



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

HONGO ENTOMOPATÓGENO NATIVO ASOCIADO A LARVAS DE LEPIDÓPTERO

CON POTENCIAL DE APROVECHAMIENTO AGRÍCOLA EN EL VALLE DE

TOLUCA

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO

AGRÓNOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

RICARDO EMMANUEL DÍAZ GONZALEZ EVARISTO

MODALIDAD: TESIS

ASESORES:

DR. EN C. JESÚS RICARDO SÁNCHEZ PALE

DRA. ALEJANDRA CONTRERAS RENDÓN

CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS,

MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉX., OCTUBRE 2023



INDICE

No.		Pág.
	DEDICATORIAS	ii
	AGRADECIMIENTOS	v
	ÍNDICE	vi
	ÍNDICE DE CUADROS	x
	ÍNDICE DE FIGURAS	xi
	RESUMEN	xiii
	ABSTRACT	xv
I	INTRODUCCION	1
II	OBJETIVOS	3
III	HIPOTESIS	4
IV	JUSTIFICACION	5
V	REVISION DE LITERATURA	6
5.1	Efectos de la producción agrícola convencional en las últimas décadas.	6
5.2	Control Biológico	7
5.2.1	Parasitoides y depredadores	8
5.2.2	Hiperparasitismo	8
5.2.3	Patógenos (hongos, bacterias, virus)	9

5.2.4	Tipos de control biológico	10
5.3	Entomopatógenos o patógenos de insectos	10
5.3.1	Hongos entomopatógenos	10
5.3.2	Mecanismo de infección	11
5.4	Cepas nativas	13
5.5	<i>Beauveria bassiana</i>	14
5.5.1	Origen y distribución	14
5.5.2	Taxonomía	14
5.6	Hongos endófitos	15
5.7	Hongos entomopatógenos en el control de plagas	15
5.7.1	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals. -Criv.) Vuill.	15
5.7.2	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin.	16
5.7.3	Estudios de diversos hongos	16
5.8	Casos de control biológico en México y en algunos países	17
5.9	Huésped para bioensayo	21
5.9.1	<i>Callophrys xami</i>	21
5.9.2	Taxonomía	24
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1	Extracción de la cepa	28
6.1.1	Recolecta	28

6.2	Aislamiento de muestras recolectadas	30
6.3	Cultivo puro	30
6.4	Cultivo monospórico por dilución en placa	30
6.5	Observación y descripción de la morfología del hongo	31
6.6	Análisis molecular	31
6.6.1	Extracción de ADN	31
6.6.2	Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	31
6.7	Pruebas de parasitismo de la cepa aislada	33
6.7.1	Pie de cría insectil	33
6.7.2	Reactivación de la cepa	36
6.7.3	Producción masiva del inóculo	37
6.7.4	Producción y formulación del inóculo y suspensión de esporas	37
6.7.5	Pruebas de patogenicidad	37
6.8	Análisis de datos	38
VII	RESULTADOS	39
7.1	Observación y descripción de la morfología del hongo	39
7.2	Análisis molecular	40
7.3	Pruebas de patogenicidad	41
7.4	Análisis de varianza	43
VIII	DISCUSIÓN	44

IX	CONCLUSIONES	50
X	BIBLIOGRAFÍA	53
XI	ANEXOS	59

INDICE DE CUADROS

No.		Pág.
Cuadro 1	Datos de recolecta	30
Cuadro 2	Resultados de mortandad de larvas en los tres tratamientos evaluados	44
Cuadro 3	Resultados del análisis de varianza para la variable mortandad de larvas con dos concentraciones de conidios de <i>B. bassiana</i>	45
Cuadro 4	Comparación de medias para la variable mortandad de larvas con el uso de dos concentraciones de conidios	46

INDICE DE FIGURAS

No.		pág.
Figura 1	<i>Echeveria secunda</i> ovipositada por <i>C. xami</i> y con presencia de telarañas en la base de la planta y sobre el sustrato.	22
2Figura 2	Adulto de <i>C. xami</i> polinizando flor	23
Figura 3	Adultos de <i>C. xami</i> cortejando	24
Figura 4	Larva de <i>C. xami</i> alimentándose de una hoja de <i>Echeveria pallida</i> x <i>secunda</i> (A) larva dentro de hoja vista sin epidermis (B)	24
Figura 5	Especímenes de <i>C. xami</i> vista dorsal (A) Hembra (B) Macho (C)	25
Figura 6	<i>C. xami</i> Huevecillo eclosionado (B) Larva minando hojas (C) Pupas (D) Adultos en apareamiento	26
Figura 7	Daño en las hojas de las plantas por <i>C. xami</i> en la planta (A, B, C)	26
Figura 8	Daños en hojas ocasionados por <i>C. xami</i> : Hoja sana, Daño inicial, Daño progresivo, Minado completo de hoja (sin tejido succulento o parénquima)	27
Figura 9	Planta con hojas secas minadas por <i>C. xami</i>	27
Figura 10	Ubicación geográfica del lugar de recolecta por medio de Google maps.	29
Figura 11	Larvas con presencia de micosis recolectadas	30
Figura 12	Criadero para la especie <i>C. xami</i>	35

Figura 13	Esqueje enraizado en el criadero (A) Planta final para oviposición de las mariposas en el criadero (B).	36
Figura 14	Pupa con presencia de micosis	38
Figura 15	Aislamientos de <i>B. bassiana</i> Vista trasera (A) Vista frontal (B)	41
Figura 16	Estructuras del hongo en microscopio 100x	42
Figura 17	Análisis BLAST en NCBI	43
Figura 18	Incidencia de <i>B. bassiana</i> en especímenes de los tratamientos	44
Figura 19	Mortalidad de <i>C. xami</i> con <i>B. bassiana</i>	45

Anexos

Anexo		pág.
1	Especies usadas como huésped en el criadero para la oviposición y alimentación de la plaga <i>C. xami</i>	59
2	Daños causados por la plaga en distintas especies de la familia crassulaceae.	63
3	Observaciones en microscopio estereoscópico.	67
4	Establecimiento del criadero en la Facultad de Ciencias Agrícolas.	68
5	Trabajos de laboratorio realizados	73

RESUMEN

HONGO ENTOMOPATÓGENO NATIVO ASOCIADO A LARVAS DE LEPIDÓPTERO CON POTENCIAL DE APROVECHAMIENTO AGRÍCOLA EN EL VALLE DE TOLUCA.

¹Ricardo Emmanuel Díaz Gonzalez Evaristo Licenciatura de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista.

Asesores: ¹Jesús Ricardo Sánchez Pale ¹Alejandra Contreras Rendón.

¹Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Universitario El Cerrillo, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Méx. Código Postal 50200.

Los hongos entomopatógenos representan alternativas al uso y aplicación de insecticidas, uno de los métodos más usados en el control convencional de plagas de importancia agrícola, debido a que representan una alternativa de bajo impacto ecológico en el control de poblaciones de plagas de distintos cultivos. Se detectó la presencia de un hongo entomopatógeno nativo del municipio de Zinacantepec, Estado de México en insectos del orden Lepidoptera. A partir de larvas infectadas se realizaron aislamientos en medio PDA del posible entomopatógeno y se analizaron con técnicas moleculares. También se realizó un bioensayo en plantas suculentas de la familia Crassulaceae infestadas con una especie fitófaga de lepidóptero para confirmar la infección del hongo, determinar la capacidad de mortandad de la cepa y el tiempo promedio de muerte de los insectos, mediante un ANOVA se midió la mortalidad de la cepa. En los diferentes crecimientos, siempre fue consistente la presencia del hongo con características morfológicas similares a *Beauveria* spp. El análisis molecular indicó la identidad del hongo *Beauveria bassiana*. La mortalidad de la cepa fue del 100% en la concentración de 1×10^9 y de 80% en 1×10^8 , en un tiempo letal promedio de 6 días y de 5.66 días respectivamente. Es importante rescatar, identificar y preservar los microorganismos que se encuentran en nuestras regiones para conservar la biodiversidad y junto con las cepas que se conservan en centros de investigación, realizar estudios para evaluar su virulencia y obtener cepas nativas con potencial bioinsecticida e implementar su uso en programas de manejo integrado de plagas.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, cepas nativas, lepidópteros.

ABSTRACT

NATIVE ENTOMO-PATHOGENIC FUNGUS ASSOCIATED WITH LEPIDOPTERAN LARVAE WITH POTENTIAL FOR AGRICULTURAL USE IN THE TOLUCA VALLEY.

Ricardo Emmanuel Diaz Gonzalez Evaristo Agronomist Engineer Phytotechnics.
Autonomous Mexico State University. Faculty of Agricultural Sciences.

Advisors: 1 Jesús Ricardo Sánchez Pale 2 Alejandra Contreras Rendón

¹ Autonomous University of the State of Mexico. Faculty of Agricultural Sciences. El Cerrillo University Campus, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Mex. ZIP Code 50200.

Entomopathogenic fungi represent alternatives to the use and application of insecticides, one of the most commonly used methods in the conventional control of pests of agricultural importance, because they represent an alternative with low ecological impact in the control of pest populations of different crops. The presence of an entomopathogenic fungus native was found in the municipality of Zinacantepec, State of Mexico, in insects of the order Lepidoptera. Isolations of the possible entomopathogen were made from infected larvae in PDA medium and analyzed with molecular techniques. A bioassay was also carried out on succulent plants of the Crassulaceae family infested with a phytophagous species of Lepidoptera to confirm the infection of the fungus, determine the mortality capacity of the strain, and determine the average death time of the insects. An ANOVA was used to measure the strain mortality. In the different growths, the presence of a fungus with morphological characteristics similar to *Beauveria* spp. was always consistent. Molecular analysis indicated the identity of the *Beauveria bassiana* fungus. The mortality of the strain was 100% at a concentration of 1×10^9 and 80% at 1×10^8 , for an average lethal time of 6 days and 5.66 days, respectively. It is important to rescue, identify, and preserve the microorganisms that were found in our regions to conserve biodiversity, and together with the strains that are conserved in research centers, conduct studies to evaluate their virulence, and obtain native strains with bioinsecticidal potential, and implement their use in programs of integrated pest management.

Keywords: *Beauveria bassiana*, native strains, Lepidoptera.

I. INTRODUCCIÓN

Las plagas representan un factor limitante para alcanzar altos rendimientos en los cultivos, causan daños económicos y pérdidas en el rendimiento por altos índices de población de insectos dañinos en las distintas etapas del ciclo de los cultivos, esto se debe a la falta de un correcto manejo de plagas. Desde tiempos antiguos se tienen evidencias de hongos presentes en el ambiente afectando poblaciones de diferentes insectos. Los principales avistamientos se observaron en abejas y gusanos de seda por su importancia económica (Espinel et al., 2018).

Los distintos tipos de microorganismos causantes de enfermedades en insectos representan recursos genéticos útiles para el control de plagas en la agricultura, el uso de formulaciones de distintos tipos de estructuras reproductivas particulares de microorganismos benéficos específicos (hongos, bacterias, virus) aplicados por el hombre en los cultivos se le conoce como control biológico (Espinel et al., 2018), tiene la finalidad de que una enfermedad se disemine y establezca en la población insectil (en este caso existe una relación insecto/hongo entomopatógeno) causando una alta tasa de contagio o una epizootia en el agrosistema, la cual en ausencia del hombre no se obtendría, este método se utiliza actualmente de manera alternativa a los plaguicidas de síntesis química como método de control, manteniendo un estricto monitoreo para medir el crecimiento poblacional y mantener un adecuado manejo de plagas, generando un impacto menos contaminante para el ambiente (Russo, 2016).

