

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA**

Informe Escrito Final

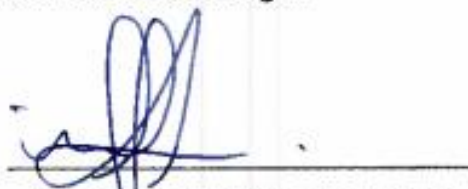
**Desarrollo de un sistema para producción masiva del hongo entomopatógeno
Lecanicillium lecanii y su potencial uso como agente de control de áfidos en el
cultivo de caña de azúcar (*Melanaphis sacchari*)**

**Estudiante: Argerie Melissa Oviedo Bolaños
Cédula 207910156, carné 175196**

**Tutor: MBA & MPM. Jorengeth Abad Rodríguez Rodríguez
Asesor: Lic. José Daniel Salazar Blanco**

**Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica
2023**

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.



Dra. Stefany Solano González

Representante, Decano, quién preside



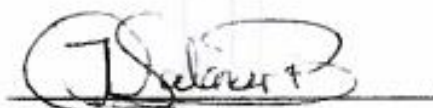
Dra. Silvia Mau Incháustegui

Representante de la Dirección de la (ECB)



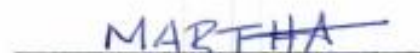
MPM. Abad Rodríguez Rodríguez

Tutor



Lic. José Daniel Salazar Blanco

Asesor



Ph.D. Martha Orozco Aceves

Invitada especial

Agradecimiento

Agradezco al profesor MPM. Jorengeth Abad Rodríguez Rodríguez, por su aporte y asesoramiento durante todo el desarrollo del presente trabajo. A mis tutores Lic. José Daniel Salazar y M. Sc. Alejandro Rodríguez por compartir su experiencias y conocimientos que aportaron a mi desarrollo personal y académico.

A DIECA-LAICA, la Universidad Nacional, colegas y amigos que me brindaron todo su apoyo para realizar esta investigación, también a mi familia que siempre han fomentado en mí el deseo de superación y de triunfar cada día.

Dedicatoria

A Dios, a mis padres y colegas por su apoyo incondicional,
guiarme por el camino correcto y con su amor, inspirarme a seguir mejorando
y cumpliendo mis metas.

Índice

Miembros del tribunal	¡Error! Marcador no definido.
Agradecimiento	II
Dedicatoria.....	III
Índice	IV
Índice de cuadros	VIII
Índice de figuras.....	IX
Abreviaturas o acrónimos	X
1. Introducción	13
1.1. Antecedentes	13
1.2. Justificación.....	6
1.3. Planteamiento del problema	9
1.4. Objetivos.....	10
1.4.1. Objetivo general	10
1.4.2. Objetivo específico.....	10
2. Marco teórico.....	10
2.1. Características generales de la caña de azúcar	10
2.2. Principales enfermedades provocadas por hongos en la caña de azúcar	11
2.3. Principales enfermedades provocadas por bacterias en la caña de azúcar.....	12

2.4. Principales enfermedades provocadas por virus en la caña de azúcar	13
2.5. Descripción general de los áfidos	14
2.6. Daños primarios y secundarios de los áfidos en el campo	16
2.7. Técnicas empleadas para el control de áfidos	17
2.8. Características generales de los hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas en la agricultura.....	18
2.9. Características generales de <i>Beauveria bassiana</i>	21
2.10. Características generales de <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
2.11. Características morfológicas de <i>L. lecanii</i>	22
2.12. Clasificación taxonómica	23
2.13. Identificación molecular de <i>L. lecanii</i>	24
2.13. Papel de <i>L. lecanii</i> en el control de los áfidos	24
2.14. Aspectos por considerar para la producción de <i>L. lecanii</i>	25
2.15. Temperatura	26
2.16. Humedad	26
2.17. pH.....	27
2.18. Germinación.....	27
2.19. Secado	27
2.20. Tipos de cultivo sólidos, líquidos y bifásicos	28
2.21. Sustratos para la producción de hongos entomopatógenos	29
2.22. Control de calidad y aplicación en el campo.....	29
3. Marco Metodológico	30
3.1. Área de estudio:	30

3.2. Identificación molecular de <i>L. lecanii</i>	30
3.3. pH y medio nutritivo	32
3.4. Producción de biomasa y producción de conidios	33
3.5. Preparación del sustrato	33
3.5. Sustrato y temperatura	34
3.6. Homogeneización, esporulación y secado	37
3.7. Homogenización.....	37
3.8. Esporulación.....	38
3.9. Secado	38
3.9. Análisis de control de Calidad.....	38
3.9.1. Concentración de conidios (conidios/gramos).....	39
3.9.2. Viabilidad	40
3.9.3. Pureza	41
3.10. Estudio de costos de producción de <i>L. lecanii</i>	42
3.10.1. Costos variables	42
3.10.1. Costos fijos.....	43
3.11. Estadística.....	44
4. Resultados.....	45
4.1. pH y Medio Nutritivo	46
4.2. Análisis de la varianza.....	46
4.3. Sustrato, temperatura y Humedad	48
4.4. Sustrato.....	48
4.5. Temperatura-Arroz.....	50
	VI

4.6. Temperatura-Harina de trigo.....	52
4.7. Temperatura-Salvado de avena	54
4.7. Temperatura-Semolina	55
4.8. Humedad en arroz	57
5. Discusión.....	63
6. Conclusiones	68
7. Recomendaciones.....	68
8. Referencias.....	69
1. Anexos.....	88

Índice de cuadros

Cuadro 1.....	11
Cuadro 2.....	32
Cuadro 3.....	33
Cuadro 4.....	36
Cuadro 5.....	37
Cuadro 6.....	46
Cuadro 7.....	47
Cuadro 8.....	49
Cuadro 9.....	51
Cuadro 10.....	53
Cuadro 11.....	54
Cuadro 12.....	56
Cuadro 13.....	58
Cuadro 14.....	61
Cuadro 15.....	62
Cuadro 16.....	63

Índice de figuras

Figura 1.....	2
Figura 2.....	7
Figura 3.....	14
Figura 4.....	15
Figura 5.....	16
Figura 6.....	20
Figura 7.....	21
Figura 8.....	22
Figura 9.....	23
Figura 10.....	25
Figura 11.....	34
Figura 12.....	40
Figura 13.....	41
Figura 14.....	45
Figura 15.....	50
Figura 16.....	52
Figura 17.....	53
Figura 18.....	55
Figura 19.....	57
Figura 20.....	59
Figura 21.....	60

Abreviaturas o acrónimos

UNA	Universidad Nacional de Costa Rica.
DIECA	Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar.
LAICA	Liga Industrial de la Caña de Azúcar.
PDB	Caldo Papa Dextrosa (Potato Dextrose Broth).
CTAB	Cetiltrimetilamonio Bromuro.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica.
ITS	Región Espaciadora Interna Transcrita.
BLAST	Búsqueda Básica de Alineación Local.
SMAY	Sabouraud Maltosa suplementado con Extracto de Levadura.
TM	Toneladas Métricas.
SDA	Sabouraud Dextrosa Agar.
PROCOMER	Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica.
SCMV	Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar.
SrMv	Virus del Mosaico del Sorgo.
MDMV	Virus del Mosaico Enano del Maíz.
ScYLV	Virus de la Hoja Amarilla.
SCSMV	Virus del Mosaico Estriado de la Caña de Azúcar.
RSD	Raquitismo de las socas.
IMPI	Inhibidores de Proteasas de Insectos.
TLRs	Receptores tipo Toll.
β GRP3	Proteína de Reconocimiento β -1,3-glucano.
GNBP3	Proteína de unión gramnegativa 3.
CLIPs	Inmunoprecipitación de Entrecruzamiento.

SPE	Enzima Procesadora de Spaetzle.
SPz	Proteína Spaetzle.
MYD88	Proteína de Diferenciación Mieloide 88.
AMPs	Adenosín monofosfato.
NF-Kb	Factor Nuclear de Transcripción kappa B.
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
CTAB	Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio.
UV	Radiación Ultravioleta.
TBE	Tris-borate-EDTA.
pb	Pares de bases
μM	micromol
SDAY	Agar Sabouraud Dextrosa y Extracto de Levadura.
SSE	Solución Salina Estéril.
HR	Humedad Relativa.
°C	Grados Celsius.
m/v	Masa/Volumen.
mm	Milímetros.
mm ²	Milímetros cuadrados.
cm	Centímetros.
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosómico
CVP	Conidios Viables Puros.
mL	Mililitros.
SAM	S-adenosil L-metionina.

Resumen

En el cultivo de caña de azúcar existe un grupo importante de plagas que causan daño en distintas partes de la planta y en diferentes épocas del año. Los áfidos son causantes de grandes pérdidas en la producción y rendimiento de caña azúcar, esto por sus características de ser insectos chupadores de savia de las hojas, las cuales se tornan amarillas o rojo oscuro y, también se consideran vectores de virus. Además, generan la presencia de hongos como la fumagina en el follaje, así como asociaciones simbióticas con las hormigas por las sustancias azucaradas que los áfidos liberan. El hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* parasita y se emplea para el control biológico de esta plaga, sin embargo, no se ha estandarizado su producción masiva, finalidad de esta investigación.

En este trabajo la metodología se basó en la identificación molecular del hongo, determinar el mejor medio, pH, sustrato, temperatura y humedad para su producción masiva. Entre los resultados obtenidos se determinó que el hongo se desarrolla mejor a pH entre 5,5 y 6,5 en agar compuesto por dextrosa e infusión de papa. Así mismo, el arroz es el sustrato que permite la mayor producción de conidios viabilidad y pureza microbiológica ($7,26E+08$ CVP), en comparación con la semolina ($0,00E+00$ CVP), harina de trigo ($9,13E+05$ CVP) y salvado de avena ($3,70E+07$ CVP). Se debe mantener una humedad superior al 65% en la fermentación sólida con arroz, alcanzando un total de $81,42E+09$ Conidios Viabiles Puros (CVP) por gramo de sustrato cuando se empleó un volumen de 140 mL y una temperatura de 20°C ($8,68E+08$ CVP). En conclusión, se logró establecer las condiciones de cultivo y desarrollo del hongo para una alta esporulación y viabilidad para su posible aplicación en campo.

1. Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) se considera uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel nacional e internacional debido a su impacto en la canasta básica para el consumo humano, en la ganadería como suplemento alimenticio, para producir azúcar y alcohol, para la generación de energía e incluso, para su utilización como biocombustible (Caballero, 2020). Sin embargo, el cultivo de la caña de azúcar se ve afectado por diferentes plagas que generan daños directos e indirectos en las plantaciones (Lou et al., 2018), y deben de manejarse con base a diferentes estrategias, siendo los hongos entomopatógenos microorganismos que cuentan con un gran potencial para el control biológico, esto por su mecanismo de acción que generan infecciones fúngicas sobre las poblaciones de diferentes plagas de insectos (Ramírez-Sánchez et al., 2019).

1.1. Antecedentes

Para el año 2020 el cultivo de caña de azúcar en Costa Rica registra con un total de 5 393 productores y 12 ingenios azucareros con más de 62 604 hectáreas destinadas al cultivo de caña (Chaves & Bermúdez, 2020) y una producción de 8 807 860 bultos de azúcar al año, según el Informe de Progreso Zafra 2019-2020 (Barrantes, 2018).

Para la Zafra 2020-2021, LAICA reporta 60.668 ha y una producción total de 8 503 560 bultos de azúcar y en el año 2021-2022 se produjo un total de 8 317 940 bultos de azúcar con 59 836 Ha (figura 1), pero a pesar de esto, los productores se enfrentan a las plagas provocadas por insectos hemípteros que pertenecen a la familia Aphididae, siendo para Costa Rica, *Melanaphis sacchari* (Zehntner), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) y *Sipha flava* (Forbes), las tres especies de áfidos de mayor impacto (Voegtlin et al., 2003).

Zafra	Área sembrada (ha)	Área cosechada (ha)	Caña procesada (t)	¹ Azúcar fabricado (t)	² Rendimiento agrícola caña (t/ha)	Rendimiento Industrial (azúcar kg/t)	Rendimiento azúcar (t/ha)	Rendimiento miel final (kg/t)	³ Relación caña/sacarosa
2001-2002	48 500	48 000	3 474 331	364 930	72,38	105,04	7,60	39,36	9,52
2002-2003	49 100	48 000	3 462 338	364 259	71,99	105,42	7,59	39,71	9,49
2003-2004	50 400	49 000	3 959 185	413 388	80,8	104,41	8,44	38,94	9,58
2004-2005	51 200	49 200	3 804 075	404 658	77,32	106,38	8,23	38,88	9,40
2005-2006	52 600	49 300	3 615 584	382 824	73,34	105,88	7,77	36,62	9,44
2006-2007	55 600	53 300	4 152 799	417 439	77,91	100,52	7,83	40,62	9,95
2007-2008	54 550	52 500	3 561 379	373 193	67,84	104,79	7,11	36,89	9,54
2008-2009	53 030	49 030	3 492 232	361 836	71,23	103,61	7,38	37,94	9,65
2009-2010	55 730	51 850	3 918 882	390 176	75,58	99,56	7,53	44,5	10,04
2010-2011	57 480	54 300	3 320 596	355 078	61,15	106,93	6,54	37,35	9,35
2011-2012	57 600	53 700	3 823 114	415 075	71,19	108,57	7,73	40,53	9,21
2012-2013	63 316	58 980	4 340 603	458 382	73,59	105,6	7,77	45,42	9,47
2013-2014	63 205	58 742	4 492 123	481 494	76,47	107,19	8,2	41,28	9,33
2014-2015	64 676	59 161	4 422 451	465 702	74,75	105,3	7,87	44,66	9,50
2015-2016	65 485	58 225	4 396 458	445 988	75,51	101,44	7,66	46,13	9,86
2016-2017	64 250	56 355	4 343 890	452 160	77,08	104,09	8,02	41,59	9,61
2017-2018	60 000	55 070	4 054 141	431 109	73,62	106,34	7,83	36,84	9,40
2018-2019	62 630	54 548	4 025 447	442 187	73,8	109,85	8,11	40,89	9,10
2019-2020	62 604	56 689	4 092 123	440 393	72,19	107,62	7,77	39,23	9,29
2020-2021	60 668	55 357	3 995 020	425 178	72,13	106,43	7,68	36,85	9,40
2021-2022	59 836	54 848	3 897 888	415 897	71,07	106,7	7,58	39,19	9,37
2022-2023	58 917	53 230	3 422 767	350 242	64,30	102,33	6,58	38,69	9,77
PROMEDIO	57 790	53 608	3 912 156	411 436	72,97	105,18	7,67	40,10	9,51

1. El azúcar fabricado corresponde al azúcar producido en bultos *tel quel* y transformado a toneladas métricas.
Factor de conversión: Bultos azúcar/20 = toneladas de azúcar.
2. Rendimiento promedio calculado a partir de la caña total en toneladas métricas molida para el periodo, dividida por el área total cosechada respectiva. No corresponde al promedio aritmético del periodo.
3. Se interpreta como la cantidad de caña en toneladas métricas (t) necesaria para producir 1 t de azúcar.

Figura 1. Índices de producción y rendimiento agroindustrial del sector cañero-azucarero costarricense durante el período 2002 – 2023.

En el caso de *M. sacchari*, conocido popularmente como el áfido amarillo, es una de las plagas que afecta principalmente las producciones de gramíneas, caña de azúcar, sorgo en Florida, Estados Unidos. Pero, no fue hasta 1988 cuando se informó por primera vez la presencia de este áfido en Louisiana, y para el 2013 se consideró como una plaga económica en Texas y Louisiana; debido al aumento de los reportes por pérdidas en el rendimiento de las cosechas en estas zonas y posteriormente, se extendió a otros estados y regiones en donde se producen dichos cultivos (Haar et al., 2018).

En el año 2016 en México se observaron especies de *M. sacchari* muertas y parasitadas por un hongo de coloración blanca con algunos tonos amarillos, siendo estas características morfológicas similares a cepas de *L. lecanii*, por lo que se procedió con su identificación molecular a partir de insectos que se encontraban momificados por dicho hongo y se determinó que esta cepa correspondía a *L. longisporum*, siendo esto fundamental para generar un

conocimiento claro acerca de los posibles controladores biológicos de plagas de áfidos por medio de dicho hongo entomopatógeno (Berlanga-Padilla et al., 2016).

A raíz de lo anterior, los autores Castillo et al. (2009), mostraron en su estudio que para la caracterización morfológica de *L. lecanii*, se cultivó el hongo en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) a 25°C por un periodo de 7 días y se realizaron tinciones con azul de lactofenol para su observación microscópica, luego, el hongo se propagó en Caldo Papa Dextrosa (PDB) incubando por 5 días a 25°C en agitación continua. Para obtener el ADN (Ácido desoxirribonucleico) fúngico, se tomó una alícuota de las blastosporas producidas en el caldo y se utilizó la técnica de extracción de CTAB (Cetiltrimetilamonio Bromuro), seguido de la amplificación por medio de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), del gen que codifica para la región ribosomal 18s (ADN ribosomal), empleando los primers PN3 (5'-CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C-3') y PN10 (5'-TTC GCT TAT TGA TAT GCT TAA G-3'). Finalmente, las secuencias de cada muestra amplificada fueron analizadas en la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) para su identificación.

Otro de los métodos empleados para la identificación de *L. lecanii*, se basó en el cultivo del hongo en PDA a 24 ° C durante una semana en oscuridad y el ADN fúngico genómico se aisló empleando el kit de ADN PowerSoil. Seguido de la extracción, se cuantificó el ADN con el espectrofotómetro NanoDrop TM 1000 y la PCR se llevó a cabo utilizando los primers ITS1F y ITS4 de la región ITS (región espaciadora interna transcrita), es una fracción del genoma que se llama ADN espaciador. Finalmente, se comprobaron con las secuencias registradas en base de datos del NCBI utilizando BLAST (Búsqueda Básica de Alineación Local) para obtener la correspondiente identificación del hongo (Diaz et al., 2009).

Ahora, desde el punto de vista aplicado, un estudio realizado por Kumar et al. (2020), muestra la importancia del uso de *L. lecanii* como agente de control biológico para evitar el uso de plaguicidas en la agricultura. Por lo que, se pueden emplear sustratos como lo es el sorgo, arroz, desechos de granja, desechos vegetales, bagazo de caña de azúcar, así como el medio de cultivo adecuado para desarrollar su esporulación. También, es importante evaluar el tipo de

matriz para su multiplicación y observar resultados significativos en la concentración de conidios, viabilidad y pureza.

Así mismo, la investigación realizada en 2008 por Derakhshan et al., muestra la importancia de la producción masiva de *Verticillium lecanii* (reclasificado como *Akanthomyces lecanii*) en matrices sólidas, líquidas e incluso, bifásica. En cuanto a los sistemas líquidos se determinó que, de los seis medios probados, el que generó una mayor concentración de esporas/mL, es levadura de melaza (8.33×10^8 esporas mL/L). En cuanto a los sustratos sólidos analizados, se observó que el arroz es el adecuado para la generación de conidios, y, por último, cuando se realizó en estado bifásico, con respecto a la combinación de levadura de melaza y sustrato de arroz (1.75×10^9 esporas/mL) se muestra que es el método más eficiente para la producción en masa de esta cepa y su posterior aplicación en campo.

Además, de las variables anteriormente mencionadas, también es importante evaluar los efectos de la aireación, pH, temperatura y otros. Feng et al. (2000), muestra que *V. lecanii* posee un gran potencial para el control biológico de áfidos y, por ende, es necesario estandarizar su producción en fermentación líquida y fermentación sólida. Para esta última, se analizaron sustratos de arroz, tomando en cuenta que la humedad utilizada juega un papel importante para el desarrollo de este hongo entomopatógeno. En cuanto a la fermentación líquida, se probó el medio líquido SMAY (Sabouraud Maltosa suplementado con 1% de extracto de levadura) y pH requerido para su óptimo desarrollo, dando como resultado un pH inicial de 5 en medio SMAY, donde alcanzó una concentración de $1,2 \times 10^9$ esporas/ml en el caldo a 24 °C y 150 rpm, además, una producción de biomasa de $1,5 \times 10^9$ espóra/g en arroz como sustrato.

Así mismo, se pueden utilizar diferentes coadyuvantes que permitan un mejor resultado al momento de su aplicación en campo. En la investigación de Ritika & Sangha (2019), realizaron análisis con glicerol, tween-80 y carboximetilcelulosa, para observar su efecto en el crecimiento y desarrollo del hongo *L. lecanii*. Para esto, se adicionaron estos adyuvantes en medio con papa dextrosa, lo cual permitió una mayor obtención de biomasa, crecimiento en la superficie y finalmente, al evaluar la formulación, se determinó un aumento en la mortalidad de la especie objetivo.

También es importante destacar que, una vez que se logra estandarizar el proceso de producción masiva del hongo entomopatógeno, es necesario evaluar su efectividad en el campo, por lo que, en el estudio realizado por Zambrano-Gutiérrez et al (2019), llevó a cabo la producción de *L. longisporum* en medio PDA (Agar Papa Dextrosa), SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) y Agar Malta. Posteriormente, se evaluó su eficiencia y virulencia en condiciones controladas sobre poblaciones de áfidos, encontrándose que los mayores niveles de infección fueron causados por *L. longisporum* con una mortalidad entre el 30,0% y 50,0%. No obstante, es necesario realizar un estudio más detallado acerca de la ecología de estas especies para considerar su posible rol en la dinámica de las poblaciones de insectos de *M. sacchari*.

En el caso de Costa Rica, se empleó el uso de *L. lecanii* para el control de la roya *Hemileia vastatrix* en cultivos de café (*Coffea arabica*), ya que, esta enfermedad provoca un debilitamiento de la planta, la maduración del fruto es irregular y, por ende, una disminución en la producción. Además, el uso de agroquímicos puede conllevar a la resistencia de las distintas plagas que afectan los cultivos, por esta razón, en el estudio realizado por Alcantara et al. (2020), de la Universidad de Costa Rica, se evaluó el efecto del hongo entomopatógeno en distintas dosis sobre la incidencia de la plaga, logrando en todos los aislados una eficiencia biológica de 60%, un porcentaje de germinación mayor al 80% y la viabilidad de los conidios fue alrededor del 50%.

También se han llevado a cabo ensayos en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) (Romero, 2020) en el que se evaluaron aislados de *Lecanicillium* sp para determinar la capacidad de parasitismo sobre uredosporas y pústulas de roya, obteniendo un porcentaje de parasitismo de uredosporas hasta del 88.33%. También se evaluó la capacidad parasítica de los aislamientos de *Lecanicillium* sp. en campo, en donde se presentó una disminución de la enfermedad de hasta el 57.18%. Además, se obtuvo la producción de conidios en los sustratos como soya, sorgo, arroz, siendo el sustrato a base de soya con la mayor concentración de $1.08E+0^9$ conidios por gramo y un porcentaje de viabilidad (99.7%)

1.2. Justificación

En Costa Rica, las plantaciones azucareras son una de las principales fuentes en la generación de divisas y del Producto Interno Bruto, ya que, desde principios de la década de 1960, las actividades agrícolas han tenido un auge dentro del desarrollo industrial del país (Harris & Fuller, 2014). También se caracterizan por ser multiplicadores del empleo, con aproximadamente 25.000 trabajadores directos y cerca de 100.000 empleos indirectos en el país (Aguirre, 2018), además de garantizar energía limpia, combustible, productos químicos a partir de su biomasa (Lagos-Burbano & Castro-Rincón, 2019).

