

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROSPECCIÓN Y EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
ASOCIADOS A PUPARIOS DE *CERATITIS CAPITATA* EN COSTA RICA**

Tesis sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de Maestría
Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de
Cultivos

ROSSY MARCELA MORERA MONTOYA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

DEDICATORIA

A Dios, Aurora, Cochis y bb... ¡el amor todo lo puede!

No te rindas, aún estás a tiempo
De alcanzar y comenzar de nuevo,
Aceptar tus sombras,
Enterrar tus miedos,
Liberar el lastre,
Retomar el vuelo.
No te rindas que la vida es eso,
Continuar el viaje,
Perseguir tus sueños,
Destabar el tiempo,
Correr los escombros,
Y destapar el cielo.
No te rindas, por favor no cedas,
Aunque el frío queme,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se esconda,
Y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma
Aún hay vida en tus sueños.
Porque la vida es tuya y tuyo también el deseo
Porque lo has querido y porque te quiero
Porque existe el vino y el amor, es cierto.
Porque no hay heridas que no cure el tiempo.
Abrir las puertas,
Quitar los cerrojos,
Abandonar las murallas que te protegieron,
Vivir la vida y aceptar el reto,
Recuperar la risa,
Ensayar un canto,
Bajar la guardia y extender las manos
Desplegar las alas
E intentar de nuevo,
Celebrar la vida y retomar los cielos.
No te rindas, por favor no cedas,
Aunque el frío queme,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se ponga y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma,
Aún hay vida en tus sueños
Porque cada día es un comienzo nuevo,
Porque esta es la hora y el mejor momento.
Porque no estás solo, porque yo te quiero.

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Inicio agradeciendo a mi Dios, porque Él es mi fuerza, mi bastión, mi luz, el motor que me impulsa a levantarme cada vez que caigo, el que ha puesto en mi mente las ideas y la sabiduría necesaria para tomar decisiones, para hacer lo correcto, para luchar por alcanzar las metas que juntos nos proponemos en este camino llamado vida.

A Gustavo, por ser mi otra ala, por trabajar hombro a hombro, acompañarme en las buenas y malas, por ser más que mi esposo, mi amigo, mi confidente, mi apoyo, la mitad que todos los días lucha conmigo incesante e incondicionalmente. Gracias por enseñarme el significado de amar.

A mi Aurora, por todas las horas que le robé para lograr esta meta. Por la paciencia que tuvo para jugar con la portátil de juguete a mi lado cada tarde, por fingir que se divertía con la palita escarbando en algunas giras que tuve que llevarla. Por darme la mejor experiencia de mi vida: ser tu mamá.

A mi mamá y hermanos, por apoyarnos en los momentos en que teníamos horarios imposibles, desvelos, cansancio, trabajo y más trabajo.

Agradezco a Helga, por su guía, sus consejos y por ese apoyo maternal que siempre la ha caracterizado. Tu mística de trabajo, esfuerzo y entrega han dejado una huella profunda en mí.

Deseo expresar mi gran agradecimiento a la empresa Global Nano Network Limited por donar todas las micrografías que se pudieron obtener y la oportunidad de explorar todo el material que se analizó.

Esta investigación pudo ser posible gracias al apoyo económico del proyecto “Producción sostenible por medio del fortalecimiento de capacidades tecnológicas en Costa Rica y evaluaciones de un hongo controlador bajo dos escenarios de producción de campo” (Código SIA 0549-15) UNA-UCR-UNED, liderado por el Dr. Ramón Molina Bravo, al Laboratorio de Entomología y al Laboratorio de Control Biológico de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional.

Un agradecimiento especial a científicos de alta calidad, que me han apoyado para culminar esta investigación, y se han convertido en grandes amigos: Allan González y María Isabel González Lutz.

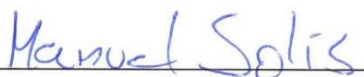
Deseo agradecer a personas muy especiales que me ayudaron en diferentes procesos de la metodología: Juan Pablo Castillo, Alejandro Vargas, Jonathan Reyes y a mi hermanita Mari por el apoyo con las micrografías.

Agradezco al Programa Nacional Mosca de la Fruta, en especial al Ing. Rigoberto Romero, por el aporte del material para realizar los ensayos.

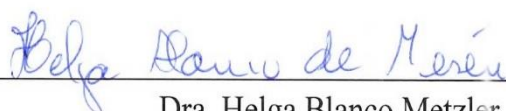
Muchas gracias al Dr. Toledo por ser parte de esta investigación en un tema que a ambos nos apasiona.

Y si alguien se me quedó por fuera de esta nota: GRACIAS, porque este logro es la suma del apoyo de muchas personas que Dios puso en mi camino.

Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos



Dr. Manuel Solís Vargas
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



Dra. Helga Blanco Metzler
Profesora Guía



Dr. Felipe Arauz Cavallini
Lector



MSc. Allan González Herrera
Lector



Dra. Pamela Murillo Rojas
Representante del Director del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Rossy Morera Montoya
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE.....	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación (Revisión de literatura)	5
1.2. Objetivo general	10
1.3. Objetivos específicos.....	10
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1 Prospección de hongos entomopatógenos sobre especies de moscas de la fruta.....	11
2.2 Muestreo en campo	11
2.2.1. Análisis de muestras en laboratorio	15
2.2.2. Patogenicidad de aislados de hongos entomopatógenos sobre <i>Ceratitis capitata</i>	17
2.2.3. Observación de entradas naturales de los puparios en alta resolución	23
2.3 Crecimiento y germinación de las esporas de las diferentes cepas evaluadas	23
2.3.1 Porcentaje de germinación (viabilidad)	24
2.3.2 Crecimiento radial	24
2.4 Efecto de dos cepas sobre el desarrollo de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> en pupas parasitadas.....	25
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
3.1 Prospección de hongos entomopatógenos sobre puparios de <i>Ceratitis capitata</i>	28
3.1.1 Parasitoides encontrados.....	34
3.2 Determinación de la patogenicidad y la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de hongos entomopatógenos sobre puparios de <i>Ceratitis capitata</i>	38
3.2.1 Patogenicidad de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> sobre pupas de <i>Ceratitis capitata</i> ...	38
3.2.2 Patogenicidad de cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre pupas de <i>Ceratitis capitata</i>	

