

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**

Evaluación *in vitro* de la compatibilidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en presencia de seis fungicidas utilizados en cultivos hortícolas

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de tesis para optar por el grado de Licenciatura en
Ingeniería Agronómica

Estudiante

Bach. Santiago Ramírez Cabrera

Tutor

M. Sc. Allan González Herrera

Asesores

M. Sc. Alejandro Vargas Martínez

Lic. Juan Pablo Castillo Jiménez

Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2026

Resumen

Introducción. La producción hortícola en Costa Rica enfrenta una alta incidencia de plagas y enfermedades, lo que ha incrementado el uso de fungicidas sintéticos; paralelamente, los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* constituyen una alternativa sostenible dentro del manejo integrado de plagas. No obstante, su aplicación conjunta con fungicidas puede generar interacciones que afecten su desarrollo y eficacia biológica. **Objetivo.** Evaluar la compatibilidad de aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* con seis fungicidas de uso común en horticultura, mediante pruebas in vitro de viabilidad y desarrollo fúngico. **Materiales y métodos.** Se utilizaron los aislamientos BV-ECA-15 (*B. bassiana*) y MTR-ECA-01 (*M. anisopliae*), evaluando benomil, propamocarb, fosetil-Al, azoxystrobin, oxiclورو de cobre y propineb a dosis comerciales recomendadas, además de un tratamiento control sin fungicida. Se analizaron crecimiento micelial en medio PDA, germinación de conidios y capacidad de esporulación bajo condiciones controladas de laboratorio, con cinco repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey ($p < 0.05$) en RStudio. **Resultados.** La respuesta de los hongos varió según el ingrediente activo y la especie evaluada. El benomil presentó el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial, la germinación y la esporulación en ambos hongos, con los valores más bajos de producción de conidios en *B. bassiana* ($14,67 \times 10^6$ conidios) y *M. anisopliae* ($6,50 \times 10^6$ conidios), en comparación con sus respectivos controles ($76,67$ y $58,17 \times 10^6$ conidios). En *B. bassiana*, el fosetil-Al presentó una respuesta relativamente favorable, aunque la esporulación fue inferior a la del control ($61,83 \times 10^6$ conidios). Por otra parte, *M. anisopliae* evidenció una mayor tolerancia a propineb ($43,83 \times 10^6$ conidios), propamocarb ($41,67 \times 10^6$ conidios) y azoxystrobin ($39,00 \times 10^6$ conidios), cuyos resultados no difirieron estadísticamente del control ($58,17 \times 10^6$ conidios). La germinación de conidios se identificó como uno de los parámetros más sensibles para detectar efectos subletales. **Conclusión.** La compatibilidad entre fungicidas y hongos entomopatógenos depende tanto del modo de acción del ingrediente activo como de la especie evaluada. La evaluación in vitro permite identificar diferencias especie-específicas relevantes para la selección de insumos compatibles y el fortalecimiento de estrategias de manejo agroecológico orientadas hacia una agricultura más sostenible.

Palabras clave: Control biológico; hongos entomopatógenos; compatibilidad; fungicidas; Brassicaceae; manejo integrado de plagas.

Abstract

Introduction. Horticultural production in Costa Rica faces a high incidence of pests and diseases, which has increased the use of synthetic fungicides. At the same time, entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* represent a sustainable alternative within integrated pest management programs. However, their combined use with fungicides may generate interactions that affect their development and biological performance. **Objective.** To evaluate the compatibility of *M. anisopliae* and *B. bassiana* isolates with six fungicides commonly used in horticulture through in vitro assays of fungal viability and development. **Materials and methods.** The isolates BV-ECA-15 (*B. bassiana*) and MTR-ECA-01 (*M. anisopliae*) were tested against benomyl, propamocarb, fosetyl-Al, azoxystrobin, copper oxychloride, and propineb at recommended commercial doses, including a fungicide-free control. Mycelial growth on PDA medium, conidial germination, and sporulation capacity were evaluated under controlled laboratory conditions with five replicates per treatment. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$) in RStudio. **Results.** Fungal response varied according to the active ingredient and the species evaluated. Benomyl had the greatest inhibitory effect on mycelial growth, germination, and sporulation in both fungi, with the lowest conidial production values in *B. bassiana* (14.67×10^6 conidia) and *M. anisopliae* (6.50×10^6 conidia), compared with their respective controls (76.67 and 58.17×10^6 conidia). In *B. bassiana*, fosetyl-Al showed a relatively favorable response, although sporulation was lower than that of the control (61.83×10^6 conidia). In contrast, *M. anisopliae* showed greater tolerance to propineb (43.83×10^6 conidia), propamocarb (41.67×10^6 conidia), and azoxystrobin (39.00×10^6 conidia), with values that did not differ statistically from the control (58.17×10^6 conidia). Conidial germination was identified as one of the most sensitive parameters for detecting sublethal effects. **Conclusion.** Compatibility between fungicides and entomopathogenic fungi depends on both the mode of action of the active ingredient and the fungal species evaluated. In vitro assessment provides relevant information for selecting compatible inputs and strengthening agroecological pest management strategies aimed at more sustainable agricultural systems.

Keywords: Biological control; entomopathogenic fungi; compatibility; fungicides; Brassicaceae; integrated pest management.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	2
Abstract	4
1. Introducción	12
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo general.....	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Marco teórico	15
3.1.1. Contexto productivo de las hortalizas y su manejo fitosanitario	15
3.1.2. Control biológico	15
3.1.3. Generalidades de los hongos entomopatógenos.....	16
3.1.4. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos.....	16
3.1.5. Biología de <i>B. bassiana</i>	17
3.1.6. Biología de <i>M. anisopliae</i>	17
3.1.7. Selección de aislamientos.....	17
3.1.8. Método de cultivo de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	17
3.1.9. Manejo de calidad.....	18
3.2. Fungicidas en el cultivo de hortalizas	18
3.2.1. Definición y clasificación de fungicidas.....	18
3.2.2. Ingredientes activos utilizados con mayor frecuencia	19
4. Metodología	21
4.1. Materiales.....	21
4.1.2. Hongos entomopatógenos.....	21
4.1.3. Fungicidas.....	21
4.2. Procedimientos.....	22
4.2.1. Reactivación de los aislamientos de hongos.....	22
4.2.2. Preparación de los aislamientos para los ensayos.....	22
4.2.3. Determinación del impacto de dosis recomendadas de fungicidas sobre el crecimiento micelial de colonias de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	23
4.2.4. Efectos de los fungicidas recomendados sobre la viabilidad y la germinación de conidios.....	25
4.2.5. Efecto de la dosis recomendada sobre la capacidad de esporulación	26
5. Resultados	26

5.1	Determinación del impacto de dosis recomendadas de fungicidas sobre el crecimiento micelial de colonias de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	26
5.2	Efectos de los fungicidas recomendados sobre la viabilidad y la germinación de conidios	28
5.3	Efecto de la dosis recomendada sobre la capacidad de esporulación	30
6	Discusión.....	32
6.1	Determinación del impacto de dosis recomendadas de fungicidas sobre el crecimiento micelial de colonias de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	32
6.2	Efectos de los fungicidas recomendados sobre la viabilidad y la germinación de conidios	34
6.3	Efecto de la dosis recomendada sobre la capacidad de esporulación	34
7	Conclusiones	38
8	Recomendaciones	40
9	Referencias bibliográficas	41
10	Anexos.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingredientes activos para los ensayos de compatibilidad y su dosis recomendada por litro de agua.
.....22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Montaje del bioensayo para evaluar el efecto de fungicidas sobre el crecimiento micelial de <i>B. bassiana</i> en medio PDA e ingrediente activo.....	24
Figura 2. Montaje del bioensayo para evaluar el efecto de fungicidas sobre el crecimiento micelial de <i>M. anisopliae</i> en medio PDA e ingrediente activo.	24
Figura 3. Crecimiento micelial (mm) de <i>B. bassiana</i> en presencia de diferentes fungicidas a la dosis comercial recomendada, evaluado in vitro en condiciones de laboratorio a los 0, 2, 4, 7 y 9 días después de su inoculación.....	27
Figura 4. Crecimiento micelial de <i>M. anisopliae</i> en presencia de diferentes fungicidas a la dosis comercial recomendada, evaluado in vitro en condiciones de laboratorio a los 0, 2, 4, 7 y 9 días después de su inoculación.	28
Figura 5. Germinación de conidios de <i>B. bassiana</i> en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluada a 24, 48 y 72 horas después de la incubación en condiciones de laboratorio.....	29
Figura 6. Germinación de conidios de <i>M. anisopliae</i> en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluada a 24, 48 y 72 horas después de la incubación en condiciones de laboratorio.	30
Figura 7. Producción de esporas de <i>B. bassiana</i> en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluado 7 días después de su inoculación en condiciones de laboratorio.....	30
Figura 8. Producción de esporas de <i>M. anisopliae</i> en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluado 7 días después de su inoculación en condiciones de laboratorio.....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Germinación de conidios de <i>M. anisopliae</i> en presencia de oxiclورو de cobre a dosis comercial recomendada, evaluada a las 24 horas.....	49
Anexo 2. Establecimiento del bioensayo para el conteo de germinación de esporas de <i>B. bassiana</i> en presencia de diferentes fungicidas a dosis comercial recomendada.....	50
Anexo 3. Procedimiento de medición del micelio de <i>B. bassiana</i> en presencia de Fosetyl Al a las 72 horas después de incubado.....	51

DEDICATORIA

Primero a Dios, por permitirme llegar hasta aquí y cumplir su voluntad conmigo.

A mis padres, mis hermanas y mis abuelos por todo el apoyo en este proceso, sin ellos no hubiera sido posible, los amo.

A mi otra madre y abuela Virginia González por sus oraciones y buenos deseos desde que inicie esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y profesor el M. Sc. Allan González Herrera, por darme las oportunidades y la guía para llevar con éxito esta etapa de formación. Saludos especiales ingeniero.

A mi asesor y colega M. Sc. Alejandro Vargas Martínez, por darme el apoyo necesario y confianza durante mi proceso de formación. Su motivación fue clave para que me interesara y me adentrara en el análisis de datos.

A mi asesor el Lic. Juan Pablo Castillo Jiménez por toda su orientación, acompañamiento y conocimiento para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

A mis compañeros de universidad desde el día uno, Cristhian Araya, Jimmy Fonseca, Tomás Guzman, Luis Arturo Arrieta y Marcos Rodríguez, por caminar conmigo durante todo este proceso. Los amo mis hermanos.

A mis amigos y hermanos, Ryan Arguedas, Alexandro Guido y Giovanny Diaz por estar presentes y completar mi vida más allá de lo académico. Los amo viejitos.

A Mijaíl y Yasser Diaz, mis hermanos en Cristo. Gran parte de mis éxitos es gracias a ustedes, los amo.

A mis padres Angela y Alex, y a mis hermanas Laura y Sara, fueron un pilar fundamental en esta etapa, los amo.

A la educación pública, por nutrir no solo mi conocimiento, sino también mis valores, criterio y compromiso social. Gracias por abrirme las puertas a una educación de calidad y por demostrar que lo público es una fuerza transformadora que construye oportunidades y país.

1. Introducción

La producción de hortalizas en Costa Rica es un componente vital de su economía agrícola y desempeña un papel significativo en el abastecimiento de alimentos tanto para consumo interno como para exportación (Villalobos-Monge & Sánchez-Chacón, 2013). Esta actividad se ha desarrollado principalmente en la región del Valle Central, la cual es una zona que se presenta características ambientales, climáticas y edafológicas aptas para esta clase de cultivos (Gusman et al., 2023). En Costa Rica, la mayoría de los cultivos hortícolas se siembran continuamente, lo que, junto a la variabilidad climática típica del trópico, contribuye con una alta incidencia de plagas y enfermedades (Muniappan & Heinrichs, 2016; Ramírez Vargas & Nienhuis, 2012).

Este escenario productivo implica que los agricultores recurran con frecuencia a programas intensivos de manejo fitosanitario para proteger el rendimiento y la calidad comercial de las hortalizas (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2011; Pimentel, 2005). No obstante, el uso continuo de plaguicidas puede generar efectos a largo plazo como la aparición de resistencia, reducción de organismos benéficos y alteraciones en la biodiversidad del agroecosistema, lo que plantea la necesidad de estrategias de manejo más equilibradas y sostenibles (Aktar et al., 2009).