Para el año 2017 se reportó que se habían sembrado un total de 63.300 ha para la agroindustria de la caña de azúcar en las seis regiones de Costa Rica (Guanacaste, Zona Norte, Pacífico Central, Turrialba-Juan Viñas, Zona Sur y Valle Central) (Bermúdez, 2020). Además, en la zafra 2019-2020 se produjo un total de 4.092.123 TM (Toneladas Métricas) de caña de azúcar (LAICA, 2019)

Con base en lo anterior, 2.754.991 TM fueron producidas por los ingenios (67,3% del total) y 1.339.585 TM producidas por 5.393 productores independientes (32,7% del total): 5.277 pequeños (0 a 1.500 TM/año); 103 medianos (1.501 a 5.000 TM/año); y 13 grandes (más de 5.000 TM/año) (LAICA. 2023). Así mismo, en la información provista en el Portal Estadístico de PROCOMER (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica), en el año 2020 se exportó a América del Norte, el Caribe y la Unión Europea, un total de 597 toneladas de azúcar, equivalentes a USD 251.200 (Vallejo et al., 2021).

Según reporte de LAICA durante el periodo de Zafra 2010-2020, se realizaron entregas \leq a 5.000 toneladas de productores independientes y entregas mayores a 5.000 toneladas de productores no independientes (figura 2).

Sector productivo	Caña procesada en toneladas métricas según zafra						
	2010-11	2011-12	2012-13	2013-14	2014-15	2015-16	2016-17
Independientes	1.229.300	1.299.723	1.365.719	1.432.747	1.335.010	1.275.146	1.171.269
No Independientes*	148.257	278.035	385.826	394.619	393.032	410.826	383.535
Caña Propia (Ingenios)	1.943.039	2.245.356	2.589.057	2.664.757	2.694.409	2.710.486	2.789.086
Total	3.320.596	3.823.114	4.340.603	4.492.123	4.422.451	4.396.458	4.343.890

Sector productivo	Caña procesada en toneladas métricas según zafra					
	2017-18	2018-19	2019-20	2020-21	Promedio	% del total
Independientes	1.086.127	1.024.785	1.079.425	1.029.315	1.211.688	29,42
No Independientes*	253.891	257.273	260.160	325.601	317.369	7,70
Caña Propia (Ingenios)	2.714.123	2.743.388	2.752.538	2.640.105	2.589.668	62,88
Total	4.054.141	4.025.447	4.092.123	3.995.020	4.118.724	100,00

Corresponde a entregas mayores a 5.000 toneladas métricas de caña.

Fuente: Departamento Técnico LAICA (2022).

Figura 2. Distribución de la producción agroindustrial según sector productivo del periodo 2010-2020.

Sin embargo, los agricultores se enfrentan a los problemas causados por enfermedades virales, bacterianas, fúngicas y plagas por insectos (Aday et al., 2017). Entre los principales virus que afectan las plantaciones de caña de azúcar se encuentra el que se conoce como el virus del mosaico de la caña (SCMV, SrMV, MDMV), hoja amarilla (ScYLV); en el caso de las bacterias se identifica la enfermedad conocida como escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans*), también se observan daños que generan los insectos como el barrenador (*Diatraea* spp.), el salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.), jobotos (*Phyllophaga* spp.) entre otros (Badilla, 2002), así como los áfidos, los cuales generan daños directos e indirectos, ya que, también se consideran vectores de algunos de los virus anteriormente mencionados (Lutz, 2017).

Si no se controla de manera adecuada las infestaciones por áfidos, se pueden llegar a producir pérdidas desde 20% hasta 100 % del rendimiento en el cultivo, tomando en cuenta las prácticas de control de plagas que el productor emplea (Lee et al., 2023). En Argentina también se reportan pérdidas de rendimiento entre 30 y 100% a causa de *M. sacchari* en sorgo. (Cuitiño et al., 2022).

Por esta razón, algunas de las estrategias que se utilizan para mitigar el efecto de estas plagas, se basan en utilizar variedades que sean resistentes, eliminar las plantas que se encuentran enfermas para evitar la transmisión mecánica con las herramientas de corta, tratamiento térmico de esquejes, trampas con feromonas, plaguicidas, trampas de color, cultivo *in vitro* y diagnóstico molecular (Duran & Chaves, 1996).

Pero, en algunas ocasiones estas prácticas no son tan eficientes y la aplicación de plaguicidas en altas concentraciones causan daño al ambiente, por lo que, utilizar controladores biológicos es esencial para reducir de manera responsable y adecuada las plagas que provocan daños primarios y secundarios en los cultivos y brindar una solución pronta a los productores (Cárdenas, 2018).

A pesar de los esfuerzos por controlar las plagas y enfermedades en los cultivos, los áfidos siguen generando daños primarios en los cultivos de caña de azúcar, también se pueden observar efectos secundarios, ya que, no solamente se consideran vectores de virus, sino que también afectan los cultivos porque se alimentan de los fluidos del sistema vascular de la hoja, específicamente, del floema de la planta, posteriormente, una parte de las sustancias nitrogenadas de la savia se filtran y, finalmente, se excretan sustancias azucaradas compuestas de carbohidratos, conocida como ligamaza (Tena et al., 2018). Este compuesto es sumamente atractivo para hongos saprófitos como la fumagina (*Capnodium* sp.), el cual, forma una capa de crecimiento sobre toda la superficie de la hoja, impidiendo el proceso de fotosíntesis en la caña de azúcar (Akbar, et al., 2010). Así mismo, estas sustancias también generan relación de simbiosis con hormigas (*Nylanderia fulva*), debido a la secreción azucarada de los áfidos aportan (Völkl et al., 1999).

Por esta razón, el control biológico de dichos áfidos es esencial para evitar pérdidas en la cosecha de caña de azúcar durante los meses de enero, febrero, marzo y en ocasiones abril (periodo de zafra), siendo *L. lecanii*, un hongo entomopatógeno que parasita y genera epizootias sobre las especies de áfidos (Matarrita & Vásquez, 2021). En el estudio de (Raigoza, 2023), reporta que el control biológico de la plaga se logra a través de la aplicación de *L. lecanii* por la

septicemia en los insectos que infecta, considerando los porcentajes de eficacia, productividad y la relación beneficio-costeo.

Sin embargo, no se ha estandarizado un procedimiento óptimo para la producción de este, teniendo en cuenta variables como la temperatura de crecimiento, pH óptimo del medio, humedad, tipo de sustrato y otros, por lo que, el propósito de este trabajo es llevar a cabo su producción considerando todas las variables anteriormente mencionadas (Javed et al., 2019).

Finalmente, además de optimizar un protocolo para la producción masiva de *L. lecanii* para su utilización como controlador biológico de plagas de la caña de azúcar, es necesario emplear el uso de técnicas moleculares que permiten analizar ácidos nucleicos para identificar las diferentes especies de *Lecanicillium* sp. que se pueden encontrar en la naturaleza, esto con el fin de producir y aplicar el microorganismo indicado que va a cumplir su función en campo (Leal et al., 2008). Así mismo, los marcadores moleculares (primers) que se utilizan en las diferentes metodologías de biología molecular y en biotecnología, son fundamentales para identificar una secuencia particular de ADN en un conjunto de ADN desconocido (Minarni et al., 2021).

Bajo este contexto, la finalidad del presente trabajo de investigación es identificar molecularmente cepas de *L. lecanii* y discernir cuáles son los requerimientos óptimos de pH, temperatura, humedad, sustratos y medios nutritivos adecuados para realizar la producción masiva del hongo entomopatógeno como potencial controlador biológico de áfidos.

1.3. Planteamiento del problema

Debido a los problemas provocados por las plagas de áfidos en cultivos de caña de azúcar es necesario llevar a cabo una metodología estandarizada que permita la identificación molecular y la producción del hongo entomopatógeno *L. lecanii* con los sustratos y medios de cultivo adecuados, por lo que, la pregunta de investigación es la siguiente: ¿Cuáles son las condiciones y

sustratos óptimos para la estandarización de la producción masiva e identificación molecular del hongo entomopatógeno *L. lecanii* utilizado en el control de áfidos?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar un sistema que permita la producción masiva de *L. lecanii* y su potencial uso como agente de control de áfidos en el cultivo de caña de azúcar.

1.4.2. Objetivo específico

1. Identificar mediante técnicas moleculares el hongo entomopatógeno *L. lecanii* a partir de dos cepas criopreservadas de *Lecanicillium* sp.
2. Determinar las condiciones óptimas de temperatura, pH, humedad y medios nutritivos adecuados para el crecimiento y desarrollo del hongo identificado como *L. lecanii*.
3. Definir los sustratos para la producción masiva de unidades infectivas del hongo entomopatógeno *L. lecanii*.

2. Marco teórico

2.1. Características generales de la caña de azúcar

La caña de azúcar pertenece a la Familia: Poaceae (Gramineae), (Arif et al., 2019). Estas plantas se caracterizan porque crecen hasta alcanzar 3-5 metros de altura y de 4-12 tallos, cada uno compuesto por una gran cantidad de entrenudos, en su parte interna es dulce y el jugo se encuentra compuesto por sacarosa (más abundante), glucosa, fructosa, ácidos orgánicos y polisacáridos que se detallan en el cuadro 1 (Elahi & Mughal, 2017). Así mismo, en los últimos años se potencia su uso para biocombustibles y afines (Mirajkar et al., 2019).

Cuadro 1. Composición jugo de caña de azúcar (Makur, 2019).

Components	Composition in Cane Stalk	Components	Composition in Cane Stalk	Composition in Cane Juice	
Water	65- 75	Ash	0.4 - 0.8	Water	75 - 88
Total sugars	12- 16	Minerals (Fe, Ca, K, P, Na, S, Mg, Cl)	0.01 - 0.25	Sucrose	10 - 21
Sucrose	11 - 14.5	Fats & Waxes	0.15 - 0.25	Reducing sugars	0.3 - 3.0
Glucose	0.2 - 1.0	Gums	0.15 - 0.25	Organic Matter other than sugar	0.5 - 1.0
Fructose	0.5 - 0.6	Nitrogen cpds	0.3 - 0.6	Inorganic compounds	0.2 - 0.6
Fibers	8- 14	Free acids	0.06 - 0.1	Nitrogenous bodies	0.5 - 1.0
Cellulose	5.5	Amino acids (Aspartic acid)	0.2		
Lignin	2.0	Albuminoids	0.12		
Hemicellulose	2.0	Amides (Asparagine)	0.07		
Gums	0.5	Nitric acid	0.01		
		Ammonium	Trace		
		Other acids	0.1 - 0.15		

Dado la importancia socioeconómica de esta actividad, es necesario identificar cuáles son los puntos más vulnerables a los que el sector agrícola se enfrenta y perjudican la producción, entre ellos se puede mencionar el tipo de suelo utilizado, las variedades empleadas, el impacto por el cambio climático que reducen los rendimientos óptimos del cultivo, aumenta la proliferación de la maleza (Vignola et al., 2018). También se destacan las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus, e incluso plagas como ácaros, chinches, ratas, el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea* spp, que, además de generar daños directos también provocan daños secundarios, siendo necesario desarrollar estrategias para mitigar la vulnerabilidad y promover su competitividad (Lutz, 2017).

2.2. Principales enfermedades provocadas por hongos en la caña de azúcar

Entre las principales enfermedades causadas por hongos se encuentran la roya naranja, la cual es generada por el patógeno *Puccinia kuehnii* y su sintomatología se caracteriza porque en las etapas iniciales se presentan pequeñas lesiones elongadas amarillas, luego se forma una aureola pálida que se torna de una coloración verde a amarilla y por último una tonalidad naranja

cuando la enfermedad se desarrolla y avanza en la planta (Valdés et al., 2017). Estas lesiones se generan en la epidermis de las hojas de la caña de azúcar, lo que resulta imposible para la planta llevar a cabo su proceso de fotosíntesis de manera eficiente y en su superficie foliar toma una apariencia áspera (Aday et al., 2017).

Otra de las enfermedades causadas por hongos es *Ustilago scitaminea*, conocida popularmente como carbón de la caña de azúcar (Honorio, 2013). Este parásito sistémico produce necrosis y clorosis sobre las láminas de las hojas, además, durante el desarrollo de la infección el micelio penetra intracelularmente los tejidos meristemáticos de la planta, dando como resultado la formación de una estructura en forma de látigo en la parte del ápice del tallo que permite la liberación de las esporas y continuar con su ciclo (Elizabeth, 2020).

También se pueden mencionar el Cogollo Retorcido o Pokkah Boeng que es causado por el hongo *Fusarium moniliforme* y la planta adquiere una coloración pálida, inhibición en el crecimiento, los nodos se tornan de color rojo oscuro y se observa tallos de caña huecos y secos (Miranda et al., 2020). Además, la Mancha Ojival (*Bipolaris sacchari*), son manchas cloróticas en la base de la hoja, se presentan deformaciones en el cogollo y puede concluir en la muerte del ápice por pudrición (Ovalle & de CENGICANA, 2017).

2.3. Principales enfermedades provocadas por bacterias en la caña de azúcar

Además de las fitopatologías anteriormente mencionadas, también se encuentran las causadas por las bacterias, como por ejemplo *Xanthomonas albilineans*, la cual genera la enfermedad conocida como escaldadura foliar y se caracteriza por generar líneas delgadas paralelas a la nervadura central de la hoja y en la mayoría de los casos se observan de una coloración blanca, que incluso pueden encontrarse hasta la zona de la vaina y tallo (Macías et al., 2011). También se ha observado en las variedades de caña susceptibles a esta enfermedad un acortamiento de entrenudos y enanismo de los tallos en comparación con su crecimiento normal (Alvez et al., 2011).

Con base en lo anterior, también se destaca el Raquitismo de las socas (RSD por sus siglas en inglés ratoon stunting disease) causado por *Leifsonia xyli subsp. xyli*, la cual se alberga en los tejidos del xilema y genera que los haces vasculares del tallo se obstruyan (Joya et al., 2015). Además, esta enfermedad sistémica no muestra síntomas externos y en muchas ocasiones no se logra detectar, sin embargo, anualmente se reporta pérdida del vigor y número de tallos, esto debido al efecto que causa la bacteria en la disminución del diámetro del tallo y acortamiento entre los entrenudos, sin afectar el porcentaje de azúcar que posee cada tallo (Iglesia et al., 2007)

2.4. Principales enfermedades provocadas por virus en la caña de azúcar

No se puede dejar de lado el daño causado por los virus, ya que, uno de los principales problemas a los que se enfrentan los productores se encuentra el virus de la hoja amarilla (ScYLV por sus siglas en inglés) y el virus del mosaico de la caña (SCMV por sus siglas en inglés), tal como lo mencionan Durán & Chaves (1996). Los síntomas de ScYLV se caracterizan por un acortamiento de entrenudos, clorosis, tallos y sistema radicular menos desarrollados que en una planta sana, además puntas quemadas alrededor de la lámina foliar, amarillamiento de la nervadura central, siendo este uno de los primeros rasgos que se observan al inicio de la enfermedad y continúa en la lámina foliar (Chavarría et al., 2006).

Así mismo, el SCMV muestra síntomas muy similares a ScYLV, ya que, como se muestra en la figura 3, presenta decoloraciones en la lámina foliar y zonas de color verde en contraste con áreas verde pálido o amarillentas y es causada por la asociación de tres virus, por sus siglas en inglés: Sugarcane mosaic virus (SCMV), Sorghum mosaic virus (SrMV) y Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) (Perales-Rosas et al, 2018).

Además, se han identificado la presencia de insectos vectores que provocan la transmisión indirecta de estos virus, tales como el áfido gris (*M. sacchari*) considerado transmisor de ScYLV, el pulgón amarillo (*S. flava*) vector de ScMV y el áfido negro del maíz (*R. maidis*) transmisor de ambos virus (Medina, 2017).



Figura 3. Sintomatología de ScMV y ScYLV en caña de azúcar. Imagen tomada por Salazar, 2012 y Durán, 2011 (<https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/CIGSAsuppYOILTPyGTUwniOpqeBpKOlO>).

2.5. Descripción general de los áfidos

Los áfidos se consideran cosmopolitas y generan un impacto significativo sobre sus plantas hospederas cuando los cultivos se encuentran afectados por estos insectos (Clarke et al., 2020). Además, su problemática también radica por transmitir virus fitopatógenos al succionar la savia de los tejidos del floema, provocando pérdidas en la producción de caña de azúcar, maíz y arroz, melón, cítricos y otros (Blanco-Metzler & Morena-Montoya, 2019).

Los áfidos son pequeños insectos de cuerpo blando pertenecientes al orden Hemíptera y a la superfamilia Aphidoidea (Pucheta et al., 2006); así mismo, miden de 2,0 a 3,0 mm, cuentan con un par de sifúnculos con poros en los extremos que están ubicados en la parte dorsal del abdomen, antenas filiformes de 3-6 segmentos, el rostro asemeja formarse entre las coxas anteriores, alas anteriores están formadas por una sola vena longitudinal bien desarrollada, ojos compuestos con tubérculo ocular de tres facetas, el color característico es verde para camuflarse en el envés de hojas de toda la planta, por lo que, a veces resulta difícil su detección (Voegtlin et al., 2003).

En cuanto a su ciclo de vida se caracterizan por ser complejo por la manera que sobreviven a las condiciones ambientales que se presenten y tener la capacidad de aprovechar a disponibilidad de plantas en zonas que presentan cambios de estacionalidad (Quaghebeur et al.,

2018). Entonces, cuando las condiciones ambientales no son óptimas se reproducen de manera anfígónica en donde intervienen tanto macho como hembra. (Shuo et al., 2020).

Sin embargo, cuando las condiciones son adecuadas y de alta disponibilidad de alimento, la reproducción se lleva a cabo mediante partenogénesis, donde sus huevos se caracterizan por ser diploides, ya no necesitan la participación de un macho de esta especie (Watanabe et al., 2018). Además, en el caso de Costa Rica, existe una gran diversidad de áfidos que provienen de las zonas templadas y su ciclo de vida es complejo, esto a pesar de que en el clima tropical desaparece la fase sexuada y solamente se reproducen por medio de partenogénesis, tal como se representa en la figura 4 (Carreño, 2020).

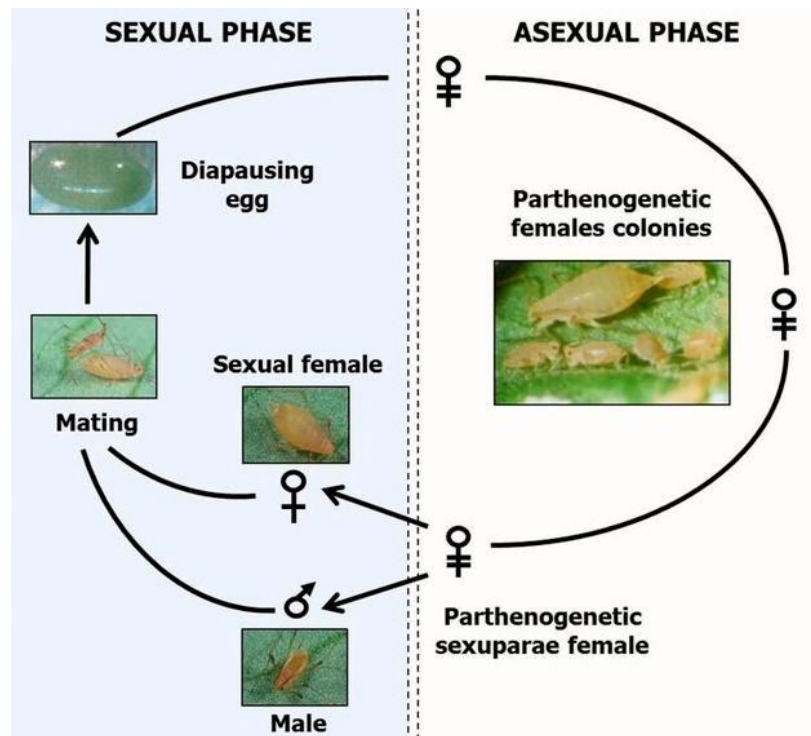


Figura 4. Ciclo de vida de los áfidos. Imagen tomada de Tagu et al.,2014.

También se han identificado ciclos en la vida de los áfidos en dependencia de las migraciones que realicen las generaciones con respecto a su planta hospedera, ya que, si no cambian de planta durante todas las generaciones hasta que se desarrollen completamente, se

conoce como ciclo monoico, sin embargo, el ciclo es dioico cuando las generaciones migran a otra especie vegetal para completar su ciclo de vida (Carreño, 2020).

2.6. Daños primarios y secundarios de los áfidos en el campo

Es importante destacar que, cuando los áfidos se alimentan directamente del sistema vascular de la hoja, específicamente del floema de la planta, excretan una sustancia azucarada conocida como ligamaza que se encuentra compuesta principalmente por carbohidratos, aminoácidos y el agua proveniente del floema (Styrsky & Eubanks, 2007). Estas sustancias ricas en sacarosa son sumamente atractivas para otros insectos y hongos saprófitos como las hormigas y fumagina, respectivamente (Pringle et al., 2014).

En la figura 5 se muestra la relación de simbiosis de las hormigas (figura 5.A) y los áfidos (figura 5.B), ya que, las primeras palpan con sus antenas la ligamaza que liberan los áfidos (Detrain et al., 2010). Así mismo, los áfidos también se ven beneficiados porque las hormigas protegen a estos de posibles depredadores y parasitoides, e incluso brindan limpieza para evitar la aparición de hongos u otro microorganismo y así mantener esta interacción (Woodring et al., 2004)

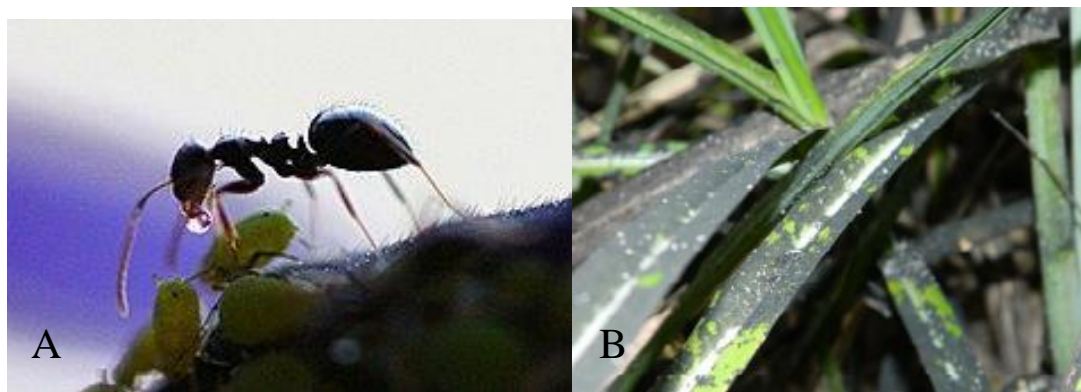


Figura 5. A) Hormiga consumiendo ligamaza de áfidos y B) Cobertura del hongo fumagina sobre hojas de planta. Imagen tomada de Salazar, 2012 (<https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/trOFDQCykoOthkiwKcfluCDjfVJhBdZY>).

Este compuesto también es sumamente atractivo para hongos como la fumagina, el cual forma una capa sobre la hoja, impidiendo el proceso de respiración y de fotosíntesis de la hoja principal de la caña de azúcar (Völkl et al., 1999). Esto provoca que el crecimiento de la planta no sea óptimo, siendo los hongos *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Antennariella*, *Limacinula*, *Scorias* y *Capnodium*, los géneros que se encuentran principalmente involucrados en el consumo de ligamaza generada por los áfidos (Nelson, 2008).