3.3	Crecimiento y germinación de esporas en las cepas evaluadas	65
3.3.1	Crecimiento radial de las cepas evaluadas de <i>Beauveria bassiana</i>	66
3.3.2	Pruebas de germinación de esporas de las cepas evaluadas de <i>Beauveria bassiana</i> ..	67
3.3.3	Crecimiento radial de las cepas evaluadas de <i>Metarhizium anisopliae</i>	70
3.3.4	Pruebas de germinación de las cepas evaluadas de <i>Metrhizium anisopliae</i>	72
3.4	Observación de entradas naturales de los puparios en alta resolución	74
3.5	Efecto de cepas con mayor potencial patogénico sobre el desarrollo de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> en pupas de <i>Ceratitis capitata</i>	79
IV.	CONCLUSIONES	85
V.	RECOMENDACIONES	87
VI.	REFERENCIAS	88

RESUMEN

El uso de entomopatógenos sobre puparios de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) ha sido una herramienta poco explorada. El pupario se caracteriza por poseer una cutícula gruesa y dura, lo cual fue comprobado mediante micrografías, que explican cómo se protegen de las condiciones adversas del suelo. Por esto, el uso de hongos entomopatógenos en este estado representa un reto. Aunado a lo anterior, la prevalencia en el campo de *C. capitata* es baja respecto al género *Anastrepha*, razón que explica por qué no se encontraron hongos entomopatógenos asociados a las pupas de *C. capitata* en este estudio. Se encontraron hongos fitopatógenos en puparios en suelo y frutos. Se evaluaron cuatro cepas de *Beauveria bassiana*: Bv-ECA-1, Bv-ECA-9, Bv-ECA-14 y Bv-ECA-31, y tres de *Metarhizium anisopliae*: MTR-ECA-4, MTR-ECA-6 y MTR-ECA-8, con el objetivo de evaluar su patogenicidad en puparios a diferentes concentraciones: 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 conidios/ml en condiciones de laboratorio. Las cepas con mejores resultados fueron Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8. La cepa Bv-ECA-1 logró controlar la emergencia en 50,29% en una concentración de 1×10^6 conidios/ml, micosis de 30,04% y obtuvo una CL_{50} de $1 \times 10^{5,23}$ conidios/ml. La cepa MTR-ECA-8 logró controlar la emergencia en 52,9% en una concentración de 1×10^6 conidios/ml, y 24% micosis, su CL_{50} obtenida fue de $1 \times 10^{4,69}$ conidios/ml. La cepa Bv-ECA-1 obtuvo un porcentaje de germinación de esporas menor (12,84%), aunque su crecimiento radial fue el mayor entre las cepas de *B. bassiana* (6,904 mm). La cepa MTR-ECA-8 mostró un 92,69% de germinación de esporas y un crecimiento radial de 11,4 mm. Ambas cepas se inocularon en puparios de *C. capitata* parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) y se encontró que las variables habilidad de vuelo ($p=0,3013$) y parasitismo ($p=0,0738$) no presentaron diferencias entre tratamientos. La mortalidad de hembras mostró una interacción entre tratamientos muy significativa ($p=0,0002$): la cepa Bv-ECA-1 fue la que presentó mayor mortalidad de hembras, seguida de la cepa MTR-ECA-8. La proporción sexual de los adultos de *D. longicaudata* también se vio afectada, los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p=0,0021$), la cepa Bv-ECA-1 redujo la proporción sexual a 0,31, mientras que la cepa MTR-ECA-8 fue estadísticamente igual al testigo. Al comparar estos resultados con la literatura, las concentraciones utilizadas en el estudio fueron inferiores, por lo que sería importante ampliar el rango de concentraciones y, posteriormente, evaluarlas en el campo, principalmente la MTR-ECA-8, con resultados de patogenicidad similares a Bv-ECA-1, pero fisiológicamente más agresiva y con menor daño en la calidad de *D. longicaudata*.

ABSTRACT

The use of entomopathogens in puparia of *C. capitata* has been a tool scarcely explored, the state of pupa is characterized by having a thick and hard cuticle, it was verified by micrographs, which explain how they are protected from the adverse soil conditions. Therefore, the use of entomopathogenic fungi in this instar represents a challenge. In addition to this, the prevalence of *C. capitata* is low comparing to the genus *Anastrepha*, consequently, no entomopathogenic fungi associated with the pupae of *C. capitata* were found in this study. Phytopathogenic fungi were found in pupae in soil and fruits. Four strains of *Beauveria bassiana* were evaluated: Bv-ECA-1, Bv-ECA-9, Bv-ECA-14 and Bv-ECA-31, and three of *Metarhizium anisopliae*: MTR-ECA-4, MTR-ECA-6 and MTR-ECA-8, with the objective of evaluating its pathogenicity in puparia at different concentrations: 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 conidia/ml, under laboratory conditions. The strains with the best results were Bv-ECA-1 and MTR-ECA-8. Strain Bv-ECA-1 managed to control the emergence in 50.29% at a concentration of 1×10^6 conidia/ml, mycosis of 30.04% and obtained an LC_{50} of $1 \times 10^{5.23}$ conidia/ml. The strain MTR-ECA-8 managed to control the emergence in 52.9% at a concentration of 1×10^6 conidia / ml, and 24% mycosis, its LC_{50} obtained is $1 \times 10^{4.69}$ conidia / ml. Strain Bv-ECA-1 obtained a lower percentage of spore germination (12.84%), although its radial growth was the highest among strains of *B. bassiana* (6.904 mm). Strain MTR-ECA-8 showed 92.69% spore germination and a radial growth of 11.4 mm. Both strains were inoculated into pupae of *C. capitata* parasitized by *D. longicaudata*. The variables flight ability ($p = 0.3013$) and parasitism ($p = 0.0738$) did not present differences between treatments. The mortality of females showed a very significant interaction between treatments ($p = 0.0002$): the strain Bv-ECA-1 was the one with highest mortality of females, followed by the strain MTR-ECA-8. The sexual proportion of adults of *D. longicaudata* was also affected ($p = 0.0021$), the strain Bv-ECA-1 reduced the sexual proportion to 0.31, while the strain MTR-ECA-8 was statistically the same to the control. When comparing these results with the literature, the concentrations used in the study were lower, so it would be important to extend the range of concentrations and then evaluate them in the field, mainly the MTR-ECA-8, with pathogenicity and virulence results similar to Bv-ECA-1, but physiologically more aggressive and produces less damage for *D. longicaudata*.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Hongos asociados a puparios de <i>Ceratitis capitata</i> colectadas en frutos y suelo, en zonas frutícolas de Costa Rica (2018).	32
Cuadro 2. Parasitoides encontrados en puparios de <i>Ceratitis capitata</i> durante la prospección.....	35
Cuadro 3. Ventaja de puparios con micosis en las diferentes cepas de <i>Beauveria bassiana</i> evaluadas a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.	40
Cuadro 4. Ventaja de puparios con micosis en las diferentes concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> evaluadas a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.	41
Cuadro 5. Ventaja de emergencia de adultos para las cepas evaluadas de <i>Beauveria bassiana</i> a diferentes concentraciones (0 conidios/ml= Testigo, 1×10^3 conidios/ml, 1×10^4 conidios/ml, 1×10^5 conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml) (n= 6). Prob. Asoc: probabilidad asociada. Valores en negrita son significativos.	46
Cuadro 6. Ventaja de puparios con micosis para las cepas evaluadas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en una a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.	56
Cuadro 7. Ventaja de puparios con micosis para las concentraciones evaluadas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en una a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.	57
Cuadro 8. Ventaja de emergencia de adultos para las cepas evaluadas de <i>Metarhizium anisopliae</i> a los 9 ddi a diferentes concentraciones (0 conidios/ml= Testigo, 1×10^3 conidios/ml, 1×10^4 conidios/ml, 1×10^5 conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml) (n= 6). Prob. Asoc: probabilidad asociada. Valores en negrita son significativos.	59