El Control Biológico (CB) de plagas ha surgido como una alternativa sostenible y responsable con el medio ambiente para manejar plagas insectiles, sustituyendo los pesticidas químicos sintéticos (Litwin et al., 2020). En este contexto, los hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, han demostrado ser eficaces agentes de manejo contra una variedad importante de insectos plaga en cultivos de hortícolas (Vásquez & Pérez, 2017). Sin embargo, su aplicación conjunta con fungicidas utilizados comúnmente en la horticultura plantea interrogantes sobre la posible interacción negativa entre estos agentes biológicos y químicos (Johnson et al., 2020).

Hay ocasiones donde la aplicación de hongos entomopatógenos es anterior o posterior a la aplicación de los fungicidas frecuentemente utilizados (Yáñez & France, 2010). Por consiguiente, el uso simultáneo de hongos entomopatógenos y fungicidas en cultivos de hortalizas expone el problema de la posible interacción antagónica entre estos agentes, comprometiendo la eficacia de los controladores biológicos y reducción de la biodiversidad del suelo (Saleem Akbar, 2012). Por otro lado, el resultado de estas prácticas agrícolas podría generar consecuencias económicas significativas para los agricultores y la industria agrícola en general (Souza et al., 2019).

Hasta el momento, se ha investigado ampliamente la eficacia individual de *B. bassiana* y *M. anisopliae* como agentes de control biológico de plagas en diferentes cultivos agrícolas (Viera et al., 2020). Sin embargo, la mayoría de los estudios han abordado estos hongos entomopatógenos de manera aislada, sin considerar su interacción con fungicidas comúnmente utilizados en la agricultura (de Freitas et al., 2011). Además; la literatura científica proporciona una comprensión limitada, ya que los ingredientes activos y aislamientos evaluados varían según el interés de la investigación (Um et al., 2018).

Diversos estudios han evidenciado que la sensibilidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* frente a fungicidas varía según el ingrediente activo, la concentración empleada y el aislamiento evaluado, mostrando desde inhibición total hasta efectos moderados sobre el desarrollo fúngico (de Oliveira et al., 2003; Neves et al., 2001). Además, se ha documentado que algunos compuestos pueden reducir significativamente la germinación de conidios y la esporulación, afectando parámetros clave para la eficacia del biocontrol (Alves et al., 1998; Souza et al., 2019). Esta variabilidad refuerza la importancia de generar información específica para cultivos de *Brassicaceae*, donde la frecuencia de aplicación de fungicidas incrementa la probabilidad de interacción directa con estos agentes biológicos.

En este contexto, existe una necesidad para evaluar la compatibilidad de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en presencia de fungicidas utilizados en distintos cultivos (Gonçalves et al., 2019). Mediante los análisis de laboratorio que determinan la compatibilidad y viabilidad de los hongos entomopatógenos, se podría caracterizar la tolerancia de los aislamientos en presencia de diferentes dosis de fungicidas sintéticos. Además, la generación de esta información facilita la selección de ingredientes activos compatibles, contribuye a la toma de decisiones técnicas fundamentadas y fortalece la integración efectiva del control biológico dentro de esquemas de manejo fitosanitario más sostenibles.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar la compatibilidad de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* con los fungicidas de mayor uso en cultivos de Brassicaceae, a través de pruebas *in vitro* de viabilidad y desarrollo fúngico para evaluar su potencial como agentes de biocontrol.

2.2. Objetivos específicos

- Analizar el impacto de la dosis recomendada de fungicidas (uso comercial) sobre el crecimiento micelial de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio.
- Determinar la viabilidad y germinación de conidios de los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en presencia de fungicidas.
- Determinar la afectación de la dosis recomendada de los fungicidas seleccionados sobre la capacidad de esporulación de los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

3. Marco teórico

3.1.1. Contexto productivo de las hortalizas y su manejo fitosanitario

Las hortalizas constituyen un grupo de cultivos fundamentales dentro de los sistemas agrícolas, debido a su alta contribución a la seguridad alimentaria, la nutrición humana y la economía agrícola. Estos cultivos son fuentes esenciales de vitaminas, minerales, fibra dietética y compuestos bioactivos que contribuyen a la prevención de enfermedades crónicas y al mantenimiento de una dieta equilibrada (FAO, 2011). Además, su producción se caracteriza por ciclos relativamente cortos y una alta eficiencia en el uso del espacio, lo que las convierte en una alternativa estratégica para mejorar la disponibilidad de alimentos frescos, especialmente en países en desarrollo (Silva Dias, 2011; Ahmed et al., 2024).

Desde el punto de vista productivo, las hortalizas representan sistemas agrícolas intensivos que demandan un manejo técnico especializado debido a su alta susceptibilidad a plagas y enfermedades. Su cultivo se realiza en una amplia diversidad de condiciones agroecológicas y comprende diferentes órganos vegetales como hojas, raíces, tallos y flores, lo que incrementa la complejidad de su manejo agronómico (Márquez-Cardozo, 2025; FAO, 2023). Asimismo, la creciente demanda por productos frescos, inocuos y de alta calidad ha impulsado la adopción de prácticas agrícolas más sostenibles y eficientes, incluyendo el uso de tecnologías y estrategias como el manejo agroecológico de plagas (Muñoz-Arias & Rojas, 2025).

3.1.2. Control biológico

El control biológico es una estrategia de manejo que utiliza organismos vivos para reducir las poblaciones de plagas, contribuyendo a sistemas agrícolas más sostenibles y con menor impacto ambiental. Este enfoque forma parte de las prácticas de manejo agroecológico de plagas, donde se busca combinar diferentes métodos de control de manera compatible y eficiente (Eilenberg et al., 2001). Dentro de estas alternativas, los microorganismos entomopatógenos han cobrado relevancia por su especificidad y capacidad de establecerse en el agroecosistema (Vega et al., 2012).

3.1.3. Generalidades de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) son un grupo filogenéticamente diverso, heterótrofos, unicelulares o pluricelulares que se pueden reproducir a través de esporas sexuales, asexuales o ambas. La mayoría de las especies pertenecen al grupo Ascomycota y Zygomycota (Mora et al., 2018). Se pueden encontrar principalmente en el suelo, vegetación o cadáveres de insectos que fueron infectados (Quesada-Moraga et al., 2024). Actualmente, se conocen más de 1000 especies incluidas en 100 géneros de hongos (Souza et al., 2019).

Estos microorganismos son utilizados como bioinsecticidas por su habilidad de infectar y reducir la población de los insectos clasificados como plagas (Correal et al., 2018). Entre los micoinsecticidas comúnmente más aplicados, se encuentra *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* los cuales se caracterizan por su alta patogenicidad para varios insectos de diferentes ordenes (Kidanu & Hagos, 2020). Ambos, *M. anisopliae* y *B. bassiana* no solo manejan naturalmente poblaciones de insectos, sino que también forman relaciones con las plantas. A estos se le conocen como microorganismos endófitos de las raíces, tallos y hojas (Jaber & Enkerli, 2017).

3.1.4. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos penetran directamente a través de la cutícula, utilizando procesos tanto físicos como enzimáticos. Los mecanismos de acción de estos hongos incluyen el asentamiento de esporas en la cutícula del insecto, la germinación de las esporas y su entrada a través de la formación de un apresorio (Afifah et al., 2022). Una vez dentro, las hifas se desarrollan en la hipodermis, multiplicándose en el cuerpo y las células sanguíneas del insecto, lo que causa su muerte (Mora et al., 2018). Este proceso puede ser seguido por períodos sexuales y asexuales, con esporas asexuales que se propagan mediante el desarrollo saprofito en los individuos muertos (Wang et al., 2021).

Así mismo, un factor importante en los mecanismos de estos microorganismos es la secreción de toxinas. Con respecto a *M. anisopliae* y *B. bassiana*, ambas secretan toxinas en el ambiente (Afifah et al., 2022). Estas sustancias pueden causar la muerte de los insectos incluso antes de que propaguen y formen esporas en el tejido del hongo. En la mayoría de los casos, la muerte del insecto ocurre debido al efecto tóxico de la digestión de los propágulos fúngicos más que por micosis (Um et al., 2018).

3.1.5. Biología de *B. bassiana*

Este hongo produce conidios aéreos y blastosporas unicelulares por germinación cuando entran en contacto con la capa superior de la piel de los insectos y penetran directamente en los cuerpos de sus hospedadores desde la piel superior (Kim et al., 2010). El hongo se multiplica rápidamente en el cuerpo produciendo toxinas. Por lo tanto, a diferencia de los patógenos bacterianos y virales de los insectos, solo un contacto es suficiente para la infección de *B. bassiana* (Afifah et al., 2022). Cuando el hongo mata a su huésped, se extiende hacia afuera cubriendo al insecto con una capa blanca de moho. Este moho produce millones de nuevas esporas infecciosas que se liberan en el ambiente (Mascarin & Jaronski, 2016).

3.1.6. Biología de *M. anisopliae*

El hongo *M. anisopliae* se multiplican en forma de blastosporas o estructuras de hifas en su hospedador y se dispersan por la cavidad corporal con el movimiento del fluido sanguíneo en el cuerpo del insecto (Afifah et al., 2022). En *M. anisopliae*, las destruxinas, especialmente las destruxinas A y E que tienen mayor efecto insecticida, se sintetizan para reprimir la respuesta inmune celular y humoral en el hospedador. La enfermedad causada por el hongo se conoce como enfermedad muscardina verde debido al color verde de sus esporas (Aw & Hue, 2017).

3.1.7. Selección de aislamientos

La selección de aislamientos es una etapa esencial para obtener aislamientos virulentos de alta productividad en medio de cultivo y proceder con la producción a escala comercial. Las técnicas de biología molecular ayudan en la selección de aislamientos fúngicos y acortan el tiempo necesario para dicha selección; por lo tanto, determinan los grupos de aislamientos y virulencia que son similares a los de otras especies de insectos (Almeida, 2020). Además, vale la pena desmitificar la idea de recolectar aislamientos de la misma región y parcela, ya que en la mayoría de los casos estos aislamientos son endémicos y de menor virulencia debido a que se generan naturalmente (Souza et al., 2019).

3.1.8. Método de cultivo de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Se inicia con la obtención de un aislado puro del hongo, que puede provenir de muestras de suelo, insectos infectados u otras fuentes. Una vez obtenido el aislamiento, se realiza la transferencia a un medio de cultivo adecuado, como papa-dextrosa-agar (PDA), utilizando técnicas asépticas (Souza

et al., 2019). Después de la incubación a una temperatura óptima, se observa el crecimiento del hongo y se realizan subcultivos para asegurar la pureza de la cepa. Luego, las esporas se recolectan de cultivos puros y se pueden utilizar para aplicaciones de control biológico, ya sea mediante fermentación líquida para la producción a gran escala o formulación en polvo para su aplicación directa en campo (Kidanu & Hagos, 2020).

3.1.9. Manejo de calidad

El manejo de la calidad es crucial desde la selección de aislamientos hasta la caracterización molecular y la evaluación de parámetros como la producción de conidios y enzimas. Dividir el hongo en múltiples muestras después de esta transferencia facilita la producción de bioinsecticidas y minimiza el uso de medio artificial (Yáñez & France, 2010). Es crucial almacenar el hongo bajo condiciones óptimas, ya sea mediante enfriamiento en medio artificial o transferencia al hospedero natural, para mantener su viabilidad y calidad (Souza et al., 2019).

La temperatura óptima de almacenamiento para los aislamientos fúngicos, como *B. bassiana* o *M. anisopliae*, suele ser alrededor de 4°C en un ambiente refrigerado. Esto ayuda a mantener la viabilidad y la estabilidad de los aislamientos durante períodos prolongados (Saleem Akbar, 2012). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la temperatura exacta puede variar dependiendo de la especie fúngica y de las condiciones específicas de almacenamiento recomendadas por el proveedor o la literatura científica (Quesada-Moraga et al., 2024).

3.2. Fungicidas en el cultivo de hortalizas

3.2.1. Definición y clasificación de fungicidas

Los fungicidas son agentes de origen natural o sintéticos que actúan como protectores de la planta ante la invasión de hongos y erradican la infección fúngica (Oliver & Hewitt, 2014). Sin embargo, no solo tiene la capacidad de manejar, sino que también incluye los compuestos que pueden otorgar resistencia a la planta o convertir el entorno en menos habitable para el microorganismo (Baibakova et al., 2019).