En cuanto a la forma de diseminación de este hongo, se puede llevar a cabo mediante corrientes de agua o aire, por medio de insectos que transportan esporas y transmiten la enfermedad cuando se alimentan del floema de la planta (Moir et al., 2018). Además, se caracterizan por ser saprófitos y no patógenos, ya que, la fumagina no genera infección porque no penetra los tejidos vegetales y solamente se alimenta de las sustancias azucaradas generadas por los insectos (El-Gali & Mohammed, 2017). También produce una película de manchas negras sobre el haz de la hoja de polvo muy fino, retrasando el crecimiento y menor resistencia dejando a su hospedero susceptible a otros parásitos (Nelson, 2008).

2.7. Técnicas empleadas para el control de áfidos

Existen diversas técnicas que se emplean para mitigar el efecto de los áfidos, entre ellas se encuentran las trampas adhesivas cromáticas, ya que, dichos insectos se ven atraídos por el color amarillo o verde amarillento. También se pueden mencionar las trampas de succión que su función se basa en aspirar el aire a través de una malla horizontal en donde quedan los áfidos atrapados (Salazar, 2009).

En ocasiones es necesario aplicar productos químicos que se basan en insecticidas de gran espectro como el Imidacloprid, Clotianidina y Tiametoxam (neonicotinoides), el Fipronil (fenil pirazol), pero también supone un mayor riesgo para los insectos no objetivo como las abejas (*Apis mellifera*), además de ser dañinos para organismos acuáticos y edáficos. (Botías & Sánchez-Bayo, 2018).

El empleo constante de estos químicos no solamente genera daño al medio ambiente, sino que también a las personas, con síntomas tales como intoxicaciones, infertilidad y presencia de estas sustancias en metabolitos involucrados en fluidos biológicos (Pardo et al., 2020). Por lo tanto, en los últimos años se ha prohibido o bajado las concentraciones de estos productos por su perfil toxicológico y persistencia ambiental (Rojas, 2018).

También se emplean productos biológicos como una herramienta para el control de estos insectos, ya sea por medio de bioinsecticidas a base de agentes microbianos o entomopatógenos como ingrediente activo, o bien metabolitos del microorganismo para reducir el efecto negativo generado por los áfidos y que no causen daño al ambiente y suelo, así como a la diversidad de organismos que se encuentran en él.

2.8. Características generales de los hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas en la agricultura

El rol que desempeñan los hongos entomopatógenos para el control de plagas en el área agrícola es de gran importancia para reducir el impacto producido por las altas poblaciones de plagas. Entre las especies empleadas para el control biológico se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma* spp., entre otras, siendo *L. lecanii* utilizado por su potencial para reducir las plagas de estos insectos (Yadav et al., 2019).

Estos microorganismos se caracterizan por presentar talos pluricelulares, filamentos formados por cadenas de células y existe una diferenciación celular para llevar a cabo distintas funciones como absorción de nutrientes, formación de hifas, generar cuerpos fructíferos y conidios (Altamira et al., 2020). Además, los hongos filamentosos están conformados por una parte vegetativa, la cual es incolora, compuesta por hifas y el conjunto de estas forman el micelio, además de otra parte reproductiva constituida por estructuras de reproducción sexual y asexual. (Sepulveda et al., 2019).

El mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos empieza cuando los conidios son dispersados por el aire, insectos o lluvia que transportan estas esporas hasta la cutícula de su

hospedero y comienza su ciclo de infección (Ames de Icochea, 2004). Una vez que se adhiere, continúa con la formación del apresorio (hifas achatadas que rompen la cutícula de su hospedante) a partir de la diferenciación del tubo germinativo, el cual le permite penetrar al interior de la cutícula del insecto, producir toxinas y causar la muerte del insecto. Posteriormente, las blastoporas colonizan el hemocele y culminan con la formación de hifas desde la parte interna a la parte externa del insecto, para la dispersión de conidios sobre el cadáver de este y así, continuar con su ciclo (Carreño, 2020).

En la figura 6 se esquematiza el proceso de interacción de la respuesta inmune innata de los insectos ante el ataque de infecciones fúngicas, en donde se incluyen las defensas humorales y celulares (Qu & Wang, 2018). En este mismo estudio se detallan las estrategias empleadas por los huéspedes, que se basan en reacciones multifactoriales, desarrollo de inhibidores de proteasas de insectos (IMPI) hacia las metaloproteasas de los hongos y Toll, (Toll-like Receptors, TLRs) que es esta vía inmunitaria del hospedero ante la invasión de los hongos entomopatógenos (Qu & Wang, 2018).

En el proceso de infección, la proteína de unión gramnegativa 3 (GNBP3), perteneciente a la familia de proteínas de reconocimiento β -1, 3-glucano (β GRP), se une a los componentes de las células fúngicas y se inicia la vía de señalización Toll, para lo cual, dos CLIPs (Inmunoprecipitación de Entrecruzamiento), Persephone y Spaetzle, la enzima de procesamiento (SPE), generan la ruptura de una citocina del nudo de cisteína, que se conoce como Spaetzle (Spz) y provoca la activación del receptor transmembrana Toll cuando Spz escindido proteolíticamente se une con el receptor (Qu & Wang, 2018). Seguidamente, se desencadena una cascada de transducción de señales intracelulares compuesta por adaptadores MyD88 (Proteína de Diferenciación Mieloide 88), Tube y la quinasa Pelle, que tiene como finalidad la expresión de los AMPs (Adenosín monofosfato) que son péptidos antimicrobianos que producen cuerpos grasos, las células de la epidermis y los hemocitos) llevada a cabo por los factores de transcripción NF-Kb (Factor Nuclear de Transcripción kappa B): Dorsal y Dif (Qu & Wang, 2018).

De esta manera, las esporas fúngicas que ya están en la hemolinfa pueden ser detectadas por los hemocitos, quienes van a inducir a la fagocitosis celular y encapsular a los huéspedes invasores, junto con moléculas involucradas en el sistema inmunológico para eliminar la infección del hongo entomopatógeno (Shin et al., 2020). Para que las esporas fúngicas puedan causar infección dentro de su huésped, el hongo debe de eludir las defensas anteriormente mencionadas, para lo cual, cuentan con la estrategia de convertirse en levaduras tipo blastosporas en el hemocele del insecto y acelerar su proliferación para evadir estas defensas (Mascarin & Jaronski, 2016); también son capaces de liberar inmunosupresores y toxinas para poder suprimir el sistema inmunitario del insecto (Qu & Wang, 2018).

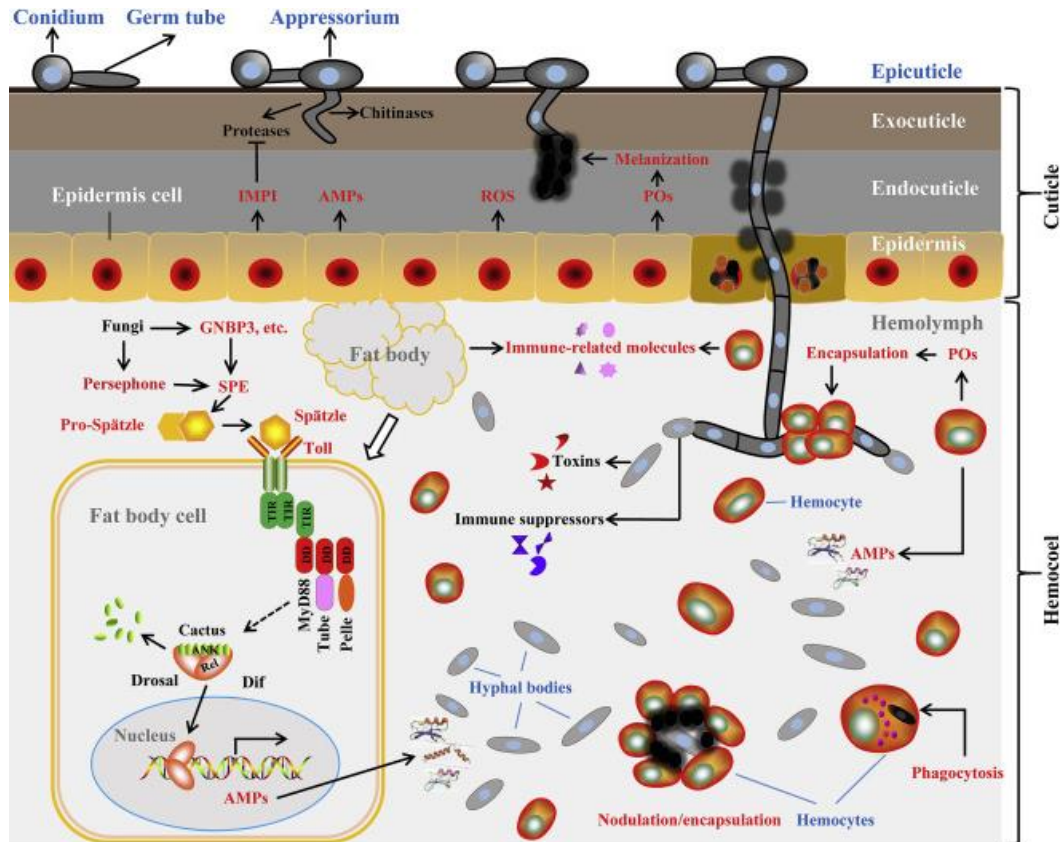


Figura 6. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos ante el sistema inmunitario de los huéspedes. Imagen tomada de Qu & Wang, 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X17305542>.

2.9. Características generales de *Beauveria bassiana*

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* perteneciente al orden Hypocreales, de la familia Cordycipitacea; muestra colonias algodonosas de coloración blanca cuando se encuentra creciendo en PDA (figura 7), luego, con el paso del tiempo se tornan de una coloración amarillentas y cremosas, y en algunas cepas, el envés se muestra de color rojo en la parte central y amarillo alrededor (Ramírez, 2020). Generalmente el diámetro de los conidióforos es de 1 a 2 μm , de los cuales nacen las células conidiógenas que se acumulan y forman grandes cuerpos compactos que se pueden ramificar y dar origen a conidiógenas secundarias o pueden encontrarse en forma solitaria, además, sus conidios son hialinos y se encuentran suspendidos en estas estructuras (Espinosa-Ortiz et al., 2011).

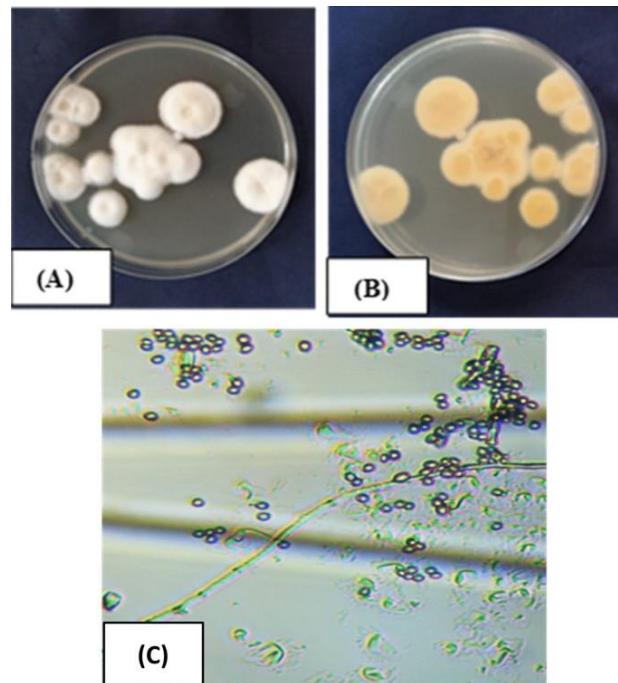


Figura 7. Morfología macro A) superior, B) inferior y C) microscópica de *B. bassiana*. Imagen tomada de: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-022-00617-4>.

2.10. Características generales de *Metarhizium anisopliae*

Se describió el género de *Metarhizium* en 1883 y forma parte del orden Hypocreales, de la familia Cordycipitaceae; su crecimiento en PDA se observa un micelio redondo con borde blanco y grupos de conidióforos que, al multiplicarse los conidios, se tornan de color verde (figura 8), su envés es incoloro, marrón o en algunas ocasiones verdoso (Aguilera-Cogley et al., 2020). A partir del micelio nacen unas estructuras que internamente produce las esporas, conocida como fiálide de forma cilíndrica con 6 a 13 μm de longitud y 2 a 4 μm de diámetro, además, los conidios son unicelulares, cilíndricos que forman largas cadenas verdes (Gao et al., 2011).

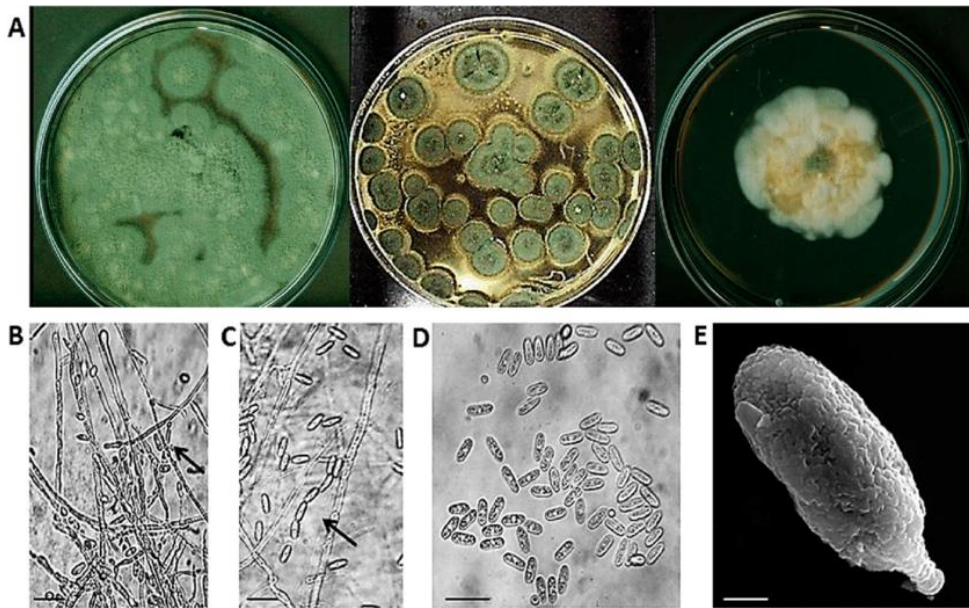


Figura 8. Morfología A) macro y B), C), D) y E) microscópica de *M. anisopliae*. Imagen tomada de: https://www.researchgate.net/figure/M-anisopliae-colonies-on-different-media-A-CYA-left-PDA-middle-and-Czapek-right_fig1_360398941.

2.11. Características morfológicas de *L. lecanii*

L. lecanii pertenece al orden Hypocreales, de la familia Cordycipitaceae y entre sus características macroscópicas se destacan la formación de colonias blancas con consistencia algodonosa, crecimiento expandido y plano, tal como se muestra en la figura 9. A. Además, sus cualidades microscópicas (Figura 9. B) destacan por presentar fiálides (células conidiógenas) erectas, anchas en la base y en el extremo son delgadas por donde se expulsan los conidios

conformados en grupos de dos a seis, aunque también hay algunos solitarios (Cañedo & Ames, 2004).

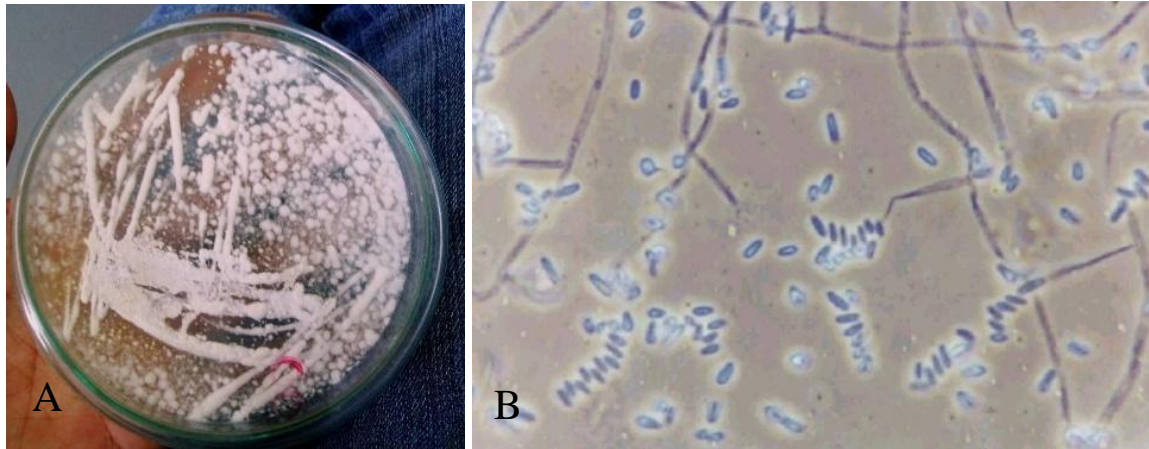


Figura 9. Morfología A) macro y B) microscópica de *L. lecanii*. Imagen tomada por Svetlana Y. Gouli, 2018, <https://www.ipmimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=12317>.

Las enzimas involucradas en el proceso de infección del hongo *V. lecanii* son proteasas, lipasas, quitinasas y amilasas degradantes de proteínas y polisacáridos (Altamira, 2020). Estas moléculas son la base para el desarrollo de mico-insecticidas porque les confieren capacidad a los hongos entomopatógenos de penetrar la cutícula de su hospedador y obtener los nutrientes necesarios para desarrollarse y continuar con su ciclo infectivo (Saba et al. 2013).

2.12. Clasificación taxonómica

La ubicación taxonómica de *Lecanicillium lecanii* según Kepler RM et al. (2017), es la siguiente

Reino: Fungi

División: Ascomycota.

Subdivisión: Pezizomycotina.

Clase: Sordariomycetes.

Orden: Hypocreales.

Familia: Cordycipitaceae.

Género: *Lecanicillium*

Especie: *Lecanicillium lecanii*

En el 2017 *L. lecanii* fue clasificado por Kepler RM et al. (2017) como *Akanthomyces lecanii*. Además, su sinónimo homotípico es *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) por Zare & W. Gams en 2001 y como *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas.

2.13. Identificación molecular de *L. lecanii*

Después de reconocer las características morfológicas de *L. lecanii*, es necesario aplicar el uso de las herramientas moleculares para la adecuada identificación a nivel de género o especie del microorganismo que se aisló y purificó (Aguilera, 2021). Sin embargo, los procedimientos moleculares no constituyen protocolos estandarizados para el microorganismo que se requiere identificar, lo que dificulta su utilización en dependencia de la especie con la que se está trabajando (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014).

Además, los reactivos que se emplean son costosos económicamente y algunos casos se manipulan productos tóxicos, lo que hace fundamental la utilización de equipos de protección personal (Aguilera, 2021). A pesar de estas limitaciones, las técnicas moleculares han facilitado analizar con mayor claridad la diversidad genética, los patrones de distribución, composición, funcionamiento, relaciones filogenéticas y, por ende, una mayor comprensión de los requerimientos y necesidades de los microorganismos por estudiar (Sierra, 2007).

2.13. Papel de *L. lecanii* en el control de los áfidos

En cuanto al papel que juega *L. lecanii* sobre el control biológico de áfidos es de suma importancia, ya que estos últimos presentan características morfológicas, biológicas y ecológicas que los hacen susceptibles a este hongo entomopatógeno, el cual genera epizootias naturales que se evidencian en una disminución considerable en las poblaciones de áfidos (Díaz et al., 2009).

Cabe destacar que, su proceso infectivo inicia cuando el hongo libera enzimas como B-1,3-glucanasas, quitinasas, proteasas que generan alteraciones en la pared celular de los insectos y las células pierden turgencia, lo que conlleva a la desorganización del citoplasma y las células atacadas colapsan hasta reducir el protoplasma por el desarrollo y multiplicación de su antagonista, para concluir con la liberación de esporas sobre el cadáver del insecto, tal como se muestra en la figura 10 (Vargas, 2017).



Figura 10. Cadáver de áfididos parasitados por *L. lecanii*. Imagen tomada de Pecina et al., 2021.

Los hongos entomopatógenos como *L. lecanii* actúan como parásitos facultativos, por lo que, no existe ningún riesgo para otras especies de mamíferos, aves, plantas, humanos y en el campo demuestran la especificidad por su hospedero, razones por las que no se considera invasivo y puede ser utilizado sin ningún riesgo (Shi et al., 2009). No obstante, se ha informado sobre la capacidad de los hongos entomopatógenos de infectar o matar artrópodos no objetivo, por lo cual, se debe evaluar exhaustivamente el grado de riesgo, estrategias de aplicación razonable, el manejo integral de plagas y la capacidad de resistencia de los organismos no objetivo (Yan et al., 2023).

2.14. Aspectos por considerar para la producción de *L. lecanii*

Al momento de producir masivamente el hongo *L. lecanii*, es necesario considerar una serie de factores físicos que pueden influir directamente en la producción de conidios, como la temperatura, pH, fotoperiodo, humedad para lograr una germinación adecuada, sin embargo, antes de su producción es necesario obtener un cultivo monospórico, el cual se puede obtener de manera directa o indirecta (Marques et al., 2018).

En algunas ocasiones, la técnica directa no es la mejor opción porque la muestra puede acarrear contaminación por ser ambiental, pero se puede solucionar suplementando el medio con antibiótico. En cuanto a la técnica indirecta, se basa en emplear una solución de hipoclorito de sodio para desinfectar primero el insecto y se coloca sobre una cámara húmeda con papel filtro o algodón e incubar por unos días (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

Una vez que se cuenta con la cepa pura y libre de contaminación, se pueden llevar a cabo tinciones para observar la morfología de las hifas, fiálides y conidios para su identificación a nivel de género. Luego, complementando con las técnicas moleculares, se puede identificar la cepa tanto a nivel de género como de especie y conocer cuáles son sus requerimientos para su producción (Yoon et al., 2010).

2.15. Temperatura

Una temperatura adecuada para que el microorganismo inicie con su proceso infectivo se encuentra entre 15 y 26 °C, considerándose una óptima a 25-26°C. Además, la temperatura puede provocar un desarrollo más lento o que no sea la óptima para que el microorganismo crezca de la manera adecuada (Carrillo et al., 2007).

2.16. Humedad

El hongo debe de estar expuesto a una humedad relativa mínima de 85% durante alrededor de 10 a 12 horas por día, esto se debe a que los hongos necesitan producir grandes cantidades de esporas y de no haber humedad (Subramaniam et al, 2021), las esporas

permanecerán inactivas hasta que se presenten las condiciones favorables para su desarrollo (Cariajano & Ibelia, 2018). Cuando se emplea arroz como sustrato debe contar con una humedad entre 60-70% en el grano y 80-90% en el interior de la bolsa (Romero, 2020).

2.17. pH

Un pH adecuado para el desarrollo adecuado del hongo se encuentra entre 5 y 7 en donde el rango de pH puede potenciar una mayor o menor producción de biomasa, ya que, este determina la solubilidad de los nutrientes y, por ende, su capacidad de absorción (Pereira et al., 2007).

2.18. Germinación

La germinación sucede después de 0 y 10 horas de su inoculación y es sumamente susceptible a condiciones adversas, por lo que la calibración de cada proceso previo y las condiciones de ambiente (temperatura, humedad relativa y luminosidad) de los cuartos (salas) de almacenaje, es sumamente importante (Sucaticona, 2018). La colonización total del sustrato se da entre el segundo y cuarto día después de la inoculación; en este momento, es importante quebrar el bloque formado entre el micelio del hongo con el objeto de oxigenar a las capas más internas, pero, además, con el objetivo de seccionar en ciertos porcentajes a las hifas y lograr estresar al hongo, de tal forma que esto induzca a la producción de más conidios (Gonzalez et al., 2021).

2.19. Secado

La práctica de secado es un proceso que busca dos objetivos: incrementar la concentración de conidios por peso de producto final y, detener el metabolismo del hongo para que pueda ser almacenado por espacios de tiempo más prolongados (Alvarez et al., 2018).