De las enfermedades que infectan a los insectos el 80% es causado por los hongos entomopatógenos y más de 750 especies están diseminadas en el ambiente y provocan enfermedades en insectos (Hernández, 2019). Es importante contar con

microorganismos nativos patogénicos para el control de insectos ya que poseen adaptación climática a la región y puede representar una ventaja frente a otros usados comercialmente, se deben preservar y aprovechar los recursos genéticos ya que representan elementos de utilidad en problemas actuales y futuros para aumentar la variabilidad genética entre las distintas cepas investigadas y usadas en la actualidad (García, 2011).

Uno de los principios en que se basa el control biológico de plagas (control biológico por conservación y aumentativo), es el uso de cepas nativas adaptadas a las condiciones ambientales y presentes en la región (Arrizibita, 2019). Ante la necesidad de contar con cepas nativas del Valle de Toluca como alternativa para el control de plagas, la investigación se realizó a partir de un hongo entomopatógeno que se avisto dentro de un invernadero de distintas hortalizas manejadas con enfoque orgánico, se encontró ejerciendo control en distintas especies de lepidópteros, reduciendo la población y diseminado en larvas que afectaban a la mayoría de los cultivos establecidos en el invernadero.

II. OBJETIVO GENERAL

Determinar la identidad del hongo que ejerce control sobre especies de plagas de interés agronómico.

Objetivos específicos:

- 1.- Identificar el hongo entomopatógeno mediante técnicas moleculares.
- 2.- Determinar la patogenicidad del aislamiento en distintas larvas.

III. HIPÓTESIS:

El hongo entomopatógeno asociado a lepidópteros corresponderá a la identidad de al menos un hongo reportado como agente de control biológico.

IV. JUSTIFICACIÓN

La agricultura convencional requiere el uso de insumos externos para el control de plagas y enfermedades, los cuales provocan efectos adversos en el ambiente y en la fauna nativa. El uso de plaguicidas ocasiona bajas en las poblaciones de microorganismos nativos de la zona, dañan los recursos naturales, además si no se usan adecuadamente pueden causar alteraciones a la sanidad e inocuidad de los cultivos y en cultivos de exportación pueden sobrepasar los límites máximos de residuos (LMR) de los estándares internacionales permitidos. Actualmente se utilizan organismos entomopatógenos para el control de plagas, los cuales tienen la ventaja de ser de menor costo y amigables con el ambiente. Uno de los requisitos deseables para el uso de microorganismos en el control de plagas es que deben de ser nativos de la zona o región en donde se desean utilizar. Se observó la presencia de un hongo entomopatógeno infectando larvas de lepidóptero. Por tal motivo resulta deseable determinar la identidad del hongo que ejerce control sobre especies plagas de interés agronómico en el Valle de Toluca.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Efectos de la producción agrícola convencional en las últimas décadas.

Las técnicas adoptadas durante la revolución verde cambiaron totalmente la manera de producir, actualmente la agricultura convencional se basa aun en los principios de esta revolución los cuales son: producir de manera independiente los cultivos, es decir monocultivos o parcelas donde únicamente hay un tipo de cultivo, se utilizan mayores volúmenes de fertilizantes y plaguicidas, ("plaguicida" comprende todos los productos químicos utilizados para destruir o controlar las plagas) así como agua en grandes cantidades (Martínez *et al.*, 2018).

Esta transición de la agricultura, sin duda trajo beneficios en la producción agrícola a corto y mediano plazo, debido a la eficiencia biológica de estos agroquímicos en el momento, sin embargo traería perjuicios a mediano o largo plazo en los sistemas de monocultivo actuales, por ejemplo, deficiencias de nutrientes por la extracción continua de un monocultivo, mayor presencia de plagas y enfermedades durante el ciclo de cultivo, así como la resistencia adquirida por falta de conocimiento en la rotación de los sitios de acción de los plaguicidas sobre estos, el uso de insecticidas acaba con la población de insectos en general, es decir plagas e insectos benéficos, los cuales en su ausencia traería repercusiones más severas (Pacheco *et al.*, 2019).

La resistencia se puede definir como el desarrollo de la habilidad de algunos individuos para soportar o tolerar la exposición a dosis mayores de tóxicos mediante cambios genéticos en respuesta a la presión de selección, es decir, la población alélica

susceptible va desapareciendo y aumenta la frecuencia alélica resistente en la población (Peñaranda, 2016).

Un uso intensivo de los suelos, no realizando rotaciones de cultivos, las aplicaciones indiscriminadas de fertilizantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas, etc. No solo provocan la resistencia de los organismos adversos al cultivo, si no que provocan al mismo tiempo la disminución de microorganismos benéficos nativos o presentes en la zona (Pacheco *et al.*, 2019). Los efectos indirectos de todos los agroquímicos mal aplicados contaminan los cuerpos de agua, mantos freáticos y en caso de los fertilizantes la eutrofización del agua (García, 2020).

5.2 Control Biológico

El uso de microorganismos benéficos que sirve para contrarrestar la presencia de agentes dañinos y se conoce con el nombre de control biológico, sirve para contrarrestar la incidencia o el aumento de poblaciones a niveles del umbral de daño económico que restarían rendimiento a la producción. El control biológico en una de sus definiciones clásicas es la acción ejercida por parásitos depredadores y patógenos para mantener la población de otros organismos en niveles más bajos de los que existirían en ausencia de enemigos naturales (Espinell *et al.*, 2018).

Otra definición de control biológico es: el uso de organismos para suprimir una plaga, reducir el impacto o la tasa de crecimiento de las poblaciones, causando que la población sea menos abundante o dañina (Eilenberg *et al.*, 2001). Más recientemente Cotes (2018)

lo define como el aprovechamiento de las interacciones (simbiosis) adversas para las plagas como estrategia de producción de cultivos.

Los cultivos con fines de exportación pueden ser más exigentes dependiendo de su mercado, muchos productores optan por incorporar prácticas que aumenten la rentabilidad (cultivos certificados) e impliquen el uso de microorganismos benéficos, se debe mencionar que productores de cultivos orgánicos o de exportación requieren insumos de baja toxicidad para control de plagas y enfermedades debido a los análisis de los límites máximos de residuos (LMR) por entidades internacionales, en Dinamarca por ejemplo, se han etiquetado productos con la leyenda producidos con control biológico y esto ha impulsado a los consumidores a comprarlos (Cotes, 2018).

5.2.1 Parasitoides y depredadores

Los agentes que interactúan en el control biológico son: los parasitoides, los depredadores y los patógenos o antagonistas. Los insectos que parasitan y depredan otros insectos se conocen como insectos benéficos, puede que sean nativos de la región o se introduzcan al cultivo como medida de control, adquiriendo o criando insectos adultos para diseminar y nos otorguen una reducción de población de los insectos perjudiciales al cultivo (Marín *et al.*, 2018). Los insectos benéficos depredadores se alimentan de presas o huéspedes específicos de su dieta, los parasitoides se presentan con un concepto más claro a continuación.

5.2.2 Hiperparasitismo

Se trata de una interacción causada por un microorganismo parásito a expensas de otro huésped que a su vez es un parásito, ya sea por medio de parasitismo en insectos los cuales ovipositan dentro de o por la colonización de un microorganismo infeccioso o por los exudados o metabolitos secundarios producidos por el microorganismo parásito o antagonista, por ejemplo: hongo llamado *Trichoderma* el cual coloniza otros hongos fitopatógenos y ayuda en la producción orgánica frutihortícola (Chiriboga *et al.*, 2015).

5.2.3 Patógenos (hongos, bacterias, virus)

Existe también una interacción de bacterias con insectos como ejemplo tenemos a *Bacillus thuringiensis* que secreta proteínas y metabolitos eficientes para ejercer control sobre plagas y enfermedades, así mismo, realiza funciones que ayudan en la nutrición ya que solubiliza fósforo y participa en la fijación de nitrógeno, también genera reguladores del crecimiento vegetal como el ácido Indol acético (AIA Acido Indol Acético) (Corrales *et al.*, 2017).

En una interacción más específica de hongos contra plagas esta *Metarhizium anisopliae* como patógeno de insectos, existen distintos hongos como *Cordyceps* spp., *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces* spp. *Lecanicillium lecanii*, *Entomoptora*, entre otros, representan el grupo más importante en el control de insectos plaga ya que realizan su nutrición a través de estos organismos o materia orgánica (Gómez, 2014).

También existen patógenos de malezas, se habla de controlar con cepas de hongos, bacterias, virus o nematodos no dañinas al cultivo y con efecto a las malezas que

compitan con el cultivo, como ejemplo en Australia en 1971 se introdujo *Puccinia chondrillina* en el control de *Chondrilla juncea* (Royet, 2020).

El manejo de estos microorganismos es más fácil bajo ambientes controlados, ya que el objetivo es manejar el clima a nuestra conveniencia, ya que en campo abierto las condiciones ambientales pueden ser desfavorables para el establecimiento del microorganismo al usarlo en campo, por lo que es pertinente adecuar estas condiciones (Pacheco *et al.*, 2019).

5.2.4 Tipos de control biológico

El control biológico debe realizarse con base en estudios rigurosos para evitar causar impactos negativos en el ecosistema y utilizando especies altamente selectivas o que tengan especificidad, es imprescindible conocer el hábitat y la especie a introducir.

Clásico: introducción de una especie de enemigo natural o microorganismo benéfico exótico que permita ejercer control sobre la tasa de reproducción y crecimiento de la plaga que se requiere controlar.

Aumentativo: se aumenta la población de enemigos naturales o microorganismos benéficos de manera artificial.

Por conservación: consiste en aumentar las poblaciones y la persistencia de los enemigos naturales en el entorno aplicando medidas y modificando el entorno para protegerlos (Arrizibita, 2019).

5.3 Entomopatógenos o patógenos de insectos

5.3.1 Hongos entomopatógenos

De las enfermedades que infectan a los insectos aproximadamente el 80% es causado por los hongos entomopatógenos, representan una alternativa en el manejo de las poblaciones de insectos plaga en los cultivos, entre los hongos más efectivos y utilizados se encuentran *Beauveria bassiana* y *Metharhizium anisopliae*, un factor importante es la identificación de la interacción de la plaga y los entomopatógenos nativos para obtener la cepa con más virulencia, persistencia y especificidad (Huerta, 2018).

En este estudio nos competen hongos e insectos y la relación patógeno-huésped es decir que hay un organismo “insecto” que habita dicha zona y que su presencia puede ser alta y el microorganismo “hongo” toma la función de enfermedad y se prolifera por la región en la cual encuentra condiciones favorables a su crecimiento y desarrollo, generando posiblemente una epizootia (si se presentaron condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad), en investigaciones y ensayos de los hongos entomopatógenos, la importancia del factor humano es fundamental para poder generar resultados más exitosos sobre la incidencia del microorganismo en los insectos y poder obtener mayor control en la población realizando aplicaciones periódicas, al mismo tiempo que el ciclo biológico del hongo contribuye a generar un propágulo infectivo del hongo (Espinel *et al.*, 2018).