Existe un sistema de clasificación de los fungicidas según su mecanismo de acción, se clasifican en protectantes y sistémicos. Los protectantes son efectivos ante un amplio rango de hongos y protegen a la planta de una infección en la superficie de la hoja o tallo; además, requieren de constante aplicación durante el crecimiento de la planta para cubrir toda la superficie vegetal (Baibakova et al.,

2019). Con respecto a los fungicidas sistémicos, estos son absorbidos por la planta y se transportan a tejidos donde pueden ser tóxicos para el hongo; Sin embargo, pueden generar resistencia y ser menos eficaces (Hahn, 2014).

3.2.2. Ingredientes activos utilizados con mayor frecuencia

En Costa Rica los plaguicidas más utilizados en el sector agrícola corresponden a los fungicidas. Para el año 2014 los ingredientes activos de mayor aplicación eran dimetomorf, propineb, procloraz, metil-tiofanato, metalaxil, azoxiestrobina, mancoceb, clorotalonil, carbendazima, benomil y boscalid (Rodríguez, 2015). No obstante, fungicidas que contengan como ingrediente activo el clorotalonil han sido prohibidos, ya que genera afectaciones al ambiente y salud humana (Ministerio de Salud, 2023).

3.2.3. Mecanismos de acción de los fungicidas

El benomil es un fungicida sistémico perteneciente al grupo de los benzimidazoles, cuyo modo de acción se basa en la inhibición de la división celular de los hongos. Este compuesto actúa interfiriendo con la polimerización de la β -tubulina, proteína esencial para la formación de los microtúbulos durante la mitosis, lo que provoca la detención del crecimiento micelial y la germinación de esporas. Debido a este mecanismo altamente específico, los benzimidazoles presentan riesgo elevado de desarrollo de resistencia en poblaciones fúngicas sensibles (Kara, 2020).

El propamocarb y el fosetil-aluminio (fosetil-Al) son fungicidas sistémicos cuyo modo de acción está relacionado con la alteración de procesos fisiológicos esenciales del patógeno, aunque mediante mecanismos distintos. Propamocarb interfiere principalmente en la síntesis de fosfolípidos y ácidos grasos, afectando la integridad y funcionalidad de la membrana celular fúngica, lo que limita el crecimiento del micelio y la esporulación. Por su parte, fosetil-Al presenta un mecanismo de acción complejo que incluye la inhibición directa del desarrollo del micelio y de la germinación de esporas, así como la inducción de respuestas de defensa en la planta hospedante, lo que contribuye a reducir el desarrollo de enfermedades, especialmente causadas por oomicetos (PPDB–University of Hertfordshire; FRAC, 2024).

Por su parte, azoxystrobin es un fungicida sistémico del grupo de las estrobilurinas que actúa inhibiendo la respiración mitocondrial de los hongos. Su mecanismo consiste en bloquear la transferencia de electrones en el sitio Q_o del complejo citocromo bc₁, lo que impide la síntesis de

ATP necesaria para la germinación de esporas y el crecimiento micelial. Este modo de acción es altamente específico y eficaz en fases tempranas del desarrollo fúngico, aunque también presenta riesgo de resistencia debido a su sitio de acción único (PPDB–University of Hertfordshire; FRAC, 2024).

El oxiclорuro de cobre y el propineb corresponden a fungicidas de contacto que actúan de manera preventiva y se caracterizan por presentar un modo de acción multisitio. En el caso del oxiclорuro de cobre, su efecto fungicida se produce por la liberación de iones Cu^{2+} sobre la superficie vegetal, los cuales interactúan con distintas estructuras celulares del hongo, causando la desnaturalización de proteínas y enzimas, la alteración de la respiración celular y el deterioro de la integridad de las membranas. Por su parte, el propineb, perteneciente al grupo de los ditiocarbamatos, ejerce su acción al interferir simultáneamente en diversos procesos metabólicos del patógeno, lo que limita la germinación de esporas y el establecimiento inicial del micelio (FRAC, 2024). La participación de múltiples sitios de acción explica el amplio espectro de actividad de ambos fungicidas y reduce la probabilidad de que los hongos desarrollen mecanismos de adaptación específicos frente a su uso (del Nozal Nalda, 2000).

3.2.4. Compatibilidad entre fungicidas y hongos entomopatógenos

La eficiencia de los hongos entomopatógenos puede verse afectada por varios factores bióticos y abióticos: luz UV, temperatura, comportamiento del huésped, vigor del entomopatógeno y agroquímicos. Productos para proteger la planta de enfermedades fúngicas puede disminuir el crecimiento vegetativo, problemas de germinación y llevar a la muerte a los microorganismos benéficos (Saleem Akbar, 2012). En adición, las moléculas de distintos ingredientes activos pueden permanecer durante periodos extensos en el ambiente donde residen los hongos entomopatógenos (HE) o bien donde estos se utilizan para erradicar plagas insectiles (Van-Zwieten et al., 2004).

Existen investigaciones que afirman la tolerancia de HE ante diferentes dosis de fungicidas. Ingredientes activos tales como benomil, dimethomorph-mancozeb, chlorotalonil, propineb, mancozeb, y mancozeb-cymoxanil afectan significativamente la germinación de *B. bassiana*; Mientras, fosetil-Al, propamocarb y oxiclорuro de cobre no reportan efectos inhibitorios (Tanzini et al., 2002). Por otro lado, se han reportado aislamientos de *M. anisopliae* compatibles con dosis bajas de benomyl y fenhexamid. También, se determinó que azoxystrobin y fludioxonil son incompatibles

con cepas de *M. anisopliae* y deben de evitarse en el manejo agroecológico de plagas (Yáñez & France, 2010).

4. Metodología

4.1. Materiales

4.1.1. Ubicación del estudio

El estudio se realizó en la provincia de Heredia, Costa Rica, en la Universidad Nacional (UNA), específicamente en el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela de Ciencias Agrarias. Los ensayos se desarrollaron bajo condiciones controladas de laboratorio.

4.1.2. Hongos entomopatógenos

Los aislamientos de hongos entomopatógenos fueron suministrados por el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) de la Universidad Nacional, ubicada en Heredia, Costa Rica. Ambos aislamientos se encontraban previamente conservados en la micoteca del laboratorio y habían sido purificados mediante técnica monospórica. El aislamiento MTR-ECA-01 (*M. anisopliae*) fue obtenido a partir de un coleóptero recolectado en la zona de San José de la Montaña, Heredia, mientras que el aislamiento BV-ECA-15 (*B. bassiana*) fue donado por el Centro de Investigaciones en Café (CICAFE) y originalmente aislado de muestras de suelo con actividad agrícola.

4.1.3. Fungicidas

Las pruebas de compatibilidad fueron con fungicidas sistémicos y preventivos, seleccionados con base en su aprobación y uso en cultivos hortícolas de Costa Rica. En la tabla 1 se observan los ingredientes activos de los fungicidas sistémicos utilizados: benomil (metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato), propamocarb (isopropil N-(3-dimetilaminopropil) carbamato de N-metil), fosetil-Al (fosfito de aluminio). Los fungicidas preventivos utilizados fueron: azoxystrobin (metil (E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi) pirimidin-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato), oxiclورو de cobre (triclورو hidroxilado de cobre) y propineb (polímero de zinc y N-[1-(etilcarbamoil)metil]ditiocarbonato).

Tabla 1

Ingredientes activos para los ensayos de compatibilidad y su dosis comerciales recomendada por litro de agua.

Ingrediente activo	Grupo químico	Concentración mínima recomendada por litro de agua
Benomil	Benzimidazoles	1 g
Propamocarb	Carbamato	1.5 mL
Fosetil-Al	Fosfonato	1.87 g
Azoxystrobin	Estrobilurinas	0.75 mL
Oxicloruro de cobre	Inorganico: cúprico	3.75 g
Propineb	Ditiocarbamatos	7.5 g

4.2.Procedimientos

4.2.1. Reactivación de los aislamientos de hongos

Para reactivar los hongos conservados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en latencia, se realizó una suspensión de las esporas en una solución acuosa estéril con un agente humectante polisorbato 20 (Tween 20) para dispersarlas adecuadamente. La suspensión se homogenizó mediante agitación manual durante 1 min para asegurar una distribución uniforme de las esporas. A continuación, se inoculó la suspensión sobre el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en placas Petri estériles de 90 mm de diámetro. La suspensión se distribuyó de forma uniforme utilizando una espátula estéril. Las placas se incubaron a una temperatura de entre 25-28°C y una humedad relativa del 85-90% en la cámara bioclimática marca High Ten y modelo HC-S4, favoreciendo la germinación y el crecimiento de las esporas; el proceso tomó alrededor de cuatro días hasta observar el crecimiento activo y esporulación.

4.2.2. Preparación de los aislamientos para los ensayos

En platos Petri con los aislamientos de BV-ECA-15 y MTR-ECA-01, se realizó un rallado sobre otra placa Petri con PDA+Ac de manera tal que el hongo cubriera por completo la superficie del medio cuando completara el crecimiento a una temperatura de 26±11°C y 80±5 % de humedad

relativa para *B. bassiana*; y para *M. anisopliae* $27\pm 11^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 5\%$ de humedad relativa. Ambos aislamientos se incubaron por siete días. Estos cultivos fueron utilizados posteriormente para las pruebas de desarrollo micelial en presencia de fungicidas.

4.2.3. Determinación del impacto de dosis recomendadas de fungicidas sobre el crecimiento micelial de colonias de *M. anisopliae* y *B. bassiana*

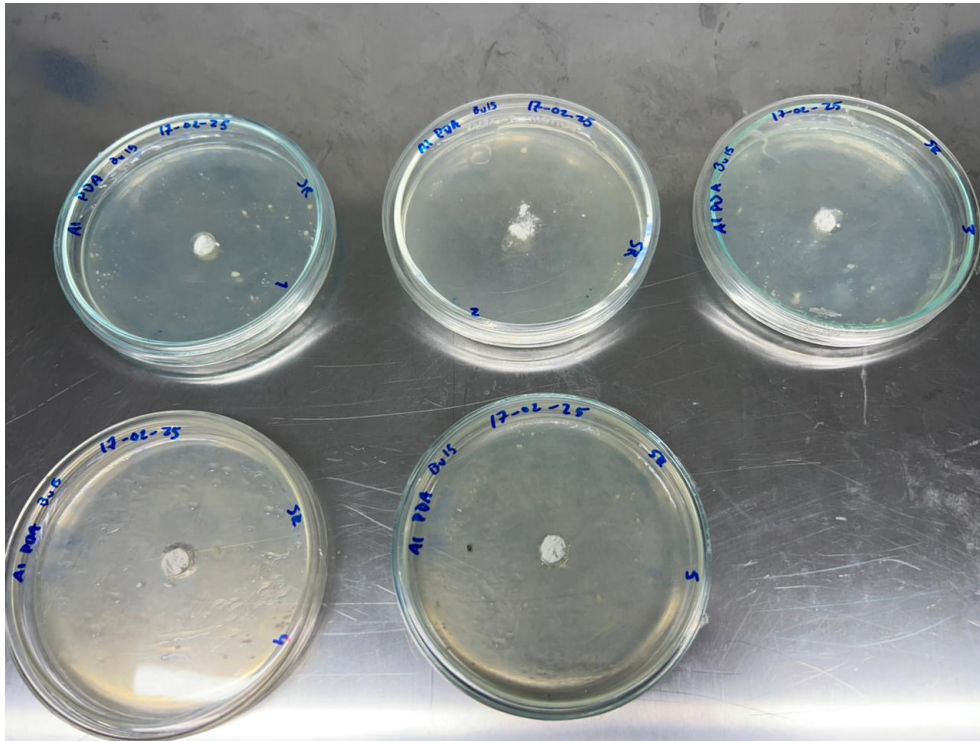
Se agregó papa-dextrosa-agar (PDA) (90 ml) en un matraz de Erlenmeyer y se mezcló con el fungicida seleccionado según la dosis respectiva estando el medio caliente, se agitó hasta disolver por completo el fungicida. Luego se colocaron 10 ml a cada placa Petri (80 mm de diámetro) esterilizado. Después de que el medio solidificó, se extrajo un círculo de 5 mm del centro del plato Petri con sacabocados previamente desinfectado. Luego, se tomaron círculos de 5 mm de diámetro de colonias ya establecidas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y se incubaron a $26\pm 11^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 5\%$ de humedad relativa para *M. anisopliae* y $27\pm 11^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 5\%$ de humedad relativa para *B. bassiana* en el plato Petri donde se mezcló el fungicida con PDA (Figura 1; Figura 2) (Saleem Akbar, 2012; Yáñez & France, 2010). Los ingredientes activos benomil y fosetil-Al se incorporaron directamente al medio PDA dentro del plato Petri.