Cuadro 9. Porcentaje de germinación de esporas de las cepas evaluadas de <i>Beauveria bassiana</i> a las 24 y 48 horas (n= 5). Letras diferentes indican diferencias significativas entre columnas (p= 0,05). Los datos para la cepa Bv-ECA-31 a las 48 horas no se pudieron obtener debido a que se contaminó el agar.	69
Cuadro 10. Ventaja de mortalidad de hembras de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> que emergieron de puparios tratadas con MTR-ECA-8 y Bv-ECA-1, a una concentración 1×10^6 conidios/ml y del tratamiento testigo (concentración 0) (n= 5). Valores en negrita son significativos.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Capturas de <i>Ceratitis capitata</i> en Costa Rica. (A: 2016, B: 2017). Fuente: Programa Nacional Mosca de la Fruta. Por Roberto Durán, Unidad de Biometría y Sistemas de Información, SFE-MAG. 2016 y 2017.....	12
Figura 2. Sitios de muestreo de frutos y puparios de <i>Ceratitis capitata</i> en zonas frutícolas de Costa Rica. Diseño del mapa: Jonathan Reyes, Escuela de Geografía, UCR.	14
Figura 3. Estructuras de madera para recuperación de puparios durante la prospección de entomopatógenos.....	16
Figura 4. Tamizado de muestras de suelo (A) y localización de puparios en muestras de suelo (B).	17
Figura 5. Bolsas de tergal utilizadas para desinfectar los puparios.	19
Figura 6. Filtros de té de acero inoxidable esterilizados, utilizados para la inmersión de puparios de <i>Ceratitis capitata</i> en las diferentes concentraciones de entomopatógenos evaluados.	20
Figura 7. Metodología empleada para preparar las concentraciones de cada cepa e inocular los puparios de <i>Ceratitis capitata</i>	21
Figura 8. Recipientes utilizados para realizar las pruebas de habilidad de vuelo de los parasitoides.	27
Figura 9. A y C. Puparios de <i>Ceratitis capitata</i> colectadas en Brasil de Santa Ana, con crecimiento fungoso. B. Pupa con pudrición.....	34
Figura 10. Parasitoides de moscas de la fruta encontrados en muestreo realizado en zonas frutícolas de Costa Rica. A. <i>Doryctobracon zeteki</i> (Muesebeck) (Hymenoptera:	

Braconidae). B. <i>Aganaspis</i> sp. (Brèthes) (Hymenoptera: Eucoilidae). C. <i>Asobara anastrephae</i> (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae). D. <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Identificación realizada por Dr. Paul Hanson.....	37
Figura 11. Micosis en puparios de <i>Ceratitis capitata</i> en la muestra. Las cepas evaluadas fueron Bv-ECA-1, Bv-ECA-9, Bv-ECA-14 y Bv-ECA-31 de <i>Beauveria bassiana</i> (n= 6).....	42
Figura 12. A y C. Puparios con micosis, inoculadas con la cepa Bv-ECA-1 (9 ddi) a una concentración de 1×10^6 conidios/ml. B y D. Puparios disectados para corroborar patogenicidad.....	43
Figura 13. Emergencia de adultos en puparios de <i>Ceratitis capitata</i> inoculadas con las cepas Bv-ECA-1, Bv-ECA-9, Bv-ECA-14 y Bv-ECA-31 de <i>Beauveria bassiana</i> a diferentes concentraciones 1×10^3 (A), 1×10^4 (B), 1×10^5 (C), 1×10^6 (D) conidios/ml y 0 (Testigo) (D). (n= 6) en la muestra.	49
Figura 14. A. Adulto de <i>Ceratitis capitata</i> en proceso de emergencia del pupario, infectado por cepa Bv-ECA-1 concentración 1×10^6 conidios/ml. B. Adulto de <i>Ceratitis capitata</i> infectado por cepa Bv-ECA-1 concentración 1×10^6 conidios/ml.	53
Figura 15. Porcentaje de puparios de <i>Ceratitis capitata</i> con micosis. Las cepas evaluadas fueron MTR-ECA-4, MTR-ECA-6 y MTR-ECA-8 de <i>Metarhizium anisopliae</i> a diferentes concentraciones 1×10^3 (A), 1×10^4 (B), 1×10^5 (C), 1×10^6 (D) (n= 6). El testigo no mostró micosis para todas las cepas.	55
Figura 16. A. Puparios con micosis, inoculados con la cepa MTR-ECA-4 (9 ddi). B. Puparios con micosis inoculados con la cepa MTR-ECA-6 (9 ddi). C. Puparios con	

micosis, inoculados con la cepa MTR-ECA-8 (6 ddi). D. Pupario inoculado con la cepa MTR-ECA-8 con desarrollo de micelio a los 9 ddi. Todas las cepas mostradas fueron inoculadas a 1×10^6 conidios/ml.	58
Figura 17. Porcentaje de emergencia de adultos en la muestra de puparios de <i>Ceratitis capitata</i> inoculados con cepas MTR-ECA-4, MTR-ECA-6 y MTR-ECA-8 de <i>Metarhizium anisopliae</i> a diferentes concentraciones 1×10^3 (A), 1×10^4 (B), 1×10^5 (C), 1×10^6 (D) conidios/ml y 0 conidios/ml (Testigo) (E) (n= 6).....	61
Figura 18. A. Adulto de <i>Ceratitis capitata</i> en proceso de emergencia del pupario, infectado por cepa MTR-ECA-8 concentración 1×10^6 conidios/ml. B. Adultos de <i>Ceratitis capitata</i> infectados por cepa MTR-ECA-8 concentración 1×10^6 conidios/ml.	64
Figura 19. Crecimiento radial de las cepas evaluadas de <i>Beauveria bassiana</i> por 7 días (n= 6). A 26 °C y 100% HR.....	67
Figura 20. Crecimiento radial de las cepas evaluadas de <i>Metarhizium anisopliae</i> por 7 días (n= 6).	71
Figura 21. Micrografías de los extremos de un pupario de <i>Ceratitis capitata</i> con más de 72 horas de convertirse en pupa. A. Micrografía a 50 μ m de la parte superior. B. Micrografía a 100 μ m de la parte inferior o zona espiracular.	76
Figura 22. Micrografía a 50 μ m de la parte inferior del pupario de <i>Ceratitis capitata</i> , donde se encuentran los espiráculos. B. Micrografía a 10 μ m de una entrada espiracular, los cuales poseen una membrana interna. C. Micrografía a 10 μ m de la pared del pupario sin parasitar. D. Micrografía a 10 μ m de la pared del pupario parasitada por <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	78

