

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

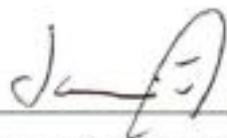
Evaluación *in vitro* de la capacidad patogénica de aislamientos nativos del hongo *Beauveria bassiana* como agentes de control biológico hacia el insecto *Zabrotes subfasciatus*

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Biotecnología

**Estudiante: Hillary Brenes Monge
(115940074)**

**Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica
2020**

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología



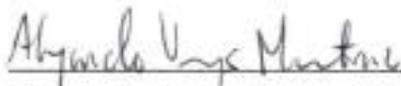
Dr. Javier Alvarado Mesén

Representante, Decano, quién preside



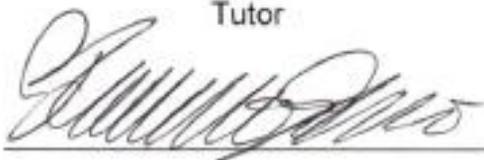
M.E.d Carolina Sancho Blanco

Representante, Unidad Académica



M.Sc. Alejandro Vargas Martínez

Tutor



Phd. Ramón Molina Bravo
Asesor



Dr. Meyer Guevara Mora

Invitado especial

Agradecimientos

A todos aquellos que manifestaron su apoyo durante el proceso de este trabajo:

A mi familia, amigos, compañeros y profesores.

A mi tutor y asesores por su paciencia y ayuda tanto técnica como profesional.

A los colaboradores del Laboratorio de Control Biológico y de Entomología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional por las enseñanzas transmitidas.

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mis padres y a mi gran compañero de vida por todos sus esfuerzos y apoyo incondicional que me han brindado para crecer personal y profesionalmente.

Índice

Miembros del tribunal	I
Agradecimientos	II
Dedicatoria.....	III
Índice	IV
Índice de cuadros	V
Índice de figuras.....	VI
Abreviaturas o acrónimos	VII
Resumen	VIII
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	5
1.3 Planteamiento del problema	7
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos	7
2. Marco Teórico	8
3. Marco Metodológico	20
4. Resultados.....	27
5. Discusión	39
6. Conclusiones.....	42
7. Recomendaciones	43
8. Referencias	44
9. Anexos.....	51

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del hongo <i>B. bassiana</i>	10
Cuadro 2. Aislamientos de <i>B. bassiana</i> utilizados en este trabajo.	21
Cuadro 3. Mortalidad acumulada de <i>Z. subfasciatus</i> causada por el aislamiento BV-09 y el producto comercial de <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones.	28
Cuadro 4. Mortalidad acumulada de <i>Z. subfasciatus</i> causada por el aislamiento BV-15 y el producto comercial de <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones.	30
Cuadro 5. Mortalidad acumulada de <i>Z. subfasciatus</i> causada por el aislamiento BV-28 y el producto comercial de <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones.	32
Cuadro 6. Tiempo letal medio (TL ₅₀) de <i>Z. subfasciatus</i> , provocado por distintos aislamientos y un producto comercial de <i>B. bassiana</i> a 1×10^7 conidios/mL.	34
Cuadro 7. Concentración letal media (CL ₅₀) de los distintos aislamientos y de un producto comercial de <i>B. bassiana</i> para el insecto <i>Z. subfasciatus</i>	36

Índice de figuras

Figura 1. Pie de cría de <i>Z. subfasciatus</i> en semillas de frijol (a), huevos y adulto en galerías del grano (b).....	20
Figura 2. Cultivos de aislamientos de <i>B. bassiana</i> con 7 días de edad en PDA (izquierda y centro) y producto comercial en arroz (derecha).....	22
Figura 3. Rayado “Neubauer” del hemocitómetro, indicando las dimensiones de los: cuadrados principales (A, B, C, D y E) de 1 mm por lado y cuadrados secundarios (25 cuadrados del E) de 0,2 mm por lado. Fuente: French & Hebert (1980).....	22
Figura 4. Unidad experimental conformada por la placa Petri con 10 adultos de <i>Z. subfasciatus</i> expuestos a los distintos aislamientos fúngicos. Fuente: Propia.....	23
Figura 5. Diseño experimental para cada bioensayo de mortalidad de <i>Z. subfasciatus</i> . Fuente: Propia.....	24
Figura 6. Efecto del Entomopatógeno (BV-01 y comercial)- Concentración -Día sobre la mortalidad de <i>Z. subfasciatus</i> ($10^{-5}=1\times 10^5$, $10^{-6}=1\times 10^6$, $10^{-7}=1\times 10^7$, $10^{-8}=1\times 10^8$ conidios/mL) (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).....	27
Figura 7. Efecto de la interacción Entomopatógeno (BV-09 y comercial)-Día (a) y Concentración (conidios/mL)-Día (b) sobre la mortalidad de <i>Z. subfasciatus</i> (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).....	29
Figura 8. Efecto de la interacción Entomopatógeno (BV-15 y comercial)-Día (a) y del Entomopatógeno-Concentración (conidios/mL) (b) sobre la mortalidad de <i>Z. subfasciatus</i> (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).....	31
Figura 9. Efecto de la interacción del Entomopatógeno (BV-28 y comercial)-Día (a) y de la Concentración-Día (b) sobre la mortalidad de <i>Z. subfasciatus</i> (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).....	33
Figura 10. Modelo Logit ajustado de la proporción de insectos muertos (Muertos/Expuestos) para el TL_{50} del aislamiento nativo (izquierda) y para el producto comercial (derecha). BV01 (a), BV09 (b), BV15 (c) y BV28 (d).....	35
Figura 11. Adultos de <i>Z. subfasciatus</i> infectados con BV-01 (a), BV-09 (b), BV-15 (c), BV-28 (d), el producto comercial (e-h), el producto comercial contaminados (i-l) y testigo (m-o).....	37
Figura 12. Prueba de pureza para el aislamiento (BV-28) (arriba) y el producto comercial de <i>B. bassiana</i> (abajo) a una concentración de 1×10^{-3} (a), 1×10^{-4} (b) y 1×10^{-5} (c) conidios/mL. .38	

Abreviaturas o acrónimos

ADE	Agua destilada estéril
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CICAFÉ	Centro de Investigaciones en Café
CORBANA	Corporación Bananera Nacional
DIECA	Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar
CL ₅₀	Concentración letal media
ECA	Escuela de Ciencias Agrarias
INA	Instituto Nacional de Aprendizaje
PDA	Agar Papa Dextrosa
RM-ANOVA	Análisis de varianza de medidas repetidas
TL ₅₀	Tiempo letal medio

Resumen

Los hongos entomopatógenos pueden controlar gran diversidad de plagas insectiles. No obstante, la variabilidad en patogenicidad y virulencia que presentan aislamientos de una misma especie, acompañado de escasa caracterización previo a utilizarlos como micoinsecticidas comerciales, ha generado resultados ineficientes y por ende la sustitución de éstos por plaguicidas químicos. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad patogénica de aislamientos nativos del entomopatógeno *Beauveria bassiana*, mediante bioensayos de mortalidad y virulencia del insecto modelo *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Chrysomelidae) en condiciones de laboratorio, para su posible utilización como agentes de control biológico. Los bioensayos tuvieron como unidad experimental una placa Petri con 10 insectos, que se asperjó con 1 mL de solución fúngica. Se probaron cuatro aislamientos nativos de *B. bassiana* provenientes de diferentes sitios del país y un producto comercial a base de *B. bassiana*, como tratamiento de referencia, a las concentraciones de 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/mL, y el testigo; con cinco repeticiones cada uno. Las placas se llevaron a una cámara bioclimática y durante 9 días consecutivos se contabilizaron los coleópteros muertos; que se desinfectaron y colocaron en una cámara húmeda para posteriormente verificar la esporulación del hongo. Se determinó la mortalidad acumulada, el tiempo letal medio (TL₅₀) y la concentración letal media (CL₅₀). Los aislamientos nativos produjeron mayor mortalidad (88-100%) y menor TL₅₀ y CL₅₀, en comparación con el producto comercial. Sobresalió el aislamiento BV-15, obtenido de suelo de cafetal, que provocó 100% de mortalidad, con diferencias significativas respecto al producto comercial, con un TL₅₀= 1 día y una CL₅₀= 2.5×10^7 conidios/mL. Los resultados reflejan gran capacidad patogénica de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos, así como la importancia de realizar futuras pruebas de especificidad para garantizar eficacia al emplearlos en sistemas de producción agrícola.

1. Introducción

En la naturaleza los hongos entomopatógenos parasitan insectos. Su aplicación en la agricultura puede ayudar a mantener las poblaciones de insectos plaga bajo control para minimizar los daños a los cultivos. Entre éstos destaca el ascomiceto *Beuveria bassiana*, que debido a su facilidad de propagación y eficiencia, ha sido muy utilizado para el control de un amplio rango de insectos. Por tanto, el uso de estos microorganismos es considerado una alternativa eficaz y amigable ambientalmente para el manejo de plagas en sistemas de producción agrícola.

1.1 Antecedentes

Desde el siglo XIX se impulsó el uso de depredadores naturales contra insectos plagas tales como crisomélidos y avispas. Sin embargo, en los años 1930 y 1940 fueron sustituidos por los insecticidas químicos, los cuales resultaron ser más rápidos, económicos y con espectro de acción más amplio que el de enemigos naturales de insectos (Assaff, Reyes, López, & de la Torre, 2002).

No obstante, debido a que los pesticidas han generado un gran impacto ambiental negativo y enormes problemas de toxicidad (Goulson, 2014; Schäfer, Brink, & Liess, 2012; van Wendel de Joode et al., 2016; Vogel, 2017), el uso de hongos entomopatógenos ha ganado cada vez más relevancia en programas de control biológico de plagas. Una ventaja de estos hongos es que no dejan residuos en el ambiente ni se consideran tóxicos para humanos y animales (Musso, Padín, & Dal Bello, 2017). Sumado a esto, el interés por caracterizar y seleccionar especies de hongos promisorias para el desarrollo de bioinsecticidas ha ido en aumento.

Existen diferencias en la patogenicidad que presentan los aislamientos de una misma especie, lo cual se debe evaluar para evidenciar el potencial que tengan para infectar determinada plaga insectil. Torres-de-la-Cruz, Cortez, Ortiz, Cappello-García y De-la-Cruz-Pérez (2013) reportaron en Tabasco, México, que aislamientos nativos y monospóricos de *Metarhizium anisopliae* presentaron mayor efectividad contra la mosca *Aeneolamia postica*; plaga de la caña de azúcar, en comparación con otros aislamientos polispóricos, el testigo y una cepa comercial.

En otro estudio, se probó la virulencia de 25 aislamientos nativos provenientes de insectos y del suelo en España. Los resultados bajo condiciones de laboratorio reflejaron grandes diferencias

en la virulencia, donde sólo 7 aislamientos causaron mortalidad de mosca blanca superior al 50%. Esta característica en conjunto con la capacidad de crecer rápidamente *in vitro* bajo temperaturas de interés, se consideraron como herramientas para la selección de aislamientos fúngicos con potencial para micoinsecticidas y para mejorar biotecnológicamente su virulencia y la velocidad de muerte del insecto (Quesada-Moraga, Maranhao, Valverde-García, & Santiago-Álvarez, 2006).

Grund y Hirsch (2010) examinaron varios aislamientos nativos de Etiopía tanto de *B. bassiana* como de *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio, a diferentes concentraciones durante 15 días. Esto para determinar la patogenicidad hacia el gorgojo *Acanthoscelides obtectus*; una de las principales amenazas para la producción de frijol en etapas de campo y postcosecha. La mayoría de aislamientos provocaron alta mortalidad en la concentración más elevada que se probó (1×10^7 conidios/mL). Así mismo, se observó que todos los aislamientos provocaron alto grado de micosis (85-97%), mientras que el control tuvo 0%, lo cual evidencia que los insectos murieron por la efectiva infección del hongo. Grund y Hirsch (2010) concluyeron que específicamente uno de los aislamientos de *M. anisopliae*, por causar un mayor porcentaje de insectos muertos, podría ser efectivo para el manejo de *A. obtectus*.

Además de conocer la efectividad de un aislamiento de interés, resulta necesario definir la concentración a la cual dicho aislamiento infecta gran parte de la población objetivo; es decir la concentración letal media (CL_{50}), lo cual resulta esencial para el desarrollo de un posible bioinsecticida. Los investigadores Ugine, Wraight, Brownbridge y Sanderson (2005), en Estados Unidos, evaluaron la virulencia de una cepa comercial de *B. bassiana*, bajo condiciones de laboratorio, contra *Frankliniella occidentalis* Pergande (trips que afectan cultivos de flores). Los resultados reflejaron una CL_{50} entre 33 y 66 conidios/insecto; después de 24 horas de la exposición del hongo. Esto se consideró altamente eficiente, debido a que a una concentración pequeña el hongo logró matar la mitad de la población de tisanópteros.

Hailemariam y Seyoum (2013), destacan que la patogenicidad, en términos de velocidad y magnitud de la mortalidad de los insectos, puede presentar variabilidad entre aislamientos del hongo y la concentración utilizada. En su investigación, llevada a cabo en Etiopía, compararon la patogenicidad de cuatro aislamientos fúngicos locales del género *Metarhizium*, en condiciones controladas, con un aislamiento estándar y optimizaron la concentración letal de los aislamientos.

Todos los aislamientos en estudio mostraron virulencia con todas las concentraciones probadas, siendo el aislamiento de *Metarhizum* con código META-D el más patogénico contra el gorgojo mexicano del frijol (*Zabrotes subfasciatus*), ya que provocó una alta mortalidad (82.5%) y de manera más rápida (al día 5) que todos los demás aislamientos. Además, causó un alto porcentaje de micosis (90%) a una concentración de 1×10^8 conidios/mL, mostrando así diferencias significativas con respecto a los porcentajes que generaron las concentraciones más bajas.

En Latinoamérica, también sobresale el uso de hongos entomopatógenos, tanto para el control de plagas como para el manejo de vectores de enfermedades. García-García, Cappello-García, Leshner-Gordillo y Molina-Martínez (2011) aislaron y caracterizaron macroscópicamente y microscópicamente distintas cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* encontradas en hemípteros, coleópteros e himenópteros. Además, recalcaron la importancia de llevar a cabo ensayos de germinación, patogenicidad y especificidad; tomando en cuenta las condiciones ambientales del sitio de interés.

En otro estudio se evaluó la virulencia, mediante ensayos *in vitro*, de aislamientos de los patógenos *Beauveria*, *Verticillium*, *Metharizum*, *Paecilomyces* y *Fusarium*. Se determinó que dos cepas nativas aisladas del sur de Chile, de la especie *Verticillium lecanii* obtuvieron un TL_{50} de 3.2 y 3.1 días y una DL_{50} de 1.2^4 y 1.3^7 conidios/mL. Éstas se consideraron con alto nivel de efectividad y con posible uso como controladores biológicos del pulgón del ciprés *Cinara cupressi*, que ha afectado enormemente a especies nativas (*Austrocedrus chilensis*) y exóticas (*Fitzroya cupressoides*) de Chile (Montalva, Gutiérrez, Rojas, Lanfranco, & Valenzuela, 2011).

En México se evaluó, en condiciones de laboratorio, la patogenicidad de dos cepas de *B. bassiana* (Bb26 y BbJLSV) y una de *M. anisopliae* contra adultos de la mosca de la fruta *Anastrepha obliqua*. La cepa Bb26 causó el mayor porcentaje de mortalidad (99.8%), requirió menor cantidad de inóculo para infectar a la mitad de la población, con una CL_{50} de 3.8×10^6 conidios/mL y produjo mayor cantidad de conidios (78% de esporulación), por lo que dicha cepa se consideró la más patogénica. Lo anterior evidencia que la capacidad patogénica de las cepas de una misma especie varía y está influenciada por la relación entre el hongo e insecto hospedero (Hernández Díaz-Ordaz, Pérez, & Toledo, 2010).

En Costa Rica, se han realizado diversos experimentos con hongos entomopatógenos, tanto a nivel de laboratorio como de campo. En una finca comercial de aguacate en San Pablo de León Cortez (San José), se aplicaron 7 cepas nativas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* para probar su patogenicidad contra tisanópteros. Las cepas BVMOG trips y MTRMOG Ciprés presentaron los valores más altos de parasitismo (11 y 8%, respectivamente) manifestado durante los 5 meses de evaluación en el campo; las demás tuvieron porcentajes menores a 5%. A pesar de que dichos valores fueron muy bajos, el tratamiento con la cepa de *Beauveria* (BVMOG trips) fue diferente significativamente con el testigo y los demás tratamientos. La poca efectividad fue explicada por condiciones de temperatura desfavorables para el crecimiento y reproducción de los hongos, ya que la temperatura ambiental estuvo entre 18 y 24°C y el rango óptimo para *M. anisopliae* y *B. bassiana* es 25-32°C (Villalobos, Vargas, & González, 2011).

Por su parte, la Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA) ha impulsado el uso de hongos entomopatógenos en programas de manejo integrado de plagas que generan daños en caña de azúcar en Costa Rica (Badilla, 2002). Por ejemplo, durante 8 años se aplicaron aislamientos de *M. anisopliae*, uno originario de Brasil y otro nativo de San Carlos, con una dosis de 2.5 a 5×10^{12} conidios del hongo/ha para el control de *Aeneolamia* spp. Los resultados reflejaron un parasitismo promedio de 70%, que en conjunto con trampas adhesivas y prácticas culturales promovió una reducción significativa en el uso de insecticidas (Sáenz, Alfaro, Oviedo & Badilla, 1997 citados por Badilla, 2002).

Dentro de los programas de DIECA también se utilizó un aislamiento de *B. bassiana*, impregnado en trozos de caña de bambú, con lo cual se logró una mortalidad de 85% a nivel de campo del picudo *Metamasius hemipterus*. Dicho resultado se consideró beneficioso porque favoreció la generación de epizootias, por el hecho de que los insectos permanecieron en constante contacto con el hongo, el cual tiene una viabilidad de aproximadamente 15 días en los trozos y los insectos podían dispersar las esporas a otros insectos por medio de la cópula (Badilla & Alves, 1991 citado por Badilla, 2002). Los investigadores concluyeron que resulta necesario buscar aislamientos más patogénicos y virulentos, que se puedan escalar a nivel comercial para obtener formulaciones más estables (Badilla, 2002).

De acuerdo a lo anterior, la mayoría de los estudios con hongos entomopatógenos en Costa Rica aún no muestran resultados totalmente satisfactorios y en lo que respecta a los productos comerciales en muchos casos no se formulan con aislamientos nativos ni brindan información completa como la concentración a la cual el hongo es capaz de infectar a la mitad de la población (CL₅₀) ni el tiempo en que mata la mitad de la población (TL₅₀). Esto podría generar disconformidad con el bioplaguicida, ya que la dosis aplicada podría estar errónea y por tanto no resulta eficiente para matar los insectos.