En el reino fungí los hongos entomopatógenos se encuentran en cinco Phylum: Microsporidia, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota, dentro de los cuales encontramos a las familias más destacadas como: Clavicipitaceae y los

géneros *Aschersonia*, *Hypocrella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, la familia Cordycipitaceae y encontramos los géneros tales como *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, la familia Ophiocordycipitaceae y los géneros *Ophiocordyces*, *Hirsutella*, *Tolypocladium*, *Hasposporium* y *Purpureocillium* (Russo, 2016).

5.3.2 Mecanismo de infección

Gómez (2014) mencionó el método de acción de los hongos entomopatógenos:

1. Adhesión del conidio a la cutícula del insecto
2. Germinación del conidio
3. Penetración del integumento
4. Multiplicación del hongo en el hemocele
5. Producción de toxinas
6. Muerte del insecto
7. Colonización
8. Emergencia
9. Esporulación
10. Diseminación

La salud del insecto se ve alterada por la adhesión de una espora o conidio (propágulo infectivo) por medio de propiedades físicas, químicas y electrostáticas en la superficie de

la cutícula del insecto y el propágulo infectivo, algunos hongos contienen proteínas que favorecen la adhesión del conidio a sitios específicos, que en presencia de agua se hidratan las esporas y germinan, comienza el crecimiento de un tubo germinativo y en ciertos casos un apresorio que penetra el cuerpo del insecto causando un daño físico, pues ocasiona la ruptura de membranas y continúa con daños químicos por acción enzimática, causando descomposición en el tejido, el cual por consiguiente es colonizado por el ensanchamiento y ramificación de hifas, esto puede venir acompañado en ciertos casos de cierta acción insecticida debido a los metabolitos secundarios, los cuales van generando toxinas que alteran organelos celulares, esto ocasiona parálisis celular, disfunción en el intestino, se bloquea el sistema inmunológico del insecto y se favorece la multiplicación del hongo para asegurar su diseminación y perpetuidad en el ambiente (Russo, 2016).

5.4 Cepas nativas

Una cepa microbiana engloba un único aislado, que contiene un conjunto de descendientes provenientes de una misma colonia y crecidos en un medio puro (Parada, 2020).

Una cepa que está asociada a un lugar se conoce como cepa nativa, la cual mediante la interacción con los fenómenos climáticos particulares de la región logran alcanzar las condiciones favorables para el desarrollo y crecimiento de este microorganismo. Es importante destacar entonces, que los microorganismos nativos poseen adaptación a las condiciones climáticas de la zona, por lo cual se deben rescatar aislamientos nativos

causantes de patogenicidad y con más virulencia para el control de agentes dañinos (Pacheco *et al.*, 2019).

Al hablar de cepas nativas y cepas comerciales hablamos también de la relación genotipo ambiente, es decir adaptación a las condiciones climáticas de la región, virulencia o la capacidad de enfermar o incidir en insecto u organismo, especificidad o plagas que puede infectar el hongo o microorganismo y sobrevivencia en el agrosistema o en el ambiente, por lo cual las cepas nativas representan una alternativa para obtener aislados, ya que estos poseen infectividad deseable y compiten con productos comerciales (Alcántara *et al.* 2020).

5.5 *Beauveria bassiana*

5.5.1 Origen y distribución

Beauveria bassiana en 1834 fue reportado por Bassie en Francia (Espinel *et al.*, 2018), actualmente se encuentra en todo el mundo como parte de la microbiota natural y es clasificado como saprofito patógeno y simbiote, lo cual indica que no es obligatorio el ataque a un insecto para completar su ciclo, se adapta a distintas áreas edafoclimáticas por lo cual tolera un rango amplio de temperatura y humedad relativa (Bermeo, 2022)

Las plagas de mayor importancia en las que se ha reportado son: gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano barrenador (*Diatrea magnifactella*), broca del café (*Hypothenemus hampei*), Pacheco *et al.*, (2019) la reportó en más de 200 especies y Bermeo (2022) en más de 700 especies.

5.5.2 Taxonomía

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezyzomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordypitaceae

Género: Beauveria

Especie: *Beauveria bassiana*

(Schoch *et al.*, 2020)

5.6 Hongos endófitos

Se ha reportado por Russo en 2016 que 14 cepas *B. bassiana* inoculadas en maíz y soja se asociaron endofíticamente con las plantas mediante distintas técnicas: aspersión en hoja, inmersión de semilla e inmersión de raíz. Mientras que una cepa de *M. anisopliae* y *M. robertsii* solo se asociaron a las plantas mediante las técnicas de aspersión en hoja e inmersión de raíz. El término fue mencionado por De Bary en 1884 y se refiere a que hongos y bacterias pueden vivir durante o gran parte dentro de los tejidos de la planta sin presentar síntomas. Pueden transmitirse horizontalmente, es decir, cuando la planta es infectada por entrar en contacto con un inoculo y de manera vertical, por la descendencia de la planta infectada a través de las semillas, estos hongos penetran la

planta mediante secreción de enzimas hidrolíticas o distintos tejidos en la planta tales como estomas, raíces y heridas presentes, se distribuyen por la planta y pueden asociarse a hojas, tallos, ramas, raíces y brotes, tiene el potencial de proteger a las plantas contra insectos plaga y confiere resistencia al huésped a estrés de tipo biótico y abiótico, incluidos factores climáticos adversos tales como salinidad y déficit de agua (Russo, 2016).

5.7 Hongos entomopatógenos en el control de plagas

Pacheco *et al.*, (2019) mencionan los siguientes casos de control de plagas agrícolas.

5.7.1 *Beauveria bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill.

Las plagas en que se presentó fueron:

Broca del café: *Hypothenemus hampei*, 1867 (Coleóptera: Scolytinae) (Gerónimo, 2016; Díaz y Roblero, 2007)

Chinche ligus: ninfas de *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) asociado a Fresa (González *et al.*, 2010)

Conchuela del frijol: *Epilachna varivestis* en el cultivo de Frijol (Castrejón, 2017)

Chapulines: *Brachystola magna* y *B. mexicana* con presencia en Frijol, (Lozano y España, 2006)

Mosquita blanca: *Bemisia tabaci* en Hortalizas (Ruiz, 2009).

Palomilla del manzano: *Cydia pomonella* (Manzana Solís, 2006).

Picudo del nopal: *Metamasius spinolae* (Sánchez *et al.*, 2016 y Tafoya, 2004).

5.7.2 *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin.

Las plagas asociadas:

Barrenador: *Diatraea magnifactella*, 1911 en cultivo de caña de azúcar y maíz (Buenosaires, 2013).

Chapulines: *Sphenarium purpurascens* y *Melanoplus differentialis* (Ortóptera: *Acrididae*) en maíz y frijol (Tamayo, 2009).

Langosta Centroamericana: *Schistocerca piceifrons piceifrons* en los cultivos de maíz, sorgo, frijol, caña de azúcar, soya, algodón, ajonjolí, plátano y cacahuate (Barrientos, 2005)

5.7.3 Estudios de diversos hongos

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith.

La plaga de Picudo: *Anthonomus fulvipes* asociado a Cereza de Barbados (Acerola) (Lezama *et al.*, 1997).

Mariposa blanca de la col: *Pieris rapae*, gusano dorso de diamante: *Plutella xylostella*, gusano falso medidor: *Trichoplusia ni*, pulgón de la col: *Brevycorine brassicae* en distintos cultivos de hortalizas (García y González, 2010).

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *N. rileyi* (Farlow) Samson, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *P. javanicus* (Friederichs & Bally) Brown & Smith en gusano cogollero del maíz: *Spodoptera frugiperda* (Lezama *et al.*, 1996).

5.8 Casos de control biológico en México y en algunos países

Alcántara *et al.*, (2020) aisló muestras de suelo agrícola del oriente del Estado de México para evaluar la producción, calidad e infectividad de los conidios obtenidos de cepas nativas de hongos entomopatógenos en comparación con un producto comercial llamado META-SIN®, bajo una solución de conidios de 9×10^8 por gramo de arroz, en parámetros de infectividad, no se encontraron diferencias significativas, concluyendo que puede ser una alternativa para obtener aislados, los hongos aislados poseen infectividad deseable y compiten con productos comerciales.

Nájera *et al.*, (2005) evaluaron 3 aislamientos de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* y uno de *Beauveria* con la finalidad de obtener cepas con potencial para aplicación como agentes de control biológico contra larvas de tercer estado de gallina ciega *Phyllophaga crinita*, plaga de gran importancia económica en el sureste de estados unidos y noreste de México los aislados pertenecen a el centro nacional de referencia de control biológico (CNRCB-DGSV-SAGARPA). Los tratamientos estadísticamente fueron diferentes y el hongo demostró potencial para causar una epizootia, destacando una cepa más virulenta y con mayor potencial como agente de control originaria de Jalisco, México.

Huerta *et al.*, (2018) realizaron un muestreo de suelos en cinco sitios con diferentes condiciones de prácticas agrícolas, con el suelo colectado realizaron bioensayos, registrando el número de larvas con síntomas de micosis, mostrando diferencias en el porcentaje de incidencia de los hongos sobre las larvas, se encontró la presencia de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* obteniendo el máximo de incidencia con 36.5% y concluyendo que los suelos con una menor perturbación aumentan las unidades infectivas de hongos entomopatógenos.

García *et al.*, (2011) aislaron cepas nativas de hongos entomopatógenos para contar con cepas nativas contra *Spodoptera frugiperda* y *Epilachna varivestis*, analizaron 97 aislamientos encontrando los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, el bioensayo de actividad insecticida evalúa la dosis letal 50 y el tiempo letal 50, un aislamiento del género *Beauveria* confrontado contra larvas de segundo estadio ocasiono una mortalidad de 96.6% una concentración de 1×10^9 esporas por ML la CL_{50} de 5.92×10^3 y un TL_{50} de 3,6 días en larvas de *Spodoptera*, otra cepa del mismo género causó la mortalidad del 93.3% en larvas neonatos de *Epilachna varivestis* con la misma concentración de esporas a los tres días con una CL_{50} de 1.20×10^6 y un tiempo de 5.1 días, concluyendo que la patogenicidad de los aislamientos son mayores cuando se obtuvieron directamente del insecto que de suelos cultivados.

Villegas *et al.*, (2017) probaron en bioensayos cinco concentraciones de distintas cepas de hongos entomopatógenos sobre ninfas del tercer estadio de *Bactericera cockerelli* y obtuvieron sus CL_{50} y CL_{95} . Todas las cepas resultaron patógenas obteniendo cepas más tóxicas, las cuales fueron BB09, BB42 y MA28. La mortalidad fluctuó entre 90 a 100% con las concentraciones más altas de cada cepa. La más virulenta fue BB09, con una

CL₅₀ de $2,99 \times 10^4$ conidias mL⁻¹ y MA25 la menos virulenta tuvo una CL₅₀ de $6,34 \times 10^5$ conidias mL⁻¹. Obtuvo las identidades mediante la secuenciación de la región ITS de los rADN 18S y corroboró que las cepas nativas identificadas por morfología microscópica y claves taxonómicas corresponden a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Carrillo (2012) recolecto larvas de gallina ciega *Phyllophaga polyphylla* en diferentes regiones de Guanajuato, fueron incubadas en laboratorio y se aislaron los hongos entomopatógenos encontrados, se obtuvieron 17 aislamientos de *B. bassiana* y 2 de *M. anisopliae*, la infectividad fue confirmada en larvas sanas de la especie, todos los aislamientos de *Beauveria* fueron identificados como *Beauveria pseudobassiana* y los de *Metarhizium* como *M. pingshaense* se evaluó la diversidad genética de los aislamientos por microsatélites y la detección de secuencias consenso repetitivas intragenicas de enterobacterias (ERIC), los microsatélites mostraron que todos los aislamientos de *B. pseudobassiana* fueron agrupados en un haplotipo y el análisis ERIC confirmo que no hay variación genética entre aislamientos.