Figura 23. Mortalidad con estrés de hembras de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> durante 14 ddi (n= 5).	80
Figura 24. Proporción sexual de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> mostrada en el tratamiento testigo, en el tratamiento con inoculación de la cepa MTR-ECA-8 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml, y pupas parasitadas tratadas con la cepa Bv-ECA-1 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml. Letras diferentes indican diferencias significativas (p= 0,05) (n=6).	82
Figura 25. Adulto de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> emergido de puparios con tratamiento testigo (A), con inoculación de la cepa MTR-ECA-8 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml (B), y pupas parasitadas tratadas con la cepa Bv-ECA-1 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml (C).	83



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP

Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Rosy Marcela Morera Montoya, con cédula de identidad 2-0579-0592, en mi condición de autor del TFG titulado Prosperción y evaluación de hongos entomopatógenos asociados a puparios de *larritis capitata* en Costa Rica

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☐ NO * ☒

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 3 año(s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Rosy Marcela Morera Montoya

Número de Carné: A12962 Número de cédula: 2-0579-0592

Correo Electrónico: rossy.morera@gmail.com

Fecha: 8/1/2020 Número de teléfono: 88752403

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Dra. Helga Blanco Metzler


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

I. INTRODUCCIÓN

Las moscas de la fruta, de la familia Tephritidae, generan dos tipos de daños: directos e indirectos (Aluja 1994). El daño directo consiste en la disminución de la producción agrícola debido a que sus larvas se alimentan de la pulpa de los frutos, generando importantes pérdidas económicas (Salcedo-Baca *et al.* 2010). Los daños indirectos son implícitos, involucran costo ambiental ocasionado por los plaguicidas utilizados en el control de estos tefrítidos (Guillén y Sánchez 2007), aunado a las medidas cuarentenarias implementadas, que representan limitaciones para las importaciones y exportaciones de cada país (Gutiérrez 2010; Villaseñor y Ortiz 2010).

En las regiones productoras de frutas, el manejo de la plaga se basa en el monitoreo y trampeo, así como aplicaciones de insecticidas como Malathion 50% CE y Spinosad 25% CE en cebos para adultos, aplicaciones de Diazinon 50 CE en tratamientos al suelo, o incluso, en el área de “goteo” de los árboles (Saul *et al.* 1983; Roessler 1989; Goldshtein *et al.* 2017). No obstante, estas acciones no han sido suficientes para mantener controlada la plaga, además, la necesidad de utilizar productos más inocuos para la salud y el ambiente se ha convertido en una exigencia de los mercados de exportación. Por lo anterior, es necesario fortalecer el uso de enemigos naturales como una estrategia de combate sostenible (Aluja *et al.* 1990; Ekesi *et al.* 2002; Montoya y Toledo 2010; Cancino *et al.* 2012).

Con el objetivo de fortalecer las herramientas de control más inocuas con el ambiente y la salud, los diversos Programas de Manejo Integrado de Plagas han realizado esfuerzos por ofrecer estrategias de control biológico (Cancino *et al.* 2012; Enkerlin *et al.* 2015), tales como el uso de enemigos naturales como parasitoides (Aluja *et al.* 1990), de nematodos para el

control de larvas del tercer estadio (Toledo 2006b) y de hongos entomopatógenos (Ekesi *et al.* 2002; Montoya y Toledo 2010).

El uso de bioplaguicidas como los entomopatógenos presentan muchas ventajas para países en desarrollo, además de la baja nocividad para el ambiente, los residuos no dañan a los consumidores, su aplicación no implica riesgos en la salud de los productores, se producen a bajo costo, la producción local permite mantener cepas adaptadas a los ambientes y necesidades de los productores de la zona.

Las plagas con problemas de resistencia a agroquímicos, como *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae), y *Plutella xylostella* L. (Curtis) (Lepidoptera: Plutellidae) podrían ser controladas más eficientemente (Grzywacz *et al.* 2014) con el uso de los hongos biocontroladores. Además, los costos de producción de esta herramienta son inferiores a los costos de producción de los parasitoides (Montoya y Toledo 2010).

Se han probado algunas cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Isaria fumosorosea* (Wize) (formalmente *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown y Smith) y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) sobre moscas de la fruta en estado adulto (Konstantopoulou y Mazomenos 2005; Hernández-Díaz-Ordaz *et al.* 2010; Osorio-Fajardo y Canal 2011; Mar y Lumyong 2012) y han mostrado resultados promisorios (San Andrés *et al.* 2014; Falchi *et al.* 2015). Algunas de estas cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron encontradas en el suelo, donde dependen de factores bióticos y abióticos como temperatura, humedad relativa, tipo de suelo, pH, origen de la cepa del

hongo, edad y especie del insecto hospedero para expresar su potencial de control (Garrido-Jurado *et al.* 2011).

En México se utiliza *B. bassiana* en el campo para el control de adultos de moscas de la fruta; se coloca en unos dispositivos cilíndricos impregnados con atrayentes (Toledo *et al.* 2006a; Toledo *et al.* 2017), para atraer únicamente a las moscas de la fruta, evitando que los polinizadores y otros insectos benéficos puedan ser dañados por el hongo. Sin embargo, aún no se ha encontrado una cepa promisorio comercialmente que pueda controlar el estado de pupa en moscas de la fruta en campo.

En Costa Rica los problemas por moscas de la fruta se presentan principalmente en cultivos como cítricos, jocote y mango (Jirón y Zeledón 1979) por el género *Anastrepha*; sin embargo, la Mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wied.) (Diptera: Tephritidae) llegó al país desde 1955 (Padilla-Monge 2012). *C. capitata* ha afectado muchos cultivos frutícolas del país, como el jocote (*Spondias purpurea* L.), en el cual una de las prácticas culturales más importantes es la recolección manual de la fruta caída, lo que implica un aumento excesivo en los costos de producción. Ante esto, la idea de utilizar un entomopatógeno capaz de atacar los puparios de la Mosca del Mediterráneo se convierte en una necesidad imperante para la producción frutícola nacional.

