

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFECTO POTENCIADOR DE INHIBIDORES DE FENOLOXIDASAS (PO)  
EN LA INFECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE EL  
GUSANO SOLDADO *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)**

**POR**

**Q.B.P. RICARDO PÉREZ RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**OCTUBRE, 2017**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTO POTENCIADOR DE INHIBIDORES DE FENOLOXIDASAS (PO) EN  
LA INFECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE EL GUSANO  
SOLDADO *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

TESIS

Presentada como requisito para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Por

Q.B.P. RICARDO PEREZ RODRÍGUEZ

Comité de tesis



---

**Dra. Isela Quintero Zapata**  
Presidente (Director)



---

**Dr. Benito Pereyra Alferez**  
Secretario



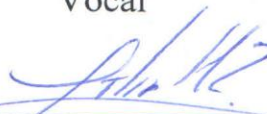
---

**Dra. Myriam Elías Santos**  
Vocal



---

**Dra. Verónica Almaguer Cantú**  
Vocal



---

**Dra. Lilia H. Morales Ramos**  
Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTO POTENCIADOR DE INHIBIDORES DE FENOLOXIDASAS (PO) EN  
LA INFECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE EL GUSANO  
SOLDADO *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

TESIS

Presentada como requisito para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Por

Q.B.P. RICARDO PEREZ RODRÍGUEZ

Dirección de tesis

---

**Dra. Isela Quintero Zapata**  
Director de Tesis

---

**Dr. Erick de Jesús de Luna Santilla**  
Co – Director de Tesis

## AGRADECIMIENTOS

**A las Instituciones:** Al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., por permitirme realizar este trabajo de investigación. Al Centro de Biotecnología Genómica del IPN unidad Reynosa.

### **A las personas:**

A la **Dra. Isela Quintero Zapata**, por todo su apoyo, tiempo y paciencia, le agradezco el haberme primeramente aceptado, asesorado y enseñado en toda mi estancia en el L6.

Al **Dr. Erick de Jesus de Luna Santillana**, por su asesoría en la realización de este trabajo y atenciones para recibirme en el laboratorio.

A la **Dra. Verónica Almaguer Cantú** y **Dra. Lilia H. Morales Ramos**, por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Benito Pereyra Alférez** y **Dra. Myriam Elías Santos**, por su asesoría en la realización de este trabajo y formar parte de mi comité de tesis.

Al **Dr. Hamlet Avilés Arnaut**, por su apoyo y las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A todos los maestros de la facultad que a lo largo de la carrera me transmitieron sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Eugenia Ortiz, MC Claudia B. López, Abiel, Melissa, Eduardo, Ulises y sobre todo a la Dra. Ileana Castro González por haberme ayudado con mi tesis, no lo hubiera logrado sin uds.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Por estar conmigo siempre.

### **A mis Padres**

Los señores Ricardo Pérez García y Luz Elena Rodríguez Valadez por todo el amor incondicional que me han brindado y por ser mis ejemplos a seguir en la vida.

### **A mis hermanas**

Nena y Bere por compartir conmigo las buenas y malas experiencias de la vida las quiero gordas XP.

### **Y sobre todo a mi flaquita hermosa**

Fabiola Lizeth Cuellar Guevara por ser mi compañera durante esta etapa de mi vida y hasta que la muerte nos separe si Dios quiere n.n

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	I
<b>DEDICATORIA</b> .....	II
<b>ÍNDICE</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	VI
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VII
<b>LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>RESUMEN</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Control biológico.....	3
2.1.1 Hongos entomopatógenos.....	4
2.1.2 Clasificación taxonómica de hongos entomopatógenos.....	4
2.1.3 Principales hongos entomopatógenos usados en control biológico.....	5
2.1.4 Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos.....	9
2.1.5 Ventajas y Desventajas del uso de Hongos Entomopatógenos.....	12
2.2 Mecanismos de defensa del insecto ante la infección fúngica.....	13
2.2.1 Respuesta mecánica.....	13
2.2.2 Respuesta celular.....	14
2.2.3 Respuesta humoral.....	15
2.3 Inhibidores de síntesis de melanina.....	17
2.3.1 Arbutina.....	18
2.3.2 Extracto de <i>Morus alba</i> .....	18
2.3.3 Acido Kojico.....	19
2.4 Sinergismo en insecticidas.....	19
2.5 <i>Spodoptera exigua</i> .....	20
2.5.1 Ubicación taxonómica.....	21
2.5.2 Biología de <i>Spodoptera exigua</i> .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	24
<b>5. OBJETIVO DEL TRABAJO</b> .....	25
Objetivo general.....	25

Objetivos particulares .....	25
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
6.1 Muestreo de suelo .....	26
6.2 Aislamiento de hongos entomopatógenos.....	27
6.2.1 Confirmación de hongos entomopatógenos .....	28
6.2.2 Identificación morfológica.....	28
6.2.3 Cultivos monospóricos y conservación de cepas .....	29
6.3 Identificación molecular de los aislados .....	29
6.3.1 Activación.....	29
6.3.2 Extracción de ADN.....	30
6.3.3 Amplificación de las secuencias de los transcritos internos (ITS).....	30
6.3.4 Secuenciación de segmentos ITS .....	32
6.4 Obtención de extractos vegetales .....	32
6.4.1 Colecta del material vegetal.....	32
6.4.2 Extracción metanólica.....	33
6.5 Actividad Fenoloxidasa (PO) en hemolinfa de <i>S. exigua</i> .....	33
6.5.1 Extracción de hemolinfa .....	33
6.5.2 Ensayo enzimático de PO .....	34
6.6 Inhibición de PO <i>in vitro</i> .....	34
6.7 Bioensayos contra larvas de <i>S. exigua</i> .....	34
6.7.1 Preparación de la suspensión de conidios .....	35
6.7.2 Preparación de alimento para larvas de <i>S. exigua</i> .....	35
6.7.3 Ensayos con larvas de <i>S. exigua</i> .....	35
6.7.4 Ensayos de sinergia sobre <i>S. exigua</i> .....	36
6.8 Cromatografía de capa fina (TLC) de los extractos metanólicos.....	36
6.8.1 Preparación de la placa de sílica .....	37
6.8.2 Preparación de las muestras y cromatografía.....	37
6.9 Pruebas de antagonismo en el desarrollo fúngico .....	37
6.9.1 Antibiograma .....	38
6.9.2 Prueba de germinación.....	38
6.10 Análisis de datos y estadísticos .....	39
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
7.1 Muestreo de suelo .....	40

7.2 Aislamiento de hongos entomopatógenos.....	40
7.4 Identificación molecular de los aislados .....	44
7.5 Obtención de extractos vegetales .....	46
7.6 Actividad Fenoxidasas (PO) en hemolinfa de <i>S. exigua</i> y su inhibición <i>in vitro</i> .....	46
7.7 Bioensayos contra larvas de <i>S. exigua</i> .....	48
7.8 Bioensayos de sinergia.....	50
7.9 Cromatografía de capa fina de los extractos metanólicos .....	51
7.10 Pruebas de antagonismo.....	52
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO .....</b>	<b>68</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Coordenadas geográficas de las localidades muestreadas del sur de Tamaulipas. .....	27
<b>Tabla 2.</b> Reactivos de reacción de amplificación de la región ITS. ....	31
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de amplificación de reacción de secuenciación .....	31
<b>Tabla 4.</b> Cepas de hongos de referencias usadas en el análisis filogenético. ....	32
<b>Tabla 5.</b> Hongos aislados en suelo de cultivos agrícolas del sur de Tamaulipas. ....	40
<b>Tabla 6.</b> Géneros de hongos encontrados en suelos de cultivos agrícolas del sur de Tamaulipas. ....	42
<b>Tabla 7.</b> Rendimiento de extracción de las diferentes plantas con metanol como solvente. .....	46
<b>Tabla 8.</b> CL <sub>50</sub> de los aislados y la cepa de referencia GHA contra larvas de <i>S. exigua</i> . .48	
<b>Tabla 9.</b> Biotayos de sinergia de los extractos de <i>M.alba</i> , <i>S. secundiflora</i> y Arbutina con los aislados seleccionados. ....	51
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de germinación de esporas del aislado HKS ( <i>I. fumosorosea</i> ) en presencia de extractos. ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación taxonómica de los principales hongos entomopatógenos.....	5
<b>Figura 2.</b> Conidióforo (a) y conidios (b) de <i>Beauveria bassiana</i> . Tomado de Humber 2012 .....	6
<b>Figura 3.</b> Conidióforo (a) y conidios (b) de <i>Isaria fumosorosea</i> . Tomado de Humber 2012. .....	7
<b>Figura 4.</b> Conidióforo (a) y conidios (b) de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Tomado de Humber 2012.....	8
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de un hongo entomopatógeno. ....	9
<b>Figura 6.</b> Estructura de la cutícula de insectos y penetración de hongos entomopatógenos. .....	14
<b>Figura 7.</b> Esquema con los diferentes mecanismos de respuesta inmune. Celular .....	15
<b>Figura 8.</b> Ruta de síntesis de melanina en insectos y mamíferos. R .....	17
<b>Figura 9.</b> Estructura molecular de la arbutina .....	18
<b>Figura 10.</b> Estructura molecular del ácido kojico. ....	19
<b>Figura 11.</b> Etapas del ciclo biológico de <i>Spodoptera exigua</i> . ....	22
<b>Figura 12.</b> Mapa mostrando las localidades donde se realizaron los muestreos en el sur de Tamaulipas. ....	26
<b>Figura 13.</b> Pruebas de antagonismo del aislado sinergista con los extractos <i>S. secundiflora</i> y <i>M. alba</i> . ....	38
<b>Figura 14.</b> Morfología colonial de los generos aislados de a) <i>Beauveria bassiana</i> , b) <i>Isaria fumosorosea</i> y c) <i>Aspergillus sp.</i> .....	43
<b>Figura 15.</b> Microfotografía que muestran los conidióforos de: a) <i>B. bassiana</i> , b) <i>I.</i> <i>fumosorosea</i> y c) <i>Aspergillus sp.</i> .....	43
<b>Figura 16.</b> Productos de amplificación por PCR de los segmentos ITS de los aislados fúngicos. ....	44
<b>Figura 17.</b> Arbol filogenético construido a partir de las secuencias de los fragmentos ITS de los aislados fúngicos y de las secuencias de las cepas de referencia. ....	45
<b>Figura 18.</b> Absorbancia de las reacciones de inhibición de los diferentes extractos con respecto al control. ....	47

<b>Figura 19.</b> Producción de melanina comparada entre el control y las reacciones con los inhibidores durante 1 h.....	47
<b>Figura 20.</b> Tiempo de sobrevivencia de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> infectadas por los distintos aislados y la cepa de referencia GHA a una concentración de $1 \times 10^8$ esporas/ml. ....	49
<b>Figura 21.</b> Cromatograma mostrando presencia de arbutina. ....	52
<b>Figura 22.</b> Antibiograma mostrando la ausencia de inhibición del crecimiento del aislado fúngico HKS de <i>Isaria fumosorosea</i> . De izquierda a derecha; Caja 1 <i>M. alba</i> , Caja 2 <i>S. secundiflora</i> y Caja 3 arbutina. ....	53
<b>Figura 23.</b> Esporas germinadas de <i>Isaria fumosorosea</i> HKS en presencia y ausencia de a) <i>M. alba</i> , b) <i>S. secundiflora</i> y c) Control.....	53

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ITS	Secuencia de Transcritos Internos
PO	Fenoloxidasa
TLC	Cromatografía en Capa Fina
CL <sub>50</sub>	Concentración Letal Media
TL <sub>50</sub>	Tiempo Letal Medio
DOPA	Dihidroxifenilalanina
MIP	Manejo Integrado de Plagas
AMPs	Peptidos Antimicrobianos
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PRRs	Receptores de Reconocimiento de Patrones
PAIT	Fenil alanina hidroxilasa
et al.	y colaboradores
H.R.	Humedad Relativa
NaClO	Hipoclorito de Sodio
PDA	agar papa dextrosa
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ANOVA	Análisis de Varianza
FS	Factor de Sinergia
Cct	Coficiente de co-toxicidad
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
cm <sup>3</sup>	centímetro cúbico
mM	milimolar
mg	miligramo
g	Gramo
h	Hora
μl	microlitro
ml	Mililitro
L	Litro
μm	Micrómetro
KDa	Kilodalton
%	Porcentaje
°C	Grados centígrado
rpm	Revoluciones por minuto

## RESUMEN

Actualmente se busca reducir el uso de insecticidas químicos como consecuencia de una serie de efectos adversos que estos ocasionan (resistencia, resurgencia, no selectividad, daños ambientales y a la salud humana), por ello, hoy en día el control biológico representa ser una alternativa ecológica ante los insecticidas químicos. Los hongos entomopatógenos representan una alternativa dentro del área del control biológico, ya que estos fueron de los primeros microorganismos reportados como causantes de enfermedades en insectos. Los factores que afectan la eficacia de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico se pueden clasificar en abióticos (humedad, temperatura, radiación UV, etc.) y bióticos, como los mecanismos de respuesta del hospedero. El principal mecanismo de respuesta a la infección fúngica en insectos es la melanogénesis, ya que representa la única respuesta inmune innata dentro del phylum Arthropoda. La principal enzima involucrada en la ruta de síntesis de melanina en sus primeras etapas es la fenoloxidasa (PO). Debido a lo anterior y a que actualmente no existen reportes del uso de compuestos que actúen como sinergistas de insecticidas biológicos, en el presente trabajo se evaluó el efecto sinergista de extractos de plantas (*Morus alba*, *Aloe vera*, *Rubus ulmifolius*, *Sophora secundiflora* y *Pyrus communis*) junto con aislados de hongos entomopatógenos de suelos agrícolas del sur de Tamaulipas. Como modelo de estudio se utilizó *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Se obtuvieron 7 aislados de hongos entomopatógenos del sur de Tamaulipas, pertenecientes a las especies *Beauveria bassiana* (HBB, HEB y HKB), *Isaria fumosorosea* (HGB, HKS y HKR) y *Aspergillus alliaceus* (HP). El aislado HKS de *I. fumosorosea* presentó la CL<sub>50</sub> menor ( $1.29 \times 10^6$ ) siendo el más eficiente en cuanto a mortalidad causada en larvas de *S. exigua*. Además se mostró potenciado por los extractos de *M. alba* y *S. secundiflora*, los cuales presentaron inhibición de (PO) in vitro y en los bioensayos. Así mismo, los extractos de *S. secundiflora* y *M. alba* no presentaron antagonismo contra el aislado HKS de *I. fumosorosea* en el crecimiento en placa, ni en el proceso de germinación.

## ABSTRACT

Nowadays, the main concern for the pest control consist reduce the use of chemical insecticides as a result of a series of adverse effects that these cause (resistance, resurgence, non-selectivity, environmental damage and human health), therefore, nowadays biological control represents an ecological alternative to chemical insecticides. Entomopathogenic fungi represent an alternative within the biological control area, as these were the first microorganisms reported as causing insect diseases. Factors affecting the efficacy of entomopathogenic fungi as biological control agents can be classified into abiotics (humidity, temperature, UV radiation, etc.) and biotics, such as host response mechanisms. The main mechanism of response to fungal infection in insects is melanogenesis, as it represents the only innate immune response within the phylum Arthropoda. The main enzyme involved in the route of melanin synthesis in its early stages is phenoloxidase (PO). Because of the foregoing and that currently there are no reports of the use of compounds that act as synergists of biological insecticides, in this work evaluated the effect synergist of extracts of plants (*Morus alba*, *Aloe vera*, *Rubus ulmifolius*, *Sophora secundiflora* and *Pyrus communis*). Together with isolated fungi entomopathogenic of agricultural soils of southern Tamaulipas. As a model of study was used *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Seven isolates of entomopathogenic fungi from southern Tamaulipas were obtained, belonging to the species *Beauveria bassiana* (HBB, HEB y HKB), *Isaria fumosorosea* (HGB, HKS y HKR) and *Aspergillus alliaceus* (HP). The isolated HKS of *I. fumosorosea* presented the minor LC50 ( $1.29 \times 10^6$ ) being the most efficient in terms of mortality caused in larvae of *S. exigua*. It was also enhanced by the extracts of *M. alba* and *S. secundiflora*, which showed inhibition of (PO) in vitro and bioassays. Likewise, the extracts of *S. secundiflora* and *M. alba* did not present antagonism against the isolated HKS of *I. fumosorosea* in the growth in plaque, nor in the process of germination.

# 1. INTRODUCCIÓN

Una vez que el hombre ha tecnificado muchos procesos de su vida, incluida la agricultura extensiva, uno de los principales problemas a los que se ha enfrentado son las pérdidas ocasionados por los insectos “plaga” afectando en gran medida los rendimientos de las cosechas (De Luna-Santillana 2014). El aumento de la demanda de alimentos, así como la llegada de la revolución industrial condujeron al desarrollo de estrategias de control de plagas agrícolas. En un principio, la mayoría de dichas estrategias se limitaban al uso de insecticidas químicos para solucionar el problema, con lo cual se creía resuelto el problema, sin embargo, el uso indiscriminado de químicos para el control de plagas acarreó inconvenientes no previstos en principio, como lo es la resistencia a insecticidas, la no selectividad, daños ambientales y daños a la salud humana.

Actualmente se busca reducir el uso de insecticidas químicos debido a sus efectos nocivos, por ello, actualmente el control biológico representa una alternativa ecológica ante los pesticidas químicos, el cual se puede llevar a cabo mediante agentes depredadores, parasitoides y patógenos (García 2000), dentro estos últimos podemos mencionar a los hongos entomopatógenos, ya que estos fueron los primeros microorganismos reportados como causantes de enfermedades en insectos y se ha experimentado con ellos desde finales del siglo XIX (Lacey et al. 2001).