Casos de control biológico en algunos países:

España

Álvarez (2015) aisló 3 cepas de hongos entomopatógenos en España a partir de *Monochamus galloprovincialis*, vector de la enfermedad de marchitamiento de pino, destacando entre las cepas *Beauveria pseudobassiana* por su alta virulencia, por lo tanto evaluó la transmisión vertical y horizontal en formulaciones secas y acuosas, obtuvo resultados del 100% de insectos muertos infectados horizontalmente en formulación seca y redujo el tiempo promedio de supervivencia apuntando a una infección inducida

horizontalmente y validando a la cepa *B. pseudobassiana* como un importante regulador natural de la población.

Chile

Altimira (2022) secuencio el genoma de una cepa de *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 y realizaron análisis de minería del genoma para predecir factores involucrados en la actividad insecticida y se analizó el perfil metabólico de sobrenadantes del cultivo de la cepa, se evaluó la actividad insecticida de un extracto en larvas de gallería mellonella, como resultado obtuvo 114 genes que codifican a enzimas extracelulares y c4 grupos que codifican enzimas extracelulares, cuatro grupos de genes biosintéticos reportados como productores de factores insecticidas, 20 toxinas y 40 factores de biocontrol no descritos, el extracto del metabolito causó una mortalidad del 79% de las larvas de *Galleria mellonella* a los 28 días, concluyó que el estudio representa las bases para el estudio de nuevas moléculas insecticidas.

5.9 Huésped para bioensayo

5.9.1 *Callophrys xami*

El hongo fue avistado en distintas especies de lepidópteros, se optó por la facilidad de crianza y disponibilidad por la especie de *Callophrys xami*, los huéspedes que conforma su dieta son plantas de la familia Crassulaceae conocidas comúnmente como suculentas (Ver anexos). Es conocida como mariposa sedosa verde mexicana y en el valle de Toluca está presente durante todo el año realizando varias veces su ciclo biológico, disminuyendo su población en épocas de lluvia, ya que representa uno de los factores

biocidas más importante para la plaga, ya que los adultos ovipositan sobre las hojas y los huevecillos caen de la hoja por escorrentía o golpe de las gotas en la planta, pudiendo ser depredados por enemigos naturales o microorganismos, se distribuye en parte de Norteamérica y casi toda la república mexicana desde la sierra madre occidental, sierra madre del sur, el valle de México, valle de Tehuacán, en regiones con clima templado frío y cálido (Martínez, 2021).

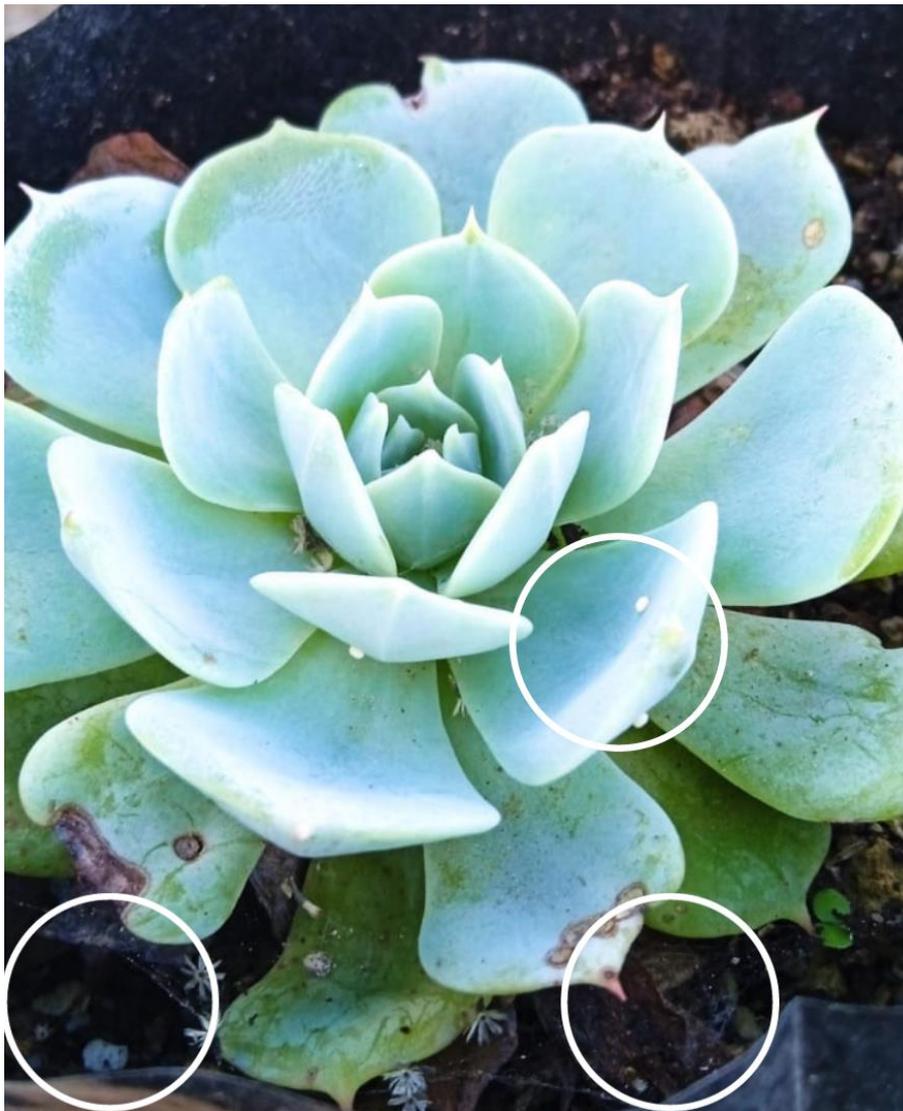


Figura 1. *Echeveria secunda* ovipositada por *C. xami* y con presencia de telarañas en la base de la planta y sobre el sustrato.



Figura 2. Adulto de *C. xami* polinizando flor



Figura 3. Adultos de *C. xami* cortejando.



Figura 4. Larva de *C. xami* alimentándose de una hoja de *Echeveria pallida x secunda*

(A) larva dentro de hoja vista sin epidermis (B)

5.9.2 Taxonomía

Reino: Eukaryota

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Hexápoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidóptera

Familia: Lycaenidae

Genero: Callophrys

Especie: Callophrys xami

(Schoch *et al.*, 2020)



Figura 5. Especímenes de *C. xami* Vista dorsal (A) Hembra (B) Macho (C)

El ciclo de *C. xami* en huevecillo es de 6-7 días después de la oviposición a la eclosión, estadios larvales 22.19 días, pupa 20 días y estado adulto 31.34 días (Martínez, 2021).



Figura 6. *C. xami* Huevecillo eclosionado (B) Larva minando hojas (C) Pupas (D) Adultos en apareamiento.

Las larvas son fitófagas y minan o se introducen en las hojas de las plantas y a su paso dejan dentro excretas que inicialmente tienen un color verde limón y con el tiempo se tornan color café hasta llegar a una coloración café oscuro o negro, después de varios días las hojas se secan.



Figura 7. Daño en las hojas de las plantas por *C. xami* en la planta (A, B, C).

Algunas especies de plantas atacadas por la plaga presentan debilitamiento en la unión con el tallo y por ende abscisión de las hojas, pudiendo caer al suelo con la larva dentro, lo que puede representar un mecanismo natural de las plantas en defensa de la plaga.



Figura 8. Daños en hojas ocasionados por *C. xami*: Hoja sana, Daño inicial, Daño progresivo, Minado completo de hoja (sin tejido succulento o parénquima).



Figura 9. Planta con hojas secas minadas por *C. xami*

Una larva puede ocasionar daños severos en las plantas y acabar con una planta en pocos días por lo cual la oviposición de adultos puede ser voraz y acabar con colecciones enteras de plantas (Martínez, 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Extracción de la cepa

6.1.1 Recolecta

En la recolección de insectos se registraron los siguientes datos: recolector, insecto recolectado, lugar, hospedante, cultivo, ambiente, altitud, fecha y observaciones adicionales (Cañedo, 2004).



Figura 10. Ubicación geográfica del lugar de recolecta por medio de Google maps.

Se observaron incidencias en distintas especies de lepidópteros y se recolectaron especímenes de larvas infectadas o con presencia de micosis, en el lugar georreferenciado, ubicado en el barrio La Veracruz, Zinacantepec, Estado de México.



Figura 11. Larvas con presencia de micosis recolectadas

Cuadro 1. Datos de recolecta

Datos de recolecta	
1.Nombre recolector.	del Ricardo Emmanuel Díaz González Evaristo
2.Nombre insecto recolectado.	del Gusano del fruto (<i>Spodoptera exigua</i>) 6 larvas
3.Lugar recolecta.	de Zinacantepec, estado de México (Figura 10) En el invernadero se encontraban distintos cultivos establecidos (tomate rojo, fresa, chile manzano, acelga, cilantro, espinaca, lechuga sangría, lechuga orejona, es decir un policultivo.) el invernadero tiene un manejo orgánico, sin aplicaciones de productos bioinsecticidas, (descartando así el aislamiento de un microorganismo que ya ha sido utilizado), sin embargo, donde se encontró la mayor presencia larvas infectadas fue en el cultivo de tomate en las partes superiores de la planta, se observó la presencia de gusano del fruto (<i>Spodoptera exigua</i>). El invernadero presenta baja humedad relativa, n el transcurso del día y en las mañanas hay escurrimientos de agua condensada en la cubierta
4.Hospedante, cultivo ambiente:	plástica y sereno, el riego utilizado es riego por goteo. En el invernadero ose observaron distintos patógenos <i>Alternaría solani</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , asociados a los cultivos de tomate y chile manzano.

	<i>Cladosporium fulvum</i> y <i>Erysiphe betae</i> presente en el cultivo de acelga y malezas como quelite (<i>Chenopodium álbum</i>).
5. Altitud	2740 msnm
6. Fecha	07 de marzo 2018
	Micosis algodonosa exógena color blanco, insecto momificado y sin presencia de fluidos, aspecto deshidratado o seco, condiciones climáticas de baja humedad relativa en el día con presencia de sereno
7.Observaciones adicionales	dentro del invernadero por la mañana, los cultivos son manejados de manera orgánica, sin aplicaciones de bioinsecticidas.

6.2 Aislamiento de muestras recolectadas

El aislamiento de las muestras recolectadas se realizó en el laboratorio de Fitosanidad ubicado en la sala de trabajo del invernadero 3 de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Primero se procedió a la limpieza del área de trabajo, las larvas se segmentaron y desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante dos minutos y se sembraron en cajas Petri estériles con medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA), se incubaron a 25°C durante 8 días, monitoreando el crecimiento del micelio sobre el insecto, de acuerdo a lo reportado por Bolaños *et al.* (2000).