2.20. Tipos de cultivo sólidos, líquidos y bifásicos

Cuando se realiza la producción masiva de hongos entomopatógenos para el control biológico de diferentes plagas en los cultivos, es importante considerar cuales son las condiciones físicas óptimas para generar un crecimiento micelial efectivo siendo esto los requerimientos nutricionales adecuados, condiciones necesarias de humedad y aireación, además del método de reproducción para producirse en cantidades masivas, el cual puede ser líquido, sólido o bifásico (Villalba et al., 2010).

Con base en lo anterior, en la mayoría de las especies se emplean medios sólidos como método de reproducción que permitan el crecimiento superficial del micelio y conidios en hifas aéreas (Ramírez et al., 2014). Sin embargo, se debe de considerar que, al momento de producir hongos entomopatógenos en medios sólidos, se pierde eficiencia en cuanto a la producción de conidios, lo que dificulta su automatización a una escala que satisfaga las necesidades del mercado (Monzón, 2000).

También se puede llevar a cabo mediante una producción en medio líquido y se debe de considerar que la composición de dicho medio, así como también el estrés hídrico y osmótico pueden conllevar a reducir su crecimiento, su capacidad de virulencia y germinación que son características fundamentales para que el hongo entomopatógeno pueda cumplir su función en el campo una vez que este sea liberado (Barajas et al., 2010).

Por estas razones, el empleo de medios bifásicos (producción en dos fases: líquido y sólido) es una de las técnicas que se ha empleado para la producción eficiente de estos microorganismos, en donde la ventaja de esta técnica se basa en combinar tanto medio sólido como líquido (Chong, 2003). Por esta razón, es necesario llevar a cabo la etapa de matriz líquida para que este crezca con una máxima producción de blastosporas y seguidamente, se dispensa a diferentes sustratos como avena, sorgo, trigo, arroz, lenteja y otros para la obtención de conidios aéreos (Sepulveda et al., 2019).

2.21. Sustratos para la producción de hongos entomopatógenos

Como se mencionó anteriormente, se emplean diferentes sustratos para la producción de conidios aéreos del hongo, tales como maíz, arroz, sorgo, salvado de avena y harina de trigo (Ocampos et al., 2013), siendo el arroz el que más se emplea para la producción masiva de los hongos entomopatógenos, sin embargo, también depende de los costos para su obtención, la zona y de la cepa que se desea utilizar para llevar a cabo su producción masiva (Laura & Blanco, 2017).

2.22. Control de calidad y aplicación en el campo

Una vez que se logra optimizar el proceso de obtención del hongo entomopatógeno, es necesario realizar pruebas de control de calidad para determinar si la viabilidad, concentración de conidios y pureza se encuentran en el rango óptimo para su empleo y eficacia en el campo para el control de plagas (Velez et al., 1997).

En cuanto a la viabilidad es un parámetro que se realiza mediante el conteo de esporas germinadas y no germinadas con respecto al total que se desea contar, en donde según CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) (Monzón, 2002), un porcentaje menor al 95%, no se considera viable y es necesario repetir de nuevo su producción y cambiar las variables que pueden estar afectando el resultado (Ames de Icochea, 2004). El conteo de conidios se realiza con ayuda de la cámara de Neubauer determinando la concentración de conidios por gramo del hongo, además, su pureza también es fundamental para comprobar la presencia o ausencia de contaminación por agentes externos que pueden afectar la producción del hongo (Ames de Icochea, 2004).

Ya que se tienen todas estas variables en el rango de aceptación, se procede con su liberación al campo. (Urtubia & France, 2007). Las aplicaciones se pueden realizar por medio de bomba manual, bomba automática o por aspersion con ayuda de un helicóptero, sin embargo, esta última no es la adecuada porque la distribución no es uniforme y las esporas del hongo quedan suspendidas solamente en la parte superior de las plantaciones (Dembilio et al., 2019).

Además, se aconseja aplicar *L. lecanii* a una dosis recomendada de 1 kg a 1.5 kg por hectárea con una concentración de 1×10^9 esporas viables por gramo y realizar las liberaciones durante la mañana o en la tarde para que la radiación solar no cause daño a las esporas y puedan llevar a cabo su función (Casarrubias et al., 2017).

3. Marco Metodológico

Se estandarizó un protocolo para la producción masiva del hongo entomopatógeno *L. lecanii* para su uso como controlador biológico de plagas de la caña de azúcar. Este protocolo consistió en la identificación molecular de la cepa utilizada, su inoculación en el medio nutritivo, preparación del inóculo, así como su desarrollo y esporulación en el sustrato correspondiente. Además, se realizó un control de calidad para determinar su viabilidad, pureza microbiológica y concentración de conidios por gramo.

3.1. Área de estudio:

Las actividades se realizaron en el Laboratorio de Control Biológico, Microbiología Agrícola y Biología Molecular del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA, LAICA) ubicado en Santa Gertrudis Sur, Grecia, Provincia de Alajuela. La Estación se encuentra a $10^{\circ}04'10.16''$ N y $84^{\circ}16'25.30''$ O a una altitud de 1.001 msnm.

Las actividades se realizaron siguiendo la metodología descrita por Gómez et al (2014) en el manual de producción y uso de hongos entomopatógenos por el Laboratorio de Entomopatógenos SCB, Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA en Perú, con algunas modificaciones.

3.2. Identificación molecular de *L. lecanii*

La cepa de *Lecanicillium* sp. criopreservada en el cepario (MICROBANK®), proporcionado por DIECA, la misma fue aislada en la Argentina de Grecia, Alajuela a partir de

áfidos parasitados en campo. La cepa fue reactivada transfiriendo asépticamente una de las perlas contenidas en los crio-viales a placas de PDAY (Agar Papa Dextrosa 39 g/L y Extracto de levadura 5g/L) mediante la técnica de placa llena, se sellaron con Parafilm y se incubaron (Incubadora BioBase L400) a 25°C por un periodo de 8 días. Después se caracterizó morfológicamente por observación macroscópica y microscópica realizando tinciones con azul de Lactofenol.

Para la extracción de ADN se inoculó asépticamente el hongo *Lecanicillium* sp. en medio líquido Sabouraud Dextrosa con agitación continua (Digisystem DSR-2800D) a 150 rpm durante 8 días a 25°C. Después de este tiempo, se tomó una alícuota de 1 mL del medio y se agregó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril, posteriormente, se precipitó el micelio por medio de centrifugación (Sorvall™ ST 16R, Thermo scientific) a 5000 rpm (4193 g) y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con agua ultrapura estéril y se descartó el sobrenadante. Al botón de hongo se le adicionó un buffer de extracción CTAB [2% p/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0; y 0,2% v/v b-mercaptoetanol], 2% PVP-40 y Proteinasa K (0.2 mg/mL).

Para cada muestra de ADN obtenida se llevó a cabo la medición de la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 230 nm respectivamente, empleando un espectrofotómetro UV-visible (Multiscan GO, Thermo Scientific). Para determinar la integridad del ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con una solución amortiguadora TBE 1X (Tris 10 mM, Borato 20 mM, EDTA 1.0 mM, pH 8,0. El gel fue teñido con GelRed (Biotium).

Para las reacciones de PCR, se siguió la metodología de Ramteke et al., 2022 con algunas modificaciones, para lo cual, se utilizó un volumen final de 50 µL, conteniendo 1X de Master Mix (ThermoScientific), 0,32 µM de cada cebador y 100-200 ng de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Arktik, Thermo Scientific), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante 3 min, 35 ciclos: 94 °C durante 30 s, temperatura de hibridación de 54°C durante 30 s y 72 °C por 1 min 30 s, con una extensión final de 10 min a 72 °C y finalmente almacenado a 4 °C.

La identidad de los amplicones (cuadro 2) obtenidos mediante PCR se confirmó mediante secuenciación (Macrogen, Korea). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Geneious v.R9 (Biomatters), posteriormente se analizaron a través del programa en línea BLASTn disponible en el NCBI y fueron comparadas con secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para llevar a cabo la identificación.

Cuadro 2. Cebadores, secuencia y pares de bases de la región que amplifica por PCR para la identificación molecular del hongo *L. lecanii*.

Primer (Cebadores)	Secuencia	Pares de bases (pb)	Región que amplifica
NL1	(5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3')	600	D1-D2 de la subunidad grande del ARNr*
NL4	(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')	600	D1-D2 de la subunidad

* Ácido ribonucleico ribosómico

3.3. pH y medio nutritivo

Se inoculó una placa de medio PDAY con el hongo *L. lecanii* e incubó durante 8 días a 27°C, cuando tapizó completamente el medio, se llevó a la cámara de flujo laminar y se procedió de la siguiente manera:

1. Se abrió asépticamente la placa Petri y se le agregaron 10 mL de solución del surfactante WK® 86% (250 uL/L).
2. Con el asa de Drigalsky estéril, se raspó toda la superficie de la placa para desprender las esporas de la superficie del medio de cultivo. Esto se realizó moviendo el asa de Drigalski a la izquierda por 30 segundos y luego a la derecha por 30 segundos, seguido de 3 lavados con solución de WK.
3. Se trasvasó el volumen de la solución de esporas con WK a un Erlenmeyer de 250 mL.

4. Se calculó mediante un recuento microscópico inoculando 10 uL en la cámara de Neubauer (Bright-Line TM Hemacytometer) para obtener la concentración por mililitros de esta solución y la dilución que se realizó para alcanzar una concentración de inoculación de 1×10^7 conidios/mL.
5. A partir de la dilución madre (1×10^7), se inocularon 100 uL en cada placa con cada medio nutritivo (SDAY y PDAY) a los diferentes pH y se esparció de manera estéril con el asa de Drigalski por toda la superficie.
6. Se prepararon 30 placas de medio PDAY a 3 diferentes pH (Medidor multiparamétrico de pH HANNA® instruments) y 30 placas de medio SDAY (Agar Sabouraud Dextrosa 65 g/L y Extracto de Levadura 5 g/L) a 3 diferentes pH, tal como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Composición y pH del medio nutritivo empleado para la producción de *L. lecanii*.

Medio nutritivo	Composición	pH	placas
PDAY	Papa (infusión de sólidos), dextrosa y agar -agar.	6,5	10
PDAY		5,5	10
PDAY		4,5	10
SDAY	Glucosa, pluripeptona y agar- agar.	6,5	10
SDAY		5,5	10
SDAY		4,5	10

7. Las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 27°C por 8 días.

3.4. Producción de biomasa y producción de conidios

3.5. Preparación del sustrato

Se evaluaron cuatro sustratos: harina de trigo, salvado de avena, semolina y arroz (grano entero 80/20) para el crecimiento y esporulación de *L. lecanii*, para lo cual, se procedió de la siguiente manera:

1. Se midió un peso equivalente a 300 g del sustrato y se depositó el contenido en bolsas de polipropileno de 35 micra, de 10 x 12,5 cm.
2. Se prepararon 270 bolsas que contenían 300 g del sustrato: harina de trigo, salvado de avena, semolina y arroz, variando los volúmenes de agua (humedad) solamente para el caso de este último (figura 11). Al resto de los sustratos no se les agregó agua para evaluar el crecimiento del hongo en ambientes más secos y polvorientos.
3. Luego, se selló el contenido mediante tres grapas y se autoclavó el material durante un periodo de 25 minutos a 121°C (Autoclave Huxley Modelo YTM-CS5B); bajo estas condiciones, el material fue esterilizado y se enfrió homogeneizando su contenido para posteriormente ser inoculadas con el hongo.
4. Además, el ensayo se realizó tres veces para validar su repetibilidad y reproducibilidad para un total de 810 bolsas con el respectivo sustrato.



Figura 11. Bolsas de polipropileno preparadas con 300 g de A) harina de trigo y B) arroz para la inoculación de *L. lecanii*.

3.5. Bolsa, sustrato e inóculo

Una vez que el hongo tapizó completamente la placa de PDAY a un pH de 6,5 se llevó a la cámara de flujo laminar y se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se abrió la placa Petri y se dividió en cuatro partes iguales con ayuda de una espátula limpia y estéril. Seguidamente, se depositaron los trozos del medio con el hongo dentro de un Erlenmeyer estéril de 250 mL.
2. Se agregaron 20 mL de agua destilada estéril con surfactante WK y se agitó constantemente para trasvasar el volumen de la solución de esporas a tubos Falcon de 50 mL estériles.
3. Se realizaron 3 lavados hasta completar los 50 mL de los tubos Falcon, luego se llevaron a centrifugar por 4 min a 5000 rpm.
4. De manera estéril, se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en agua destilada estéril con WK y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} .
5. Con la cámara de Neubauer se calculó la concentración por mililitros de esta solución y la dilución que se necesitó para alcanzar una concentración de $1E+07$ conidios/mL (equivalente calculado para inocular aproximadamente $1,6E+08$ conidios totales en cada bolsa de sustrato).
6. Posteriormente, se procedió a medir el volumen indicado de inóculo y se aforó con SSE (Solución Salina Estéril) hasta tener un volumen de 160 mL para un total de 10 bolsas por sustrato. Luego, con una bomba peristáltica (BT-S V2 Basic Variable-Speed Peristaltic Pump) y una jeringa estéril, se inyectaron 16 mL de la suspensión de esporas para una concentración de $1,6E +08$ esporas/mL por bolsa de sustrato esterilizadas y a temperatura ambiente.
7. Seguidamente, las bolsas inoculadas pasaron a la sala de homogenización
8. Las bolsas se homogeneizaron manualmente y se colocaron 10 bolsas por sala en cada una de las temperaturas (Aire acondicionado, York 12.000 BTU/H) a analizar, tal como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Cantidad de agua (mL), bolsas, tiempo de esporulación (días) y temperaturas (°C) de exposición del arroz como sustrato para el crecimiento y esporulación de *L. lecanii*.

Sustrato	Cantidad (g)	Agua (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo de esporulación (días)	Cantidad de bolsas
Arroz	300	90	20	15	10
Arroz	300	90	25	15	10
Arroz	300	90	30	15	10
Arroz	300	100	20	15	10
Arroz	300	100	25	15	10
Arroz	300	100	30	15	10
Arroz	300	110	20	15	10
Arroz	300	110	25	15	10
Arroz	300	110	30	15	10
Arroz	300	120	20	15	10
Arroz	300	120	25	15	10
Arroz	300	120	20	15	10
Arroz	300	130	25	15	10
Arroz	300	130	30	15	10
Arroz	300	140	20	15	10
Arroz	300	140	25	15	10
Arroz	300	140	30	15	10

También se realizó el mismo procedimiento para semolina, harina de trigo y salvado de avena como sustratos, tal como se representa en el cuadro 5.

Cuadro 5. Cantidad de sustrato (g), bolsas, tiempo de esporulación y temperaturas (°C) de exposición de la semolina, harina de trigo y salvado de avena como sustrato para el crecimiento y esporulación de *L. lecanii*.

Sustrato	Cantidad (g)	Temperatura (°C)	Tiempo de esporulación (días)	Cantidad de bolsas
Semolina	200	20	15	10
Semolina	200	25	15	10
Semolina	200	30	15	10
Harina de trigo	200	20	15	10
Harina de trigo	200	25	15	10
Harina de trigo	200	30	15	10
Salvado de avena	200	20	15	10
Salvado de avena	200	25	15	10
Salvado de avena	200	30	15	10

3.6. Homogeneización, esporulación y secado

3.7. Homogenización

Esta actividad consistió en agitar manualmente la bolsa que fue recién inoculada con el hongo y de esta manera, separar cualquier agrupamiento del sustrato e incluso, para evidenciar y tapar cualquier rotura o daño posible.

El lapso de agitación fue de 30 segundos para todas las bolsas; una sobre manipulación, pudo provocar la pérdida de parte del inóculo inicial, esto según el Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos del Laboratorio de entomopatógenos SCB-SENASA (Ramírez et al., 2014). Posteriormente, las bolsas ya homogeneizadas fueron colocadas en los estantes limpios, para que iniciara el proceso de germinación, cada estante contaba con una capacidad de 280 bolsas (40/piso).

3.8. Esporulaci3n

Las bolsas inoculadas fueron separadas por sala de acuerdo con la temperatura indicada (20, 25 y 30°C) regulado con aire acondicionado y en oscuridad los primeros 3 d3as para favorecer el desarrollo del micelio. Al finalizar el tercer d3a se encendi3 la luz y al cuarto d3a de incubaci3n, las bolsas fueron quebradas manualmente para favorecer la oxigenaci3n de todo el sustrato y despu3s de 15 d3as que complet3 la esporulaci3n, se llevaron a su etapa de secado. En esta etapa se revisaron las bolsas diariamente, eliminando las que presentaron contaminantes (principalmente por *Penicillium* sp.).

3.9. Secado

Con una tijera desinfectada con alcohol se cortaron las bolsas por debajo de las grapas y se pas3 el sustrato con el hongo a bandejas que hab3an sido previamente desinfectadas, para lo cual las bandejas se limpiaron y humedecieron con alcohol al 70%. Una vez que se realiz3 este proceso, se extendi3 en las bandejas (10 bolsas por bandeja), para favorecer la colonizaci3n y esporulaci3n del hongo y se dejaron en incubaci3n a 20 °C y 15% HR (Humedad Relativa) por 8 d3as.

Cada 2-3 d3as, se homogeneiza el material para favorecer un secado m3s eficiente y uniforme. Transcurrido este periodo, se tom3 la muestra para realizar el control de calidad del hongo.

3.10. An3lisis de control de Calidad

Las muestras fueron tomadas con tubos Falcon est3riles y sin tocar la parte interna del mismo se recolect3 alrededor de 10 g de cada muestra. Se analizaron un total de 405 muestras (cinco repeticiones por sustrato), para lo cual, dentro de la c3mara de flujo laminar y de manera est3ril, se pes3 (Balanza BOECO BLC 1500) 5 g gramos del producto en 50 mL de agua destilada est3ril con WK para una proporci3n de 1:10 m/v.

En tubos de ensayo con solución salina estéril al 0,85% se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} , diluyendo 1 mL de la solución más concentrada en 9 mL de Solución Salina Estéril (SSE).

3.10.1. Concentración de conidios (conidios/gramos)

Se limpió la cámara de Neubauer o hemocitómetro cuidadosamente con etanol al 70% y se dejó secar sin rayar la superficie, luego, a partir de la dilución 10^{-3} se homogeneizó y se agregó una alícuota de 10 μ L a la cámara por el borde del cubreobjetos para llenar por capilaridad el espacio entre la cámara y el cubreobjetos y se realizó el conteo celular.

Se realizó el recuento conidial contando los cuatro cuadros grandes de las esquinas (cuadros marcados el número 1, figura 12 A), tomando en cuenta solamente el interior del cuadro y dos lados del mismo cuadro (marcados con la L invertida, color verde (figura 12 B); siempre los mismos dos lados para los cuatro cuadros contados). En el caso que, una espora se encontraba sobre uno de los otros dos lados no será sumado. Con la cantidad de esporas contadas se calculó la concentración de conidios por ml mediante la siguiente fórmula (Gallego & Pérez, 2021):

$$Densidad = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas}}{\text{Superficie de conteo (mm}^2\text{)} \times \text{Profundidad (mm)} \times \text{Dilución}}$$

Células contadas: Promedio de conidios contados

Superficie de recuento: 4 mm² (4 cuadrados de 1mm² cada uno)

Profundidad de la cámara: 0,1 mm

Dilución: Dilución realizada

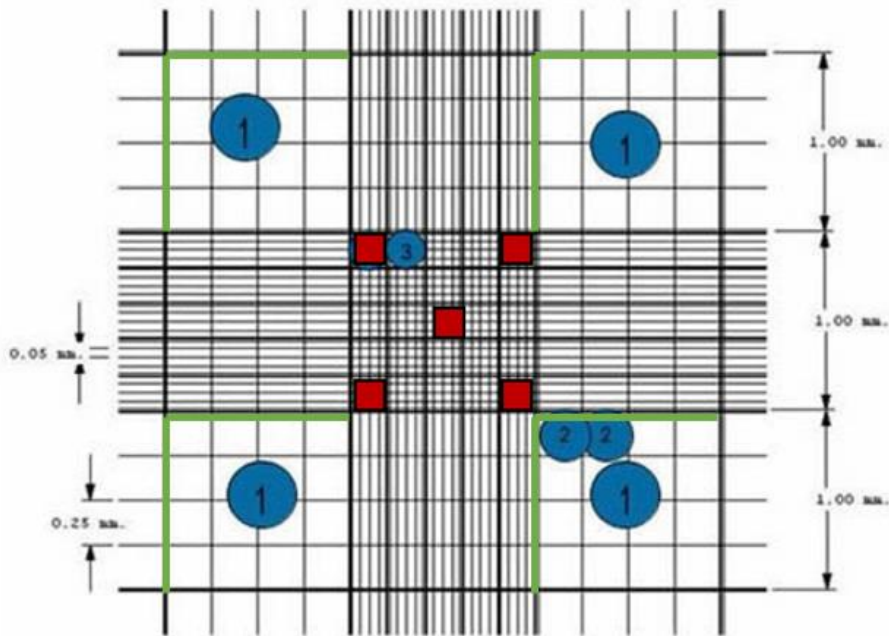


Figura 12. Conteo en cámara de Neubauer. Marcado con el número 1 donde se deben de contar las esporas y las L invertidas verdes que se tomaron en cuenta. Imagen tomada de: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf.

Para obtener el número de conidios por gramo del producto, se multiplicó el promedio del número de conidios por mililitro obtenido en el recuento dividido entre la superficie del conteo en mm^2 multiplicado por la profundidad en mm y por la dilución realizada (Ramírez Sánchez et al., 2019).

3.10.2. Viabilidad

Para determinar la viabilidad de las muestras, se tomó la dilución 10^{-3} y se inocularon 3 puntos de una placa con PDA con 5 μL de la solución (Figura 13.A) y se incubó durante 24 horas a 25 ± 2 °C.

Transcurrido el tiempo, se tomó la placa y se cortó con un sacabocados un círculo del medio de cultivo de aproximadamente 2,5 cm de diámetro alrededor de cada punto inoculado

(Figura 13.B). Luego, se colocaron los círculos de medio cortado en un portaobjetos (Fisherbrand™), se agregó dos gotas de azul de lactofenol al 50% y se le colocó un cubreobjetos encima a cada uno.

Se observó en el microscopio (OPTIKA) bajo el objetivo de 20X y se contaron al menos 100 esporas de cada círculo, se apuntaron las esporas totales y las no germinadas. Además, de los tres valores obtenidos se sacó un promedio y se tomó como porcentaje de viabilidad (Montesinos-Matías, 2014).

$$\% \text{ Germinación} = \left(\frac{a}{a + b} \right) * 100$$

a = número de conidios germinadas

b = número de conidios sin germinar

Si el resultado es igual o superior al 90% se consideró que la viabilidad del producto era aceptable.



Figura 13. Inoculación de placas para determinación de viabilidad. A. Lugar donde se colocaron los puntos con 5µL de muestra. B. Círculos que se cortaron. Imagen tomada de: Palmero et al., 2009).

3.10.3. Pureza

Para determinar la pureza se tomó la dilución 10^{-4} y se sembró por difusión en una placa Petri con medio PDA, tomando 100 μL de la solución, colocándolos en el centro de la placa, se esparció con el asa de Drigalsky por toda la superficie del medio y se incubó a 25 °C durante 7 días.

Durante el periodo de incubación se monitoreó constantemente el crecimiento en las placas para verificar que no hubiera contaminación de ningún tipo y se analizó visualmente el porcentaje de contaminación basado en el área de la placa contaminada.

