of 98.2% similarity to the genus *Beauveria*. Furthermore, the characterization of the bloc gene indicated that the three of them (named P4, P7, and P10) matched with *B. peruvensis*. Their phylogenetic analysis indicated that isolates P7 and P4 were more similar between them. This was confirmed by their metabolite profiles and germination rates. However, the isolate P7 produced a more homogeneous metabolite profile. The isolate P7 also showed the best germination rate. Thus, it was tested against *T. molitor*. The bioassays showed an average mortality percentage of *T. molitor* around 90 % caused by isolate P7. Therefore, we conclude that *B. peruvensis* P7 posses high entomopathogenic potential to be tested against the annonaceae weevil.

Key words: *Beauveria*, *Optatus palmaris*, entomopathogenic fungi, Soursop, metabolites.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente en México la familia Annonaceae está conformada por 130 géneros aproximadamente 2,300 especies. Dentro de estas, los géneros de mayor importancia económica, por su calidad frutícola y potencial farmacéutico, son *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina*. El género *Annona* posee alrededor de 120 especies de clima tropical y subtropical; son principalmente nativos de América (González, et al., 1999; CONABIO). En México se han aceptado 13 géneros y 37 especies. En nuestro país, las especies que han alcanzado mayor desarrollo comercial son la guanábana (*Annona muricata* L.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) y atemoya (*Annona squamosa* x *A. cherimola*) (González, et al., 1999). La guanábana y la chirimoya se comercializan en el mercado nacional e internacional. La producción de guanábana en México asciende a 30,790 t anuales y los principales estados productores son Nayarit (23,230 t), Colima (2,832 t) y Michoacán (2,781 t). Este frutal se siembra en una superficie de 3,612 ha, lo cual se refleja en un valor de producción de \$ 248,170.00 MXN (Sader, 2021). Dentro de los usos de este género se encuentran el medicinal (bacteriostáticos, citostáticos, anticancerígenas), ornamental, como insecticidas biológicos, para extracción de esencias, aceites, como cercos vivos y consumo de frutos frescos en presentaciones como pulpa, jugos, yogurt, helados, paletas, postres, licores, y mermeladas (CONABIO 2021; Hernández et al., 2013). Sin embargo, la producción de este cultivo está altamente por plagas y enfermedades, las cuales ocasionan pérdidas económicas importantes en rendimiento frutal. Las principales plagas asociadas al género incluyen al barrenador de la semilla (*Bephratelloides cubensis* Ashmead), la palomilla barrenadora de frutos (*Cerconota anonella* Sepp.), el barrenador de frutos (*Oenomaus ortygnus* Cramer), la cochinilla rosada del hibiscus (*Maconellicoccus hirsutus* Green), el piojo harinoso (*Planococcus citri* Risso), el gusano rayado (*Gonodonta pyrgo* Cramer) y el picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe); en el caso de enfermedades, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Rhizopus stolonifer* Ehr., *Phyllosticta* sp., *Pestalotia* sp., *Macrophoma* sp.,

Fusarium sp y *Phytophthora* sp. Son las reportadas como causantes de daño severo al cultivo (Hernández et al., 2021; Hernández et al., 2014). No obstante, el picudo de las anonáceas se ha convertido en una plaga de importancia económica, debido a que afecta principalmente flores y frutos, lo cual provoca pérdidas considerables del 68 al 79% (Castañeda, 2011). Sin embargo, el control químico no ha sido suficiente y su uso excesivo ha provocado deterioro ambiental, ha repercutido en la salud humana, ha causado pérdida de polinizadores y depredadores naturales (Viera et al., 2020). En este contexto, actualmente existen esquemas de manejo y control complementarios o alternativos que son más amigables con el ambiente; por ejemplo, el uso de trampas con semioquímicos y el control biológico mediante el uso de parasitoides, depredadores o microorganismos antagonistas. Por esta razón, es necesario implementar un manejo alternativo como el uso de microorganismos benéficos. Dentro de ellos se encuentran los hongos entomopatógenos, de los cuales, algunos géneros se encuentran disponibles como productos comerciales, los cuales están compuestos de al menos 12 especies de las 800 identificadas como patógenos de insectos. Dentro de este grupo de hongos se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosoroseus*, *Lecanicillium* sp., entre otros (Maina et al., 2018). Por ello, en esta investigación se seleccionaron tres aislamientos de hongos con potencial entomopatógeno de un grupo de aislados obtenidos de picudos de las anonáceas recolectados en campo (Pineda-Ríos et al., 2022). Lo anterior con el objetivo de identificarlos, evaluar su capacidad entomopatógena y su posible correlación con su producción de metabolitos especializados.

JUSTIFICACIÓN

El picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe) se ha convertido en una de las plagas principales del cultivo de la guanábana (*Annona muricata* L.) debido a los daños que ocasiona principalmente a frutos en cualquiera de sus etapas de maduración. En la actualidad, el uso del control químico ha sido insuficiente para su manejo, por esto, es necesaria la implementación de estrategias alternativas o complementarias de carácter ecológico mediante el uso de enemigos naturales como los hongos entomopatógenos que pudieran disminuir el uso de insecticidas químicos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar aislados de hongos nativos mediante aspectos morfológicos y moleculares como estrategia de manejo contra el picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar mediante pruebas de patogenicidad y virulencia los aislamientos con mejor porcentaje de germinación sobre el insecto modelo.
- ❖ Caracterizar de forma general el perfil de producción de metabolitos especializados y su posible correlación con su grado de patogenicidad y virulencia de *Beauveria peruviansis*.

HIPÓTESIS / SUPUESTO DE INVESTIGACIÓN

Ha: Al menos un aislamiento fúngico causará mortalidad en adultos de *Tenebrio molitor*.

Ho: Ningún aislamiento causará mortalidad en adultos de *Tenebrio molitor*.

Ha: La producción de metabolitos de al menos un aislado fúngico será diferente del resto de los aislados fúngicos con potencial insecticida.

Ho: La producción de metabolitos de los aislados fúngicos será igual en todos los aislados fúngicos con potencial insecticida.

LITERATURA CONSULTADA

- SADER. (2021). *Guanábana , dulce milagro tropical Pocas frutas son tan importantes en el mundo como lo es.* 1–4.
- Castañeda, G. G. M. (2011). Ciclo de vida y hábitos del picudo de las Annonáceas *Optatus palmaris* Pascoe: observaciones en campo y laboratorio. Tesis Licenciatura. Universidad Tecnológica de la Costa. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 16-22 pp.
- Castañeda-Vildózola, Á., Morales-Trujillo, M. C., Franco-Mora, O., Valdez-Carrasco, J., & Mejía-Carranza, J. (2020). Un nuevo registro de *Optatus palmaris* Pascoe (Coleoptera: Curculionidae) asociado con *Annona* L. (Annonaceae) en el Estado de México, México. *Revista Chilena De Entomología*, 46(3), 397–400. <https://doi.org/10.35249/rche.46.3.20.07>
- CONABIO. (2021). La biodiversidad en Nayarit: estudio de estado, volumen 2 . México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (. página(s): 305-308 .
- Cotes, A. M., Fargetton, X., Köhl, J., Díaz García, A., Gómez Álvarez, M. I., Grijalba Bernal, E. P., ... & Kondo, T. (2018). *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas. V. 2.* Corporación colombiana de investigación agropecuaria-AGROSAVIA.
- Hernández, F. L. M., R. Gómez J. and J. Andrés A. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. http://inifapcirpac.gob.mx/publicaciones_nuevas/Importancia,%20plagas%20insectiles%20y%20enfermedades%20fungosas%20del%20cultivo%20del%20Guanabano.pdf.
- Hernández-Fuentes, Luis Martín, Nolasco-González, Yolanda, Orozco-Santos, Mario, & Montalvo-Gonzalez, Efigenia. (2021). Toxicidad de insecticidas contra (*Optatus palmaris* Pascoe) en guanábana. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(1), 49-60. Epub 21 de febrero de 2022.<https://doi.org/10.29312/remexca.v12i1.2417>
- Hernández, L. V., Moctezuma, H. L., Martínez, N. A. V., Bello, R. R., Rocha, D. G. C., & Contreras, R. G. C. (2014). La situación de las annonaceae en

México: Principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPEC. EDITION 1), 44–53. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500005>

- Marmolejo, D., Gamarra, D. P., A., E. N. P., & Marmolejo, K. J. (2019). *Caracterización morfológica, fisicoquímica y de sanidad de una selección de clones multipatrón de guanábana (Annona muricata L.)*. 10(3), 235–239.
- Maina, U.M., Galadima, I.B. Gambo, F.M. y D. Zakaria. 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pest of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 6 (1): 27-32.
- Viera-Arroyo, William Fernando, Tello-Torres, Cristina Margarita, Martínez-Salinas, Aníbal Arturo, Navia-Santillán, Daniel Fernando, Medina-Rivera, Lorena Anabel, Delgado-Párraga, Alex Gabriel, Perdomo-Quispe, Cynthia Estefanía, Pincay-Verdezoto, Ana Katherine, Báez-Cevallos, Francisco Javier, Vásquez-Castillo, Wilson Arturo, & Jackson, Trevor. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308385920200002000006&lng=es&tlng=es.

CAPITULO I: ESTRATEGIAS DE MANEJO DE PLAGAS EN EL CULTIVO DE GUANABANA

7.1.1 Generalidades de la guanábana

Las anonáceas son de origen tropical y con distribución en ambos hemisferios. En México se localizan en los estados del centro, golfo y pacífico (Hernández, 2016); en estos estados se encuentran 14 géneros con 63 especies identificadas hasta el momento. Los cuatro géneros de mayor importancia económica por su calidad frutícola y potencial farmacéutico son: *Annona*, *Rollinea*, *Uvaria* y *Asimina* (Hernández *et al.*, 2014), de los cuales destacan *Annona muricata* (Figura 1), *Annona cherimola* (Figura 2), *Annona squamosa*, *Annona diversifolia*, *Annona reticulata* y *Annona purpurea* (Andrés, 2011). De estas especies, únicamente la guanábana y la chirimoya se cultivan con fines comerciales debido a que tienen usos alimenticios, terapéuticos, de conservación de agroecosistemas y propiedades insecticidas. Por otro lado, el resto de las especies se encuentran en traspatio o forman parte de la vegetación natural. Estos frutales requieren de clima cálido y húmedo, crecen en altitudes menores de 1000 msnm, temperatura de 25 a 28 °C, alta humedad relativa (entre 60 y 80 %); necesitan precipitación promedio de 1000 a 3000 mm por año, suelos profundos, arenosos con buen drenaje y pH ácido (5.5 - 6.5) (Saltos, 2016).

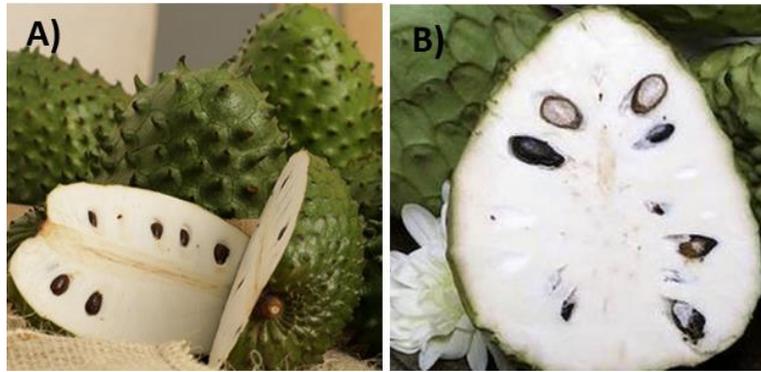


Figura 1. A) Guanabana(*Annona muricata* L.)(SADER, 2020), **B)**Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.)(SADER 2017).

7.1.2 Clasificación taxonómica de la guanábana

A continuación, se describe la clasificación taxonómica de la guanábana (*Annona muricata* L.)

Dominio: Eukarya

Reino: Vegetal

División: Spermatophyta

Clase: Dicotyledonea

Subclase: Archichlamydeae

Orden: Ranales

Familia: *Annonaceae*

Género: *Annona*

especie: *a. muricata*

7.1.3 Descripción botánica

La guanábana es un árbol de 3 hasta 10m de altura, ramificado desde la base; sus ramas son glabras de color rojizo, cilíndricas, arrugadas, ásperas y con numerosas lenticelas; presenta dos tipos de hojas, obovadas, glabras, con pecíolo y brácteas redondas, caedizas, sin pecíolo, color verde grisáceo y las

otras son simples, oblongo-elípticas a oblongo-obovadas enteras, duras, lisas, de color verde oscuro y de 5 a 15 cm de longitud (Rodríguez, 2022). La copa del árbol es extendida, con follaje compacto, el tronco tiende a ramificarse desde su base mientras que el arbusto tiene la característica de presentar un crecimiento de tendencia erecta. La raíz es de tipo pivotante, lo cual proporciona a este árbol buena fijación a suelos. Estos árboles crece en altitudes por debajo de los 1200 m sobre el nivel del mar, con humedad relativa del 60% al 80%, rango de temperatura de 25 a 28 °C y con precipitación de 1000 a 3000 mm anuales (Mutakin, 2022), en suelos profundos, arenosos con buen drenaje y pH ácido entre 5.5 y 6.5 (Saltos, 2016).

Las flores tienen tres pétalos externos de 2 a 5 cm de largo y tres internos pequeños; el color de los pétalos tiene diferentes tonalidades que varían de verdoso a amarillo y en ocasiones teñidas de rojo. El fruto tiene una longitud aproximada de 20 cm y su pulpa es de color blanca. Presenta un aroma típico y su sabor puede variar de simple a dulce, es de forma elipsoidal u ovoide y contiene numerosas semillas (Leiva, 2018). Los frutos poseen un ciclo de vida de 100 a 150 días (14 a 21 semanas) (Muhammad, 2022). La cáscara es gruesa de color verde y tiene espinas cortas; la superficie interna es de color crema, de apariencia granular y se separa fácilmente de una masa blanca. Además, el fruto es fibroso, jugoso con segmentos que rodean el núcleo central suave y conciso (Patel, 2016).

Las semillas son de forma cilíndrica alargada, con una longitud aproximada de 1.5 a 2.5 cm, su grosor es de aproximadamente 1 cm cubierta por una testa dura, la cual posee textura lisa y es de color café brillante. Esta posee un período largo de dormancia, difícil de interrumpir y para romperlo la semilla se debe almacenar de 6 a 8 meses previos a la siembra, así el almacenamiento junto con la escarificación permiten alcanzar porcentajes de germinación del 80 al 90% entre los 20 a 30 días después de la siembra (Napoleón, 2004).

7.1.4 Ciclo de maduración del fruto de la guanábana

Durante 6 a 15 semanas después de la polinización, las flores de guanábana permanecen inactivas. Desde la quiescencia posterior a la antesis hasta la madurez fisiológica, los frutos tienen un ciclo de vida de 100 a 150 días (14 a 21 semanas) (Muhammad, 2022) Debido a la tasa de respiración la guanábana está clasificada como climatérica, los frutos son cosechados en estado de madurez fisiológica y maduran posteriormente a la cosecha; su intensidad respiratoria y producción de etileno son altas, de $150 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $100 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de CO_2 . A medida que el fruto alcanza la madurez se observa palidez ligera en el verde intenso de la cascara hasta alcanzar una pigmentación verde-amarillenta debido a la degradación de clorofila. Durante la última etapa de maduración esta cambia de color verde a color marrón oscuro posiblemente debido a la ruptura de sus cloroplastos, lo cual generaría la liberación de la enzima polifenol oxidasa (PPO) que causa la oxidación y la polimerización de fenoles causantes del oscurecimiento de la cascara de guanábana madura (Jiménez et al., 2017).

A los cinco días después de la cosecha produce compuestos volátiles tales como hexanoato de metilo y (*E*)-2-hexenoato de metilo, etileno, azúcares y ácidos orgánicos. La producción, acumulación y variabilidad de estos compuestos determinan el color, firmeza, acidez, sólidos solubles totales y aromas del fruto. Después de esta etapa ocurre un descenso en la producción de los constituyentes del aroma, aunado a esto se producen volátiles tales como ácido butanoico, hexanoico y γ -butirolactona, a los cuales se les atribuye el olor fermentado del fruto que ha sobrepasado su maduración; esta misma tendencia se puede observar en el contenido y tipo de azúcares y ácidos orgánicos presentes en el fruto (Jiménez et al., 2017).