Dentro de las especies más importantes como agentes de control de insectos plaga se encuentran *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wize), *Lecanicillium lecanii* (*Verticillium lecanii*) (Zimm.) Zare & W. Gams, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Los factores que afectan la eficacia de los hongos entomopatógenos se pueden clasificar en abióticos (humedad, temperatura, radiación UV, etc.) (Jaronsky 2010) y bióticos, como los mecanismos de respuesta inmune del hospedero. Un mecanismo de respuesta a la infección fúngica en insectos es la melanogénesis, la cual representa la principal respuesta humoral en insectos, este proceso lleva a la encapsulación de patógenos en una densa capa de melanina y a la

producción de metabolitos tóxicos que pueden dañar tales patógenos (Yassine et al. 2012). La enzima involucrada en la síntesis de melanina en insectos es la fenoloxidasa (PO).

El proceso de síntesis de melanina en insectos presenta diferencias con respecto a como ocurre en mamíferos, sin embargo, en ambos las enzimas PO presentan la misma función catalítica al inicio de la ruta de su producción (Baurin et al. 2002; Christensen et al. 2005). En insectos, la PO cataliza el primer paso de la ruta generando la hidroxilación del aminoácido fenilalanina para convertirlo en tirosina, y posteriormente a dihidroxifenilalanina (DOPA).

El uso de compuestos inhibidores de fenoloxidasas es bien conocido en la industria cosmética, dichos compuestos se encuentran presentes en diversas plantas como *Morus alba* y *Glycyrrhiza glabra*, y han sido utilizados como agentes aclaradores de piel (Lee et al. 1997). Por ello, para evitar el proceso de melanogénesis durante la infección fúngica en el presente trabajo se evaluaron extractos vegetales con compuestos capaces de inhibir la síntesis de melanina, bloqueando la acción de la PO, para ello, se utilizaron las plantas moral (*Morus alba*), sábila (*Aloe vera*), zarzamora (*Rubus ulmifolius*), colorin (*Sophora secundiflora*) y peral (*Pyrus communis*), analizando si presentaron inhibición enzimática *in vitro*, y además, si mostraron un efecto sinérgico con el uso de hongos entomopatógenos para llevar a cabo control biológico del gusano soldado *Spodoptera exigua* como modelo de estudio.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Control biológico

Durante gran parte del siglo XX, el uso indiscriminado de insecticidas químicos ha llevado consigo al desarrollo de daños colaterales (afección de biota benéfica, contaminación de suelo, agua y la atmosfera de nuestro ecosistema) (Pimentel et al. 1992). Ante esto, en las últimas décadas hay una tendencia para racionalizar cada vez más los plaguicidas químicos para evitar dichos efectos, por ello, se han venido desarrollando estrategias alternativas, dentro de las que destaca el control biológico, ya que representa una alternativa ecológica ante los plaguicidas químicos para reducir poblaciones de insectos en campos agrícolas. Además, representa una herramienta importante dentro de las estrategias del manejo integrado de plagas (MIP).

El término “control biológico” originalmente se definió como la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia (De Bach 1964), recientemente lo definieron como “un medio ecológico y eficaz para reducir o mitigar plagas y sus efectos mediante el uso de enemigos naturales” (Eubanks et al. 2017).

Entre las ventajas del control biológico comparado con los insecticidas químicos se pueden destacar su nivel bajo o ningún efecto nocivo colateral hacia los enemigos naturales y otros organismos incluido el hombre, se presenta muy rara vez resistencia en las plagas, el tratamiento con insecticidas es eliminado de forma sustancial, es muy favorable la relación coste/beneficio, evita la aparición de plagas secundarias, no producen problemas de intoxicaciones, entre otras (Summy y French 1988; Charleston et al. 2005, 2006).

El control biológico de insectos puede llevarse a cabo mediante el uso de enemigos naturales del insecto en cuestión que se desea controlar, los enemigos naturales, a su vez pueden clasificarse en tres clases: depredadores, parasitoides y los patógenos (Rosenheim,

et al. 1995) y dentro de este último grupo se encuentran los virus, bacterias, nematodos y hongos (Lacey et al. 2001).

### **2.1.1 Hongos entomopatógenos**

La patología de artrópodos es una disciplina que comenzó con pioneros como Agostino Bassi y Elie Metchnikoff durante el siglo XIX, siendo los hongos los protagonistas de estas primeras investigaciones (Rosenheim et al. 1995). Así los hongos entomopatógenos se consideran los primeros microorganismos reportados como agentes etiológicos causantes de enfermedades en insectos.

Se estima que aproximadamente el 80% de las enfermedades que se producen en los insectos de manera natural tienen como agente causal un hongo (Badii y Abreu 2006). Su distribución en un amplio rango de hábitats, incluido el agrícola, es bien conocido (Lacey et al. 1996). Por otra parte, su producción en masa está bastante desarrollada (Wraight et al. 2000). Además, es bastante común observar epizootias en poblaciones de insectos causadas por hongos (Lacey et al. 2015).

Desde que en 1836, Agostino Bassi, describiera la enfermedad de la muscardina sobre el gusano de seda, cuyo agente etiológico es *Beauveria bassiana* (Porter 1973), los hongos han sido utilizados para controlar poblaciones de insectos en todo el mundo, tan solo en 2006, había 129 productos a base de esporas de hongos comercialmente disponibles en todo el mundo (Faria y Wraight, 2007; Jaronsky 2010), esto los convierte en el segundo grupo de microorganismos utilizado en formulaciones de insecticidas biológicos después de *Bacillus thuringiensis* (Polanczyk et al. 2012).

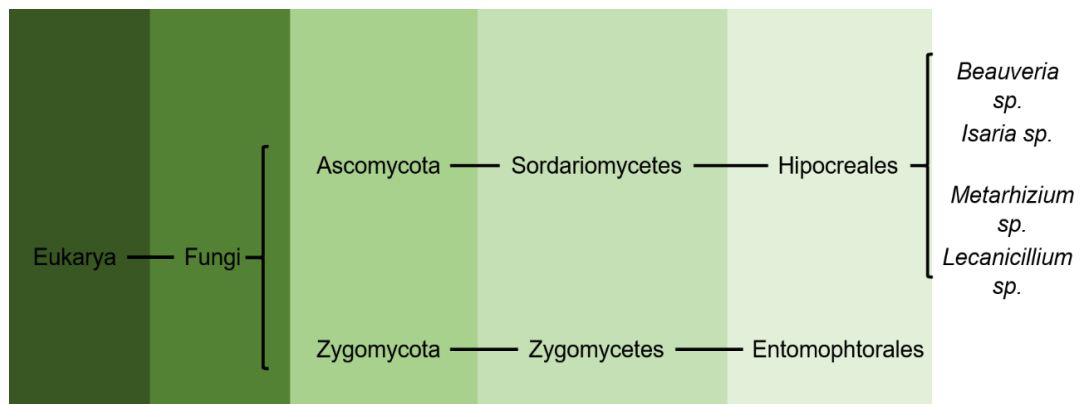
### **2.1.2 Clasificación taxonómica de hongos entomopatógenos**

La amplia gama de especies de hongos entomopatógenos se puede dividir en dos grandes grupos. Los entomofthorales, causantes de epizootias de manera natural, pero con limitaciones técnicas en su producción masiva y los Hypocreales de uso inundativo en

campo, los cuales son los más utilizados en micoinsecticidas comerciales (Faria y Wraight 2007).

Se conocen al menos noventa géneros y más de setecientas especies de hongos han sido identificadas y asociadas a invertebrados, principalmente insectos (St. Leger y Screen 2001).

Para autores como Samson et al. (1988), los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados en las divisiones Zygomycota, Ascomycota y Deuteromycota, también, Shah y Pell (2003), la mayoría de los géneros como ya se mencionó se encuentran en el orden de los hypocreales y entomophtorales dentro de los filos Ascomycota y Zygomycota respectivamente (Figura 1). De cualquier manera, los géneros de hongos entomopatógenos más comunes son *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria* (*Paecilomyces*), *Tolypocladium* y *Lecanicillium* (*Verticillium*) (Inglis et al. 2001).



**Figura 1.** Clasificación taxonómica de los principales hongos entomopatógenos.

### 2.1.3 Principales hongos entomopatógenos usados en control biológico

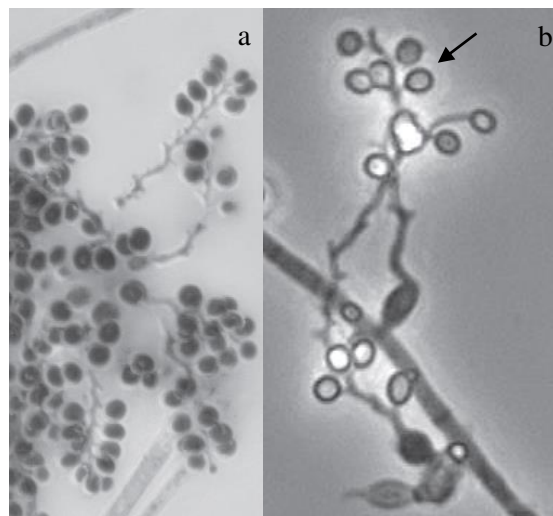
Dentro de los dos grupos de hongos considerados entomopatógenos, los Hipocreales son los más utilizados en la industria de los micoinsecticidas ya que tienen

una distribución cosmopolita y su producción masiva es técnica y económicamente más simple y rentable, como por ejemplo:

### 2.1.3.1 *Beauveria bassiana*

*Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que ha sido aislado de una amplia variedad de insectos de todos los órdenes (Zimmermann 2007). Agostini Bassi en 1836 fue el primero en describirlo cuando lo aisló del gusano de la seda (*Bombix mori*). *B. bassiana* posee un amplio rango de insectos hospederos conformado por 707 especies pertenecientes a 521 géneros y 149 familias en 15 ordenes distintos (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Ortoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattodea, Embioptera) (Li 1988).

Macroscópicamente las colonias de *B. bassiana* se caracterizan por presentar un color blanco con un aspecto polvoso y a veces aterciopelado. La presencia de conidióforos es abundante, estos se levantan a partir de las hifas vegetativas sosteniendo grupos de células conidiógenas que se pueden ramificar en zig-zag. Los conidios son esféricos o ligeramente ovoidales de pigmentación blanquecina y miden entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente forman racimos parecidos a los de las uvas (Figura 2).

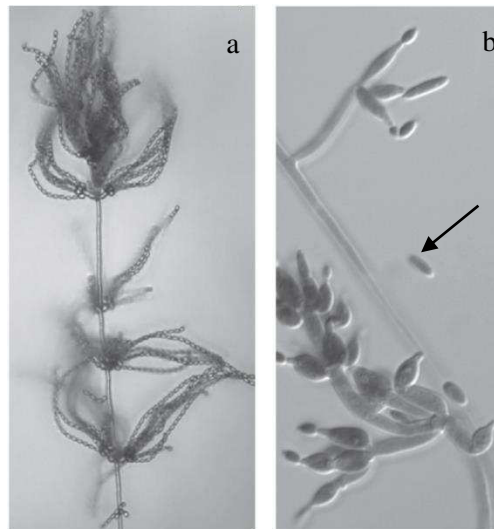


**Figura 2.** Conidióforo (a) y conidios (b) de *Beauveria bassiana*. Tomado de Humber 2012.

### 2.1.3.2 *Isaria fumosorosea*

*Isaria fumosorosea* puede ser comúnmente encontrada en suelo (Cantone y Vandenberg 1998). En 1904 en Ucrania, M. Wize fue el primero en realizar una descripción del hongo después de aislarlo de una larva del picudo de la remolacha *Cleonus punctiventris*. *I. fumosorosea* tiene un rango relativamente amplio de hospederos predominantemente Lepidópteros, pero reducido si se le compara con *B. bassiana* (Zimmermann 2008). Los órdenes de insectos susceptibles a infecciones por *I. fumosorosea* son: Acari, Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Neuroptera y Thysanoptera (Humber and Hansen 2005).

Las colonias de *I. fumosorosea* son de rápida aparición, al principio presentan una coloración blanca tornándose en tonalidades que van desde el rosa hasta el malva, también presentan un aspecto polvoso, granular. Producen sinemas con conidióforos solos o en grupos, con verticilos ramificados con grupos de 3-6 fiálides. Las fiálides con una base ancha globosa a elipsoidal que se adelgaza a un cuello delgado y largo, como en forma de botella. Los conidios son fusiformes (3-4 x 1-2  $\mu\text{m}$ ), triconcavos con extremos redondeados, ligeramente pigmentados, formando estructuras tipo cadenas (Figura 3).

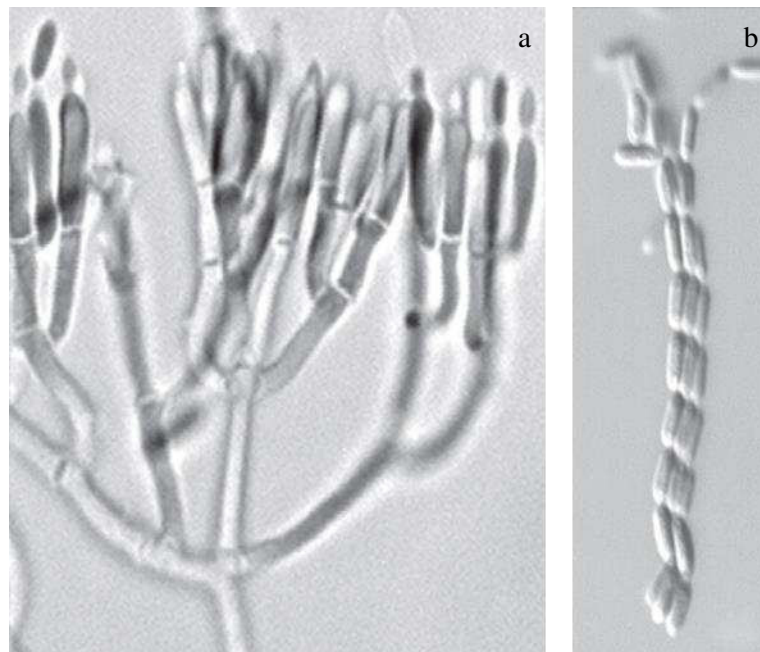


**Figura 3.** Conidióforo (a) y conidios (b) de *Isaria fumosorosea*. Tomado de Humber 2012.

### 2.1.3.3 *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium anisopliae*, anteriormente conocido como *Entomophthora anisopliae*, es un hongo que habita naturalmente en suelo alrededor del mundo. Ilya Ilych Mechnikov microbiólogo ruso lo aisló del escarabajo del trigo, *Anisoplia austriaca* en 1879, más tarde fue usado para controlar el gorgojo de la remolacha azucarera, *Cleonus punctiventris* (Bischoff et al. 2009). *M. anisopliae* tiene un rango de hospederos muy amplio, ha sido observado infectando cerca de 200 especies de insectos (Cloyd 1999).

Las colonias de *M. anisopliae* presentan una pigmentación en tonalidades desde verde olivo hasta verde limón con borde blanco con aspecto granulado parecido a tierra. Los conidióforos en hileras generalmente ramificados en forma de candelabro. Los conidios aseptados, cilíndricos u ovoideos en hileras con forma de cadenas (Figura 4).

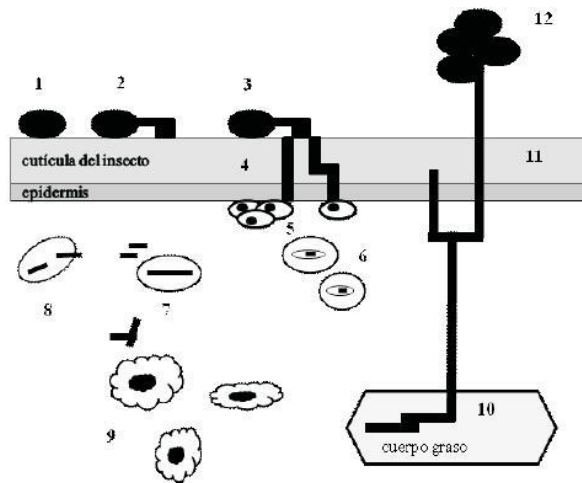


**Figura 4.** Conidióforo (a) y conidios (b) de *Metarhizium anisopliae*. Tomado de Humber 2012.

### 2.1.4 Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos no necesitan ser ingeridos por el insecto como otros agentes de control, ya que pueden invadir al insecto directamente desde el exoesqueleto o cutícula. Los hongos como *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. son hemibiotrofos oportunistas, con una fase parasítica en el hospedero vivo y una vez muerto el hospedero, otra fase saprofita sobre el cadáver (Charnley y Collins, 2007).

El mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos podemos dividirlo en tres fases: Adhesión y germinación de la espóra sobre la cutícula del insecto, Penetración hasta el hemocele y Reproducción y desarrollo del hongo. Lo cual al final resulta en el desarrollo de la micosis y la muerte del insecto (Ferron et al. 1972; St. Leger et al. 1993) (Figura 5).



**Figura 5.** Mecanismo de acción de un hongo entomopatógeno. Adhesión y germinación de la espóra sobre la cutícula del insecto (1 y 2), Penetración hasta el hemocele (3, 4, 5, 6, 7 y 8) y Reproducción y desarrollo del hongo (9, 10, 11 y 12). 1. Adhesión de la espóra a la cutícula del insecto, 2. Germinación y formación del apresorio, 3. Penetración de la cutícula, 4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis 5. Agregación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica, 6. Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocitas del insecto, 7. Transformación a cuerpos levaduriformes, 8. Evasión del sistema inmune, 9. Propagación en el hemocele, 10. Transformación a cuerpo hifal, 11. Esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto, 12. Diseminación de las esporas. (Tomado de Téllez-Jurado et al. 2009).