Esta situación se refleja en la investigación de Inclán et al. (2008), en la cual aplicaron insecticidas microbianos a base de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* (1×10^8 conidios/g: 6 kg/ha, para ambos) en plantaciones de piña en Guácimo, Limón. Los frutos que se trataron con *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentaron daños de 33 y 16%, respectivamente, mostrando diferencias estadísticas con respecto al testigo ($p \leq 0.05$; Duncan). Sin embargo, estos entomopatógenos no fueron más efectivos que el pesticida químico con el cual se estaban comparando (Carbaryl), porque a los frutos que se les aplicó éste sólo presentaron daños de 4%. A pesar de esto se concluyó que estos bioplaguicidas podrían tener potencial para mejorar el control de *S. megarus*, ya que los análisis económicos muestran que el costo de los hongos es mucho menor (\$624/ha) que del producto sintético (\$812/ha); además de ser productos de bajo impacto ambiental y seguros para la salud humana (Zimmermann, 2007). Inclán et al. (2008) consideraron que hacen falta investigaciones donde se evalúen aislamientos de hongos que permitan obtener formulaciones y tasas de mortalidad más efectivas.

1.2 Justificación

La implementación de pesticidas químicos ha permitido mejorar los rendimientos en el ámbito agrícola. Sin embargo, ha generado efectos negativos como la contaminación de fuentes de agua, residuos en los alimentos, destrucción de la biodiversidad y daños en la salud de personas y animales. Además, el incremento creciente en el uso de estos productos, especialmente en Costa Rica, país número uno en el uso de agroquímicos por área a nivel mundial (Ramírez, 2011), ha provocado que muchas plagas hayan desarrollado resistencia y por tanto causen pérdidas económicas enormes. Como consecuencia, los métodos de control biológico han venido ganando importancia, ya que logran suprimir el impacto de determinada plaga sin perjudicar el ambiente.

Los hongos entomopatógenos constituyen uno de los grupos de mayor importancia para el control biológico de insectos, que a diferencia de los insecticidas, no afectan con residuos peligrosos el agua y las cadenas de alimentos. La capacidad que tienen estos hongos para parasitar y causar la muerte a los insectos por medio de invasión física y producción de toxinas (Mascarin & Jaronski, 2016) se ha aprovechado para el manejo de una gran cantidad de plagas y a su vez reducir las pérdidas de productos agrícolas en las diferentes etapas.

Uno de los hongos entomopatógenos más relevante es *B. bassiana*, el cual se reproduce fácilmente y puede infectar alrededor de 200 especies de insectos de hasta nueve órdenes (Feng, Khachatourians, & Poprawski, 1994; Gul, Saeed, & Khan, 2014). Uno de éstos es el coleóptero *Z. subfasciatus*, el cual se alimenta de granos de frijol durante la etapa post cosecha (Paul, Lossini, Edwards, & Hilbeck, 2009). No obstante, cabe mencionar que los distintos aislamientos del hongo pueden tener cierta especificidad y diferir en comportamiento y grado de virulencia dependiendo de las condiciones ambientales del sitio de origen (Uma-Devi, Padmavathi, Uma-Maheswara-Rao, Khan, & Mohan, 2008).

Por otra parte, es importante resaltar que la gran mayoría de biopesticidas comerciales no brindan la concentración exacta a la cual cada aislamiento del hongo logra controlar determinada población de insectos de manera eficiente. Además, la vulnerabilidad que poseen hacia factores ambientales, tales como temperatura, humedad y desecación, ha influenciado en la obtención de resultados ineficaces y por ende se tienden a sustituir por productos químicos.

Los hongos entomopatógenos tienen gran potencial para controlar plagas insectiles; no obstante, se ha demostrado que cuando se introducen en cierto ambiente se requiere de cuidado y enfoque responsable, especialmente si los hongos no son endémicos del sitio (Carrillo-Rayas & Blanco-Labra, 2009). Por tanto, es importante tener buen conocimiento sobre aislamientos nativos, mediante técnicas de bioensayo, para llegar a utilizarlos con la certeza de que tienen la suficiente patogenicidad y virulencia hacia una plaga en condiciones agroecológicas específicas (Carrillo-Rayas & Blanco-Labra, 2009).

El incremento en la información completa del comportamiento de los aislamientos de hongos entomopatógenos es necesario, con el fin de aprovecharlos como una herramienta biotecnológica para el manejo agroecológico de plagas y así aumentar los rendimientos en los sistemas de

producción agrícola de manera sostenible e inocua para el medio ambiente. Por lo tanto, este trabajo tiene como propósito determinar la capacidad patogénica *in vitro* de aislamientos nativos de *B. bassiana*, como potenciales agentes de control de plagas de insectos.

1.3 Planteamiento del problema

¿Cuál es la capacidad patogénica *in vitro* de aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como agentes de control biológico de insectos plaga?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad patogénica de aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) mediante bioensayos de mortalidad de un insecto modelo en condiciones de laboratorio para su posible utilización como agentes de control biológico.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la patogenicidad de cuatro aislamientos nativos de *B. bassiana* por medio de bioensayos de mortalidad del insecto modelo *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae).
2. Establecer el tiempo letal medio (TL₅₀) y la concentración letal media (CL₅₀) de los cuatro aislamientos nativos de *B. bassiana*, mediante un modelo de dosis-respuesta utilizando el insecto *Z. subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae).
3. Comparar la capacidad patogénica *in vitro* de los cuatro aislamientos de *B. bassiana* con la de un micoinsecticida de origen comercial.

2. Marco Teórico

Hongos entomopatógenos

Los Entomophorales han destacado como agentes microbiológicos de interés económico y ambiental. Esto porque han mostrado un potencial promisorio para el control de plagas que afectan cultivos, lo cual ha permitido reducir pérdidas en productos agrícolas, relacionadas al ataque de plagas en etapas pre y post-cosecha (García et al., 2008). Además, han sido eficientes contra vectores de enfermedades, se ha demostrado que son seguros para el medio ambiente y que no generan toxicidad en animales ni humanos (Rumbos & Athanassiou, 2017).

Los hongos entomopatógenos se definen como microorganismos que tienen la capacidad de infectar y causar la muerte de insectos (García-García, Cappello-García, Leshner-Gordillo, & Molina-Martínez, 2008). Se describen como patogénicos tanto para insectos como para ácaros, ya que pueden mantener o eliminar las poblaciones de ciertos artrópodos a niveles que no ocasionen daños económicos en sistemas agropecuarios ni en la salud de personas y animales (Huanes-Carranza & Wilson-Krugg, 2016; Tanzini, Alves, Setten, & Augusto, 2001). Entre los sitios donde se pueden encontrar estos hongos destacan el suelo, agua dulce, zonas agrícolas, urbanas y aéreas, pastos y asociados con insectos (Hajek & Leger, 1994; Rumbos & Athanassiou, 2017).

Uso como agentes de control biológico

A pesar de que se conocen alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos y que éste constituye uno de los grupos más importante para el control biológico de insectos, se han desarrollado muy pocas especies para dicho propósito (García et al., 2008; Hajek & Leger, 1994). Las especies más utilizadas de hongos entomopatógenos se encuentran dentro del orden Hypocreales, poseen una gran diversidad de hospederos y se pueden producir masivamente de manera fácil (Butt, Jackson, & Magan, 2001). Entre los géneros más usados destacan *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe* y *Paecilomyces* (Huanes-Carranza & Wilson-Krugg, 2016).

Para fines de control biológico las especies más empleadas son *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Langenedium giganteum*, *M. anisopliae*, *P. fumosorosseus* y *L. lecanii*. La mayoría de estas

especies tienen potencial para controlar langostas, chapulines, áfidos, mosquita blanca, moscas, escarabajos, mosquitos, termitas, gallina ciega, picudos del chile y algodón, y tisanópteros (Pucheta-Díaz, Flores-Macías, Rodríguez-Navarro, & de la Torre, 2006). También las especies *L. longisporum* y *L. muscarium*, están comercializadas como Vertalec® y Mycotal® para el control de áfidos y mosca blanca, respectivamente (Díaz, Oggerin, Lastra, Rubio, & Fereres, 2009).

Beneficios en el ámbito agropecuario

El uso de hongos entomopatógenos en el manejo integrado de plagas ha generado beneficios en el sector agropecuario. Por ejemplo, se aplicó *M. anisopliae* a ganado bovino para determinar su efecto sobre las poblaciones de garrapatas (*Boophilus microplus*) que afectan tanto al huésped como a los productores por su implicación económica. Se determinó que la concentración más alta que se probó (1×10^{10} conidios/mL) generó mayor mortalidad, mayor inhibición de ovoposición y menor eclosión de huevos. Además, en la finca se observó, que durante el periodo de aplicación del hongo, hubo una reducción de 79% en el número de garrapatas (Arguedas, Álvarez, & Bonilla, 2008).

También se ha encontrado buena interacción de *Metarhizium* a nivel *in vitro* con dos plantas de interés agronómico: brócoli para consumo humano y alfalfa como forraje para ganado por su alto nivel nutricional. En el caso del brócoli, el hongo favoreció el porcentaje de germinación, tamaño de las plantas y crecimiento de raíces primarias y secundarias, mientras que en alfalfa sólo ayudó en la germinación, como producto de una alta concentración de conidios en la interacción directa. Los resultados obtenidos reflejan que *Metarhizium* además de generar mortalidad en las plagas que atacan dichos cultivos, podría mejorar el rendimiento de las plantas (López-Gaeta, Torres-Guzmán, Padilla-Guerrero, Guerrero-Carrera, & González-Hernández, 2017).

En cuanto al entomopatógeno *B. bassiana*, el cual pertenece al filo Ascomycota, familia Cordycipitaceae y orden Hypocreales (Mascarín & Jaronski, 2016) (Cuadro 1), se caracteriza morfológicamente por tener células globulares o conidígenas, con conidios holoblásticos terminales y unicelulares. Las especies de *Beauveria* se distinguen por las características de sus conidios, que son de paredes lisas, hialinas, con tamaño entre 1.5-5.5 μm y globosas o vermiformes (Rehner et al., 2011).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del hongo *B. bassiana*.

Reino	Fungi
Filum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>B. bassiana</i>

Fuente: Imoulan, Hussain, Kirk, Meziane y Yao (2017)

Comportamiento de B. bassiana

B. bassiana puede infectar alrededor de 100 especies diferentes de insectos entre los órdenes coleóptera, lepidóptera, hemíptera y homóptera; sin embargo, cada aislamiento del hongo puede tener distinto grado de efectividad (García et al., 2008). Es conocido que *B. bassiana* tiene hasta 700 hospederos, incluyendo especies de Acari e Insecta. Entre estos se encuentran la ninfa de la mosca blanca de hoja plateada *Bemisia tabaci*, el gorgojo del plátano *Metamasius hemipterus*, el barrenador de bayas de café *Hypothenemus hampei*, la mosca de la fruta *Anastrepha fraterculus*, la araña roja *Tetranychus urticae*, el chinche de soya *Nezara viridula*, el psílido de los cítricos *Diaphorina citri* y el chinche de eucalipto bronce *Thaumastocoris peregrinus* (Mascarin & Jaronski, 2016).

Con respecto a la especificidad que presenta *B. bassiana*, se ha observado que aislamientos provenientes de diferentes zonas geográficas poseen distintos grados de especificidad en un mismo hospedero. Todorova, Coderre y Côté (2000) determinaron que dos aislamientos de *B. bassiana* provocaron hasta el 100% de mortalidad en las plagas *Leptinotarsa decemlineata* y *Myzus persicae*, que afectan el cultivo de papa, pero sólo generaron 10% de mortalidad en *Coleomegilla maculata* lengi; depredador de dichas plagas. Esto evidencia que *B. bassiana* es específico de hospedero y por tanto se podría complementar con parasitoides para el manejo integrado de plagas.

Crecimiento óptimo de B. bassiana

El potencial de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico puede ser afectado por factores abióticos como humedad, temperatura, lluvia y radiación ultravioleta; y

bióticos como edad, susceptibilidad y comportamiento del hospedero (Mascarin & Jaronski, 2016). La temperatura es uno de los más importantes, ya que repercute en el crecimiento vegetativo del hongo y persistencia en el campo. Por ejemplo, se cultivó *B. bassiana* a 15, 20, 25, 28, 30 y 35°C en medio sólido, pero sólo se obtuvieron tasas de germinación elevadas ($88.6 \pm 2.9\%$) a 25, 28 y 30°C después de 16 horas (Luz & Fargues, 1997). No obstante, se ha observado que aislamientos de *B. bassiana* se adaptan fácilmente para crecer a temperaturas desde 8 hasta 32°C (Fargues, Maniana, Delmas, & Smits, 1992).

La humedad relativa también es un factor crítico que influye en el rendimiento de los entomopatógenos, tanto en laboratorio como en campo (Mascarin & Jaronski, 2016), ya que interfiere en su desarrollo y eficiencia. Luz y Fargues (1997) probaron 8 humedades relativas entre 81.5 hasta 200% a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en el cultivo de *B. bassiana* y encontraron que valores entre 95.5 y 100% favorecen la germinación en 24 horas. Lo anterior coincide con lo reportado por Shipp, Zhang, Hunt y Ferguson (2003), donde una humedad relativa de 97.5% promovió, de manera significativa, mayor porcentaje de infección (60-88.8%) de *B. bassiana* hacia diferentes insectos plaga, en comparación con una humedad de 75 y 80% que sólo indujo la infección entre 15.3 y 43.9% de los insectos.

Coleóptero *Zabrotes subfasciatus*

Zabrotes subfasciatus pertenece a la familia Chrysomelidae y también se conoce como gorgojo mexicano del frijol (Hailemariam & Seyoum, 2013). Este coleóptero tiene preferencia por lugares de clima cálido y en bajas latitudes, por lo que es más importante en regiones tropicales y subtropicales (Abate & Ampofo, 1996). Además, se reproduce rápidamente, su ciclo de vida tarda alrededor de 24 días y se ha observado que la hembra puede poner hasta 35 huevos durante su vida (Abate & Ampofo, 1996; Hailemariam & Seyoum, 2013).

Este insecto se considera una de las principales plagas que deterioran granos almacenados, provocando una disminución del valor nutritivo de las semillas en almacenaje (Hailemariam & Seyoum, 2013). Ataca principalmente al frijol, durante la madurez, secado y de manera potencial en la etapa de almacenamiento (De Lima, 1987). Se ha observado que se alimenta de los granos, por lo que genera daños severos como la reducción del poder germinativo de la semilla. Esto debido a que deteriora los cotiledones, realiza perforaciones que constituyen las cámaras de

alimentación y oviposturas de la hembra en la testa del grano, lo cual es una problemática para su control (Cruz-Ortega et al., 2016; Valdés-Herrera, Pozo-Velázquez, & Cárdenas-Morales, 2015).

A nivel mundial ha provocado infestaciones con pérdidas mayores al 50% de la cosecha de frijol (Paul, Lossini, Edwards, & Hilbeck, 2009). En muchas ocasiones *Z. subfasciatus* tiende a aparecer en conjunto con el coleóptero *A. obtectus* y entre ambos han llegado a generar pérdidas de hasta 38% en frijol almacenado, con disminución de 3.2% en el peso del grano (Abate & Ampofo, 1996). Esto ha impedido que se puedan almacenar granos de leguminosas de manera exitosa, ya que las pérdidas tan grandes catalogan las semillas no aptas para el consumo humano ni animal (Valdés-Herrera et al., 2015).

Los tratamientos para el combate de *Z. subfasciatus* han consistido principalmente en pesticidas sintéticos (Hailemariam & Seyoum, 2013). Sin embargo, se han buscado otras alternativas porque éstos se consideran peligrosos para el ambiente, generan resistencia, dejan residuos en alimentos y piensos, y en muchos casos afectan a otros organismos (Hailemariam & Seyoum, 2013). Entre los mecanismos para el control destacan calentamiento solar, seleccionar variedades, eliminar el grano infestado, mezclar el grano con ceniza, recubrir la semilla con barro e implementar técnicas de almacenamiento y limpieza de graneros (Abate & Ampofo, 1996).

Otras estrategias para disminuir las poblaciones de este escarabajo consisten en aplicaciones botánicas; se ha observado que *Chenopodium ambrosioides* puede causar hasta 100% de mortalidad en laboratorio y en campo (Paul et al., 2009). La inoculación con tierra de diatomea ha sido eficiente en dosis de 0.8 g/Kg de semilla de frijol (Cruz-Ortega et al., 2016), así como el tratamiento con aceites esenciales (Brito et al., 2015) y otros agentes de control biológico como hongos entomopatógenos (Hailemariam & Seyoum, 2013).

Relación hongo-insecto

Utilidad agrícola

La implementación de hongos entomopatógenos en sistemas agrícolas ha permitido mejorar enormemente los rendimientos de los cultivos. Por ejemplo, los hongos *I. fumosorosea*, *P. lilacinum* y *B. bassiana*, en laboratorio, causaron mortalidades superiores al 96% en adultos del chinche *Leptopharsa gibbicarina*, que puede reducir la producción de palma de aceite en un 36% y sus efectos negativos persisten hasta por 3 años. Dichos hongos también generaron porcentajes

de mortalidad mayores a 73%, en condiciones de umbráculo, 14 días después de su aplicación en concentraciones de 1×10^{13} conidios/ha. Cabe mencionar que los hongos no atacaron la hormiga *Crematogaster* sp., que es el depredador más importante del chinche de encaje de la palma (Barrios, Bustillo, Ocampo, Reina, & Alvarado, 2016). Esto es una clara evidencia de que los micopesticidas son útiles en el campo agrícola y que tienen el potencial para evitar aplicaciones de insecticidas, lo cual permite preservar fauna benéfica.

Modo de acción del hongo

La capacidad que poseen los hongos entomopatógenos de matar los insectos, se debe principalmente a una respuesta de inanición fisiológica cuando consumen todas las reservas nutricionales de los insectos. Además, el hongo invade físicamente y produce toxinas dentro del insecto (Kannan, Murugan, Kumar, Ramasubramanian, & Mathiyazhagan, 2008). De esta manera, en el momento en que una espora de *B. bassiana* se encuentre en contacto con la cutícula de un insecto existe la probabilidad que cause la enfermedad conocida como Muscardina (Grund & Hirsch, 2010).