Si la contaminación se observa antes de los 7 días y las UFC son contables, se determina el porcentaje de contaminación basado en la cantidad de UFC del contaminante con relación con las UFC totales, con la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza}(\%) = \frac{\text{Unidades formadoras de colonias del hongo evaluado}}{\text{Unidades formadoras de colonias totales}} * 100$$

En caso contrario, las placas permanecieron en incubación por un máximo de 8 días para realizar un adecuado conteo de las UFC, posterior a este tiempo, se consideró con 100% de pureza (Calixto, 2019). Y para los datos de los conidios viables puros por gramo (CVP) se obtuvieron multiplicando los valores de concentración, viabilidad y pureza.

3.11. Estudio de costos de producción de *L. lecanii*

3.11.1. Costos variables

Los costos variables varían de acuerdo con la cantidad de hongo que el laboratorio produzca, por lo cual, entre mayor volumen de producción, más elevado será el valor de los costos variables (Hasbun & Hasbun, 2022), tales como el arroz, medios nutritivos PDA y extracto de levadura, placas Petri desechables, tensoactivo (WK), agua destilada, alcohol 96% y

70%, cloro al 1%, aluminio, productos de limpieza, grapas, bolsas de empaque, bolsas de polipropileno, salario de personal y electricidad.

Se determinó el consumo diario, costo unitario, costo diario y el costo mensual de cada consumible, así como también el consumo energético en KW/h de cada equipo. Además, el salario de 5 asistentes que llevarán a cabo la producción de 400 bolsas de arroz con 300 g cada una, tomando como referencia la producción más baja dentro del Laboratorio de Producción de Hongos Entomopatógenos en DIECA-LAICA.

3.11.2. Costos fijos

Se analizó los costos fijos considerando todos los gastos que se mantienen constantes independientemente de la cantidad de hongo que se produzca (Valenzuela, 2015). Es decir, son los costos que se deben de cancelar de forma obligatoria en el laboratorio, como la depreciación de los siguientes equipos: cámara de flujo laminar, bomba peristáltica, cámara de Neubauer, microscopio, balanza electrónica, autoclaves, aire acondicionado, pHmetro, cajas plásticas (secado) y centrífuga; así como el salario de la jefatura a cargo de la producción, por lo cual, son gastos que no varían en función del mes porque no dependen de la producción.

En el caso de la depreciación de los equipos, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Gasto mensual de depreciación} = \left(\frac{\text{Valor real del equipo}}{\text{Tiempo de vida útil del equipo}} \right) \div 12 \text{ meses}$$

El valor obtenido se divide entre 12 para conocer la depreciación mensual.

Para obtener el costo total por determinada cantidad de conidios, se multiplicó el valor total por Kg de producto (C\$2.615,20) por los 5 Kg que se aplican en campo en un volumen de 400 L; luego se determinó cuál es la concentración y precio de conidios por metro cuadrado (m²),

además, el costo por conidia, la cual se obtuvo dividiendo el precio total entre los 300 g por bolsa, para finalmente, el valor obtenido, dividirlo por la concentración que se obtiene por bolsa.

3.12. Estadística

Los datos obtenidos de concentración de conidios, viabilidad, pureza y CVP fueron analizados por medio de la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si existía normalidad. Para discernir diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANDEVA) con el programa estadístico InfoStat (Mónica et al., 2008) y se aplicó la Prueba de Tukey a un nivel de confianza $p < 0,05$ para obtener la separación de medias (Alcantara et al., 2020).

4. Resultados

En la Figura 14, se observan los productos PCR por duplicado para la muestra de la cepa de *Lecanicillium* sp., las cuales fueron enviadas a secuenciar. Se tomó como referencia el marcador de peso molecular, para determinar el tamaño molecular de cada amplicón y que coincidiera con el esperado.

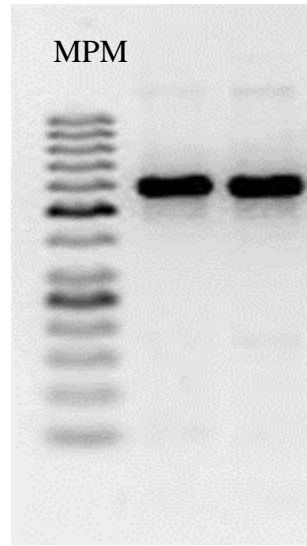


Figura 14. Amplificaciones de la cepa de *Lecanicillium* sp. de cebadores NL1 / NL4, por PCR convencional. Visualización mediante gel de agarosa al 1,5%. Escalera de peso molecular GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to use (Thermo Scientific).

El análisis mediante la herramienta BLASTn reveló que todas las secuencias obtenidas de la amplificación de la secuencia de la unidad grande ARNr fueron altamente homólogos (cuadro 6) a las secuencias accesadas al GenBank de las siguientes especies: *Akanthomyces muscarius* y *Lecanicillium lecanii*. Cabe destacar que *Akanthomyces muscarius* se denominó anteriormente como *Lecanicillium lecanii* o *Verticillium lecanii*. Por lo tanto, se trata de la misma especie.

Las secuencias obtenidas de la dirección forward y reverse fueron de alta calidad (superior al 98% editadas), por lo tanto, la confiabilidad de los resultados obtenidos fue alta.

En el cuadro 6, se encuentra el código correspondiente a la cepa de *Lecanicillium* sp. analizada.

Cuadro 6. Identificación de aislados microbiológicos mediante secuenciación de la región NL1/NL4 de la subunidad grande ARNr.

Información de la muestra	Código de muestra	Secuencia	Resultado BLAST	Código de accesoión	Porcentaje de identidad
<i>Lecanicillium</i> sp.	A2	Consenso	<i>Lecanicillium lecanii</i> strain ATCC 46578 large subunit ribosomal RNA, partial sequence	U17421.1 MH86656 2.1	100%
			<i>Akanthomyces muscarius</i> strain CBS 203.30 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence		

4.1. pH y Medio Nutritivo

4.2. Análisis de la varianza

En el cuadro 7 se muestran los resultados estadísticos de los medios nutritivos y pH evaluados para el crecimiento óptimo de *L.lecanii*, en el que se determinó que el medio PDAY a un pH 5,5 a 6,5 son las condiciones más adecuadas para el crecimiento y germinación de esporas de este hongo ($p < 0,05$). Así mismo, cuando el pH del medio es más acidificado (4,5) no permite el

crecimiento del hongo en el medio nutritivo, obteniendo una concentración de 0 conidios/mL ($p < 0,05$).

Cuadro 7. Diferencias estadísticas de producción de conidios/mL de *L. lecanii* en dependencia del pH en medio nutritivo (SDAY y PADY). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test: Tukey Alfa=0,05.

Medio PDAY

pH	Medias	n	E.E.	
4,50	-7,50E-09	3	7,62E+06	A
5,50	7,55E+07	3	7,62E+06	B
6,50	1,01E+08	3	7,62E+06	B

Medio SDAY

pH	Medias	n	E.E.	
4,50	0	3	2,26E+06	A
5,50	6,63E+07	3	2,26E+06	B
6,50	6,67E+07	3	2,26E+06	B

pH 5,5

Medio nutritivo	Medias	n	E.E.	
SDAY	6,67E+07	3	4,78E+06	A
PDAY	7,55E+07	3	4,78E+06	A

pH 6,5

Medio nutritivo	Medias	n	E.E.	
SDAY	6,63E+07	3	8,48E+06	A
PDAY	1,01E+08	3	8,48E+06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.3. Sustrato, temperatura y Humedad

4.4. Sustrato

En el análisis estadístico (cuadro 8) se determinó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos evaluados para la producción del hongo. El arroz brindó las mejores condiciones para la producción conidial de *L. lecanii* ($8,72E+08$ conidios/g). Seguido de semolina ($5,31E+08$ conidios/g) y por último harina de trigo y salvado de avena, los cuales fueron los sustratos menos eficientes en la producción de conidios ($7,00E+07$ conidios/g y $2,16E+08$ conidios/g, respectivamente).

Lo mismo ocurre para los resultados obtenidos en viabilidad (cuadro 8), con significancia de $p < 0,05$ cuando se realiza la fermentación sólida utilizando como sustrato de cultivo el arroz. Para este último, la viabilidad promedio fue de 85, 11%, seguido del salvado de avena con 24,14%, finalmente, harina de trigo con 5,52% y semolina con 2,39%.

El sustrato mediante el cual el hongo presentó mayor pureza durante su producción, fue en el arroz con un porcentaje del 97,87%. El resto de los tratamientos muestran valores de pureza que rondan desde 70,92% para el salvado de avena, 23,62% para la harina de trigo y por último la semolina con 0%.

Los datos de los conidios viables puros por gramo (CVP) demostró como resultado que el arroz es el sustrato ideal ($p < 0,05$) para la producción del hongo entomopatógeno *L. lecanii* con CVP de $7,26E+08$ (cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza para el número de conidios, viabilidad, pureza y conidios viables puros por gramo (CVP) del hongo entomopatógeno *L. lecanii*, según el sustrato usado.

Sustrato	Concentración		Viabilidad		Pureza (%)		CVP	
	(conidios/g)		(%)					
Harina trigo	7,00E+07	A	5,52	A	23,62	B	9,13E+05	A
Salvado de avena	2,16E+08	A	24,14	B	70,92	C	3,70E+07	A
Semolina	5,31E+08	B	2,39	A	0,00	A	0,00E+00	A
Arroz	8,72E+08	C	85,11	C	97,87	D	7,26E+08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Este resultado también se representa en la figura 15 con el promedio conidios viables por gramo (CVP), donde se demuestra que el arroz es el mejor sustrato para la producción y germinación del hongo entomopatógeno con respecto los demás sustratos, los cuales no alcanzan los valores óptimos de los estándares de calidad.

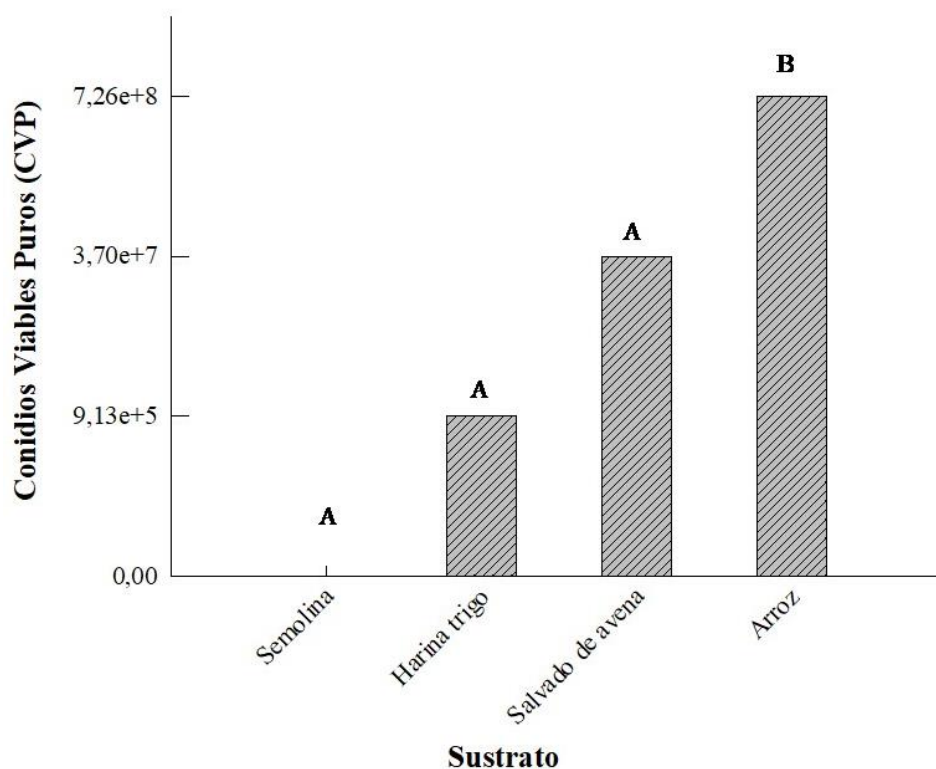


Figura 15. Promedio de Conidios Viabiles Puros por gramos (CVP) de arroz, semolina, salvado de avena y harina de trigo como sustratos para la producción de *L.lecanii*.

4.5. Temperatura-Arroz

El análisis estadístico realizado para cada una de las temperaturas en arroz registra diferencias significativas ($p < 0,05$) a 20°C, alcanzando la mayor concentración de esporas con un promedio de 9,88E+08 conidios/g, con respecto a 25°C con un promedio de 7,39E+08 conidios/g. No obstante, a 30°C no mostró ser significativamente diferente con una concentración de 8,60E+08 conidios/g ($p > 0,05$) (cuadro 9).

Se obtuvo para todos los casos una viabilidad por encima del 80%. A 30°C se mostraron los valores más bajos con diferencias significativas ($p < 0,05$), con un valor promedio de 81,84% y el mayor porcentaje de germinación se obtuvo cuando el hongo se encontraba creciendo a 20°C con

una viabilidad del 88,82% ($p < 0,05$). Por último, no se determinaron diferencias ($p > 0,05$) en la viabilidad a 25°C con un 85,20% (cuadro 9).

La pureza se mantuvo en porcentajes mayores al 95%. Los datos más altos de pureza se obtienen cuando el proceso de producción masiva se lleva a cabo con temperaturas de 20°C y 30°C, sin diferencias significativas entre ambas ($p > 0,05$) con 98,88% y 98,85%, respectivamente. El porcentaje significativamente más bajo de pureza ($p < 0,05$) se observa a 25° con 95,87% (cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza para el número de conidios, viabilidad, pureza y CVP del hongo entomopatógeno *L. lecanii* sometido a diferentes temperaturas en arroz.

Sustrato	Temperatura	Concentración		Viabilidad		Pureza (%)		CVP	
	(°C)	(conidios/g)		(%)					
Arroz	20	9,88E+08	B	88,82	B	98,88	B	8,68E+08	A
Arroz	25	7,39E+08	A	85,20	A B	95,87	A	5,98E+08	B
Arroz	30	8,60E+08	A B	81,84	A	98,95	B	7,19E+08	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Finalmente, al calcular los conidios viables puros de cada uno de los tratamientos en arroz, se obtuvo el dato más alto con 8,68E+08 CVP a 20°C, seguido de 7,19E+08 CVP a 30°C, y 5,98E+08 a 25°C (figura 16).

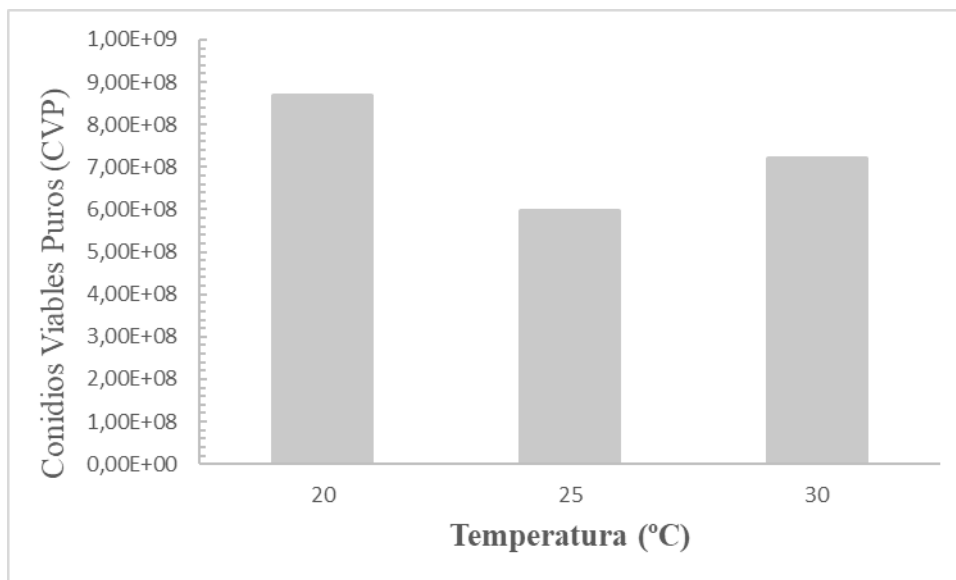


Figura 16. Promedio de Conidios Viables Puros por gramos (CVP) de arroz como sustrato a diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) para la producción de *L. lecanii*.

4.6. Temperatura-Harina de trigo

En el caso del uso de la harina de trigo como sustrato para el crecimiento de *L. lecanii*, también se generó significativamente mayor concentración de esporas ($1,48E+08$ conidios/g) cuando el proceso de fermentación sólida se realizó a 20°C ($p < 0,05$). Así mismo, no hubo diferencia estadística con 25°C y 30°C ($2,00E+07$ conidios/g y $4,17E+07$ conidios/g, respectivamente), tal como se muestra en el cuadro 10.

La viabilidad en todos los tratamientos se encontró con valores del 0% tanto a 25°C como a 30°C. La temperatura donde se generó mayor germinación de conidios fue a 20°C (16,55%), no obstante, no fue óptima para la producción de *L. lecanii* (cuadro 10).

Lo mismo se visualiza para el parámetro de pureza, en donde a 25°C y 30°C se obtuvo 0%, pero a una temperatura de 20°C, el hongo se logra desarrollar con un promedio de 70,85% de pureza (cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza para el número de conidios, viabilidad, pureza y CVP del hongo entomopatógeno *L. lecanii* sometido a diferentes temperaturas en harina de trigo.

Sustrato	Temperatura (°C)	Concentración (conidios/g)	Viabilidad (%)	Pureza (%)	CVP
Harina de Trigo	20	1,48E+08 B	16,55 B	70,85 B	1,74E+07 B
Harina de Trigo	25	2,00E+07 A	0,00 A	0,00 A	0,00E+00 A
Harina de Trigo	30	4,17E+07 A	0,00 A	0,00 A	0,00E+00 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El valor final de CVP para las temperaturas de 25°C y 30°C fue de 0 conidios viables puros, pero a 20°C dio como resultado 1,74E+07 de conidios viables puros, como se detalla en la figura 17.

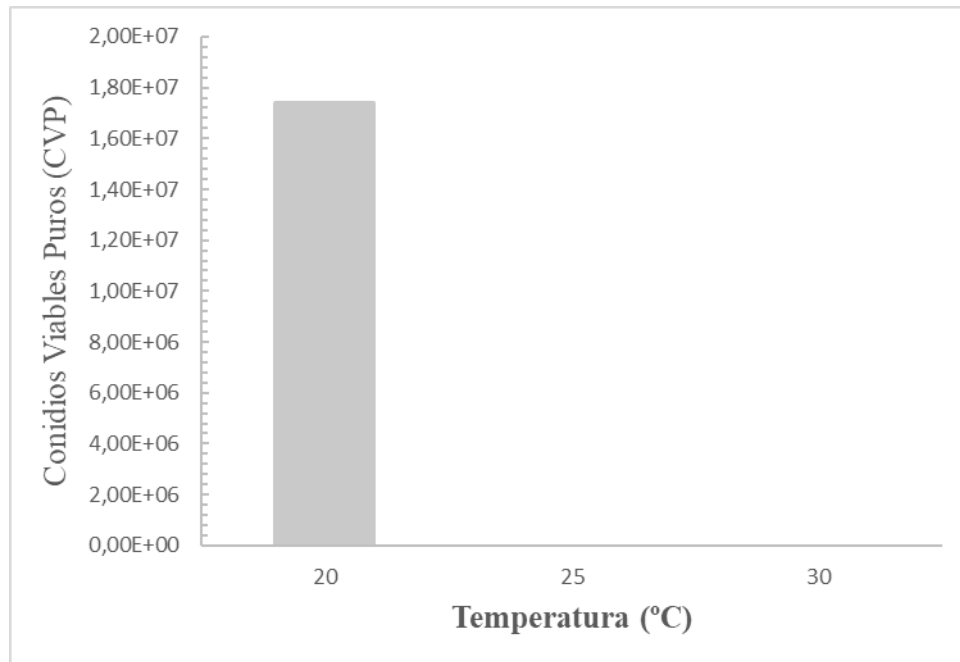


Figura 17. Promedio de Conidios Viables Puros por gramos (CVP) de harina de trigo como sustrato a diferentes temperaturas (20,25 y 30°C) para la producción de *L.lecanii*.

4.7. Temperatura-Salvado de avena

La evaluación de la concentración de los conidios de *L. lecanii* sobre salvado de avena como sustrato, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, donde la mayor cantidad de conidios fueron producidos a 30°C (2,38E+08 conidios/g), seguido de 25°C (2,15E+08 conidios/g) y la temperatura menos eficaz fue a 20°C (1,95E+08 conidios/g) (Cuadro 11).

Los resultados estadísticos visualizados en la viabilidad de los conidios, refleja que no son significativamente diferentes entre las temperaturas ($p > 0,05$) y con datos totalmente fuera de una viabilidad óptima para la producción del hongo, con porcentajes que rondan el 20% tanto como a 20°C, 25°C y 30°C (cuadro 11).

Los productos con menor grado de pureza fueron en todas las temperaturas sin diferencias significativas ($p > 0,05$), dando como resultado purezas con un promedio alrededor del 70% en todos los tratamientos (cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de varianza para el número de conidios, viabilidad, pureza y CVP del hongo entomopatógeno *L. lecanii* sometido a diferentes temperaturas en salvado de avena.

Sustrato	Temperatura (°C)	Concentración		Viabilidad		Pureza (%)		CVP	
		(conidios/g)		(%)					
Salvado de avena	20	1,95E+08	A	25,1	A	70,12	A	3,43E+07	A
Salvado de avena	25	2,15E+08	B	23,43	A	70,75	A	3,56E+07	A
Salvado de avena	30	2,38E+08	C	23,9	A	71,89	A	4,09E+07	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Dado lo anterior, a una temperatura de 30°C se obtiene el valor más alto con un total de 4,09E+07 conidios viables puros, seguido de 25°C con 3,56E+07 CVP y, por último, a 20°C un total de 3,43E+07 CVP (figura 18).

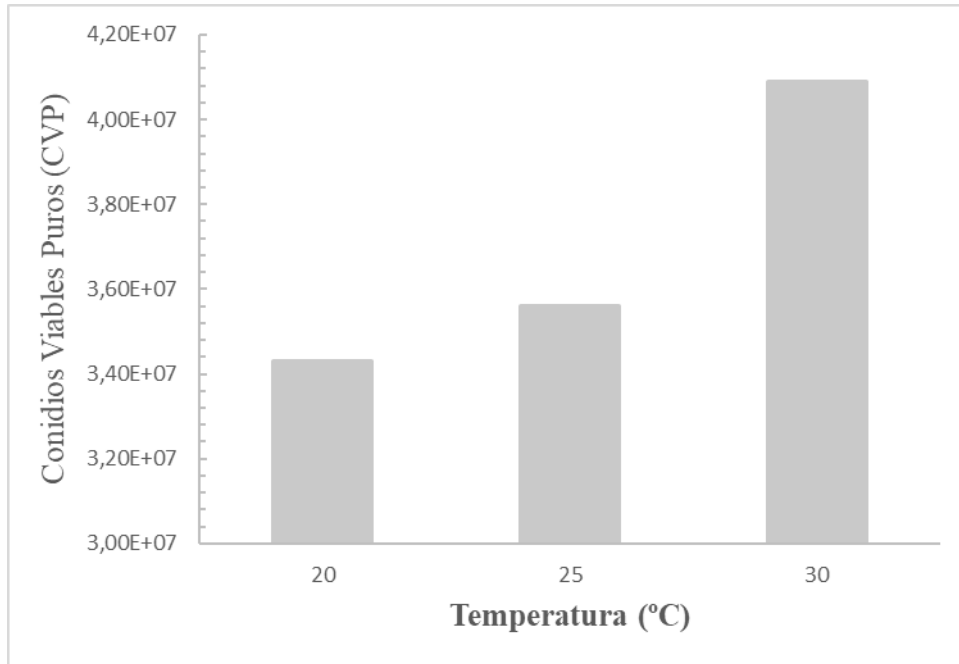


Figura 18. Promedio de Conidios Viables Puros por gramos (CVP) de salvado de avena como sustrato a diferentes temperaturas (20,25 y 30°C) para la producción de *L.lecanii*.