#### **2.1.4.1. Adhesión y germinación de la espora sobre la cutícula del insecto**

El primer contacto que hace la espora con la superficie del hospedero es sobre la cutícula. Las características físicas y químicas de la superficie de la cutícula del insecto y la espora son las responsables de esta unión.

El proceso comienza cuando la espora fúngica (conidio o blastospora) se adhiere a la cutícula por medio de mecanismos inespecíficos que involucran la hidrofobicidad de la pared celular de las esporas (Boucias et al. 1991; Inglis et al. 2001; Charnley y Collins 2007), algunas glicoproteínas presentes en la cutícula pueden servir como un receptor específico para las esporas (Tanada y Kaya 1993).

Después continúa el proceso con la germinación. Se entiende por germinación el proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinales, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas (Volcy y Pardo 1994). En este proceso, la expresión de enzimas proteasas, quitinasas y lipasas, además de otros factores promueven la germinación y crecimiento del hongo a través de la superficie cuticular y posterior penetración a través de la cutícula hacia el hemocele (Ortiz-Urquiza y keyhani 2013). Además, la germinación de las esporas en gran parte depende de la humedad ambiental y temperatura y en menor grado de las condiciones de luz y nutricionales (Tanada y Kaya 1993).

#### **2.1.4.2 Penetración hasta el hemocele**

La forma en la que *B. bassiana* penetra en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley 1992).

La penetración hasta el hemocele es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos; uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una



estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón 2001).

Las proteasas son de suma importancia, ya que entre 60 y 70% de la cutícula del insecto está conformada por proteínas (Charnley 2003). Se ha demostrado que la sobreexpresión del gen que codifica para la quitinasa de *B. bassiana* acelera el proceso de muerte en los insectos en un 23% (Fan et al. 2007).

Otro mecanismo que utiliza el hongo para penetrar al hemocele es a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto.

#### **2.1.4.3. Reproducción y desarrollo del hongo**

Una vez que el hongo alcanza el hemocele, comienza la esporulación (blastosporas), la mayoría de los hongos realizan transición dimórfica de micelio a levadura y una vez que han evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia. En este punto, el insecto muere por alteraciones bioquímicas y fisiológicas provocadas por dicho crecimiento esporulado. La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto, tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo 2001).

Finalmente, el ciclo de vida del hongo se completa cuando las blastosporas germinan y crecen de manera saprofita sobre el cadáver del insecto, en algunos hongos las hifas salen sobre la superficie del insecto produciendo nuevos conidios permitiendo su dispersión horizontal entre la población de insectos (Charnley y Collins 2007).

### **2.1.5 Ventajas y Desventajas del uso de Hongos Entomopatógenos**

Entre las ventajas del uso de hongos entomopatógenos en control biológico se enlistan las siguientes:

- Presentan un hospedero específico.
- Una vez en campo se reproducen y dispersan rápidamente.
- La tecnología requerida para su producción es simple y de bajo costo.
- La resistencia adquirida en insectos hacia la infección fúngica no ha sido reportada ni documentada.
- No presentan un riesgo sanitario para las especies vegetales y la salud humana así como tampoco contaminan el medioambiente.

A pesar de las ventajas antes mencionadas del uso de hongos entomopatógenos, también hay que decir que presentan características desfavorables que limitan su eficiencia, y por lo tanto, reducen su preferencia de uso entre las que se encuentran:

- No todas las plagas poseen enemigos biológicos eficientes desde el punto de vista económico.
- Su efectividad en campo se ve afectada por factores edáficos y medioambientales.
- Su rango vital requiere de una humedad alta y temperatura mesófila.
- El tiempo de muerte sobre el insecto se considera lento en comparación con insecticidas químicos.

No obstante, en la actualidad se realizan investigaciones en busca de sortear algunas de estas desventajas. Una estrategia para mejorar la eficiencia de hongos entomopatógenos es la de mezclarlo con otras sustancias ya sean adyuvantes para proteger las esporas o mejorar su virulencia o compuestos que potencien su eficiencia logrando una sinergia con el hongo.

Por otra parte, la respuesta del hospedero ante la infección fúngica representa uno de los obstáculos que los hongos necesitan vencer para lograr su objetivo de controlar poblaciones de insectos, por ello resulta importante estudiar los mecanismos de defensa del hospedero para entender e intentar inhibir alguno de dichos mecanismos y así mejorar la eficiencia de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico.

## **2.2 Mecanismos de defensa del insecto ante la infección fúngica**

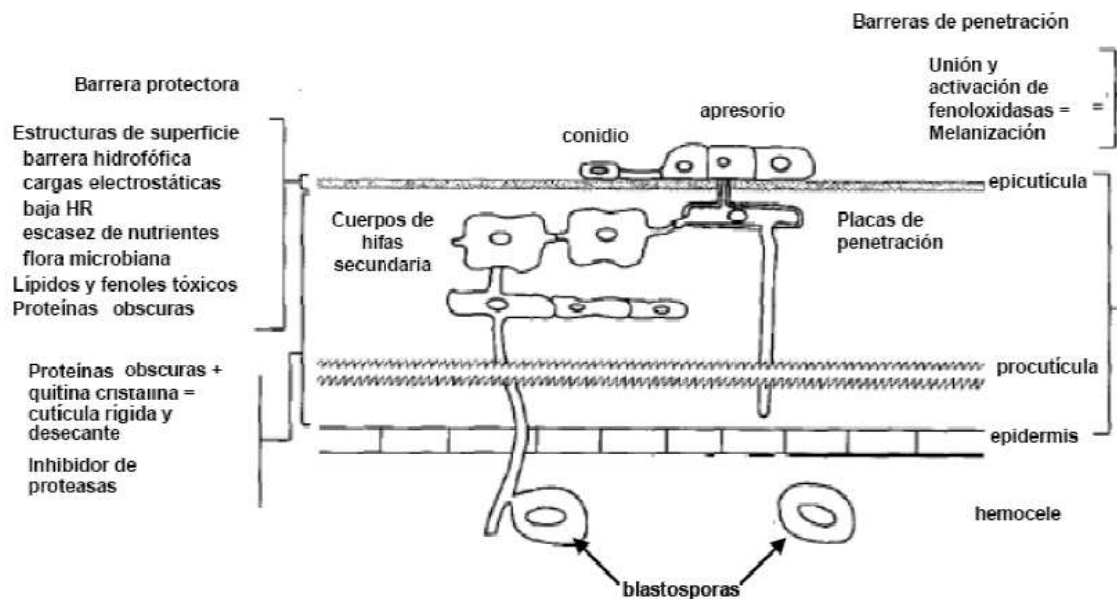
Una gran diversidad de organismos patógenos puede infectar insectos incluidos virus, bacterias, hongos, protozoarios, nematodos e inclusive otros insectos (Mahy 2004; Pennacchio y Strand 2006; Vega y Kaya 2012; Hillyer 2016).

Los insectos poseen diversos mecanismos de defensa los cuales se pueden clasificar en tres grupos: el primero es totalmente mecánico, inespecífico y está conformado por barreras estructurales como la cutícula, el segundo grupo es la respuesta celular mediada por hemocitos y el tercero es la respuesta humoral (Moreno 2010).

### **2.2.1 Respuesta mecánica**

En el caso de una infección fúngica, como ya se mencionó la primera línea de defensa del insecto es la cutícula (Charnley y Collins 2007; Ortiz-Urquiza y Keyhani 2013; Hillyer 2016), en ella se producen moléculas antifúngicas y toxinas incluidas lípidos, péptidos y proteínas.

La cutícula del insecto está compuesta de manera heterogénea. Y está formada por la epicutícula o capa más externa, ésta proporciona una barrera hidrofóbica rica en lípidos, después sigue la procutícula rica en quitina y proteína esclerotizada, ésta a su vez dividida en capas: exo, meso y endo cutícula. Debajo de la procutícula, a su vez, se encuentra la epidermis, que protege las estructuras internas del insecto (Ortiz-Urquiza y Keyhani 2013) (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura de la cutícula de insectos y penetración de hongos entomopatógenos. Tomada de (Gonzalez-Castillo et al. 2012)

### 2.2.2 Respuesta celular

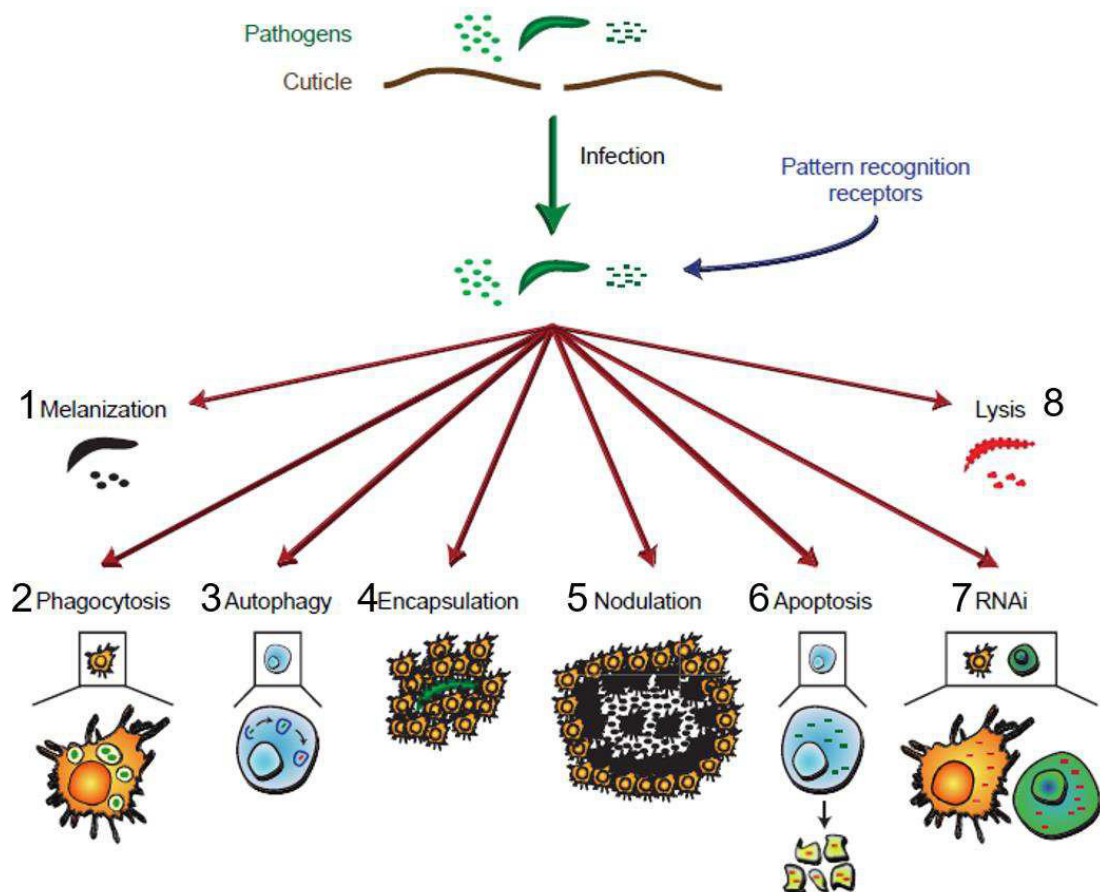
Una vez atravesada la cutícula, el insecto puede responder a la infección activando los otros dos grupos de respuesta inmune, la respuesta celular, e involucrando los mecanismos de fagocitosis y/o encapsulación mediada por hemocitos (Bidochka et al. 1997; Boucias and Pendland 1998), (Figura 7).

Los hemocitos son las principales células inmunes presentes en insectos (Hillyer y Strand 2014; Strand 2008), están presentes en el hemocele, impulsan procesos inmunes celulares tales como la fagocitosis, encapsulación, nodulación, etc. y producen factores inmunes humorales que conducen al patógeno matando a través de la lisis o la melanización (Hillyer 2016) (Figura 7).

### 2.2.3 Respuesta humoral

La respuesta humoral está compuesta por los mecanismos de lisis y melanogénesis. El mecanismo de lisis está mediado por péptidos antimicrobianos (AMPs), lisozimas y especies reactivas de oxígeno, que conducen a la ruptura de la membrana celular del patógeno (Hillyer 2016). Los AMPs son péptidos de 2 a 20 kDa de peso que se pueden agrupar en cuatro categorías: Defensinas, Cecropinas, Atacinas y Gloverinas y Lebocinas.

Por su parte, la melanogénesis es un proceso enzimático involucrado en la defensa contra gran cantidad de patógenos incluidas bacterias, hongos, protozoarios, nematodos y huevos de parasitoides. Aunque en el proceso participan los hemocitos (Sugumaran 2002; Nappi y Christensen 2005), este se considera humoral (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema con los diferentes mecanismos de respuesta inmune. Celular (2, 4 y 5) y humoral (1 y 8) en insectos contra organismos patógenos y virus (3, 6 y 7). Adaptada de Hillyer 2016.

### **2.2.3.1 Melanogénesis**

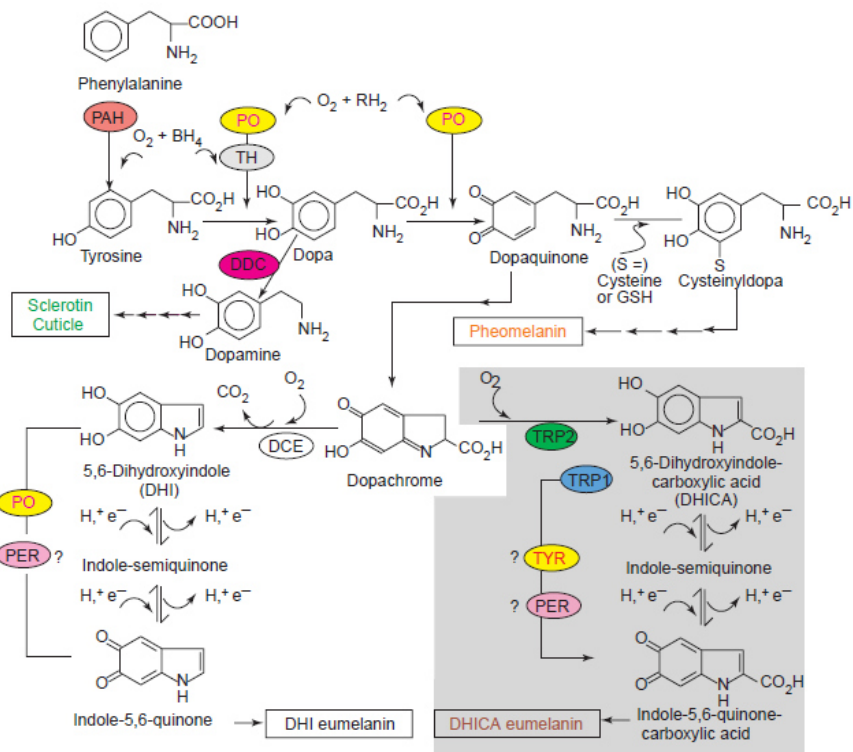
La melanina es un heteropolímero derivado de la O-quinona. La función principal de la melanina en animales incluye la protección contra la radiación ultravioleta y una coloración protectora. En insectos, la melanina también está implicada en el mecanismo de respuesta inmune en insectos, la cual lleva a la encapsulación de patógenos en una densa capa de melanina y los metabolitos intermediarios de su síntesis son tóxicos para tales patógenos (Yassine et al. 2012).

La melanina se sintetiza a partir de una cascada enzimática, que en ciertos insectos y estadios de estos involucra la participación de hemocitos, mientras que en otros insectos con cantidades limitadas de hemocitos, la melanogénesis es totalmente humoral (Sugumaran 2002; Christensen et al. 2005).

### **2.2.3.2 Ruta bioquímica de la melanogénesis**

La melanogénesis es iniciada cuando los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como las proteínas de reconocimiento de  $\beta$ -1,3 glucano presentes en el insecto, se unen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en la pared del hongo e inicia una cascada enzimática que lleva a la producción de melanina (Matskevich et al. 2010; Yassine et al. 2012; Wang et al. 2014; Hillyer 2016).

La principal enzima involucrada en la síntesis de melanina en insectos es la fenoloxidasas (PO), la cual es capaz de oxidar compuestos fenólicos a quinonas, que posteriormente polimerizan en forma no enzimática a melanina. Esto ocurre por fuera, pero muy cerca de los hemocitos, de la siguiente manera: primero un aminoácido fenilalanina, es convertido en Orto-tirosina por la fenilalanina hidroxilasa (PAH); después, la enzima PO (producida principalmente por los hemocitos) transforma la tirosina en un compuesto llamado dopa, de nuevo la PO convierte esta dopa en dopaquinona, la cual, después de varias reacciones, es convertida en melanina como producto final (Christensen et al. 2005) (Figura 8).



**Figura 8.** Ruta de síntesis de melanina en insectos y mamíferos. Reacciones remarcadas en gris solo ocurren en mamíferos. Tomado de Christensen et al. 2005.

Este proceso es el que llama la atención para hacerlo objetivo de inhibición debido a que se conocen moléculas capaces de inhibir dicha ruta de síntesis.

### 2.3 Inhibidores de síntesis de melanina

La síntesis de melanina tanto en mamíferos como en insectos es análogo químicamente y está involucradas la fenoloxidasas. Además, existen compuestos con capacidad de inhibir la acción de las fenoloxidasas.