Adhesión y penetración de la cutícula

El mecanismo de acción de *B. bassiana* contra invertebrados inicia cuando sus conidios son dispersados por viento, lluvia e inclusive por vectores artrópodos. En primer lugar los conidios se unen a la cutícula del insecto mediante fuerzas químicas y electrostáticas; luego de una rehidratación y un estímulo químico, dichos conidios germinan en un tubo germinativo (Mascarin & Jaronski, 2016), el cual tiende a desarrollar apresorios para concentrar energía física y enzimas líticas sobre un área pequeña (Hajek & Leger, 1994). Posteriormente el hongo penetra todas las capas de la cutícula con la ayuda de enzimas como proteasas, quitinasas y lipasas, también con factores como presión mecánica y ácido oxálico, que le confieren la capacidad de degradar y solubilizar la cutícula de los insectos (Carrillo-Rayas & Blanco-Labra, 2009; Mascarin & Jaronski, 2016; Pucheta-Díaz et al., 2006).

La patogénesis del hongo puede empezar cuando un conidio se adhiere a la cutícula o a partir del contacto con partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos de los insectos. Esto resulta ventajoso, debido a que en contraste con otros agentes entomopatógenos, tales como bacterias, virus o protozoarios, los hongos no requieren ser consumidos por el insecto para causar

infección (Carrillo-Rayas & Blanco-Labra, 2009; Hajek & Leger, 1994; Pucheta-Díaz et al., 2006). Así mismo, la infección puede llevarse a cabo posterior a la germinación de la espora, ya sea en la superficie de la cutícula o en el intestino del insecto (Hajek & Leger, 1994).

Colonización del hemocele

La penetración de la cutícula ocurre con el propósito de llegar a la hemolinfa, que es un medio rico en nutrientes. Aquí el hongo se diferencia morfogenéticamente, porque pasa de tener un crecimiento filamentoso a unicelular para la formación de blastosporas. Éstas últimas explotan los nutrientes e invaden tanto tejidos internos como el sistema inmune del huésped. Además, en este momento el hongo secreta metabolitos tóxicos, que ayudan a suprimir el sistema inmune y colonizar exitosamente el insecto hasta provocar su muerte. Seguidamente, los conidióforos emergen del cuerpo de los cadáveres momificados en pocos días y se genera esporulación para su diseminación y por ende continuar su ciclo de vida (Mascarin & Jaronski, 2016).

Durante la infección, *B. bassiana* causa una disminución del volumen de hemolinfa, atribuido posiblemente a la pérdida de agua tanto de la hemolinfa como de los tejidos y un aumento en la densidad y pH de la hemolinfa por la producción de metabolitos del hongo. Además, genera un incremento inicial del contenido de carbohidratos por la posible presencia de trehalosa (disacárido de reserva en situaciones de infección), una reducción del nivel de lípidos producto del agotamiento de la nutrición y una disminución del contenido de proteínas de la hemolinfa; explicado por el hecho de que el patógeno tiende a reducir enzimas o proteínas solubles y convertir algunas proteínas nativas en lipo o glicoproteínas. Por lo tanto se considera que el hongo interfiere tanto en las propiedades físicas como bioquímicas de la hemolinfa como parte de la colonización exitosa del insecto (Barakat & Abokersh, 2016).

Infección exitosa

El éxito de la infección va a depender del potencial genético del patógeno para crecer rápidamente, penetrar las barreras del hospedero y resistir a sustancias tóxicas. En los casos en que el hongo no logre desarrollarse puede ser debido a factores como una baja humedad, ya que el hongo requiere agua para germinar y crecer. También podría ser porque el hongo sea incapaz de utilizar los nutrientes disponibles en la cutícula, porque ésta posea compuestos inhibitorios como fenoles, quinonas y lípidos que impidan su invasión o por ausencia de señales químicas y

topografía de la cutícula desfavorable para el correcto reconocimiento de un hospedero susceptible o de un sitio de infección penetrable (Hajek & Leger, 1994).

Síntomas que presenta el insecto

En cuanto al comportamiento de los insectos, se han observado gran diversidad de cambios luego de la exposición a hongos entomopatógenos. Se evidenció que ninfas y adultos del ácaro *Oligonychus* sp. presentaron algunos signos como movimiento errático, alteración en el color del tegumento y momificación después de que fueron inoculados con *B. bassiana* y *M. anisopliae*; bajo condiciones de laboratorio (Huanes-Carranza & Wilson-Krugg, 2016). Así mismo, larvas de *Manduca sexta*, que se expusieron a *M. anisopliae*, mostraron melanización, degradación parcial de las proteínas de la hemolinfa y redujeron su alimentación, debido a que esta cepa de *M. anisopliae* poseía un gen que sobreexpresaba una proteasa (Pr1) con capacidad de inducir la activación el sistema de profenoloxidasa de los hospederos (St Leger, Joshi, Bidochka, & Roberts, 1996).

Sistema de defensa del insecto

Con respecto al mecanismo de defensa antifúngica por parte del insecto se ha detectado que los granulocitos de la hemolinfa tienen la capacidad de fagocitar las células del hongo, el cual es encapsulado y melanizado rápidamente. Posteriormente, los plasmocitos son recluidos y forman un pseudot Tejido en capas concéntricas y se diferencian en un granuloma, en el cual el hongo puede ser lisado. No obstante, si las cepas son hipervirulentas, los hospederos son incapaces de crear granulomas o encapsulación. Por tanto, para que *B. bassiana* tenga éxito dentro del hospedero debe superar de manera simple la respuesta del hemocito, lo cual tiene como consecuencia que los granulocitos se reduzcan 3 días después de que se exponen al hongo (Hajek & Leger, 1994).

Ventajas de la interacción hongo-insecto

Una de las principales ventajas de los hongos entomopatógenos es que muestran alta efectividad contra las plagas, no representan riesgo para el ambiente ni para seres vivos y no dejan residuos en los alimentos, ya que no se acumulan en el suelo o plantas ni secretan sus metabolitos en dosis peligrosas (García-García et al., 2008; Strasser, Vey, & Butt, 2000). Un ejemplo es que se evidenció que la cantidad de oosporina (toxina liberada por *B. brongniartii*) que queda en el suelo después de que se aplica el hongo es muy baja (0.02 mg/m²), en comparación con la cantidad

que queda de los pesticidas Methylbromide y Dazomet (50.000 y 40.000 mg/m², respectivamente) (Strasser et al., 2000). Además, se ha observado que aplicaciones de *B. bassiana* no desplazan la microbiota indígena de determinado lugar (Wang, Fan, Li, & Butt, 2004), no generan efectos adversos en peces ni aves e incluso pueden reducir la presencia de patógenos en las plantas (Althouse, Petersen, & Mcewen, 1997; Zimmermann, 2007).

Respecto a los efectos de *B. bassiana* en mamíferos se ha demostrado que no resulta tóxico ni patogénico. En un experimento llevado a cabo en ratones, a los cuales se les inyectó de manera intramuscular 2×10^5 esporas de este hongo, se concluyó que no genera infección, no migra hacia otros órganos y sus esporas no son viables posterior a 12 horas de que se inyectan (Semalulu, MacPherson, Schiefer, & Khachatourians, 1992). Por su parte, se ha determinado que ciertos extractos de *B. bassiana* poseen actividad anticoagulante y moduladora del sistema inmune, lo cual podría tener beneficios en actividades fisiológicas de los humanos (Yoon et al., 2003).

Por otro lado, se ha estimado que el costo para desarrollar un biopesticida es de \$3 a \$5 millones y se toma aproximadamente 3 años para colocarlo en el mercado (Glare et al., 2012), mientras que un pesticida químico toma alrededor de 10 años entre la síntesis y la primera venta del producto, proceso que requiere más de \$250 millones (McDougall, 2016). Por tanto, el uso de *B. bassiana* como micoinsecticida se considera rentable y posee la facilidad de que se puede reproducir en condiciones artificiales de forma masiva y a bajos costos (Gerónimo-Torres et al., 2016).

Otra ventaja es que los hongos entomopatógenos se pueden aplicar de manera individual y tener una eficacia muy similar que si se aplicaran de forma combinada. Por ejemplo, se demostró que al aplicar, en condiciones de laboratorio, preformulados de *I. fumosorosea* y de *B. bassiana*, y un bioplaguicida a base de *L. lecanii* no hubo diferencias significativas en la eficiencia de los tres productos cuando se usaron de forma individual y combinada, y siempre provocaron porcentajes de mortalidad mayores a 65% de la mosca blanca *B. tabaci*. Esto representa beneficios económicos en sistemas de manejo integrado de plagas, ya que los costos de producción de bioplaguicidas pueden aumentar si se desarrollan en mezclas (Espinel, Torres, & Cotes, 2009).

Desventajas de la interacción hongo-insecto

Uno de los principales impedimentos que poseen los hongos entomopatógenos es que generalmente tienen un mecanismo de acción más lento que los insecticidas convencionales, ya que pueden matar una plaga entre 5 y 10 días posterior a la aplicación (St Leger et al., 1996). Montalva et al. (2011) observaron que una cepa de *V. lecanii* produjo un TL₅₀ de 3.2 días, mientras que el de un insecticida (Pirimicarb) fue de sólo 0.7 días. No obstante, no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) respecto a la mortalidad acumulada entre *V. lecanii* y el producto químico.

La situación anterior se ha logrado mejorar por medio de ingeniería genética. Por ejemplo, se han insertado copias adicionales de un gen que codifica de manera constitutiva para una proteasa llamada Pr1, la cual solubiliza la cutícula de los insectos y por ende ayuda a que las hifas puedan penetrar más rápidamente. Esta cepa mejorada logró generar un tiempo de sobrevivencia medio de los insectos de 93 horas, lo cual fue 25% menor al que provocó la cepa silvestre (120 horas) (St Leger et al., 1996).

Otra de las desventajas en cuanto a la salud de animales y humanos es que muchos de los hongos entomopatógenos, incluyendo *B. bassiana*, podrían tener alergénicos. Por tanto, la exposición a los conidios de los hongos podría causar dificultad respiratoria, fiebre, lagrimeo, dolor de cabeza y debilidad (Zimmermann, 2007).

Por otra parte, la aplicación de fungicidas podría afectar el rendimiento de los hongos entomopatógenos. Se encontró que la aplicación de Tebuconazole y Azoxystrobin indujo una disminución en la cantidad de cadáveres de una peste importante en soya (*Megacopta cribraria*) infectados por *B. bassiana* (Knight et al., 2017). No obstante, se ha observado que algunos agentes botánicos, otros microorganismos como *Bacillus thuringiensis*, nematodos entomopatógenos e incluso bajas dosis de insecticidas en conjunto con los hongos entomopatógenos pueden mejorar la eficacia en el control de insectos plaga (Butt, Coates, Dubovskiy, & Ratcliffe, 2016).

***Beauveria bassiana* como controlador biológico**

Beauveria aparece en 37.7% de las publicaciones de 6451 artículos científicos, revisiones y patentes desde el 1945 al 2015 en Web of Science, seguido de *Metarhizium* spp. con 34.9%. Esto

demuestra que este género es de gran importancia en ámbitos de biocontrol, microbiano industrial y farmacéutico (Mascarin & Jaronski, 2016).

B. bassiana se considera uno de los entomopatógenos más empleados en ensayos de control biológico, ya que tiene ciertas características favorables como rápida germinación y esporulación, elevada virulencia, buena producción de conidios, es barato de producir en grandes cantidades y fácil de almacenar (Grund & Hirsch, 2010). Se ha utilizado para el control de gran variedad de insectos como *Rhodnius prolixus*, vector de la enfermedad de Chagas (Luz & Fargues, 1997), *Anopheles stephensi*, vector de la malaria (Kannan et al., 2008), *Rhicephalus microplus*; principal problema de la ganadería bovina (Bautista Gálvez, Pimentel Segura, & Gómez Vázquez, 2017), contra mosca blanca y áfidos, entre otros (Perdikis, Kapaxidi, & Papadoulis, 2008).

Variaciones en la eficacia de aislamientos de *B. bassiana*

Debido a que los aislamientos de hongos entomopatógenos presentan variabilidad en el rango de hospederos, características fisiológicas y virulencia, resulta imprescindible conocer sus características para un control biológico eficiente (Diaz et al., 2009). Un ejemplo, es el experimento de laboratorio llevado a cabo por Gerónimo-Torres et al. (2016), donde los distintos aislamientos de *B. bassiana*, a una concentración de 1×10^7 conidios/mL, presentaron variabilidad intraespecífica en la patogenicidad del coleóptero *Hypothenemus hampei*. En dicha investigación todos los aislamientos causaron el 100% de mortalidad a las 144 horas, pero el tiempo requerido para matar al 50% de la población varió entre aislamientos de 72 a 104 horas.

Es relevante conocer la concentración exacta a la cual cierto aislamiento de hongo muestra patogenicidad para optimizar la concentración efectiva de esporas. La importancia de lo anterior se refleja en la investigación de Grund y Hirsch (2010), en la cual se encontró que la mayoría de los aislamientos utilizados incrementaron la mortalidad cuando se aplicaron en una concentración de esporas elevada; con lo que se podría obtener resultados más rápidamente.

Debido a que los Entomophthorales dependen principalmente de condiciones ambientales para poder parasitar insectos, es necesario caracterizar el comportamiento de los aislamientos que se desean utilizar, ya que puede variar según el sitio donde provenga. En un estudio en que se trabajó con aislamientos de *B. bassiana* provenientes de distintas latitudes, se encontró que entre los originarios entre 0° y 22° , los de latitudes más bajas tuvieron significativamente mayor tolerancia

a radiación UV-B que aislamientos de latitudes más altas (Fernandes, Rangel, Moraes, Bittencourt, & Roberts, 2007).

Productos comerciales de *B. bassiana*

En relación a los productos comerciales de hongos entomopatógenos, cabe señalar que los formulados podrían tener limitaciones a la hora de emplearlos en el campo, como por ejemplo el clima, la arquitectura de las plantas o las propiedades químicas y físicas de las superficies donde se aplican; que influyen el grado de susceptibilidad que presente el insecto y por tanto, en el resultado final del control biológico. Es por esto que se considera relevante seleccionar aislamientos o cepas más robustas que sean tolerantes a condiciones de temperatura, humedad o lluvia del sitio donde se desean aplicar, para garantizar un desarrollo adecuado del hongo y una manifestación de su virulencia ante determinada plaga (Mascarin & Jaronski, 2016).

En cuanto a la compatibilidad con otros agentes, se ha demostrado que al agregar ciertos componentes a la formulación del micoinsecticida, ya sean nutrientes exógenos, osmoprotectores y aceites, en etapas del crecimiento o durante el secado, se podría mejorar la tolerancia a la desecación y prolongar la vida útil (Mascarin & Jaronski, 2016). Sin embargo, se puede señalar que los resultados de la formulación pueden depender de la variabilidad genética entre los aislamientos de las diferentes especies y que cada caso debe tratarse con especial cuidado (Mascarin & Jaronski, 2016).

Por su parte, determinar la compatibilidad de los hongos entomopatógenos con algunos compuestos químicos en las formulaciones es la base para obtener un insecticida microbiano exitoso. Sin embargo, también hay factores que determinan dicho éxito como lo son las características del microorganismo y su interacción con coadyuvantes y el medio ambiente para su adecuado almacenaje. En una investigación se demostró que los tensoactivos Agrimul PW, Sulfofon NSS, Surfion 950, Surfion PW, Vixil-S y Vixilex son compatibles con *B. bassiana* y pueden ser utilizados para formulaciones con este entomopatógeno, pero los productos Dehydol KS 60, Sulpragil WP, Surfax 345 y Texapon Zacd fueron muy tóxicos para el hongo porque provocaron hasta 0% de su esporulación y crecimiento (Tanzini et al., 2001).

Así mismo, la evaluación de la patogenicidad de diferentes aislamientos fúngicos, mediante un bioensayo, se considera el primer paso para desarrollar un bioplaguicida (Vicentini, Faria, & De

Oliveira, 2001). Esto con el fin de promover el uso de aislamientos nativos, ya que se ha observado que las cepas exóticas de biopesticidas comerciales podrían comportarse de manera diferente a como se comprobó en su sitio de origen (Gerónimo-Torres et al., 2016). Además, en un bioensayo elaborado por Vicentini et al. (2001), se evidenció que aislamientos exógenos de *B. bassiana* (de Estados Unidos y Argentina) provocaron una mortalidad más baja en *B. tabaci*. Esto en comparación con la de varios aislamientos nativos de Brasil, que mostraron diferencias significativas con respecto al testigo, luego de 14 días de exposición al hongo.

3. Marco Metodológico

Pie de cría de *Zabrotes subfasciatus*

El pie de cría de *Z. subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) se realizó en el Laboratorio de Entomología de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA), Universidad Nacional. Se colocaron alrededor de 100 insectos en 250 g de semilla de frijol, en cajas plásticas con tapa que se colocaron dentro de una bolsa plástica transparente. Los recipientes se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 3^\circ\text{C}$ y bajo una humedad relativa entre 55 y 70%. Cuando la progenie F_1 comenzó a emerger (aproximadamente después de 2 meses de la inoculación), los insectos adultos se sacaron con un aspirador entomológico para usarlos en los experimentos (Figura 1).



Figura 1. Pie de cría de *Z. subfasciatus* en semillas de frijol (a), huevos y adulto en galerías del grano (b).

Origen de aislamientos fúngicos

Se utilizaron cuatro aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *B. bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), pertenecientes a la micoteca del Laboratorio de Control Biológico de la ECA, Universidad Nacional (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamientos de *B. bassiana* utilizados en este trabajo.

Aislamiento	Donado por	Ciudad	Hospedero
BV-01	INA	ND	ND
BV-09	CATIE	ND	Río
BV-15	CICAFÉ	Salitral, San José	Suelo de cafetal
BV-28	CORBANA	Guápiles, Limón	Planta de Banano

Cultivo de los hongos

Se utilizó el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) para activar y hacer crecer los hongos (Senthamizhlselvan, Alice, Sujeetha, & Jeyalakshmi, 2010). Éste se preparó adicionando 69 g del polvo listo para mezclar en 1 L de agua destilada. Se hirvió en microondas para homogenizar la solución y luego se autoclavó a 121°C por 40 minutos. Posteriormente, se vertió 20 mL de medio en placas Petri estériles (90 x 15 mm) dentro de la cámara de flujo laminar.

Después de que el medio solidificó, con un asa bacteriológica se hizo un rayado uniforme del hongo sobre el PDA. Las placas Petri se sellaron con Parafilm™ y se llevaron a una incubadora a 26 ± 2°C y 80% de humedad relativa programada con fotoperiodo 16:8 luz:oscuridad.