7.1.5 Principales problemas fitosanitarios del cultivo de la guanábana

La producción de guanábana está limitada principalmente por problemas fitosanitarios que pueden ocasionar pérdidas considerables durante el cultivo y postcosecha. Las pérdidas ocasionadas por plagas y enfermedades a la producción en el mundo se estiman en un 40% (Pimentel, 1995). Aproximadamente, las plagas insectiles ocasionan el 13% de pérdidas, las enfermedades 12% y las malezas 10% (Hernández et al., 2014). Además, se ha reportado la asociación de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon y Maublanc, los cuales provocan pudriciones secas y blandas, respectivamente (Hernández et al., 2017; Marmolejo et al., 2019). Algunas de sus plagas más importantes son el barrenador de la semilla (*Bephratelloides cubensis*), la palomilla barrenadora de frutos (*Cerconota anonella*), el barrenador de los frutos (*Oenomaus ortygnus*), la cochinilla rosada del hibiscus (*Maconellicoccus hirsutus*), el piojo harinoso (*Planococcus citri*) y enfermedades como la antracnosis, muerte descendente de ramas y pudrición del fruto causadas por los hongos anteriormente mencionados (Hernández et al., 2013). En adición a estas plagas, por primera vez en 2006, se reportó al picudo de las anonáceas que ataca frutos de guanábana en las Varas, Nayarit (Hernández et al., 2013). No obstante, este curculiónido no fue considerado como plaga primaria o siquiera de importancia económica para el cultivo. Posteriormente, su tasa de reproducción, distribución y daños ocasionados incrementaron a tal grado que su estatus cambió a plaga de importancia primaria (Maldonado 2013; Maldonado, 2014). Debido a que se alimenta prácticamente de todos los órganos de la planta (Fig.3), pero con mayor preferencia por los frutos cercanos a la madurez fisiológica o en el punto de cosecha utilizando como fuente de alimento para el desarrollo de sus larvas (Jones et al., 2019). En campo es común observar hasta 30 insectos posados sobre un fruto. El insecto en estado adulto perfora el fruto para alimentarse y las hembras aprovechan estas perforaciones para ovipositar; cuando las larvas emergen se alimentan de la pulpa (Fig.4) ocasionando un manchado que demerita la calidad del fruto, además estos orificios son entrada para organismos

saprófitos como hongos y bacterias (Fig.5). Por ello, en general y desde el punto de vista económico, los picudos son de interés agrícola por su alta especificidad hacia plantas cultivadas que utilizan como fuente de alimento para el desarrollo de sus larvas (Jones et al., 2019).

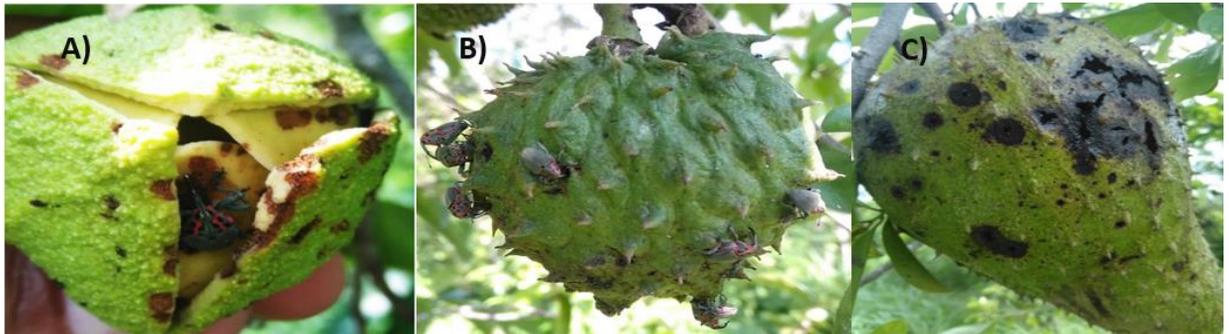


Figura 2. A) Daño de floración, B) Daño en fruto, C) Daño por hongos y bacterias (Imágenes tomadas por Pineda- Rios, 2020).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Optatus palmaris*

La clasificación taxonómica del picudo de las anonáceas propuestas por Pascoe en 1889 es la siguiente.

Dominio *Eukarya*

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Curculionidae

Subfamilia: Baridinae

Género: *Optatus*

Especie: *O. palmaris*

8.1.1 Descripción morfológica y ciclo biológico del picudo de las anonáceas

Optatus palmaris mide de 5.7 a 10.5 mm de largo y posee caracteres morfológicos llamativos; por ejemplo, el color general de su cuerpo es negro opaco a diferencia de su dorso del pronoto que muestra patrones de color rojo. En vista lateral, se observan estructuras en el tórax y los ventritos que también son rojizos. El ciclo de vida del adulto es largo y llega a ser de hasta 216 días. Las larvas se alimentan de la pulpa y semillas del fruto por un periodo de 73 días. Próximas a pupación abandonan los frutos para pupar de forma subterránea por aproximadamente 22 días. Los daños atribuidos al picudo de las anonáceas se reportan del 68 al 79% por fruto (Castañeda et al., 2020). Estos insectos afectan principalmente a frutos en desarrollo, dañan la cáscara y la pulpa de manera superficial. La presencia de adultos en árboles se observa entre los meses de agosto y noviembre con la temporada de lluvia; es común encontrar más de 30 adultos por fruto dependiendo del tamaño del fruto.

Las diferencias morfológicas entre la hembra y el macho no son muy notables (Figura 6 c), por ejemplo, en el macho el rostro o pico es ligeramente más robusto y esculpido, en hembras es delgado y liso, las antenas en los machos presentan más pubescencia que en las hembras (Figura 6 B). No obstante, las patas en los machos son de mayor tamaño y sus tarsos son más dilatados y pubescentes que en las hembras, lo cual constituye el principal carácter morfológico para diferenciar de forma visual el sexo de los especímenes de esta especie (Figura 6 a) (Maldonado, 2013).

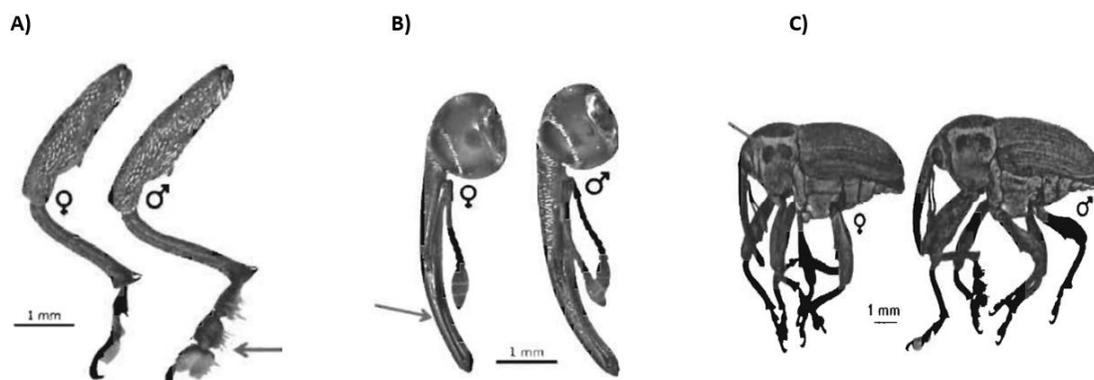


Figura 3. A) Patas anteriores de *O. palmaris*, B) Rostro de *O. palmaris*, C) Vista lateral de *O. palmaris* (Maldonado, 2013).

8.1.2 Métodos de control del picudo de las anonáceas

En México, el picudo de las anonáceas se ha vuelto una plaga de importancia en los últimos años en el cultivo de guanábana ya que llega a infestar hasta 79.3% de los frutos con una severidad en éstos del 38 al 98% (Maldonado et al., 2014). Para el control de la plaga se han evaluado distintos productos, entre ellos, insecticidas de origen químico y extractos vegetales (Hernández et al., 2021), por otra parte se ha determinado la feromona de agregación α -terpineol con el objetivo de utilizar técnicas de menor impacto ambiental para su manejo (Pineda et al., 2021). Sin embargo, esta no se usa aún de forma comercial en campo. El control biológico es una herramienta natural que ayuda a disminuir las poblaciones; al respecto se han encontrado algunos parasitoides y depredadores en especies de *Annona* (Vidal et al., 2014). Por otro lado, el potencial de los hongos entomopatógenos no ha sido explorado en los sistemas de manejo y control de plagas en este cultivo.

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos tienen potencial como agentes de control de plagas, debido a que constituyen un grupo de microorganismos con más de 750 especies, entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*, para la FAO (2003), se incluye otros géneros de importancia para control insectil (Cuadro 1).

Cuadro 1. Géneros de hongos entomopatógenos relevantes de acuerdo con la FAO (2003).

Género	Orden	Familia	Especie
<i>Aschersonia</i>	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Aleyrodia</i>
<i>Beauveria</i>	Moniliales	Moniliaceae	<i>Bassiana</i> <i>Brongniartii</i>
<i>Hirsutella</i>	Globigerinida	Globotaliidae	<i>Hirsuta</i>
<i>Verticillium</i>	Hypocreales	Plectosphaerellaceae	<i>Dahliae</i>
<i>Paecilomyces</i>	Eurotiales	Trochocomaceae	<i>Fumosoroseus</i>
<i>Nomuraea</i>	Moniliales	Moniliaceae	<i>Rileyi</i>
<i>Metarhizium</i>	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Anisopliae</i>

En general, el ciclo de vida de los hongos entomopatógenos comienza con la germinación de sus esporas sobre partes del cuerpo de sus hospederos como aparatos bucales, membranas intersegmentales o en espiráculos (Díaz et al., 2006); posteriormente la penetración al interior del cuerpo de sus hospederos ocurre a través de la cutícula, seguido de una rápida proliferación de las células fúngicas (micelio) en el interior del insecto, lo cual culmina con la infección

generalizada y muerte del insecto. Por último, la producción de esporas infectivas para repetir el ciclo y la producción de esporas no móviles o de estructuras de resistencia que requieren un período de inactividad (Araujo de Albuquerque, 2008). Por ejemplo, *Metarrhizium o Muscardina verde*, *M. anisopliae* es un hongo imperfecto de la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia clavicipitaceae. Entre sus características morfológicas destacan la coloración de la colonia, generalmente olivaceo, amarillenta o verde oscura, lo cual depende del aislamiento. El conidióforo es irregular y ramificado con dos o tres ramas en cada septa de 4 a 13.5µm de longitud por 1.4 a 2.6 µm de diámetro, fiálides cilíndricas en forma de clava y delgadas en el ápice; estos miden de 6.3 a 13.5 µm de longitud y de 1.8 a 3.6 µm de diámetro. Sus conidios son unicelulares, cilíndricos y truncados, formados en cadenas muy largas, hialinos o con coloración verde olivaceo; stos miden 3.5 a 9 µm de longitud por 1.5 a 3.5 µm de diámetro (Oduño, 2009).

Cordyceps pertenece a la familia Cordycipitaceae en el orden Hypocreales de Ascomycota y es conocida como un hongo entomopatógeno con una distribución mundial en zonas templadas y tropicales (Du, 2021). Posee estromas solitarios o gregarios, cilíndricos a clavados de 2 a 8 cm de longitud; son peritecios ovoides, completamente inmersos en el estroma en ángulo recto, de 580 a 670 por 315 a 325 µm. Poseen ascas cilíndricas y filamentosas de 3 a 6 µm de ancho. Sus ascosporas son hialinas, filiformes, multiseptadas y se fragmentan en porciones de 3.5 a 4.2 µm por 1.4 a 2 µm (Pérez et., al 2017).

MECANISMOS GENERALES DE INFECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Las condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos entomopatógenos incluyen temperaturas de 25 a 30 °C y humedad relativa superior al 90%. Generalmente, el desarrollo de la enfermedad está dividida en tres fases, (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto; (2) penetración

en el hemocele; (3) desarrollo del hongo (Figura 9) (Téllez et al., 2007). El hongo se introduce al insecto mediante penetración del tegumento con ayuda del tubo germinativo y enzimas degradadoras de cutícula y tejido. Durante la penetración, la quitina es disuelta o parcialmente digerida mediante acción de enzimas tipo lipasas y proteasas así como exoproteasas, endoproteasas, esterases, quitinasas, quitobiasas, entre otras (Oduño, 2009).

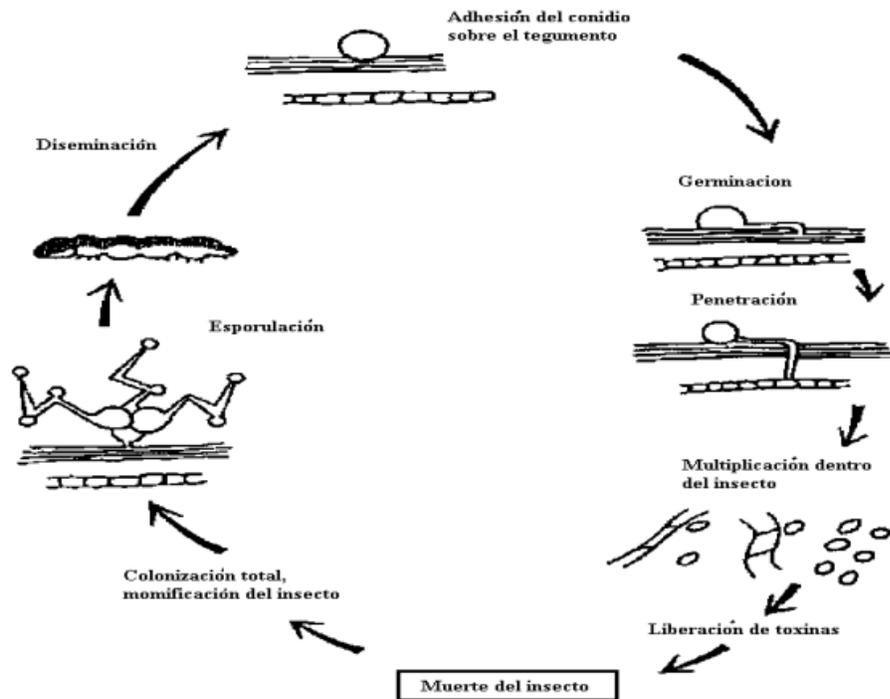


Figura 4. Ciclo de infección de *Beauveria bassiana* (Casmayor, 1998).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Beauveria bassiana*

La clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana* establecida por Barnett y Hunter (1972) es la siguiente.

Dominio: *Eukarya*

Reino: Mycetozoa

División: Amastigomycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes

Orden: Moniliales

Familia: Monilliaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *B. bassiana*

11.1 Morfología de *Beauveria*

En cultivo de medio sólido, los hongos pertenecientes a este género presentan una apariencia aterciopelada o polvorienta con micelio blanco. A medida que transcurre el tiempo, el micelio se torna de color amarillento (Figura 5A). Los conidióforos tienen de 1 a 2 μm de diámetro provenientes de hifas septadas de las que nacen células conidiógenas; estas células suelen ser sencillas e irregularmente agrupadas, aunque también pueden presentarse en grupos verticilados en forma de botella con 3 a 6 μm de longitud y 3 a 5 μm de diámetro. Las células conidiógenas son hinchadas en la base y se adelgazan hacia el extremo final del mismo. Este conjunto de células forma un raquis de aproximadamente 20 μm de longitud y 1 μm de diámetro en forma de zig-zag y sostiene una espora en cada dentículo (Figura 5B). Los conidios son hialinos, redondos a ovoides de 3 a 6 μm de largo y 2.5 a 3.5 μm de ancho (Oduño, 2009).

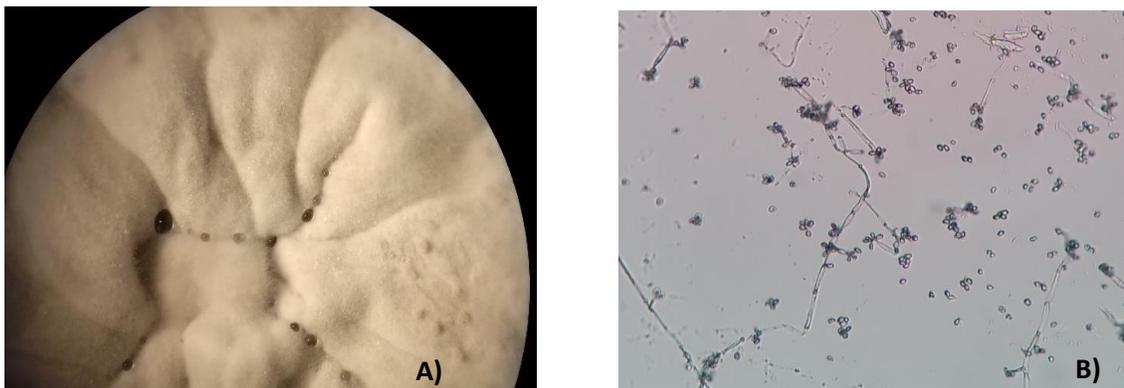


Figura 5. A) Características macroscópicas, B) Características microscópicas de *Beauveria* sp.