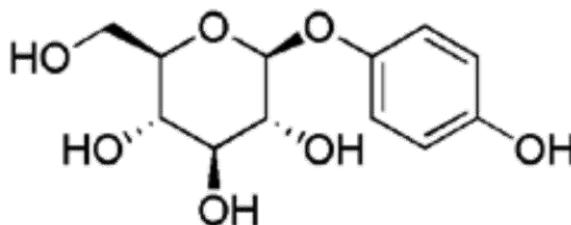
El uso de compuestos inhibidores de fenoloxidasas es bien conocido en la industria cosmética, uno de los primeros compuestos utilizados tradicionalmente en la despigmentación de piel es la hidroquinona, desafortunadamente es altamente tóxica para el ser humano (Zhu y Gao 2008). Tales compuestos se encuentran presentes en diversas

plantas como *Morus alba* y *Glycyrrhiza glabra* y han sido utilizados como agentes aclaradores de piel (Lee et al. 1997).

Entre estos compuestos que son capaces de inhibir la síntesis de melanina, inhibiendo por competencia la acción de la tirosinasa (una fenoloxidasa), se puede citar la arbutina, la aloesina, el ácido kojico, L-mimosina, el extracto de *Morus alba*, etc. Estos compuestos inhibidores de PO se encuentran presentes en diversas plantas ornamentales, frutales alrededor del mundo.

### 2.3.1 Arbutina

La  $\beta$ -arbutina es uno de los más abundantes compuestos presentes en distintas especies de pera (*Pyrus sp.*) o Gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*) y ha sido ampliamente utilizado como agente blanqueador en productos cosméticos (Cho et al. 2011). Sin embargo, el anómero  $\alpha$ -arbutina ha mostrado ser más potente que su contraparte  $\beta$  (Kurosu et al. 2002) (Figura 9). La  $\alpha$ -arbutina puede ser sintetizada a partir de hidroquinona usando amilasas de *Bacillus subtilis* (Nishimura et al. 1994) o con sucrosa fosforilasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Kitao y Sekine 1994).



**Figura 9.** Estructura molecular de la arbutina.

### 2.3.2 Extracto de *Morus alba*

La morera blanca *M. alba* es considerada originaria del centro y este de Asia, es un árbol de hasta 18 m de alto, ramoso, de copa ancha y corteza lisa y gris cuando es



joven, pero gruesa, muy agrietada y parda o gris al envejecer (Arbolapp 2017). Se ha demostrado que el extracto de *M. alba* inhibe la actividad de la tirosinasa en mamíferos.

### 2.3.3 Acido Kojico

Es un derivado del fenol obtenido por fermentación del arroz, o por fermentación usando varias especies de hongos en especial *Aspergillus oryzae*. Tiene aplicación para el tratamiento de hiperpigmentaciones, ya que inhibe la melanogénesis (Figura 10).

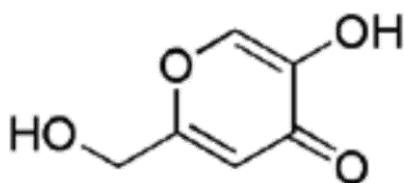


Figura 10. Estructura molecular del ácido kojico.

### 2.4 Sinergismo en insecticidas

En toxicología se define sinergismo como un efecto combinado de dos o más factores, siendo este efecto mayor que cualquiera de ellos de manera aislada (Repeto y Saenz 1995). En lo que a insecticidas se refiere, se define sinergista como una molécula química que al ser mezclada con el insecticida incrementan su actividad biológica, el cual, por sí solo no tiene actividad biológica.

El mecanismo de acción de la mayoría de los sinergistas es el de inhibir las enzimas involucradas en el proceso de degradación o detoxificación de la molécula insecticida (Bernard y Philogene 1993), por ejemplo, el butóxido de piperonilo, el cual inhibe la actividad de oxidasas permite una mayor eficiencia de algunos insecticidas químicos como piretrinas y carbamatos.

En el caso específico de insecticidas biológicos no se tiene registro de moléculas que incrementen su actividad biológica, aunque si existen infinidad de trabajos donde se

explora coinfección entre hongos entomopatógenos y otros organismos patógenos u otros insecticidas.

Por ello se busca que los extractos botánicos con capacidad de inhibir la actividad de la fenoloxidasa actúen como sinergistas del hongo entomopatógeno ayudando durante su infección dentro del insecto.

## ***2.5 Spodoptera exigua***

La familia Noctuidae, ubicada dentro del orden Lepidoptera, abarca un total de 20,000 especies y se caracterizan porque sus adultos vuelan de noche y son de colores grisáceos u oscuros. Existen diversas especies de lepidópteros noctuidos que atacan a los distintos cultivos hortícolas. Entre otras especies destacan *Spodoptera exigua*, que es la más importante.

El gusano soldado *S. exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) es considerada una plaga polífaga que ataca más de 60 especies de plantas pertenecientes a 23 familias botánicas diferentes (Brown y Dewhurst 1975), es nativa del sur de China (Kolodny-Hirsch et al. 1997), y actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo. Es considerada una especie migratoria en la que sus adultos pueden recorrer largas distancias de hasta 3,500 Km en un lapso de 9 a 11 días (French 1969).

En determinadas zonas geográficas de clima cálido, ésta especie puede estar presente todo el año, produciéndose un reagrupamiento de las poblaciones de adultos en la primavera o principios del verano (Belda et al. 1994).

En México, durante 1990, se encontró esporádicamente en cultivos de algodón, sin embargo, en 1993 se convirtió en una plaga importante para dicho cultivo y se extendió a otras plantas hospedadoras (Obando-Rodríguez et al. 1997; Garza y Terán 2007). Además ha sido reportada como plaga de varios cultivos importantes en México como frijol, tomate, algodón, yuca, maíz, arroz y, precisamente, soja y sorgo (Ruiz-Corral et al. 2013).

### 2.5.1 Ubicación taxonómica

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera
Familia	Noctuidae
Género	<i>Spodoptera</i>
Especie	<i>Exigua</i>
Nombre común	Gusano soldado

### 2.5.2 Biología de *Spodoptera exigua*

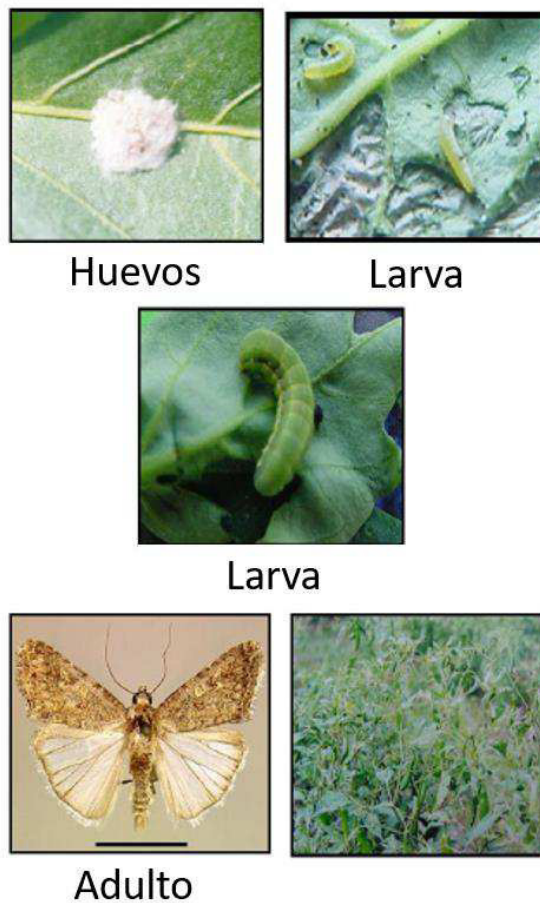
Es un insecto holometábolo; es decir, que presenta una metamorfosis completa. Su ciclo de vida incluye huevo, larva u oruga, pupa y adulto. En condiciones de campo el ciclo de vida se desarrolla en aproximadamente 23 días dando hasta 11 generaciones por año (Amaldos y Hssue 1989) (Figura 11).

Los huevos se encuentran en masas de 50 a 150 sobre las hojas. Las hembras adultas ovopositan entre 1 a 4 días después de la cópula. Los huevecillos son de color verde olivo y las hembras están cubiertos con una capa de escamas aterciopeladas de color gris que se desprende del abdomen de la hembra (Oliver y Chapin 1981) para protegerlos de las condiciones ambientales.

El periodo de incubación de los huevos es de 3-7 días mientras que el periodo larval es de 17-21 días. Las larvas pequeñas son de color verde claro con la cabeza negra, presentan 5 estadios con líneas subdorsales más o menos oscuras marcadas en cada uno en los segmentos abdominales. Cerca de los espiráculos se encuentran manchas blancas o amarillas brillantes. El vientre es verde brillante y moteado con líneas blancas irregulares (Bohmfolk et al. 1982).

La pupa es de color café brillante y tiene un periodo de 8-10 días, se le encuentra en el suelo a una profundidad de 1.0 cm, dentro de una celda elaborada con partículas de tierra como se observa en la figura 2b (Oliver y Chapin 1981).

El adulto es una palomilla de color café grisáceo y brillante, mide 2.5 cm con las alas extendidas. Las alas anteriores son de color café grisáceo con líneas café oscuro y escamas blancas, con una mancha redonda color crema y con el centro anaranjado; las alas posteriores son blancas con las venas y el margen color café (Oliver y Chapin 1981).



**Figura 11.** Etapas del ciclo biológico de *Spodoptera exigua*. Tomado de Garza-Urbina y Terán-Vargas 2007.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La eficiencia de un insecticida con esporas de hongos entomopatógenos como ingrediente activo, se mide en base a su concentración letal (CL) y tiempo letal (TL), es decir la cantidad de esporas y el tiempo que requiere el hongo para dar muerte al insecto blanco. Por otra parte, los insectos presentan varios mecanismos de defensa ante la infección fúngica, uno de ellos, la “melanogénesis” es el principal mecanismo de respuesta humoral presente en insectos hacia la infección fúngica. Debido a que el uso de compuestos inhibidores de melanogénesis es bien conocido en la industria cosmética, y a que la ruta de síntesis de melanina en insectos y en mamíferos es catalizada por enzimas fenoloxidasa (PO) análogas en estructura y función, se pretende el uso de inhibidores de PO para impedir uno de los mecanismos de defensa del insecto y así buscar potenciar la eficiencia de hongos entomopatógenos como insecticidas.

#### **4. HIPOTESIS**

La arbutina, así como extractos de *Morus alba*, *Aloe vera*, *Rubus ulmifolius*, *Sophora secundiflora* y *Pyrus communis* (inhibidores de PO) inhiben la síntesis de melanina en la hemolinfa de *S. exigua* durante el proceso de infección con esporas de hongos entomopatógenos, potenciando la eficiencia de hongos entomopatógenos como insecticidas y haciendo posible su uso como sinergistas.

## 5. OBJETIVO DEL TRABAJO

### Objetivo general

Determinar si la inhibición del proceso de melanogénesis por parte de extractos de plantas durante la infección fúngica en *Spodoptera exigua*, potencia la eficiencia de insecticidas a base de esporas de hongos entomopatógenos.

### Objetivos particulares

1. Aislar hongos entomopatógenos de suelos agrícolas del sur de Tamaulipas.
2. Identificar molecularmente los aislados fúngicos.
3. Determinar la CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub> de los aislados fúngicos sobre *S. exigua* y seleccionar aquellos que presenten la mejor actividad.
4. Obtener extractos metanólicos de *Morus alba*, *Rubus ulmifolius*, *Pyrus communis*, *Aloe vera* y *Sophora secundiflora*.
5. Determinar la producción de melanina en la hemolinfa de *S. exigua*.
6. Determinar el porcentaje de inhibición de fenoloxidasa (PO) por parte de los extractos de plantas en la hemolinfa de *S. exigua* y seleccionar los que presenten mayor actividad.
7. Determinar el coeficiente de co-toxicidad y el factor de sinergia de los extractos en conjunto con los aislados sobre *S. exigua* y seleccionar las mejores combinaciones.
8. Realizar pruebas de antagonismo de los extractos seleccionados en el desarrollo fúngico.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Muestreo de suelo

Se colectaron muestras de suelo de cultivos agrícolas de los municipios de Altamira y Aldama en el sur del estado de Tamaulipas (Figura 12). Una vez seleccionados los campos de cultivo de aproximadamente una hectárea y con la ayuda de una pala metálica, se colectaron 50 muestras de suelo superficial en puntos distantes y aleatoriamente, para tomar la muestra el sitio se limpió, removiendo la hojarasca y las malezas. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron al laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL para realizar el aislamiento de los hongos. Los sitios de muestreo fueron localizados mediante mapas geográficos con coordenadas (Tabla 1).



**Figura 12.** Mapa mostrando las localidades donde se realizaron los muestreos en el sur de Tamaulipas. Adaptado de INEGI, 2017.



**Tabla 1.** Coordenadas geográficas de las localidades muestreadas del sur de Tamaulipas.

Localidad	Coordenadas	
	Lat N	lon O
Los pepes	22°28'44,911	98°0'18,979
Corpus Christi	22°28'44,508	98°1'3,439
El catalán	22°27'39,409	97°58'55,578
Santa Rita	22°27'55,598	98°0'51,994
El alto	22°40'34,024	97°55'51,294
Tabla tirada	22°40'32,21	97°56'33,99
Maclovio Herrera	22°30'14,79	98°5'49,257
Benito Juárez	22°29'45,567	98°3'38,534
El chamizal	22°34'0,073	98°0'25,585
Mata del blanco	22°31'4,245	98°0'57,157

## 6.2 Aislamiento de hongos entomopatógenos

Se utilizó la técnica del insecto trampa (Zimmermann 1986; Bing-Da y Xing-Zhong 2008), empleando larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) reproducidas en laboratorio. Las muestras de suelo se cribaron en tamices de 1mm de diámetro de poro hasta obtener un polvo fino. De cada muestra tamizada se tomaron 300 g, se humedecieron y se colocaron en recipientes de plástico (14 x 18 x 6 cm), junto con cinco larvas de *G. mellonella* de tercer estadio. Cada recipiente se tapó y se incubó a 28°C durante siete días, diariamente los recipientes se invirtieron y agitaron suavemente para asegurar el máximo contacto de las larvas con el suelo.

Transcurrido ese tiempo, se extrajeron las larvas, se desinfectaron con NaClO al 0.05% y se colocaron en una cámara húmeda (placas de Petri con papel filtro humedecido con agua bidestilada estéril) durante 7 días a 28°C y 80% de H.R. para favorecer el desarrollo de los hongos (Woodring y Kaya 1988; Fan y Hominick 1991). Cuando se observó el desarrollo de algún hongo sobre la superficie de la larva, se tomó una pequeña

muestra, se sembró en agar papa dextrosa (PDA) adicionado con 500 ppm de cloramfenicol (Hatting et al. 1999) y se incubó durante 7 días a 28°C. Finalmente, de las colonias obtenidas a partir de las larvas micosadas se resembraron en PDA hasta obtener cultivos axénicos.

### **6.2.1 Confirmación de hongos entomopatógenos**

Una vez obtenidos los aislados fúngicos se procedió a descartar los posibles patógenos oportunistas que pudieran haberse aislado, para ello se llevó a cabo un ensayo de patogenicidad sobre larvas de tercer estadio de *G. mellonella* de la siguiente manera. Con ayuda de unas pinzas entomológicas estériles se tomaron las larvas, se desinfectaron en una solución de NaClO al 0.05%, se colocaron durante 1 min sobre cajas de Petri con crecimiento fúngico de cada aislado, se transfirieron a cámaras húmedas conteniendo dieta para *G. mellonella* y se incubaron durante 7 días a 28°C en completa oscuridad (10 larvas por tratamiento). Se descartaron los aislados que mostraron mortalidades inferiores al 50%.

### **6.2.2 Identificación morfológica**

La técnica tradicional de identificación de un género (fenotipificación) involucra su aislamiento en placas de cultivo, purificación y caracterización morfológica, tanto de los elementos hifales (septación, estructura de pared, estructura de septos, etc.) así como de sus estructuras de reproducción (esporangióforo, conidióforo, ascomata, basidiomata o zoosporangio) (Barnett y Hunter 1972; Humber 1997).

Los aislados se caracterizaron por su morfología con la técnica de microcultivo. En placas de Petri, sobre una varilla de vidrio en forma de “V” se colocó un portaobjetos con un corte de 1 cm<sup>2</sup> de PDA y algodón humedecido, éste se inoculó con los aislados fúngicos y se colocó un cubreobjetos encima. A continuación se incubaron durante 48h a temperatura ambiente. Posteriormente los microcultivos de los aislados se observaron al microscopio óptico a 10× y 40× de aumento para identificar las estructuras de

reproducción (Conidióforos) y clasificarlos de acuerdo con las claves morfológicas de Humber (1997) y Cañedo y Ames (2004) dentro géneros de hongos entomopatógenos reportados.

### **6.2.3 Cultivos monospóricos y conservación de cepas**

Se procedió a realizar cultivos monospóricos de cada aislado de la siguiente manera: se tomaron asadas de micelio esporulado de los aislados fúngicos y se suspendieron en tubos de 1.5 mL conteniendo 1 mL de solución Tween 80 al 0.1%. De estas suspensiones, se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer para conocer la concentración (esporas/mL), después se realizaron diluciones seriadas [1:10] para ajustar las concentraciones a menos de 50 esporas/mL. Una vez ajustadas las concentraciones se sembraron en placas de Petri con PDA y se extendieron en superficie con una varilla de vidrio en forma de “L”. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y diariamente se revisaron hasta observar crecimiento fúngico. Una vez visible una colonia, se realizó el trasplante a una nueva placa con PDA y se incubaron durante 14 días a temperatura ambiente. Cada colonia fúngica proviene de una sola espora.

De los cultivos anteriores se realizó la conservación de aislados fúngicos, en las periferias de las colonias se realizaron cortes circulares de aproximadamente 1cm de diámetro, se colocaron en viales criogénicos con 1.0 mL de glicerol al 10% y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta ser utilizados en experimentos posteriores.