Producción y conteo de conidios

Para los experimentos con los aislamientos nativos, los conidios se obtuvieron a partir de cultivos en PDA con 7 días de edad, los cuales se cosecharon con una espátula metálica estéril sobre una solución estéril acuosa de Tween 80® (0.5%). Además, se utilizó un producto comercial (basado en *B. bassiana*) como tratamiento de referencia, del que se obtuvieron conidios a partir de arroz (presentación en la que se adquirió) (Figura 2) y de igual manera se depositaron en la solución acuosa de Tween 80® (0.5%). De acuerdo a Hailemariam & Seyoum (2013), esta solución se homogenizó con una pastilla magnética por 10 minutos para romper las cadenas de conidios.

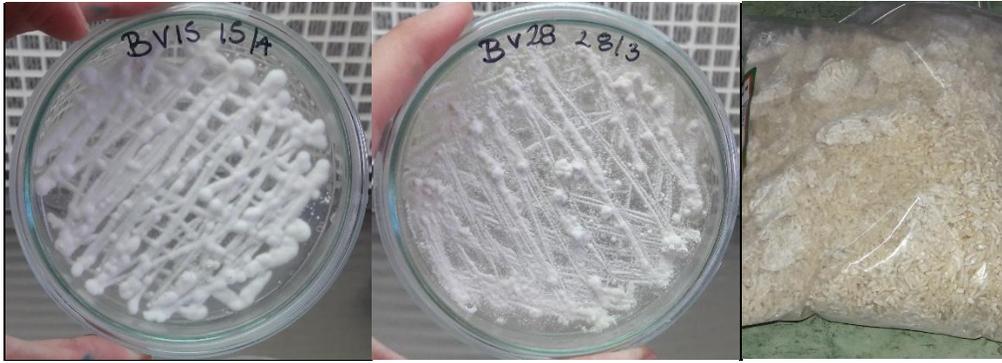


Figura 2. Cultivos de aislamientos de *B. bassiana* con 7 días de edad en PDA (izquierda y centro) y producto comercial en arroz (derecha).

Para determinar la concentración de conidios, se tomó 1 mL de la solución madre y se depositó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, agitando cada vez que se tomó 1 mL del tubo correspondiente y así sucesivamente hasta obtener la dilución que permitiera el conteo de conidios, que se llevó a cabo con un hemocitómetro. El tubo con la dilución que permitió el conteo, se agitó con vortex por 20 segundos, se tomó 10 μ L y se depositó en una cámara de Neubauer. Se contó el número de esporas en los cuatro cuadrantes secundarios esquinados y central del cuadrante principal (E) de la cámara (Figura 3).

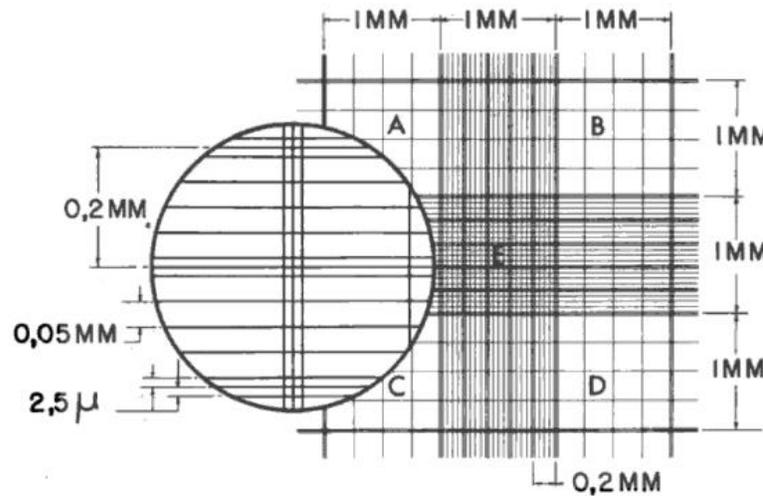


Figura 3. Rayado “Neubauer” del hemocitómetro, indicando las dimensiones de los: cuadrados principales (A, B, C, D y E) de 1 mm por lado y cuadrados secundarios (25 cuadrados del E) de 0,2 mm por lado.

Fuente: French & Hebert (1980).

Lo anterior se realizó por triplicado y se calculó la concentración de esporas con la siguiente fórmula recomendada por French y Hebert (1980):

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{conidios}}{\text{mL}} \right) \\ = \text{Suma de conidios en los 5 cuadrantes secundarios} * 50.000$$

Prueba de mortalidad

En una placa Petri a la que se le colocó un papel filtro (estériles), se depositó con una micropipeta 1 mL de la solución de esporas y posteriormente se colocaron 10 insectos adultos de *Z. subfasciatus* con ayuda de un pincel fino autoclavado (Figura 4). Dicha placa se selló con Parafilm™ y se llevó a una cámara bioclimática con $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 80% de humedad y un fotoperíodo de 16 horas luz, durante 9 días.



Figura 4. Unidad experimental conformada por la placa Petri con 10 adultos de *Z. subfasciatus* expuestos a los distintos aislamientos fúngicos.
Fuente: Propia.

Diariamente se contabilizó el número de coleópteros muertos en cada placa Petri; para ello se utilizó un pincel fino estéril, con el cual se tocó el cuerpo del insecto para verificar su movimiento y se consideraron como muertos los insectos que presentaron ausencia de movimientos. Además, de acuerdo a lo recomendado por Hailemariam y Seyoum (2013), después de 24 horas de iniciado el ensayo se incorporó a la placa Petri tres granos de frijol; como fuente de alimento para los insectos. Esto para prevenir la eliminación de esporas por el contacto de los insectos con los granos. Los granos de frijol se desinfectaron por 30 segundos en alcohol 70%, posteriormente se pasaron a una solución de cloro 0.5% por 1 minuto y finalmente se les realizó 3 lavados con agua destilada estéril (ADE). Lo anterior también se realizó para el producto comercial y el testigo; el cual consistió únicamente en la solución acuosa de Tween 80® (0.5%).

Diseño experimental

El experimento de cada uno de los aislamientos nativos ocurrió en momentos distintos, completamente al azar, y tanto el aislamiento nativo como el producto comercial se probaron a 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/mL. El diseño factorial fue de $2 \times 4 + 1$ y se realizaron 5 réplicas para cada tratamiento con $n = 50$ insectos por tratamiento (Figura 5). Cada uno de estos bioensayos, y el cultivo de los aislamientos fúngicos se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico de la ECA, Universidad Nacional.

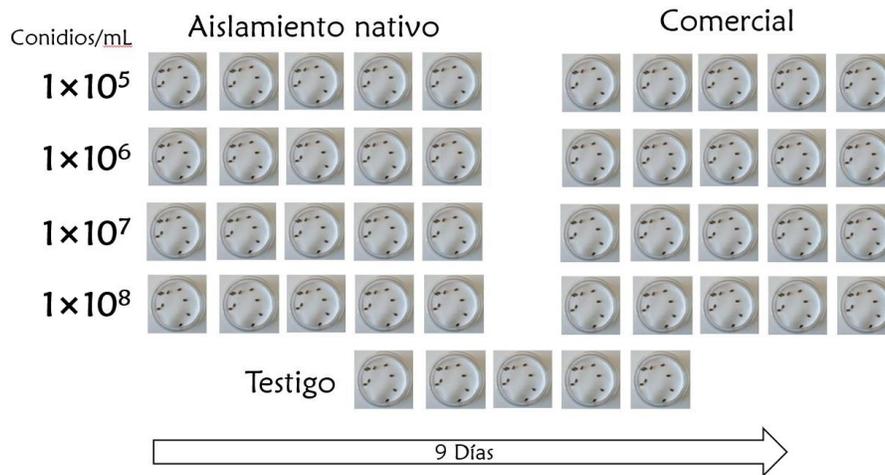


Figura 5. Diseño experimental para cada bioensayo de mortalidad de *Z. subfasciatus*.

Fuente: Propia.

Prueba de micosis

Los insectos considerados como muertos se sacaron de la placa Petri antes de que el hongo esporulara para evitar o minimizar la contaminación y posible transmisión horizontal, según lo recomendado por Hailemariam y Seyoum (2013). Posteriormente, para desinfectar la superficie de los insectos, se sumergieron en ADE por un minuto, luego en etanol 70% durante 30 segundos y de nuevo en ADE por un minuto. Los insectos se colocaron en una cámara húmeda, que consistió en una placa Petri con un papel filtro previamente autoclavado al que se le añadió 1 mL de ADE, para posteriormente verificar la esporulación; como evidencia de que el hongo penetró la cutícula del insecto y por ende la muerte fue debido a la infección. Por tanto, sólo los insectos infectados se tomaron en cuenta para determinar los porcentajes de mortalidad acumulada, el TL_{50} y la CL_{50} .

Prueba de pureza

Se comparó cualitativamente la pureza del producto comercial con la de un aislamiento nativo (BV-28). Para este último, se colocó 150 g de arroz en una bolsa plástica y se añadió 45 mL de H₂O destilada, que posteriormente se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Una vez que dicho sustrato se enfrió, se abrió cuidadosamente y se agregaron 4 discos del hongo (con 7 días de crecimiento en PDA), se homogenizó la bolsa, se volvió a sellar y se colocó en oscuridad durante 4 días. Al cuarto día se homogenizó la bolsa y se expuso a 16:8 horas de luz hasta el día 8, donde se sacó de la cámara bioclimática y se llevó a refrigeración hasta su posterior uso. Esto se realizó por triplicado.

Tanto para el producto comercial como para el aislamiento nativo se colocó 1 g del sustrato inoculado con el hongo en un tubo con 9 mL de ADE y se realizaron diluciones seriadas. De los tubos con la dilución 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ se tomaron 250 µL con micropipeta que se depositaron y esparcieron con un asa de Digrafsky en una placa Petri con PDA. Se realizaron 3 réplicas de cada una y las placas se llevaron a una cámara bioclimática con 16 horas de luz hasta el día 6, donde se realizaron observaciones de contaminación fúngica y bacteriana.

Análisis estadístico

Los datos de mortalidad acumulada fueron sometidos a un análisis de varianza de medidas repetidas (RM-ANOVA) mediante el software InfoStat 2018 (<http://www.infostat.com.ar>), donde se determinó el efecto del entomopatógeno (aislamiento nativo-producto comercial), de la concentración y del tiempo sobre la mortalidad de los insectos. El modelo matemático para un modelo bifactorial con interacción se describe como:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

con: $i = 1, \dots, n$ $j = 1, \dots, n$, $k = 1, \dots, n$

Con

Y_{ijk} : variable de respuesta de la k-ésimo repetición en el i-ésimo nivel del factor A y j-ésimo nivel Factor B

μ : media general

α_i : efecto de la i-ésimo nivel del Factor A.

γ_j : efecto de la j-ésimo nivel del Factor B.

δ_{ij} : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles de los factores.

ε_{ijk} : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante.

Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos) y se escogió el modelo que mejor ajustó según los criterios de Akaike (AIC) y de información Bayesiano (BIC). En las variables donde existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron las comparaciones de medias por medio de la prueba de Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) ($p \leq 0.05$), permitiendo la formación de grupos excluyentes y no transición entre tratamientos.

Para determinar el TL_{50} , de acuerdo al estudio de Gerónimo-Torres et al. (2016) se eligió la tasa de mortalidad obtenida con 1×10^7 conidios/mL; como concentración estándar. Los datos se analizaron mediante modelos lineales generalizados de regresión logística para datos binarios.

Siendo $g(\mu)$ la función de enlace que transforma la media poblacional, el modelo para cada análisis es el siguiente:

- El tiempo letal 50 (TL_{50})

$$g(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento} + \beta_2 \text{Días}$$

Se probaron las siguientes funciones de enlace:

- Logit: $g(p_i) = \text{logit}(p_i) = \text{logit}\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right)$
- Probit: $g(p_i) = \Phi^{-1}(p_i)$
- Complemento log-log: $g(p_i) = \log(-\log(1 - p_i))$

Esto se implementó en el programa RStudio 2015 (<http://www.rstudio.com/>) y se escogió la función de enlace Logit, ya que fue la que generó el mejor ajuste de los datos.

Para determinar la CL_{50} se llevó a cabo una regresión lineal simple en RStudio 2015, con los datos de porcentaje de mortalidad correspondientes al día donde el primer tratamiento alcanzó el

90% de mortalidad. Para los bioensayos de los aislamientos BV-09 y BV-28 se utilizó el logaritmo de las concentraciones; ya que proporcionó el mejor ajuste de la recta.

4. Resultados

Pruebas de mortalidad

El RM-ANOVA para el aislamiento **BV-01** arrojó que la interacción Entomopatógeno (aislamiento nativo y comercial)-Concentración-Día tienen un efecto significativo en el patrón de mortalidad observado (Figura 6, Anexo 1). Este aislamiento provocó una mayor mortalidad de *Z. subfasciatus* con la concentración más alta de inóculo (1×10^8 conidios/mL); con un 90% de mortalidad en el primer día de la prueba. Por el contrario, el producto comercial causó mayor mortalidad con las concentraciones más bajas, y su máxima mortalidad fue de 70%; al día 8 con 1×10^6 conidios/mL.

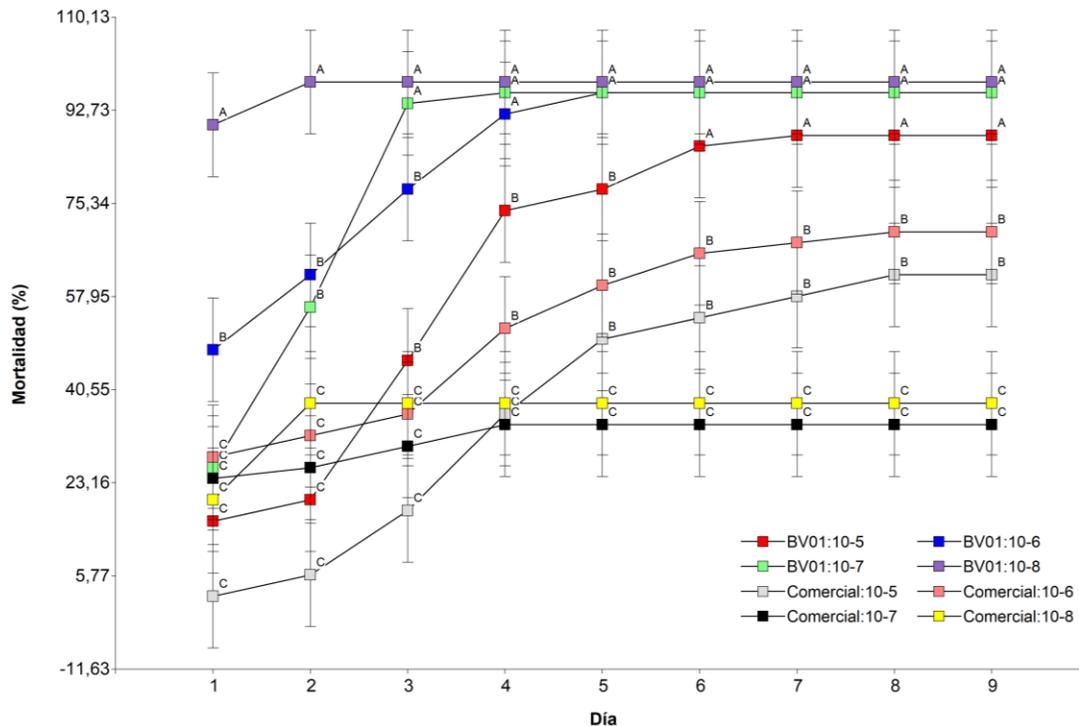
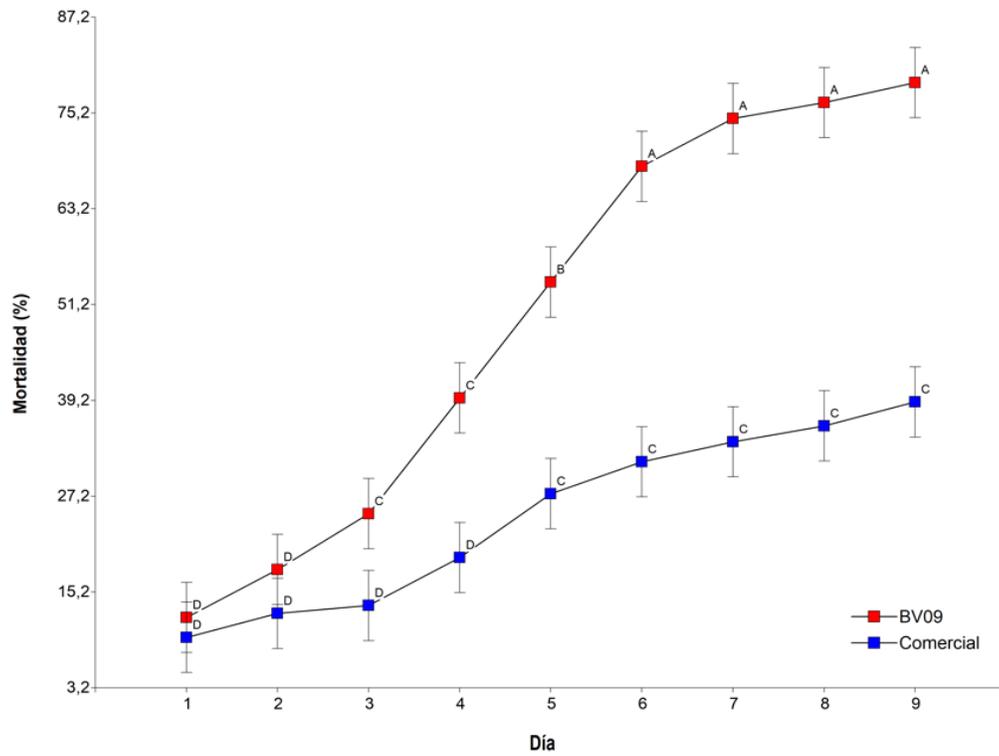


Figura 6. Efecto del Entomopatógeno (BV-01 y comercial)- Concentración -Día sobre la mortalidad de *Z. subfasciatus* ($10^{-5} = 1 \times 10^5$, $10^{-6} = 1 \times 10^6$, $10^{-7} = 1 \times 10^7$, $10^{-8} = 1 \times 10^8$ conidios/mL) (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).