6.3 Cultivo puro

Para obtener un cultivo libre de contaminantes externos se realizó un segundo aislamiento en medio de cultivo (PDA), a partir del aislamiento directo de las muestras recolectadas, se incubo por 8 días a 25°C con el fin de obtener un medio de cultivo “puro” o sin presencia de contaminación (Gómez, 2014).

6.4 Cultivo monospórico por dilución en placa

Con la finalidad de cultivar colonias individuales del hongo para obtenerlas a partir de una sola espora, se tomó una muestra colocándola en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril y se agitó vigorosamente durante 1 minuto, posteriormente se realizarán diluciones 1×10^0 , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , hasta realizar las diluciones seriadas 4, 5 y 6, las cuales se obtuvieron tomando 1 ml de la muestra inicial y mezclando con 9 ml de agua destilada estéril repitiendo el procedimiento de agitación y se coloca 1 ml para cada caja petri, se sembró en medios de cultivo la dilución 4, 5 y 6 con varias siembras por dilución para obtener cantidades más bajas de esporas y separar fácilmente el microorganismo de interés (Ramírez, 2017).

6.5 Observación y descripción de la morfología del hongo

Muestra permanente

Paralelamente se prepararon muestras permanentes la cual consistió en tomar una porción con la aza bacteriológica y se colocó en un portaobjetos con colorante azul de algodón y se colocó un cubreobjetos para observar las estructuras reproductivas (Ramírez, 2017).

6.6 Análisis molecular

Se sembraron 5 cajas Petri con medio de cultivo PDA con cultivos monospóricos por 7 días y se enviaron a el Colegio de Postgraduados (COLPOS) campus Montecillo, Texcoco para realizar los siguientes análisis.

6.6.1 Extracción de ADN

Para cada aislamiento, se raspo de la superficie de un cultivo de 5 días (cultivado en PDA a 28°C) una pequeña cantidad de micelio con una punta de micropipeta estéril de 10µl, la extracción del DNA genómico se realizó utilizando el método CTAB al 2% con ligeras modificaciones (Doyle and Doyle,1990). El DNA se cuantificó en un espectrofotómetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, USA)

6.6.2 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se realizó con los iniciadores ITS5 (5´GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3´) /ITS4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) (White et al., 1990). La mezcla de reacción de PCR consistió en 15 µl en la cual se utilizaron 50 ng de DNA, 0,18 de cada iniciador, 0,18µl de dNTPs, 0,9 U de GoTaq® DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y 3 µl de DNA (20 ng/µl).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador C100 Touch (BIO-RAD, USA), con las siguientes condiciones de termociclado: un primer paso a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 95°C durante 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C durante 10 min.

Las amplificaciones obtenidas se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa 1.5% (Seakem, USA) teñido con GelRed (Biotium, CA, USA). Las bandas se visualizaron en

un transluminador (Viber Lourmat, Deutschland, Germany) utilizando el software Infinity v15.01.

Los productos de PCR amplificados se limpiaron con ExoSAP- IT TM (Affymetrix, USA) con las recomendaciones dadas por el fabricante. Ambas cadenas fueron secuenciadas directamente utilizando el kit de secuenciación BIGDyeTM Terminator v3.1 en un secuenciador 3130 (Applied Biosystems TM).

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se generó la una secuencia consenso. Esta secuencia, se compilo en un archivo FASTA. Las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

6.7 Pruebas de parasitismo de la cepa aislada

6.7.1 Pie de cría insectil

Se probaron dos metodologías y se optó por realizar la metodología de Cría en laboratorio de Rivera *et al.* (2001) con algunas modificaciones, se recolectaron adultos de *Callophrys xami* con la finalidad de establecer un criadero controlado, para obtener la oviposición de los adultos sobre un huésped susceptible en este caso plantas de la familia Crassulaceae, comúnmente conocidas como suculentas, de los géneros *Echeveria* (*E. elegans*, *E. azulita*, *E. prolífica*, *E. secunda*, *E. pallida x secunda*, *E. perle von nurnberg*, *E. macdougallii* y *E. carnicolor*) *Graptopetalum* (*G. Mendozae*, *G.*

paraguayensis y *G. purple haze*) *Graptosedum* (*G. vera* Higgins y *G. Francesco Baldi*)
Aeonium (*A. castello paivae*, *A. haworthii*) *Sedum* (*S. Clavatum*, *S. pachyphyllum*,
nussbaumerianum *S. alexanderi* *S. luteoviridae*, *S. rupestre*, *S. palmeri*, *S. rupestre var*
angelina y *S. adolphi*) *Pachyphytum* (*P. Hookeri*) *Sedeveria* (*S. blue mist* y *S. fanfare*) y
Kalanchoe (*K. blossfeldiana*).

Inicialmente se optó por usar la metodología de huevecillo en la cual se utilizaron cajas petri en las cuales se depositaban hojas con huevecillos previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% las cuales representarían su dieta, sin embargo se presentó alta mortalidad y presencia de hongos en algunas de las hojas, que por falta de luz y oxígeno iniciaban su proceso descomposición en vez de proliferar raíces y un brote nuevo, se optó por cambiar el método para optimizar e higienizar más la metodología y generar condiciones más favorables al desarrollo de ambas especies plaga/huésped.



Figura 12. Criadero de *C. xami*

La plaga como se mencionó anteriormente se propaga por estadios adultos, las plantas se cortaron de plantas madre y se dejaron cicatrizar y deshidratar tres días a sol directo, se optó por un cultivo sin suelo para evitar otras posibles contaminaciones, las plantas se suspendieron en vasos de unicel de 118 ml o 4 oz y una tapa de papel aluminio, requerimos dos agujeros uno al centro para soportar a la planta y uno auxiliar en la orilla para verter posibles excesos de agua, el siguiente paso fue desinfectar los vasos que elaboramos y los esquejes.



Figura 13. Esqueje enraizado en el criadero (A) Planta final para oviposición de las mariposas en el criadero (B).

Previamente se construyó un criadero recubierto por malla mosquitera y plástico de invernadero en el cual se introdujeron los vasos con la tapa de papel aluminio, se colocaron las plantas dentro del agujero de soporte y se vertieron 20 ml de agua con fertilizante, ya que como estuvo suspendida necesitó agua para estimular el enraizamiento, cada dos días se vertieron 5-10 ml de agua para reponer el agua perdida por evaporación y para hidratar las raíces nuevas, se dejaron enraizar por 7 días.

Después se introdujeron los adultos para reproducirse y ovipositar en las plantas, se utilizó miel diluida en agua como suplemento alimenticio para los adultos, con esta metodología se logró obtener plantas en crecimiento, oviposición de los adultos, larvas alimentándose de las plantas con una dieta natural, el método nos permitió recolectar especímenes en estados inmaduros para realizar el bioensayo y también desinfestar todos sus elementos fácilmente antes de realizar el experimento, en total se utilizaron larvas por tratamiento.

6.7.2 Reactivación de la Cepa

Se utilizaron larvas de la especie seleccionada para realizar la reactivación del aislamiento, el procedimiento consistió en desinfectar las larvas en hipoclorito de sodio al 3% y lavadas con agua estéril, se preparó la solución de esporas a una concentración de 1×10^9 verificando la solución mediante conteo en una cámara Neubauer y se colocaron en contacto directo con la solución de esporas, por 20 segundos y fueron transferidas a la cámara húmeda hasta la aparición del micelio, las larvas con presencia de micelio se transfirieron a medios de cultivo (Rivera *et al.* 2001).



Figura 14. Pupa con presencia de micosis.

6.7.3 Producción masiva del inocular

6.7.4 Producción y formulación del inocular y suspensión de esporas.

A partir de aislamientos de la reactivación de la cepa se tomaron esporas para la siembra y reproducción masiva, consistió en una la preparación de una suspensión de esporas, el proceso consistió en obtener micelio y blastosporas para inocular el sustrato natural, se mantuvo en agitación continua por 72 h 90 ml de caldo papa dextrosa inoculada con 10 ml de la dilución 1×10^5 de conidios/ml, se añadió un bactericida (Ampicilina) para evitar el crecimiento bacteriano, se preparó de manera alterna el sustrato solido posterior a las 48 h de agitación continua para enfriarse 24 h y coincidir tiempos, el proceso fue lavar por 2 minutos con agua corriente y se dejó escurrir por 10 minutos, se colocaron en bolsas de HDPE de polipapel porciones de 50 g y en peso húmedo con 25ml de agua bidestilada respectivamente y se esterilizaron en autoclave durante $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 15PSI por 15 min y se dejaron enfriar por 24 h, al concretar las 72 h de agitación las bolsas con el sustrato fueron inoculadas con 5 ml de la suspensión 1×10^6 de blastosporas/ml y se incubaron a temperatura ambiente bajo luz blanca de lámparas de laboratorio por 14 días, se agitaron las bolsas con el sustrato para esparcir las esporas y micelio y obtener un crecimiento homogéneo, se realizó cada tres días (Rodriguez, 2017).

6.7.4 Pruebas de patogenicidad

Se evaluó en el bioensayo la mortalidad y el tiempo letal en el cual se presenta el mayor porcentaje de infecciones (TL50) la concentración de esporas será 1×10^9 ya que es la concentración de productos comerciales y en trabajos realizados, se ha demostrado que

esta concentración (DL50) causa el mayor porcentaje de infecciones (96,6%) a comparación de diluciones distintas (García *et al.*, 2011), para cada especie evaluada en el bioensayo, se utilizaron 5 larvas en cada tratamiento, utilizando una larva por unidad experimental o repetición, se realizaron 2 tratamientos y un testigo.

Las concentraciones de los tratamientos fueron las siguientes: 1×10^8 y 1×10^9 las cuales fueron calculadas mediante el uso de un hemacitómetro o cámara de Neubauer, obteniendo en el conteo 452 000 conidios en 1 ml.

6.8 Análisis de datos

Los datos de patogenicidad se evaluaron en un diseño experimental completamente aleatorizado ANOVA con una comparación de medias por prueba de Tukey al 0.05% y 0.01%.

VII. RESULTADOS

7.1 Observación y descripción de la morfología del hongo

Características macroscópicas:

Micelio color blanco y de aspecto algodonoso en los primeros días de incubación y un color blanco de aspecto harinoso o polvoriento al invadir el medio.