Los platos Petri se incubaron a $27\pm 11^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 5\%$ de humedad relativa para *M. anisopliae* y $26\pm 11^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 5\%$ de humedad relativa para *B. bassiana*. El crecimiento de las colonias se empezó a medir dos días después de la incubación y durante diez días con la ayuda de un vernier. Los datos recolectados fueron comparados con el tratamiento control (el cual consistió en repetir el procedimiento antes mencionado, colocándolo los aislamientos en medio PDA sin fungicida) para comprobar la compatibilidad de los aislamientos con los fungicidas seleccionados para este estudio. En total fueron siete tratamientos, representando cada uno de los fungicidas seleccionados (incluyendo el control), y un mínimo de cinco repeticiones por tratamiento.

Para medir el crecimiento relativo de las colonias (CR) se tomó el área de crecimiento de las colonias con ingredientes activo y se dividió por el área de las colonias en PDA sin fungicida, el resultado se multiplicó por 100 (Jobin & Carisse, 2007; Köller & Wilcox, 2001; Yáñez & France, 2010). Los datos recolectados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias mediante la prueba Tukey ($P < 0.05$) con el programa estadístico Rstudio (Posit Team, 2023).

Figura 1

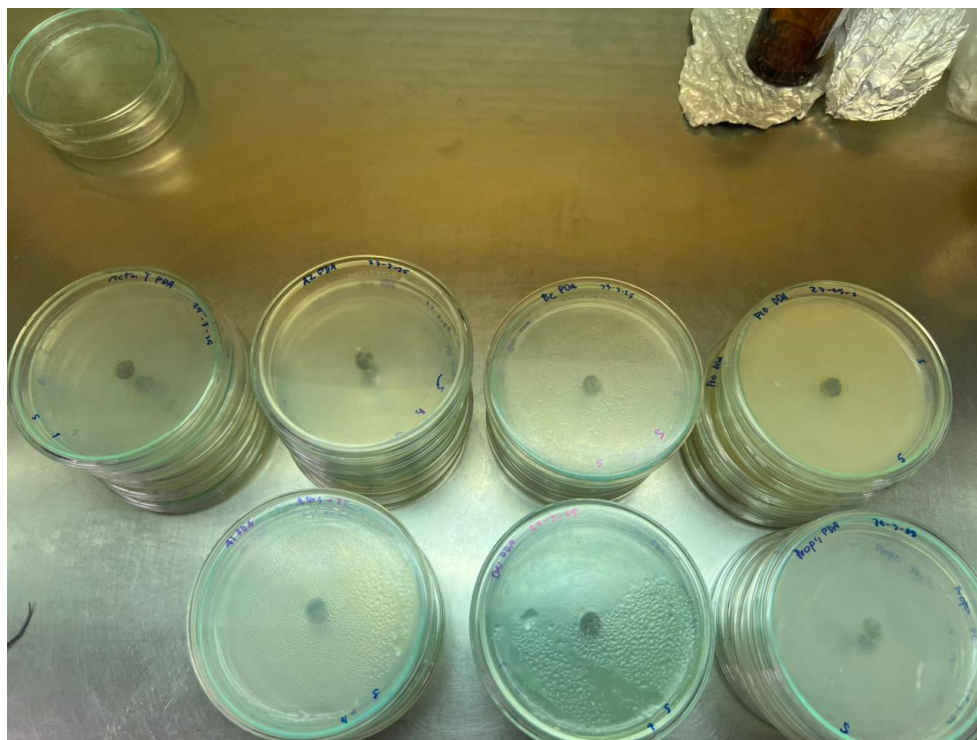
Montaje del bioensayo para evaluar el efecto de fungicidas sobre el crecimiento micelial de B. bassiana en medio PDA e ingrediente activo.



Fuente. Elaboración propia

Figura 2.

Montaje del bioensayo para evaluar el efecto de fungicidas sobre el crecimiento micelial de M. anisopliae en medio PDA e ingrediente activo.



Fuente. Elaboración propia

4.2.4. Efectos de los fungicidas recomendados sobre la viabilidad y la germinación de conidios

Para la evaluación de la germinación de los conidios se utilizó una suspensión en agua estéril de esporas de *B. bassiana* incubado a 26°C y *M. anisopliae* incubado a 27°C, cuya concentración se ajustó a 1×10^6 conidios mL⁻¹. A esta suspensión se le añadió el fungicida correspondiente a una concentración equivalente al 100 % de la dosis recomendada en campo, mientras que el tratamiento control consistió en una suspensión de conidios únicamente en agua estéril. Después de 24 h de incubación a 26°C y 27°C, se prepararon portaobjetos y se le añadió tres mililitros de medio agar-agua (AA), dentro de una placa Petri estéril, para luego colocar una gota de cada tratamiento, posteriormente después a las 24, 48 y 72 h, con ayuda del microscopio se procedió a seleccionar una parte del medio para realizar un conteo de conidios germinados y no germinados, para obtener un porcentaje de germinación de conidios, utilizando la siguiente fórmula: conidios germinados x total de conidios entre cien (Celar & Kos, 2016).

4.2.5. Efecto de la dosis recomendada sobre la capacidad de esporulación

Para contar las esporas de hongos cultivados en arroz se siguió el procedimiento de Lemus *et al.*, 2008, con modificaciones. Se prepararon tratamientos con la aplicación del fungicida a una concentración del 100 % de la dosis recomendada, el cual fue mezclado con el arroz esterilizado justo antes de la inoculación con el hongo (anexo 2). Se incluyó un tratamiento control sin fungicida. Tras un periodo de incubación adecuado para permitir la esporulación, se tomó una muestra de 10 g del hongo en arroz y se colocó en un Beaker con 90 mL de agua destilada y una gota de Tween 20, agitando con una espátula durante un minuto para liberar los conidios adheridos. Luego, se tomó 1 mL de esta suspensión y se mezcló en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada, alcanzando una dilución de 10^{-2} , y se agitó en un agitador tipo vórtex durante un minuto. El tubo con la dilución final se agitó nuevamente durante 30 s y se tomó una muestra de 0.01 mL con una micropipeta, depositándola cuidadosamente en la cámara de Neübauer sin formar burbujas. Se contaron las esporas en el cuadrante central y sus cuadrantes secundarios del retículo, repitiendo el conteo tres veces por muestra. Finalmente, la concentración de esporas se calculó multiplicando el promedio del número de esporas contadas por el inverso de la dilución y el factor de la cámara (10^4).

$$C = N * \text{Dilución empleada}^{-1} * \text{Factor de cámara}^{-1}$$

C= concentración de esporas

N= promedio del número de esporas

5. Resultados

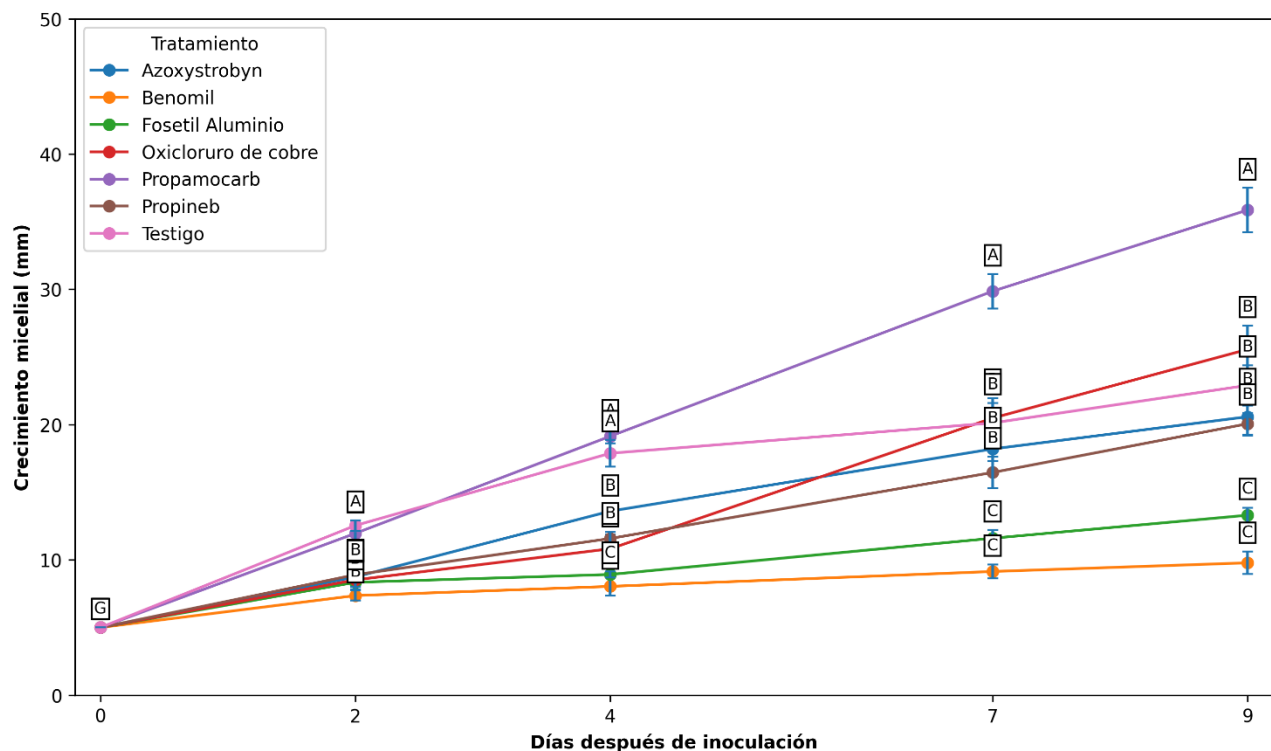
5.1 Determinación del impacto de dosis recomendadas de fungicidas sobre el crecimiento micelial de colonias de *M. anisopliae* y *B. bassiana*

El mayor crecimiento se observó en el tratamiento con propamocarb, que alcanzó un promedio de 35.86 mm al día 9 y se agrupó en la categoría estadística “A”. El testigo registró un crecimiento promedio de 22.90 mm, perteneciente al grupo “B”. Por otro lado, el menor crecimiento correspondió al tratamiento con Benomil, con un promedio de 9.78 mm y clasificado en el grupo “C”. Un comportamiento intermedio se presentó con oxicloruro de cobre, que alcanzó un promedio de 25.56 mm y se agrupó también en la categoría “B”. Letras distintas indican diferencias significativas entre

tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$), mientras que tratamientos con la misma letra no difieren estadísticamente. En la figura 3 se presenta el efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de *B. bassiana*, evidenciándose diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Figura 3

Crecimiento micelial (mm) de B. bassiana en presencia de diferentes fungicidas a la dosis comercial recomendada, evaluado in vitro en condiciones de laboratorio a los 0, 2, 4, 7 y 9 días después de su inoculación.