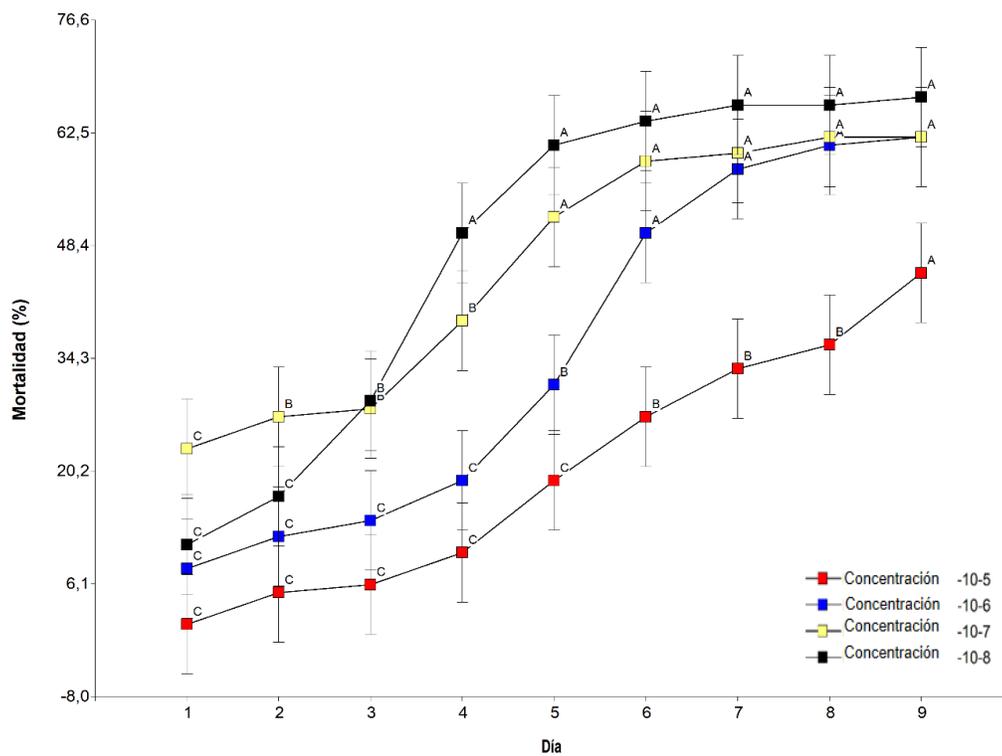
La mortalidad más elevada causada por el aislamiento **BV-09**, fue de 88% con 1×10^6 conidios/mL en el día 8. Por otro lado, la mortalidad máxima originada por el producto comercial fue de 56% con 1×10^8 conidios/mL en el día 9 (Cuadro 3). Por su parte, se encontró que a partir del día 3 este aislamiento nativo generó significativamente mayor mortalidad (Figura 7a) y se evidenció que las concentraciones más elevadas provocaron mayor mortalidad; sin importar el entomopatógeno empleado (Figura 7b) (Anexo 2).

Cuadro 3. Mortalidad acumulada de *Z. subfasciatus* causada por el aislamiento BV-09 y el producto comercial de *B. bassiana* a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Concentración fúngica (conidios/mL)	Mortalidad acumulada después de la inoculación (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
BV-09	1×10^5	0	6	8	14	28	44	54	54	64
	1×10^6	12	18	22	30	48	74	82	88	88
	1×10^7	24	28	30	50	70	82	84	86	86
	1×10^8	12	20	40	64	70	74	78	78	78
Comercial	1×10^5	2	4	4	6	10	10	12	18	26
	1×10^6	4	6	6	8	14	26	34	34	36
	1×10^7	22	26	26	28	34	36	36	38	38
	1×10^8	10	14	18	36	52	54	54	54	56
Testigo	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8



a)



b)

Figura 7. Efecto de la interacción Entomopatógeno (BV-09 y comercial)-Día (a) y Concentración (conidios/mL)-Día (b) sobre la mortalidad de *Z. subfasciatus* (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).

El aislamiento **BV-15** al día 4 provocó el 100% de mortalidad de los insectos con la concentración más elevada (1×10^8 conidios/mL), mientras que el producto comercial provocó la mayor mortalidad (76%) con 1×10^6 conidios/mL en el día 7 (Cuadro 4). Este aislamiento nativo generó mayor mortalidad durante el bioensayo, a partir del segundo día de evaluación (Figura 8a) y con las concentraciones más altas (1×10^7 y 1×10^8) (Figura 8b), de manera significativa ($p \leq 0.05$), en comparación con el producto comercial (Anexo 3).

Cuadro 4. Mortalidad acumulada de *Z. subfasciatus* causada por el aislamiento BV-15 y el producto comercial de *B. bassiana* a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Concentración fúngica (conidios/mL)	Mortalidad acumulada después de la inoculación (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
BV-15	1×10^5	22	30	44	74	82	86	92	92	92
	1×10^6	12	22	62	68	74	74	76	76	76
	1×10^7	30	66	90	94	94	94	94	94	94
	1×10^8	56	88	94	100	100	100	100	100	100
Comercial	1×10^5	8	22	26	42	58	64	74	74	74
	1×10^6	22	28	38	58	70	74	76	76	76
	1×10^7	34	36	56	64	66	66	66	66	66
	1×10^8	18	28	42	42	42	42	42	42	42
Testigo	0	8	8	10	10	12	14	18	18	20

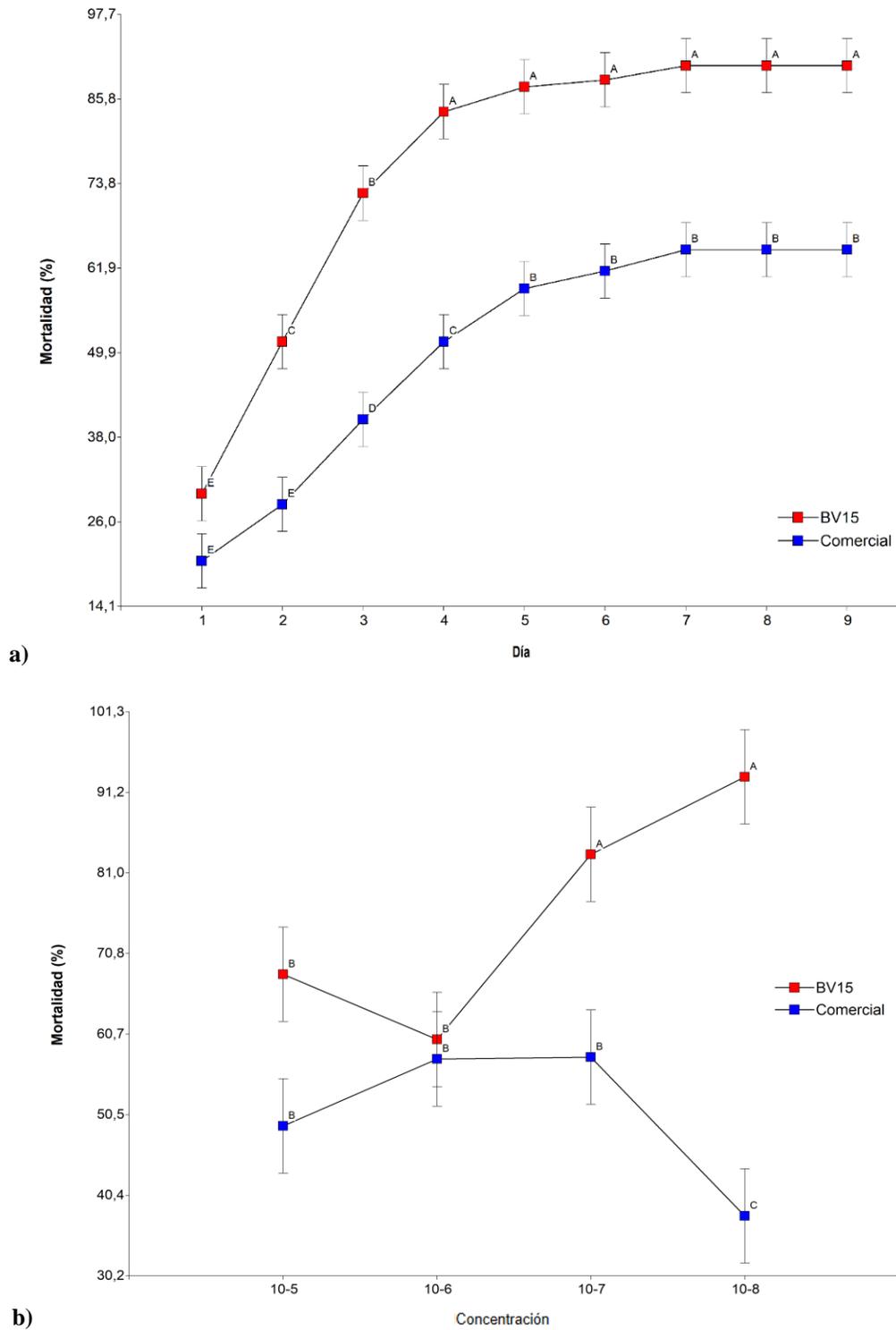
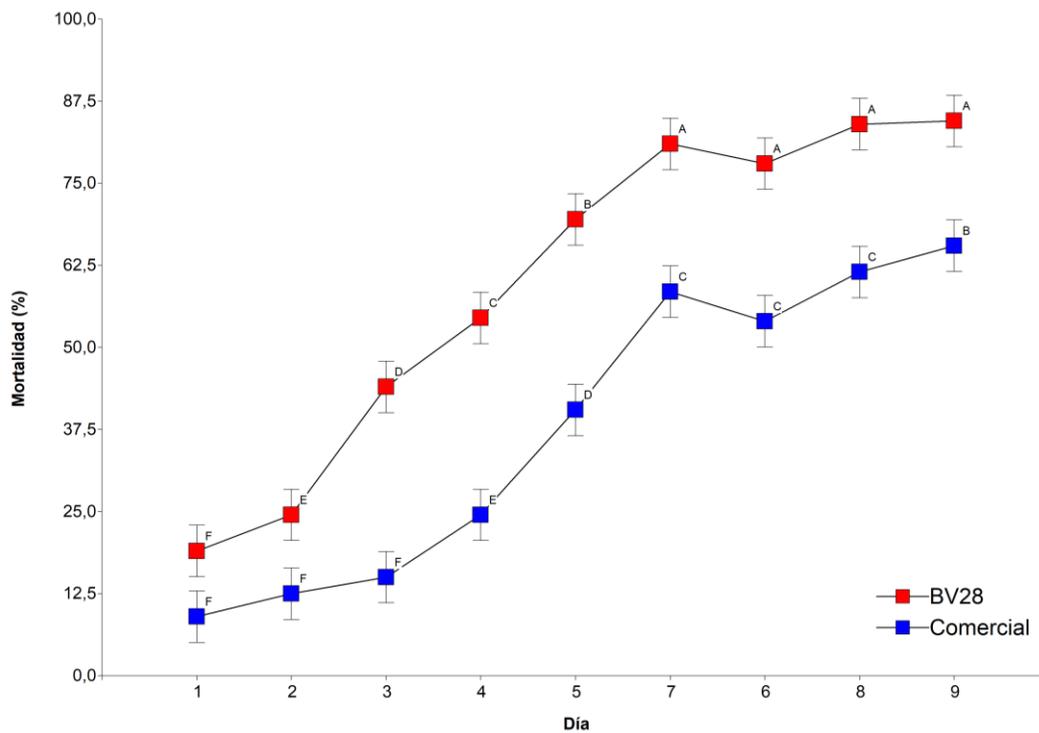


Figura 8. Efecto de la interacción Entomopatógeno (BV-15 y comercial)-Día (a) y del Entomopatógeno-Concentración (conidios/mL) (b) sobre la mortalidad de *Z. subfasciatus* (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).

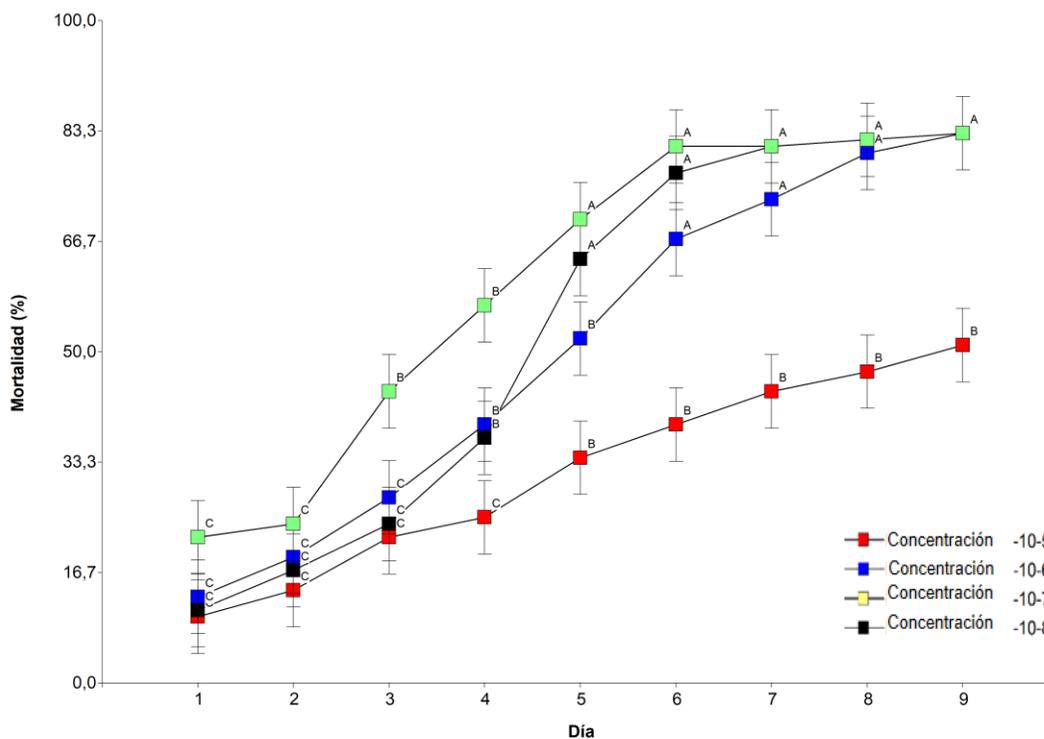
El aislamiento **BV-28** causó el 100% de mortalidad de los insectos (al día 6) con 1×10^8 conidios/mL. En contraste, el producto comercial produjo una mortalidad más alta (76%) con 1×10^6 y 1×10^7 al día 9 (Cuadro 5). En adición, este aislamiento generó una mortalidad mayor con respecto al producto comercial de manera significativa (Figura 9a) y se evidenció una relación positiva de la concentración con la mortalidad causada (Figura 9b) (Anexo 4).

Cuadro 5. Mortalidad acumulada de *Z. subfasciatus* causada por el aislamiento BV-28 y el producto comercial de *B. bassiana* a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Concentración fúngica (conidios/mL)	Mortalidad acumulada de la inoculación (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
BV-28	1×10^5	16	18	32	36	46	48	54	58	58
	1×10^6	12	20	36	48	62	76	80	88	90
	1×10^7	16	26	34	42	72	88	90	90	90
	1×10^8	32	34	74	92	98	100	100	100	100
Comercial	1×10^5	4	10	12	14	22	30	34	36	44
	1×10^6	14	18	20	30	42	58	66	72	76
	1×10^7	6	8	14	32	56	66	72	74	76
	1×10^8	12	14	14	22	42	62	62	64	66
Testigo	0	12	12	12	12	12	12	12	14	16



a)



b)

Figura 9. Efecto de la interacción del Entomopatógeno (BV-28 y comercial)-Día (a) y de la Concentración-Día (b) sobre la mortalidad de *Z. subfasciatus* (Medias con letras iguales son no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)).

Tiempo Letal Medio y Dosis Letal Media

Con respecto al TL₅₀, el aislamiento que requirió menor cantidad de tiempo para matar el 50% de los insectos fue BV-15 con 1 día, seguido por BV-01 con 1.5 días, BV-09 con 3.8 días y BV-28 con 3.9 días. Para el producto comercial los valores fueron más elevados y con gran variación, ya que rondaron entre 3.1 y 19 días (Cuadro 6, Figura 10).

Cuadro 6. Tiempo letal medio (TL₅₀) de *Z. subfasciatus*, provocado por distintos aislamientos y un producto comercial de *B. bassiana* a 1×10^7 conidios/mL.

Tratamiento	TL ₅₀ (días)
BV-01	1.5
Comercial	19
BV-09	3.8
Comercial	12.9
BV-15	1
Comercial	3.1
BV-28	3.9
Comercial	5.6

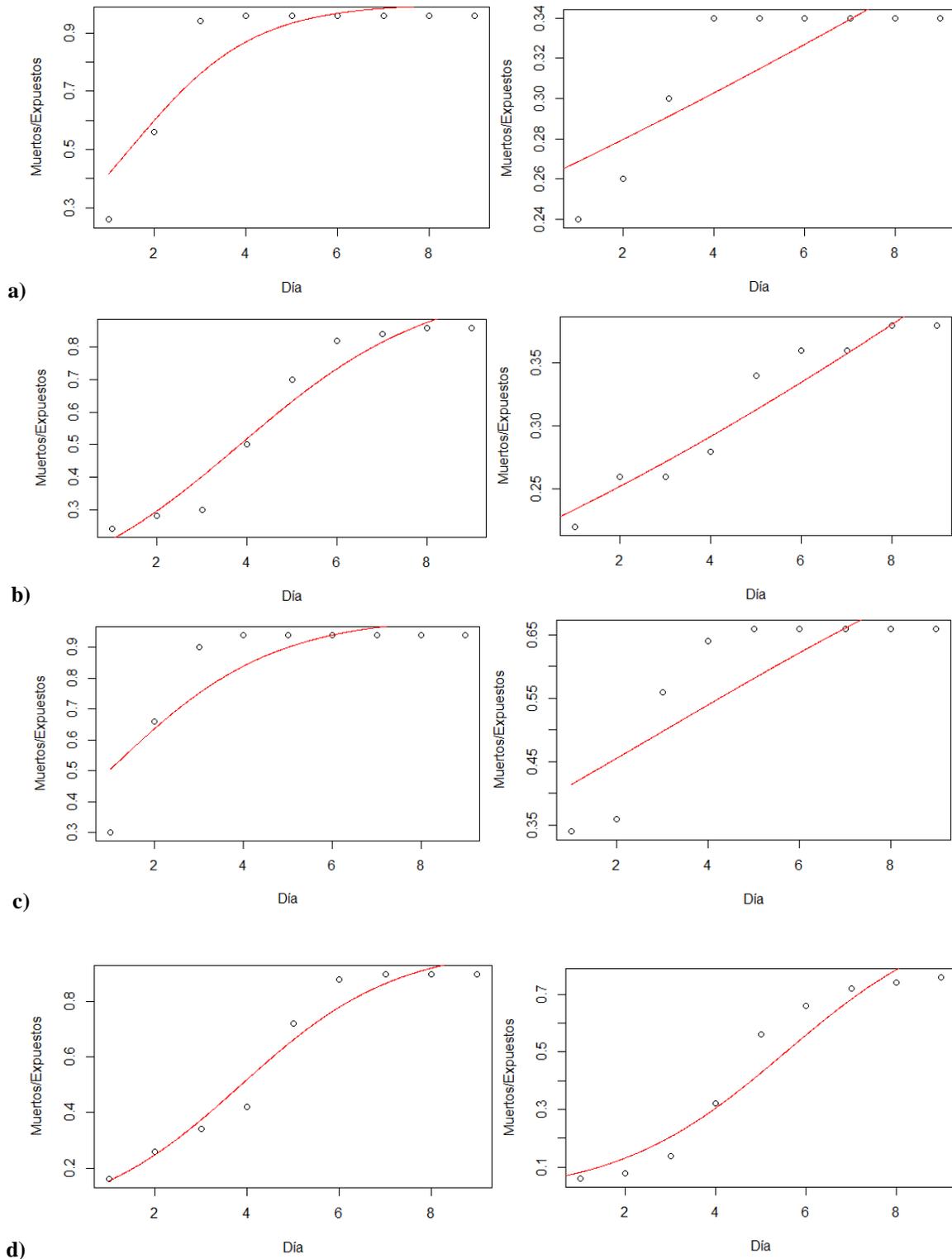


Figura 10. Modelo Logit ajustado de la proporción de insectos muertos (Mueartos/Expuestos) para el TL₅₀ del aislamiento nativo (izquierda) y para el producto comercial (derecha). BV01 (a), BV09 (b), BV15 (c) y BV28 (d).