Hasta el momento se han realizado pocos estudios del efecto de los entomopatógenos en estado de pupa de *C. capitata*. En países como España (Quesada-Moraga *et al.* 2006) y Grecia (Beris *et al.* 2013) utilizaron *B. bassiana* y *M. anisopliae* a concentraciones superiores a 10^8 y obtuvieron mortalidades iguales o menores al 50%; sin embargo, en Kenya se reportaron mortalidades de 80% (Ekesi *et al.* 2002).

El éxito de las cepas comerciales de entomopatógenos radica en diversos factores, dentro de los cuales el inicial es tener un conocimiento básico del material biológico evaluado (Padilla-Melo *et al.* 2000). El crecimiento del micelio del hongo y la capacidad de germinación de sus esporas son características que proveen información importante para decidir el uso de una cepa respecto a otra a nivel comercial (Pinto-Oliveira *et al.* 2015), ya que una cepa puede ser patógena, pero su crecimiento y su germinación son lentos, por lo que no serviría para el control de algunos insectos de ciclo corto. Para decidir comercialmente, la virulencia permite tomar decisiones entre cepas, y ésta depende de muchas características, como la capacidad de generar esporas y que éstas, a su vez, sean capaces de germinar para poder iniciar el proceso de contacto de las hifas con la cutícula del insecto (Chen *et al.* 2018).

Otro aspecto importante para considerar es el desarrollo de una cepa comercial es el tipo de manejo del agrosistema (Jaronski 2010), ya que se deben considerar las prácticas de manejo que se utilizan en los cultivos, por lo que se debe tomar en cuenta las liberaciones de parasitoides, y su respectiva interacción con los entomopatógenos. Algunos estudios han demostrado que los entomopatógenos pueden ser nocivos para enemigos naturales (Dean *et al.* 2012).

Sin embargo, es preciso evaluar las concentraciones y momentos de aplicación en los que los entomopatógenos pueden interferir en su desarrollo o desempeño en el campo (Martins *et al.* 2014). Así de esta manera, se pueden prolongar los intervalos de inoculaciones con hongos entomopatógenos reduciendo el daño a los parasitoides (Emami *et al.* 2013).

El objetivo de esta investigación consistió en evaluar a nivel de laboratorio la patogenicidad de cepas de hongos entomopatógenos sobre puparios de *Ceratitis capitata*, encontradas en el

campo o provenientes de una micoteca, con el fin de generar candidatos potenciales para cepas comerciales.

1.1. Justificación (Revisión de literatura)

Una de las prácticas más utilizadas para el control de plagas insectiles son las aplicaciones de agroquímicos; sin embargo, los agroquímicos pueden presentar efectos negativos en la salud humana y el ambiente, resultan en resistencia de la plaga tratada y matan o afectan negativamente a los organismos benéficos (Kaya y Vega 2012, Beris *et al.* 2013). Debido a estos riesgos, el control biológico surge como una herramienta que utiliza agentes controladores para reducir las poblaciones plaga (Eilenberg *et al.* 2001). Dentro de los agentes controladores más utilizados para el control de plagas insectiles se encuentran el uso de parasitoides, depredadores y de microorganismos, entre ellos los más conocidos son los hongos entomopatógenos (Vega *et al.* 2009). A nivel de producción masiva, los hongos entomopatógenos resultan en menor costo respecto a la producción masiva de invertebrados como agentes de control biológico ((Montoya y Toledo 2010, Leppla *et al.* 2014).

Los hongos entomopatógenos más utilizados para la producción masiva corresponden a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Jaronski 2014, Pinto-Oliveira *et al.* 2015), pertenecientes al grupo Ascomycete del orden Hypocreales. Estos hongos infectan a través de la cutícula del insecto, se adhieren mediante fuerzas de van der Waals, y unas horas después se adhieren y germinan (Jaronski 2014); sin embargo, algunas veces pueden encontrar entradas naturales para ingresar, tales como boca, ano o espiráculos, entre otras (Vega *et al.* 2012). Luego de esto, los hongos producen una hifa de penetración, así como

un apresorio o estructura de anclaje, dependiendo de la especie, la hifa penetra la cutícula del insecto por presión y/o acción enzimática (Jaronski 2014). Una vez en el hemocele, se prolifera en todo el cuerpo del insecto mediante cuerpos hifales, cuando el insecto muere se produce micelio y, si las condiciones ambientales son las óptimas, se producen conidios fuera del insecto (Jaronski 2014). Estos hongos dependen mucho de los conidios para poder dispersarse, por lo que la producción de estas estructuras va a determinar el desempeño en un proceso de producción masiva (Jaronski 2014).

Es necesario conocer el material biológico evaluado para decidir cuál será el más promisorio para producción masiva (Padilla-Melo *et al.* 2000). El crecimiento del micelio del hongo y la capacidad de germinación de sus esporas son características que proveen información importante para decidir el uso de una cepa respecto a otra a nivel comercial (Pinto-Oliveira *et al.* 2015), ya que una cepa puede ser virulenta, pero su crecimiento y su germinación son lentos, por lo que no serviría para el control de algunos insectos de ciclo corto. La patogenicidad entre cepas depende de muchas características, como la capacidad de generar esporas y que éstas, a su vez, sean capaces de germinar para poder iniciar el proceso de contacto de las hifas con la cutícula del insecto (Chen *et al.* 2018). Esta característica brinda información importante de la agresividad de cada cepa. Bidochka *et al.* (2001) propusieron que la virulencia de las cepas de *M. anisopliae* se encuentra asociada a diferentes tipos de hábitats, eliminando el paradigma que defendía la asociación con el orden del hospedero. Ante esto, se hace importante la búsqueda de cepas endémicas que puedan adaptarse mejor a las condiciones ambientales y puedan ejercer control sobre el organismo plaga (Dembilio *et al.* 2010).

En Costa Rica durante 1955 se detectó por primera vez la presencia de Mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*) (Padilla-Monge 2012). Esta plaga ha generado problemas principalmente en cultivos como cítricos, jocote y mango, y especialmente *C. capitata* se ha encontrado en el cultivo de café de manera esporádica (Jirón *et al.* 1988; Jirón y Hedstrom 1988). En el caso del jocote (*Spondias purpurea* L.) la recolección manual de la fruta caída es una de las principales herramientas de control cultural (Padilla *et al.* 2016). Sin embargo, la caída de frutos provocados por el insecto cada día va en aumento, lo que significa que los costos de producción también se incrementan. Ante esto, la idea de utilizar un entomopatógeno capaz de atacar puparios de las moscas de la fruta en suelo y en montículos de frutos caídos, se convierte en una necesidad imperante para la producción frutícola nacional.