11.2 Metabolitos producidos por el género *beauveria*

Este género presenta tanto metabolitos primarios como especializados. Dentro del primer grupo se encuentran los que regulan el crecimiento celular, viabilidad y proliferación y que además son necesarios hasta la diferenciación y esporulación. Los metabolitos especializados de este género son secretados una vez que los nutrientes en el medio se agotan o cuando tienen interacciones con otros agentes bióticos o en respuesta a agentes abióticos, lo cual generalmente resulta en la producción, excreción y acumulación de ácidos orgánicos, pigmentos y antibióticos. Incluso en algunos casos, estos metabolitos son responsables de la toxicidad causada por el hongo. De esta forma, los metabolitos especializados pueden contribuir a la muerte del insecto (Guamán, 2022).

Se han reportado compuestos tales como la bassianolida y la beauvericina como parte de los diversos metabolitos especializados producidos por este género y a los cuales se les han atribuido actividades tóxicas contra insectos (Hajek et al., 1994). Estos compuestos son péptidos bioactivos producidos de manera no ribosomal por grandes complejos enzimáticos multiméricos llamados sintetasa peptídicas no ribosomales (NRPSs por sus siglas en inglés) cuyos módulos funcionales utilizan tres dominios centrales denominados adenilación, tiolación y condensación. La beauvericina es un trímero de éster cíclico de monómeros de dipeptidol formado por ácido (2R)-2-hidroxi-3-metilbutanoico (ácido D-hidroxiisovalérico, D-Hiv) y N-metil-L-fenilalanina (N-MePhe) (Xu et al., 2008). La bassianolida es un octadepsipéptido con un anillo de macrolactona de 24 miembros que está formado como un éster tetramérico cíclico del monómero dipeptidol D-hidroxiisovalerato (Rosas, 2020).

Algunos otros factores metabólicos que aportan a la toxicidad causada por este género son de origen enzimático. Por ejemplo, una enzima multifuncional conocida como eniatina sintetasa el cual es un agente ionóforo capaz de formar complejos de iones Na⁺ y K⁺ que permiten el incremento de la permeabilidad natural y artificial de las membranas, lo cual induce la deshidratación de los

tejidos por pérdida de líquido de las células. Además, puede producir alteraciones en los procesos de muda y metamorfosis, así como en su fecundidad. La bassiacridina es una proteína tóxica purificada a partir de una cepa de *Beauveria bassiana* a través de métodos cromatográficos. Esta se caracterizó como un monómero de 60 KD y punto isoeléctrico de 9,5; posee actividad β -glucosidasa, N-galactosidasa y N-acetilglucosaminidasa probadas con acción insecticida. Otro factor de toxicidad importante en *Beauveria* es el ácido 2,6-piridindicarboxílico (ácido dipicolínico), del cual, su sal sódica posee propiedades insecticidas (Borges et al., 2010).

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS APLICADOS EN TENEBRIO MOLITOR COMO MODELO DE ESTUDIO

Para determinar la efectividad de cualquier producto de control de plagas insectiles es necesario llevar a cabo bioensayos, lo cual implica el uso de diferentes especies de insectos con características apropiadas para cada tipo de producto. En este sentido, *Tenebrio molitor* ha sido ampliamente usado como insecto cebo para hongos entomopatógenos debido a su ciclo de vida simple, fácil manipulación y adaptabilidad (Toriello et al., 2008). Alcantara y colaboradores (2020) aislaron *Metarhizium anisopliae* de suelo agrícola del oriente del estado de México y evaluaron su efectividad en insectos de *T. molitor*. En cuanto a parámetros de infectividad la mortalidad causada por el aislamiento fúngico fue igual a la del producto comercial utilizado como control positivo ($p > 0.05$). Adicionalmente, resaltó el uso de *T. molitor* como una estrategia confiable y rápida para la determinación de aislados con potencial insecticida.

Otro estudio que demostró el valor de *T. molitor* como modelo biológico se trató sobre la determinación de la virulencia y termotolerancia de 18 aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* obtenidos de aislamientos provenientes de moscas pintas (*Aeneolamia* sp.). Los datos obtenidos de TL50 y mortalidad acumulada indicaron que al menos seis aislados sobresalieron del resto los aislados. Estos obtuvieron TL50 de 5.19, 5.76, 5.97, 6.04, 6.15 y 6.53 días. Por otro lado, los resultados de termotolerancia mostraron que los aislados poseían

buena tolerancia tanto como la cepa de referencia FI-1029 (Toriello et al., 2008). Adicionalmente, Dara (2017) probó los fungicidas captan, fenhexamida, azufre, piraclostrobina + boscalid, quinoxifeno, miclobutani y cyprodinil + fludioxonil en larvas *T. molitor* como insecto cebo para evaluar la infección causada por *B. bassiana* con y sin fungicidas. En general, por si sola, *B. bassiana* causó una mortalidad promedio de 96 %, de los cuales, 90 % de los especímenes mostraron síntomas de infección. Por otro lado, cuando se utilizó a *B. bassiana* en combinación con fungicidas, se observó que no todos los insectos muertos mostraron síntomas de infección fúngica. Lo cual indicó que ciertos productos químicos pueden aminorar los efectos insecticidas de hongos entomopatógenos; dichos efectos adversos deben ser considerados durante pruebas de efectividad biológica y estrategias de manejo o control de plagas insectiles. Así pues, queda resaltado el valor de *T. molitor* como modelo biológico para el estudio de efectos insecticidas de hongos entomopatógenos.

REFERENCIAS

- Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., & Angel-Cuapio, A. (2020). Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91.
- Andrés, A. J., y H. Andrés L. (2011). *Biología, Diversidad, Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos de Annonaceae en México*. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México.
- Araujo de Albuquerque, E. (2008). Hongos Entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (Homóptera: aleyrodidae). *Anais Da Academia Pernambucana de Ciência Agrônomic*, 6, 209–242. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25735/1/Maranhao.pdf>
- Borges, D., Díaz, A. O., Nelis, A. S. J., & Gómez, E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar.*, 44(3), 48–55.
- Castañeda-Vildózola, Á., Morales-Trujillo, M. C., Franco-Mora, O., Valdez-Carrasco, J., & Mejía-Carranza, J. (2020). Un nuevo registro de *Optatus palmaris* Pascoe (Coleoptera: Curculionidae) asociado con *Annona L.* (Annonaceae) en el Estado de México, México. *Revista Chilena De*

Entomología, 46(3), 397–400. <https://doi.org/10.35249/rche.46.3.20.07>

- Dara, S. K. (2017). Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with some fungicides used in California strawberry. *The Open Plant Science Journal*, 10(1).
- Díaz, M. P., Macías, A. F., Navarro, S. R., & Torre, M. D. La. (2006). MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. *Interciencia*, 31(12), 856–860. <http://www.redalyc.org/pdf/339/33901204.pdf>
- Du, C., Wu, J., Cuthbertson, A. G., Hamid Bashir, M., Sun, T., & Ali, S. (2021). Morphological, molecular and virulence characterisation of six *Cordyceps* spp. isolates infecting the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Biocontrol Science and Technology*, 31(4), 373-386.
- González, E.A.R., Luna, C.L., Moreno, A.R., De la Cruz, C. I., y H.P. Barajan. Distribución del género *Annona* In: Congreso Internacional de Anonáceas, 2., 1999., México. Memoria. México: Tuxtla Gutiérrez, 1999. p.85.
- Guamán, M. A. (2022). Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas. *γκρη*, 8.5.2017, 2003 2005.
- Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39(1), 293-322.
- Hernández-Fuentes, L. Agustín, J.; Espíndola, C.; Castañeda, A.; Ballesteros, G.; (2016). RECURSOS GENÉTICOS DE ANONÁCEAS (Annonaceae) EN MÉXICO: SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS. *Agro Productividad*, 9(4). Recuperado a partir de <https://mail.revista agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/739>
- Hernández, F. L. M., R. Gómez J. and J. Andrés A. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. http://inifapcirpac.gob.mx/publicaciones_nuevas/Importancia,%20plagas%20insectiles%20y%20enfermedades%20fungosas%20del%20cultivo%20del%20Guanabano.pdf [Links]
- Hernández, L. V., Moctezuma, H. L., Martínez, N. A. V., Bello, R. R., Rocha, D. G. C., & Contreras, R. G. C. (2014). La situación de las annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPEC. EDITION 1), 44–53. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500005>
- Jiménez-Zurita, José Orlando, Balois-Morales, Rosendo, Alia-Tejacal, Irán, Juárez-López, Porfirio, Jiménez-Ruíz, Edgar Iván, Sumaya-Martínez, María Teresa, & Bello-Lara, Juan Esteban. (2017). Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(5), 1155-1167. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.115>

- Jones, R.W., Illescas-Riquelme, C., López-Martínez, V., Bautista-Martínez, N. y O'Brien, Ch.W. (2019) Emergent and possible invasive pest species of weevils in Mexico. *Florida Entomologist*, 102(3): 480-485. <https://doi.org/10.1653/024.102.0302>
- Leiva González, S., Gayoso Bazán, G., & Chang Chávez, L. (2018). *Annona muricata* L." guanábana"(Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa*, 25(1), 127-140.
- Maldonado J. E. (2013). Bioecología del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe) en el cultivo de guanábana (*Annona muricata* L.). *CONACYT*.
- Maldonado, E. ., Hernández, L., Luna, G. ., Gómez, J., Flores, R., & Orozco-Santos. (2014). Bioecology of *optatus palmaris pascoe* (Coleoptera: Curculionidae) in *Annona muricata* L. *Southwestern Entomologist*, 39(4), 773–782. <https://doi.org/10.3958/059.039.0408>
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2014). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445–458. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Mutakin, M., Fauziati, R., Fadhillah, F. N., Zuhrotun, A., Amalia, R., & Hadisaputri, Y. E. (2022). Pharmacological activities of soursop (*Annona muricata* Lin.). *Molecules*, 27(4), 1201.
- Muhammad Afzaal, Farhan Saeed, Aasma Asghar, Yasir Abbas Shah, Ali Ikram, Huda Ateeq, Muzzamal Hussain, Chigozie E. Ofoedu, James S. Chacha. (2022). Nutritional and Therapeutic Potential of Soursop, *Journal of Food Quality*, vol. 2022, Article ID 8828358, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2022/8828358>
- Napoleón, J. (2004). Guía técnica del cultivo de la Anona. El Salvador. IICA Instituto Interamericano de Cooperación Para La Agricultura., 36.
- Oduño, N. (2009). virulencia de *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* sobre picudo del nopal. 93.
- Patel, MS y Patel, JK (2016). Una revisión sobre los frutos milagrosos de *Annona muricata*. *Revista de Farmacognosia y Fitoquímica* , 5 (1), 137-148.
- Pineda-Ríos, J. M., Cibrián-Tovar, J., Hernández-Fuentes, L. M., López-Romero, R. M., Soto-Rojas, L., Romero-Nápoles, J., Llanderal-Cázares, C., & Salomé-Abarca, L. F. (2021). α -Terpineol: An aggregation pheromone in *optatus palmaris* (coleoptera: curculionidae) (pascoe, 1889) enhanced by its host-plant volatiles. *Molecules*, 26(10). <https://doi.org/10.3390/molecules26102861>
- Rodríguez Loor, M. E. (2022). Polinización manual de la guanábana *Annona muricata* en la parroquia Juan Gómez Rendón Progreso provincia de Guayas (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa

Elena.

- Rosas García, N. M., Mireles Martínez, M., & Villegas-Mendoza, J. M. (2020). Detección de bassianolida y beauvericina en cepas de *Beauveria bassiana* y su participación en la actividad patogénica hacia *Spodoptera* sp. *Biotecnia*, 22(3), 93–99. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1060>
- Saltos, R. S. R. (2016). “*Propagación de Guanábana (Annona muricata) utilizando ANA (Ácido Naftalenacético) y AIB (Ácido Indolbutírico) en el Cantón Quevedo año 2015.*”
- Téllez-jurado, A., Guadalupe, M., Ramírez, C., & Flores, Y. M. (2007). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. © 2009 *Revista Mexicana de Micología.*, 80.
- Toriello, C., Montoya-Sansón, E., Zavala-Ramírez, M., Navarro-Barranco, H., Basilio-Hernández, D., Hernández-Velázquez, V., & Mier, T. (2008). Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Revista mexicana de micología*, 28(SPE), 57-66.
- Vidal H, L., Lopez Moctezuma, H., Vidal Martinez, N. A., Ruiz Bello , R., Castillo Rocha, D. G., & Chiquito Contreras, R. G. (2014). La situación de las annonaceae en México. Scielo
- Pérez-V,J,C., Burrola-Aguilar.,Aguilar-Miguela, X., Sanjuanb, T., Jiménez-Sánchez, E., (2017) Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR DE HONGOS CON POTENCIAL ENTOMOPATÓGENO AISLADOS DE *Optatus palmaris* PASCOE (Curculionidae: Coleoptera).

MORPHOLOGICAL-MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF FUNGAL ISOLATES WITH ENTOMOPATHOGENIC POTENTIAL OBTAINED FROM *Optatus palmaris* PASCOE (Curculionidae: Coleoptera)

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos son reconocidos por su potencial como agentes de biocontrol aplicados comúnmente como productos formulados. No obstante, uno de los primeros pasos en la obtención de este tipo de productos es el aislamiento, purificación e identificación de los hongos obtenidos de cadáveres de insectos micosados. Algunos de los géneros de importancia para control de plagas son *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* e *Isaria*. El objetivo de este trabajo fue aislar, purificar e identificar aislamientos fúngicos nativos de adultos del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*), el cual se ha convertido en una plaga primaria de la guanábana (*Annona muricata* L.) y no existe un sistema establecido de control para esta especie. Los especímenes adultos expuestos a humedad mostraron la aparición de micelio blanquecino típico de una infección por hongos entomopatógenos. De este micelio se lograron obtener 24 aislados que variaron en color, de blanco a beige, y de apariencia algodonosa. De estos aislados, tres fueron seleccionados por su alta esporulación y producción de exudados pigmentados. La morfología colonial macroscópica y microscópica sugirieron que los aislados pertenecían al género *Beauveria*. Lo anterior fue corroborado mediante análisis molecular utilizando los iniciadores ITS4, ITS5, que codifica las regiones ITS1 8.5S ITS2; aunado a esto, el análisis indicó que los aislados pertenecían a la especie *bassiana*. No obstante, las características de morfológicas y de crecimiento diferían de esta especie en particular. Por ello, el análisis molecular utilizando el iniciador BLOC (B22U-B822L), específico para el género *Beauveria*, demostró que los aislamientos pertenecían a la especie *B. peruviansis*. Finalmente, el análisis filogenético mostró que las cepas L1P7-C3 y L2P4-C3 eran más similares entre ellas,

mientras que la cepa L2p10-C4 se separó en una rama diferente del árbol filogenético. Por ello, se concluye que los aislamientos obtenidos de cadáveres de *Optatus palmaris* pertenecen a un género con potencial entomopatógeno.

Palabras clave: *Beauveria peruviana*, caracterización molecular, gen BLOC.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi are valuable biocontrol agents which are commonly applied as formulated products. Nonetheless, one of the first steps on producing these products is the isolation, purification, and identification of such microorganisms. Some of the most relevant genera of entomopathogenic fungi includes *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, and *Isaria*. The aim of this study was to isolate and identify fungal isolates obtained from dead bodies of the Annonaceae weevil (*Optatus palmaris*). It is worth to note that this insect has become in a primary pest of soursop (*Annona muricata* L.). Moreover, there is not a established control method for this pest. The specimens exposed to humid condition showed a white mycelium coming from inside of the dead bodies, which is a typical symptom of fungal infection. From this material, 24 isolates were obtained, which showed color variation, from white to beige, and cotton texture. Three isolates were selected from the group due to their high sporulation degree and their pigmented exudates production. The macro- and micromorphological characters of their colonies suggested that the isolated belonged to the *Beauveria* genus. This was confirmed by molecular analysis using the primers ITS4, ITS5, which encode the ITS1 8.5S ITS2 regions. In addition, the ITS analysis suggested that the isolated belonged to the *B. bassiana* species. However, the morphological and growth features of the isolates differed a bit from the reported for *B. bassiana*. Thus, a molecular analysis using the BLOC gene, specific for the genus *Beauveria*, demonstrated that the isolates were more similar to *B. peruviana*. Finally, their phylogenetic analysis showed that isolates L1P7-C3 y L2P4-C3 are more similar among each other, while isolate L2p10-C4 was separated in another branch. Thus, we conclude that fungal

isolates obtained from *O. palmaris* adults belong to a genus with entomopathogenic potential.

Key words: *Beauveria peruviansis*, molecular characterization, BLOC gene.

INTRODUCCIÓN

Las inadecuadas prácticas de control o manejo de plagas han traído como resultado la resistencia de insectos considerados como plagas secundarias hasta convertirse en plagas primarias (Hernández et., al 2014). Este es el caso del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*), el cual ocasiona pérdidas entre el 68% y el 79% de la producción de guanábana (*Annona muricata* L.) (Castañeda-Vildózola et al., 2020). En este contexto, el uso de biocontroladores tiene como objetivo el disminuir la población de la plaga hasta volverlos no dañinos. Adicionalmente, los biocontroladores constituyen una práctica económica, no generan resistencia, no pone en riesgo la salud de sus aplicadores y no afecta el medio ambiente (Hanke, 2012). Sin embargo, es necesario realizar la identificación correcta de las especies controladoras, especialmente en el caso de los hongos entomopatógenos. El éxito del uso de entomopatógenos es debido en gran medida a la susceptibilidad de estos insectos a enfermedades fungosas. Además, los hongos entomopatógenos no necesitan ser ingeridos para infectar a sus insectos blanco.