En cuanto a la CL₅₀, el aislamiento que requirió menor cantidad de inóculo para matar el 50% de los insectos fue BV-09 (4.9×10^5 conidios/mL), seguido por BV-28 (1.6×10^6 conidios/mL), BV-15 (2.5×10^7 conidios/mL) y BV-01 (3.6×10^7 conidios/mL). El producto comercial presentó mucha variabilidad, desde 5.4×10^7 hasta 1.9×10^{21} (Cuadro 7, Anexos 5-8).

Cuadro 7. Concentración letal media (CL₅₀) de los distintos aislamientos y de un producto comercial de *B. bassiana* para el insecto *Z. subfasciatus*.

Tratamiento	CL ₅₀ (conidios/mL)	Ecuación regresión
BV-01	3.6×10^7	$y = 6.14 \times 10^{-7} X + 2.7 \times 10^1$
Comercial	1.1×10^9	$y = 3.03 \times 10^{-8} X + 1.77 \times 10^1$
BV-09	4.9×10^5	$y = 3.04 X + 31^*$
Comercial	5.4×10^7	$y = 4.86 X - 36.8^*$
BV-15	2.5×10^7	$y = 5.36 \times 10^{-7} X + 3.66 \times 10^1$
Comercial	6.4×10^9	$y = 3.40 \times 10^{-9} X + 2.84 \times 10^1$
BV-28	1.6×10^6	$y = 7.04 X - 50.80^*$
Comercial	1.9×10^{21}	$y = 1.13 X + 7.60^*$

*Estimado con log de la concentración

Micosis

Por otra parte, se evidenció de manera general que los insectos infectados con los aislamientos nativos (Figura 11a-d) tendieron a desarrollar más micelio y esporas que los infectados con el producto comercial (Figura 11e-h). Además, varios insectos, que fueron expuestos a dicho micoinsecticida comercial mostraron contaminación (Figura 11i-l). En cuanto a los que se expusieron al testigo, mayoritariamente no manifestaron esporulación (Figura 11m-o).

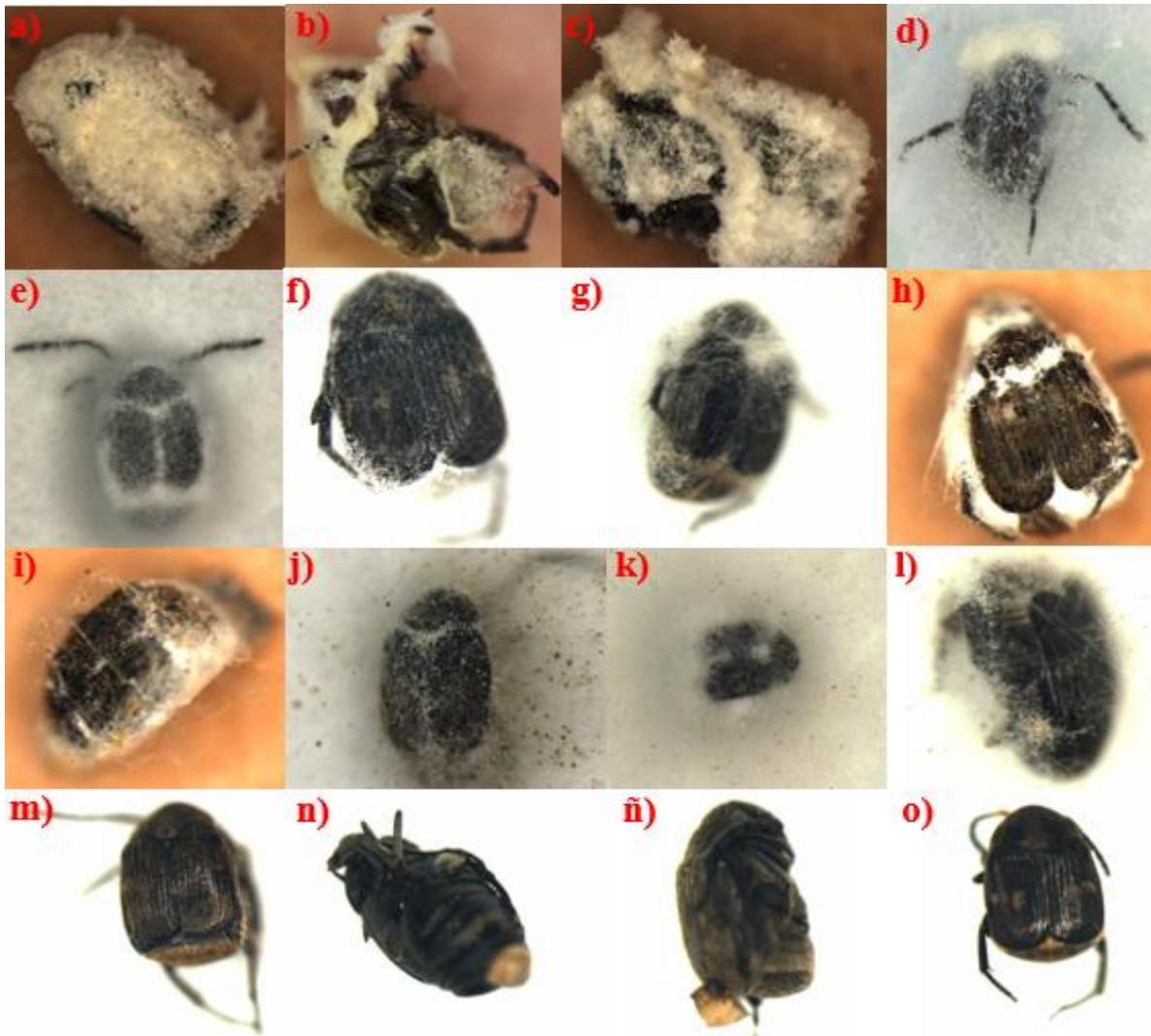


Figura 11. Adultos de *Z. subfasciatus* infectados con BV-01 (a), BV-09 (b), BV-15 (c), BV-28 (d), el producto comercial (e-h), el producto comercial contaminados (i-l) y testigo (m-o).

Pruebas de pureza

Se observó cualitativamente que las placas del producto comercial presentaron poca cantidad de micelio e incluso aparición de otros hongos y bacterias; por lo que hubo coincidencia con que se evidenció en la esporulación de los insectos (prueba de micosis). Por su parte, las placas del aislamiento nativo resultaron estar puras (Figura 12).

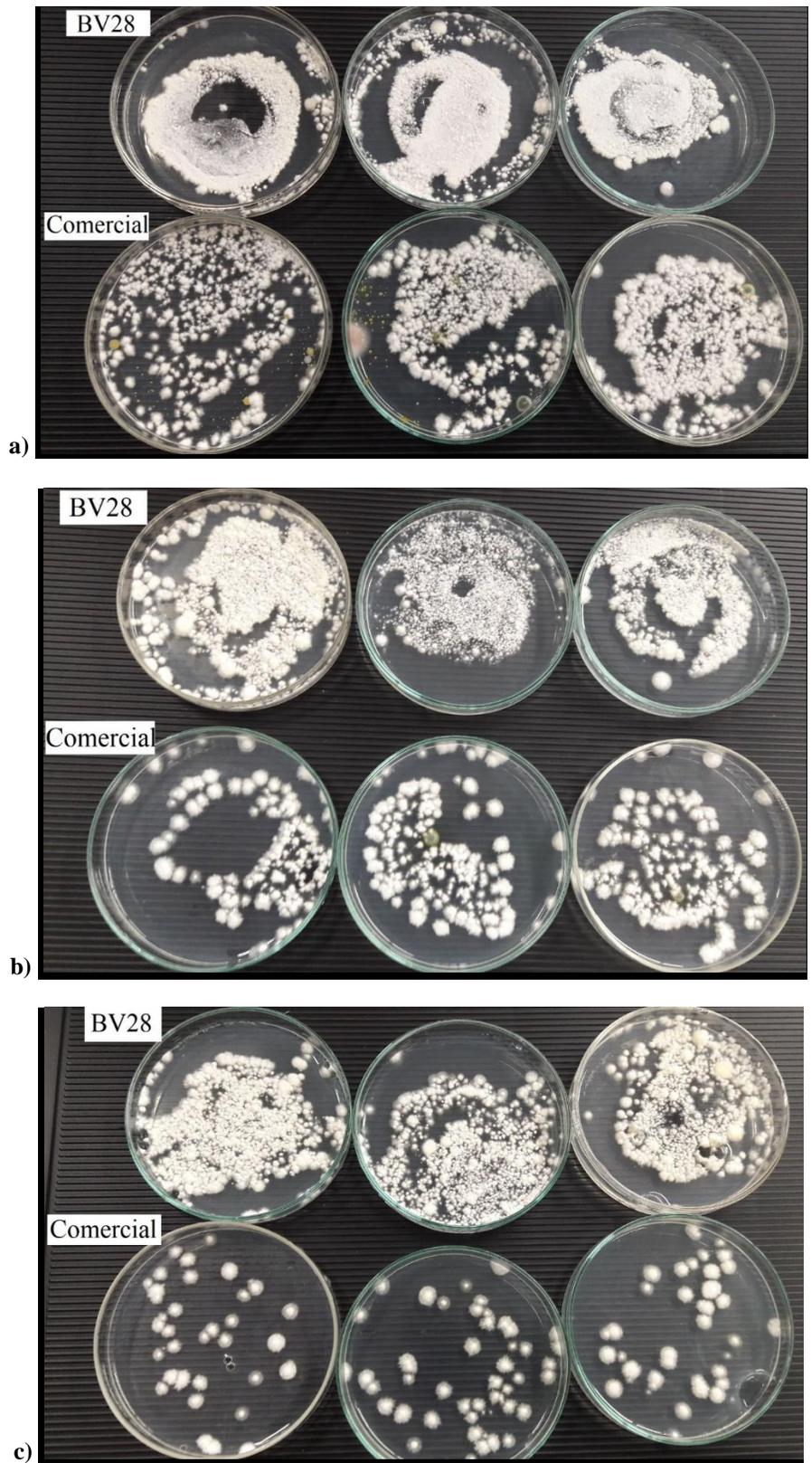


Figura 12. Prueba de pureza para el aislamiento (BV-28) (arriba) y el producto comercial de *B. bassiana* (abajo) a una concentración de 1×10^{-3} (a), 1×10^{-4} (b) y 1×10^{-5} (c) conidios/mL.

5. Discusión

Estadística y biológicamente los cuatro aislamientos fueron más virulentos y patogénicos que el producto comercial, ya que la máxima mortalidad provocada por los aislamientos rondó entre 88-100% y se alcanzó en los primeros días del experimento, mientras que la del producto comercial estuvo entre 56-76%. León-Martínez, Campos-Pinzón y Arguelles-Cárdenas (2019) también encontraron que cepas promisorias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* provocaron una alta mortalidad (90%) del coleóptero *Rhynchophorus palmarum*, en comparación con un producto comercial de *M. anisopliae* (13%). Por su parte, Tomer et al. (2018) observaron que tanto aislamientos nativos de *M. anisopliae* como una cepa comercial resultaron patogénicos contra *Dermanyssus gallinae*, pero la cepa comercial causó una de las sobrevivencias más altas (30%).

Por otra parte, en la mayoría de los ensayos se observó que las concentraciones de hongo más elevadas indujeron una mortalidad más alta, lo cual coincide con lo reportado por Tuncer, Kushiyevev, Erper, Ozdemir y Saruhan (2019), quienes aportan que la eficacia del hongo entomopatógeno tiende a incrementar conforme se aumenta su concentración. No obstante, el aislamiento BV-09 (Cuadro 3) presentó un comportamiento contrario. Esto podría ser una demostración de hormesis; fenómeno bifásico donde bajas concentraciones de un agente estresor, estimulan determinado efecto y altas concentraciones lo inhiben (Ramanaidu & Cutler, 2012). Cabe destacar que no existen reportes de que el insecto *Z. subfasciatus* manifieste una respuesta adaptativa hormética hacia *B. bassiana*, pero sí la ha mostrado cuando se le ha aplicado insecticida (azadiractina) (Mallqui, Vieira, & Guedes, 2014) y extractos botánicos (*Tetradenia riparia*) (Cutler, 2013).

Todos los aislamientos nativos resultaron tener menor TL_{50} y CL_{50} que el producto comercial. Dichos valores fueron similares entre los aislamientos BV-01 y BV-15; y entre BV-09 y BV-28. Quesada-Moraga et al. (2006) obtuvieron resultados similares, donde aislamientos de *B. bassiana* fueron más virulentos hacia *B. tabaci*, que un micoinsecticida comercial (basado en *B. bassiana*). Los aislamientos provocaron un tiempo de sobrevivencia más corto (7 días) y una CL_{50} entre 6.53×10^5 y 9.34×10^7 conidios/mL, mientras que la del micoinsecticida fue la más alta (3.50×10^8 conidios/mL). Con respecto a los valores variables de TL_{50} y CL_{50} del producto comercial, es importante aclarar que se utilizó el mismo producto comercial en cada uno de los bioensayos, pero

se utilizaron dos lotes distintos debido a que el primero se contaminó. Esto se ve reflejado en los bioensayos de los aislamientos BV-01 y BV-09, donde el producto comercial obtuvo TL₅₀ y CL₅₀ similares, ya que para éstos se utilizó un mismo lote. Mientras que para los bioensayos de los aislamientos BV-15 y BV-28, en los que se utilizó otro lote de producto comercial, el TL₅₀ también fue similar y presentaron los mayores valores de CL₅₀ (Cuadro 7).

El hecho de que el producto comercial haya causado una mortalidad más baja, junto con TL₅₀ y CL₅₀ más elevados podría estar relacionado con la contaminación evidenciada en la esporulación de los insectos (Figura 11e-h) y en las pruebas de pureza (Figura 12), ya que la presencia de otros microorganismos podría estar inhibiendo el crecimiento y eficacia del hongo (Monzon, 2001). También podría ser por falta de revigorización, debido a que se considera de gran importancia inocular el hongo sobre insectos de interés (Vargas-Martínez, Salazar-Blanco, González-Herrera, & Molina-Bravo, 2019) en lugar de realizar resiembras sucesivas, con el fin de evitar la pérdida de virulencia y reactivar el potencial bioinsecticida (Simi et al., 2018).

Otro aspecto que pudo haber influenciado, es que los conidios de los aislamientos nativos se cosecharon de medio PDA, mientras que los del producto comercial de arroz que además, al ser una formulación, contenía otros componentes como aminoácidos, extracto de algas, polisacáridos y flavonoides. Se ha observado que existen sustratos de crecimiento que promueven una mayor o menor virulencia (Ortiz-Urquiza, Fan, Garrett, & Keyhani, 2016). Por ejemplo, Santoro et al. (2007) reportaron diferencias significativas en la mortalidad de adultos de escarabajos que fueron infectados con conidios de *B. bassiana*, producidos en distintos sustratos (arroz, medio sintético y en el insecto).

Al igual que lo observado en este trabajo, se han reportado variaciones en la patogenicidad y virulencia de distintos aislamientos de hongos de la misma especie. Qazzaz, Al-masri y Barakat (2015) encontraron que distintos aislamientos de *B. bassiana* resultaron tener diferentes valores de CL₅₀; entre 3.8 y 10.5 (log de conidios/mL) y de TL₅₀; desde 3.9 hasta 5.6 días contra la mosca mediterránea de la fruta. Mwamburi y Laing (2010) evaluaron *in vitro* la actividad entomopatogénica de 34 aislamientos de *B. bassiana* hacia *Musca domestica* y encontraron que todos fueron patogénicos, tanto a la larva como al adulto, causaron entre 30-100% de mortalidad, con una CL₅₀ entre 10³-10⁵ conidios/mL y un TL₅₀ entre 0.44-1.3 días.

Wang y Chi (2019) también encontraron que cinco cepas de *B. bassiana* tuvieron TL₅₀ entre 3.28 y 8.25 días al infectar larvas del coleóptero *Xylotrechus rusticus* y Santoro, Oliveira, Alexandre y Angeli (2007) estimaron valores de CL₅₀ entre 2.92 y 177.42 (10⁶ conidios/mL) al atacar el escarabajo *Alphitobius diaperinus*. Dicha variabilidad puede deberse a ciertos factores como la capacidad de adherencia y penetración de los conidios en el integumento del insecto, el nivel toxicogénico que posea el aislamiento e incluso la capacidad de defensa del insecto (Aldana, Mesa, & Olivera, 2011).

Por otro lado, se puede decir que *Z. subfasciatus* es un insecto adecuado para este tipo de experimentos dosis-respuesta, gracias a su fácil manipulación y alta reproducción, y que el tiempo de los bioensayos (9 días) resultó óptimo para visualizar la actividad entomopatogénica de los aislamientos, ya que alrededor del día 7 los porcentajes de mortalidad se estabilizaron en todas las concentraciones probadas. También el hecho de que en pocos días los aislamientos nativos hayan tenido alta patogenicidad resulta relevante. Esto porque la velocidad a la que se mata una plaga objetivo, se considera un requerimiento primordial para que un micoinsecticida sea competitivo ante un pesticida químico (Quesada-Moraga et al., 2006).