## **6.3 Identificación molecular de los aislados**

### **6.3.1 Activación**

Los viales criogénicos conteniendo los aislados se descongelaron a temperatura ambiente en un tiempo aproximado de 30-60 minutos; posteriormente se inocularon en forma de estría en PDA y se dejaron incubar a una temperatura ambiente por 14 días.

### **6.3.2 Extracción de ADN**

Para la identificación molecular de los aislados se realizó la extracción de ADN genómico a partir del protocolo de Raeder y Broda (1985). El cual a continuación se describe brevemente, en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, se añadieron 500µl de buffer de extracción (200mM de Tris-HCl pH 8.5, 250mM NaCl, 25mM de EDTA, 0.5% SDS) junto con la biomasa fúngica colectada a partir del cultivo activado en PDA.

La biomasa se maceró con un pistilo estéril durante 3 min, la muestra se homogenizó en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se agregaron 500µl de Cloroformo-Octanol (24:1) frío y se mezclaron en vortex a velocidad máxima por 5 min. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5mL. Para precipitar el DNA se adicionaron 500µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó durante 30 min a -20°C, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante por decantación y se añadieron 500µl de etanol frío al 70%, se mezcló suavemente por inversión para lavar la pastilla de DNA. Finalmente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante por decantación y se dejó secar la pastilla manteniendo el tubo invertido en la campana. La pastilla de DNA se resuspendió en 50µl de TE 1X y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.3.3 Amplificación de las secuencias de los transcriptos internos (ITS)**

La región ITS (secuencias internas espaciadoras de transcritos) es ahora las más secuenciada para la identificación de hongos. Ha sido utilizada en la sistemática molecular a nivel de especie, e incluso dentro de las especies (para identificar razas geográficas). Es por ello que se eligió esta técnica para la identificación molecular de los aislados.

Una vez obtenido el ADN genómico se prepararon los tubos de reacción para la amplificación de la región ITS (Tabla 2). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando

los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3').

**Tabla 2.** Reactivos de reacción de amplificación de la región ITS.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer 10X	2.50	1.00 X
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75	1.50 mM
ITS 1 5uM	1.00	0.20 uM
ITS 4 5uM	1.00	0.20 uM
dNTP's 10mM	0.20	0.08 mM
Taq 5U/ul	0.20	0.04 U/ul
H <sub>2</sub> O mQ	17.85	
BSA 0.5	0.50	0.01 mg/mL
gDNA	1.00	
Final	25.00	

Posteriormente cada uno de los tubos se colocó en el Termociclador, y se amplificaron bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones de amplificación de reacción de secuenciación

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
<b>1</b>	96	1:00
	96	0:10
<b>25</b>	55	0:05
	62	4:00
<b>1</b>	6	5:00

### 6.3.4 Secuenciación de segmentos ITS

Una vez obtenidos los productos de PCR, se purificaron usando el kit de extracción QIAquick (Qiagen), luego se enviaron a Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL) para su secuenciación.

Las secuencias ITS aisladas se sometieron a una herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) para identificar secuencias similares depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Finalmente, se construyó un árbol filogenético con las regiones ITS de los aislados fúngicos y de secuencias ITS de referencia con mayor similitud (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cepas de hongos de referencias usadas en el análisis filogenético.

<b>Especie</b>	<b>Aislado/cepa</b>	<b>Fuente del aislado</b>	<b>País de origen</b>	<b>Número de acceso al GenBank</b>
<i>Beauveria bassiana</i>	SASRI BB444	<i>Galleria mellonella</i> en suelo	Sudafrica	JX110368
<i>Beauveria bassiana</i>	CCTCC M 2017045	No especificado	China	KY640637
<i>Beauveria bassiana</i>	IIFT-B10	No especificado	Cuba	KT310220
<i>Isaria fumosorosea</i>	SKCH-1	Suelo urbano	Corea del sur	FJ765017
<i>Aspergillus alliaceus</i>	NRRL 315	No especificado	E.E.U.U.	NR121331

## 6.4 Obtención de extractos vegetales

### 6.4.1 Colecta del material vegetal

Se eligieron cinco plantas frutales u ornamentales para evaluar su actividad inhibitoria de fenoloxidasa (PO). Las plantas se colectaron en el área metropolitana de la ciudad de Monterrey durante los meses de marzo a agosto del año 2014. Para ello, se

colectó el follaje de las siguientes plantas: moral (*Morus alba*), zarzamora (*Rubus ulmifolius*), peral (*Pyrus communis*) y colorín (*Sophora secundiflora*); así como la cáscara de penca de sábila (*Aloe vera*).

Una vez colectado el material vegetal, cada muestra se desinfectó con NaClO al 0.1%, se incubó a 45°C durante 3-4 h para su deshidratación y se trituró en un vaso para licuadora estándar de 2 L hasta obtener un polvo fino.

#### **6.4.2 Extracción metanólica**

La extracción se adaptó de la metodología de Lee *et al.* (1997). En breve, a cada 50 g de muestra se le añadió 200 mL de metanol, se incubó en agitación rotatoria (250 rpm) durante 24 h a temperatura ambiente y se recuperó la fase metanólica por filtración con papel Whatman® No.1, esta etapa se realizó por triplicado. Después el solvente fue retirado completamente mediante evaporación en un Rotavapor. Finalmente, los extractos metanólicos fueron colocados en frascos ámbar de 50 mL de capacidad con gotero y almacenados a -20°C hasta su uso.

### **6.5 Actividad Fenoloxidasas (PO) en hemolinfa de *S. exigua***

#### **6.5.1 Extracción de hemolinfa**

Las larvas de *S. exigua* se adquirieron en el laboratorio L-11 del Instituto de Biotecnología, FCB-UANL. Para el ensayo enzimático se colectó la hemolinfa de larvas de *S. exigua* de tercer estadio de la siguiente manera: se colocaron larvas sobre una placa de Petri de vidrio mantenida en un baño de hielo con la finalidad de inducirles diapausa, posteriormente con una pinza entomológica estéril se sujetó cada larva, después se realizó una incisión con un bisturí en la parte ventral cercana al hemocele para extraer la hemolinfa, ésta se colectó en tubos de centrífuga de 1.5 mL y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

### **6.5.2 Ensayo enzimático de PO**

Se procedió a determinar la producción de melanina mediante la metodología de Kim et al. (2001) y Mahmoud et al. (2012). Para medir la actividad PO, se añadieron 2µl de laminarina (100 mg) a la hemolinfa colectada y se incubó a temperatura ambiente. Después de diez minutos, se añadieron 900 µl de sustrato a una concentración de 10 mM de L-3 ,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) en PBS. La absorbancia se midió a 490 nm cada 5 minutos durante una hora.

### **6.6 Inhibición de PO *in vitro***

Una vez determinada la actividad PO en la hemolinfa de larvas de *S. exigua*, se procedió a medir el porcentaje de inhibición generado por cada uno de los extractos metanólicos. Se repitió el protocolo descrito previamente en el apartado 6.5.2 añadiendo cada uno de los extractos metanólicos. La actividad determinada en ese apartado se consideró como control (100% de actividad).

El porcentaje de inhibición de melanogénesis se determinó de acuerdo a la fórmula de Baurín et al. (2002) (1):

$$(1) \% \text{ inhibición de PO} = [(\text{abs control} - \text{abs extracto}) / \text{abs control}] * 100$$

Al final se seleccionaron los dos extractos que presentaron mayor inhibición de melanogénesis para los ensayos posteriores de sinergia.

### **6.7 Bioensayos contra larvas de *S. exigua***

Para evaluar la actividad biológica de los aislados fúngicos contra *S. exigua* se realizaron bioensayos de la siguiente manera:



### **6.7.1 Preparación de la suspensión de conidios**

Para el bioensayo se utilizaron conidios de los aislados almacenados (glicerol al 10% a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), los cuales se descongelaron a temperatura ambiente en un tiempo aproximado de 30-60 minutos; posteriormente se inocularon en PDA y se incubaron a una temperatura ambiente por 14 días. Después del tiempo de incubación, a cada placa de Petri con crecimiento abundante se le realizó un raspado superficial con un asa bacteriológica para desprender los conidios aéreos, éstos se transfirieron tubos de microcentrífuga de 1.5 mL conteniendo Tween 80 al 0.1 %. Las suspensiones se ajustaron a concentraciones de  $1 \times 10^8$  conidios/mL para la determinación del tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) y de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  conidios/mL para estimar las concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ).

### **6.7.2 Preparación de alimento para larvas de *S. exigua***

Como alimento se utilizó lechuga fresca (*Lactuca sativa* L.) adquirida en un mercado del área metropolitana. Las hojas de lechuga se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 0.05% durante 20 minutos y se enjuagaron con agua bidestilada estéril, luego se cortaron en trozos pequeños (4 cm de diámetro aproximadamente) y se colocaron en placas de Petri para su uso posterior.

### **6.7.3 Ensayos con larvas de *S. exigua***

Las larvas de *S. exigua* de segundo estadio se sumergieron dentro de la suspensión de conidios durante 5 segundos, se les eliminó el exceso de humedad con papel secante y se colocaron en placas de Petri con hojas de lechuga (diez larvas por suspensión). Las placas se sellaron con Vitafilm®, se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$ , 80% de H.R. durante 5 días. Durante el bioensayo, diariamente se observó la mortalidad y se reemplazaron las hojas de lechuga. Se realizaron 3 repeticiones de cada uno de los tratamientos. Se usó la cepa GHA de *Beauveria bassiana* como referencia y la suspensión Tween 80 al 0.1 % como control, además de un testigo absoluto solo con larvas.

Finalmente se determinaron las CL<sub>50</sub> y la TL<sub>50</sub> mediante análisis de regresión probit y se seleccionaron 3 aislados para los ensayos de sinergia, el de mayor CL<sub>50</sub>, el de CL<sub>50</sub> intermedia y uno con una CL<sub>50</sub> baja.

#### **6.7.4 Ensayos de sinergia sobre *S. exigua*.**

Los extractos con mayor porcentaje de inhibición de PO se agregaron al alimento descrito en el apartado 6.7.2 de la siguiente manera: después de desinfectar las hojas de lechuga, se sumergieron en soluciones de los extractos al 10% v/v en agua bidestilada.

Las suspensiones de esporas de los aislados seleccionados se ajustaron a sus respectivas CL<sub>50</sub>. Los ensayos de sinergia se realizaron siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 6.7.3. Finalmente se evaluó el efecto de los extractos sobre la infección fúngica. Para ello, se determinó el coeficiente de co-toxicidad y el factor de sinergismo mediante las siguientes fórmulas respectivamente (2) y (3) respectivamente (Bhan et al. 2013):

$$(2) Cct=[A/B*100]-100$$

$$(3) Fs=A/B$$

Donde Cct = coeficiente de co-toxicidad, Fs = Factor de sinergismo, A= mortalidad de la suspensión fúngica sola y B= mortalidad de la suspensión más el inhibidor de (PO).

#### **6.8 Cromatografía de capa fina (TLC) de los extractos metanólicos**

Para confirmar la presencia de compuestos inhibidores de PO en los extractos vegetales se realizó una cromatografía de capa fina en placas de sílica.

### **6.8.1 Preparación de la placa de sílica**

Se enjuagó con metanol una placa de sílica gel 60 de 10 cm<sup>2</sup>, después se dejó secar por 24 h a temperatura ambiente y posteriormente se calentó a 120°C por 30 minutos para su activación.

### **6.8.2 Preparación de las muestras y cromatografía**

Se utilizó  $\alpha$ - arbutina (Sigma Aldrich®) como referencia, la cual se preparó diluyendo 60 mg en 10 mL de metanol. Además, se prepararon las muestras de los extractos colocando 50  $\mu$ l de cada uno en 500 $\mu$ l de metanol.

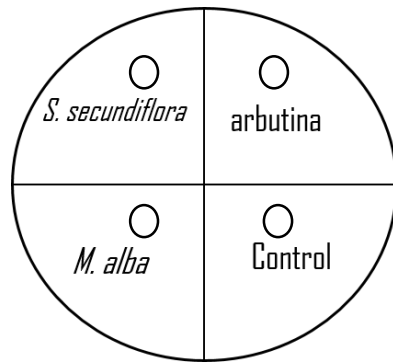
Se colocaron las muestras con un capilar sobre la placa de sílica a una altura de 1cm y con una separación entre ellas de igual distancia. Posteriormente se colocó la placa en 100 mL de la fase móvil que consistió en una mezcla de acetato de etilo – metanol – agua (40/4.5/5) dentro de un vaso de precipitado de 1L. Se dejó recorrer el eluente hasta 1 cm antes del final de la cromatoplaca, una vez terminada la cromatografía se dejó secar la placa para la evaporación del eluente. Las placas se revelaron en un transiluminador mediante radiación UV de 285 nm. Las manchas ubicadas a la misma altura que el control indica presencia de  $\alpha$ -arbutina.

### **6.9 Pruebas de antagonismo en el desarrollo fúngico**

Con la finalidad de incorporar los extractos de plantas a formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos, se realizaron pruebas de antagonismo sobre el crecimiento y germinación del aislado fúngico con el que mostraron sinergia, mediante un antibiograma y una posterior prueba de germinación.

### 6.9.1 Antibiograma

Las placas de Petri conteniendo PDA se dividieron en 4 cuadrantes, y en cada espacio se colocó un círculo de 5 mm de diámetro de papel filtro Whatman® No. 1 impregnado con los extractos (*S. secundiflora* y *M. alba*), la arbutina y un control (Tween 80 al 0.01%), como se muestra en la Figura 13. Después se inoculó por picadura el aislado sinergista alrededor de cada papel filtro, se dejó incubar durante 14 días a temperatura ambiente y se revisó el crecimiento micelial al concluir el tiempo de incubación.



**Figura 13.** Pruebas de antagonismo del aislado sinergista con los extractos *S. secundiflora* y *M. alba*.

### 6.9.2 Prueba de germinación

Para la prueba de germinación, se prepararon suspensiones del aislado sinergista en Tween 80 al 0.01% adicionado con los extractos al 10% v/v y arbutina a una concentración de 500 ppm. De cada suspensión fúngica se sembró una alícuota de 50  $\mu$ l en una gota de caldo papa dextrosa sobre un portaobjetos. Posteriormente se incubó en cámara húmeda durante 20 h a temperatura ambiente. Finalmente, en un microscopio óptico se realizó el conteo de esporas germinadas. Una spora germinada es aquella que posee un tubo germinativo más largo que su radio promedio. El porcentaje de germinación se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$(4) \% \text{ de germinación} = (\text{esporas germinadas} / \text{total de esporas}) * 100$$

## **6.10 Análisis de datos y estadísticos**

Para determinar el porcentaje de inhibición de los extractos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una posterior prueba de Dunnett con el programa SPSS® v.17. Al final se seleccionaron los dos extractos con mayor porcentaje de inhibición de PO.

En los ensayos de inhibición de melanogénesis, se realizó un ANOVA unidireccional y una prueba de Dunnett de una cola para comparar cada tratamiento con el control y determinar la diferencia significativa en los porcentajes de inhibición.

Las mortalidades en los bioensayos superiores al 20% en el control negativo, se ajustaron con la fórmula de Abbot (Abbot 1925). Los valores de la  $TL_{50}$  y  $CL_{50}$  se estimaron a través de un Análisis de Regresión Probit, posteriormente, se sometieron a un ANOVA unidireccional y a una prueba de Dunnett de dos colas para comparar con el control de referencia. El análisis de regresión de Probit y los ANOVA unidireccionales se llevaron a cabo en el programa estadístico SPSS® v.22.

En el análisis bioinformático, los alineamientos de las secuencias y la construcción del árbol de Máxima Verosimilitud se realizaron con el módulo Clustal W del software Mega 6®.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Muestreo de suelo

En el presente trabajo se colectaron 50 muestras de suelo de cultivos agrícolas provenientes de diez localidades de los municipios de Altamira y Aldama del sur del estado de Tamaulipas, como se muestra en la figura 12.

### 7.2 Aislamiento de hongos

Del total de muestras colectadas (50), el 40 % resultaron positivas a la presencia de hongos en general, es decir en 20 muestras hubo crecimiento fúngico. De éste porcentaje total de aislados se descartaron algunos patógenos oportunistas, por lo cual solo el 12% corresponde a hongos entomopatógenos (Tabla 5). Con respecto a las localidades muestreadas (10), el 70% resultó positiva por la presencia de hongos entomopatógenos concordando con trabajos como el de Esparza-Mora et al. (2016) que encontraron porcentajes de ocurrencia de hasta el 68% en suelos forestales de Brasil.

**Tabla 5.** Hongos aislados en suelo de cultivos agrícolas del sur de Tamaulipas.

Localidad	Muestras de suelo	Hongos totales		Hongos entomopatógenos	
		Aislados	Ocurrencia	Aislados	Ocurrencia
Los pepes	5	2	40	1	20
Corpus Christy	5	5	100	1	20
El catalán	5	1	20	1	20
Santa Rita	5	1	20	0	0
El alto	5	3	60	1	20
Tabla tirada	5	1	20	0	0
Maclovio Herrera	5	3	60	1	20
Benito Juárez	5	1	20	1	20
El Chamizal	5	2	40	1	20
Mata del blanco	5	1	20	0	0
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>7</b>	<b>12</b>

Ocurrencia se expresa en porcentaje.