La pupa es el instar inactivo de los insectos holometábolos, en este estado es cuando se da el cambio de larva a adulto. En el orden Diptera, es muy común observar un tipo de pupa coartada, donde la larva segrega una cubierta endurecida llamada pupario que protege a la verdadera pupa (exarada) (Brown 2010).

El control del estado de pupa en *C. capitata* representa todo un reto debido a que el pupario está compuesto de una cutícula muy dura y gruesa (Rabossi *et al.* 1992), y, además, posee pocas entradas naturales que, de acuerdo con Tomalsky *et al.* (2001) permiten el intercambio gaseoso en pocas ocasiones, principalmente al final de la etapa, para preparar al adulto a emerger. Además, por ser una estructura que sirve de protección al insecto durante su desarrollo en el suelo, en el caso de algunas moscas como *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) y *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) se ha encontrado que algunos compuestos antimicrobianos protegen el

pupario (Chernysh *et al.* 1995). En el caso de los tefrítidos, el compuesto Bractocerin-1, un péptido antimicrobiano de amplio espectro (bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos) fue encontrado en pupas de *Bractocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (Dang *et al.* 2009). En *C. capitata* se ha encontrado la Ceratotoxina, solo en las glándulas reproductivas de las hembras adultas, no en pupas (Marchini *et al.* 1993).

En el mundo se han realizado pocos estudios del efecto de los entomopatógenos en estado de pupa de *C. capitata*: en los países del Mediterráneo se han realizado pruebas de laboratorio en Grecia (Beris *et al.* 2013) y en España (Quesada-Moraga *et al.* 2006) con porcentajes de control de emergencia menores a 50%. Y, por último, en Kenya (Ekesi *et al.* 2002) probaron 13 cepas de *M. anisopliae* y 2 de *B. bassiana* en puparios de *C. capitata*, donde obtuvieron micosis altas de hasta 80%, y emergencia de adultos de 10 a 40%. Este último resultado ha sido el más promisorio, pero se cree que la razón es porque *C. capitata* tuvo su origen en África oriental (De Meyer *et al.* 2002), lugar de donde se originan las cepas que probaron.

El hongo entomopatógeno que se requiere no sólo debe estar adaptado a las condiciones ambientales de las zonas frutícolas, sino debe ofrecer una posibilidad de manejarse paralelamente o de forma intermitente con las liberaciones del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (*Biosteres longicaudatus*) (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *D. longicaudata* es un endoparasitoide solitario, del tercer estadio de larva en tefrítidos (Van Nieuwenhove y Ovruski 2011), nativo de la región indoaustrialiana (Montoya *et al.* 2000). Las hembras emergen 2 a 3 días después que los machos (Paladino *et al.* 2010; Harbi *et al.* 2016). Este parasitoide fue importado al país junto con otras especies con la ayuda del Ministerio de Agricultura y Ganadería y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (Jirón and Mexzón 1989; Ovruski *et al.* 2000); sin embargo, este parasitoide

fue el que mejor se adaptó al país y actualmente es producido por el Programa de Moscas de la Fruta del Servicio Fitosanitario del Estado (O'neal-Coto 2018).

Con el fin de obtener el desempeño óptimo del parasitoide, es necesario medir constantemente la calidad del parasitoide liberado en campo (van Lenteren 2003; Cancino *et al.* 2006b). Como parámetros de calidad del parasitoide se evalúa emergencia de adultos, supervivencia, fecundidad, habilidad de vuelo, comportamiento de búsqueda por olfatometría y fecundidad de parasitoides en campo (Cancino *et al.* 2006a). Estos parámetros van a definir la capacidad de búsqueda y el control que se logre con las liberaciones en campo.

En México, Dimbi *et al.* (2003) y Toledo *et al.* (2006a) probaron algunas cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos, larvas y puparios de *C. capitata*, las cuales mostraron patogenicidad únicamente para el estado adulto. Además, han probado algunos dispositivos en campo con atrayentes, con el fin de eliminar el contacto de *B. bassiana* con organismos benéficos (Toledo *et al.* 2017), como los polinizadores y parasitoides que liberan constantemente. Sin embargo, aún no han encontrado una cepa promisorio que sea virulenta para las pupas de *C. capitata* y que, a su vez, no afecte, o que el efecto negativo sea el menor posible para *D. longicaudata*. Por lo tanto, en este estudio se realizó una búsqueda de hongos entomopatógenos afectando pupas de *C. capitata* en los cultivos frutícolas de Costa Rica con historial de plaga, y se evaluaron algunas cepas de la micoteca del Laboratorio de Control Biológico de la Universidad Nacional de Costa Rica, de las cuales, las dos más promisorias a nivel de laboratorio fueron inoculadas sobre el parasitoide *D. longicaudata*, con el fin de evaluar si generaban daño o interferían en su calidad.

1.2. Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de cepas de hongos entomopatógenos sobre puparios de *Ceratitis capitata* para medir su potencial de control y el efecto sobre el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*.

1.3. Objetivos específicos

1. Realizar una prospección de hongos entomopatógenos sobre puparios de *C. capitata* con el fin de encontrar cepas nativas con potencial comercial.
2. Determinar la patogenicidad, virulencia y la Concentración Letal Media (CL₅₀ y CL₉₀) de hongos entomopatógenos sobre puparios de *C. capitata* para obtener posibles cepas con potencial comercial.
3. Caracterizar algunos aspectos fisiológicos de las cepas potenciales para analizar si existe relación entre la patogenicidad y su comportamiento natural.
4. Evaluar el efecto de cepas con mayor potencial de control sobre el desarrollo de *Diachasmimorpha longicaudata* en pupas parasitadas para evaluar si estos hongos entomopatógenos generan daño al parasitoide.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