Cabe rescatar que BV-01 y BV-15 tuvieron una CL₅₀ más alta que los otros dos aislamientos, pero provocaron altos porcentajes de mortalidad (98 y 100%) en los primeros días de los experimentos (días 2 y 4), lo cual se reflejó en un TL₅₀= 1.5 y 1 día. Otros entomopatógenos han presentado una máxima mortalidad de 93%, hasta el día 6 después de la inoculación, hacia *Z. subfasciatus* (Hailemariam & Seyoum, 2013). Por lo tanto, se podrían considerar con potencial para futuros ensayos de caracterización, especificidad, compatibilidad con otros hongos e insecticidas, tanto en condiciones de laboratorio como de campo, e incluso para su posible comercialización como bioinsecticidas.

6. Conclusiones

Los cuatro aislamientos nativos de *B. bassiana* causaron altos porcentajes de mortalidad (88-100%), la cual tendió a incrementar con una mayor concentración del entomopatógeno, excepto para el aislamiento BV-09; por lo que podría tratarse de un efecto de hormesis en *Z. subfasciatus* inducido por este entomopatógeno.

El TL₅₀ de los aislamientos nativos rondó entre 1 y 4 días, y la CL₅₀ entre 4.9×10^5 y 3.6×10^7 conidios/mL, que fueron menores a los estimados para el producto comercial. Además, dicho producto provocó una mortalidad más baja (56-76%), lo cual puede estar relacionado con impurezas, el tipo de sustrato de donde provenían los conidios o con falta de revigorización.

Los resultados indicaron que los aislamientos nativos evaluados tienen elevada capacidad patogénica, bajo condiciones de laboratorio, hacia *Z. subfasciatus*. Se puede rescatar el aislamiento BV-15, obtenido de suelo de cafetal, que provocó hasta 100% de mortalidad de los insectos con TL₅₀= 1 día y CL₅₀= 2.5×10^7 conidios/mL. Por tanto, estos aislamientos nativos podrían considerarse en posteriores investigaciones que conlleven a su formulación comercial como potenciales agentes de control biológico.

7. Recomendaciones

Al existir interés en llegar a comercializar aislamientos nativos de *B. bassiana*, se recomienda continuar evaluando sus características de germinación, de capacidad de esporulación (realizar conteo de conidios de los insectos infectados), de especificidad (si se desean emplear contra determinada plaga objetivo), de compatibilidad (con otros microorganismos y productos químicos) para promover el uso correcto de estos en el control biológico de plagas. Esto especialmente con el aislamiento BV-15, que mostró resultados prometedores. Además, indagar en los estándares de calidad para una producción masiva eficaz y proceso de empaçado, que aseguren la pureza y conservación del hongo.

También seguir caracterizando la respuesta de hormesis que presentó el aislamiento BV-09, con una ampliación de las concentraciones probadas y determinar si efectivamente se estimula la adaptación de *Z. subfasciatus* al hongo con las concentraciones subletales.

Para pruebas similares a las de este trabajo, tratar de estandarizar los tratamientos; es decir, adquirir los conidios del producto comercial de un sustrato similar al de donde se obtengan los de los aislamientos nativos. Además, previo a los bioensayos, llevar a cabo pruebas de viabilidad, esporulación, germinación y de pureza; para tener la certeza de que el producto a aplicar es únicamente el entomopatógeno.

Para trabajos donde se desee utilizar *Z. subfasciatus* como insecto modelo, es recomendable realizar observaciones previas de su comportamiento, ya que son insectos pequeños (miden entre 3-5 mm), vuelan muy rápido e incluso suelen hacerse los muertos cuando se sienten amenazados. Por tanto, al momento de verificar la mortalidad se deben tocar cuidadosamente con un pincel o instrumento estéril para activarlos.

8. Referencias

- Abate, T., & Ampofo, J. K. O. (1996). Insect Pests of Beans in Africa: Their Ecology and Management. *Annual Review of Entomology*, 41(1), 45–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.000401>
- Aldana, R. C., Mesa, E., & Olivera, H. G. De. (2011). Patogenicidad de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* sobre larvas de *Strategus aloeus* L. (Coleoptera : Scarabaeidae), en condiciones de laboratorio. *Palmas*, 32(4), 30–40.
- Althouse, C. M., Petersen, B. E., & McEwen, L. C. (1997). Effects on Young American Kestrels (*Falco sparverius*) Exposed to *Beauveria bassiana* Bioinsecticide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 507–512. <https://doi.org/10.1007/s001289900507>
- Arguedas, M., Álvarez, V., & Bonilla, R. (2008). Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Agronomía Costarricense*, 32(2), 137–147.
- Assaff, A., Reyes, Y., López, E., & de la Torre, M. (2002). Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance Y Perspectiva*, 21, 291. Retrieved from <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8495>
- Badilla, F. (2002). Un programa exitoso de control biológico de insectos plaga de la caña de azúcar en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas Y Agroecología (Costa Rica)*, 64, 77–87.
- Barakat, E., & Abokersh, M. (2016). Characterization of the haemolymph from *Schistocera gregaria* adults after infection with entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Life Science Journal*, 13(3), 79–87. <https://doi.org/10.7537/marslsj13031610>
- Barrios, C. E., Bustillo, A. E., Ocampo, K. L., Reina, M. A., & Alvarado, H. L. (2016). Eficacia de hongos entomopatógenos en el control de *Leptopharsa gibbicarina* (Hemiptera: Tingidae) en palma de aceite. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 22–27. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84986191379&partnerID=40&md5=848d56b279f4d849ce1ef75104c0cc3f>
- Bautista Gálvez, A., Pimentel Segura, R., & Gómez Vázquez, A. (2017). Control biológico de *Rhicephalus* (*Boophilus*) *microplus* con hongos entomopatógenos. *CIBA Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas Y Agropecuarias*, 6(12). <https://doi.org/10.23913/ciba.v6i12.68>
- Brito, S. S. S., De Magalhães, C. R. I., De Oliveira, C. R. F., De Oliveira, C. H. C. M., Ferraz, M. S. S., & Magalhães, T. A. (2015). Bioactivity of essential oils on *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Chrysomelidae) in common beans stored. *Revista Brasileira de Ciencias Agrarias*, 10(2), 243–248. <https://doi.org/10.5039/agraria.v10i2a5316>
- Butt, T., Jackson, C., & Magan, N. (2001). Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=YozZDTvenmvUC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Introduction-fungal+biological+control+agents:+progress,+problems+and+potential.+In+T.+M.+Butt,+>

C.+W.+Jackson,+%26+N.+Magan+(Eds.),+Fungi+as+biocontrol+agents:+Progress,+problems+and+potential&ots=QiTZqGAv6M&sig=x4Vhi6YnDCiE3VuIDPQUAQPF6qc

- Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M., & Ratcliffe, N. A. (2016). Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Advances in Genetics*, *94*, 307–364. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- Carrillo-Rayas, M. T., & Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria de Guanajuato*, *19*(2), 40–49.
- Cruz-Ortega, J. E., Partida-Ruvalcaba, L., Velásquez-Alcaraz, T. de J., Guerra-Liera, J. E., Díaz-Valdés, T., & Oliva-Ortiz, L. del C. (2016). Effectiveness of Different Doses of Diatomaceous Earth on Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman) in Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Open Access Library Journal*, *3*, 1–11. <https://doi.org/10.4236/oalib.1103228>
- Cutler, G. C. (2013). INSECTS, INSECTICIDES AND HORMESIS: EVIDENCE AND CONSIDERATIONS FOR STUDY. *Dose-Response*, *11*(2), 154–177. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-008.Cutler>
- De Lima, C. P. . (1987). Insect pests and post harvest problems in the tropics. *Insect Science and Its Applications*, *8*, 673–676.
- Diaz, B. M., Oggerin, M., Lastra, C., Rubio, V., & Fereres, A. (2009). Characterization and virulence of *Lecanicillium lecanii* against different aphid species. *BioControl*, *54*(6), 825–835. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9218-9>
- Espinel, C., Torres, L., & Cotes, A. M. (2009). Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, *35*(1), 18–21.
- Fargues, J., Maniania, N., Delmas, J., & Smits, N. (1992). Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agromonie*, *12*(7), 557–564. Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885500>
- Feng, M. G., Khachatourians, G. G., & Poprawski, T. J. (1994). Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*, *4*(1), 3–34. <https://doi.org/10.1080/09583159409355309>
- Fernandes, É. K. K., Rangel, D. E. N., Moraes, Á. M. L., Bittencourt, V. R. E. P., & Roberts, D. W. (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, *96*(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.05.007>
- French, E., & Hebert, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica. Retrieved from https://books.google.co.cr/books?id=nR8PAQAIAAJ&pg=PA171&hl=es&source=gbs_to_c_r&cad=4#v=onepage&q&f=false
- García-García, M. A., Cappello-García, S., Leshner-Gordillo, J. M., & Molina-Martínez, R. F. (2008). Hongos Entomopatógenos como una Alternativa en el Control Biológico. *Kuxulkab'*,

- 15(27), 25–28. Retrieved from <http://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/846>
- García-García, M. A., Cappello-García, S., Leshner-Gordillo, J. M., & Molina-Martínez, R. F. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), 21–28.
- Gerónimo-Torres, J. D. C., Torres-de-la-Cruz, M., Pérez-De-la-Cruz-Pérez, M., De-la-Cruz-Pérez, A., Ortiz-García, C. F., & Cappello-García, S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 28–35. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882016000100006&lang=pt
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., ... Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>
- Goulson, D. (2014). Ecology: Pesticides linked to bird declines. *Nature*, 511(7509), 295–296. <https://doi.org/10.1038/nature13642>
- Grund, J., & Hirsch, L. (2010). The potential of entomopathogenic fungal isolates as an environmentally friendly management option against *Acanthoscelides obtectus*. *Swedish University of Agricultural Sciences*. Retrieved from https://stud.epsilon.slu.se/2178/1/Hirsch_et_al_110119.pdf
- Gul, H. T., Saeed, S., & Khan, F. A. Z. (2014). Entomopathogenic Fungi as Effective Insect Pest Management Tactic : A Review. *Applied Sciences and Business Economics*, 1(1), 10–18.
- Hailemariam, A., & Seyoum, E. (2013). Evaluation on the Potential of Entomopathogenic Fungal Isolates for the Control of Mexican Bean Bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) (Coleoptera: Bruchidae). *Ethiopian Journal of Biological Sciences*, 12(1), 67–79. <https://doi.org/10.1017/S003060531000181X>
- Hajek, A. ., & Leger, R. J. S. (1994). Interactions between fungal pathogen and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 293–322.
- Hernández Díaz-Ordaz, N., Pérez, N., & Toledo, J. (2010). Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (MacQuart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana (Nueva Serie)*, 26(3), 481–494.
- Huanes-Carranza, J., & Wilson-Krugg, J. (2016). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio. *REBIOL*, 36(1), 51–58. Retrieved from <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbciol/article/view/1314/1278>
- Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P., Meziane, A. El, & Yao, Y.-J. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2017), 1204–1212. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.015>
- Inclán, D. J., Bermúdez, F. J., Alvarado, E., Ellis, M., Williams, R. N., & Acosta, N. (2008). Comparison of biological and conventional insecticide treatments for the management of the

- pineapple fruit borer, *Strymon megarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) in Costa Rica. *Ecological Engineering*, 34(4), 328–331. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.07.005>
- Kannan, S. K., Murugan, K., Kumar, A. N., Ramasubramanian, N., & Mathiyazhagan, P. (2008). Adulticidal effect of fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *African Journal of Biotechnology*, 7(6), 838–841. Retrieved from <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58556>
- Knight, I. A., Roberts, P. M., Gardner, W. A., Oliver, K. M., Jacobson, A., & Toews, M. D. (2017). Effect of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) and Fungicide Applications on *Megacopta cribraria* (Hemiptera: Plataspidae) in Soybean. *Crop, Forage & Turfgrass Management*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.2134/cftm2017.05.0034>
- Leach, A. W., Mumford, J. D., & Krauss, U. (2002). Modelling *Moniliophthora roreri* in Costa Rica. *Crop Protection*, 21(4), 317–326. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00148-X)
- León-Martínez, G. A., Campos-Pinzón, J. C., & Arguelles-Cárdenas, J. H. (2019). Patogenicidad y autodiseminación de cepas promisorias de hongos entomopatógenos sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera : Dryophthoridae) Pathogenicity and autodissemination of promising entomopathogenic fungi strains on *Rhynchophorus palmarum* L. . *Agronomía Mesoamericana*, 30(3), 631–646. <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.36184>
- López-Gaeta, J. M., Torres-Guzmán, J. C., Padilla-Guerrero, I. E., Guerrero-Carrera, Y. S., & González-Hernández, G. A. (2017). Interacción Hongo-Planta-Insecto; Participación de Genes 2NP1 y 2NP5 en la Interacción de *Metarhizium* con *Brassica oleracea* y *Medicago sativa*. *Jóvenes En La Ciencia*, 3(2), 778–782.
- Luz, C., & Fargues, J. (1997). Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*, 138(3), 117–125. <https://doi.org/10.1023/A:1006803812504>
- Mallqui, K. S. V., Vieira, J. L., & Guedes, R. N. C. (2014). Azadirachtin-Induced Hormesis Mediating Shift in Fecundity-Longevity Trade-Off in the Mexican Bean Weevil (Chrysomelidae : Bruchinae), 860–866.
- 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(11), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- McDougall, P. (2016). *The Cost of New Agrochemical Product Discovery , Development and Registration in 1995 , 2000, 2005-8 and 2010 to 2014*. United Kingdom. Retrieved from http://191hmt1pr08amfq62276etw2.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2016/04/Phillips-McDougall-Final-Report_4.6.16.pdf
- Montalva, C., Gutiérrez, M., Rojas, E., Lanfranco, D., & Valenzuela, E. (2011). Evaluación de la virulencia de hongos entomopatógenos del pulgón del ciprés, de dos regiones ecológicas de Chile. II. *Boletín Micológico*, 26, 10–14.
- Monzon, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, (63), 95–103.
- Musso, A., Padín, S., & Dal Bello, G. (2017). Control de Insectos en Granos Almacenados con

- Hongos Entomopatógenos. *Investigación Joven*, 4(2), 79. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/66066/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1
- Mwamburi, L., & Laing, M. D. (2010). Laboratory Screening of Insecticidal Activities of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces lilacinus* Against Larval and Adult House Fly (*Musca domestica* L.). *African Entomology*, 18(1), 38–46. <https://doi.org/10.4001/003.018.0106>
- Ortiz-Urquiza, A., Fan, Y., Garrett, T., & Keyhani, N. O. (2016). Growth substrates and caleosin-mediated functions affect conidial virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 162(11), 1913–1921. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000375>
- Paul, U. V., Lossini, J. S., Edwards, P. J., & Hilbeck, A. (2009). Effectiveness of products from four locally grown plants for the management of *Acanthoscelides obtectus* (Say) and *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (both Coleoptera: Bruchidae) in stored beans under laboratory and farm conditions in Northern Tanzania. *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.09.006>
- Perdikis, D., Kapaxidi, E., & Papadoulis, G. (2008). Biological Control of Insect and Mite Pests in Greenhouse Solanaceous Crops. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(Special Issue 1), 125–144. <https://doi.org/258808727>
- Pucheta-Díaz, M., Flores-Macías, A., Rodríguez-Navarro, S., & de la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12). Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006
- Qazzaz, F. O., Al-masri, M. I., & Barakat, R. M. (2015). Effectiveness of *Beauveria bassiana* Native Isolates in the Biological Control of the Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitis capitata*). *Advances in Entomology*, 3, 44–55. <https://doi.org/10.4236/a...Article>
- Quesada-Moraga, E., Maranhao, E. A. A., Valverde-García, P., & Santiago-Álvarez, C. (2006). Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialetrodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control*, 36(3), 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.022>
- Ramanaidu, K., & Cutler, G. C. (2012). Different toxic and hormetic responses of *Bombus impatiens* to *Beauveria bassiana*, *Bacillus subtilis* and spirogrammat. *Pest Management Science*, 69(8), 949–954. <https://doi.org/10.1002/ps.3456>
- Ramírez, F. (2011). *Importacion De Plaguicidas En Costa Rica: Periodo 2007-2009. Area de Diagnóstico IRET-UNA*. Heredia, Costa Rica. Retrieved from http://cep.unep.org/repcar/informacion-de-paises/costa-rica/Impoortaciones_07-09_REPCar.pdf
- 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. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Rumbos, C. I., & Athanassiou, C. G. (2017). Use of entomopathogenic fungi for the control of stored-product insects: can fungi protect durable commodities? *Journal of Pest Science*,

90(3), 839–854. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0849-9>

- Santoro, P. H., Oliveira, P., Alexandre, T., & Angeli, L. (2007). Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(4), 483–489. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/%0D/pab/v42n4/05.pdf>
- Schäfer, R. B., Brink, P. J. Van Den, & Liess, M. (2012). Impacts of Pesticides on Freshwater Ecosystems. *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, 111–137. <https://doi.org/10.2174/978160805121211101010111>
- Semalulu, S. S., MacPherson, J. M., Schiefer, H. B., & Khachatourians, G. G. (1992). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* in Mice. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 39(1–10), 81–90. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01141.x>
- Senthamizhselvan, P., Alice, J., Sujeetha, R. P., & Jeyalakshmi, C. (2010). Suitable medium for fungal production. *Journal of Biopesticides*, 3(2), 466–469. Retrieved from http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/Sentamil_Selvan_V32.pdf
- Shipp, J. L., Zhang, Y., Hunt, D. W. A., & Ferguson, G. (2003). Influence of Humidity and Greenhouse Microclimate on the Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for Control of Greenhouse Arthropod Pests. *Environmental Entomology*, 32(5), 1154–1163. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.5.1154>
- Simi, L. D., Leite, L. G., Trevisan, O., Nilton, J., Costa, M., Oliveira, L. E., ... Filho, A. B. (2018). Mortality of *Conotrachelus humeropictus* in response to combined application of the nematode *Steinernema brazilense* and the fungus *Beauveria bassiana*. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 85, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1808>
- St Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., & Roberts, D. W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6349–6354. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349>
- Strasser, H., Vey, A., & Butt, T. M. (2000). Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 717–735. <https://doi.org/10.1080/0958315002001169>
- Tanzini, M. R., Alves, S. B., Setten, A., & Augusto, N. T. (2001). Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 59, 15–18.
- Todorova, S. I., Coderre, D., & Côté, J. C. (2000). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* isolates toward *Leptinotarsa decemlineata* [Coleoptera: Chrysomelidae], *Myzus persicae* [Homoptera: Aphididae] and their predator *Coleomegilla maculata lengi* [Coleoptera: Coccinellidae]. *Phytoprotection*, 81(1), 15–22. <https://doi.org/10.7202/706196ar>
- Tomer, H., Blum, T., Arye, I., Faigenboim, A., Gottlieb, Y., & Ment, D. (2018). Activity of native and commercial strains of *Metarhizium* spp. against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* under different environmental conditions. *Veterinary Parasitology*, 262, 20–25.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.09.010>