En trabajos previos de aislamiento de hongos entomopatógenos en la década de los noventa, se reportaron ocurrencias considerablemente bajas de hongos aislados a partir de suelo, por ejemplo Tarasco et al. (1997), reportaron 14.9% de ocurrencia en suelos del sur de Italia, Chandler et al. (1997) 17.5% en suelos del Reino Unido, y Vanninen (1996) 38.6% en suelos de Finlandia. Sin embargo, en trabajos más recientes otros autores como Pérez-González et al. (2014) reportaron ocurrencias más altas en suelos de México (91%), además de Muñoz-Reyes et al. (2014) quienes reportaron un 100% de ocurrencia en suelos del centro de México, por otra parte, Kolczarek (2015) reporta un 100% en suelos en Polonia aunque cabe mencionar, que en este trabajo se utilizó otro método de aislamiento de hongos. El incremento en los aislamientos puede deberse al uso cada vez más común y extendido de hongos entomopatógenos como bioinsecticida en los suelos agrícolas hoy en día.

El método del insecto trampa con larvas de *Galleria mellonella* fue elegido en este estudio, ya que representa un método muy sensible para la detección de hongos entomopatógenos a partir de muestras de suelo (Keller et al. 2003; Meyling y Eilenberg 2006). Sin embargo, ocasionalmente algunos hongos no entomopatógenos podrían aislarse como patógenos oportunistas y colonizadores secundarios (Sun y Liu 2008), por lo cual se recomienda realizar una prueba de patogenicidad complementaria para confirmar que los aislados realmente sean entomopatógenos.

Inicialmente se obtuvieron veinte aislados, sin embargo, después de la prueba de patogenicidad solo siete aislados presentaron características de hongos entomopatógenos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Géneros de hongos encontrados en suelos de cultivos agrícolas del sur de Tamaulipas.

Localidad	Hongos entomopatógenos		Hongos oportunistas			
	<i>Beauveria</i>	<i>Isaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>	Otros
Los pepes	0	1	0	0	0	1
Corpus Christy	1	0	2	2	0	0
El catalán	1	0	0	0	0	0
Santa Rita	0	0	1	0	0	0
El alto	0	1	1	0	1	0
Tabla tirada	0	0	0	1	0	0
Maclovio Herrera	0	1	0	0	0	2
Benito Juárez	1	0	0	0	0	0
El Chamizal	0	0	1*	0	0	1
Mata del blanco	0	0	0	0	0	1

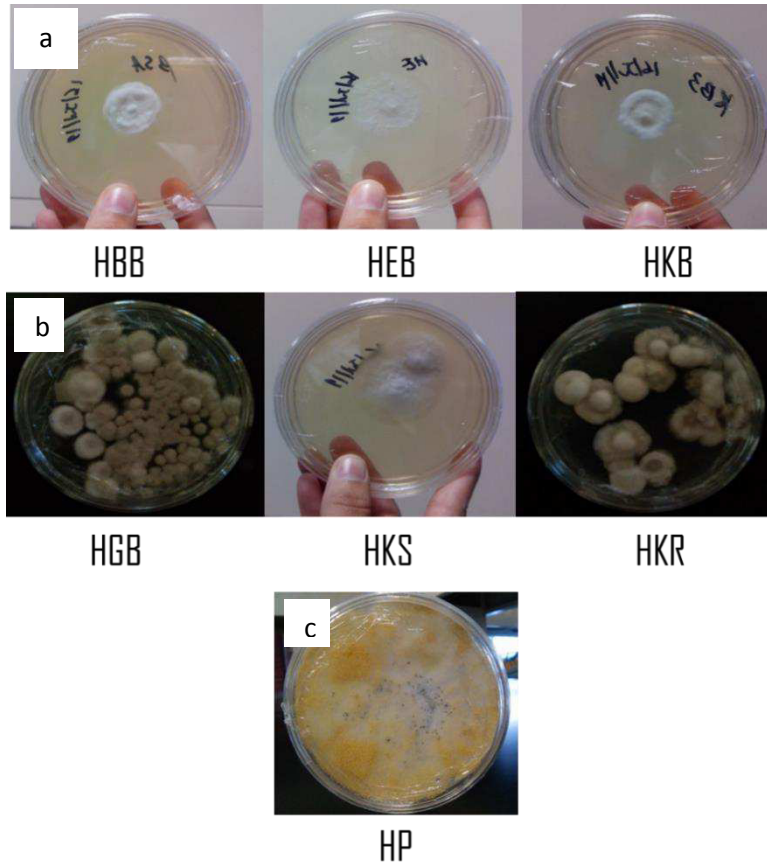
\* Características de entomopatógeno. Otros: géneros no identificados. 0: ausencia de hongo

### 7.3 Identificación morfológica de hongos entomopatógenos

La identificación de los hongos entomopatógenos aislados se realizó mediante las claves taxonómicas de Humber (1997) y Cañedo y Ames (2004), tomando como base sus estructuras de reproducción, que en este caso fueron los conidióforos. En el presente estudio se obtuvieron tres aislados identificados morfológicamente como *Beauveria bassiana*, tres aislados más como *Isaria fumosorosea* y un aislado del género *Aspergillus* (Tabla 6).

A los diferentes aislados de hongos entomopatógenos se les asignó una clave para su identificación y análisis posteriores, como se muestra en la figura 14. Para el género *Beauveria* (HBB, HEB y HKB), género *Isaria* (HGB, HKS y HKR) y género *Aspergillus* (clave HP). La presencia del hongo *Nomurea rileyi* era prevista en este estudio, ya que existen reportes en trabajos previos que lo colocan como un agente causante de la epizootia natural hacia los insectos del género *Spodoptera* en México (Garza y Terán, 2007; Ruiz-Najera et al. 2013), sin embargo, en el presente estudio se mostró ausente. En la Figura 15 se observa la morfología microscópica de los hongos entomopatógenos aislados.





**Figura 14.** Morfología colonial de los generos aislados de a) *Beauveria bassiana*, b) *Isaria fumosorosea* y c) *Aspergillus sp.*



**Figura 15.** Microfotografía que muestran los conidióforos de: a) *B. bassiana*, b) *I. fumosorosea* y c) *Aspergillus sp.*

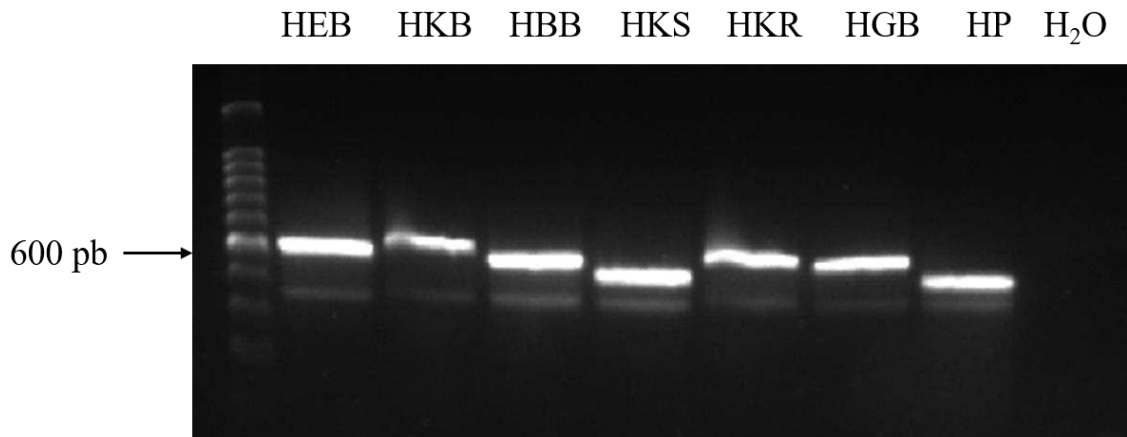
Estos géneros de hongos entomopatógenos han sido encontrados en suelos bajo diversos cultivos (Bidochka et al. 1998; Lezama-Gutiérrez et al. 2001). En México,

(Lezama-Gutierrez et al. 2001) aislaron a partir de muestras de suelo de diferentes estados del país, las siguientes especies: *M. anisopliae* en Colima y Jalisco, *B. bassiana* en Colima, Michoacán y Jalisco, y *I. fumosoroseus* en Colima, las cuales mostraron patogenicidad hacia *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae).

La ocurrencia de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* concuerda con trabajos previos realizados en México. Se han aislado hongos pertenecientes al género *Beauveria* en Saltillo, Coahuila, México (Sánchez-Peña et al. 2011), en los estados de Veracruz y Michoacán (Molina-Ochoa et al. 2003), además, hongos pertenecientes a los géneros *Isaria* y *Beauveria* se han aislado en estados citrícolas (Galán-Franco et al. 2011).

#### 7.4 Identificación molecular de los aislados

La amplificación de las secuencias ITS del ADN genómico fue realizado mediante PCR a partir de los aislados de *Beauveria bassiana* (HBB, HEB y HKB), *Isaria fumosorosea* (HGB, HKS y HKR) y *Aspergillus* sp. (HP) generaron fragmentos de aproximadamente 600 pares de bases (pb) (Figura 16).

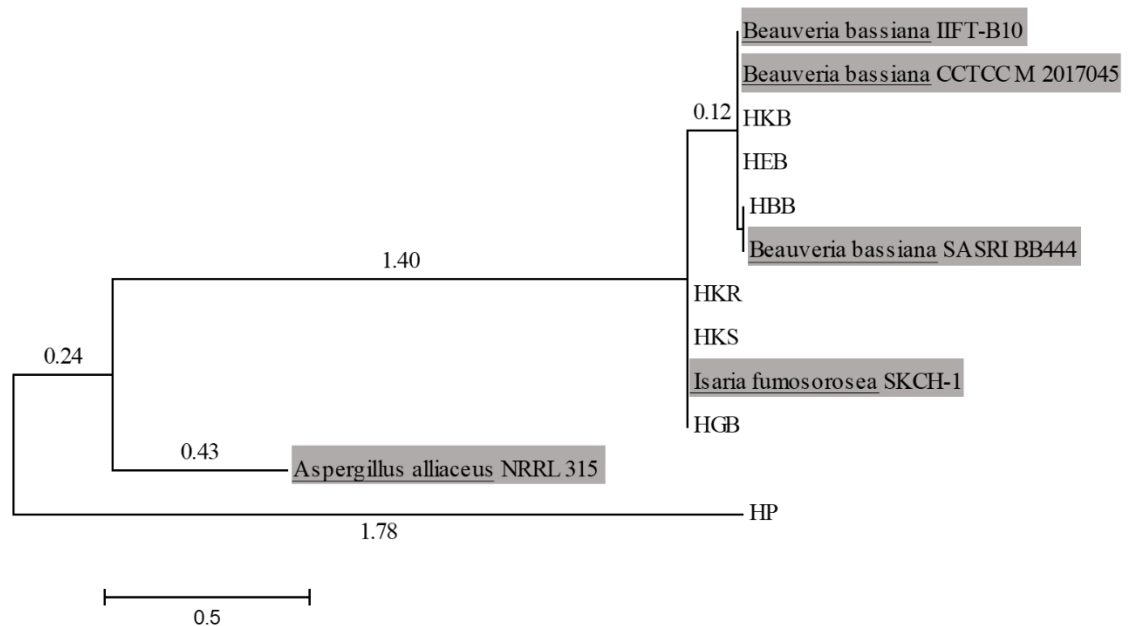


**Figura 16.** Productos de amplificación por PCR de los segmentos ITS de los aislados fúngicos.

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos ITS de cada uno de los aislados, estos fueron comparados y alineados con secuencias ITS depositadas en el

Genbank empleando la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Tool) en la página del NCBI.

Se encontró una identidad entre la cepa de referencia SKCH-1 de *I. fumosorosea* depositada en el GenBank y el aislado HKS del 98%, mientras que del 99% para los aislados HGB y HKR con la misma cepa. Por otra parte se encontró un 99% de identidad entre el aislado HEB y la cepa IIFT-B10 de *B. bassiana*, así mismo, entre el aislado HKB y la cepa CCTCC M 2017045 de *B. bassiana*, además se encontró un 100% de identidad entre el aislado HBB y el aislado SASRI BB444 de *B. bassiana*. Por último se encontró una identidad del 97% entre el aislado HP y el aislado de referencia NRRL 315 de *Aspergillus alliaceus*. La información de las cepas de referencia utilizadas se muestra en la Tabla 4. Se creó un árbol filogenético con las secuencias de los segmentos ITS de cada aislado fúngico además de las cepas de referencia (Figura 17).



**Figura 17.** Arbol filogenético construido a partir de las secuencias de los fragmentos ITS de los aislados fúngicos y de las secuencias de las cepas de referencia. Las secuencias resaltadas representan las secuencias de referencia.

## 7.5 Obtención de extractos vegetales

Una vez pulverizado el material vegetal, se procedió a determinar el rendimiento de extracción de cada uno de los extractos vegetales, obteniendo rendimientos desde 14.4% a 29.06% correspondientes a *R. ulmifolius* y *A. vera* respectivamente (Tabla 7), lo cual concuerda con estudios previos. Nirmal y Benjakul (2011) y Roby et al. (2013) que reportan rendimientos de extracción con metanol de aproximadamente 25.5% utilizando metodologías de extracción similares.

**Tabla 7.** Rendimiento de extracción de las diferentes plantas con metanol como solvente.

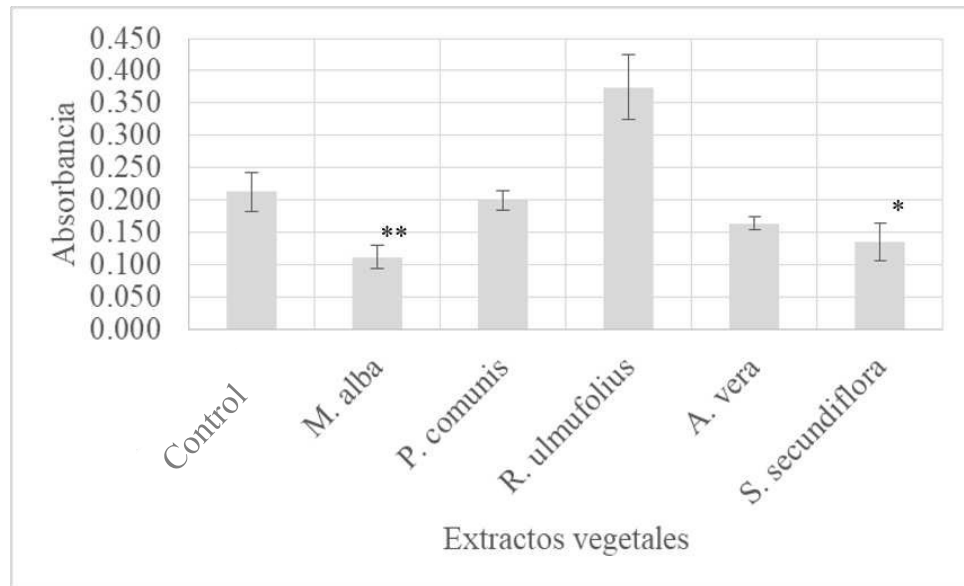
<b>Planta</b>	<b>Rendimiento(g de extracto/g material vegetal)</b>
<i>Morus alba</i>	15.77
<i>Aloe vera</i>	29.06
<i>Sophora secundiflora</i>	24.51
<i>Rubus ulmifolius</i>	14.40
<i>Pyrus communis</i>	24.21

## 7.6 Actividad Fenoxidasa (PO) en hemolinfa de *S. exigua* y su inhibición *in vitro*

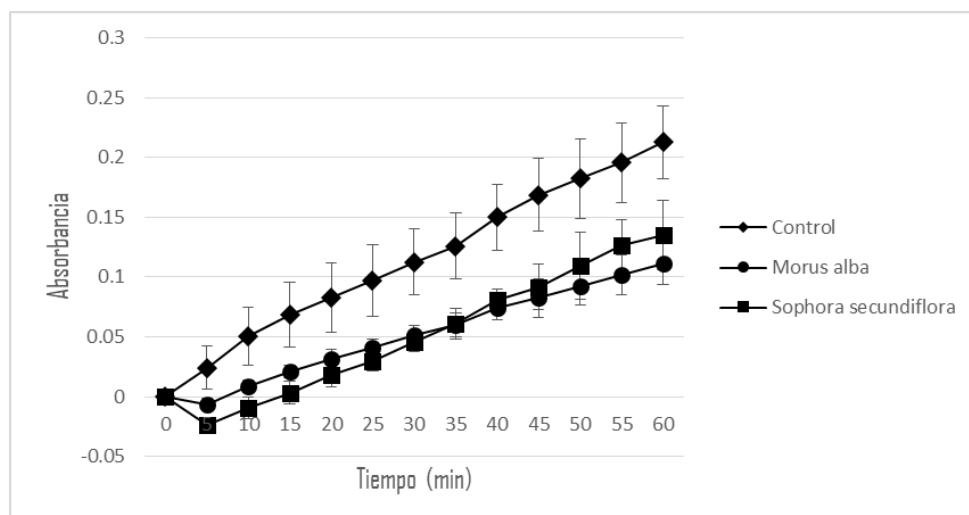
Durante una reacción enzimática el cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración del metabolito formado, por lo cual se tomó el cambio en la absorbancia de la reacción mencionada en el apartado 6.5.2 como control y se comparó con cada una de las reacciones con la presencia de extractos de plantas para determinar su porcentaje de inhibición. El cambio de absorbancia mostrado en la reacción de melanogénesis *in vitro* fue de  $0.213 \pm 0.03$ .

Una vez establecido el cambio de absorbancia en la reacción control del apartado 6.5.2 como control, de la misma manera se obtuvieron las absorbancias de cada reacción con la presencia de extractos y se calculó el porcentaje de inhibición (Figura 18). Los extractos que mostraron diferencia significativa con respecto al control fueron el extracto de *Morus alba* y el de *Sophora secundiflora*, en el caso de *M. alba* la inhibición de PO fue de un 47.49% representando la mayor inhibición, mientras que el extracto de *Sophora*

*secundiflora* mostró una inhibición del 36.52% (Figura 19). De acuerdo a varios autores como Baurin et al. (2002). El porcentaje de inhibición de *M. alba* presenta resultados superiores, de alrededor de 97%, mientras que Lee et al. (1997) lo reporta en 85%.