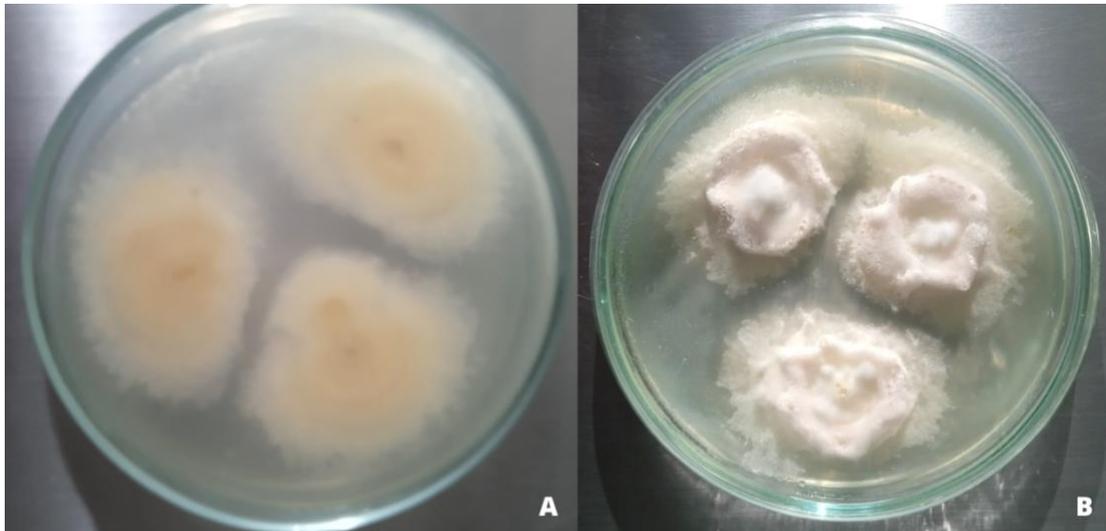


Figura 14. Aislamientos de *B. bassiana* Vista trasera (A) Vista frontal (B).

Características microscópicas

Con el uso de claves morfológicas para hongos imperfectos, se identificó inicialmente al hongo, en muestra permanente a *Beauveria bassiana*, apreciándose conidios nuevos en la punta del conidióforo, los conidios midieron entre 2 y 3 μ m, el conidióforo (Bermeo, 2022) entre 1 y 2 μ m y el raquis 20 μ m de longitud y 1 μ m de diámetro (Cañedo, 2014).



Figura 16. Estructuras del hongo en microscopio 100x

7.2 Análisis molecular

Se obtuvo una secuencia de 570 pares de bases (pb) del análisis molecular se realizó un análisis BLAST en la base de datos NCBI obteniendo una cobertura de 100% y un porcentaje de identidad de 100% resultando la identificación de *Beauveria bassiana* (Fig. 17).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show	100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results				
MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria bassiana strain KVL 07-51 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	Beauveria bassia...	1053	1053	100%	0.0	100.00%	571	GU354341.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria brongniartii culture CBS 722.71 strain CBS 722.71 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...	Beauveria brong...	1051	1051	99%	0.0	100.00%	669	MH860310.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria pseudobassiana strain 19GT11.008 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc...	Beauveria pseud...	1051	1051	99%	0.0	100.00%	585	MW077719.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria pseudobassiana isolate C5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Beauveria pseud...	1050	1050	99%	0.0	100.00%	591	MK142275.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria tenella culture CBS 126934 strain CBS 126934 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; in...	Beauveria tenella	1050	1050	99%	0.0	100.00%	706	MH864341.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria bassiana culture CBS 129.36 strain CBS 129.36 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; j...	Beauveria bassia...	1050	1050	99%	0.0	100.00%	574	MH855734.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria pseudobassiana isolate R3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Beauveria pseud...	1050	1050	99%	0.0	100.00%	600	MH374534.1

Figura 17. Análisis BLAST en NCBI

La secuencia más cercana corresponde a la accesión GU354341 perteneciente a *Beauveria bassiana*, secuencia parcial; de la región del espacio transcrito interno (ITS).

7.3 Pruebas de patogenicidad

Se realizó un bioensayo para confirmar la infectividad en larvas sanas de un lepidóptero, en este caso *C. xami* y para estimar la patogenicidad de la cepa, el diseño experimental consto de un diseño completamente aleatorizado con 2 tratamientos y un testigo, los tratamientos tuvieron concentraciones de 1×10^8 (T2) y 1×10^9 (T3), cada tratamiento tuvo 5 repeticiones, de las cuales el testigo no presentó mortalidad en ninguna de las repeticiones (Fig. 18), el tratamiento 1×10^8 presento una mortalidad de 4 especímenes representando el 80% y el tratamiento 1×10^9 presento una mortalidad de 5 especímenes representando el 100% (Cuadro 2) tiempo promedio de 5.66 días de la población en un tiempo promedio de 6 días (Fig. 19).

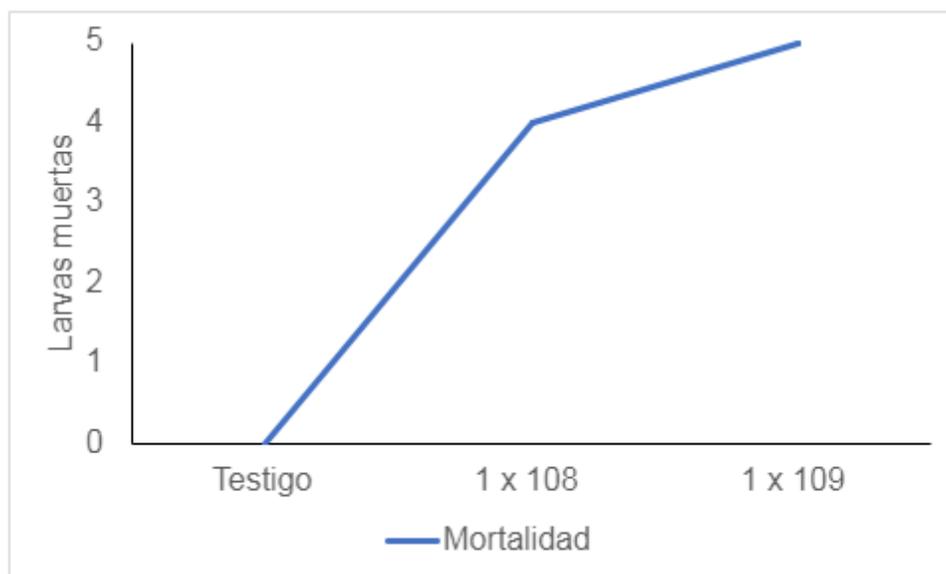


Figura 18. Incidencia de *B. bassiana* en especímenes de los tratamientos.

La incidencia se midió como: larva infectada (1) larva sana (0), teniendo un total de 0 especímenes infectados en el T1 (testigo) de 4 en el T2 (1×10^8) y de 5 en el T3 (1×10^9).

Cuadro 2. Resultados de mortandad de larvas en los tres tratamientos evaluados.

Tratamientos	Especímenes	Mortalidad	Tiempo letal (días)
Testigo	1	0	0
	1	0	0
	1	0	0
	1	0	0
	1	0	0
1×10^8	1	1	5
	1	1	6
	1	1	6
	1	1	6
	1	0	0
1×10^9	1	1	6
	1	1	6
	1	1	6

1	1	6
1	1	6

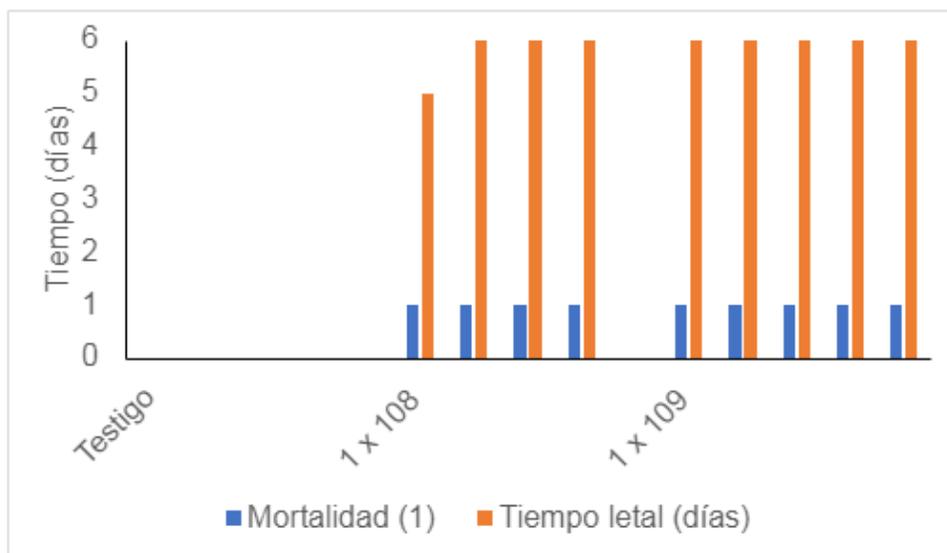


Figura 19. Mortalidad de *C. xami* con *B. bassiana*.

El tiempo letal se calculó obteniendo el promedio del tiempo transcurrido en cada espécimen 5.66 días (T2) y 6 días (T3).

7.4 Análisis de varianza

El análisis de varianza realizado indicó la presencia de diferencia altamente significativa para la variable mortandad de larvas en dos concentraciones de *B. bassiana* (Cuadro 3.)

Por lo que se procedió a la separación de medias de cada tratamiento.

Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza para la variable mortandad de larvas con dos concentraciones de conidios de *B. bassiana*.

	G.L.	S.C	C.M.	F trat	C.R	C.V.	V.C.S.	D.M.S.
S.C. TRAT 2		0.25373337	0.12686669	21	0.777778	43.033153	3.77278	0.1311
S.C								
ERROR	12	0.07249525	0.00604127		0.05	0.01		
S.C.								
TOTAL	14	0.32622862		**	3.885	6.927		

El 77% de variación total de datos se explica por diferencias entre tratamientos el 23% restante se debe al error experimental.

Cuadro 4. Comparación de medias para la variable mortandad de larvas con el uso de dos concentraciones de conidios.

Tratamiento	Valor	Media
T3	0.30103	a*
T2	0.24082	a
T1	0	b

*Valores con la misma letra en la columna indican ausencia de diferencia en términos estadísticos.

Todos los tratamientos superan al testigo (T1) en el valor de incidencia y mortandad de larvas inducidas con las dosis evaluadas. Las dos dosis evaluadas fueron estadísticamente similares (Cuadro 4) por lo que no hay diferencia significativa entre concentraciones, pero se tiene un mayor efecto o cantidad de mortandad cuando se utiliza la dosis de 1×10^9 .

VIII. DISCUSIÓN

El aislamiento analizado por técnicas moleculares fue identificado como *B. bassiana*, asociada con la infección de larvas de lepidópteros y de tipo endémica para el valle de Toluca. Otras especies de hongos también se han identificado molecularmente Carrillo (2012) quien identificó a *Beauveria pseudobassiana*, *Metarhizium* y *M. pingshaense* aislados de larvas de gallina ciega *Phyllophaga polyphyllae* en regiones de Guanajuato.

La cepa identificada se aisló a partir de larvas infectadas del Lepidoptero *Spodoptera exigua* sobre hojas pero sus daños se observaron en frutos de tomate bajo condiciones de Invernadero, en este mismo sentido Najera (2005) aisló distintas cepas nativas de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. en *Phyllophaga* spp. para contar con un método de control biológico y nativa, pero alternativo al químico, en un manejo integrado de plagas, como alternativa en la agricultura convencional, con destacada virulencia.

El bioensayo de confrontación de larvas y hongo realizado, presentó un coeficiente de variación alto (43.03%) por lo cual se sugiere realizar trabajos posteriores en un bioensayo con mayor número de muestras en laboratorio y realizar bioensayos en invernadero.