4.7. Temperatura-Semolina

Los resultados obtenidos demostraron que *L. lecanii* produce más concentración de esporas (6,25E+08 esporas/g) cuando la temperatura es de 30°C y es significativamente mayor ($p < 0,05$) con respecto a 20°C, con una concentración 4,40E+08 conidios/g. En el caso de 25°C no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos con un promedio de 5,28E+08 conidios/g (cuadro 12).

En todos los casos la viabilidad muestra un promedio del 5,78% cuando la temperatura es de 25°C, seguido de 1,38% cuando se expone a 30°C y finalmente, a 20°C se obtiene 0% de viabilidad (cuadro 12).

La pureza fue del 0% para las tres temperaturas analizadas en semolina como sustrato para el crecimiento y desarrollo de *L. lecanii*, dando como resultado final 0,00E+00 conidios viables puros para estos tratamientos (cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza para el número de conidios, viabilidad, pureza y CVP del hongo entomopatógeno *L. lecanii* sometido a diferentes temperaturas en semolina.

Sustrato	Temperatura (°C)	Concentración (conidios/g)		Viabilidad (%)		Pureza (%)		CVP	
Semolina	20	4,40E+08	A	0,00	A	0,00	A	0,00E+00	A
Semolina	25	5,28E+08	A B	5,78	B	0,00	A	0,00E+00	A
Semolina	30	6,25E+08	B	1,38	AB	0,00	A	0,00E+00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En la figura 19 se resumen los datos obtenidos para cada uno de los sustratos empleados, arroz, harina de trigo, salvado de avena y semolina, variando la temperatura de crecimiento del hongo, demostrando que el arroz a 20°C produce las condiciones ideales para la obtención de una elevada producción de conidios viables puros.

Con base en lo anterior, el valor de CVP óptimo para la producción masiva del hongo *L. lecanii* con 1,42E+09 conidios viables puros, se obtiene cuando el arroz es preparado con 140 mL de agua y el dato más bajo se observa en 100 y 120 mL con 4,42E+08 y 4,35E+08, respectivamente (cuadro 13.)

Cuadro 13. Análisis de varianza para el número de conidios, viabilidad, pureza y CVP del hongo entomopatógeno *L. lecanii* sometido a diferente humedad en arroz.

Sustrato	Humedad (mL)	Concentración (conidios/g)	Viabilidad (%)	Pureza (%)	CVP
Arroz	90	8,24E+08 B C	87,57 B	99,41 A	7,17E+08 BC
Arroz	100	6,14E+08 A B	74,93 A	96,03 A	4,42E+08 A
Arroz	110	6,09E+08 A B	86,37 B	98,80 A	5,20E+08 AB
Arroz	120	5,28E+08 A	83,90 B	98,13 A	4,35E+08 A
Arroz	130	9,20E+08 C	87,91 B	98,65 A	7,98E+08 C
Arroz	140	1,65E+09 D	89,54 B	96,14 A	1,42E+09 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

De acuerdo con lo anterior, en la figura 20 detalla que conforme se aumenta la cantidad de agua inoculada en el sustrato, genera mayor producción de conidios viables puros para la cepa de *L. lecanii* evaluada, con respecto a las humedades más bajas, siendo 140 mL el volumen ideal para el desarrollo y esporulación del hongo.

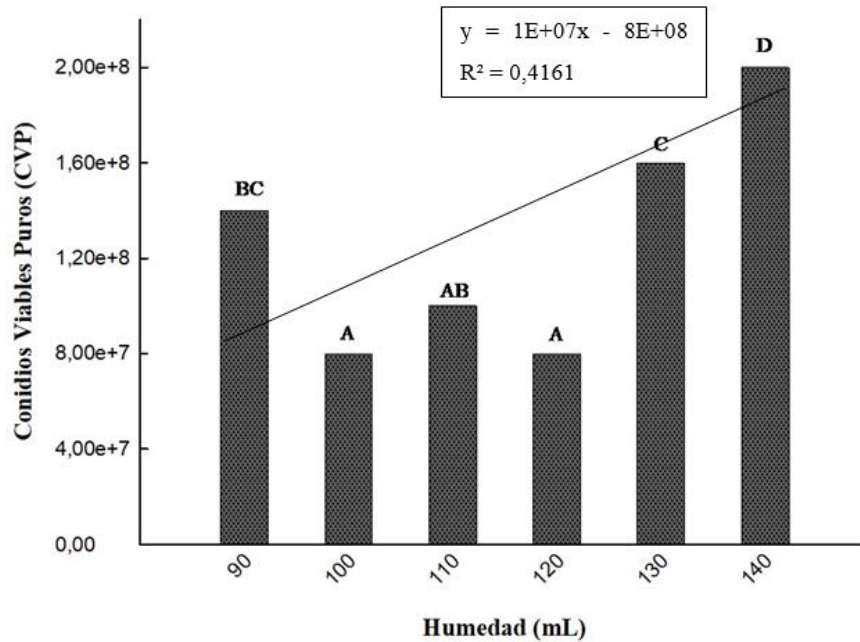


Figura 20. Promedio de Conidios Viables Puros por gramo (CVP) de arroz a diferentes humedades de 90,100,110,120,130 y 140 mL para la producción de *L. lecanii*.

En la figura 21 ya el hongo tapizó completamente el sustrato con 14 días de crecimiento a 22°C y una humedad de 140 mL con 300 g de arroz, además, de un proceso de “quiebre” del sustrato para permitir la oxigenación del hongo en la parte interior, optimizando su crecimiento y esporulación por toda la bolsa durante su fermentación sólida.

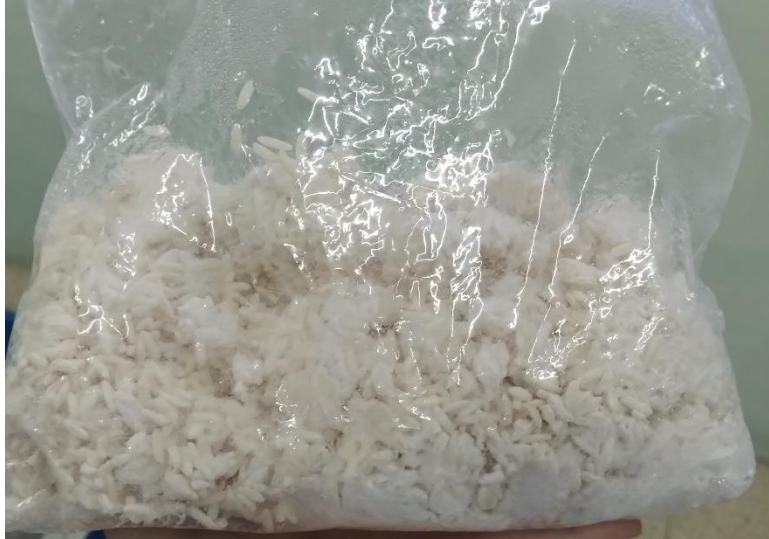


Figura 21. Crecimiento y esporulación de *L. lecanii* en arroz a 20°C durante 15 días empleando 140 mL en 300 g de sustrato.

En el cuadro 14 también se detalla los costos variables de cada uno de los insumos empleados en la producción masiva del hongo entomopatógeno, así como su consumo diario, costo unitario, costo diario y costo mensual para un total de 400 bolsas diarias. También se incluyen los costos de personal (5 asistentes) y de electricidad, obteniendo la suma total de los costos variables con un total de ¢6.276.714,90.

Cuadro 14. Costos variables de materiales, electricidad y salario de personal para la producción de *L. lecanii* en producción de 400 bolsas diarias con 300 g de sustrato.

Cantidad de Kg mensual por 400 bolsas con 300 g					2400
Producto	Unidad	Consumo diario	Costo unitario	Costo diario	Costo mensual
Arroz	Gramos	120000,00	€0,41	€49.200,00	€984.000,00
PDA (Potato Dextrose Agar)	Gramos	11,00	€113,18	€1.244,98	€24.899,60
Extracto de Levadura	Gramos	1,40	€115,07	€161,09	€3.221,90
Placas Petri desechables	Unidad	14,00	€100,00	€1.400,00	€28.000,00
Tensoactivo (WK)	mL	0,07	€4,90	€0,34	€6,86
Agua Destilada	mL	56000,00	€0,60	€33.600,00	€672.000,00
Otros consumibles					€0,00
Alcohol 96% y 70%	mL	500,00	€1,18	€590,00	€11.800,00
Cloro al 1%	mL	500,00	€4,39	€2.195,00	€43.900,00
Aluminio	cm	280,00	€1,68	€470,40	€9.408,00
Producto de limpieza	mL	500,00	€2,64	€1.320,00	€26.400,00
Grapas	Unidad	1200,00	€0,18	€216,00	€4.320,00
Bolsas de empaque	Unidad	17,00	€622,00	€10.574,00	€211.480,00
Bolsas de polipropileno	Unidad	400,00	€36,00	€14.400,00	€288.000,00
Costo total de materiales					€2.307.436,36
Precio total/Kg					€2.615,30
Costos mensuales	Valor				
Costo personal	€1.617.838,54				
Costos materiales	€2.307.436,36				
Electricidad	€2.351.440,00				
Total	€6.276.714,90				

También se muestran los gastos fijos en la producción de hongos entomopatógenos, en donde se incluye la depreciación de los equipos y el salario fijo de jefatura a cargo del laboratorio (se

dividió en tres porque también tiene a cargo otros dos programas), tomando como referencia el proceso realizado en DIECA-LAICA, tal como se detalla en el cuadro 15.

Cuadro 15. Costos fijos de depreciación de equipos para la producción de *L. lecanii* en producción de 400 bolsas diarias con 300 g de sustrato.

Equipo	Valor real	Depreciación mensual
Cámara de flujo laminar	¢2.512.582,00	¢20.938,18
Bomba Peristáltica	¢3.028.499,00	¢25.237,49
Cámara de Neubauer	¢65.800,00	¢1.096,67
Microscopio	¢2.280.866,00	¢63.357,39
Balanza electrónica	¢182.200,00	¢15.183,33
Autoclave	¢13.407.880,80	¢74.488,23
Aire acondicionado	¢360.000,00	¢3.000,00
pH metro	¢441.378,00	¢36.781,50
Cajas plásticas (secado)	¢8.100,00	¢675,00
Centrífuga	¢2.652.164,00	¢22.101,37
Total	¢24.939.469,80	¢262.859,16
COSTOS MENSUALES		
	Valor	
Salario Jefatura	¢585.000,00	
Depreciación	¢262.859,16	
TOTAL	¢847.859,16	

Los datos de costos fijos y variables mensuales se resumen en el cuadro 16, en donde se observa que las diferencias en el costo total/Kg de arroz con hongo de cada sustrato no son considerables económicamente, pero se mantiene un costo más alto cuando se emplea harina de trigo y arroz durante la producción con un total de ¢3.138,57/Kg y ¢2.968,57/Kg respectivamente, destacando que el arroz le proporciona las mejores condiciones de concentración de conidios, viabilidad y pureza para el desarrollo de *L. lecanii*.

Cuadro 16. Costos fijos, variables, totales y costo variable por kilogramos de hongo con arroz para la producción de *L. lecanii* en producción de 400 bolsas diarias con 300 g de sustrato.

Sustrato	Costos fijos	Costos variables	Costos totales	Costo variable por Kg
Arroz	¢847.859,16	¢6.276.714,90	¢7.124.574,06	¢2.968,57
Salvado de avena	¢847.859,16	¢5.748.714,90	¢6.596.574,06	¢2.748,57
Semolina	¢847.859,16	¢5.868.714,90	¢6.716.574,06	¢2.798,57
Harina de trigo	¢847.859,16	¢6.684.714,90	¢7.532.574,06	¢3.138,57

Según menciona Lecuona (1996), en campo se debe aplicar una concentración cercana a 2,00E+12 conidios/Ha, dando como resultado 2,00E+08 esporas/m² con un costo total de ¢1.307,65. También se obtuvo un costo total de ¢0,0000000015838 por conidia. No obstante, este valor puede diferir porque la concentración del producto puede variar por lote o por bolsa producida. También se indagó más acerca del resultado para saber si el producto es viable y rentable para producirlo masivamente, mostrando que sí es rentable, ya que, en el mercado los productos se venden con un precio cercano a los ¢5000-¢8000 por presentación a granel de 1 Kg.

5. Discusión

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los datos obtenidos por Subramaniam et al., 2021, en el cual, se concluyó que, entre los diversos medios nutritivos evaluados, PDAY (Potato Dextrose Agar + 1% Yeast powder) a un pH entre 6 y 7 es el óptimo para el crecimiento y germinación de las esporas de *L. lecanii*. Cuando el potencial de hidrógeno en el medio nutritivo de crecimiento es < 3,5 o > 11,5, no es adecuado para su crecimiento porque estos iones pueden influir en procesos metabólicos de germinación y esporulación (Xianglin et al., 2004), siendo su pH óptimo de 6,5.

De la misma manera, en el estudio de Li et al., 2021 también se determinó que cepas de *Lecanicillium* sp. puede crecer en rangos de pH de 5,0 a 11,0, y el pH ácido/base óptimo fue de 8,0 para el crecimiento de las hifas, de esta manera, se indica que tanto en los extremos de

condiciones alcalinas como ácidas generan un efecto negativo sobre el crecimiento y esporulación en *Lecanicillium* sp.

La composición del medio también genera efectos sobre el crecimiento y esporulación en los hongos, ya que, necesitan proveerse de fuentes de nitrógeno, potasio, sodio, hierro, carbono, siendo esta última la principal fuente de materia prima para su metabolismo, así como la forma de asimilación de los nutrientes por parte de los mismo, variante que responden de forma singular los microorganismos (Mansilla & Álvarez, 2005).

El arroz es el sustrato más idóneo para una mayor concentración de conidios en la producción masiva de hongos entomopatógenos, ya que, este sustrato permite mantener las condiciones físicas adecuadas, además de una óptima superficie efectiva para el crecimiento micelial, humedad, aireación (Méndez, et al., 2010) y un balance nutricional de proteínas, grasas, carbohidratos, fibra, calcio, fósforo, hierro, sodio, calorías y vitaminas (Pincioli, 2011).

El salvado de avena se encuentra compuesto por hidratos de carbono, proteína vegetal, potasio, magnesio, calcio, fósforo y vitaminas del grupo B (Jing et al., 2016). En el caso de la semolina, contiene carbohidratos, fibra, proteína, vitaminas y sodio; la harina de trigo contiene proteínas, carbohidratos, grasa, no contienen azúcar y aporta vitaminas K, B3, B9 y B7 (Samaan et al., 2006).

El arroz aporta mayores nutrientes al hongo y con alrededor de 80,0 g carbohidratos y 11,6 g agua por cada 100 g de sustrato, el resto de los sustratos, aportan entre 60,0 g y 70,0 g de carbohidratos y entre 6,0 a 12,0 g de agua (Cagampang et al., 1966). Por lo cual, empleando el arroz como sustrato de fermentación se cumplen los valores óptimos de control de calidad de producción de hongos entomopatógenos (Abdul-Hamid et al., 2007).

Con base en lo anterior, en el estudio realizado por Cortez-Madrigal et al (2003), también muestra que cuando el sustrato presenta mayor compactación, se reduce la concentración en la producción de conidios del hongo *L. lecanii* porque este microorganismo requiere de aireación interna, pero, cuando el sustrato permite mayor volumen, área de crecimiento y aireación, brinda las condiciones ideales para generar mayor producción conidial por gramo de sustrato, como sucedió con el caso del arroz (Ocampos, 2013).

Cuando *L. lecanii* se encuentra expuesto a temperaturas mayores de 22°C reduce su crecimiento y germinación, incluso estudios demostrados por Elosegui en 2006, muestran que si se incrementa la temperatura a valores de hasta 28°C se puede perder el desarrollo del hongo de hasta un 80% porque *L. lecanii* es sensible a cambios de temperatura y pierde viabilidad cuando sobrepasa el límite de 22°C (Barbara y Clewes, 2003).

Con base en lo anterior, la temperatura es una variable crítica en los procesos de fermentación sólida para la producción de hongos entomopatógenos, ya que, es un factor sumamente difícil de controlar por la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo; por esta razón, el calor metabólico se ve favorecido por la acumulación de este y se incrementa la temperatura en el cultivo y genera un efecto negativo sobre la producción y germinación de conidios, siendo *L. lecanii* un hongo que necesita temperaturas óptimas de 20 a 22°C, como se mencionó anteriormente (Monzón-Ruiz, 2016).

También es importante destacar que el contenido de humedad del sustrato sólido es un factor importante en la producción masiva de hongos, ya que, el rango ideal debe estar entre un 35% y 60% de humedad por su relación con la disponibilidad de oxígeno, la cual influye en la esporulación del hongo (Méndez, 2010).

En el estudio de Rivas et al (2014), demuestra que la temperatura y la actividad del agua afecta la producción de conidios, la germinación conidial y al crecimiento del micelio de *L. lecanii*. En este caso, se detectó una viabilidad superior al 80 % cuando el hongo se encontraba expuesto a una temperatura de 28° C, sin embargo, a 32° C la viabilidad los conidios bajó hasta un 10%. Además, la germinación de conidios también se vio influenciada por la disponibilidad de agua con un 90 % de viabilidad cuando la actividad del agua (a_w) = 1,00 o a_w = 0,98, que, a su vez, también influye en su virulencia sobre áfidos. Kope et al (2008), detalla efectos negativos en el crecimiento del hongo cuando los niveles agua son de 0.88 a 0.85 a_w , ya que, cuando la humedad es baja, no favorece una adecuada germinación de los conidios en las cepas de *Lecanicillium* sp. aisladas para este estudio.

El tratamiento térmico sobre el arroz permite que se absorba el líquido hasta la parte central del grano de arroz al formarse una capa superficial gelatinizada y se presenta un estado poroso en la parte central del grano; por lo cual, aumenta la cantidad y la velocidad de absorción de humedad (Córdova, 2011), para proveerle de mayor nivel de agua al hongo.

Al realizar tratamientos térmicos en el salvado de avena mantiene significativamente su estabilidad térmica (Rico et al., 2020); y en semolina también se reporta que mejora algunas propiedades funcionales de las proteínas (Shi-Wen et al., 2018), pero en el caso de la harina de trigo posee baja estabilidad térmica porque se genera pérdida de masa cuando el sustrato alcanza una temperatura de 70° C y se exhibe pérdida de masa del hasta 11% p/p cuando las temperaturas van de 50°C a 200°C, esto según estudios realizados por Leblanc et al (2008).

Además, de la variable física descrita anteriormente, existe una serie de genes que están co-regulados transcripcionalmente por diferentes cascadas de mecanismos genéticos que abarcan desde los factores de transcripción capaces de unirse específicamente a secuencias de ADN hasta regulaciones que involucran cambios en la estructura de la cromatina (Barranco-Florido et al., 2013). Por lo tanto, se ha demostrado que existen complejos proteicos que regulan los procesos de diferenciación fúngica en dependencia de las señales que reciben, ya sean de luz, oxígeno, dióxido de carbono, nutrientes, pH u otras señales ambientales que van a influir en el desarrollo de los hongos entomopatógenos (Sarikaya-Bayram et al., 2015).

Entre los reguladores globales conservados en hongos se encuentra la metiltransferasa LaeA, la cual, es capaz de controlar genes en la producción de metabolitos secundarios y en el desarrollo fúngico mediante un complejo proteico entre la metiltransferasa LaeA, dos factores de transcripción del dominio VelA y una proteína B similar a VelB (Sarikaya-Bayram et al., 2015). Cuando la membrana plasmática del hongo recibe la señal externa y el dímero VelB-VeA ingresa al núcleo, desencadena la activación de genes involucrados en el desarrollo sexual y en la producción de metabolitos secundarios. Pero, cuando se forma el heterodímero VosA-VelC, podría activar genes que están involucrados en el desarrollo sexual, y, aún más importante para producción de hongos entomopatógenos, en la viabilidad de las esporas (Calvo et al., 2016).

Cabe destacar que factores como la presencia de la luz inhibe la expresión de VeA, así como su importación al núcleo, pero, cuando ingresa forma el complejo VeA-VelB que está a cargo de funciones como la viabilidad de las esporas (Calvo et al., 2016). De esta manera, se comprende que el complejo heterotrimérico VelB-VeA-LaeA lleva a cabo funciones de suma importancia en la cascada de reacciones para el desarrollo del hongo, así como en la producción de esporas, de metabolitos secundarios y la patogenicidad (Sarıkaya-Bayram et al., 2015), además de conocer las condiciones físicas que van a influir directamente en la esporulación, viabilidad y desarrollo del hongo (Aiuchi et al., 2008).

En cuanto a los parámetros establecidos para el control de calidad, esto se lleva a cabo con el fin de realizar más viable la comercialización del hongo y así mismo, reducir costos de aplicación en el campo al agregar menor cantidad del producto por hectárea de cultivo; también, una mayor esporulación sobre la plaga influye en una mejor diseminación del hongo y, por ende, mayor facilidad de propagación entre los insectos (García et al., 2012). De acuerdo con Gómez et al. (2011), menciona que el control de calidad de los hongos entomopatógenos, deben de contar con una concentración de conidios mayor o igual a 1×10^9 conidios/g de sustrato, resultados obtenidos cuando se utilizó arroz con 140 mL de agua, siendo apto para ser utilizado en campo.

Otro parámetro deseado en el control de calidad para la producción masiva de hongos entomopatógenos es un porcentaje alto de germinación de conidios fúngicos, ya que, es la manera que el hongo puede dar inicio al proceso de infección de su huésped, tomando en cuenta las condiciones ambientales desfavorables que se pueden presentar para su reproducción. (Drummond et al. 1987). Esto concuerda con Sandoval-Coronado et al., 2011 quienes mencionan que los porcentajes de germinación por lo general se presentan con una viabilidad por arriba del 90% y el tratamiento con mayor porcentaje de germinación se obtuvo en arroz con 140 mL de agua con un 89,54 % germinación.

La pureza es otro criterio fundamental para el control de calidad porque se certifica que el producto está libre de la presencia de otros microorganismos indeseables que pueden ser dañinos o contaminantes para el ambiente y de esta manera, asegurar que solamente se esté produciendo el organismo deseado, para posteriormente, ser liberado al campo (García et al., 2012). Respecto

a la pureza encontrada en este estudio, la misma es aceptable, ya que, de acuerdo con Rivera (2002), reporta que los biocontroladores deben de tener entre el 90 y 100% de pureza, además de examinar el tipo de microorganismos contaminante.

6. Conclusiones

1. Se realizó la identificación molecular de *Lecanicillium* sp., obteniendo como resultado que la cepa utilizada es *Lecanicillium lecanii*, clasificada recientemente como *Akanthomyces lecanii*.
2. Se determinó las condiciones ideales de pH y medio nutritivo para el desarrollo *in vitro* de *L. lecanii*, siendo el óptimo entre 5,5 y 6,5. Además, agar papa dextrosa el mejor medio de crecimiento.
3. El arroz es el sustrato que permite mayor concentración de esporas ($8,72E+08$ conidios/g), viabilidad (85,11%) y pureza con 97,87% para un total de $7,26E+08$ conidios viables puros por gramo de sustrato.
4. La temperatura óptima para la máxima producción de conidios viables puros en arroz es de 20°C con un total de $8,68E+08$ CVP.
5. *L. lecanii*, presenta la mayor producción de esporas en arroz cuando se emplea una humedad de 140 mL de agua en 300 g de sustrato obteniendo $1,42E+09$ CVP.