Cuando las esporas de estos entomopatógenos entran en contacto con la superficie de sus hospederos, estas germinan y crecen directamente a través de ella hacia el interior de sus cuerpos (Góngora & Benavides, 2013). Entre los patógenos fúngicos de invertebrados, *Beauveria bassiana* representa una especie clave en el manejo de numerosas plagas artrópodos agrícolas, veterinarias y forestales (Mascarin & Jaronski, 2016). Este género se considera anamórfico, teleomórfico y cosmopolitas transmitidos por el suelo (Chen et al., 2018; Bustamante et al., 2019). Morfológicamente, *Beauveria* ha sido caracterizado en su estadio asexual, el cual se caracteriza por tener células

conidiógenas que surgen de células de tallo cortas. Estas células son generalmente unicelulares, más o menos hinchadas, organizadas en grupos densos o dispersas en verticilos de hifas indiferenciadas. Estos consisten en una parte basal de tipo globosa o fusiforme, con un raquis geniculado y denticulado. Sus conidios son unicelulares, hialinos, lisos, de paredes delgadas y de forma globosa a elipsoidal (De Hoog, 1972). Por otro lado, los morfotipos sexuales de este género forman estromas solitarios de textura carnosa, pareados o gregarios y sin ramificaciones, zona fértil apical, poseen cilíndricos a claviformes amarillentos o con coloración anaranjada. Su peritecio es parcialmente sumergido con sección longitudinal de forma oval a ovoide y ascos hialinos con ascosporas cilíndricas y filiformes (Kepler et al. 2017). Adicionalmente, la identidad molecular de estos hongos también ha sido caracterizada. Kepler et al. (2017) y Chen et al. (2018) llevaron a cabo estudios moleculares basados en el análisis filogenético multilocus, los cuales incluyeron las regiones intergénicas nuclear *Bloc*, el espaciador de transcrito interno (ITS), el factor de elongación de traducción-1 α (TEF), la subunidad más grande de ARN polimerasa II (RPB 1) y la segunda subunidad más grande (RPB 2). Los resultados demostraron que *Beauveria* estaba compuesta por 26 especies. De este grupo las especies comúnmente reportadas son *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii*, las cuales son usadas para el control de plagas (Marcos & Wraight, 2007).

No obstante, existen otros géneros de importancia para el control de insectos plaga que también habitan en suelos como *Beauveria*. Algunos de estos géneros incluyen a *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Thrichoderma* e *Isaria* (González-Baca et al., 2019). En este sentido, al considerar que el ciclo biológico de *O. palmaris* incluye la migración de las larvas al suelo para pupar de forma subterránea y emerger del mismo suelo como adultos, es posible que cualquiera de estos géneros pueda encontrarse asociado a adultos de *O. palmaris* y que posean potencial entomopatogénico bajo las condiciones ambientales adecuadas como alta humedad y temperatura. Cabe destacar, que estas condiciones ambientales se cumplen en el sitio de recolecta del material biológico, Las Varas, Nayarit, México (Pineda-Ríos et al. 2022). Por ello, el

objetivo de esta investigación fue aislar, purificar, caracterizar morfológica y molecularmente aislados nativos de hongos con potencial entomopatogénico del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe).

MATERIALES Y MÉTODOS

16.1 Obtención del material biológico

El material biológico consistió en especímenes machos y hembras adultos del picudo de las anonáceas (*Optatus palamaris*). Los ejemplares se recolectaron en el mes de septiembre de 2021 en huertas abandonadas de guanábana de Las Varas, municipio de Compostela, Nayarit, México (21°6'13.572", - 105°9'52.2") (Pineda-Ríos et al. 2022).

16.2 Aislamiento de hongos entomopatógenos

Los especímenes muertos, recolectados en campo, fueron colocados en cámaras húmedas para inducir la esporulación de hongos asociados al cuerpo de los insectos. Al momento de observar síntomas de micosación se utilizó una punta de una aguja para tomar micelio de los insectos y ser transferido por puntos en cajas Petri con medio de cultivo agar dextrosa Saboraud (ADS) (Bioxon®). El medio de cultivo fue suplementado con 10 µL/L de amikacina para inhibir el crecimiento de bacterias. Las cajas inoculadas se incubaron a 27°C por 15 días en oscuridad. Los hongos se purificaron mediante estría cruzada; la pureza de los aislados se corroboró a través de microscopía. Se aislaron y purificaron 25 aislamientos, de los cuales se seleccionaron tres por sus características de crecimiento y producción de exudados pigmentados.

16.3 Preservación de aislamientos fúngicos

La preservación de los aislamientos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Humber (2005). Esta consistió en cortar círculos de 5 mm de diámetro de colonias de hongos con 15 días de crecimiento en cajas Petri con ADS, los círculos se depositaron en crío-viales de 2 mL de volumen (CORNING®) con 1 mL de glicerol al 10% como crioprotector. Posteriormente, los crío-viales se almacenaron a -20 °C para su conservación.

16.4 Identificación morfológica

Para esta etapa se utilizaron aislamientos puros de tres hongos; estos cultivos se realizaron mediante raspado de conidios en un área de 0.5 cm², los cuales se colocaron en 20 mL de Tween 80 estéril al 0.03%, la suspensión se agitó suavemente por 2 min. Se tomaron 50 µL de la solución de esporas y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo ADS; para distribuir y separar los conidios se utilizó un triángulo de vidrio. Las cajas fueron incubadas a 27°C por 24h. Posterior a esto, las cajas se colocaron bajo el microscopio estereoscópico, se marcaron y cortaron con un bisturí los conidios separados se reaislaron, uno por cada caja Petri con 15 mL de medio ADS, y posteriormente se incubaron a 27°C por 15 días. Al obtener aislamientos monospóricos se seleccionaron los de mayor crecimiento y apariencia uniforme, posteriormente, estos se reaislaron y purificaron nuevamente en medio ADS para obtener mayor cantidad de material fúngico.

Para la identificación morfológica se utilizaron colonias con 10 a 15 días de crecimiento; se prepararon laminillas separando las estructuras principales de cada aislamiento, estas se observaron con un microscopio compuesto y posteriormente se tiñeron con azul de lactofenol. Para cada aislamiento se midieron 50 conidios y 30 fiálides. Se realizaron comparaciones con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

16.5 Identificación molecular

16.5.1 Extracción de ADN

Se colocó papel filtro estéril dentro de cajas Petri sobre el medio de cultivo ADS sobre los cuales se inoculó una pequeña porción de cada aislamiento de forma individual; estos se incubaron a 27°C por siete días hasta alcanzar un crecimiento radial de aproximadamente 3 cm. El micelio de cada aislamiento fue separado del papel y colocado en microtubos de 2 mL. La extracción se realizó siguiendo el protocolo del Kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp ®). En detalle, se agregaron 10 mg de micelio en un tubo de lisis ZR BashingBead™, a este tubo se le fueron agregados 750 µL de bufer BashingBead™. Posterior a esto, las muestras se maceraron en un disruptor de tejidos por 15 min velocidad de 30 agitaciones por segundo, una vez transcurrido el tiempo los tubos con las muestras, estos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 min. Del sobrenadante se transfirieron 400 µL de cada muestra a filtros Zymo-Spin III-F colocados dentro de un tubo recolector y se centrifugaron a 11,000 rpm por 1 min. Al filtrado contenido en el tubo recolector se agregaron 1200 µL de Buffer de lisis Genomic, al cual se le agregaron previamente 500 µL de beta-mercaptoetanol por cada 100 mL del Buffer. La mezcla fue homogenizada suavemente con una punta de micropipeta; de esta mezcla se transfirieron 800 µL en una columna Zymo-Spin™ IICR Column, colocadas sobre un nuevo tubo colector, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 min. Se desechó el filtrado del tubo recolector y se repitió este mismo paso con la mezcla restante; a esto se agregaron 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ IICR Column, se colocaron sobre un nuevo tubo colector y se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 min. Una vez finalizada la centrifugación, se agregaron 500 µL de g-DNA Wash Buffer a la columna y se centrifugaron a 12,000rpm por 1 min, posterior a esto, las columnas se colocaron dentro de microtubos estériles de 1.5 mL y se les agregaron 50 µL del bufer “DNA Elution”. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 1 min; el ADN se filtró y se recolectó en la base

del tubo, se retiraron las columnas y los tubos se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta su análisis.

16.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de los aislados, se obtuvieron mediante la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS, del inglés Internal Transcribed Spacer) (ITS 1 y 2 incluyendo 5.8 S). (White, et al, 1990) y de la región Intergénicas nuclear Bloc (Rehener, et al., 2006, 2011). La mezcla de reacción para la PCR en el caso de la región ITS se hizo mediante el uso de los oligonucleótidos cebadores ITS 5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Cada reacción contenía 12.5 µL de Buffer 10x, 2.5 µL de dNTP's (10 µM), 1 µL de cada primer (10 µM), 0.5 µL de Taq polimerasa (5U/µL) y 3 µL ADN de cada muestra (20 ng/µL), en un volumen final de 50 µL. Las condiciones del Termociclador (Mastercycler, Eppendorf flexlid) consistieron en un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1.5 min, seguido de alineamiento a 55 °C por 2 min y una extensión de 72 °C por 5 min y extensión final de 72 °C por 5 min y un ciclo a 12 °C por tiempo indefinido.

Para la mezcla de reacción de PCR de la región Bloc se utilizaron los cebadores B22U-F (5' GTCGCAGCCAGAGCAACT 3') y B822L (5'GTCGCAGCCAGAGCAACT 3'). Cada reacción contenía 5 µL de Buffer 10X, 1 µL de dNTP's (10 µM), 2 µL de cada primer (10 µM), 0.2 µL de Taq polimerasa (5U/µL) y 3 µL (20 ng/µL), en un volumen final de 50 µL. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 2 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineamiento a 56 °C por 30 seg, una extensión a 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 15 min y un ciclo de 12 °C por tiempo indefinido. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 % disuelto en Buffer TAE 1X GelPilot, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.1 µg/mL), se utilizó el

marcador molecular de 100pb. Las condiciones de electroforesis fueron de 80 Volts, 300mA, por 45 min. Los productos obtenidos se observaron en un fotodocumentador y se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. Corea. Todas las secuencias fueron limpiadas y ensambladas con el programa BioEdit 7.7 (Hall, 1997;2011) y alineadas con el programa Clustal W, y para el análisis filogenético se utilizó el programa MEGA X.

16.7 Análisis de las secuencias

Para realizar el análisis filogenético se hizo un análisis BLAST disponible en el National Center for Biotechnology information (NCBI) para identificar las secuencias homologas reportadas en el Banco de Genes (GenBank) realizaron los análisis utilizando los iniciadores (ITS5-ITS4 y Bloc B22U-B822L) que codifican los genes ITS 1 y 2 incluyendo 5.8S. Para el caso de los fragmentos de Bloc e ITS se utilizó el método de Máxima Verosimilitud con el Modelo de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aparición de hongos entomopatógenos sobre los cuerpos de insectos infectados generalmente ocurre en las uniones de articulaciones del exoesqueleto de los insectos afectados, lo cual sugiere que el hongo proviene del interior del cuerpo del espécimen. Dicho micelio externo posee una alta concentración de esporas que germinaran dependiendo de diversos factores ambientales (Batta, 2018). Por ello, este micelio constituye el material inicial de donde se aíslan cepas de hongos entomopatógenos. En el caso de los picudos de las anonáceas colocados en cámaras húmedas, posterior a 15 días de incubación, se observó la aparición de micelio blanquecino como se describió anteriormente (Figura 1).



Figura 6. espécimen micosado de un adulto del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*).

Del material biológico se obtuvieron 24 cepas aisladas con crecimiento algodonoso y blanquecino. Esta textura y otros caracteres morfológicos concordaron con lo reportado para aislamientos de *Beauveria*, un género fúngico importante de agentes entomopatógenos (García-Estrada et. al, 2016). Lo anterior incluye colonias algodonosas de color blanquecino o beige cuando el aislado es joven. Estas cepas cambiaron a una tonalidad amarillenta al madurar y se volverán polvorientas a medida que produzcan esporas. Cabe mencionar que algunas cepas mostraron producción de exudados pigmentados, lo que indica la producción de metabolitos especializados como antibióticos o toxinas los cuales pueden aportar al grado de virulencia de las cepas entomopatógenas (Krain and Siupka, 2019). En este contexto, cabe mencionar que se obtuvieron tres cepas, que a partir del cuarto día de crecimiento presentaron alto grado de esporulación y llenado de micelio uniforme, en las cajas de cultivo; además, cuando estas colonias maduraron produjeron exudados de color azul y café. Por ello estos tres aislamientos, denominados L1P10-C4, L1P7-C3 y L2P4-C3, fueron elegidos para su identificación molecular (Figura 2).



Figura 7. Aislamientos obtenidos y purificados de especímenes de *Optatus palmaris*. **A)** L1P10-C4; **B)** L1-P7-C3; **C)** L2P4-C3.

La identificación morfológica macroscópica y microscópica indicaron que en su etapa joven los aislamientos presentaron de 13 a 32 mm de diámetro después de ser incubado de 15 a 20 días a 27°C. Presentaron una tasa de crecimiento radial diaria de 1 a 1.6, su crecimiento fue velutinoso y adherido a la superficie del agar, en algunas colonias es esponjosa color blanco y al madurar se tornaron blanco-amarillento. Los conidios están dispuestos en racimos, las hifas son septadas, ramificadas y hialinas de paredes lisas. Presentan células conidiógenas solitarias pero densas formadas en racimos de cinco o más, base subesférica con forma de matraz, ápice indeterminado, ancho y el raquis es denticulado en forma de zig-zag; crece lateralmente sobre hifas aéreas o en células subyacentes. Los conidios miden de 2 a 3 x 1 a 3 μm , son globosos, ligeramente elipsoides, oblongos, hialinos, aceptados, y de pared lisa. Para realizar la descripción y comparación del género se utilizaron las claves taxonómicas de Humber (2005). La descripción se comparó con lo reportado por Rehner (et al., 2011) y Bustamante (et al., 2019). La identidad de los aislamientos coincidió con estructuras presentes en *B. bassiana*. No obstante, por el tipo de crecimiento de las colonias también coincidió con *B. peruvencis*. como técnicas complementarias se procedió a realizar estudios de caracterización molecular debido a que las especies del género son muy complejas.

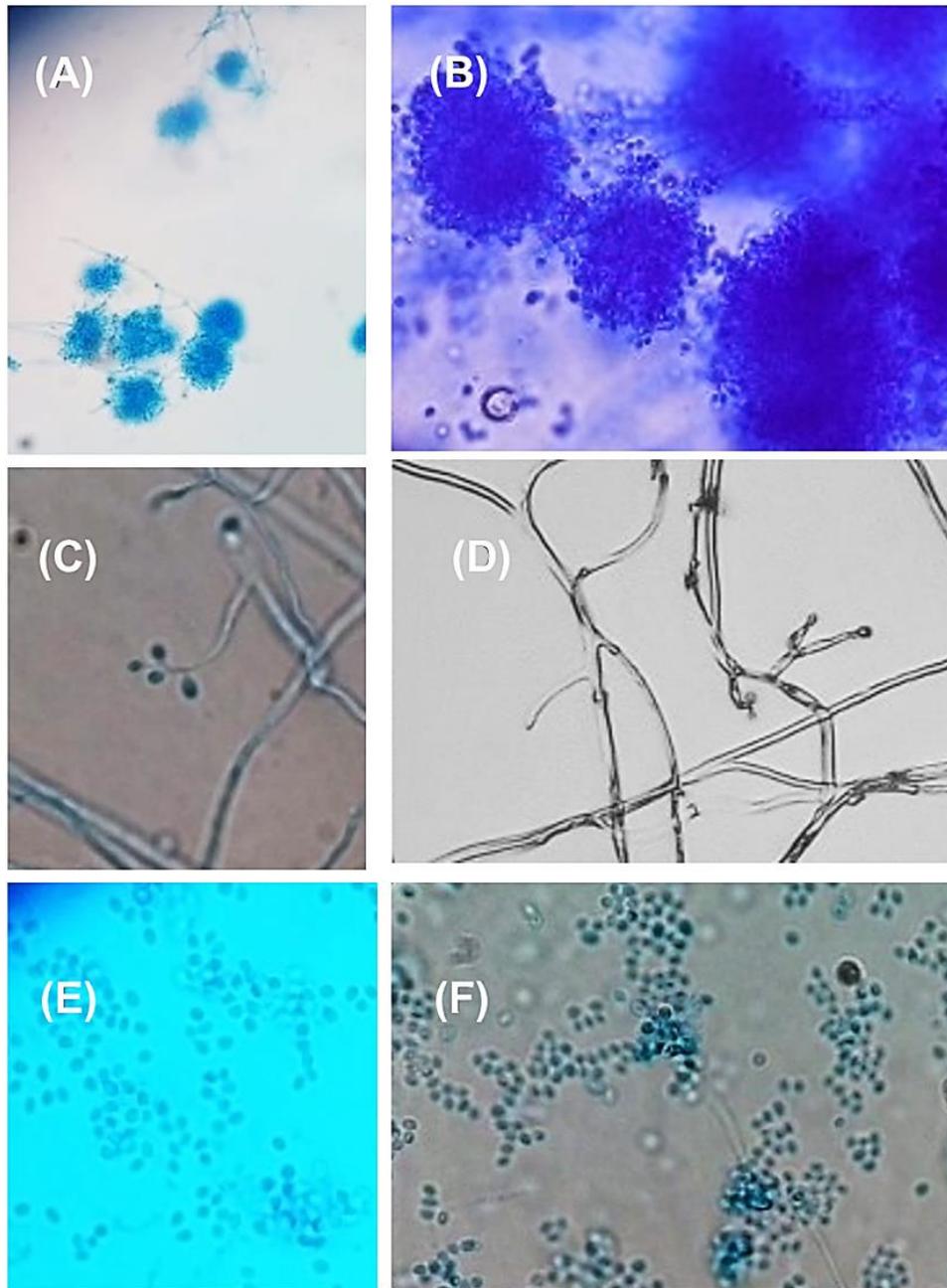


Figura 8. Estructuras fúngicas de aislamientos obtenidos de adultos de *Optatus palmaris* **(A)**, Hifas; **(B)**, conidios (maduración de un conidióforo); **(c)**, proliferación simpoidal; **(D)**, conidióforo simple; **(E)** y **(F)**, conidios.