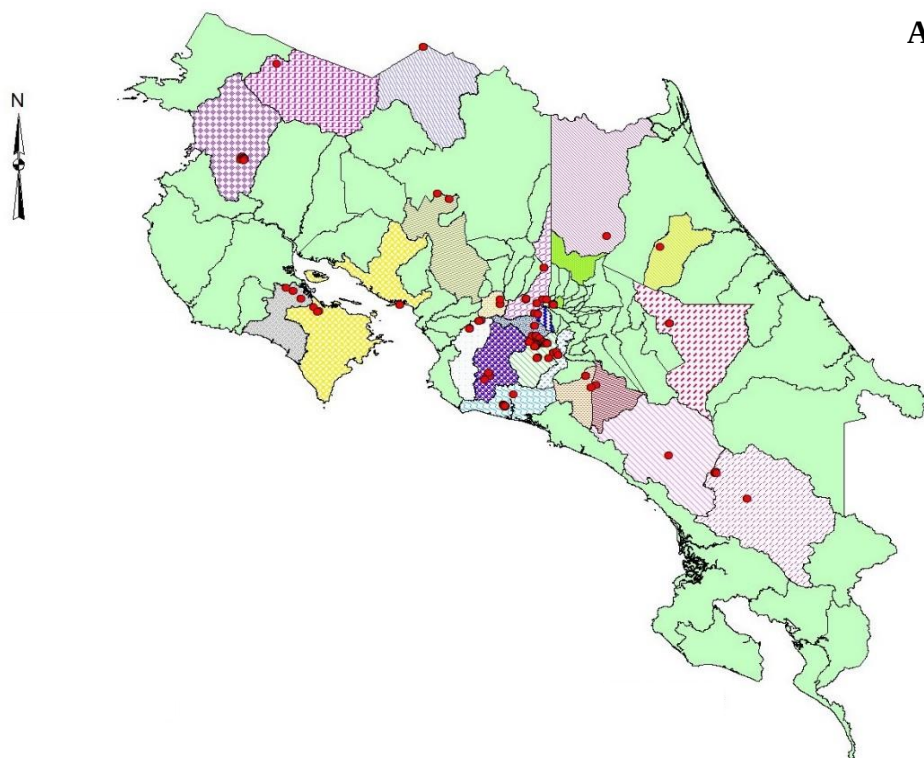
2.1 Prospección de hongos entomopatógenos sobre especies de moscas de la fruta

2.2 Muestreo en campo

Para incrementar la probabilidad de encontrar hongos entomopatógenos se realizaron colectas de puparios en fincas con manejo sostenible, orgánico, y convencional, así como bordes de fincas limítrofes con zonas boscosas.

De acuerdo con muestreos previos en zonas frutícolas del país, se obtuvieron puparios de tefrítidos del género *Anastrepha*, por lo que se decidió enfocar las colectas específicamente en zonas donde se han capturado moscas adultas de *C. capitata* con la intención de aumentar las probabilidades de encontrar puparios de esta mosca. Para lo que se utilizó la información del sistema de monitoreo del Programa Nacional de Mosca de la Fruta del Servicio Fitosanitario del Estado (figura 1) para así elegir los sitios de muestreo.

A



B

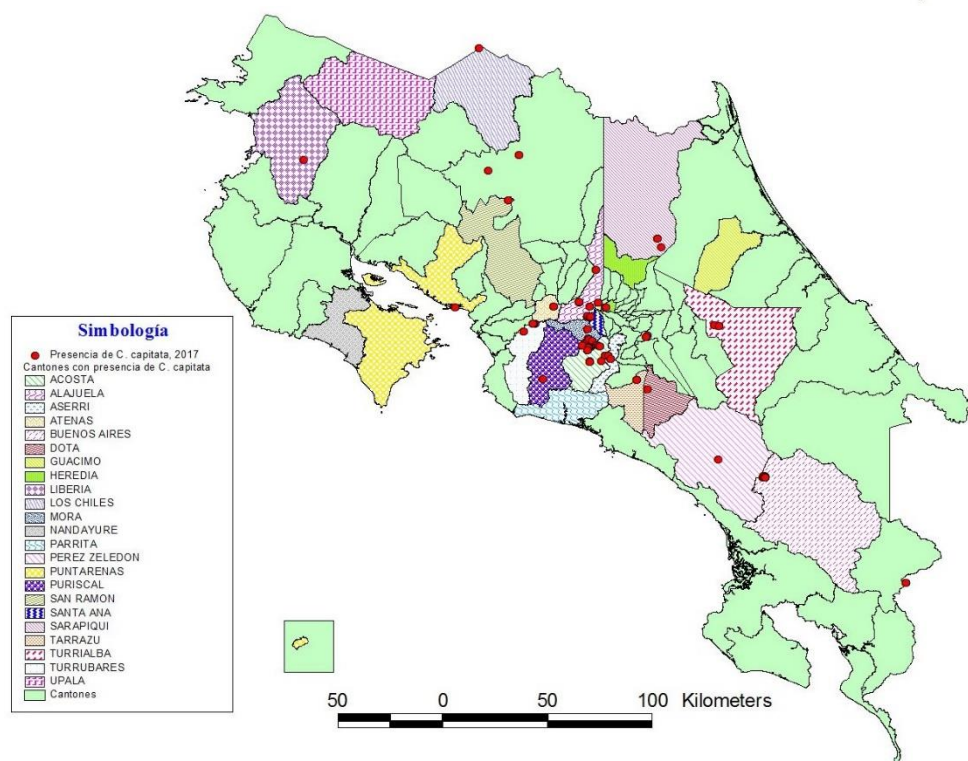


Figura 1. Capturas de *Ceratitidis capitata* en Costa Rica. (A: 2016, B: 2017). Fuente: Programa Nacional Mosca de la Fruta. Por Roberto Durán, Unidad de Biometría y Sistemas de Información, SFE-MAG. 2016 y 2017.

Las zonas muestreadas fueron:

- Santa Eulalia de Atenas, en un cultivo de *Citrus sinensis*, a 711 msnm. La ubicación de la finca es Latitud 10; 0; 33.113478999999643, Longitud 84; 22; 14.8114010000013475. Fecha de colecta: 2 de febrero, 2018.
- Santa Ana. Finca Hermanos Morales. En un cultivo de *Citrus sinensis*, a 762,92 msnm. La ubicación de la finca es Latitud 9; 56; 37.3194119999996959, Longitud 84; 13; 53.2305899999991942. Fecha de colecta: 16 de febrero, 2018.
- La Pastora de San Marcos de Tarrazú. En un cultivo de *Prunus domestica*, a 2018,77 msnm. La ubicación de la finca es Latitud 9; 37; 52.8858939999998927, Longitud 83; 59; 34.9237059999972441. Fecha de colecta: 27 de abril, 2018.
- Tuis de Turrialba. En un cultivo de *Psidium guajava* a 724 msnm. La ubicación de la finca es Latitud 9; 50; 20.4849239999996738, Longitud 83; 34; 47.237548000004494. Fecha de colecta: 18 de mayo.
- San Ignacio de Acosta. Se realizaron muestreos en diversos sitios, tanto en fincas como en árboles próximos a zonas boscosas. Se muestrearon los cultivos de *Psidium guajava* (Latitud 9; 48; 10.187072000000512, Longitud 84; 11; 29.3096919999980707), *Mangifera indica* (Latitud 10; 1; 26.7782589999998791, Longitud 84;15; 8.3770750000258332), *Citrus sinensis* (Latitud 9; 48; 33.1175989999997426, Longitud 84; 7; 3.44055100000069484 y Latitud 9; 48; 4.1205590000026859, Longitud 84; 12; 53.5198969999991019), *Psidium friedrichsthalium* (Latitud 9; 48; 45.9098500000299, Longitud 84; 10; 58.4655759999987749), *Citrus reticulata* (Latitud 9; 48; 10.187072000000512, Longitud 84; 11; 29.3096919999980707). Se realizaron dos colectas por ser un área

frutícola y hay presencia de *C. capitata*. Altitudes: 1095 msnm, 1030 msnm, 1097 msnm y 700 msnm. Fecha de colectas: 27 de abril, 2018 y 25 de mayo, 2018.