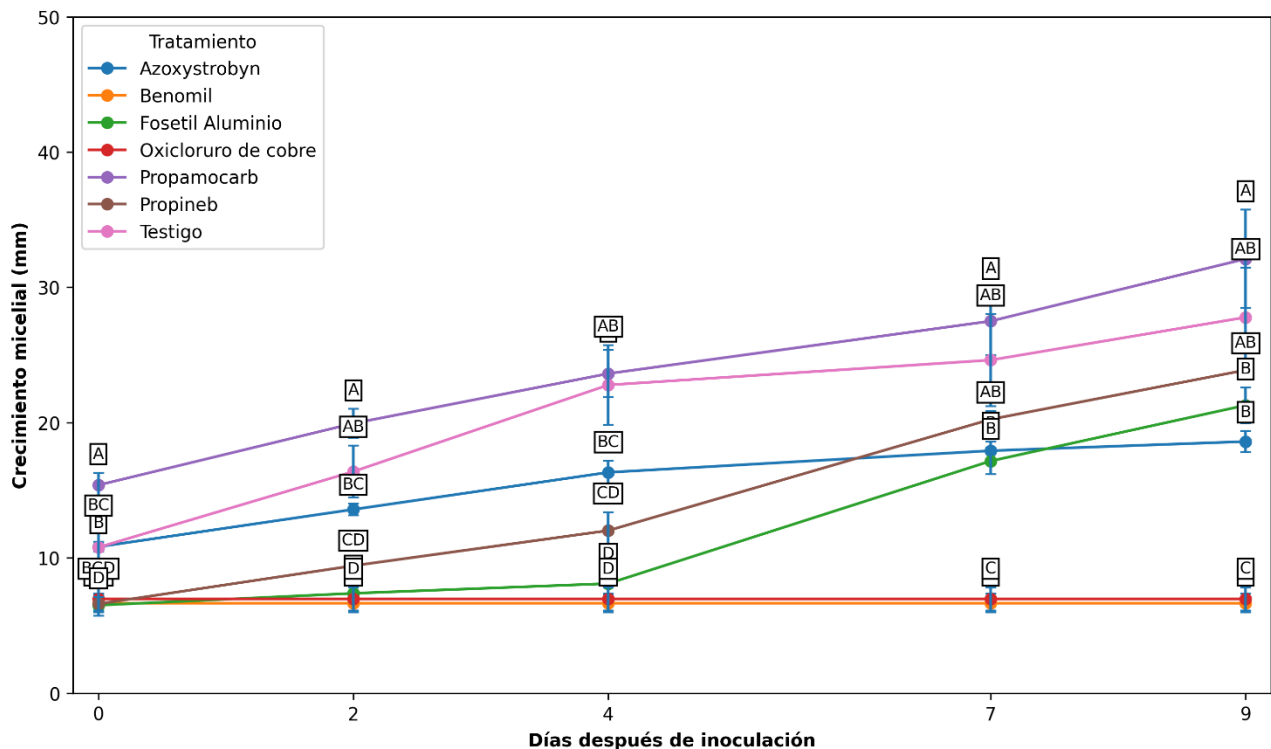
Nota. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$), mientras que tratamientos con la misma letra no difieren estadísticamente.

Al día 9, propamocarb presentó el mayor crecimiento micelial, alcanzando valores cercanos a 32 mm y ubicándose en el grupo estadístico “A”, mientras que el testigo mostró un comportamiento similar, agrupándose en “AB”. Un crecimiento intermedio se registró en Propineb, también clasificado dentro del grupo “AB”, lo que indica que su crecimiento no difirió significativamente del grupo de mayor desarrollo. En contraste, los menores valores de crecimiento correspondieron a Benomil y Oxicloruro de cobre, los cuales se mantuvieron en el grupo “C” durante la evaluación, evidenciando un efecto inhibitorio marcado sobre el crecimiento micelial de *M. anisopliae*. En la

figura 4 se muestra el crecimiento micelial de *M. anisopliae* en presencia de diferentes fungicidas, observándose diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) a lo largo del periodo de evaluación (anexo 3).

Figura 4

Crecimiento micelial de M. anisopliae en presencia de diferentes fungicidas a la dosis comercial recomendada, evaluado in vitro en condiciones de laboratorio a los 0, 2, 4, 7 y 9 días después de su inoculación.



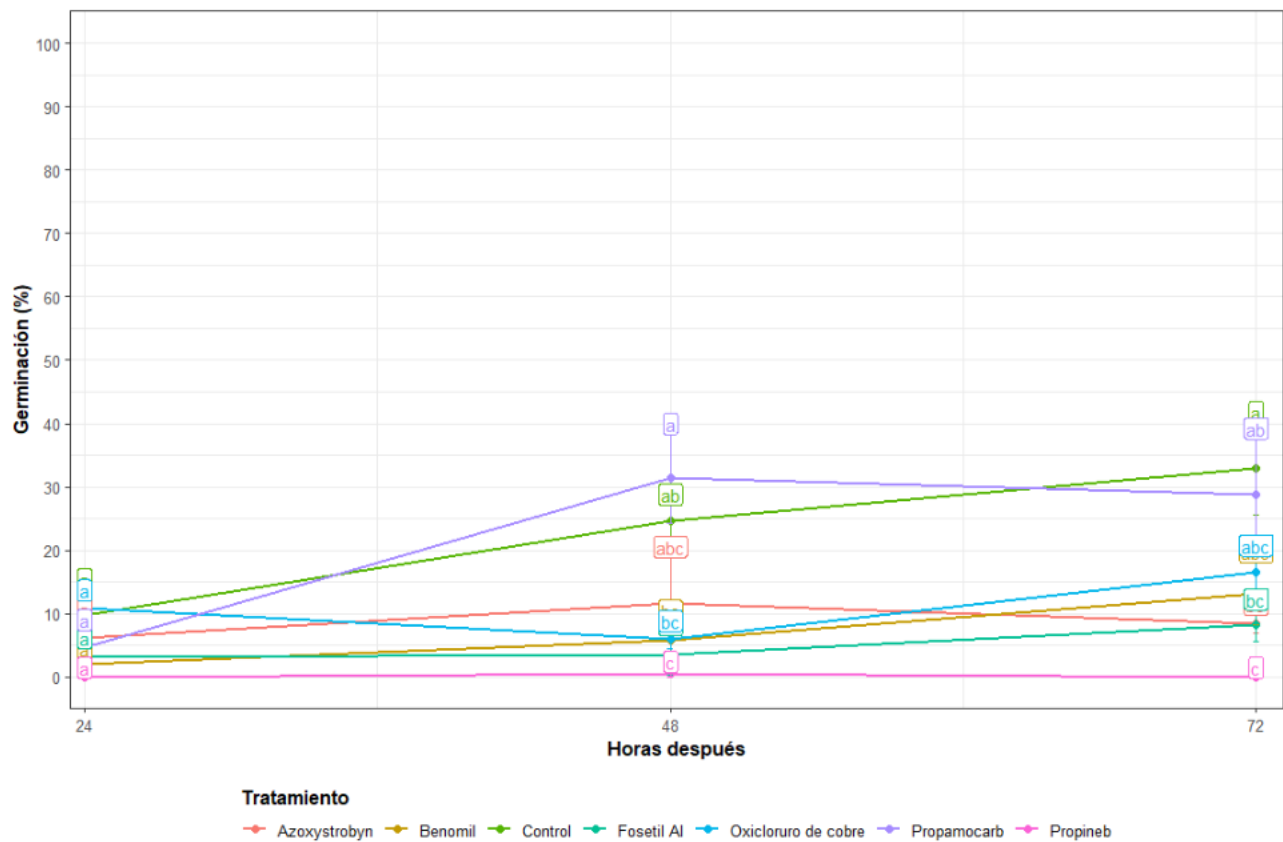
5.2 Efectos de los fungicidas recomendados sobre la viabilidad y la germinación de conidios

En la Figura 5 se muestra el efecto de los fungicidas sobre la germinación de conidios de *B. bassiana* a las 24, 48 y 72 horas después de su incubación. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). El mayor porcentaje de germinación se presentó en el tratamiento con fosetil Al, con un porcentaje de germinación de 36.7% a las 72 horas, ubicándose en el grupo estadístico “A”. El testigo mostró un comportamiento similar, alcanzando un 32.99 % a las 72 horas, sin diferencias significativas con fosetyl Al.

Por el contrario, los valores más bajos correspondieron a Propineb y Benomil, con promedios inferiores al 5% en todas las horas evaluadas, clasificándose en el grupo “C”. Un comportamiento intermedio se observó en oxiclورو de cobre (anexo 1) y propamocarb, que alcanzaron porcentajes de germinación entre 10% y 30%, agrupándose dentro de las categorías “AB” y “BC”.

Figura 5

Germinación de conidios de B. bassiana en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluada a 24, 48 y 72 horas después de la incubación en condiciones de laboratorio.



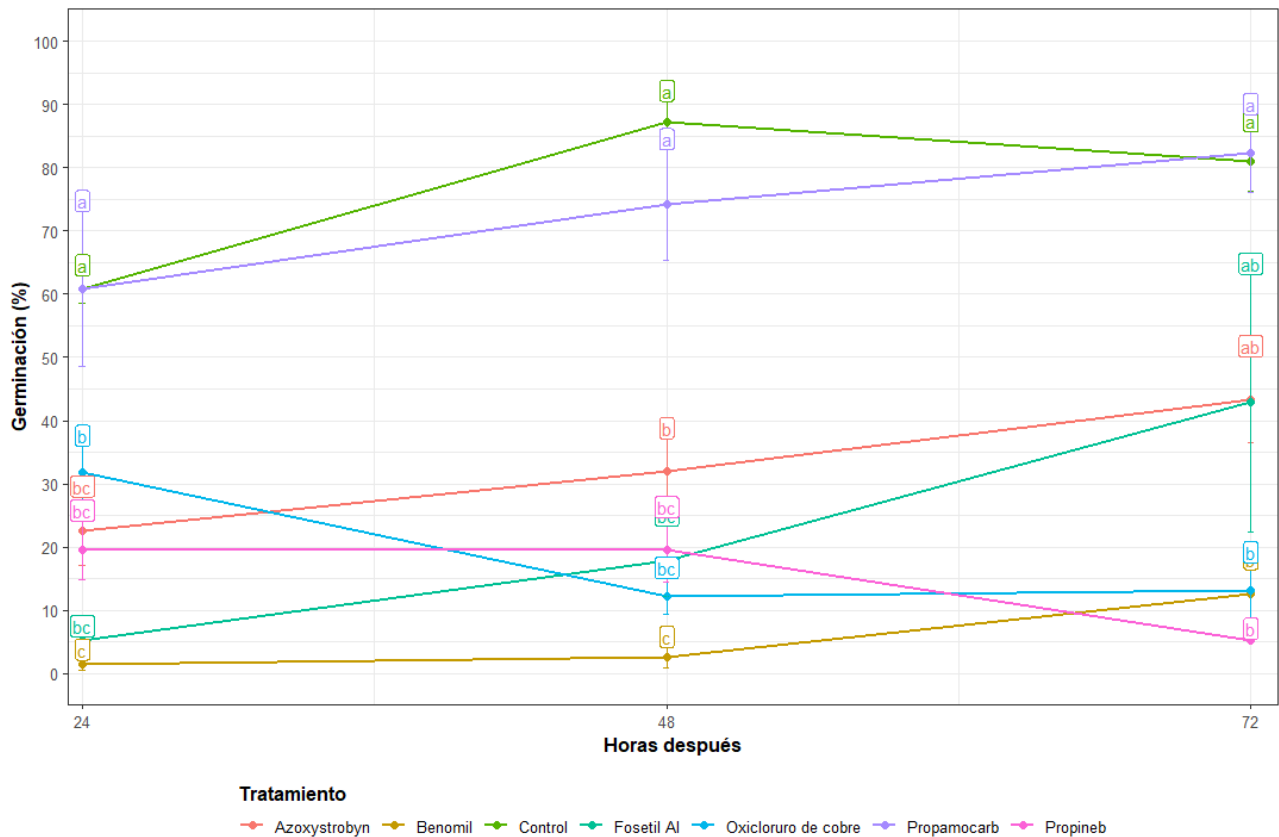
En la figura 6 se presenta la germinación de conidios de *M. anisopliae* en presencia de diferentes fungicidas a las 24, 48 y 72 h de incubación. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). A las 72 h, los mayores porcentajes de germinación se registraron en los tratamientos con propamocarb (82.4%) y el testigo (81%), ambos clasificados dentro del grupo estadístico “A”, lo que indica ausencia de diferencias significativas entre ellos.

El fungicida fosetil Al alcanzó un 43.4% de germinación, mientras que Azoxystrobyn presentó un 32%, ubicándose ambos dentro del grupo “AB”. En contraste, Oxiclورو de cobre, Propineb y

Benomil mostraron los valores más bajos, con promedios de 26.5%, 12.6% y 8.4%, respectivamente, agrupándose en la categoría “B”.

Figura 6

Germinación de conidios de M. anisopliae en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluada a 24, 48 y 72 h después de la incubación en condiciones de laboratorio.