7. Recomendaciones

1. Realizar ensayos para ampliar los rangos de humedad en la fermentación en sólido para la producción de *L. lecanii* para la obtención de mejores parámetros de control de calidad.

2. Buscar nuevas fuentes de crecimiento y desarrollo del hongo económicamente más rentable y evaluar la producción de conidios, viabilidad, pureza microbiológica y CVP.
3. Probar nuevas cepas hongos de *Lecanicillium* sp. que presenten mejores características para su producción en masa y su posible aplicación en campo.
4. Analizar la eficacia del hongo a nivel de invernadero y campo para determinar su virulencia sobre los áfidos, y, por ende, su control en el cultivo de caña de azúcar.
5. Revigorizar la cepa de *L. lecanii* a partir de insectos muertos y parasitados por el hongo para mantener su capacidad de infección.
6. Mantener el área de producción controladas de determinados parámetros clave como la temperatura, humedad y contaminantes aéreos.
7. Comprender mejor la interacción molecular del hongo *L. lecanii* cuando es expuesto a diferentes condiciones físicas de humedad, temperatura y pH (anexo 1).
8. Es importante evaluar la virulencia del hongo producido para poder determinar si es viable su uso en campo para el control de áfidos.
9. Se debe considerar el uso de soportes para mejorar la aireación, incluso, se puede producir biomasa de este hongo en medios líquidos de bajo costo para cosechar y formularla para después evaluar su eficacia en invernadero o campo.
10. También se puede estudiar la relación carbono/nitrógeno en estos sustratos, como lo es la adición de nitrógeno ureico, amoniacal o a través de aminoácidos
11. Determinar el costo por cantidad de conidios producidos.

8. Referencias

Abdul-Hamid, A., Sulaiman, R. R., Osman, A., & Saari, N. (2007). Preliminary study of the chemical composition of rice milling fractions stabilized by microwave heating. *Journal of food composition and analysis*, 20(7), 627-637. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.01.005>.

- Aday Díaz, O. D. L. C., Alfonso Terry, I., Rodríguez Lema, E., Díaz Mujica, F. R., Gil Cruz, Y., Valdés Ávalos, B. L., & Barroso Melillo, J. (2017). Caracterización de los síntomas de la roya naranja (*Puccinia kuehnii* (W. Kruger) EJ Butler) en cuatro cultivares de caña de azúcar en Cuba. *Centro Agrícola*, 44(2), 61-67. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025357852017000200008&lng=es&nr m=iso>. ISSN 2072-2001.
- Aguilera, L. A. P. (2021). Identificación molecular de microorganismos aislados en planteles mineros artesanales de Nicaragua. *I+ D Tecnológico*, 17(1). <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/339/3392002008/3392002008.pdf>.
- Aguilera-Cogley, V. A., Jaén-Torrijos, M., Ávila-Rodríguez, L. Y., Herrera-Vásquez, J. Á., Jaén-Sanjur, J. N., & Barba-Alvarado, A. A. (2020). Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá. *Idesia (Arica)*, 38(1), 59-65. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292020000100059>.
- Aguirre Restrepo, G. (2018). Historia e importancia del cultivo de la caña de azúcar en Colombia. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=bacdig.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008915>.
- Aiuchi, D., Baba, Y., Inami, K., Shinya, R., Tani, M., & Koike, M. (2008). Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Applied entomology and zoology*, 43(3), 427-436. <https://doi.org/10.1303/aez.2008.427>.
- Akbar, W., Showler, A. T., Reagan, T. E., & White, W. H. (2010). Categorizing sugarcane cultivar resistance to the sugarcane aphid and yellow sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae). *Journal of economic entomology*, 103(4), 1431-1437. <https://doi.org/10.1603/EC09336>.
- Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., & Angel-Cuapio, A. (2020). Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532020000100702&script=sci_arttext.

- Altamira, P. (2020). Microorganismos con actividad entomopatogena. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/6899/NR42158.pdf?sequence=1>.
- Alvarez, G; Ramírez, S & Escobar, J. (2018). Formulación y evaluación de *Lecanicillium lecanii* biocontrolador de *Hemileia vastatrix* (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala). Disponible en: <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puirna/INF-2017-36.pdf>.
- Alvez, B., Carballo, J., Alonso, G., & Oropeza, M. (2011). Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. *Agronomía Tropical*, 61(1), 27-36. <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2011000100003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0002-192X.
- Ames de Icochea, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center. Disponible en: [https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=lfFNUqTeit8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=Ames+de+Icochea,+T.+\(2004\).+Manual+de+laboratorio+para+el+manejo+de+hongos+entomopat%C3%B3genos.+International+Potato+Center&ots=XCF_tJIRh3&sig=LCvNWypBjAMwggw616HOxmUEMeFo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=lfFNUqTeit8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=Ames+de+Icochea,+T.+(2004).+Manual+de+laboratorio+para+el+manejo+de+hongos+entomopat%C3%B3genos.+International+Potato+Center&ots=XCF_tJIRh3&sig=LCvNWypBjAMwggw616HOxmUEMeFo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).
- Arif, S., Batool, A., Nazir, W., Khan, R. S., & Khalid, N. (2019). Physiochemical characteristics nutritional properties and health benefits of sugarcane juice. In *Non-Alcoholic Beverages* (pp. 227-257). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00008>.
- Badilla Fernández, F. (2002). Un programa exitoso de control biológico de insectos plaga de la caña de azúcar en Costa Rica. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6868>.
- Barajas, C. G., Del Pozo, E. M., García, I., & Méndez, A. (2010). Obtención de conidios del aislamiento Ma-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Revista de Protección Vegetal*, 25(3), 174-180. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000300005.
- Barbara, D. y E. Clewes. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: How many of them are there. *Molecular Plant Pathology* 4(4):297-305. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1364-3703.2003.00172.x>.
- Barranco-Florido, E., García-Hernández, L. A., Rodríguez-Navarro, S., Flores-Macías, A., & Ramos-López, M. A. (2013). Regulation of gene expression in entomopathogenic fungi in three different

- environmental conditions: A review. *African Journal of Biotechnology*, 12(10). Disponible en: DOI: 10.5897/AJB2012.2955.
- Barrantes Aguilar, J. P. (2018). Comportamiento político del sector cañero-azucarero costarricense en la tensión libre comercio-proteccionismo: el caso de dumping LAICA-La Maquila Lama (2014-2017).
- Berlanga-Padilla, A. M., Ayala-Zermeño, M. Á., Gallou, A., Serna-Domínguez, M. G., Montesinos-Matías, R., & Arredondo-Bernal, H. C. (2016). Identificación de *Lecanicillium longisporum* asociado a *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae), en sorgo. *Revista mexicana de micología*, 44, 51-54. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018731802016000200051&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0187-3180.
- Bermúdez, L. 2020. Power Point Proyecto NAMA – Datos Zafra 2019-2020. LAICA. San José, C.R.
- Blanco-Metzler, H., & Morena-Montoya, R. (2019). Biological Control in Costa Rica. *Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future*, 12, 162. Disponible en: [https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=8SLKDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA162&dq=Blanco-Metzler,+H.,+%26+Morena-Montoya,+R.+\(2019\).+Biological+Control+in+Costa+Rica.+Biological+Control+in+Latin+America+and+the+Caribbean:+Its+Rich+History+and+Bright+Future,+12,+162&ots=6fPyI9R3MY&sig=Y-2E1HG4AcoYuFvCeWTmo_iydgE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=8SLKDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA162&dq=Blanco-Metzler,+H.,+%26+Morena-Montoya,+R.+(2019).+Biological+Control+in+Costa+Rica.+Biological+Control+in+Latin+America+and+the+Caribbean:+Its+Rich+History+and+Bright+Future,+12,+162&ots=6fPyI9R3MY&sig=Y-2E1HG4AcoYuFvCeWTmo_iydgE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).
- Botías, C., & Sánchez-Bayo, F. (2018). Papel de los plaguicidas en la pérdida de polinizadores. *Ecosistemas*, 27(2), 34-41. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1314>.
- Caballero, M. A. (2020). Identification of grain sorghum resistance to sugarcane aphid and field test response by Hymenoptera to honeydew (Doctoral dissertation). Disponible en: <https://hdl.handle.net/11244/328681>.
- Cagampang, G. B., Cruz, L. J., Espiritu, S. G., Santiago, R. G., & Juliano, B. O. (1966). Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chemistry*, 43, 145-155. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19661405864>.
- Calixto Sarmiento, J. M. (2019). Determinación del estado de conservación mediante pruebas de viabilidad, pureza y germinación de los hongos entomopatógenos almacenados en la colección

microbiana del laboratorio de microorganismos entomopatógenos de CENIPALMA. Disponible en: <https://repositorio.ufps.edu.co/handle/ufps/3791>.

Calvo, A. M., Lohmar, J. M., Ibarra, B., & Satterlee, T. (2016). 18 Velvet Regulation of Fungal Development. *Growth, differentiation and sexuality*, 475-497. Disponible en: [at: https://www.researchgate.net/publication/292606035](https://www.researchgate.net/publication/292606035)

Cañedo, V. & Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p. Disponible en: [https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=IFfNuqTeit8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=Ca%C3%B1edo,+V.+%26+Ames,+T.+2004.+Manual+de+laboratorio+para+el+manejo+de+hongos+entomopat%C3%B3genos.+Centro+Internacional+de+la+Papa+\(CIP\),+Lima,+Per%C3%BA,+62+p.&ots=XCF_tJKOf3&sig=JFHM3B7RpaFvAmtVAAIL8E8KCvw&redir_esc=y#v=onepage&q=Ca%C3%B1edo%2C%20V.%20%26%20Ames%2C%20T.%202004.%20Manual%20de%20laboratorio%20para%20el%20manejo%20de%20hongos%20entomopat%C3%B3genos.%20Centro%20Internacional%20de%20la%20Papa%20\(CIP\)%2C%20Lima%2C%20Per%C3%BA%2C%2062%20p.&f=false](https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=IFfNuqTeit8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=Ca%C3%B1edo,+V.+%26+Ames,+T.+2004.+Manual+de+laboratorio+para+el+manejo+de+hongos+entomopat%C3%B3genos.+Centro+Internacional+de+la+Papa+(CIP),+Lima,+Per%C3%BA,+62+p.&ots=XCF_tJKOf3&sig=JFHM3B7RpaFvAmtVAAIL8E8KCvw&redir_esc=y#v=onepage&q=Ca%C3%B1edo%2C%20V.%20%26%20Ames%2C%20T.%202004.%20Manual%20de%20laboratorio%20para%20el%20manejo%20de%20hongos%20entomopat%C3%B3genos.%20Centro%20Internacional%20de%20la%20Papa%20(CIP)%2C%20Lima%2C%20Per%C3%BA%2C%2062%20p.&f=false)

Cárdenas Murillo, R. (2018). Control biológico de las plagas de la caña de azúcar en Colombia. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=bacdig.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=016940>.

Cariajano, M., & Ibelia, J. (2018). Evaluación de la eficacia de aislamientos nativos de *Metarhizium* spp. en el control de ninfas de *Mahanarva andigena* de la Caña de Azúcar (Bachelor's thesis, Universidad Estatal Amazónica). <https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/350>.

Carreño Amate, C. (2020). Análisis del efecto de hongos entomopatógenos como control biológico sobre la plaga de pulgón. Disponible en <http://hdl.handle.net/10835/9746>.

Carrillo, M. L., Zavala, D., & Alvarado, B. (2007). Modelado del Efecto de la Temperatura, Actividad de Agua y pH sobre el Crecimiento de *Rhizopus oryzae*. *Información tecnológica*, 18(4), 57-62. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000400009>.

Casarrubias, A. R., de Ciencias, P. A. M., Biotecnología, Á. I., Velázquez, V. M. H., de Morelos, E., & Alonso, K. T. M. (2017). Evaluación de la actividad insecticida de formulados a base de

Metarhizium anisopliae en larvas de *Spodoptera frugiperda*. Disponible en: <http://tlamati.uagro.mx/t7e2/593.pdf>.

Castillo, M. G., Herrera, R. R., & Rivera, I. A. (2009). Aislamiento, cultivo e identificación morfológica y molecular de hongos entomopatógenos. <https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/II/carteles/CII-41.pdf>.

Chavarría Soto, E., Moreira Carmona, L., Lockhart, B. E., Rivera Herrero, C., & Villalobos Muller, W. (2006). Estudio de la distribución de las enfermedades virosas de la caña de azúcar en Costa Rica. Disponible en: <http://repositorio.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/76265/Atacori%202006%20Virus%20Ca%3%b1a%20Az%3%baca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Chaves Solera, M & Bermúdez Loría, A. Revista Entre Cañeros N° 17-setiembre 2020 NÚMERO 16 • AGOSTO 2020. ISSN 2215- 597X, LAICA -DIECA.

Chong Rodríguez, M. J. (2003). Utilización de medios de cultivos líquidos para la obtención de blastoesporas y conidias de *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuillemin (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) resistentes a condiciones ambientales (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). Disponible en: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080124372.PDF>.

Clarke, R., Kehoe, M. A., Broughton, S., & Jones, R. A. (2020). Host plant affiliations of aphid vector species found in a remote tropical environment. *Virus research*, 281, 197934. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197934>.

Córdova, X. (2011). Estudio de prefactibilidad para la implementación de una procesadora de alimentos en conserva listos para su consumo. *Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador*. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/3899/1/CD-3684.pdf>.

Cortez-Madrigal, H., Alatorre-Rosas, R., Mora-Aguilera, G., Bravo-Mojica, H., Ortiz-García, C. F., & Aceves-Navarro, L. A. (2003). Caracterización cultural de cepas de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su patogenicidad sobre *Toxoptera aurantii* Boyer. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 161-167. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Gustavo-Mora-Aguilera/publication/237037429_Caracterizacion_Cultural_de_Cepas_de_Lecanicillium_Verticillium_lecanii_Zimm_Zare_y_Gams_y_su_Patogenicidad_sobre_Toxoptera_aurantii_Boyer/links

/0deec532bae4cb1cb1000000/Caracterizacion-Cultural-de-Cepas-de-Lecanicillium-Verticillium-lecanii-Zimm-Zare-y-Gams-y-su-Patogenicidad-sobre-Toxoptera-aurantii-Boyer.pdf.

- Cuitiño, A. M. M. J., Giambiasi, M. M., Morales, A. I. M. X., & Buenahora, A. M. J. (2022). PLAGA EMERGENTE EN SORGO: *Melanaphis sacchari*/sorgho (Pulgón de la caña de azúcar).
- Dembilio, Ó., Català, M., Pla, I., Urbaneja, A., Pérez-Hedo, M., Beitia, F. J., ... & Dalmau, V. (2019). Potencial de los hongos entomopatógenos para el control de *Ceratitis capitata*, como apoyo a la Técnica del Insecto Estéril (TIE). *Phytoma España. La revista profesional de sanidad vegetal*, (310), 72-74. Disponible en: <http://34.240.160.189/handle/20.500.11939/6528>.
- Derakhshan, A., Rabindra, R. J., Ramanujam, B., & Rahimi, M. (2008). Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenic fungi, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 11(11), 1506-1509. DOI: 10.3923/pjbs.2008.1506.1509.
- Detrain, C., Verheggen, F. J., Diez, L., Wathelet, B., & Haubruge, E. (2010). Aphid–ant mutualism: how honeydew sugars influence the behaviour of ant scouts. *Physiological Entomology*, 35(2), 168-174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2010.00730.x>.
- Diaz, B. M., Oggerin, M., Lastra, C. C. L., 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>.
- Durán, J., & Chaves, M. (1996). Situación actual de las principales enfermedades de la caña de azúcar en Costa Rica. *Grecia, Costa Rica. LAICA-DIECA*.
- Elahi, N. N., & Mughal, M. (2017). Stem Epidermal Anatomy of Fourteen Sugarcane Varieties of the Punjab. *Sarhad Journal of Agriculture*, 33(2), 189-198. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2017/33.2.189.198>.
- El-Gali, Z. I., & Mohammed, M. S. (2017). Sooty Mold on Lemon Trees-First Recording from El-Beida City, Libya. *Review of Plant Studies*, 4(2), 1-7. DOI: 10.18488/journal.69.2017.41.1.7.
- Elizabeth, I. e. a. (2020). Evaluación de la relación del NDVI con la tasa respiratoria en cinco variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) (doctoral dissertation, universidad agraria del ecuador). Disponible en https://cia.uagraria.edu.ec/cia_inv_view.php?id=31629&option=view.
- Espinosa-Ortiz, G.E.; Lara-Reyna, J.; Otero-Colina, G.; Alatorre-Rosas, R. & Valdez-Carrasco, J. 2011. Susceptibilidad de larvas, pupas y abejas adultas a aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize). *Interciencia* 36

(2): 1-5. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/49085537/33917765010-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1641074717&Signature=C5G8HhgwMThIN7ID6vFVROqIbxq7gF4m9Xaqoz6Qk8tqHLrbIanUp7nhtHjT6pfG6p9a-47T3e7RFKGGK7cldC-W3Q3w5zZk-XcwjSlMHxx-AVASW80ap95PuI2Re9w8AsMHIHpqy3Oq6XdPamYHDUzqz7vpYFvj8grpLUaXjWxPmv-2u5U~FuXmOZNWStMgkD5yCResz04173A~RZWBG04FYgZ27jK8OOZWCq6FpKs0klMxpW6LrIZqrx0R1BQdzp5g27IB3YDdxCsfaU7R8fwN2qkTAnT7GtIzMeMjfy2Qtkv9wKvm3GjQ2Ehi4IBOssNHEOiPiBtljT0sO-wQA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA.

Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*, 23(1), 25-29. <https://doi.org/10.1007/s004499900115>.

Gallego Albiach, V., & Pérez Igualada, L. M. (2021). Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/169378>.

Gao, Q.; Jin, K.; Ying, S-H.; Zhang, Y. & Xiao, G. 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7(1): 1-3. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>.

García, A., Bustillo, A. E., Castro, U., & Arenas, Y. (2012). Selección de hongos entomopatógenos para controlar salivazos (Hemiptera: Cercopidae) de la caña de azúcar en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2), 252-259. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882012000200015.

Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Soberanis, W. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Laboratorio de entomopatógenos SCB, Servicio Nacional de Sanidad Agraria- SENASA, Lima. Perú, 37. <https://corporacionbiologica.info/wp-content/uploads/2020/11/Manual-de-Prod-y-Uso-de-Hong-Entomopa.pdf>.

Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., Soberanis, W. (2011). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Servicio nacional de sanidad agraria. Perú.

Gonzalez, V., Paccioretti, M., Rattalino, D., Taborda, R. J., Carrasco, F., Arias, F., & Otero, M. L. (2021). Determinación de patotipos de *Verticillium dahliae* Kleb. provenientes de las regiones olivícolas del centro y oeste de Argentina y pruebas de virulencia en algodón. *AgriScientia*, 38(1), 59-69. DOI: <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v38.n1.26937>.

- Haar, P. J., Bowling, R., Gardner, W. A., & Buntin, G. D. (2018). Epizootics of the Entomopathogenic Fungus *Lecanicillium lecani* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in Sugarcane Aphid (Hemiptera: *Aphididae*) Populations Infesting Grain Sorghum in Georgia and Texas. *Journal of Entomological Science*, 53(1), 104-106. <https://doi.org/10.18474/JES17-116.1>.
- Harris, D. R., & Fuller, D. Q. (2014). Agriculture: definition and overview. *Encyclopedia of global archaeology*, 104-113.
- Pérez, M. L. D. P., Isas, M. G., Goebel, F. R., Ayup, M. M., Padilla, A. E., Salvatore, A. R., & Gastaminza, G. (2020). Effect of crop residue management on damage by *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), its egg parasitoids and the ants associated with sugarcane. *Bulletin of Entomological Research*, 1-9. DOI: 10.1007/978-1-4419-0465-2_64.
- Hasbun, J. M. H., & Hasbun, J. C. H. (2022). Estudio de factibilidad del proyecto de producción de *Metarhizium anisopliae* para la fundación hondureña de investigación agrícola (fhia). Disponible en: <https://repositorio.unitec.edu/xmlui/bitstream/handle/123456789/8086/21613040-21613023-febrero2018-m09-t.pdf?sequence=1>.
- Honorio Aguilar, I. D. (2013). Incidencia del carbón (*ustilago scitaminea syd*). En caña de azúcar (*saccharum officinarum*) en el Valle de CHICAMA–LA LIBERTAD. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7585>.
- Iglesia, A., Peralta, E. L., Alvarez, E., Milián, J., & Matos, M. (2007). Relación de la funcionalidad de los vasos del xilema y la presencia de *Leifsonia xyli subsp. xyli*. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1), 65-65. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522007000100009&lng=es&nr_m=iso. ISSN 1010-2752.
- Javed, K., Javed, H., Mukhtar, T., & Qiu, D. (2019). Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* for the management of whitefly and aphid. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(3). DOI: 10.21162 / PAKJAS / 19.8396.
- Jing, X., Yang, C., & Zhang, L. (2016). *Characterization and Analysis of Protein Structures in Oat Bran*. *Journal of Food Science*, 81(10), C2337–C2343. doi:10.1111/1750-3841.13445.
- Joya, C. M., Bertani, R. P., Henriquez, D. D., Funes, C., & González, V. (2015). Ficha técnica: raquitismo de la caña soca. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11336/14986>.
- Kepler RM, Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Quandt CA, Sung GH, Rehner SA, Aime MC, Henkel TW, Sanjuan T, Zare R, Chen M, Li Z, Rossman AY, Spatafora JW, Shrestha B. 2017. A

- phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus* 8(2):335-353. doi: 10.5598/imafungus.2017.08.02.08, PubMed: abstract
- Kope, H. H., Alfaro, R. I., & Lavallée, R. (2008). Effects of temperature and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobi*. *BioControl*, 53, 489-500. Disponible en: See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/226760525>.
- Kumar, M. M., Chaudhary, V., & Mishra, Y. K. (2020). Assessment of media for mass culturing of *Lecanicillium lecanii*. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i4i.10523>.
- Lagos-Burbano, E., & Castro-Rincón, E. (2019). Caña de azúcar y subproductos de la agroindustria azucarera en la alimentación de rumiantes. *Agronomía Mesoamericana*, 30(3), 917-934. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i3.3466>.
- LAICA. 2019. Boletín Conexión Resultados de la Zafra 2017-2018 de LAICA. San José, C.R.
- Laura, H. J. P., & Blanco, C. L. (2017). Esporulación de conidias de *Beauveria bassiana* en sustratos de arroz. *Apthapi*, 3(2), 500-513. Disponible en: <http://ojs.agro.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/114>.
- Leal, I., Alfaro, R. I., Lim, Y. W., & Kope, H. H. (2008). Molecular characterization of the entomopathogenic fungi *Lecanicillium* spp. (Deuteromycota: Hyphomycetes) isolated from white pine weevil, *Pissodes strobi* (Coleoptera: Curculionidae), in British Columbia. *The Canadian Entomologist*, 140(2), 168-173. DOI: <https://doi.org/10.4039/n07-051>.
- Leblanc, N., Saiah, R., Beucher, E., Gattin, R., Castandet, M., & Saiter, J. M. (2008). Structural investigation and thermal stability of new extruded wheat flour based polymeric materials. *Carbohydrate polymers*, 73(4), 548-557. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.12.034.
- Lee, S., Vitale, J., Lambert, D., Vitale, P., Elliot, N., & Giles, K. (2023). Effects of weather on sugarcane aphid infestation and movement in Oklahoma. *Agriculture*, 13(3), 613. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/3/613>.
- Lecuona, R. E. (1996). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*.
- Li, F., Matloob, M., Nzabanita, C., & Li, Y. (2021). Growth, sporulation and germination of *Verticillium alfalfae* on media. *European Journal of Plant Pathology*, 161(2), 383-395. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02330-8>.