- Torres-de-la-Cruz, M., Cortez, H., Ortiz, C., Cappello-García, S., & De-la-Cruz-Pérez, A. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 40–46.
- Tuncer, C., Kushiyevev, R., Erper, I., Ozdemir, I. O., & Saruhan, I. (2019). Efficacy of native isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the invasive ambrosia beetle , *Xylosandrus germanus* Blandford (Coleoptera : Curculionidae : Scolytinae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29:28, 1–6. <https://doi.org/doi.org/10.1186/s41938-019-0132-x>
- Ugine, T. A., Wraight, S. P., Brownbridge, M., & Sanderson, J. P. (2005). Development of a novel bioassay for estimation of median lethal concentrations (LC50) and doses (LD50) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(3), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.05.010>
- Uma Devi, K., Padmavathi, J., Uma Maheswara Rao, C., Khan, A. A. P., & Mohan, M. C. (2008). A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(10), 975–989. <https://doi.org/10.1080/09583150802450451>
- Valdés-Herrera, R., Pozo-Velázquez, E., & Cárdenas-Morales, M. (2015). Comportamiento de *Z. subfasciatus* en semillas tratadas con polvos de especies botánicas. *Centro Agrícola*, 42(1), 79–84.
- van Wendel de Joode, B., Mora, A. M., Lindh, C. H., Hernández-Bonilla, D., Córdoba, L., Wesseling, C., ... Mergler, D. (2016). Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6–9 years from Talamanca, Costa Rica. *Cortex*, 85(2016), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2016.09.003>
- Vargas-Martínez, A., Salazar-Blanco, J. D., González-Herrera, A., & Molina-Bravo, R. (2019). Análisis genético de *Beauveria* y *Metarhizium* tropicales asociados a insectos en caña de azúcar. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 267–280. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.32307>
- Vicentini, S., Faria, M., & De Oliveira, M. R. V. (2001). Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates Against Nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with Description of a New Bioassay Method. *Neotropical Entomology*, 30(1), 97–103. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000100015>
- Villalobos, K., Vargas, A., & González, A. (2011). Evaluación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en condiciones de campo para el combate de trips en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) en San Pablo de León Cortés, Costa Rica. *Métodos En Ecología Y Sistemática*, 6(3), 62–70.
- Vogel, G. (2017). Where have all the insects gone? *Science*, 356(6338), 576–579. <https://doi.org/10.1126/science.356.6338.576>

- Wang, C., Fan, M., Li, Z., & Butt, T. M. (2004). Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 861–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02215.x>
- Wang, Y., & Chi, D. (2019). Screening of high-virulent entomopathogenic fungal strains to infect *Xylotrechus rusticus* larvae. *3 Biotech*, 80, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1602-2>
- Yoon, C.-S., Yu, K.-W., Bae, S.-H., Song, H.-H., Park, H.-S., & Lee, C. (2003). Chemical Properties and Physiological Activities of Synnemata of *Beauveria bassiana*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(1), 125–133.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(5/6), 553–596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>

9. Anexos

Anexo 1. Análisis de varianza de medidas repetidas en el tiempo para el experimento del aislamiento BV-01.

Resultados para el modelo:

Variable dependiente: Mortalidad

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
360	2519,79	2790,85	-1185,90	9,99	0,70	0,94

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	256	396,82	<0,0001
Cepa	1	32	47,93	<0,0001
Dosis	3	32	1,69	0,1888
Fecha	8	256	91,14	<0,0001
Cepa:Dosis	3	32	1,84	0,1589
Cepa:Fecha	8	256	5,83	<0,0001
Dosis:Fecha	24	256	11,23	<0,0001
Cepa:Dosis:Fecha	24	256	2,98	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

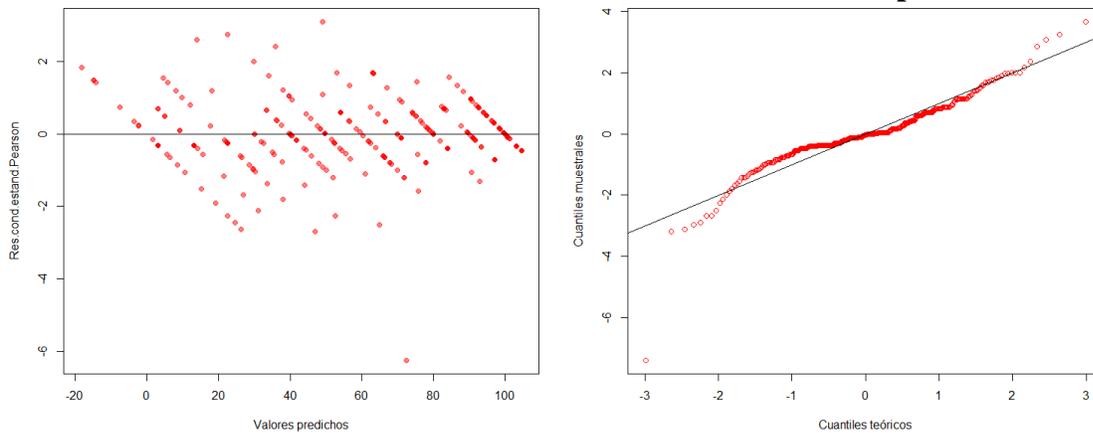
Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: *pdIdent*

Formula: $\sim 1/Cepa_Dosis_Rep$

Desvíos estándares relativos al residual y correlaciones

	(const)
(const)	1,92

Residuos condicionales estandarizados de Pearson vrs valores predichos:



Anexo 2. Análisis de varianza de medidas repetidas en el tiempo para el experimento del aislamiento BV-09.

Resultados para el modelo: *mlm.modelo.004_Mortalidad_REML*

Variable dependiente: Mortalidad

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
360	2643,61	2914,67	-1247,80	13,11	0,69	0,88

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	256	236,33	<0,0001
Cepa	1	32	26,42	<0,0001
Dosis	3	32	6,84	0,0011
Fecha	8	256	83,47	<0,0001
Cepa:Dosis	3	32	0,49	0,6901
Cepa:Fecha	8	256	14,15	<0,0001
Dosis:Fecha	24	256	2,29	0,0008
Cepa:Dosis:Fecha	24	256	0,95	0,5271

Parámetros de los efectos aleatorios

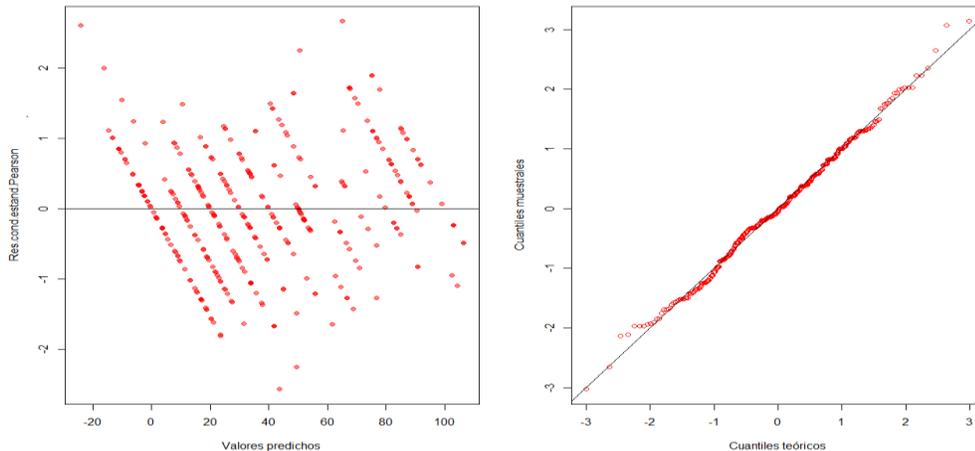
Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: *pdIdent*

Formula: $\sim 1|Cepa_Dosis_Rep$

Desvíos estándares relativos al residual y correlaciones

(const)
(const) 1,12

Residuos condicionales estandarizados de Pearson vrs valores predichos:



Anexo 3. Análisis de varianza de medidas repetidas en el tiempo para el experimento del aislamiento BV-15.

Resultados para el modelo

Variable dependiente: *Mortalidad*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
360	2565,57	2836,63	-1208,79	11,45	0,74	0,90

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	256	907,31	<0,0001
Cepa	1	32	37,06	<0,0001
Dosis	3	32	1,87	0,1550
Fecha	8	256	110,43	<0,0001
Cepa:Dosis	3	32	6,89	0,0010
Cepa:Fecha	8	256	3,48	0,0008
Dosis:Fecha	24	256	5,85	<0,0001
Cepa:Dosis:Fecha	24	256	0,84	0,6861

Parámetros de los efectos aleatorios

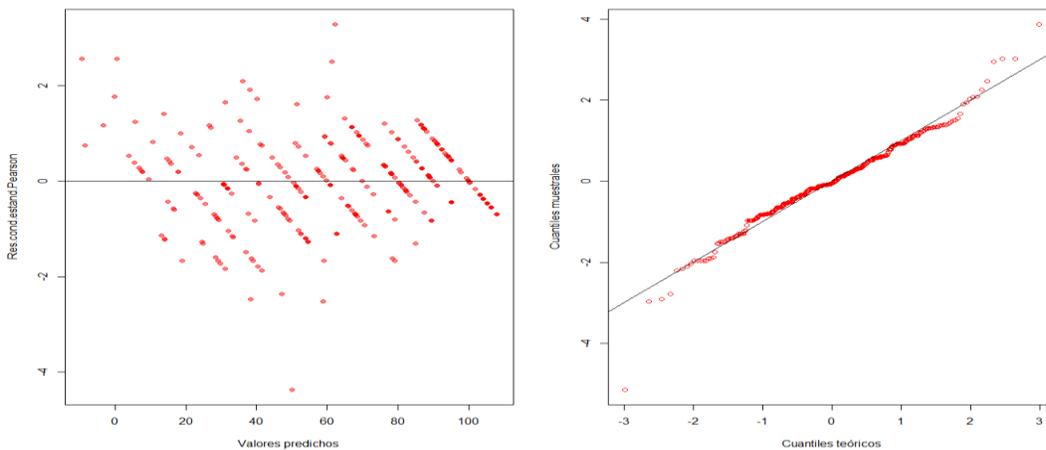
Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1/Cepa_Dosis_Rep

Desvíos estándares relativos al residual y correlaciones

(const)
(const) 1,11

Residuos condicionales estandarizados de Pearson vrs valores predichos:



Anexo 4. Análisis de varianza de medidas repetidas en el tiempo para el experimento del aislamiento BV-28.

Resultados para el modelo

Variable dependiente: Mortalidad

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
360	2586,00	2857,06	-1219,00	11,90	0,77	0,91

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	256	528,24	<0,0001
Cepa	1	32	26,74	<0,0001
Dosis	3	32	8,19	0,0003
Fechas	8	256	163,06	<0,0001
Dosis:Fechas	24	256	4,05	<0,0001
Cepa:Dosis	3	32	2,35	0,0908
Cepa:Fechas	8	256	3,70	0,0004
Cepa:Dosis:Fechas	24	256	1,14	0,3004

Parámetros de los efectos aleatorios

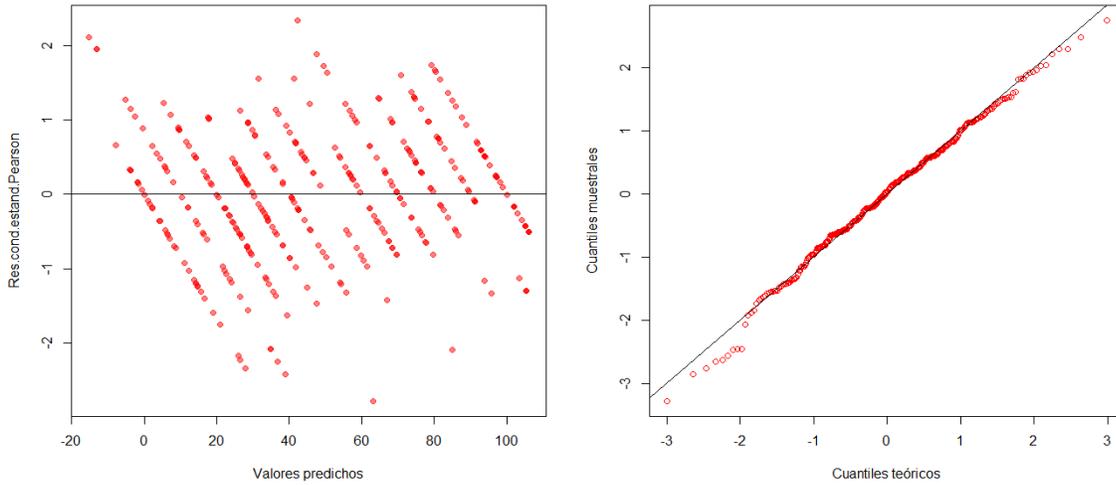
Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1/Cepa_Dosis_Rep

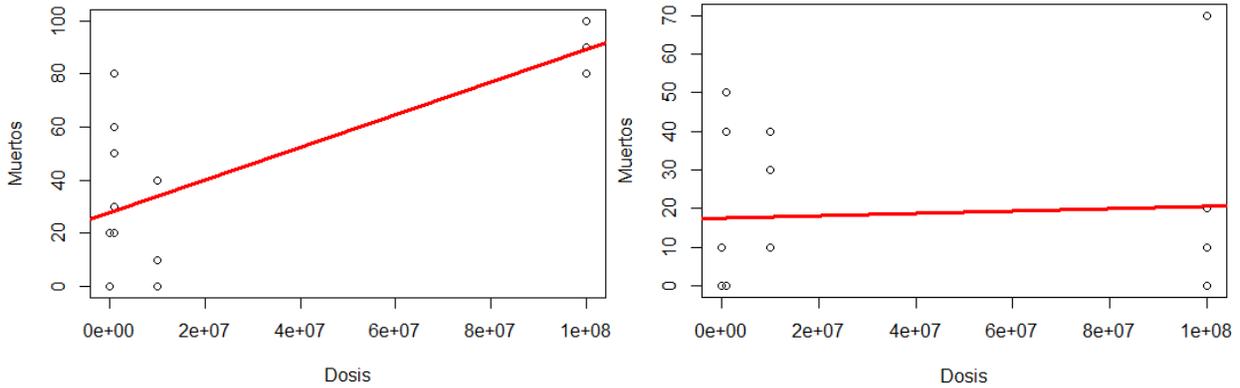
Desvíos estándares relativos al residual y correlaciones

<u> </u>	(const)
(const)	1,08

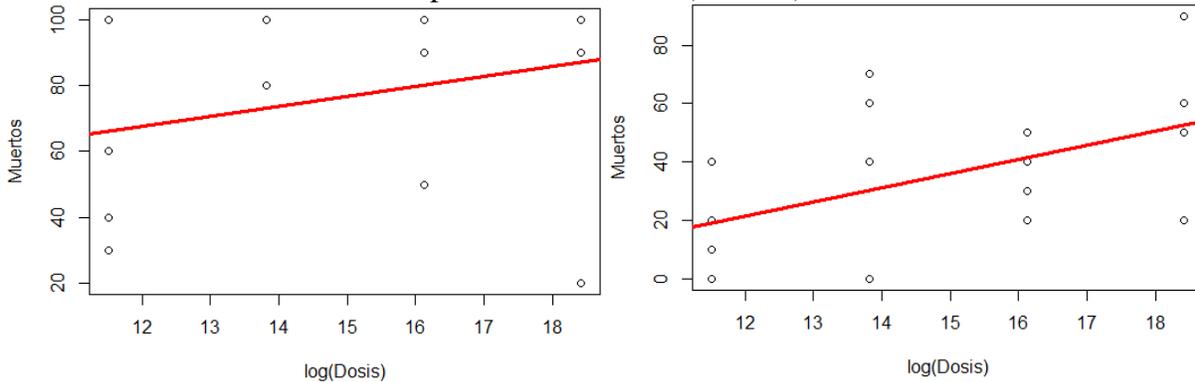
Residuos condicionales estandarizados de Pearson vrs valores predichos:



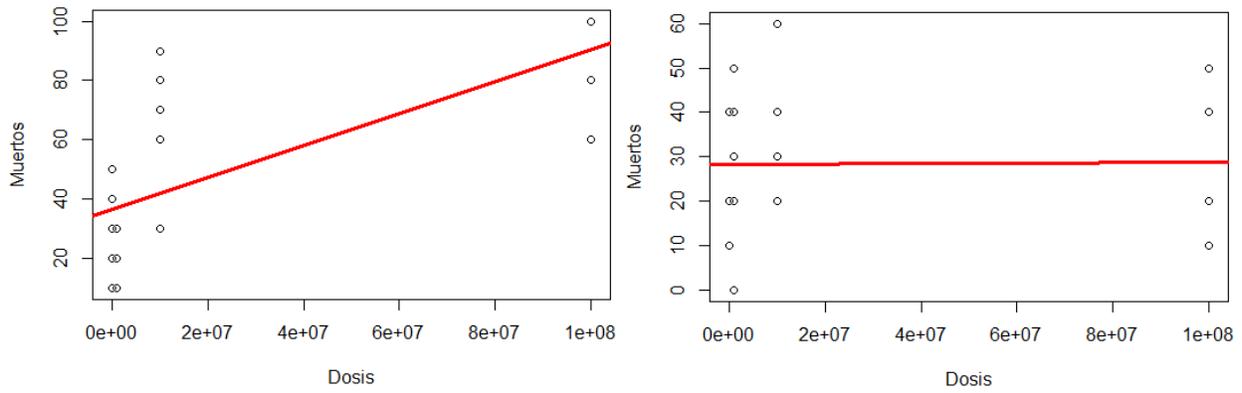
Anexo 5. Regresión lineal ajustada para la CL₅₀ del aislamiento BV-01 (izquierda) y para el producto comercial (derecha).



Anexo 6. Regresión lineal ajustada para la CL₅₀ del aislamiento BV-09 (izquierda) y para el producto comercial (derecha).



Anexo 7. Regresión lineal ajustada para la CL₅₀ del aislamiento BV-15 (izquierda) y para el producto comercial (derecha).



Anexo 8. Regresión lineal ajustada para la CL₅₀ del aislamiento BV-28 (izquierda) y para el producto comercial (derecha).