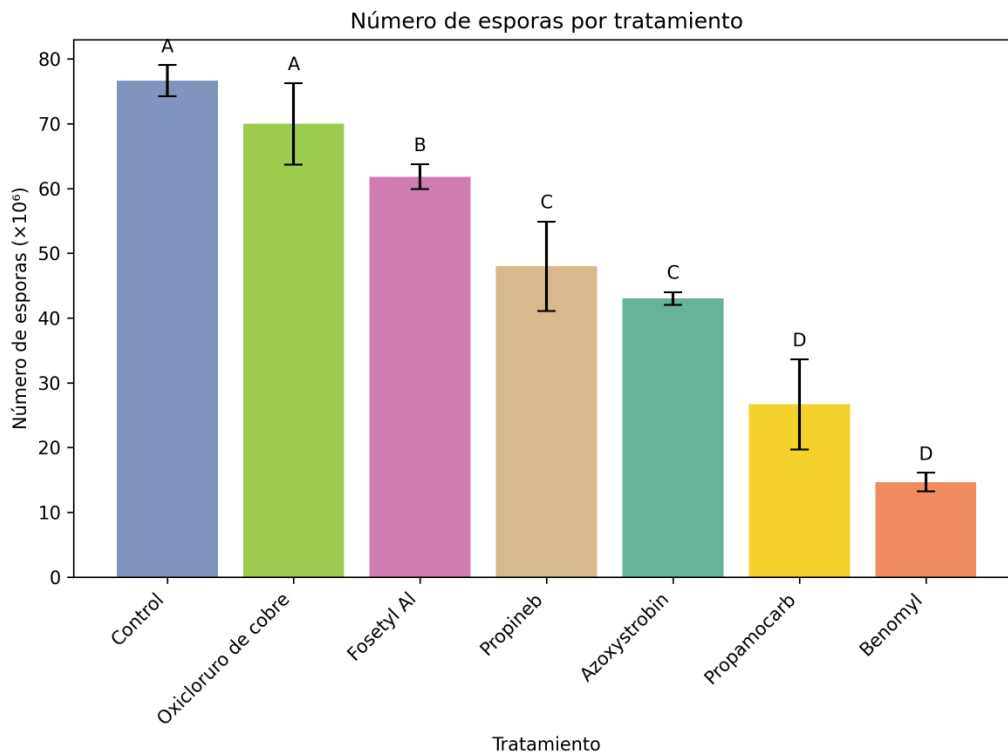
5.3 Efecto de la dosis recomendada sobre la capacidad de esporulación

En la figura 7 se presenta la producción de esporas de *B. bassiana* en presencia de diferentes fungicidas. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). El mayor número de esporas se registró en el control, con un promedio de 76.67×10^6 , agrupado en el grupo estadístico “A”. Un valor ligeramente menor se obtuvo con oxicloruro de cobre (70.00×10^6), clasificado también en el grupo “A”, sin diferencias significativas con respecto al control.

Fosetyl Al alcanzó un promedio de 61.83×10^6 esporas, agrupándose en la categoría “B”. Por su parte, propineb y azoxystrobin presentaron valores intermedios de 48.00×10^6 y 43.00×10^6 esporas respectivamente, correspondientes al grupo “C”, sin diferencias estadísticas entre ellos, pero significativamente inferiores a los grupos “A” y “B”. En contraste, propamocarb y benomyl mostraron las menores producciones, con 26.67×10^6 y 14.67×10^6 esporas, clasificadas en el grupo “D”, sin diferencias significativas entre sí.

Figura 7

Producción de esporas de B. bassiana en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluado 7 días después de su inoculación en condiciones de laboratorio.

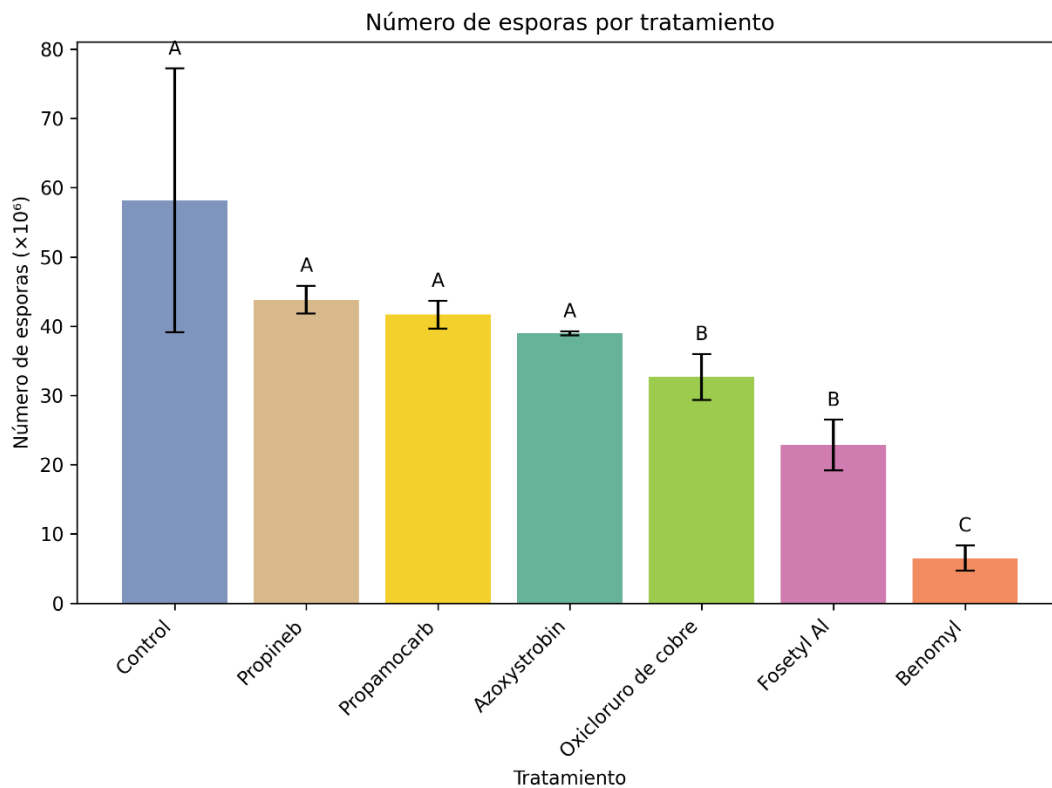


La figura 8 presenta la producción de esporas de *M. anisopliae* bajo la exposición a distintos fungicidas. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). El control registró el valor más alto, con un promedio de 58.17×10^6 esporas, y se ubicó en el grupo estadístico “A”. En esta misma categoría se encontraron propineb (43.83×10^6), propamocarb (41.67×10^6) y azoxystrobin (39.00×10^6), lo que indica que estos tratamientos no difirieron significativamente del control en cuanto a la producción de conidios. Por otra parte, oxidocloruro de

cobre (32.67×10^6) y fosetyl Al (22.83×10^6) conformaron el grupo “B”, mostrando una reducción significativa en comparación con los tratamientos del grupo “A”. Benomyl presentó la respuesta más baja, con 6.50×10^6 esporas, clasificándose en el grupo “C” y diferenciándose estadísticamente del resto de los tratamientos.

Figura 8

Producción de esporas de M. anisopliae en presencia de diferentes fungicidas a dosis comerciales recomendadas, evaluado 7 días después de su inoculación en condiciones de laboratorio.



6 Discusión

6.1 Determinación del impacto de dosis recomendadas de fungicidas sobre el crecimiento micelial de colonias de *M. anisopliae* y *B. bassiana*

En particular, algunos tratamientos redujeron el crecimiento micelial de forma considerable, lo cual coincide con lo reportado en estudios previos: por ejemplo, Bisandrea et al. (2023) encontraron que el crecimiento radial del micelio de *B. bassiana* se redujo en presencia de fungicidas como

azoxystrobin o cobre, con valores de crecimiento aproximados a 1.30 cm frente al control (2.36 cm) y porcentajes de inhibición superiores al 70 %. De igual forma, Ambethgar (2010) documentó efectos tóxicos de diez fungicidas sobre el crecimiento micelial de un aislamiento de *B. bassiana* en medio sólido, lo cual cuantifica la sensibilidad de esta especie frente al uso químico. Los tratamientos que mostraron grupos de significancia distintos “A” respecto al control indicaron que no solo la presencia del fungicida, sino también la formulación o el modo de acción de este, pueden modular la compatibilidad con este hongo entomopatógeno. Sin embargo, esta inhibición no fue uniforme entre productos, y algunos compuestos pueden mostrar una compatibilidad mayor con *B. bassiana*, como es el caso de propamocarb; el cual se caracteriza por su especificidad hacia los hongos del filo Oomycetes y tiene un efecto relativamente reducido sobre otros grupos fúngicos co-cultivados, lo cual implica que no ejerce una acción inhibidora significativa sobre hongos entomopatógenos (Hu, Hong, Stromberg, & Moorman, 2007).

El crecimiento micelial de *M. anisopliae* evidenció una respuesta diferencial frente a los fungicidas evaluados. Al día 9, el tratamiento con propamocarb alcanzó un crecimiento micelial de 27,69 mm, mientras que el testigo presentó un valor de 18 mm. Ambos tratamientos se ubicaron en el grupo estadístico “A”, lo que indica que no se detectaron diferencias significativas entre ellos y que el propamocarb presentó una compatibilidad favorable con *M. anisopliae* bajo las condiciones del ensayo. Este comportamiento podría estar asociado, al menos en parte, con el fenómeno de hormesis, entendido como una respuesta biológica bifásica en la que bajas concentraciones de un agente potencialmente tóxico pueden estimular ciertos procesos fisiológicos, mientras que concentraciones más elevadas generan efectos inhibitorios (Calabrese, 2008). En el caso de los hongos entomopatógenos, este fenómeno puede manifestarse como un aumento en el crecimiento micelial, la germinación de conidios o la producción de biomasa cuando se exponen a dosis subletales de ciertos fungicidas (Dharma, Suryanti & Widiastuti, 2024).

Este hallazgo concuerda con estudios de compatibilidad que advierten que los pesticidas que no interfieren en rutas metabólicas esenciales del hongo presentan efectos mínimos o incluso estimuladores sobre hongos entomopatógenos (Moorhouse et al., 1992). Por ejemplo, trabajos sobre la compatibilidad de *M. anisopliae* con fungicidas e insecticidas reportaron que ciertos activos permitieron crecimiento micelial sustancial sin inhibición significativa (Akbar et al., 2012). En

contraste, algunos fungicidas de amplio espectro, como carbendazim o propiconazol, provocaron inhibición severa del crecimiento micelial o de la germinación de conidios (Aravinthraju et al., 2024).

6.2 Efectos de los fungicidas recomendados sobre la viabilidad y la germinación de conidios

La germinación de conidios de *B. bassiana* mostró variaciones significativas entre los fungicidas evaluados, confirmando que la compatibilidad depende directamente del modo de acción de cada principio activo ($p < 0.05$). A las 72 h los tratamientos con fosetyl Al y el testigo presentaron los mayores porcentajes de germinación (36.74 % y 32.99 %, respectivamente), ambos dentro del grupo estadístico “A”. Estos resultados indican que fosetyl Al podría ser compatible con *B. bassiana*, probablemente porque su acción fungicida se orienta principalmente hacia Oomycetes mediante la inhibición indirecta de la síntesis de fosfolípidos en membranas celulares, sin afectar la biosíntesis de ergosterol ni las rutas metabólicas propias de los Ascomycetes (Derakhshan Shadmehri, Faraji & Mehrvar, 2016; Khun et al., 2020).

El benomil es un fungicida benzimidazol cuyo modo de acción implica la interferencia con la polimerización de tubulina, afectando la formación del huso mitótico y con ello la división celular, lo cual puede inhibir la germinación conidial al bloquear procesos de crecimiento inicial (Zhou et al., 2016). De igual forma, compuestos como ditiocarbamatos, generan radicales libres y estrés oxidativo que dañan proteínas y lípidos de la membrana fúngica, reduciendo la viabilidad de los conidios (Zubrod et al., 2019).

Por su parte, el oxiclóruo de cobre y propamocarb mostraron efectos entre 10 – 30% y se ubicaron en los grupos “AB” y “BC”, respectivamente, lo cual sugiere una compatibilidad parcial. propamocarb, al igual que fosetyl Al, presenta actividad específica contra oomycetes mediante la alteración de la biosíntesis de fosfolípidos y la formación de membranas celulares, procesos fundamentales durante la emisión del tubo germinativo. Debido a que *B. bassiana* es un hongo verdadero y no un oomiceto, su sensibilidad a este mecanismo es menor, lo que podría explicar que su efecto sobre la germinación sea limitado (Hu Hong et al., 2007).