17.1 Identificación molecular

Beauveria es un género que ha causado controversia y confusión en cuanto a su identificación específica. Al respecto, estudios recientes descubrieron teleomorfos de *Cordyceps* asociados con *Beauveria*, una de tantas razones por las cuales se han realizado estudios moleculares, los cuales han sido de apoyo para la conexión o separación filogenética entre especies de ambos géneros. En este sentido, Las técnicas de biología molecular han sido establecidas con éxito tanto para identificación, separación de especies, evaluación de persistencia y trazabilidad de hongos entomopatógenos en el suelo después de su liberación en el medio ambiente, caracterización de estructuras de poblaciones, ocurrencia natural de especies específicas, entre otros (Meyling y Eilenberg, 2006). Algunos ejemplos incluyen el estudio de similitud entre *B. bassiana* y *C. bassiana* (Sung et al., 2006) y entre *B. brongniartii* y *C. brongniartii* (Shimazu et al., 1988). Esto representa una limitante en la identificación morfológica de estos géneros, debido a que algunas especies comparten la misma forma conidial y morfología colonial. Sin embargo, estos géneros son filogenéticamente distantes, otro aspecto que propicia la realización de estudios moleculares.

En el caso de los aislamientos seleccionados para este estudio, se utilizaron los indicadores ITS4 e ITS5 (Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés), la cual es una región de DNA separada por el gen 5.8S rRNA localizado entre 18S y 28S rRNA; este fragmento ha sido ampliamente utilizado por su fácil amplificación entre todos los linajes de hongos, por lo cual han sido usados como oligonucleótidos universales (White et al., 1990; Nilsson et al., 2008; Schoch et al., 2012). El fragmento fue replicado por PCR y detectado mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Apéndice I). El análisis BLAST de las secuencias obtenidas con los iniciadores ITS4-ITS5 (5.8S) mostró un porcentaje de similitud de 98 % con *Beuaveria bassiana* para los tres aislados. Por otro lado, en la separación filogenética mediante el método ML (probabilidad logarítmica de -4323.54) y el modelo Kimura-2 parámetros incluyeron 14 secuencias de nucleótidos con un total de 785 posiciones; el análisis se realizó

con el programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021). El análisis arrojó la formación de dos grupos: uno con la especie de *B. bassiana* y el otro formado por *B. peruviansis* y *B. brongniartii* (Figura 3), como grupo externo se utilizó a *Metarhizium brunneum*. se observó que los aislamientos en estudio tuvieron 98 % de cobertura, agrupándose en el grupo de *B. bassiana*.

No obstante, se determinaron diferencias entre los tres aislamientos, lo cual separó al aislamiento L2p10-C4, aunque la cobertura indica mayor similitud con 98% a la especie *B. bassiana*, el comportamiento de crecimiento de la colonia de los aislamientos es diferente a esta especie. Por ello, en la segunda amplificación con el fragmento de iniciador BLOC (B22-B822L; Rehner et al., 2011), el cual es más específico para la especie del género *Beauveria*. Estos autores utilizaron estos fragmentos de iniciadores para encontrar las especies más cercanas dentro del complejo de especies de *Beauveria*. Para este estudio la región se analizó mediante el método de máxima verosimilitud (ML), el modelo Kimura-2 parámetros, con 14 secuencias de nucleótidos con un total de 1371 pb y 1000 repeticiones. Este fragmento también fue replicado por PCR y detectado mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Apéndice II). Los resultados mostraron que los aislamientos fueron más cercanos a la especie *B. peruviansis* con 98 % de cobertura, además, mostró la separación de estas cepas de *B. bassiana*. En adición al análisis molecular, las características de crecimiento de la especie *B. peruviansis* se asemejan con los observados en colonias de los aislamientos en estudio. Cabe mencionar que debido a la complejidad de separación de especies del género se requieren, de otros fragmentos más específicos.

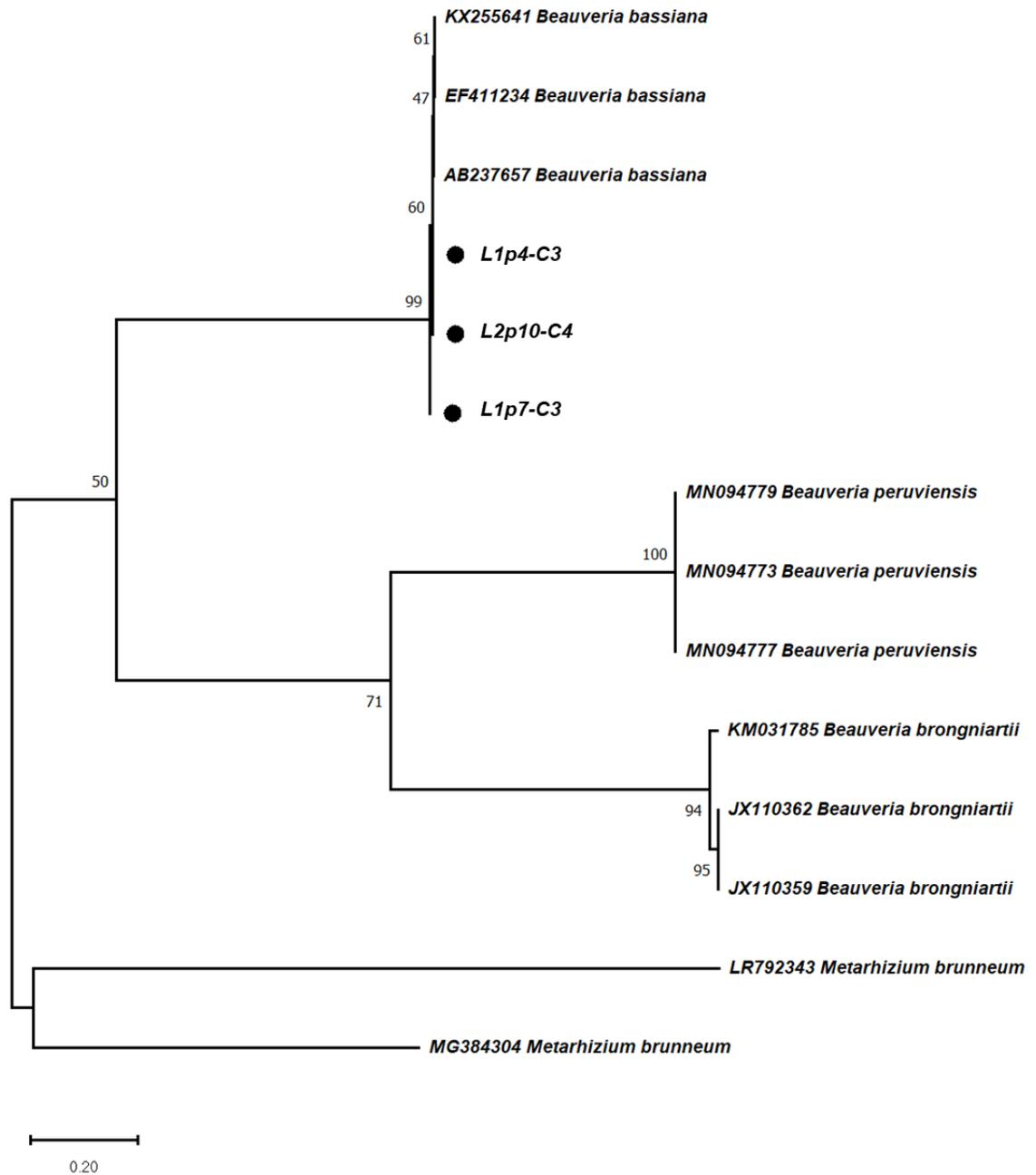


Figura 9. Reconstrucción filogenética para la agrupación de los aislamientos L1P4-C3, L2P10-C4 Y L1P7-C3 de *Beauveria* sp. (comparado con 11 aislamientos del GenBank del NCBI) basado en la región ITS (5.8S), construido con el método de ML (Máxima Verosimilitud; Bootstrap 1000 repeticiones) y distancias por Kimura-2parametros). Los porcentajes de réplica se muestran al inicio de cada rama.

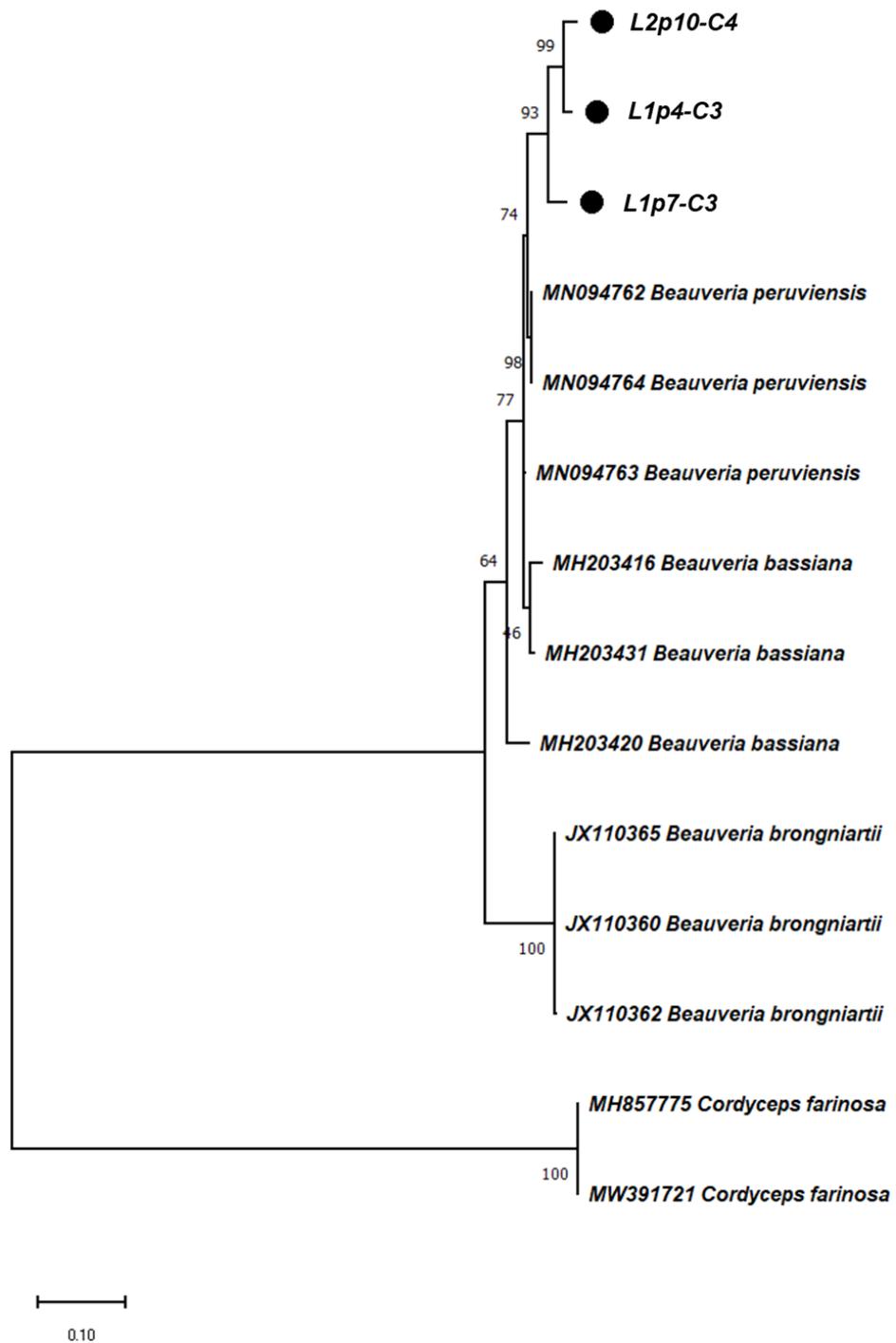


Figura 10. Reconstrucción filogenética para la agrupación de los aislamientos L1P4-C3, L2P10-C4 y L1P7-C3 de *Beauveria* sp. (comparado con 11 aislamientos del GenBank del NCBI) basado en la region BLOC (B22-B822L), construido con el metodo de ML (Máxima Verosimilitud; Bootstrap 1000 repeticiones) y distancias por Kimura-2 parámetros. Los porcentajes de réplicas se muestran al inicio de cada rama.

Es importante mencionar que este se trata del primer reporte de *B. peruviansis* en México y aislado de adultos del picudo de las anonáceas. Al respecto, existen sólo dos reportes para esta especie, la cual fue aislada en Brasil y en Perú de especímenes de *Hypothenemus hampei* (Bustamante, 2019). respectivamente. Cabe destacar que las características macroscópicas, microscópicas y genéticas sugieren que se trata de *B. peruviansis*.

CONCLUSIONES

El picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*) posee hongos asociados a su cuerpo y al menos tres aislamientos provenientes del micelio total de cadáveres de este insecto pertenecen al género *Beauveria* y especie *peruviansis*. Por ello, se concluye que dichos aislamientos pertenecen a un género con potencial entomopatógeno. Adicionalmente, los tres aislamientos mostraron crecimiento rápido y alto grado de esporulación en laboratorio, lo cual corrobora su potencial de diseminación y posible infección de insectos.

REFERENCIAS

- Barrera Sánchez, O. D., Calyecac Cortero, G. H., Castrejón Gómez, V. R., & Cuevas Sánchez, J. A. (2016). Control biológico de la chinche pata de hoja, plaga del piñón de cerro en condiciones de laboratorio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(8), 1973-1983.
- Bustamante, D. E., Oliva, M., Leiva, S., Mendoza, J. E., Bobadilla, L., Angulo, G., & Calderon, M. S. (2019). Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviansis* sp. nov. *Mycology*, 58, 47.
- Castañeda-Vildózola, Á., Morales-Trujillo, M. C., Franco-Mora, O., Valdez-Carrasco, J., & Mejía-Carranza, J. (2020). Un nuevo registro de *Optatus palmaris* Pascoe (Coleoptera: Curculionidae) asociado con *Annona* L. (Annonaceae) en el Estado de México, México. *Revista Chilena De Entomología*, 46(3), 397-400. <https://doi.org/10.35249/rche.46.3.20.07>.