El control biológico ejercido por *B. bassiana* de acuerdo a los resultados del trabajo tiene utilidad contra plagas en cultivos hortícolas, frutícolas u ornamentales en donde se asocia la presencia de *Spodoptera exigua*. Lo que coincide con lo reportado por Fula y Vázquez (2018) quienes mencionan que los hongos entomopatógenos representan una solución para distintos problemas fitosanitarios en granos almacenados o pasturas y forrajes

establecidos en campo, pueden ser afectados por el ataque de plagas, presentando un déficit alimenticio para los animales a alimentar debido a que las plagas presentes en estos cultivos causan defoliación en los forrajes, disminuyendo su rendimiento con pérdidas que van del 25-75%, debido al mal manejo de agroquímicos y la resistencia adquirida por la plaga.

En reportes como el de Russo (2016) enfatiza que los hongos entomopatógenos endófitos (*B. bassiana*, *M. anisopliae*) asociados a un hospedero como soya y maíz, pueden determinar la persistencia de una cepa en el ambiente y generar efectos de transmisión horizontal y vertical del endófito, debido a que los adultos disminuyeron el número de huevecillos ovipositados, se redujo el periodo de oviposición y la fertilidad de la eclosión de los huevecillos, disminuyeron la defoliación de hojas del cultivo tratadas, así mismo la tasa neta de crecimiento de las especies fitófagas usadas y la longevidad de los adultos al alimentarse con maíz inoculado, se debe identificar si la cepa estudiada se puede asociar endófitamente, lo cual representaría una protección, o una cobertura de tiempo contra plagas entre aplicaciones y representaría un ahorro de dinero para el productor al reducir aplicaciones y una medida de prevención y control más efectiva.

Altimira (2022) reporta la actividad insecticida de un extracto de metabolito de una cepa de *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 en larvas de *Galleria mellonella*, el extracto causó 79% de mortalidad a los 28 días, por lo que sus resultados representan las bases para el estudio de nuevas moléculas insecticidas. Para predecir factores involucrados en la actividad insecticida, se pueden realizar estudios posteriores del comportamiento de cepas nativas de *B. bassiana* y *B. pseudobassiana* para realizar **minería** del genoma y comparar los metabolitos, enzimas, etc. Con la finalidad de encontrar mayor efectividad

entre cepas, consorcios y la aplicación de moléculas con actividad o factores insecticidas con el fin de aumentar la mortalidad causada con su aplicación.

El hongo identitario en el presente estudio sea reportado en distintos huéspedes de la misma familia (Lepidoptera), en específico del huésped *Spodoptera exigua*, posteriormente se infectó un huésped de la misma familia, seleccionado por la disponibilidad llamado mariposa sedosa verde (*Callophrys xami*), se obtuvieron especímenes enfermos de los cuales se realizaron los aislamientos para las pruebas de patogenicidad que coincidieron con niveles altos de virulencia sobre la especie evaluada (80% y 100%). Lo que coincide con lo realizado con García (2011) quien reporta que la patogenicidad de las cepas es mayor cuando se obtienen directamente del insecto que cuando provienen de suelos cultivados y cuando provienen del cultivo hospedero de la plaga.

Nájera (2005) en sus trabajos de investigación, reportó problemas causados por *Phyllophaga crinita* en el amarillamiento de césped y maíz asociado con el mal uso de insecticidas químicos. Actualmente el uso de insecticidas sintéticos, tiene como consecuencia la contaminación de suelo y el agua, la eliminación de fauna benéfica que habita la rizosfera y provoca efectos perjudiciales en la salud de los agricultores, factores que hoy en día son relevantes en el modelo de agricultura actual debido a la explotación insostenible de los recursos naturales y la desaparición o disminución de poblaciones de los microorganismos, fauna y flora de las regiones productivas, nuestros resultados representan una alternativa para implementar estrategias para el manejo integrado de plagas, implementando el control biológico por medio de enemigos naturales, en este caso hongos entomopatógenos.

Najera (2005), Russo (2006), García (2011), Carrillo (2012), Álvarez (2015), Villegas (2017), Alcántara (2020) y Altimira (2022) mencionan una alta tasa de virulencia de distintas cepas de *Beauveria pseudobassiana* y *B. bassiana*, la cepa estudiada en el trabajo de tesis, puede representar una alternativa a los métodos de control de plagas usados actualmente en el Valle de Toluca o lugares con climas similares en el estado, en especial en la producción de jitomates y suculentas que presentan estos insectos plaga, por lo cual se deben llevar a cabo trabajos de campo e invernadero para estimar de manera representativa su virulencia, en cultivos asociados y compararse con otras cepas nativas y comerciales, incluidas variantes o subespecies del mismo género para probar su patogenicidad en función de la relación genotipo ambiente.

La cepa nativa estudiada de *B. bassiana* debe ser confrontada en trabajos posteriores contra lepidópteros y otras especies, dado el avistamiento inicial de la incidencia del hongo sobre el orden lepidóptera en el lugar de colecta y debido también a los resultados de patogenicidad del trabajo, con la finalidad de poder distinguir su especificidad y virulencia en distintas especies así como su persistencia en el ambiente (Alcántara, 2020), dado que por regiones geográficas podemos encontrar climas muy distintos, muchas veces extremos, en los cuales también se requiere de investigación con bajos niveles de humedad, sin periodos tan prolongados, o incluso que el hongo se pueda expresar con efectos climáticos un tanto imperceptibles tal como el caso del sereno o por el efecto de humedad causado por riegos al cultivo.

García (2011) aisló microorganismos en Durango, México, con la finalidad de obtener aislamientos nativos de entomopatógenos de suelo adaptados a las condiciones climáticas de la región que tenga patogenicidad contra *Spodoptera frugiperda* y

Epilachna varivestis, se deben rescatar cepas nativas para conservar la biodiversidad de microorganismos nativos y fauna nativa para integrarse en planes de manejo integrado de distintas especies de plagas y enfermedades en distintos cultivos y de manera regional, incluso preservando las cepas y fauna en su ambiente y origen (*in situ*) ya que representan recursos genéticos de importancia.

La tendencia actual en el control biológico de plagas, se encamina a utilizar un tipo de control distinto (aumentativo y por conservación) al clásico que consta de introducir una especie exótica como enemigo natural, las cepas nativas se deben estudiar para aprovechar su adaptación al clima de una región específica y fomentar el uso de las cepas nativas conservadas en los bancos de germoplasma actuales como en el centro nacional de referencia de control biológico (CNRCB) introduciendo así el control biológico aumentativo (aumentar artificialmente enemigos naturales) y control biológico por conservación (modificar el entorno protegiendo y aumentando enemigos naturales) (Arrizibita, 2019), creando una transición a la agricultura regenerativa con el fin de preservar, regenerar y aprovechar los recursos genéticos microbianos presentes ya que representan elementos de utilidad en problemas actuales y futuros para aumentar la variabilidad genética entre las distintas cepas investigadas y usadas en la actualidad.

IX. CONCLUSIONES

Los análisis moleculares identificaron a todos los aislamientos como *Beauveria bassiana*. *B. bassiana* infecto larvas de una especie de lepidóptero (*C. xami*).

El mayor porcentaje de patogenicidad del hongo fue en el tratamiento T3 (1×10^9) ocasionando el 100% de mortalidad, en el T2 (1×10^8) de 80%.

El tiempo letal promedio fue de 5.66 días en el tratamiento de la concentración T2 (1×10^8) y de 6 días en el tratamiento T3 (1×10^9).

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, E.; Espitia, J.; Garza, P.; Ángel, 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 Biodiversidad* Vol.9,12-9.
- Altimira, F.; Arias, M.; Jian, L.; Real, N.; Correa, P.; González, C.; Godoy, S.; Castro, J.; Zamora, O.; Vergara, C.; et al. (2022). Genomic and Experimental Analysis of the Insecticidal Factors Secreted by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184. *Journal of Fungi* 8, 253.
- Álvarez, G.; Fernández, M.; Pajares, J.; Quesada, E. (2015). Potential of native *Beauveria pseudobassiana* strain for biological control of Pine Wood Nematode vector *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of invertebrate pathology* vol. 132, 48-56
- Arrizibita, U. (2019). Control biológico, alternativa ecológica para la gestión de plagas. *Geo innova*
- Bolaños, M.; Peña, L.; Yepes, B., Mena, J.; Enríquez, J.; (2000). Hongos entomopatógenos para el manejo del gusano blanco (*Premnotrypes vorax*) de la papa. *CORPOICA Regional N°5, Boletín Técnico N°15, 4-14.*
- Bermeo, D.; Loyola, J. (2022). Determinación de la actividad entomopatógena del hongo *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. sobre el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax* h.). *Universidad politécnica salesiana sede cuenca.*

- Cañedo, V.; Ames, T.; (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos © Centro Internacional de la Papa (CIP) Centro Internacional de la Papa (CIP), 3-54.
- Carrillo, M. (2012). Diversidad y estructura genética de poblaciones de hongos patógenos infectando larvas de gallina ciega en Guanajuato, México. Colegio de postgraduados.
- Chiriboga, H.; Gómez, G.; Garces, K. (2015). Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: *Trichoderma* spp. para el control biológico de enfermedades. IICA, 1-3.
- Cotes, A. (2018). El concepto de control biológico y sus premisas fundamentales: Colecciones Capítulos de libros resultados de investigación [43]. Corporación colombiana de investigación agropecuaria-AGROSAVIA, 44-51.
- Corrales, L.; Caycedo, L. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. NOVA, vol.15, no.27. 46-58.
- Doyle, J.; Doyle, L. (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue, Focus, Vol. 12, No. 1, 13-15.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl 46, 387–400.
- Espinel, C.; Torres, L.; Villamizar, L.; Zuluaga, M.; Cotes, A. (2018). Capítulo 6 Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga. En: Control biológico

- de fitopatógenos, insectos y ácaros. Vol.1, Agentes de control biológico Alba Marina Cortez Editora AGROSAVIA, 338-356.
- García, I. (2020). Genómica de hongos fitopatógenos como herramienta para el desarrollo de estrategias de manejo SciELO Revista Colombiana Biotecnología Vol.21, no.2, 3-5.
- García, C.; González, B.; Bautista, N. (2011). *Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleóptera: Coccinellidae). Revista Colombiana de Entomología 37 (2),1-5.
- Gómez, H.; Zapata, A.; Torres, E.; Tenorio, M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Laboratorio de entomopatógenos scb – SENASA 5-30.
- Hernández, M.; Cervantes, Z.; Villalobos, F.; García, L.; Peña, G. (2011). Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleóptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. Acta zool. Mex. Vol.27 no.3
- Hernández, F.; García, L.; Figueroa, K.; Figueroa, B.; Salinas, J.; Sangerman, B.; Diaz, E.; (2019). Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisopliae* en los últimos 40 años Revista Mexicana Ciencias Agrícolas pub. esp. núm. 22 155-156.
- Huerta, A.; Enríquez, J.; Guízar, C.; Lobit, P.; Gómez, N.; Rincón, G.; Quiñones, E.; López, L. (2018). Presencia de hongos entomopatógenos nativos en suelos cultivados con maíz del municipio de Epitacio Huerta, Michoacán. Biotecnología y Sustentabilidad. Vol. 3, Núm. 2, 68-75.