6.3 Efecto de la dosis recomendada sobre la capacidad de esporulación

La capacidad de esporulación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* varió significativamente según el ingrediente activo evaluado, evidenciando que la compatibilidad de los fungicidas con hongos

entomopatógenos depende tanto del modo de acción del compuesto como de la especie fúngica. En ambos hongos, el tratamiento control presentó la mayor producción de esporas, confirmando que la ausencia de presión química permite la expresión máxima del potencial reproductivo bajo condiciones de laboratorio. Este comportamiento ha sido ampliamente descrito para hongos entomopatógenos cultivados en sustratos sólidos, donde la conidiogénesis es altamente sensible a alteraciones fisiológicas inducidas por pesticidas (Faria & Wraight, 2007; Mascarin & Jaronski, 2016).

Con respecto a *B. bassiana*, el oxiclورو de cobre fue el único fungicida que no presentó diferencias significativas respecto al control, lo que indica una alta compatibilidad con esta especie. El oxiclورو de cobre actúa como fungicida de contacto con acción multisitio, interfiriendo procesos metabólicos generales sin afectar directamente la mitosis ni la diferenciación de conidióforos, lo que puede permitir una elevada producción de conidios (Hollomon, 2015). El fosetyl-Al mostró una reducción significativa de la esporulación, ubicándose en el grupo “B”, aunque mantuvo valores relativamente altos en comparación con otros tratamientos. Dado que su modo de acción está dirigido principalmente a oomicetos, se ha documentado que su efecto sobre hongos verdaderos puede ser limitado y variable, lo que concuerda con el comportamiento observado en este estudio (Luz et al., 2007; Ribeiro et al., 2012).

El propineb y el azoxystrobin presentaron una compatibilidad intermedia con *B. bassiana*, reflejada en una reducción parcial de la esporulación respecto al control. El propineb, perteneciente al grupo de los ditiocarbamatos, ejerce una acción multisitio por contacto que puede generar estrés metabólico general, reduciendo la eficiencia reproductiva sin suprimir completamente la conidiogénesis, como ha sido reportado en estudios de selectividad con hongos entomopatógenos (Alves et al., 1998; Cruz et al., 2017). Este comportamiento fue consistente con los resultados obtenidos en *B. bassiana*, cuya esporulación disminuyó de $76,67 \times 10^6$ conidios en el testigo a $48,00 \times 10^6$ conidios con propineb. En *M. anisopliae*, aunque se observó una reducción numérica respecto al testigo ($43,83$ frente a $58,17 \times 10^6$ conidios), ambos tratamientos se ubicaron en el mismo grupo estadístico, lo que indica una mayor tolerancia relativa de esta especie.

Por su parte, el azoxystrobin inhibe la respiración mitocondrial a nivel del complejo III, afectando la producción de ATP, lo cual puede limitar procesos energéticamente demandantes como la formación de conidios (Bartlett et al., 2002; Oliveira et al., 2015). Este mecanismo podría explicar la reducción de la esporulación observada en *B. bassiana*, que pasó de $76,67 \times 10^6$ conidios en el testigo a $43,00 \times 10^6$ conidios con azoxystrobin. En *M. anisopliae*, la esporulación alcanzó $39,00 \times 10^6$ conidios frente a $58,17 \times 10^6$ conidios en el testigo; sin embargo, ambos valores pertenecieron al mismo grupo estadístico, lo que sugiere una respuesta menos sensible bajo las condiciones del ensayo.

El propamocarb y el benomil fueron los ingredientes activos menos compatibles con *B. bassiana*. En el caso de propamocarb, aunque permitió el crecimiento micelial, mostró una marcada reducción en la esporulación, lo que sugiere una interferencia específica sobre la diferenciación reproductiva más que sobre el desarrollo vegetativo. Este tipo de respuesta ha sido descrito previamente como dependiente tanto del ingrediente activo como de la especie fúngica evaluada (Luz et al., 2007; Lopes, 2010). El benomil, fungicida benzimidazol que interfiere directamente con la mitosis mediante la inhibición de la polimerización de microtúbulos, provocó la mayor supresión de la esporulación, un efecto ampliamente documentado para este grupo químico en hongos entomopatógenos (Alves et al., 1998; Ribeiro et al., 2012).

En *M. anisopliae*, el patrón de respuesta fue distinto al observado en *B. bassiana*. Además del control, los tratamientos con propineb, propamocarb y azoxystrobin mantuvieron niveles de esporulación comparables. Aunque estos fungicidas afectan procesos fisiológicos clave la respiración mitocondrial y la integridad de membranas celulares, respectivamente, *M. anisopliae* fue capaz de mantener una producción considerable de conidios, lo que sugiere la existencia de mecanismos de tolerancia especie-específicos. Este comportamiento coincide con estudios que reportan una elevada resiliencia metabólica de *M. anisopliae* ante fungicidas que no actúan directamente sobre blancos críticos del ciclo celular (Jaronski, 2010; Ribeiro et al., 2012).

El fosetyl-Al y el benomil fueron los tratamientos menos compatibles con *M. anisopliae*, mostrando los valores más bajos de esporulación. En particular, el comportamiento del fosetyl-Al contrastó con lo observado en *B. bassiana*, evidenciando una respuesta especie-específica. Aunque este fungicida no está diseñado para hongos verdaderos, su acción indirecta puede afectar procesos fisiológicos asociados a la conidiogénesis en *M. anisopliae*, como ha sido señalado en estudios

generales sobre compatibilidad de fungicidas con hongos entomopatógenos (Luz et al., 2007; Lopes, 2010). El benomil, nuevamente, mostró una fuerte inhibición de la esporulación debido a su interferencia directa con la división celular.

6.4 Clasificación de la compatibilidad in vitro de los fungicidas con los hongos entomopatógenos evaluados

Estos resultados son relevantes para el manejo fitosanitario de cultivos de Brassicaceae, donde el uso de fungicidas puede afectar el desempeño de hongos entomopatógenos empleados para el control de plagas. La respuesta diferencial observada evidencia la importancia de seleccionar combinaciones compatibles dentro de estrategias de manejo integrado, debido a que algunos agroquímicos pueden reducir el crecimiento, la germinación o la esporulación de estos agentes biológicos (Alves et al., 1998; Cruz et al., 2017).

Tabla 2

Clasificación de la compatibilidad relativa de los fungicidas con B. bassiana.

Fungicida	Crecimiento micelial	Germinación	Capacidad de esporulación
Propamocarb	Alta	Alta	Baja
Oxicloruro de cobre	Media	Media	Alta
Azoxystrobin	Media	Media baja	Media
Propineb	Media	Baja	Media
Fosetyl-Al	Baja	Media baja	Media alta
Benomil	Baja	Media baja	Baja

Tabla 3

Clasificación de la compatibilidad relativa de los fungicidas con M. anisopliae.

Fungicida	Crecimiento micelial	Germinación de esporas	Capacidad de esporulación
Propamocarb	Alta	Alta	Alta
Oxicloruro de cobre	Baja	Baja	Media
Azoxystrobin	Media	Media alta	Alta
Propineb	Media alta	Baja	Alta
Fosetyl-Al	Media	Media baja	Media
Benomyl	Baja	Baja	Baja

7 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la compatibilidad entre fungicidas comúnmente utilizados en horticultura y los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* no sigue un patrón único, sino que varía según el ingrediente activo como la especie fúngica evaluada. Por lo tanto, los fungicidas cuyo modo de acción interfiere directamente con procesos celulares esenciales del hongo tienden a generar los efectos más negativos sobre su desarrollo y capacidad reproductiva.

Dentro de los ingredientes activos evaluados, el benomil presentó el menor nivel de compatibilidad con ambos hongos, al provocar reducciones marcadas en el crecimiento micelial, la germinación de conidios y la esporulación. Este resultado confirma la alta sensibilidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a fungicidas que actúan sobre la mitosis, lo que limita su incorporación en esquemas de manejo que buscan integrar el control biológico como una herramienta funcional.

En contraste, el comportamiento de los demás fungicidas fue dependiente de la especie evaluada. En *B. bassiana*, fosetil-Al mostró una respuesta cercana al tratamiento control en variables como germinación y esporulación, lo que sugiere una mayor compatibilidad fisiológica. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo en *M. anisopliae*, donde la esporulación fue más sensible a este ingrediente activo, evidenciando una respuesta claramente especie-específica. Por su parte, fungicidas como propineb, propamocarb y azoxystrobin mostraron una mayor tolerancia en *M. anisopliae*, manteniendo niveles de esporulación relativamente altos en comparación con *B. bassiana*.

Los fungicidas de contacto y el efecto de la acción multisitio, como el oxiclورو de cobre y el propineb, no presentaron un comportamiento uniforme entre especies. La acción multisitio se caracteriza por afectar simultáneamente múltiples procesos metabólicos esenciales en las células fúngicas, lo que puede generar efectos diferenciados en organismos no objetivo. Mientras que en *M. anisopliae* algunos de estos tratamientos permitieron una producción de conidios cercana al control, en *B. bassiana* se observaron reducciones más marcadas en la esporulación, aun cuando el crecimiento micelial no fue severamente afectado. Esto sugiere que los procesos reproductivos pueden ser más sensibles que el desarrollo vegetativo frente a ciertos ingredientes activos.

La germinación de conidios se destacó como uno de los parámetros más sensibles para detectar efectos subletales de los fungicidas. En varios tratamientos, el crecimiento micelial se mantuvo en niveles aceptables, mientras que la germinación y la esporulación disminuyeron de forma considerable, lo que podría comprometer la eficacia de estos hongos bajo condiciones de campo. Esto resalta la importancia de evaluar múltiples variables al analizar la compatibilidad entre agroquímicos y agentes de control biológico.

De manera integral, los resultados indican que la esporulación constituye un criterio clave para determinar la compatibilidad real de los fungicidas con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, ya que refleja de forma conjunta los efectos del ingrediente activo sobre el desarrollo fisiológico y el potencial reproductivo del hongo. Reducciones en la producción de conidios podrían traducirse en una menor persistencia y efectividad del agente biológico en el agroecosistema.

Finalmente, este trabajo aporta información relevante para la selección de fungicidas compatibles con hongos entomopatógenos en sistemas agrícolas que buscan integrar el control biológico dentro de estrategias de manejo integrado de plagas. La evaluación de la compatibilidad *in vitro* se consolida como una herramienta clave para respaldar decisiones técnicas orientadas hacia una agricultura más sostenible y con menor dependencia de insumos de alto impacto ambiental.

8 Recomendaciones

- Evitar el uso de fungicidas con modo de acción dirigido a la mitosis, como benomil, en sistemas de manejo integrado de plagas que incorporen *B. bassiana* y *M. anisopliae*, debido a su efecto inhibitorio sobre el crecimiento, la germinación y la esporulación de ambos hongos.
- Priorizar el uso de fungicidas con acción específica sobre oomicetos, como fosetyl-AI y propamocarb, cuando se requiera su aplicación conjunta o cercana al uso de hongos entomopatógenos, especialmente en programas que incluyan *B. bassiana*.
- Considerar que la compatibilidad de los fungicidas con hongos entomopatógenos es especie-específica; por lo tanto, se recomienda evaluar de forma independiente cada hongo antes de extrapolar resultados a otros agentes de control biológico.
- Incorporar la evaluación de la germinación de conidios y la capacidad de esporulación como criterios clave en estudios de compatibilidad, y no limitar el análisis únicamente al crecimiento micelial.
- Realizar estudios complementarios en condiciones de invernadero y campo para validar los resultados obtenidos in vitro, considerando variables ambientales como radiación UV, temperatura y humedad relativa.
- Evaluar el efecto de diferentes dosis y momentos de aplicación de los fungicidas sobre la viabilidad y persistencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, con el fin de definir intervalos de aplicación seguros dentro del manejo integrado.
- Promover el uso de fungicidas compatibles dentro de estrategias de manejo agroecológico, con el objetivo de reducir el impacto negativo sobre microorganismos benéficos y mejorar la sostenibilidad de los sistemas productivos.
- En particular, se recomienda evaluar *M. anisopliae* en programas que incluyan propamocarb, propineb o azoxystrobin, así como valorar el uso de *B. bassiana* en combinación con fosetyl-AI. No se recomienda la aplicación conjunta de benomil con ninguno de los dos hongos entomopatógenos evaluados, debido a su marcado efecto inhibitorio.