- Chen WH, Man L, Huang ZX, Yang GM, Han YF, Liang JD, Liang ZQ. (2018) *Beauveria majiangensis*, un nuevo hongo entomopatógeno de Guizhou, China. *Fitotaxa* 333 : 243-250. 10.11646/phytotaxa.333.2.8
- De Hoog, G. S. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud. Mycol.*, 1, 1-41.
- Góngora, C. E., Marín, P., & Benavides, P. (2013). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Hanke, G. (2012). El control biológico: base de la agricultura sostenible: una interesante experiencia en el fundo El Mango. *La Revista Agraria*, (144), 10-12.
- Hernández, L. V., Moctezuma, H. L., Martínez, N. A. V., Bello, R. R., Rocha, D. G. C., & Contreras, R. G. C. (2014). La situación de las annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPEC.EDITION 1), 44-53. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500005>.
- Humber, R.A. 2005. Entomopathogenic fungal identification. USDA-ARS Plant Protection Research Unit US Plant, Soil & Nutrition Laboratory, Tower Road. Ithaca, NY.3-31.
- Kepler RM, Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Quandt CA, Sung GH, Rehner SA, Aime MC, Henkel TW, Sanjuan T, Zare R, Chen M, Li Z, Rossman AY, Spatafora JW, Shrestha B. (2017) Una nomenclatura de base filogenética para Cordycipitaceae (Hypocreales). *Hongos IMA* 8, 335-353. 10.5598/imafungus.2017.08.02.08.
- Kimura, M. (1980). Un método simple para estimar la tasa evolutiva de sustituciones de bases a través de estudios comparativos de secuencias de nucleótidos. *Diario de la evolución molecular*, 16, 111-120p.
- Marcos, R. de Faria, Stephen P. Wraight (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 143, 237-256.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26.
- Meyling, N. V., & Hajek, A. E. (2010). Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. *The ecology of fungal entomopathogens*, 39-54.

- NCBI (2021) National Center for Biotechnology Information. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome . Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2020. [Links]
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., & Larsson, K. H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics*, 4, EBO-S653.
- Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G., & Baverstock, J. (2014). Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 119, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.004>
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & White, M. M. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Shimazu, M., Mitsuhashi, W., & Hashimoto, H. (1988). *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 29(323), 30.
- Sung, J. M., Lee, J. O., Humber, R. A., Sung, G. H., & Shrestha, B. (2006). *Cordyceps bassiana* and production of stromata in vitro showing *Beauveria* anamorph in Korea. *Mycobiology*, 34(1), 1-6.
- Tamura K., Stecher G. y Kumar S. (2021). MEGA 11: Análisis de Genética Evolutiva Molecular Versión 11. *Biología Molecular y Evolución* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

CAPITULO III. GERMINACIÓN, METABOLITOS Y EFECTO INSECTICIDA DE HONGOS CON POTENCIAL ENTOMOPATÓGENO AISLADOS DE *Optatus palmaris* PASCOE (Curculionidae: Coleoptera)

CHAPTER III. GERMINATION, METABOLITES AND INSECTISIDE EFFECT OF POTENTIAL ENTOMOPATHOGEN FUNGI ISOLATED FROM *Optatus palmaris* PASCOE (Curculionidae: Coleoptera).

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos constituyen un grupo microorganismos que habitan comúnmente en el suelo, además, tienen la capacidad de infectar y causar mortalidad en artrópodos. No obstante, existen diversos factores que determinan el potencial de infección y mortalidad que causan estos agentes. Este estudio determinó el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de germinación de aislamientos de *Beauveria peruviansis* con potencial entomopatógeno. Además, se determinó la variabilidad de la producción de metabolitos de estos aislados, además de su patogenicidad y mortalidad. Los análisis mostraron que las temperaturas de 27 y 30 °C propician un mayor grado de germinación en los tres aislamientos fúngicos; además de obtener mejores resultados a mayores densidades de conidios en las soluciones probadas. Sin embargo, el aislado L1p7-C3 fue el que obtuvo el mayor porcentaje de germinación de los tres aislamientos, fue el aislamiento con la producción más estable de metabolitos y produjo un buen porcentaje de mortalidad en adultos de *Tenebrio molitor*. Una concentración de 1×10^6 conidios/mL es suficiente para causar mortalidad en *T. molitor*, mientras que una concentración de 1×10^8 conidios/mL es necesaria para matar a más del 90 % de la población. Por ello, se concluye que el aislamiento de *B. peruviansis* L1p7-C3 ocasiona suficiente mortalidad en *T. molitor* para ser probado contra especímenes de *Optatus palmaris* en campo.

Palabras clave: Temperatura, concentración de inóculo, patogenicidad, virulencia.¹

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Beatriz Hernández Medina
Director de tesis: Samuel Ramírez Alarcón

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi constitute a specific group of microorganisms living in the soil. Moreover, they possess the capability to infect and kill arthropods. Nonetheless, there are diverse factors which determine the infection and mortality potentials of these control agents. This study determined the effect of temperature over the germination rate of *Beauveria peruviansis* isolates with entomopathogenic potential. Furthermore, we determined metabolite variation and their insecticidal effect. The analyses showed that the germination rate of the three isolates was the best at 27 and 30 °C. Moreover, the germination ratio improved as the conidia concentration increased in the tested suspensions. However, the isolate L1p7-C3 got the best germination ratio among all isolates, and the most stable metabolite production. This isolate produced a good insecticidal effect against *T. molitor*. Finally, the inoculum concentration of 1×10^6 conidia/mL was enough to cause mortality effects in the *T. molitor* population. On the other hand, a concentration of 1×10^8 conidia/mL is needed to kill more than 90 % of the *T. molitor* population. Thus, we conclude that isolate *B. peruviansis* L1p7-C3 causes enough mortality in *T. molitor* to be tested against *Optatus palmaris* specimens at the field.

Key words: Temperature, inoculum concentration, pathogenicity, virulence. ²

² Master of Science Thesis in Plant Protection, Department of Agricultural Parasitology, Chapingo Autonomous University.

Author: Beatriz Hernandez Medina

Thesis director: Samuel Ramirez Alarcon

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos constituyen un grupo de microorganismos que habitan comúnmente en el suelo, además, tienen la capacidad de infectar y causar mortalidad en artrópodos (Mantzoukas et al., 2022). Interesantemente, estos hongos también son considerados enemigos naturales de insectos plaga, lo cual produjo el interés y uso de dichas interacciones especializadas como estrategias de control biológico y así ser un componente del manejo integrado de plagas (Alfiky, 2022). En general, se han formulado numerosas cepas de hongos entomopatógenos para su uso comercial como insecticidas e incluso se les ha reconocido como un reemplazo potencial al uso de pesticidas químicos. A pesar de ello, existen varios factores que limitan el uso de hongos entomopatógenos de forma común en los sistemas agrícolas. Estos factores incluyen la alta dificultad para su aislamiento y caracterización de nuevas cepas, efectos ambientales sobre estas, el tipo de vegetación en que actúan y la misma intervención humana (Bamisile et al., 2021). Aunado a estas limitantes, en algunas ocasiones no es posible probar la eficiencia de estos hongos sobre la especie de la que fueron aislados; esto debido a que existen especies de insectos para los que no hay dietas artificiales disponibles, lo cual impide el establecimiento de un pie de cría (Pineda-Ríos et al., 2022). Sin embargo, existen especies con ciclos de vida largos que también complican operativamente, el ser utilizado como modelos iniciales de estudio.

El picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*) es uno de estos casos. No existe una dieta artificial o condiciones reportada para el establecimiento de pies de cría. Adicionalmente, su ciclo de vida es extremadamente largo, con duración total de entre 216 a 245 días contabilizados desde la ovoposición hasta la emergencia de los adultos (Maldonado-Jiménez et al., 2014). En este sentido, cabe resaltar la importancia de insectos modelo para la realización de dichos estudios. Uno de los más utilizados en la evaluación de hongos entomopatógenos es el gusano de la harina (*Tenebrio molitor*). Este insecto pertenece a la familia Tenebrionidae, es de color negro, con antenas moniliformes y posee piezas bucales pequeñas,

además de que es considerado una plaga de importancia (Howard, 1995; Vigneron et al., 2019).

Aun siendo una plaga, este insecto ha sido usado ampliamente como insecto modelo en el estudio de hongos entomopatógenos, principalmente, debido a su ciclo de vida corto, su fácil manipulación y adaptabilidad (Toriello et al., 2008). Un ejemplo del uso de este insecto incluye la evaluación de *Metarhizium anisopliae*, aislado de suelo agrícola del oriente del estado de México, la evaluación de la mortalidad causada por este hongo sobre *T. molitor* (Alcantara et al., 2020). Otro ejemplo comprende la caracterización de hongos entomopatógenos aislados de rizosfera de maíz (Nelly et al., 2019). Incluso, *T. molitor* se ha usado para probar la virulencia de hongos entomopatógenos de diversas especies aislados de insectos (Praprotnik et al., 2018). Finalmente, este insecto ha sido utilizado como medio para la construcción de una librería de hongos entomopatógenos, la cual incrementó el número de aislados obtenidos con potencial entomopatogénico (Kim et al., 2018).

Una vez que se ha determinado el modelo de estudio, se procede a probar su índice de germinación a diferentes temperaturas y con base en esto se procede a hacer pruebas de virulencia para determinar su funcionalidad como agentes entomopatógenos. Por lo anterior, se decidió utilizar adultos de *T. molitor* como modelo de estudio para determinar la patogenicidad y virulencia de aislamiento fúngico con potencial entomopatógeno obtenidos de cadáveres de *O. palmaris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

23.1 Efecto de la temperatura en la germinación de conidios in vitro

A partir de colonias de 15 días de edad se obtuvieron conidios de los cuales se evaluó su germinación a 27, 28 y 30 °C. Para este experimento se utilizaron tres concentraciones de suspensiones de esporas de cada aislamiento (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 mL⁻¹). Los conteos se hicieron con una cámara de Neubauer y la fórmula reportada por Lawrence (2012). De cada concentración se colocaron cinco alícuotas de 10 µL, separadas entre ellas en 24 cajas Petri de 90 mm diámetro con 15 mL de Agar Dextrosa Saboraud; estas fueron preparadas para cada temperatura y su evaluación. Se hicieron tres repeticiones para un muestreo destructivo después de 16, 24 y 48 h de incubación y germinación. Para realizar la evaluación una vez transcurrido cada tiempo de incubación, los conidios fueron fijados con azul de algodón al 10% en lactofenol. Para realizar los conteos se utilizó el objetivo de 40X de un microscopio compuesto (OLYMPUZ CX31). La proporción de conidios germinados y no germinados fue de 200, los cuales se seleccionaron al azar, estos conteos se hicieron para cada alícuota de 10 µL colocadas en cada repetición. Se consideraron conidios germinados aquellos en que el tubo germinativo era más largo que el diámetro del conidio.

Para obtener el porcentaje de germinación se utilizó la fórmula reportada por Lawrence (2012).

$$\% \text{ de germinación} = [a/(a+b)] \times 100$$

a = conidios germinados

b = conidios no germinados.

23.2 Extracción de metabolitos y análisis por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)

Se utilizaron cultivos de las cepas *Beauveria peruviana* L1p4-C3, *B. peruviana* L2p10-C4 y *B. peruviana* L1p7-C3 de 7 días de crecimiento contabilizados desde el momento de su inoculación. Se hicieron 5 réplicas biológicas, donde una caja con un aislamiento fue una réplica. El medio de cultivo que contenía los aislados se cortó en secciones de aproximadamente 0.5 cm² y se transfirieron a un tubo de 50 mL. Posteriormente se les agregó 20 mL de acetato de etilo y fueron extraídas en un baño ultrasónico por 20 min. Transcurrido el tiempo de extracción, los sobrenadantes fueron filtrados y secados mediante destilación al vacío en un rotaevaporador (Büchi). Los extractos secos fueron preparados a concentración de 5 mg/mL disueltos en acetato de etilo para ser analizados por HPTLC.

El análisis usó con placas cromatográficas de alta resolución de sílica gel 60 A de 20 x 10 cm con indicador de fluorescencia F₂₅₄ (Merck). Las muestras fueron aplicadas con un muestreador automático ATS4 (CAMAG) como bandas de 6 mm de largo y 11.4 mm de separación entre cada banda contabilizados desde el centro de cada banda. Las muestras fueron aplicadas a 10 mm por arriba de la base de la placa cromatográfica y 20 mm de cada borde lateral de la placa. Para la separación cromatográfica, la fase móvil consistió de una mezcla de cloroformo:acetona:ácido fórmico (8.5:0.65:0.85, v/v/v). La separación cromatográfica se hizo en un desarrollador automático ADC2 (CAMAG) con tiempo de saturación de cámara de 20 min y control de humedad a 47 % con una solución saturada de isotiocianato de potasio. La distancia de desarrollo de la placa fue de 85 mm medidos desde la base de la placa. Una vez desarrollada la placa, esta se secó automáticamente durante 5 min para ser derivatizada por inmersión en anisaldehído sulfúrico a 100 °C por 3 min. Las imágenes de las separaciones cromatográficas fueron documentadas en un visualizador automático (CAMAG) bajo luz ultravioleta a 366 nm. Posteriormente fueron procesadas con el software rTLC (Fichou et al., 2016).

23.3 Estimación de la virulencia del aislamiento con mejor porcentaje de germinación y mayor homogeneidad metabólica

Para esta fase se utilizaron adultos de *Tenebrio molitor*, los cuales fueron inoculados mediante inmersión. En detalle, se utilizó el aislamiento L1p7-C3 en tres concentraciones (1×10^3 , 1×10^6 y 1×10^8), cada una preparada en 1000 mL de tween 80 al 0.03%. Para lograr la inmersión de los insectos en las suspensiones, estos se colocaron en coladeras de 5 cm de diámetro y los orificios permitieron la entrada de la suspensión. El tiempo de inmersión fue de 5 segundos, posteriormente los insectos se colocaron en papel absorbente para retirar el exceso de humedad y colocados en recipientes de plástico de 50 mL con tapa. El testigo se inoculó con tween 80 al 0.03%. Todos los tratamientos se incubaron a $27^\circ\text{C} \pm 1$, con humedad relativa de 70%; las observaciones se realizaron cada tercer día durante un periodo de 15 días. Los adultos muertos se colocaron individualmente en cámaras húmedas para confirmar la invasión del hongo en el cuerpo del insecto. Se utilizaron 40 insectos por cada tratamiento. Los insectos fueron alimentados con avena y zanahoria durante todo el experimento.

23.4 Análisis estadístico

El porcentaje de germinación se evaluó con un análisis de varianza factorial y una comparación de medias por Tukey con tres repeticiones y 5 sub-repeticiones por tratamiento. Los análisis se realizaron en el programa estadístico SAS On Demand for Academics en línea. El experimento de virulencia se realizó bajo un diseño completamente al azar con 40 repeticiones por tratamiento más testigo. Los resultados de mortalidad obtenidos a los 15 días de evaluación se analizaron por un modelo de regresión logística binaria con el paquete estadístico SAS On Demand for Academics. Con los resultados de esta evaluación se realizaron otros análisis; el primero consistió en una comparación de las tres concentraciones mediante un análisis Probit. En el caso del análisis por HPTLC, las imágenes cromatográficas fueron analizadas con el software rTLC usando las medidas de desarrollo de la placa como medidas de extracción de datos en el software. El

tamaño de integración de datos fue de 128 pixeles y se utilizó la información del canal rojo para hacer una matriz de datos para análisis multivariado. Dicho análisis consistió en análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). El modelo fue escalado por el método de varianza unitaria utilizando el software SIMCA-P (v.15.0.2, Umetrics, Umeå, Sweden).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

24.1 Efecto *in vitro* de la temperatura sobre la germinación de conidios de aislados de *Beauveria peruviansis*

La temperatura es uno de los factores más importantes del medio ambiente que influye en la germinación y desarrollo de los hongos entomopatógenos en condiciones naturales; existen diversos estudios de la influencia *in vitro* de este factor sobre la germinación y crecimiento de 31 aislamientos de 6 géneros de hongos entomopatógenos, donde su tasa de crecimiento fue 8 y 37 °C (Fargues, et al., 1992). El análisis estadístico de los datos de germinación mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a la influencia de la temperatura de crecimiento en cada aislamiento. En el caso del aislamiento 1 (L1p7-C3), las mejores temperaturas para la germinación de sus esporas fueron 27 y 30 °C, donde el promedio del porcentaje de germinación observado fue de 96.50% ($Pr > F = 0.0007$; $\alpha = 0.05$). Adicionalmente, el análisis determinó que a mayor concentración de la suspensión de conidios mayor fue el porcentaje de germinación obtenido ($Pr > F = < 0.0001$; $\alpha = 0.05$). Por tanto, las suspensiones de conidios con mayor concentración de estas a temperaturas de 27 y 30 °C mostraron los mayores porcentajes de germinación ($Pr > F = 0.0437$; $\alpha = 0.05$) (Figura 11).