- Lou, Z., Xin, F., Han, X., Lan, Y., Duan, T., & Fu, W. (2018). Effect of unmanned aerial vehicle flight height on droplet distribution, drift and control of cotton aphids and spider mites. *Agronomy*, 8(9), 187. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.105200>.
- Lutz Porras, J. R. (2017). Evaluación del impacto del cambio climático en la producción de caña de azúcar: el caso del Ingenio Atirro en Turrialba, Costa Rica. Disponible en <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3435/1/40416.pdf>.
- Macías, O., Estévez, H., Acosta, J., & Carvajal, O. (2011). La escaldadura foliar de la caña de azúcar *Xantomonas albilineans* Ashby Dowson. Síntomas, situación actual y medidas de control. Matanzas: Cd de monografías 2011, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Disponible en: <http://monografias.umcc.cu/monos/2011/AGRONOMIA/mo11fa2.pdf>.
- Makur, M. M., Duraisamy, R., & Birhanu, T. (2019). Clarifying Capacity of Eco-Friendly Nano Cao and Okra (*Abelmoschus esculentus*) Extract on the Processing of Sugarcane Juice: A Review. *International Research Journal of Science and Technology*, 1(1), 21-30. DOI: <https://doi.org/10.46378/irjst.2019.010104>.
- Mansilla, A. A. H., & Álvarez, C. R. (2005). Evaluación preliminar del crecimiento y la esporulación de *Aschersonia aleyrodis* Webber en medios de cultivo convencionales. *Fitosanidad*, 9(3), 61-63. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116189012.pdf>.
- Marques, N. P., de Cassia Pereira, J., Gomes, E., da Silva, R., Araújo, A. R., Ferreira, H., ... & Bocchini, D. A. (2018). Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 122, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26. DOI <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>.
- Matarrita Rosales, A. G., & Vásquez Alvarado, M. A. (2021). Efecto de diferentes momentos de suspensión del riego sobre la maduración y tonelaje de las variedades de caña de azúcar (*Saccharum Officinarum*.) CP72-2086, MEX79-431 Y RB86-7515, tratadas mediante riego por goteo en la Zafra 2019-2020. Finca EXPORPACK SA. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10669/85413>.

- Medina Litardo, R. C. (2017). Transmisión del virus del mosaico (*ScMV*) en el cultivo de caña de azúcar en Ecuador (Bachelor's thesis, Espol). Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/40148>.
- Méndez, A., Del Pozo, E., García, I., & González, A. (2010). EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON. *Revista de Protección Vegetal*, 25(2), 108-112. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000300004.
- Minarni, E. W., Soesanto, L., & Suyanto, A. (2021). Molecular identification of three entomopathogenic fungi infecting the brown plant hopper pest in Indonesia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-8. DOI: 10.1186/s41938-021-00412-7.
- Mirajkar, S. J., Devarumath, R. M., Nikam, A. A., Sushir, K. V., Babu, H., & Suprasanna, P. (2019). Sugarcane (*Saccharum* spp.): Breeding and Genomics. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops* (pp. 363-406). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_11.
- Moir, M. L., Renton, M., Hoffmann, B. D., Leng, M. C., & Lach, L. (2018). Development and testing of a standardized method to estimate honeydew production. *PloS one*, 13(8), e0201845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201845>.
- Mónica, B., Alicia, G. L., Margot, T., Fernando, C., & Carlos, R. (2008). “Infostat. Manual del usuario”. Disponible en: https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/10346/Manual_INFOSTAT_2008.pdf?sequence=1
- Montesinos-Matías, R. (2014). Efecto de la crioconservación en diferentes especies de hongos entomopatógenos. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Miguel-Ayala-Zermeno/publication/288670224_Efecto_de_la_crioconservacion_en_diferentes_especies_de_hongo/links/5881176daca272b7b441737a/Efecto-de-la-crioconservacion-en-diferentes-especies-de-hongo.pdf.
- Monzón, A. (2002). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Disponible en: <https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6723/A2107e.pdf?sequence=1>.
- Monzón, C. (2000). Producción y uso de hongos Entomopatógenos. Disponible en: <https://45.32.134.17/bitstream/handle/11554/10698/A0949e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Monzón-Ruiz, V. R. (2016). *Formulaciones de Beauveria bassiana (Bals y vuils) para el manejo de plagas en el cultivo del repollo (Brassica oleracea L. var capitata) en el Tisey, Estelí* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria). Disponible en: <https://repositorio.una.edu.ni/3283/1/tnh10m816f.pdf>.
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.187>.
- Nelson, S. (2008). Sooty mold.
- Ocampos, C. J. G., Fuente, A. L. O., & Bonzon, A. D. S. (2013). Eficiencia de sustratos sobre la esporulación de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp. *Investigación Agraria*, 7(1), 42-48. Disponible en: <https://www.cabi.org/wp-content/uploads/Grabowski-2005-Substrates-entomopathogenic-fungi.pdf>.
- Ovalle, W., & de CENGICANA, F. (2017). Hongos asociados con la enfermedad Caña seca de la Caña de azúcar. *Memoria Presentación de resultados de investigación Zafra, 2018*, 196-206. Disponible en: <https://cengicana.org/files/20180323162522444.pdf>.
- Palmero, D., Iglesias, C., & Tello, J. C. (2009). Estudio preliminar de la germinación y viabilidad de las especies de *Fusarium* en respuesta al potencial osmótico del medio. https://www.researchgate.net/publication/235898061_Estudio_preliminar_de_la_germinacion_y_viabilidad_de_las_especies_de_Fusarium_en_respuesta_al_potencial_osmotico_del_medio/citation/download.
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 535-546. <https://www.scielosp.org/article/rpmesp/2014.v31n3/535-546/>.
- Pardo, L. A., Freeman, L. E. B., Lerro, C. C., Andreotti, G., Hofmann, J. N., Parks, C. G., ... & Koutros, S. (2020). Pesticide exposure and risk of aggressive prostate cancer among private pesticide applicators. *Environmental Health*, 19(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00583-0>.
- Pecina-Quintero, V., MarínJarillo, A., Bujanos-Muñiz, R., Cortez-Mondaca, E., Yañez-López, R., & Jiménez-Becerril, M. F. (2021). Comportamiento Poblacional de *Melanaphis sacchari* (Zehntner) 1 y Entomófagos en El Bajío, México. *Southwestern Entomologist*, 46(3), 751-758. <https://doi.org/10.3958/059.046.0316>.

- Perales-Rosas, Daniel, Hernández-Pérez, Ricardo, Guillén-Sánchez, Dagoberto, López-Martínez, Víctor, Alia-Tejacal, Irán, Andrade-Rodríguez, María, Juárez-López, Porfirio, & Perdomo-Roldán, Francisco. (2018). Detection of sugarcane yellow leaf virus and sugarcane mosaic virus in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in the state of Morelos, México. *Scientia Agropecuaria*, 9(3), 423-427. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.03.14>.
- Pereira, G., Herrera, J., Machuca, A., & Sánchez, M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque (Valdivia)*, 28(3), 215-219. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002007000300005>.
- Pinciroli, M. (2011). *Proteínas de arroz: propiedades estructurales y funcionales* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata). Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/1828/Documento_completo__.pdf?sequence=3&isAllowed=y.
- Pringle, E. G., Novo, A., Ableson, I., Barbehenn, R. V., & Vannette, R. L. (2014). Plant-derived differences in the composition of aphid honeydew and their effects on colonies of aphid-tending ants. *Ecology and Evolution*, 4(21), 4065-4079. <https://doi.org/10.1002/ece3.1277>.
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&nrm=iso. ISSN 0378-1844.
- Qu, S., & Wang, S. (2018). Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 96–103. doi:10.1016/j.dci.2018.01.010.
- Quaghebeur, C., Serteyn, L., Stouvenakers, G., Sarles, L., Ongena, M., Ramirez, C. C., & Francis, F. (2018). Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on aphids reproduction and feeding behaviour. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2268/247365>.
- Raigoza Montenegro, J. F. (2023). Evaluación del manejo etológico y biológico de mosca blanca (*Trialeurodes* sp.) en el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Disponible en: <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/19605>.
- Ramírez Estrada, Y. P. (2020). *Evaluación de la eficacia de Beauveria bassiana y metarhizium spp. En el control de Picudo Rayado de Caña de Azúcar en condiciones de Campo Fátima–Pastaza* (Bachelor's thesis, Universidad Estatal Amazónica). <https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/634>.

- Ramírez, H. G., Granja, A. Z., Aguila, E. T., & Cantoral, M. T. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *Laboratorio de entomopatógenos SCB-SENASA*. Disponible en: <https://corporacionbiologica.info/wp-content/uploads/2020/11/Manual-de-Prod-y-Uso-de-Hong-Entomopa.pdf>.
- Ramírez-Sánchez, C. J., Morales-Flores, F. J., Alatorre-Rosas, R., Mena-Covarrubias, J., & Méndez-Gallegos, S. D. J. (2019). Efectividad de hongos entomopatógenos sobre la mortalidad de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) en condiciones de laboratorio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(SPE22), 1-14. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342019000900001&script=sci_arttext.
- Ramteke, B. D., Thakur, K. D., Bramhankar, S. B., Gawande, S. P., Isokar, S. S., & Ramteke, D. (2022). Molecular characterization and Phylogenetic analysis of *Lecanicillium* spp. Disponible en: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2022/vol11issue8/PartM/11-8-29-944.pdf>
- Rico, D., Villaverde, A., Martínez-Villaluenga, C., Gutiérrez, A. L., Caballero, P. A., Ronda, F., ... & Martín Diana, A. B. (2020). Application of autoclave treatment for development of a natural wheat bran antioxidant ingredient. *Foods*, 9(6), 781. Doi:10.3390/foods9060781.
- Ritika, N. J., & Sangha, K. S. (2019). Effect of adjuvants on *Lecanicillium lecanii* against nymphs of *Lipaphis erysimi* (Kalt). *Indian Journal of Entomology*, 81(3), 597-602. DoI No.: 10.5958/0974-8172.2019.00125.1.
- Rivas, F., Nuñez, P., Jackson, T., & Altier, N. (2014). Effect of temperature and water activity on mycelia radial growth, conidial production and germination of *Lecanicillium* spp. isolates and their virulence against *Trialeurodes vaporariorum* on tomato plants. *BioControl*, 59(1), 99-109. DOI 10.1007/s10526-013-9542-y.
- Rivera Méndez, W. (s/f). *Instituto Tecnológico de Costa Rica Escuela de Biología Informe de Práctica de Especialidad Control de Calidad en el Proceso de Producción de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas Mediante Fermentación en Sustrato Sólido*. Tec.ac.cr. Recuperado el 5 de junio de 2023, Disponible en: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/232/b1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rojas, M. M. (2018). Consecuencias ambientales y riesgos para la salud causados por el plaguicida Paraquat en Costa Rica. *Pensamiento Actual*, 18(30), 56-66. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6488776>.

- Romero, S. D. (2020). Aislados nativos de *Lecanicillium sp* para el manejo de la roya *Hemileia vastatrix* (*Berk & Broome*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria). <https://repositorio.una.edu.ni/4136/1/tnh20r763.pdf>.
- Saba Hasan, A. A., Purwar, A., Khan, N., Kundan, R., & Gupta, G. (2013). Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*, 9(5), 238. doi: 10.6026/97320630009238.
- Salazar, J. (2009). Situación actual de las plagas de la caña de azúcar en Costa Rica. *Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA)*. Costa Rica. <https://1library.co/document/ye1xmm7z-situaci%C3%B3n-actual-plagas-ca%C3%B1a-az%C3%BAcar-daniel-salazar-blanco.html>.
- Samaan, J., El-Khayat, G. H., Manthey, F. A., Fuller, M. P., & Brennan, C. S. (2006). *Durum wheat quality: II. The relationship of kernel physicochemical composition to semolina quality and end product utilisation*. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(s2), 47–55. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01313.x.
- Sandoval – Coronado, C., Quintero-zapata, I., Elías Santos, M., Maldonado – Blanco, M., Lozano – Contreras, M., Galán – Wong, L. (2011). Producción en cultivo sólido de *Metarhizium anisopliae* en grano de arroz cocido a diferentes concentraciones de agua. Universidad 73 autónoma de Nuevo León, Facultad de ciencias biológicas, instituto de Biotecnología. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Sarikaya-Bayram, Ö., Palmer, J. M., Keller, N., Braus, G. H., & Bayram, Ö. (2015). One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmic>.
- Sepulveda, M. E. (2019). Control biológico de plagas con hongos entomopatógenos de BioINIA. *Informativo INIA Quilamapu*. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/4929/NR41482.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Shi, Y., Xu, X., & Zhu, Y. (2009). Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(5), 921-927. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1874-2>.
- Shin, T. Y., Lee, M. R., Park, S. E., Lee, S. J., Kim, W. J., & Kim, J. S. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 105(4), e21747. <https://doi.org/10.1002/arch.21747>.

- Shi-Wen, L., Lei-Yu, H., & Li-Hui, S. (2018). Effect of different stabilisation treatments on preparation and functional properties of rice bran proteins. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(1), 57-65. Disponible en: <https://www.agriculturejournals.cz/pdfs/cjf/2018/01/09.pdf>.
- Shuo, Y. A. N., WANG, W. X., & Jie, S. H. E. N. (2020). Reproductive polyphenism and its advantages in aphids: Switching between sexual and asexual reproduction. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(6), 1447-1457. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S209531191962767X>.
- Sieiro Miranda, G. L., González Marrero, A. N., Rodríguez Lema, E. L., & Rodríguez Regal, M. (2020). Efecto de los macroelementos primarios en la susceptibilidad a enfermedades. *Centro Agrícola*, 47(3), 66-74. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-57852020000300066&script=sci_arttext&tlng=en.
- Sierra, E. D. E. J. (2007). Uso actual de las técnicas moleculares en el análisis y tipificación de microorganismos patógenos. <http://www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/mejoramientoanimal/wp-content/uploads/sites/13/2017/09/Uso-actual-de-las-t%C3%A9cnicas-moleculares-en-el-an%C3%A1lisis.pdf>.
- Styrsky, J. D., & Eubanks, M. D. (2007). Ecological consequences of interactions between ants and honeydew-producing insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1607), 151-164. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3701>.
- Subramaniam, M. S. R., Babu, A., & Deka, B. (2021). *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & Gams, as an efficient biocontrol agent of tea thrips, *Scirtothrips bispinosus* Bagnall (Thysanoptera: Thripidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). doi:10.1186/s41938-021-00380-y.
- Sucaticona Vilca, F. (2018). Actividad antagónica in vitro de los hongos *Trichoderma* spp y *Lecanicillium* spp. frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) en condiciones de laboratorio. Disponible en: http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/10442/Sucaticona_Vilca_Fanny.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Svetlana Y. Gouli. (2018). *Lecanicillium wilt* (*Lecanicillium lecanii*) fruiting bodies [Fotografía]. <https://www.ipmimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=12317>.

- Tagu, D., Le Trionnaire, G., Tanguy, S., Gauthier, J. P., & Huynh, J. R. (2014). EMS mutagenesis in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(4), 657-667. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009639>.
- Tena, A., Senft, M., Desneux, N., Dregni, J., & Heimpel, G. E. (2018). The influence of aphid-produced honeydew on parasitoid fitness and nutritional state: A comparative study. *Basic and Applied Ecology*, 29, 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2018.04.003>.
- Urtubia, I., & France, A. (2007). Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. *Tierra Adentro*. Disponible en: <https://inia.prodigioconsultores.com/handle/123456789/6379>.
- Valdés, B. L., Aday, O., Ocaña, B., Jiménez, L. E. R., Hernández, M., Acosta-Suárez, M., ... & Oloriz, M. I. (2017). Protocolo para seleccionar cultivares de caña de azúcar resistentes a la roya naranja mediante inoculación artificial en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal*, 17(1). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/525>.
- Valenzuela Arias, G. G. (2015). Optimización de procesos del área de siembra del laboratorio artesanal de Trichoderma de una institución pública Mediante un análisis de gestión (Bachelor's thesis, PUCE). Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/10028/TESIS.pdf;sequence=1>.
- Vallejo, M; Chávez, M; Solano, Z; Chacón, M & Montenegro, J. 2021. Lineamientos para el diseño de NAMA caña de azúcar. MAG/MINAE. San José, C.R. 10 p. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E14-11073.pdf>.
- Vargas Tenorio, D. A. (2017). Efecto de la aplicación de *Lecanicullium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo del café (*Coffea arabica*). Disponible en: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3432/1/40419.pdf>.
- Velez, P. E., Posada, F. J., Marín, P., González, M. T., Osorio, E., & Bustillo, A. E. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. Disponible en: <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/709>.
- Vignola, Raffaele., Poveda Coto, Karina., Watler, William., Vargas Céspedes, Armando., Berrocal Solís, Álvaro. (2018). Cultivo de caña de azúcar en Costa Rica. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8327.pdf>.
- Villalba, P. L., Grillo-Ravelo, H., & Cupull, R. (2010). Evaluación de tres sistemas de agitación para la producción de blastosporas del hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. *Centro*

- Agrícola*, 37(1), 17-21. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/hevila/Centroagricola/2010/vol37/no1/3.pdf>.
- Voegtlin, D., Villalobos, W., Sánchez, M. V., Saborío, G., & Rivera, C. (2003). Guía de los áfidos alados (Homoptera) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 1-214. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44911878001>.
- Völkl, W., Woodring, J., Fischer, M., Lorenz, M. W., & Hoffmann, K. H. (1999). Ant-aphid mutualisms: the impact of honeydew production and honeydew sugar composition on ant preferences. *Oecologia*, 118(4), 483-491. <https://doi.org/10.1007/s004420050751>.
- Watanabe, S., Yoshimura, J., & Hasegawa, E. (2018). Ants improve the reproduction of inferior morphs to maintain a polymorphism in symbiont aphids. *Scientific reports*, 8(1), 1-8. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-20159-w>.
- Woodring, J., Wiedemann, R., Fischer, M. K., Hoffmann, K. H., & Völkl, W. (2004). Honeydew amino acids in relation to sugars and their role in the establishment of ant-attendance hierarchy in eight species of aphids feeding on tansy (*Tanacetum vulgare*). *Physiological Entomology*, 29(4), 311-319. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00386.x>.
- Xianglin, Z., Yuewen, W., & Zhenhua, Z. (2004). Influence of different nutrition and culture condition on growth of *Verticillium albo-atrum*. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 41(5), 283-287. Disponible en: <https://europepmc.org/article/cba/477056>
- Yadav, R. N., Rashid, M. M., Zaidi, N. W., Kumar, R., & Singh, H. B. (2019). Secondary metabolites of *Metarhizium* spp. and *Verticillium* spp. and their agricultural applications. In *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms* (pp. 27-58). Springer, Singapore. DOI:10.1007/978-981-13-5862-3_2.
- YAN, S., REN, X., WANG, D., ZHANG, Y., ZHANG, Z., GUO, J., ... & WU, S. (2023). The Research Progress on the Effects of Entomopathogenic Fungi on Natural Enemies. *Chinese Journal of Biological Control*, 39(1), 221. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2022.01.014.
- Yoon, Y. J., Yu, Y. M., Lee, M. H., Han, E. J., Hong, S. J., Ahn, N. H., ... & Park, J. H. (2010). Characterization of *Lecanicillium lecanii* Btab0l isolated with bioactivities to tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*). *Korean journal of applied entomology*, 49(4), 417-422. Disponible en: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201014435570691.page>.
- Zambrano-Gutiérrez, J., Alatorre-Rosas, R., Carrillo-Benítez, M. G., Lomelí-Flores, J. R., Guzmán-Plazola, R. A., Azuara-Domínguez, A., & Terán-Vargas, A. P. (2019). Species Diversity of

Entomopathogenic Fungi Infecting the Sugarcane Aphid *Melanaphis sacchari*: A Recently Introduced Pest in Mexico. *Advances in Microbiology*, 9(1), 38-55. DOI: 10.4236/aim.2019.91004.

Zare, R, Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73: 1-50.

1. Anexos

Anexo 1. Cascada de reacciones metabólicas de los hongos en respuesta a señales ambientales que recibe a través de la membrana plasmática.

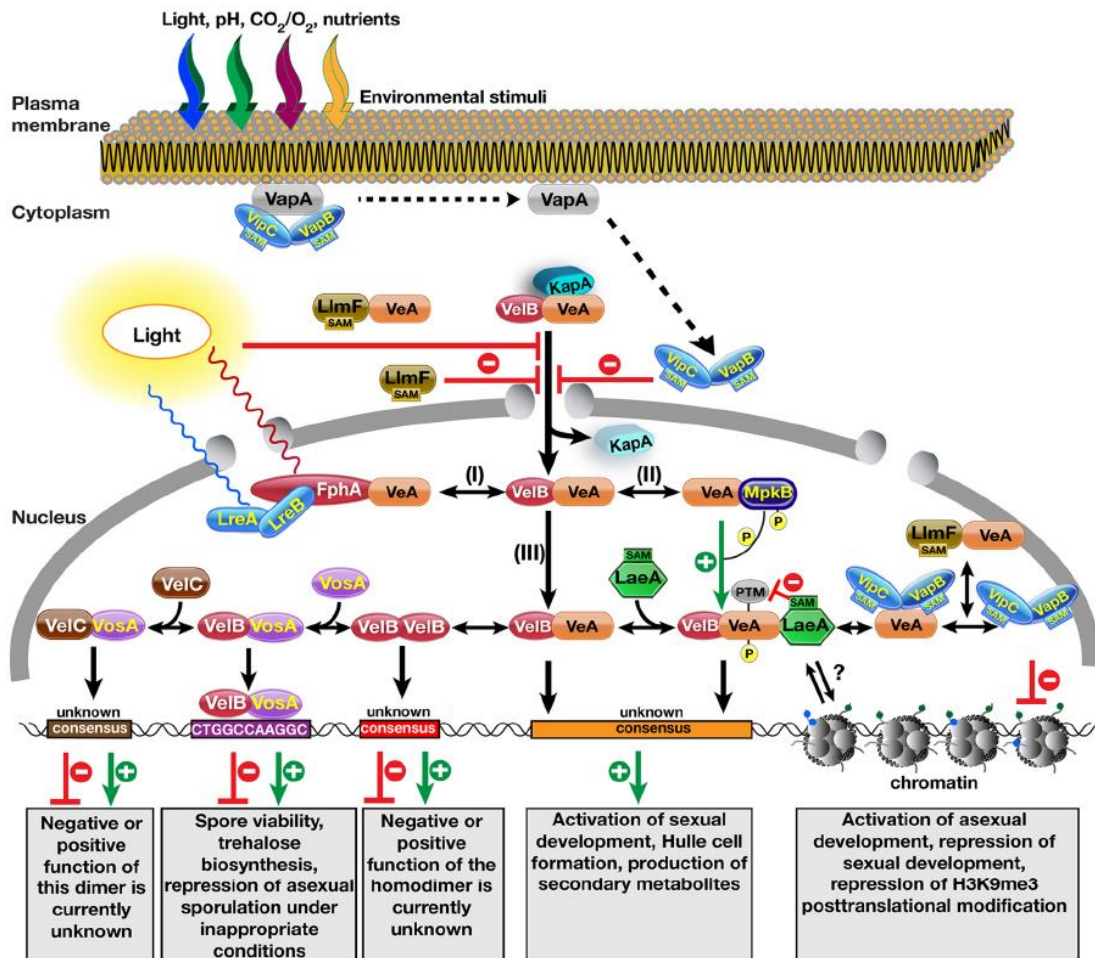


Figura 16. Complejos moleculares formados por las proteínas de la familia terciopelo y las metiltransferasas sobre el control del desarrollo fúngico.