9 Referencias bibliográficas

- Afifah, L., Corry Aena, A., Saputro, N. W., Kurniati, A., Maryana, R., Lestari, A., Abadi, S., & Enri, U. (2022). Maize media enhance the conidia production of entomopathogenic fungi *Lecanicillium lecanii* also it's effective to control the weevil *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Brentidae). *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 44(3), 117–124. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v44i3.3605>
- Ahmed, M., Babayola, M., & Bake, I. D. (2024). Role of horticultural crops in food and nutritional security: A review. *Nutrition and Food Processing*, 7(8), 124-129 <https://doi.org/10.31579/2637-8914/226>
- Akbar, S., Freed, S., Hameed, A., Gul, H. T., Akmal, M., Malik, M. N., Naeem, M., & Khan, M. B. (2012). Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with different insecticides and fungicides. *African Journal of Microbiology Research*, 6(17), 3956–3962. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.417>
- Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Almeida, J. E. M. D. (2020). Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: Oportunidades de negócio e inovações / Bio-factories for the production of mycopesticides in Brazil: business opportunities and innovations. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 3(3), 2544–2557. <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n3-162>

- Alves, S. B., Moino, A., Almeida, J. E. M., & Alves, L. F. A. (1998). Técnicas de laboratório para avaliação da compatibilidade de entomopatógenos com defensivos agrícolas. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 27(3), 353–360.
- Ambethgar, V. (2010). Potential of entomopathogenic fungi in insect pest management. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 5(27), 1–10. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20105027>
- Aravinthraju, K., & colaboradores. (2024). Endophytic entomopathogenic fungi: their role in sustainable plant production and their compatibility with agrochemicals. *Journal of Fungi*, 10(12), 865. <https://doi.org/10.3390/jof10120865>
- Aw, K. M. S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *Journal of Fungi*, 3(2), 30. <https://doi.org/10.3390/jof3020030>
- Baibakova, E. V., Nefedjeva, E. E., Suska-Malawska, M., Wilk, M., Sevriukova, G. A., & Zheltobriukhov, V. F. (2019). Modern fungicides: mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. *Annual Research & Review in Biology*, 1–16. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v32i330083>
- Bisandrea S. M., Ingle Y. V., Landec G. K., Girid M. D. 2023. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and laboratory assessment with selective pesticides. *ScienceAsia* 49:22-28. <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2023.128>
- Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1451–1474. <https://doi.org/10.1897/07-541>
- Celar, F. A., & Kos, K. (2016). Effects of selected herbicides and fungicides on growth, sporulation and conidial germination of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Pest Management Science*, 72(11), 2110–2117. <https://doi.org/10.1002/ps.4240>

- Correal, C. E., Torres, L. A. T., Rivero, L. F. V., Pardey, A. E. B., Mogollón, M. V. Z., & Prado, A. M. C. (2018). Entomopathogenic fungi in insect pests biological control. *Corporación colombiana de investigación agropecuaria*, 356.
- del Nozal Nalda, M. J. (2000). Fungicides. Liquid Chromatography. I. D. Wilson (Ed.), Encyclopedia of Separation Science (pp. 2915–2921). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/06351-1>
- Derakhshan Shadmehri, A., Faraji, S., & Mehrvar, A. (2016). Compatibility of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with some pesticides. *Journal of Entomological Society of Iran*, 36(2), 137-146.
- Dharma, R., Suryanti, L., & Widiastuti, R. (2024). Hormetic response of entomopathogenic fungi to sublethal doses of agrochemicals. *Journal of Agricultural Biotechnology and Environment*, 15(2), 88–96.
- de Freitas, D., Damin, S., Vilani, A., Krasburg, C., de Queiroz, A., Kagimura, F. Y., & Onofre, S. B. (2011). Ação de fungicidas sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. Majus (Johnston) Tulloch. *aBios-Revista De Saúde E Biologia*, 6(2), 50–56.
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46, 387–400.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2011). Guide to implementation of integrated pest management (IPM). FAO.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2011). Quality and safety of fresh fruits and vegetables along the production chain. FAO.
- Gonçalves, C., Godoy, C., Oliveira, M., & Sosa-Gómez, D. (2019). Suscetibilidade do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* ao fungicida tebuconazol. *Resumos expandidos da 37ª Reunião de Pesquisa de Soja*.

- Gusman, I., Pérez Guilarte, Y., Cidrás, D., Vila Vázquez, J. I., & Lois González, R. C. (2023). *América Latina ante los (nuevos) retos de la justicia social y ambiental*. (1a ed.). Asociación española de geografía. <https://doi.org/10.21138/al/2023.1c>
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hollomon, D. W. (2015). Fungicide resistance: Facing the challenge. *Plant Protection Science*, 51(4), 170–176. <https://doi.org/10.17221/42/2015-PPSFF>
- Hu, J., Hong, C., Stromberg, E. L., & Moorman, G. W. (2007). Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Disease*, 91(4), 414–420. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-4-0414>
- Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Science and Technology*, 27(1), 28–41. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1243227>
- Jaronski, S. T. (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, 55, 159–185. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9248-3>
- Jobin, T., & Carisse, O. (2007). Incidence of myclobutanil- and kresoxim-methyl-insensitive isolates of *Venturia inaequalis* in Quebec Orchards. *Plant Disease*, 91(10).
- Johnson, J. M., Deepthy, K. B., & Chellappan, M. (2020). Tolerance of *Metarhizium anisopliae* Sorokin isolates to selected insecticides and fungicides. *ENTOMON*, 45(2), 143–148. <https://doi.org/10.33307/entomon.v45i2.523>
- Kara, M., Oztas, E., Ramazanoğulları, R., Kouretas, D., Nepka, C., Tsatsakis, A. M., & Veskoukis, A. S. (2020). Benomyl, a benzimidazole fungicide, induces oxidative stress and apoptosis in neural cells. *Toxicology reports*, 7, 501-509.

- Kidanu, S., & Hagos, L. (2020). Research and application of entomopathogenic fungi as pest management option: A Review. *Journal of Environment and Earth Science*, 10(3), 31–39. <https://doi.org/10.7176/JEES/10-3-03>
- Kim, J. S., Roh, J. Y., Choi, J. Y., Wang, Y., Shim, H. J., & Je, Y. H. (2010). Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biology*, 114(1), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.011>
- Köller, W., & Wilcox, W. F. (2001). Evidence for the predisposition of fungicide-resistant isolates of *Venturia inaequalis* to a preferential selection for resistance to other fungicides. *Phytopathology*®, 91(8), 776–781. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.8.776>
- Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 23–42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>
- Luz, C., Rocha, L. F. N., & Moino, A. (2007). Compatibility of entomopathogenic fungi with agrochemicals. *Neotropical Entomology*, 36(3), 347–356. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000300004>
- Márquez-Cardozo, C. J. (2025). Agroindustrial importance of fruits and vegetables. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 78(1).
- 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), 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Moorhouse, E. R., Gillespie, A. T., Sellers, E. K., & Charnley, A. K. (1992). Influence of fungicides and insecticides on the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*, a pathogen of the vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*. *Biocontrol Science and Technology*, 2(1), 49–58. <https://doi.org/10.1080/09583159209355217>

- Mora, M. A. E., Castilho, A. M. C., & Fraga, M. E. (2018). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 84(0). <https://doi.org/10.1590/1808-1657000552015>
- Muniappan, R., & Heinrichs, E. A. (Eds.). (2016). *Integrated pest management of tropical vegetable crops*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-0924-6>
- Muñoz Arias, N. E., & Rojas Jorge, N. (2025). Uso de biofertilizantes en la producción de hortalizas.
- Neves, P. M. O. J., Hirose, E., Tchujo, P. T., & Moino, A. (2001). Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*, 30(2), 263–268.
- Pimentel, D. (2005). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability*, 7, 229–252.
- Posit Team. 2023. RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA.
- Quesada-Moraga, E., González-Mas, N., Yousef-Yousef, M., Garrido-Jurado, I., & Fernández-Bravo, M. (2024). Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. *Journal of Pest Science*, 97(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10340-023-01622-8>
- Ramírez Vargas, C., & Nienhuis, J. (2012). Cultivo protegido de hortalizas en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 25(2), 10. <https://doi.org/10.18845/tm.v25i2.303>
- Rodríguez, I. M. (2015). Identificación de principios activos de plaguicidas en frutas, hortalizas y granos básicos en Costa Rica: Una propuesta para la implementación de nuevas metodologías de análisis. *Revista Pensamiento Actual*, 15(25).
- Silva Dias, J. (2011). World importance, marketing and trading of vegetables. *Acta Horticulturae*, 921, 153–169. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.921.18>

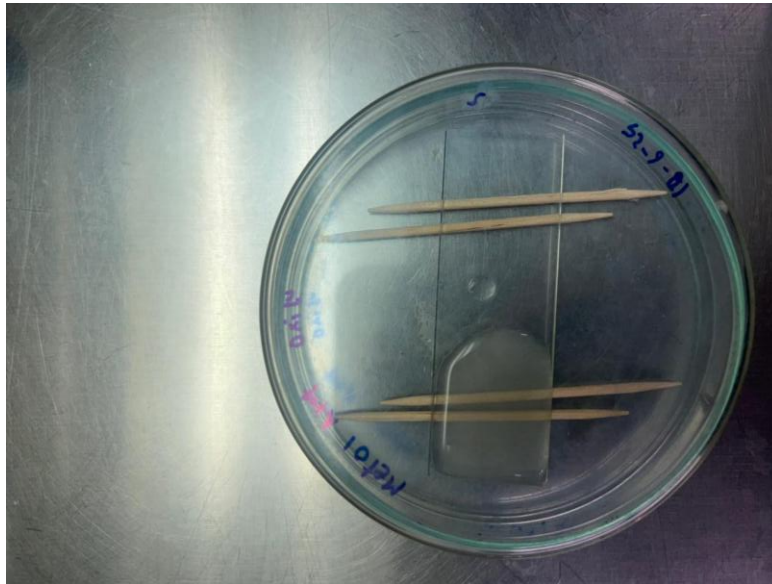
- Souza, B., Vázquez, L. L., & Marucci, R. C. (Eds.). (2019). *Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems: Biological Control and Functional Biodiversity*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24733-1>
- Tanzini, M. R., Alves, S. B., & Setten, A. (2002). Toxicidade de produtos fitossanitarios utilizados no controle de *Leptopharsa hevea* para fungos entomopatogénicos. *Journal of Animal, Plant Sanitary and Environmental Protection*, 69(4), 65–69.
- Um, M., Galadima, I., Gambo, F., & Zakaria, D. (2018). A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*.
- Van-Zwieten, L., Merrington, G., & Van-Zwieten, M. (2004). *Review of impacts on soil biota caused by copper residues from fungicide application*.
- Vásquez, L., & Pérez, N. (2017). El control biológico integrado al manejo territorial de plagas de insectos en Cuba. *Agroecología*, 12(1), 39–46.
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. En *Insect pathology* (2nd ed.). Academic Press.
- Viera, F., Tello, M., Martínez, A., Navia, F., Medina, A., Gabriel, D.-P. A., Estefanía, P.-Q. C., Katherine, P.-V. A., Javier, B.-C. F., Arturo, V.-C. W., & Trevor, J. (2020). Control Biológico: una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador, Biological Control: A tool for sustainable agriculture, a point of view of its benefits in Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128–149.
- Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to insects. *Frontiers in Microbiology*, 12, 705343. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>

- Yáñez, M., & France, A. (2010). Effects of fungicides on the development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(3), 390–398. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000300006>
- Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y., & Mingguo, Z. (2016). Mechanism of action of benzimidazole fungicides on *Fusarium graminearum*: Interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule. *Phytopathology*, 106(7), 807–813. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0186-R>
- Zubrod, J. P., et al. (2019). Fungicides: an overlooked pesticide class? *Environmental Science & Technology*, 53(7), 3347–3365.

10 Anexos

Anexo 1

Germinación de conidios de M. anisopliae en presencia de oxiclورو de cobre a dosis comercial recomendada, evaluada a las 24 horas.



Anexo 2

*Establecimiento del bioensayo para el conteo de germinación de esporas de *B. bassiana* en presencia de diferentes fungicidas a dosis comercial recomendada.*



Anexo 3

Procedimiento de medición del micelio de B. bassiana en presencia de fosetyl Al a las 72 horas después de incubado.