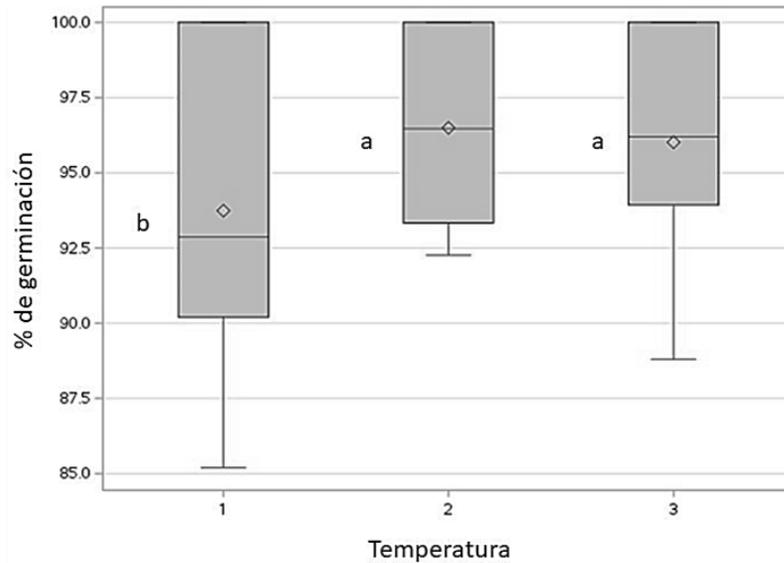


Figura 11. Influencia de la temperatura en la germinación in vitro del aislamiento 1 de *Beauveria peruviana* (L1p7-c3), inoculados por 16 h. la barra de error representa el 95% de confiabilidad. Temperatura 1 = 25°C, Temperatura 2 = 27°C, Temperatura 3 = 30°C.

Para caso del aislamiento 2 de *B. peruviana* (L2p10-C4), las mejores temperaturas para la germinación de sus conidios fueron 27 y 30 °C al igual que el aislamiento 1. El valor promedio del porcentaje de germinación para este aislamiento fue de 91.48 y 92.58% ($Pr > F = 0.0008$; $\alpha = 0.05$). De igual manera, se determinó que, a mayor concentración de conidios en las suspensiones evaluadas, mayor fue el porcentaje de germinación observado en cada una de estas ($Pr > F = < 0.0001$; $\alpha = 0.05$). Esto indica que las suspensiones de conidio con mayor concentración incubadas a 27 y 30 °C obtuvieron el mayor índice de conidios germinados para este aislamiento ($Pr > F = 0.0336$; $\alpha = 0.05$) (Figura 12).

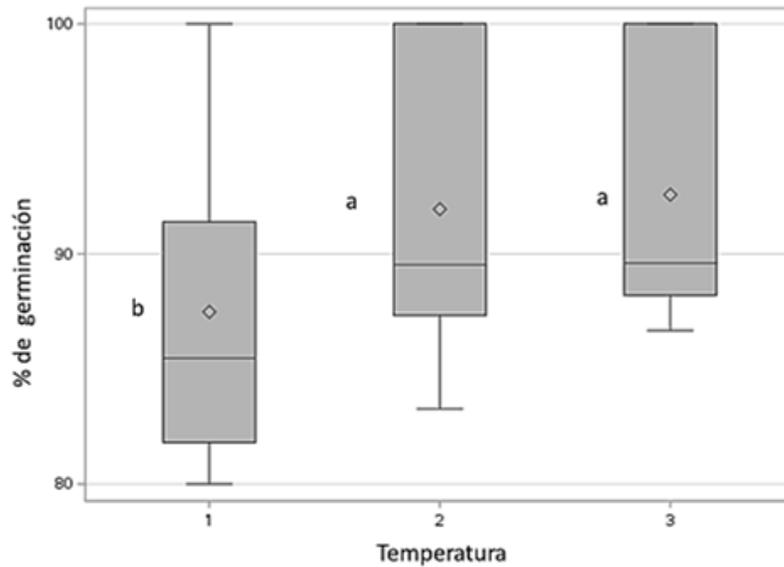


Figura 12. Influencia de la temperatura en la germinación *in vitro* del aislamiento 2 de *Beauveria peruviana* (L2P10-C4) Incubados por 16h. la barra de error representa el 95% de confiabilidad. Temperatura1=25°C, Temperatura 2 = 27° C, Temperatura 3 =30°C.

En el caso del aislamiento 3 de *B. peruviana* (L1p4-C3), las mejores temperaturas fueron para la germinación de sus conidios fueron 27 y 30 °C. El valor promedio del de germinación fue de este aislado fue de 93.81 y 90.93%, respectivamente ($Pr > F = <0.0001$; $\alpha = 0.05$). Al igual que en los otros aislamientos, se observó que a mayor concentración de la suspensión de esporas mayor fue el porcentaje de germinación obtenido ($Pr > F = <0.0001$; $\alpha = 0.05$). Lo cual, nuevamente indica que las suspensiones con mayor concentración de conidios incubadas a 27 y 30 °C obtuvieron el mejor porcentaje de germinación para este aislamiento ($Pr > F = 0.0013$; $\alpha = 0.05$) (Figura 13).

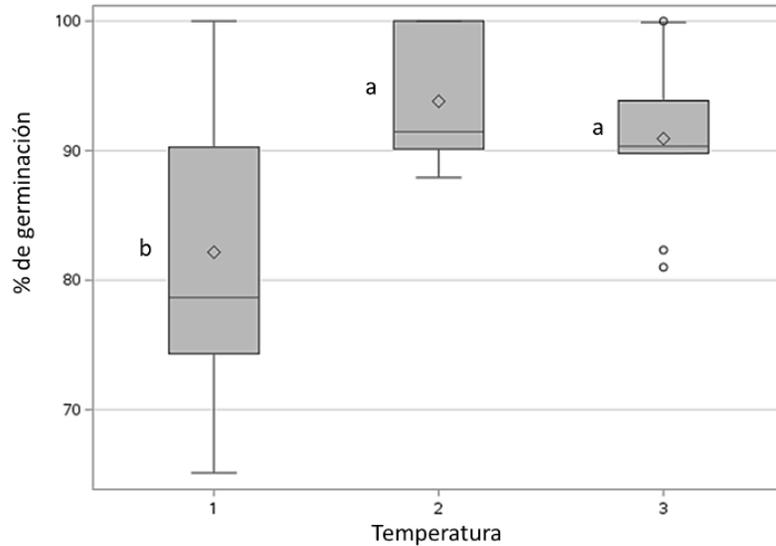


Figura 13. Influencia de la temperatura en la germinación *in vitro* del aislamiento 3 de *Beauveria peruviana* (L1P4-C3) incubado por 16 h. La barra de error representa el 95% de confiabilidad. Temperatura 1 =25°C, Temperatura 2= 25°C, Temperatura 3= 30°C.

De esta forma se determinó que las mejores temperaturas para germinación de los conidios de los tres aislamientos de *B. peruviana* son 27 y 30 °C en suspensiones con densidad de esporas de 1×10^8 conidios por mL de medio de cultivo. Estos resultados coinciden con los reportados para *Baeuveria bassiana* que presentó un rango óptimo de temperatura de crecimiento de 25 a 30°C (Ekési et al. 2010; Mwamburi et al., 2015; Moldovan et al., 2022). Por otro lado, cabe destacar que en el caso los aislados en estudio, se observó mejor crecimiento arriba de los 25 °C, esto posiblemente debido a una adaptación de los hongos a las altas temperaturas del área geográfica en donde habitan los picudos de las anonáceas, lo cual también fue observado por Nussenbaum y colaboradores en 2013. Aun así, cabe destacar que el aislamiento 1 de *Beauveria peruviana* (L1p7-C3) presentó entre el 5 y 7 % mayor germinación de conidios con respecto a los otros dos aislamientos. Adicionalmente, el comportamiento de porcentajes de germinación a las tres temperaturas y tres concentraciones fue más homogéneo también en el aislamiento 1, lo cual se observó en sus desviaciones estándares que fue siempre alrededor del 5 % de variabilidad en las tres temperaturas y concentraciones de conidios. Estos resultados sugieren que este

aislamiento pudiera poseer un metabolismo menos heterogéneo (más conservado) que los otros dos aislamientos.

24.2 Perfil de metabolitos de aislamientos de *Beauveria peruviansis* por HPTLC

El HPTLC es una herramienta robusta que permite la comparación visual rápida de perfiles de metabolitos y comparación numérica cuando se acopla a análisis multivariado (Fichou et al., 2016). En este caso, los extractos de los tres aislados fúngicos fueron caracterizados por esta técnica. El análisis visual del HPTLC mostró de forma general que las tres cepas producen una gran diversidad de metabolitos. Además, demostró que las cepas L1p4-C4 y L2p10-C3 de *B. peruviansis* produjeron perfiles de metabolitos más heterogéneos entre sus réplicas biológicas en comparación a los perfiles obtenidos de réplicas del aislado L1p7-C3 (Figura 14A). Posteriormente, el análisis por PCA mostró la separación de las muestras debido a sus perfiles de metabolitos. El modelo produjo tres componentes principales (PCs) que explicaron el 79 % de la variabilidad total ($RX^2_{cum} = 0.79$), lo cual significa que sólo el 21 % de la separación y variabilidad de las muestras no está explicada por la variación metabólica de los aislamientos. El PC1 capturó el 60 % de la variabilidad total del modelo, mientras que el PC2 y el PC3 explicaron el 13 y 6 %, respectivamente. Interesantemente, incluso si el PC3 sólo capturó una baja porción de la variabilidad de los aislados, es en este PC donde las muestras se separan de acuerdo con el actor aislamiento ellas (Figura 14B). En adición a esto, el análisis de PCA de los perfiles cromatográficos de las cepas demostró que la composición metabólica de la cepa L1p7-C3 es más diferente a la de las otras dos cepas que son más similares entre ellas (Figura 14B). Cabe mencionar que esto está en concordancia con los resultados del análisis filogenético que usó un fragmento del gen BLOC, en donde la cepa L1p7-C3 se agrupa en una rama diferente a la de los otros dos aislados.

En cuanto esto, ha sido reportado que los metabolitos especializados juegan un papel importante en los procesos de invasión y muerte del insecto blanco de los hongos entomopatógenos (Guamán, 2022). En el caso de *B. bassiana*, ha sido reportado que la bassianolida, beauvericina, el ácido dipicolínico, entre otros, son

toxinas que ayudan al establecimiento de la infección por el hongo y causan toxicidad sobre el insecto blanco (Hajek and Leger, 1994). Por ello, el que un aislado produzca perfiles más homogéneos y reproducibles entre réplicas biológicas sugiere fuertemente que los efectos biológicos de este aislado, por ejemplo, su virulencia, serán más homogéneos también. Si bien esto no ha sido determinado en hongos entomopatógenos, el estudio de los perfiles metabolómicos de hongos endófitos y la expansión metabólica causada por estos al ser alimentados con extractos de sus hospederos mostró una producción altamente homogénea y reproducible entre réplicas biológicas, lo cual resultó en el incremento de su efecto antifúngico contra especies fitopatógenas (Salomé-Abarca et al., 2022). Por ello, tomando en cuenta que el aislado de *B. peruviansis* L1p7-C3 posee el mejor porcentaje de germinación (patogenicidad) y la producción más estable de metabolitos, se considera como la cepa con mayor potencial entomopatógeno para ser probada contra un insecto modelo.

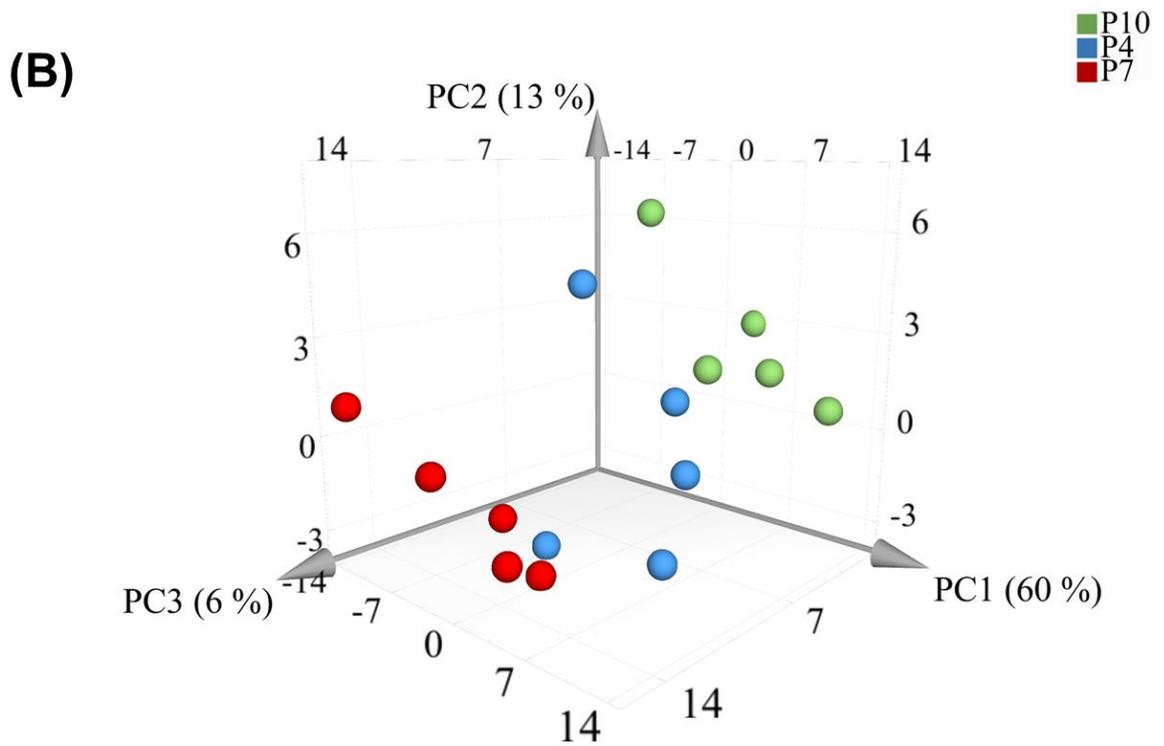
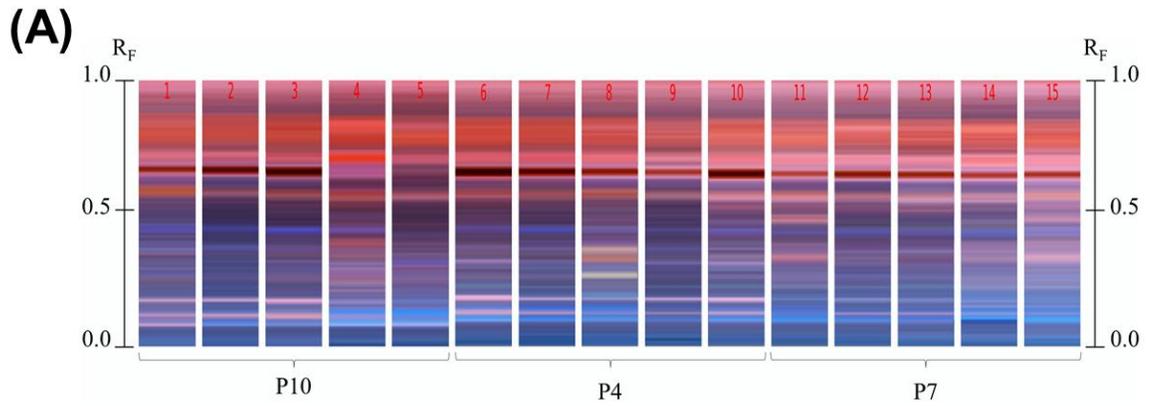


Figura 14. (A), Análisis del perfil de metabolitos de aislado de *Beauveria peruviansis* por HPTLP. **(B)**, Análisis de componentes principales de los perfiles de metabolitos analizados por HPTLP de aislados de *Beauveria peruviansis*.

24.3 Estimación de la patogenicidad

Este bioensayo fue evaluado cada tercer día después de la inoculación con los tratamientos, hasta cumplir un periodo de 15 días. En el (cuadro 2) se presentan los porcentajes de mortalidad obtenidos en el bioensayo. De acuerdo con los resultados obtenidos por la prueba de Tukey ($Pr > F = 0.0005$; con un $\alpha = 0.05$) se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones de inóculo. El porcentaje de mortalidad más alto obtenido en menor tiempo (días) fue en el tratamiento 2 (1×10^6) con casi el 90 % de mortalidad; este valor fue seguido por el obtenido con los tratamientos 1 (1×10^3) y 3 (1×10^8). No obstante, estos tratamientos produjeron alrededor de un 50% menos mortalidad que el tratamiento 2 al finalizar el bioensayo. Esto indicó que la mortalidad de los insectos no incrementa de manera proporcional al incremento de la concentración de conidios en las suspensiones de pruebas (Figura 15). No hubo diferencias significativas entre el testigo y el control negativo en sus valores de mortalidad. Cabe mencionar que los insectos muertos en estos dos tratamientos fueron debido al término de su ciclo biológico. Esto fue corroborado ya que estos insectos no expresaron síntomas de micosamamiento al ser colocados en cámaras húmedas. Por otro lado, los adultos de *T. molitor* muertos en los tratamientos desarrollaron síntomas, incluso mayor a la observada en especímenes de *O. palmaris* de donde se obtuvieron los aislados (Figura 16B). Estos resultados son comparables con los porcentajes obtenidos por otros autores (Quintana, 2000; Solis et al., 2006) quienes reportaron que a concentración de 1×10^8 esporas/mL se obtuvo el 100% de mortalidad de larvas *Rhyacionia buoliana*. No obstante, cabe mencionar que el efecto de las diferentes concentraciones de inóculo podrían cambiar si el tiempo de evaluación del bioensayo incrementara. En este sentido, algunos modelos matemáticos podrían ayudar en la predicción de estimadores y dosis letales efectivas que servirían como dosis de pruebas para experimento tanto en campo como en laboratorio.