- Moreno, D. (2022). Patogenicidad de aislados nativos (*Beauveria bassiana*) y (*Cordyceps javanica*) sobre larvas de *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). Revista investigaciones agropecuarias, Universidad de Panamá vol.4 no.2
- Fula, J.; Vázquez, N.; (2018). Revisión documental sobre *Beauveria bassiana* Y *Bacillus thuringiensis*, en el control biológico de lepidópteros en forrajes ganaderos universidad colegio mayor de Cundinamarca.
- Marín, A.; Lomeli, R.; Valdez, J. (2018). Reconocimiento de los enemigos naturales del pulgón amarillo del sorgo en Pulgón amarillo del sorgo, (PAS), *Melanaphis sacchari* (Zehntner 1897), interrogantes biológicas y tablas de vida, Editor Ricardo Yáñez López Fundación Produce Guanajuato A.C., COLPOS, INIFAP, 5-10.
- Martínez, A.; Sobalvarro, K. (2018). La revolución verde Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático vol. 4, núm. 8 Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático vol. 4, núm. 8, 2-15.
- Martínez, N.; Calyecac, H.; Hernandez, M. (2021). Observaciones del ciclo de vida de *Callophrys xami* en crasuláceas de la Universidad Autónoma Chapingo. Sociedad, permacultura y agricultura sustentable Hacia una educación y cultura ambiental Editores Erasmo Velázquez Cigarroa María Joaquina Sánchez Carrasco Universidad Autónoma Chapingo 202-213
- Nájera, B.; García, M.; Crocker, L.; Hernández, V.; Rodríguez, A. (2005). *Virulencia de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México,

contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (coleóptera: *Melolonthidae*) bajo condiciones de laboratorio. Fitosanidad, vol. 9, núm. 1, 33-36.

Pacheco, M.; Reséndiz, J.; Arriola, V. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión INIFAP Revista Mexicana De Ciencias Forestales 10 (56) 5-21.

Parada, R. (2020). Cepa (microbiana): características, identificación, aislamiento. Liferder, 1-5.

Peña, L.; Mercedes, A.; Bacca, T.; (2004). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleóptera: Scarabaeidae). CORPOICA. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, vol. 5, núm. 1, 43-48.

Peñaranda, M. (2016). Resistencia de insectos a insecticidas Revista Metroflor Edición 75 2-6.

Ramírez, J.; Parra, J.; Álvarez, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. Mente joven vol.6.

Rivera, G.; Pinto, L.; (2001). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache). Revista colombiana de biotecnología vol.iii No.2, 53-63.

Rodríguez, L.; (2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. (hypocreales: cordycipitaceae) en cultivo bifásico, Interciencia, vol. 42, núm. 11, pp.

Royet, J. (2020). Control biológico de malezas: un enfoque microbiológico Universidad de Córdoba, 2-16.

Russo, M. (2016). Hongos entomopatógenos: colonización endofítica y control de insectos plaga en cultivos agrícolas. Tesis de doctorado, Naturalis Repositorio Institucional de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo La Plata, 10-69.

Schoch, CL. *et al.* (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). NCBI baaa062. PubMed:32761142 MC: PMC7408187

Tercero, N.; Medrano, S.; (2019) Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti*, UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA, octubre 2017-abril 2018 Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.

Villegas, F.; Diaz, O.; Casas, J.; Monreal, C.; Tamayo, F.; Aguilar, F.: (2017). Actividad de dos hongos entomopatógenos, identificados molecularmente, *sobre Bactericera cockerelli*. Revista Colombiana Entomología. vol.43 no.27-33.

XI. Anexos

1.- Especies usadas como huésped en el criadero para la oviposición y alimentación de la plaga *C. xami*



Aeonium haworthii

Aeonium castello paivae



Echeveria secunda

Echeveria azulita



Echeveria prolifica



Echeveria macdougallii

Echeveria pallida x secunda



Echeveria perle von nurnberg

Echeveria elegans



Echeveria carnicolor

Graptopetalum paraguayensis

Graptopetalum mendozae



Graptopetalum purple haze

Graptosedum francesco baldi

Graptosedum vera higgins



Kalanchoe blossfeldiana

Pachyphytum hookeri

Sedeveria o graptoveria fanfare



Sedeveria blue mist



Sedum alexanderi



Sedum luteoviridae



Sedum pachyphyllum



Sedum adolphi

Sedum nussbaumerianum

Sedum clavatum



Sedum rupestre

Sedum palmeri

Sedum rupestre var *angelina*

2.- Daños causados por la plaga en distintas especies de la familia Crassulaceae.



Larva de *C. xami* sobre hojas de *Echeveria azulita* y daños iniciales en *Sedum pachyphyllum*.



Daños causados por larvas de *C. xami* en planta de *Echeveria pallida x secunda* y
planta sana



Hoja de *Echeveria pallida x secunda* vista a contraluz con larva de *C. xami* minando el tejido suculento interior y con excretas en el paso de la larva.

3.- Observaciones en microscopio estereoscópico



Pupas de *C. xami* vistas en el microscopio estereoscópico.

4.- Establecimiento del criadero en la Facultad de Ciencias Agrícolas.



Criadero con medición de temperatura y Humedad relativa y con adultos de *C. xami* para apareamiento.



Criadero con adultos de *C. xami* ovipositando

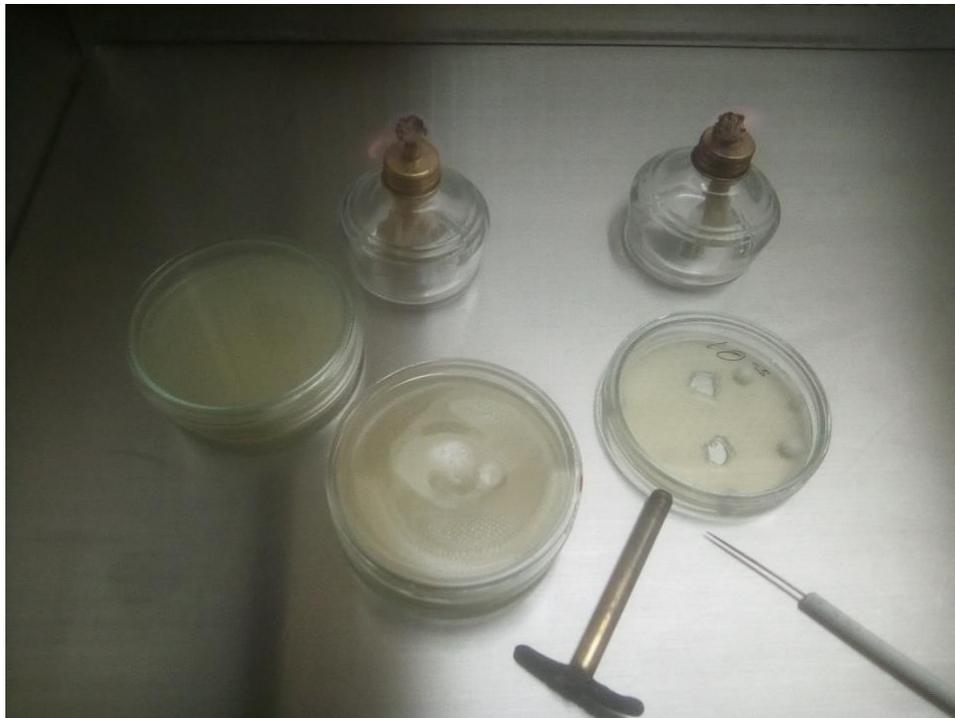
5.-Trabajos de laboratorio realizados.



Caja de Petri con el hongo entomopat6geno en crecimiento.



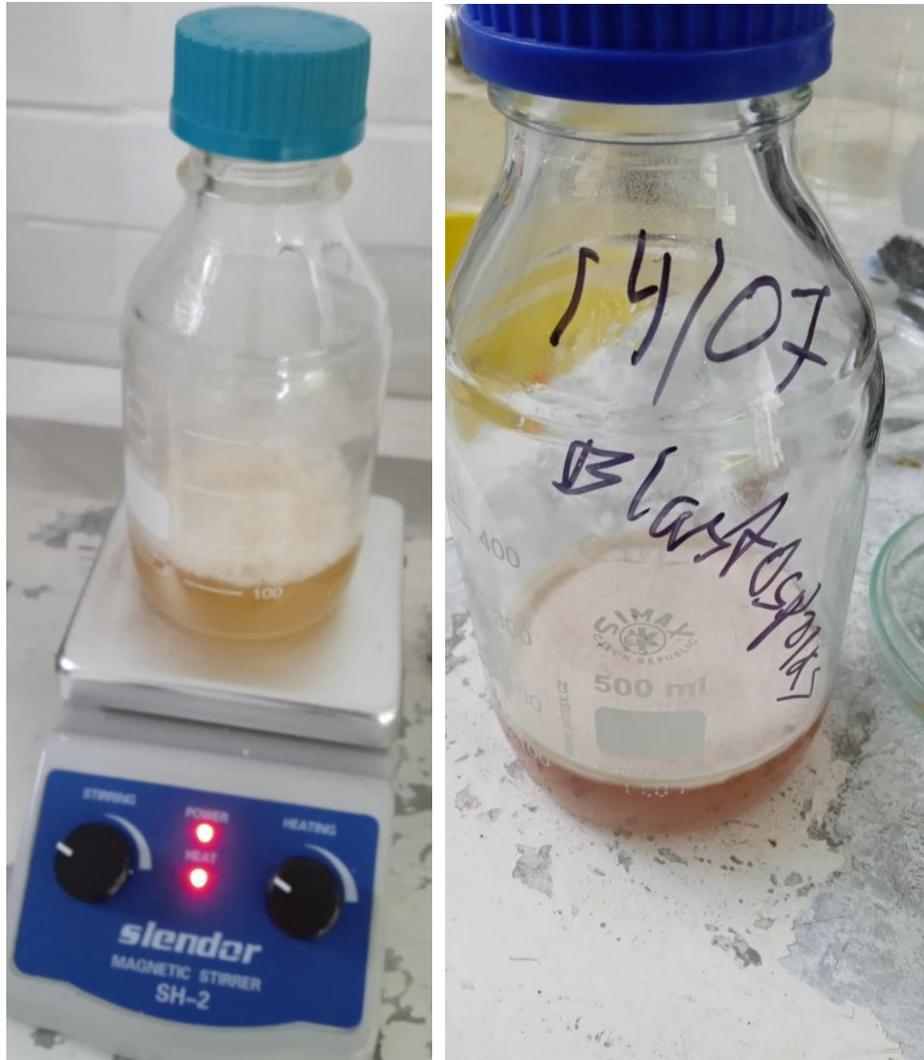
Diluciones seriadas para la siembra de cultivos monospóricos de la cepa aislada.



Obtención de las colonias provenientes de las diluciones seriadas para la siembra de cultivos monospóricos.



Larvas de *C. xami* con presencia de necrosis debido a la infección, puestas en cámara húmeda para comprobar infección de la cepa aislada y preparación de las diluciones seriadas del hongo inoculado en el sustrato natural para realizar infección.



Agitamiento de la solución Papa-Dextrosa con el hongo entomopatógeno y Obtención de blastosporas para la inoculación del sustrato natural (arroz).



Inoculación de sustrato natural (arroz) con blastosporas.

7.- Particularidades de la especie.



Larvas de *C. xami* sobre restos secos de una planta totalmente minada por las larvas y una de ellas realizando canibalismo por la falta de un huésped cercano para alimentarse.