**Figura 18.** Absorbancia de las reacciones de inhibición de los diferentes extractos con respecto al control. \*diferencia significativa en prueba de Dunett ( $P < 0.05$ ). \*\* diferencia altamente significativa en prueba de Dunett ( $P < 0.01$ ).



**Figura 19.** Producción de melanina comparada entre el control y las reacciones con los inhibidores durante 1 h.

## 7.7 Bioensayos contra larvas de *S. exigua*

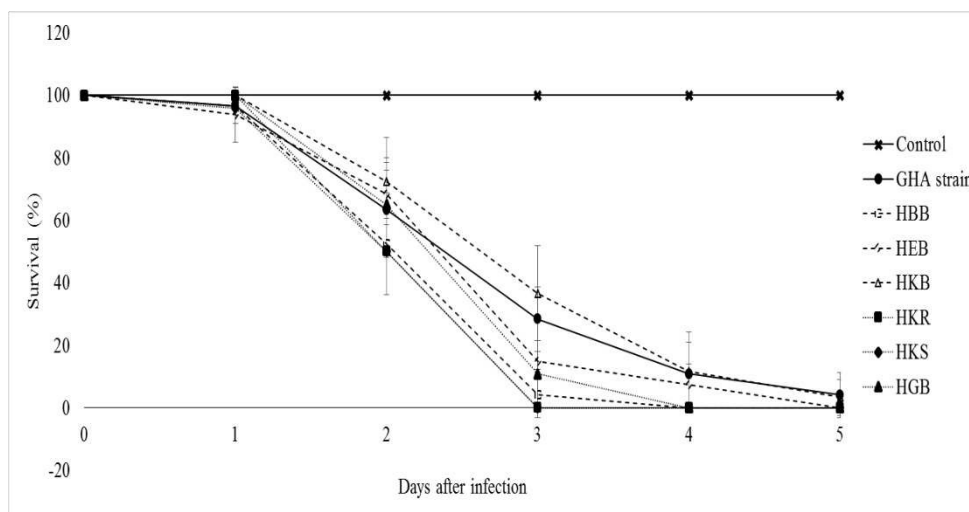
Los aislados de *I. fumosorosea* mostraron valores de  $CL_{50}$  de  $1,3 \times 10^6$ ,  $1,78 \times 10^6$  y  $5,17 \times 10^6$  conidios/ml pertenecientes a HKS, HKR y HGB respectivamente, mientras que los valores de  $CL_{50}$  de los aislados de *B. bassiana* fueron de  $2,76 \times 10^6$ ,  $6,92 \times 10^6$  y  $1,69 \times 10^7$  conidios/ml para HBB, HKB y HEB respectivamente, mientras que para el aislado de *A. alliaceus* la  $CL_{50}$  fue de  $2,1 \times 10^7$ . Del mismo modo, la  $CL_{50}$  de la cepa de referencia GHA fue de  $2,35 \times 10^7$  conidios/mL (Tabla 8). Solo el aislado de HKS mostró una diferencia significativa con respecto a la cepa GHA en la prueba de Dunnett de dos colas ( $P \leq 0.05$ ).

**Tabla 8.**  $CL_{50}$  de los aislados y la cepa de referencia GHA contra larvas de *S. exigua*.

Aislado/Cepa	$LC_{50}$ (conidios/ml)	$\chi^2$	P
GHA	$2.35 \times 10^7$	13.843	0.385
HEB	$1.69 \times 10^7$	43.049	0.000
HBB	$2.76 \times 10^6$	9.571	0.729
HKB	$6.92 \times 10^6$	30.579	0.004
HKS*	$1.29 \times 10^6$	7.503	0.874
HKR	$1.78 \times 10^6$	30.474	0.004
HGB	$5.17 \times 10^6$	25.188	0.022

\* Significativamente diferente de acuerdo a la prueba de Dunnett ( $P < 0.05$ )

En términos de tiempo, los valores de  $TL_{50}$  se estimaron en un rango entre  $1.95 \pm 0.08$  y  $2.75 \pm 0.33$  días para los aislados HKS y HKB respectivamente, estos aislados fueron significativamente diferentes del control de referencia ( $2.53 \pm 0.15$  días) según la prueba de Dunnett de dos colas ( $P \leq 0.05$ ). La tasa de supervivencia de larvas de *S. exigua* se muestra en la Figura 20.



**Figura 20.** Tiempo de sobrevivencia de larvas de *Spodoptera exigua* infectadas por los distintos aislados y la cepa de referencia GHA a una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/ml. Los  $TL_{50}$  estimados fueron: GHA,  $2.53 \pm 0.15$  días; HBB,  $2.02 \pm 0.14$  días; HEB,  $2.36 \pm 0.17$  días; HKB,  $2.75 \pm 0.33$  días; HKR,  $2.0 \pm 0.0$  días; HKS,  $1.95 \pm 0.08$ ; y HGB  $2.27 \pm 0.14$ . Las barras de error representan la desviación estandar.

Los valores de  $TL_{50}$  y  $CL_{50}$  representan indicadores de virulencia fúngica, por ende, son parámetros que nos indican la eficiencia en el control de insectos. En el caso de la  $CL_{50}$  de la cepa GHA, Wraight et al. (2010) reportaron una  $CL_{50}$  de 67 conidios viables/ $mm^2$  correspondientes a  $6.7 \times 10^6$  conidios viables/ml contra larvas de *Spodoptera exigua*. En el presente trabajo solo el aislado de *I. fumosorosea* HKS mostró un valor significativamente menor que la cepa de referencia ( $1.3 \times 10^6$ ).

Respecto a los valores  $TL_{50}$  de la cepa GHA, Legaspi et al. (2000) reportaron  $3.3 \pm 0.16$  días contra un insecto lepidóptero (*Eoreuma loftini*), mientras que en el presente trabajo el  $TL_{50}$  de GHA fue de  $2.53 \pm 0.15$  días, y el aislamiento de la *I. fumosorosea* HKS presentó solamente un valor significativamente menor que la cepa de referencia ( $1.95 \pm 0.08$  días). Además, HKS posee mejores indicadores de virulencia que otros aislamientos o cepas de *I. fumosorosea* contra insectos del género *Spodoptera*, por ejemplo, Asi et al. (2013) reportaron una  $CL_{50}$  de  $2.17 \times 10^7$  conidios / ml para una cepa de *I. fumosorosea* y un  $TL_{50}$  de 8 días contra larvas del tercer estadio de *Spodoptera litura*.

Finalmente se eligieron los aislados HKS con una  $CL_{50}$  baja, el aislado HKB con una  $CL_{50}$  media y HP con una  $CL_{50}$  alta, para los ensayos de sinergia con los extractos de *M. alba* y *S. secundiflora*.

### **7.8 Bioensayos de sinergia**

En los bioensayos de sinergia se determinaron el Coeficiente de co-toxicidad (Cct) y el factor de sinergia (Fs). Además de los extractos seleccionados se realizó el ensayo con  $\alpha$ -arbutina (Sigma-aldrich®). Con respecto a la interpretación de los resultados, se considera que cuando el Fs tiene valor mayor que 1, el efecto de la combinación de bioactivos provoca un sinergismo entre ellos, mientras que, si el valor de Fs es menor de 1, el efecto la combinación de ellos provoca un efecto antagonico. Por otro lado, con respecto al Cct, se seleccionaron las combinaciones de bioactivos que presentaron valores de Cct mayores de 20.

El extracto de *M. alba* presentó un efecto potenciador solo con el aislado HKS con un valor de Fs mayor de 1 (1.29) y un Cct de 28.9, así mismo ocurrió con el extracto de *S. secundiflora*, que solo mostró un efecto potenciador con el mismo aislado HKS con un FS mayor que 1 (1.77) y un Cct de 77.63, mientras que la arbutina no mostró efecto potenciador relevante con ninguno de los aislados (Tabla 9).



**Tabla 9.** Biensayos de sinergia de los extractos de *M.alba*, *S. secundiflora* y Arbutina con los aislados seleccionados.

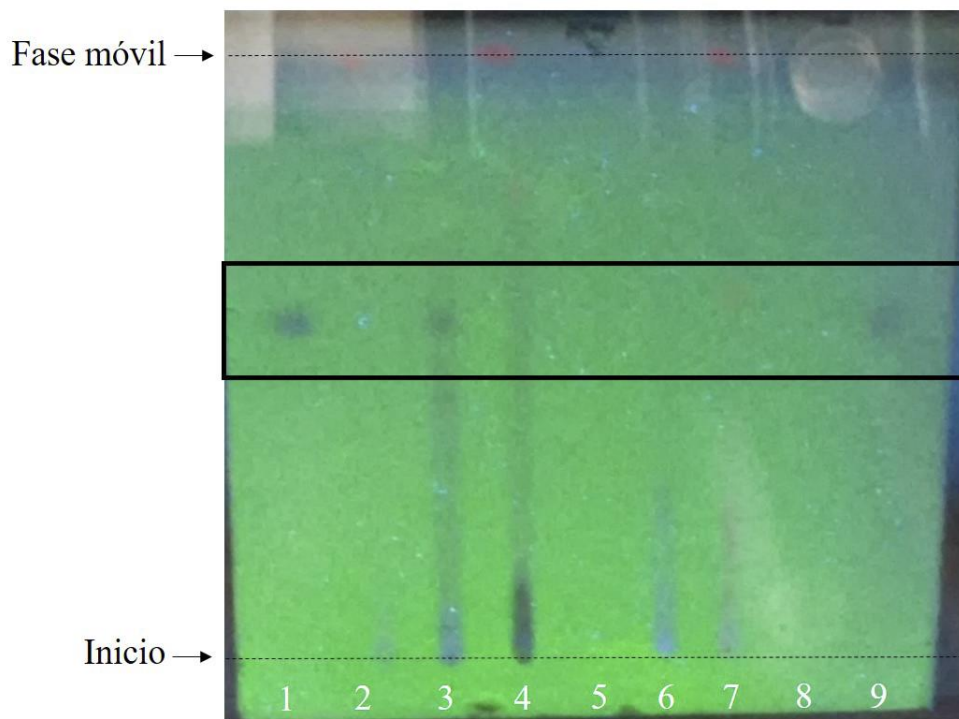
<b>Aislados</b>	<b>HKS</b>	<b>HKB</b>	<b>HP</b>
% Mortalidad	28.14	52.96	49.63
% Mortalidad + <i>M. alba</i>	36.29	55.92	50.37
% Mortalidad + <i>S. secundiflora</i>	50	53.33	32.55
% Mortalidad + arbutina	29.6	59.5	37.6
Cct <i>M. alba</i>	<b>28.95*</b>	5.59	1.49
Cct <i>S. secundiflora</i>	<b>77.63*</b>	0.70	-34.33
Cct arbutina	5.16	11.59	-24.24
Fs <i>M. alba</i>	1.29	1.06	1.01
Fs <i>S. secundiflora</i>	1.78	1.01	0.66
Fs. arbutina	1.05	1.12	0.76

Cct: coeficiente de co-toxicidad. Fs: Factores de sinergia.

### 7.9 Cromatografía de capa fina de los extractos metanólicos

Para determinar si la inhibición de la actividad fenoloxidasa es a causa de la presencia de arbutina o algún otro compuesto fenólico, se realizó una cromatografía de capa fina a cada uno de los extractos obtenidos (*M. alba*, *P. communis*, *S. secundiflora* y *A. vera*, *R. ulmifolius*). La cromatografía reveló que solamente las hojas de *P. communis* contienen arbutina, ya que mostraron un rf de 0.58 (Figura 21), esto concuerda con lo reportado por Pyka et al. (2007).

Por otra parte los otros extractos no presentaron arbutina. Por lo tanto, la actividad inhibitoria enzimática puede deberse a otros compuestos fenólicos presentes en las hojas, tales como la mulberrosida en los extractos de *M. alba*, (Kim et al. 2010) o la aloesina en extractos de *Aloe vera* (Jin et al. 1999), mientras que en el extracto de *S. secundiflora* no existen reportes sobre el compuesto que posee la actividad inhibidora.



**Figura 21.** Cromatograma mostrando presencia de arbutina. Línea 1 y 9 = arbutina. Línea 2 = *M. alba*, Línea 3 = *P. communis*, Línea 4 = *S. secundiflora*, Línea 6 = *A. vera*, Línea 7 = *R. ulmifolius*, Líneas 5 y 8 = Blancos.

### 7.10 Pruebas de antagonismo

Con la finalidad de estimar si tanto el extracto como el hongo pueden mezclarse en un formulado sin que ocasionen una inhibición de la germinación o del crecimiento fúngico, se realizó la prueba del antibiograma y la prueba de germinación. Se observó que en el antibiograma ninguno de los dos extractos (*M. alba* y *S. secundiflora*) ni la arbutina mostraron inhibición del crecimiento fúngico con el aislado HKS de *Isaria fumosorosea*, como se muestra en la figura 22.

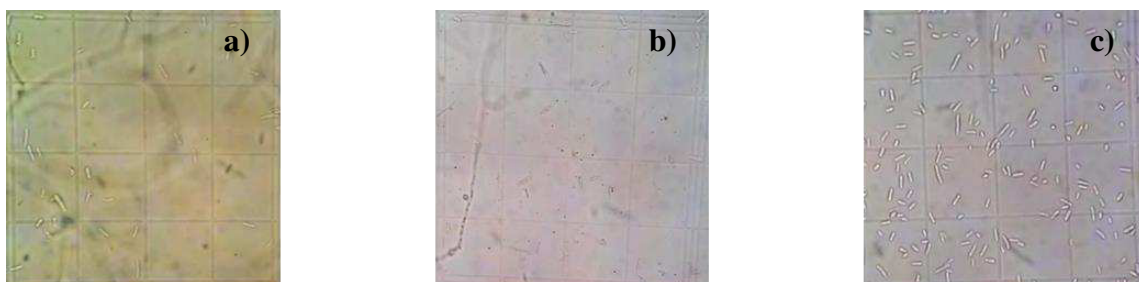


**Figura 22.** Antibiograma mostrando la ausencia de inhibición del crecimiento del aislado fúngico HKS de *Isaria fumosorosea*. De izquierda a derecha; Caja 1 *M. alba*, Caja 2 *S. secundiflora* y Caja 3 arbutina.

Finalmente, otro de los ensayos realizados fue la prueba de germinación, está con la finalidad de evaluar si los extractos obtenidos tienen una acción negativa contra los estadios de resistencia de la cepa HKS de *Isaria fumosoroseus*, no encontrándose una disminución del porcentaje de germinación de los tratamientos con los extractos obtenidos con respecto al tratamiento control (esporas del aislado HKS), como se puede apreciar en los datos e imágenes mostradas en la tabla 10 y la figura 23 respectivamente.

**Tabla 10.** Porcentaje de germinación de esporas del aislado HKS (*I. fumosorosea*) en presencia de extractos.

Extracto	Germinación (%)
<i>M. alba</i>	87.79±3.49
<i>S. secundiflora</i>	84.32±6.37
Control	77.75±4.40



**Figura 23.** Esporas germinadas de *Isaria fumosorosea* HKS en presencia y ausencia de a) *M. alba*, b) *S. secundiflora* y c) Control.

## 8. CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de hongos entomopatógenos en el 60% de los suelos agrícolas obtenidos del sur de Tamaulipas.
- Los hongos entomopatógenos aislados pertenecen a la especie *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, además de un aislado de *Aspergillus alliaceus*.
- El aislado HKS de *I. fumosorosea* presentó una CL<sub>50</sub> menor ( $1.29 \times 10^6$  esporas / ml) siendo el más eficiente en cuanto a la mortalidad causada en larvas de *S. exigua*.
- Se logró determinar la presencia de arbutina solo en el extracto de *P. communis*, sin embargo, no presentó inhibición de (PO) *in vitro*.
- Los extractos de *Morus alba* y *Sophora secundiflora* presentaron el mayor porcentaje de inhibición de (PO) en la hemolinfa de *S. exigua*.
- Los extractos de *S. secundiflora* y *M. alba* potenciaron la eficacia del aislado HKS de *I. fumosorosea* en los ensayos de sinergia, siendo HKS+*S. secundiflora* la más eficiente.
- Los extractos de *S. Secundiflora* y *M. alba* no presentaron antagonismo contra el aislado HKS de *I. fumosorosea* en el crecimiento en placa, ni en el proceso de germinación.

## 9. PERSPECTIVAS

- Continuar con los bioensayos de sinergia con diferentes concentraciones de extractos y esporas fúngicas, hasta obtener la concentración óptima de rendimiento.
- Realizar mas estudios “in situ” acerca del proceso de inhibición de melanogenesis durante infecciones fúngicas sobre insectos.
- Realizar análisis de costo beneficio de la adición de extractos a formulaciones de insecticidas a base de esporas de hongos entomopatógenos.
- Realizar estudios biológicos y edaficos acerca del uso de los extractos en formulados en campo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology*, 18(2): 265-267.
- Amaldoss G, Hsue NC. 1989. The biology and the reproductive morphology of beet army worm *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Chinese Journal of Entomology*, 9: 239-250.
- Arbolapp. 2017. <http://www.arbolapp.es/especies/ficha/morus-alba/>. Revisado el 15 de octubre de 2017.
- Asi M, Bashir M, Afzal M, Zia K, Akram M. 2013. Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Animal & Plant Sciences*. 23(3): 913-918.
- Badii M, Abreu J. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. *International Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89.
- Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do Q, Bernard P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 82: 155-158.
- Barnet H, Hunter B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Third edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota.
- Belda J, Justicia L, Pascual F, Cabello T. 1994. Distribución espacial de *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivo de pimiento en invernadero. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*. 20: 287-301.
- Bernard CB, Philogène BJ. 1993. Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 38(2): 199-223.
- Bhan S, Shrankhla LM, Srivastava CN. 2013. Larvicidal toxicity of Temephos and entomopathogenic fungus, *Aspergillus flavus* and their synergistic activity against malaria vector, *Anopheles stephensi*. *J Entomol Zool Stu*, 1(6): 55-60.
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Roberts DW. 1997. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129(S171), 213-224.

- Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metharizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.* (76):1198-1204.
- Bing-Da S, Xing-Zhong L. 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied soil ecology.* 39: 100-108.
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101(4): 512–530.
- Bohm-falk G, Friseie W, Sterling R, Melterm R, Kutson A. 1982. Identification Biology and Sampling of cotton insects. *Bull.* 933. pp. 31-32
- Boucias DG, Pendland JC. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals* (pp. 101-127). Springer US.
- Boucias DR, Pendland JC. 1998. Entomopathogenic fungi; Fungi Imperfect. In: Boucias DR, Pendland JC, editors. *Principles of Insect Pathology*, 10:321-359. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Brown ES, Dewhurst CF. 1975. The genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Africa and the Near East. *Bulletin of Entomology Research.* 65: 221-262.
- Brunet P. 1980. The metabolism of aromatic amino acids concerned in the crosslinking of insect cuticle. *Insect Biochem.* 10: 467-500.
- Bustillo A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: *seminario Uso de entomopatógenos en Colombia.* Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. pp: 30-53.
- Cantone F, Vandenberg J. 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Research* 102 (2) 209-215.
- Cañedo V, Ames T. 2004. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos.* Centro Internacional de la Papa (CIP) [International Potato Center]. Lima, Perú.
- Chandler D, Hay D, Reid AP. 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Applied Soil Ecology,* 5(2): 133-141.
- Charleston D, Kfir R, Dicke M, Vet L. 2005. Impact of botanical extracts derives from *Melia azedarach* and *azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth. *Biological Control.* 33: 131-142.

- Charleston D, Kfir R, Dicke M, Vet L. 2006. Impact of botanical extracts derives from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella xilostella* and its natural enemies: A field test of laboratory findings. *Biological Control*. 39: 105-114.
- Charnley AK. 1992. Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer. C.J. C. Prior (eds.). *Biological control of locusts and grasshoppers*. Melkshan. UK: CAB International. pp: 191–190.
- Charnley A. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *AdvBotRes*. 40: 241–321.
- Charnley A, Collins S. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In Kubicek CP, Druzhinina IS. *The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. 4: 373
- Cho JY, Park KY, Lee KH, Lee HJ, Lee SH, Cho JA, Moon JH. 2011. Recovery of arbutin in high purity from fruit peels of pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Food Science and Biotechnology*, 20(3): 801-807.
- Christensen B, Li J, Chen C, Nappi A. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*. 21(4): 192-199.
- Cloyd RA. (1999). "The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*". *Midwest Biological Control News* VI (7).
- De Bach V. 1964. *Biological Control of Insects Pests and Weeds*. Chapman and Hall: London, pp. 844.
- De Luna-Santillana E. 2014. Desarrollo y Evaluación de bioinsecticidas microencapsulados a partir de *Bacillus thuringiensis* y Neem para el control del gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. 128pp.
- Esparza-Mora MA, Costa-Rouws JR, Fraga ME. 2016. Occurrence of entomopathogenic fungi in Atlantic forest soils. *Microbiology Discovery*, 4(1): 1.
- Eubanks MD, Hoffmann JH, Lewis EE, Liu J, Melnick R, Michaud JP, Ode P, Pell JK. 2017. *Biological control*.



- Fan X, Hominick WM. 1991. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic Rhabditids (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from sand and soil. *Nematology*. 14: 381-387.
- Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ, Pei Y. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 295–302.
- Faria MR, Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43:237–256.
- Ferron P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of Entomology of United States (23). USA: Annual Reviews, pp: 409-442.
- Freimoser F, Screen S, Bagga S, Hu G, St. Leger R. 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*. 149: 1-9.
- French R. 1969. Migration of *Laphygma exigua* Hubner (Lepidoptera: Nuctidae) to British Isles in relation to large-scale weather systems. *J. Anim. Ecol.* 38: 199-210.
- Galán-Franco LA, Morales-Loredo A, Alvarez-Ojeda G, López-Arroyo JI, Arévalo-Niño K, Sandoval-Coronado C, Quintero-Zapata I. 2011. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of México. *Southwestern Entomologist*. 36(4): 443-449.
- García F. 2000. Control Biológico de plagas: Manual Ilustrado. CORPOICA, Colombia.
- Garza E, Teran AP. 2007. El gusano soldado *Spodoptera exigua* y su manejo en la planicie huasteca (No. 632.63097244 G3G8).
- Gillespie J, Bailey A, Cobb B, Vilcinskis A. 2000. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch Insect Biochem Physiol*. 44: 49–68.
- González-Castillo M, Aguilar CN, Rodríguez-Herrera R. 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatogenos: retos y perspectivas. *Rev. Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8).
- Greathead DJ, Waage JK. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11: pp. 44.

- Hatting JL, Humber RA, Poprawski TJ, Miller RM. 1999. A survey of fungal pathogens of aphids from South Africa, with special reference to cereal aphids. *Biological Control*, 16(1): 1-12.
- Hillyer JF. 2016. Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 102-118.
- Hillyer JF, Strand MR. 2014. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Current opinion in insect science*, 3, 14-21.
- Humber RA. 1997. Fungi: Identification. In: Lacey L. (ed.), *Editorial Manual Of Techniques In Insect Pathology*. San Diego, California. Academic Press.
- Humber RA. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2: 151-187.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2017. [<http://www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=28#>] revisado el 10 de septiembre del 2017.
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as biocontrol agents*, 23-69.
- Jaronsky S. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol*. 55: 159-185.
- Jin YH, Lee SJ, Chung MH, Park JH, Park YI, Cho TH, Lee SK. 1999. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Archives of pharmacal research*, 22(3): 232.
- Keller S, Kessler P, Schweizer C. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 48(3): 307-319.
- Kim K, Park Y, Kim Y, Lee Y, 2001. Study on the inoculation augmentation of *Paecilomyces japonicus* to the silkworm, *Bombyx mori*, using dexamethasone. *Korean J. Appl. Entomol.* 40, 51 – 58
- Kim T, Kim Y. 2005. Overview of innate immunity in *Drosophila*. *J Biochem Mol Biol.* 38: 121–127.

- Kim JK, Kim M, Cho SG, Kim MK, Kim SW, Lim YH 2010. Biotransformation of mulberroside A from *Morus alba* results in enhancement of tyrosinase inhibition. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(6): 631-637.
- Kitao K, Sekine II. 1994. D-Ghtcosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of  $\alpha$ -arbutin. *Biosci. Biotech. Biothem.*, 58,38-12.
- Kolczarek R. 2015. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from cultivated perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Ecological Engineering*, 16(1): 32-37.
- Kolodny-Hirsch DM, Sitchawat T, Jansiri T, Chenrchaivachirakul A, Ketunuti U. 1997. Field evaluation of a commercial formulation of the *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus for control of beet armyworm on vegetable crops in Thailand. *Biocontrol Science and Technology*, 7(4): 475-488.
- Kurosu J, Sato T, Yoshida K, Tsugane T, Shimura S, Kirimura K, Usami S. 2002. Enzymatic synthesis of  $\alpha$ -arbutin by  $\alpha$ -anomer-selective glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(3), 328-330.
- Lacey, L.A., Fransen, J.J., Carruthers, R., 1996. Global distribution of naturally occurring fungi of Bemisia, their biologies and use as biological control agents. In: Gerling, D., Mayer, R. (Eds.), *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, and Management*. Intercept, Andover, UK, pp. 401–433.
- Lacey L, Frutos R, Kaya H, Vails P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*. 21: 230-248.
- Lacey LA, Grzywacz D., Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, y Goettel MS. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of invertebrate pathology*, 132: 1-41.
- Lee k, Kim B, Kim J. 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science*. 19: 291-298.

- Legaspi JC, Poprawski TJ, Legaspi BC. 2000. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *Journal of Economic Entomology*, 93(1): 54-59.
- Lezama-Gutiérrez R, Hamm JJ, Molina-Ochoa J, López-Edwards M, Pescador-Rubio A, González-Ramírez M, Styer EL. 2001 Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist*. (84) 1:23-30.
- Li ZZ. 1988. List on the insect hosts of *Beauveria bassiana* . In: Study and application of entomogenous fungi in China, Vol. 1. Beijing: Academic Periodical Press. pp 241-255.
- Mahmoud A, De Luna-Santillana E, Guo X, Reyes-Villanueva F, Rodríguez Pérez M. 2012. Development of the braconid wasp *Cotesia flavipes* in two Crambids, *Diatraea saccharalis* and *Eoreuma loftini*: Evidence of host developmental disruption. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 15: 63-68.
- Mahy BWJ. 2004. Vector-borne diseases. In: Gillespie, S.H., Smith, G.L., Osbourn, A. (Eds.), *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases*. Cambridge University Press, Cambridge UK, pp. 1-18.
- Matskevich AA, Quintin J, Ferrandon D. 2010. The *Drosophila* PRR GGBP3 assembles effector complexes involved in antifungal defenses independently of its Toll-pathway activation function. *European journal of immunology*, 40(5): 1244-1254.
- Meyling NV, Eilenberg J. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113(1): 336-341.
- Molina-Ochoa J, Lezama-Gutierrez R, Gonzalez-Ramirez M, Lopez-Edwards M, Rodriguez-Vega MA, Arceo-Palacios F. 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Florida Entomologist*, 86(3): 244-253.
- Monzon A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. (63): 95-103.

- Moreno M. 2010. El eficaz sistema inmune de los insectos. Ciencia y desarrollo. CONACYT. En línea en [<http://www.cyd.conacyt.gob.mx/239/Articulos/SistemaInmuneInsectos/SistemaInmuneInsectos2.html>] consultado el 19 de agosto de 2015.
- Muñiz-Reyes E, Guzmán-Franco AW, Sánchez-Escudero J, Nieto-Angel R. 2014. Occurrence of entomopathogenic fungi in tejocote (*Crataegus mexicana*) orchard soils and their pathogenicity against *Rhagoletis pomonella*. Journal of applied microbiology, 117(5), 1450-1462.
- Napi A, Vass E. 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res.* 6:117-126.
- Nappi AJ, Christensen BM. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(5): 443-459.
- Nirmal NP, Benjakul S. 2011. Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4): 924-932.
- Nishimura T, Kometani T, Takii H, Terada Y, Okada S. 1994 Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* X-23 that glucosylates phenolic compounds such as hydroquinone. *J. Ferment. Bioeng*, 78,31-36.
- Obando-Rodríguez A, Blanco A, Blanco-Montero C. 1997. Confirm as a useful alternative for IPM against the beet armyworm in cotton in northern Mexico. In *Beltwide Cotton Conferences (USA)*.
- Oliver A, Chapin J. 1981. Biology and illustrated key for the identification of twenty species of economically important noctuid pest. Bull. No. 733. Louisiana. University and Agricultural Mechanical Collage. pp. 26.
- Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3): 357-374.
- Pennacchio, F., Strand, M.R., 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 233e258.
- Pérez-González VH, Guzmán-Franco AW, Alatorre-Rosas R, Hernández-López J, Hernández-López A, Carrillo-Benítez MG, Baverstock J. 2014. Specific diversity

- of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of invertebrate pathology*, 119: 54-61.
- Pimentel D, Acquay H, Biltonen M, Rice P, Silva M, Nelson J, Lipner V, Giordano S, Horowitz A, D'Amore M. 1992. Assessment of Environmental and economic costs of pesticide use. In: *The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics*. Pimentel and H. Lehman (eds). Chapman and Hall: New York, pp. 47-84.
- Porter J. 1973. Agostino Bassi bicentennial (1773-1973). *Bacteriolog Rev.* 37(3): 284-288.
- Polanczyk R, De Bortoli S, Placidi C. 2012. *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides against agricultural pests in Latin America. In Larramendi ML, Solonesky S. *Agricultural and biological sciences "Integrated pest management and pest control - current and future tactics"*. ISBN 978-953-51-0050-8.
- Pyka A, Bober K, Stolarczyk A. 2007. Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*Vaccinium vitis idaeae*). *Acta poloniae pharmaceutica*, 64(5): 395-400.
- Raeder U, Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1): 17-20.
- Repetto M, Sanz P. 1995. *Glosario de términos usados en toxicología. Recomendaciones de la IUPAC 1993. Versión española*. AET.
- Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, Khalel KI. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43: 827-831.
- Rosenheim JA, Kaya HK, Ehler LE, Marois JJ & Jaffee BA. 1995. Intraguild predation among biological-control agents: theory and evidence. *Biological control*, 5(3): 303-335.
- Ruiz-Corral JA, Sánchez-González JDJ, Hernández-Casillas JM, Willcox MC, Ramírez-Ojeda G, Ramírez-Díaz JL, González-Eguiarte DR. 2013. Identificación de razas mexicanas de maíz adaptadas a condiciones deficientes de humedad mediante datos biogeográficos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(6): 829-842.
- Ruiz-Nájera RE, Ruiz-Estudillo RA, Sánchez-Yáñez JM, Molina-Ochoa J, Skoda SR, Coutiño-Ruiz R, Pinto-Ruiz R, Guevara-Hernández F, Foster JE. 2013.

- Occurrence of entomopathogenic fungi and parasitic nematodes on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected in central Chiapas, México. Florida entomologist, 96(2), 498-503.
- Samson RA, Evans HP, Latgé JP. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. 187 p. Springer-Verlag, New York, USA.
- Sánchez-Peña SR, Lara JSJ, Medina RF. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. Journal of Insect Science, 11(1): 1.
- Shah PA, Pell JK. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied microbiology and biotechnology, 61(5-6): 413-423.
- Souad A, Gehan M. 2014. Efficacy of entomopathogenic nematodes and fungi as biological control agents against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Egyptian Journal of Biological Pest Control. 24(1): 247-253.
- St Leger RJ, Staples RC, Roberts DW. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. Journal of Invertebrate Pathology, 61(1): 81-84.
- St Leger RJ, Screen S. 2001. Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds. Fungi as Biocontrol Agents Progress: problems and potential, 219-238.
- Strand MR. 2008. The insect cellular immune response. Insect Sci. 15, 1-14.
- Sugumaran M. 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. Pigment Cell & Melanoma Research, 15(1): 2-9.
- Summy k, French J. 1988. Biological control of agricultural pest: Concepts every producer should understand. Journal of Rio Grande Valley Horticultural Society. 41: 119-133.
- Sun BD, Liu XZ. 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. Applied soil ecology, 39(1): 100-108.
- Tanada Y, Kaya H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. (USA). pp: 666.

- Téllez-Jurado A, Cruz-Ramírez MG, Mercado-Flores Y, Asaff-Torres A, Arana-Cuenca A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30: 73-80.
- Tarasco E, De Bievre C, Papierok B, Polisenio M, Triggiani O. 1997. Occurrence of entomopathogenic fungi in soils in Southern Italy. *Entomologica*, 31, 157-166.
- Vänninen I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, 100(1): 93-101.
- Vega FE, Kaya HK. 2012. *Insect pathology*. Academic Press.
- Volcy C, Pardo V. 1994. *Principios de Micología*. Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. pp:141.
- Wang TJ, An J, Chen XH, Deng QD, Yang L. 2014. Assessment of *Cuscuta chinensis* seeds' effect on melanogenesis: Comparison of water and ethanol fractions in vitro and in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, 154(1): 240-248.
- Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ y Galaini-Wraight S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17(3): 203-217.
- Wraight SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST, Vandenberg JD. 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of invertebrate pathology*, 103(3): 186-199.
- Woodrig JL, Kaya HK. 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid* nematodes: A handbook of biology and techniques. Fayetteville AR. USA, Arkansas experiment station, Southern Cooperatives Series Bull. No. 331. pp 28-32.
- Yassine H, Kamareddine L, Osta MA. 2012. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Plos Pathog*. 8(11): e1003029. doi:10.1371/journal.ppat.1003029.
- Zhu W, Gao J. 2008. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 13, 20–24; doi:10.1038/jidsymp.2008.8



- Zimmermann G. 1986. The “Galleria” bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*. 102: 213-215.
- Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6): 553-596.
- Zimmerman G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosa*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology, and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*. 18(9): 865-901.2

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Q.B.P. Ricardo Pérez Rodríguez  
Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

TESIS: EFECTO POTENCIADOR DE INHIBIDORES DE FENOLOXIDASAS (PO) EN LA INFECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE EL GUSANO SOLDADO *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

Campo de estudio: Biotecnología Agrícola

Datos Personales: Nacido en Tampico Tamaulipas, el 22 de diciembre de 1988, hijo de Ricardo Pérez García y Luz Elena Rodríguez Valadez.

Educación: Egresado de La Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2012 con tesis de investigación.

Experiencia Profesional: Supervisor de Calidad en “Alimentos San Mateo” de octubre de 2012 a abril de 2013 en la ciudad de Monterrey. Instructor de Taller dentro del programa “Mujeres en la ciencia” efectuado del 2 de septiembre al 27 de noviembre de 2015. Docente auxiliar de Enero de 2015 a Diciembre de 2016, impartiendo los temas de Diversidad microbiana y Estructura de las células microbianas dentro de la materia de Microbiología general, así como las prácticas de laboratorio de las materias de Biotecnología industrial y Fermentación en la Facultad de Ciencias biológicas de la U.A.N.L. Docente impartiendo el curso de “Biotecnología” para la carrera de “Biologo” en modalidad intersemestral en junio-julio de 2017. Docente en la Preparatoria No. 12 de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el periodo Agosto-Diciembre 2017.