Cuadro 2. Mortalidad y valores de significancia estadística en adultos de *Tenebrio molitor* a los 15 días de ser inoculados con el aislamiento 1 (L1P7-C3)

Tratamiento	Concentración	Mortalidad (% LS-Means)
T2	10^6	42.4541 a
T1	10^3	29.6494 b
T3	10^8	29.3207 b
Testigo	0	4.8025 c

Los valores promedios de la mortalidad seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $Pr > F = 0.0005$; $\alpha = 0.05$).

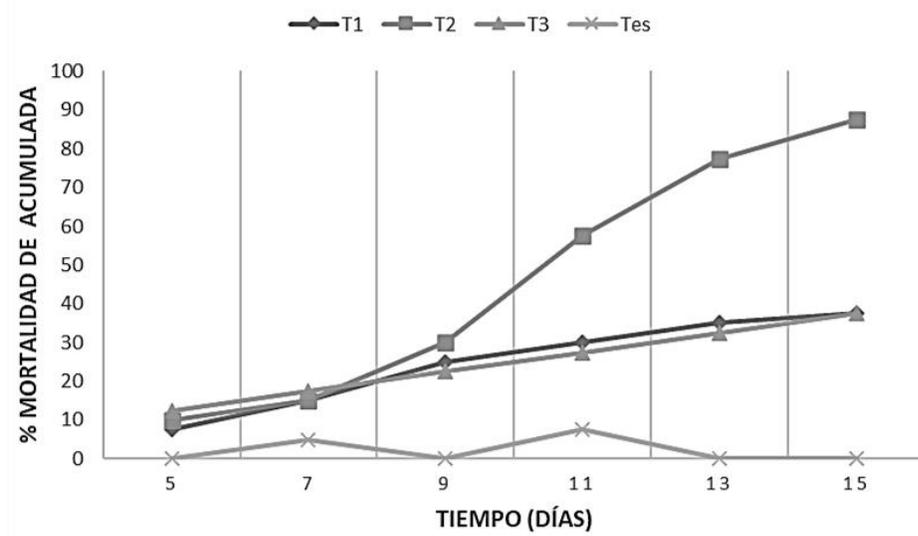


Figura 15. Porcentaje de mortalidad acumulada de adultos de *Tenebrio molitor* de acuerdo con la concentración, T1= 1×10^3 , T2= 1×10^6 , T3= 1×10^8 conidios/ML. Testigo=testigo.

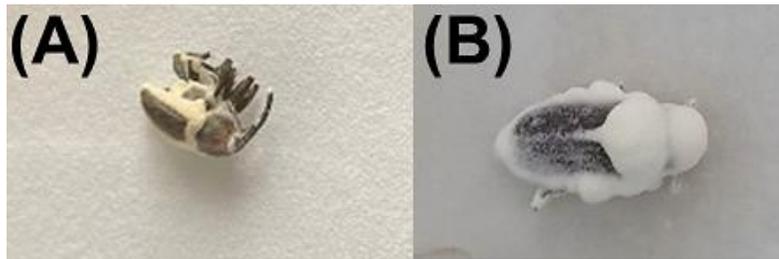


Figura 16. (A) Adulto de *Optatus palmaris* micosado, (B) Adulto de *Tenebrio molitor* micosado al finalizar el bioensayo de virulencia del aislado L1P7-C3.

24.4 Estimación de la virulencia (análisis probit)

Mediante la prueba Probit se determinó que la concentración media (CL₅₀) (log₁₀) fue de 2.8562 (2.8X10⁶) la con sus límites fiduciales de 0.8904 (inferior) y el límite superior fue 3.8462 y con la ecuación de la recta para el aislamiento 1(L1p7-C3) de $y = -0.887 + 0.3106 X$. La CL₉₀ (log₁₀) fue de 8.1522 (8.1X10⁸), con los límites fiduciales fue de 6.9235 (límite inferior) y 10.8944 como límite superior. Los valores obtenidos coinciden con los de otros trabajos similares hechos en *Ecdytolopha torticornis* fue de 2.44 X10⁶ (González et al, 1996), para *Dione juno* con CL₅₀ de 9.39 X10⁶ (Malpartida et al., 2013). Estos resultados demuestran la efectividad del aislamiento sobre adultos de *Tenebrio molitor* e indican que a una concentración de 1X10⁶ conidios/mL se puede obtener efectividad sobre la población plaga y la mortalidad alta observada podría obtenerse (CL₉₀) a concentración de 1x10⁸ en condiciones de laboratorio. Sin embargo, en aplicaciones realizadas en campo, debe tomarse en cuenta que la cantidad de conidios que llegan al insecto es por general menor, por lo que se debe determinarse previamente la concentración necesaria para alcanzar la concentración deseada sobre los insectos.

CONCLUSIONES

Los tres aislados de *Beauveria peruviansis* obtenidos de cadáveres de *O. palamris* mostraron el mayor porcentaje de germinación de conidios a 27 y 30 °C. Este efecto se vio maximizado conforme se incrementó la concentración de la solución de conidios. El aislamiento L1p7-C3 fue el obtuvo el porcentaje de germinación de conidios más alto en las condiciones anteriormente descritas. Adicionalmente, los valores de germinación producidos por este aislamiento fueron los más estables de los tres aislados que se probaron. Esta estabilidad se vio reflejada en la producción de metabolitos de este, además, su perfil metabólico también fue el menos variable de los tres aislamientos probados. Esto resaltó el potencial entomopatogénico del aislamiento L1p7-C3. Este potencial fue corroborado mediante pruebas de patogenicidad y virulencia, las cuales

determinaron que una concentración de 1×10^6 conidios/mL es suficiente para producir un efecto de mortalidad sobre poblaciones de *T. molitor* y una concentración de 1×10^8 conidios/mL para causar una mortalidad igual o mayor al 90%. Por ello, se concluye que el aislamiento de *B. peruviansis* L1p7-C3 ocasiona suficiente mortalidad en *T. molitor* para ser probado contra especímenes de *O. palmaris* en campo.

REFERENCIAS

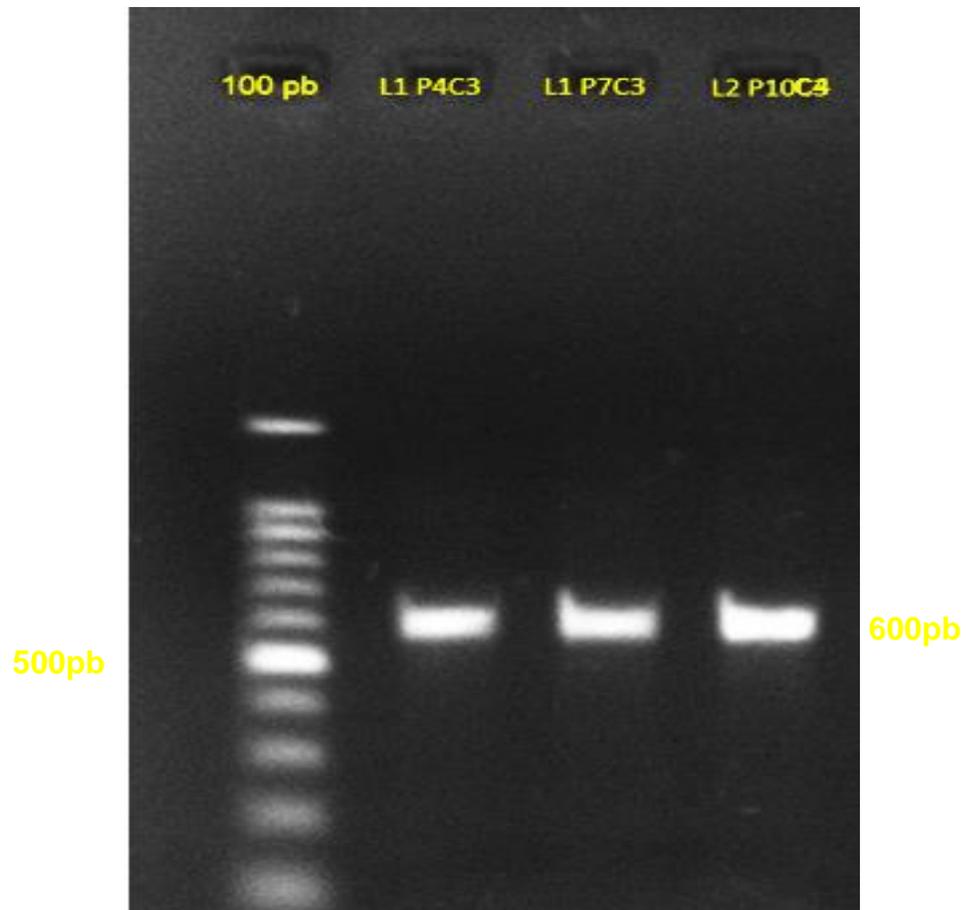
- Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., & Angel-Cuapio, A. (2020). Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91, e912912.
- Alfiky, A. (2022). Screening and identification of indigenous entomopathogenic fungal isolates from agricultural farmland soils in Nile Delta, Egypt. *Journal of Fungi*, 8(1), 54.
- Bamisile, B. S., Siddiqui, J. A., Akutse, K. S., Ramos Aguila, L. C., & Xu, Y. (2021). General limitations to endophytic entomopathogenic fungi use as plant growth promoters, pests and pathogens biocontrol agents. *Plants*, 10(10), 2119.
- Ekesi, S., Maniania, N. K., & Ampong-Nyarko, K. (1999). Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology*, 9(2), 177-185.
- Fargues, J., Maniania, N.K., Delmas, J.C. and N. Smits. 1992. Influence de la temperature sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes, *Agronomie, Entomologie*; 12, 557-564.
- Fichou, D., Ristivojevic, P., & Morlock, G. E. (2016). Proof-of-principle of rTLC, an open-source software developed for image evaluation and multivariate analysis of planar chromatograms. *Analytical chemistry*, 88(24), 12494-12501.
- González, H., Carballo, M y H. Blanco. 1996. Efecto de cepas de *Beauveria bassiana* sobre la mortalidad de *Ecdytolopha torticornis* (Lep.: Tortricidae) en macadamia. *Manejo Integrado de Plagas*. 40:17-23.
- Guamán, M. A. (2022). Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas. *γκακ*,

8.5.2017, 2003 2005.

- Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39(1), 293-322.
- Howard, R. S. (1955). The biology of the grain beetle *Tenebrio molitor* with particular reference to its behavior. *Ecology*, 36(2), 262-269.
- Kim, J. C., Lee, M. R., Kim, S., Lee, S. J., Park, S. E., Nai, Y. S., Lee, G.S., Shin, T.Y., & Kim, J. S. (2018). *Tenebrio molitor*-mediated entomopathogenic fungal library construction for pest management. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(1), 196-204.
- Lawrence, A. L. (2012). *Manual of Techniques of Invertebrate Pathology*. Academic Press, Yakima, USA. 484 pp.
- Maldonado, J. E., Hernández, F. L. M., Luna, E. G., Gómez, A. J. R., Flores, C. R. J., & Santos, M. O. (2014). Bioecology of *Optatus palmaris* Pascoe (Coleoptera: Curculionidae) in *Annona muricata* L. *Southwestern Entomologist*, 39(4), 773-782.
- Malpartida, Z. J., Narrea, C.M. y W. D. Larraburre. 2013. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer)(Lepidoptera :Nymphalidae) in the laboratory.
- Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Natsiopoulos, D., & Eliopoulos, P. A. (2022). Entomopathogenic fungi: interactions and applications. *Encyclopedia*, 2(2), 646-656.
- Moldovan, A., Munteanu-Molotievskiy, N., & Toderas, I. (2022). Temperature effects on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* strain cnmn-fe-01: vegetative growth, sporulation, germination rate. *Current Trends in Natural Sciences*, 11(21), 332-338.
- Mwamburi, L. A., Laing, M. D., & Miller, R. M. (2015). Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian journal of Microbiology*, 46, 67-74.
- Nelly, N., Syahrawati, M. Y., Hamid, H., Habazar, T., & Gusnia, D. N. (2019). Diversity and characterization of entomopathogenic fungi from rhizosphere of maize plants as potential biological control agents. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(5).
- Nussenbaum, A. L., Lewylle, M. A., & Lecuona, R. E. (2013). Germination, radial growth and virulence to boll weevil of entomopathogenic fungi at different temperatures. *World Applied Sciences Journal*, 25(8), 1134-1140.

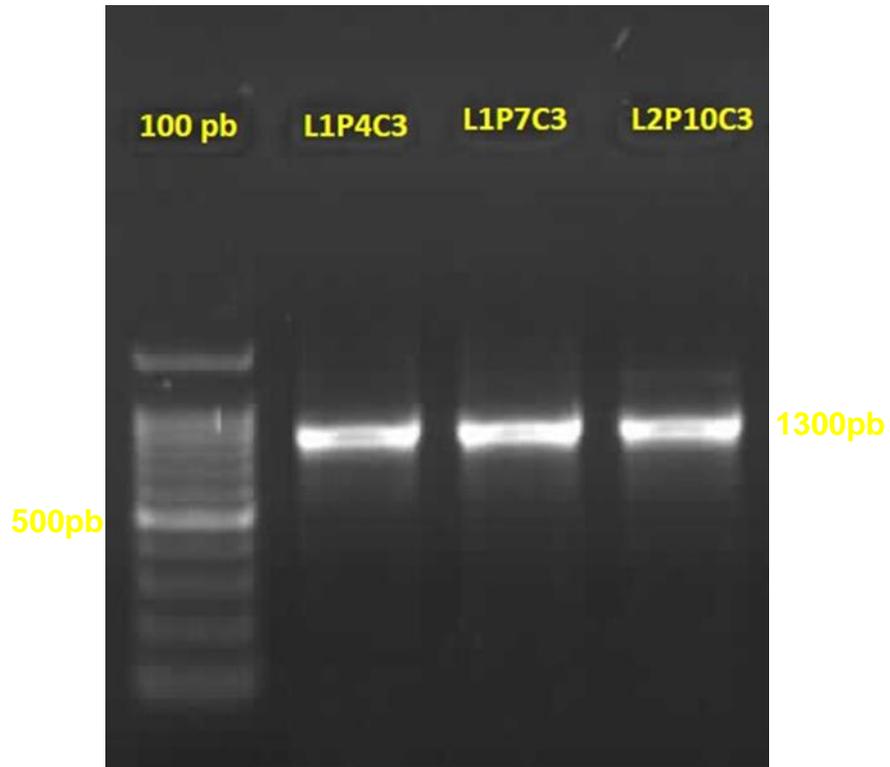
- Praprotnik, E., Lončar, J., & Razinger, J. (2021). Testing virulence of different species of insect associated fungi against yellow mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) and their potential growth stimulation to maize. *Plants*, 10(11), 2498.
- Quintana D. 2000. *Beauveria* spp. nativas para control de *Rhyacionia buoliana* Denis y Schiff. (Lep.: Tortricidae). 30 p. Tesis Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.
- Salomé-Abarca, L. F., Van Den Hondel, C. A., Erol, Ö., Klinkhamer, P. G., Kim, H. K., & Choi, Y. H. (2021). HPTLC-based chemical profiling: an approach to monitor plant metabolic expansion caused by fungal endophytes. *Metabolites*, 11(3), 174.
- Solís, S. A., García, G. C., González, M. M., Medrano, R. H. y L. W. Galán. 2006. Toxicidad de Blastosporas de *Beauveria bassiana* contra palomilla del Manzano *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Folia Entomol. Mex.*, 45(2): 195-200.
- Toriello, C., Montoya-Sansón, E., Zavala-Ramírez, M., Navarro-Barranco, H., Basilio-Hernández, D., Hernández-Velázquez, V., & Mier, T. (2008). Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Revista mexicana de micología*, 28(SPE), 57-66.
- Vignerón, A., Jehan, C., Rigaud, T., & Moret, Y. (2019). Immune defenses of a beneficial pest: the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Frontiers in physiology*, 10, 138.

APÉNDICE 1. Imagen de fragmentos amplificados de los iniciadores ITS4 e ITS5 mediante PCR y detección mediante electroforesis en gel de agarosa.



Producto de PCR obtenidos a partir de una región del gen nuclear ITS4 (600 – 650 pb) en muestras de DNA de aislamientos fúngicos obtenidos de cadáveres de *Optatus palmaris*.

APÉNDICE 2. Imagen de fragmento amplificado del indicador BLOC (B22-B822L) mediante electroforesis en gel de agarosa.



Gel de amplificación del fragmento de la región Intergénicas BLOC (B22-B822L/ 1300 pb), para los aislamientos en estudio.