En la figura 2 se pueden apreciar los sitios de muestreo y las zonas de vida que identifican las condiciones climatológicas y agroecológicas de las diferentes zonas frutícolas evaluadas.

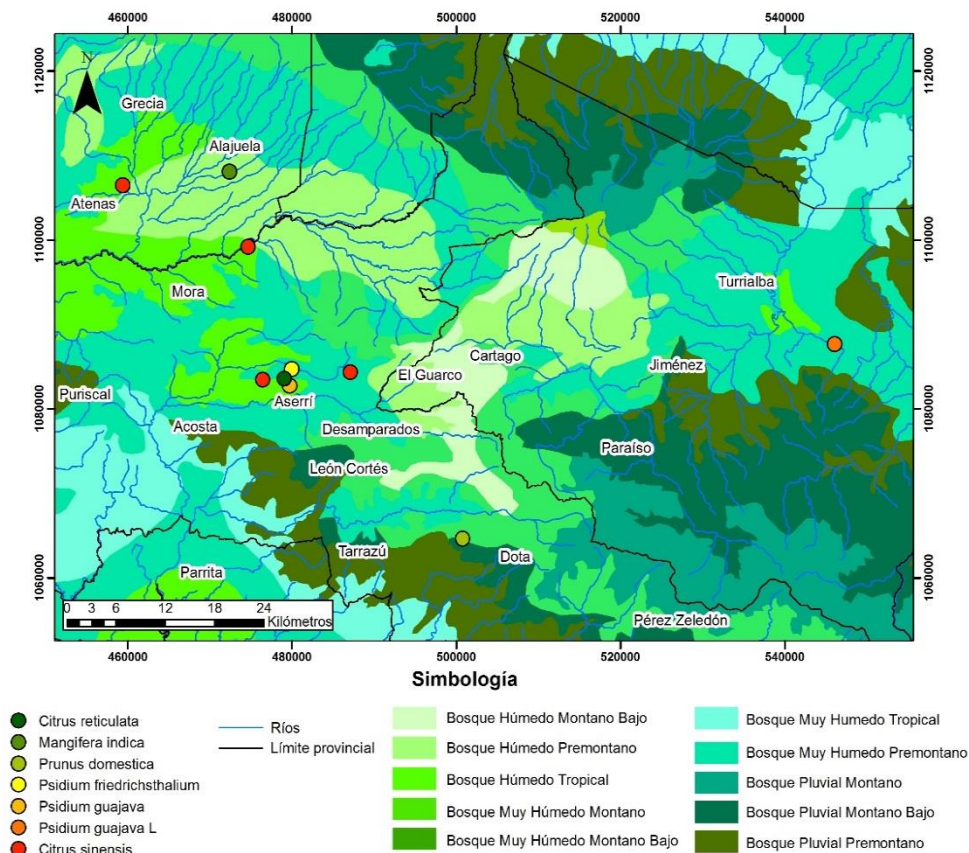


Figura 2. Sitios de muestreo de frutos y puparios de *Ceratitidis capitata* en zonas frutícolas de Costa Rica. Diseño del mapa: Jonathan Reyes, Escuela de Geografía, UCR.

Se seleccionaron los árboles que tenían frutos caídos, de la siguiente manera:

- a) Frutos caídos del árbol: se colectaron al azar frutos caídos del área de goteo (debajo de la copa del árbol). Se colocaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas con la fecha, ubicación y nombre del sitio.
- b) Puparios en suelo: debajo de frutos caídos, se realizaron excavaciones de hasta 5 cm de profundidad debajo de frutos caídos con el fin de obtener una muestra de 200 gramos de suelo por árbol. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas con la fecha, ubicación y nombre del sitio.

2.2.1. Análisis de muestras en laboratorio

Los frutos colectados en el suelo se colocaron sobre estructuras de madera de 40 cm de ancho x 60 cm de largo x 90 cm de alto (figura 3) ubicadas en el Laboratorio de Entomología de la Universidad Nacional. Las estructuras contaban con una bandeja en el fondo, con las mismas medidas, con 30 gramos de polvo de olote para disminuir la humedad. Los soportes poseen un cedazo de 10 mesh, para recuperar larvas y puparios de moscas de la fruta.

Se revisaron los frutos dos veces por semana con el objetivo de recuperar los puparios que salieran de los frutos colectados.

Las muestras de suelo se llevaron al laboratorio donde se tamizaron (4 mesh) para recuperar las pupas que pudieran estar presentes en cada muestra (figura 4). Se seleccionaron los puparios de coloración oscura y los que no emergieron, posteriormente, se lavaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,5%, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Luego se colocaron en Platos Petri de vidrio de 90 x 20 cm, con papel filtro húmedo

y estéril con agua destilada, y se mantuvieron en una cámara bioclimática Frigidare a 80% de humedad relativa y 27 °C.



Figura 3. Estructuras de madera para recuperación de puparios durante la prospección de entomopatógenos.

Se separaron las muestras que presentaron micelio, mal olor o apariencia suave. Los puparios necróticos se tomaron con pinzas estériles y se trasladaron a dos medios diferentes: PDA + ácido láctico y Sabourad + ácido láctico. Se recogió el micelio de los puparios y se inoculó en Platos de Petri de 90 x 20 cm con los medios anteriormente citados según la metodología de Alves (1998).

Después de una semana, el micelio que creció en los medios de cultivo, se retiró con un asa estéril, y se colocó en Platos de Petri de 90 x 20 cm con el medio de cultivo en el cual creció

mejor. Luego de tres días en una cámara bioclimática Frigidaire a 80% HR y 27 °C, se analizaron las diferentes estructuras de cada hongo, con el fin de identificarlos.

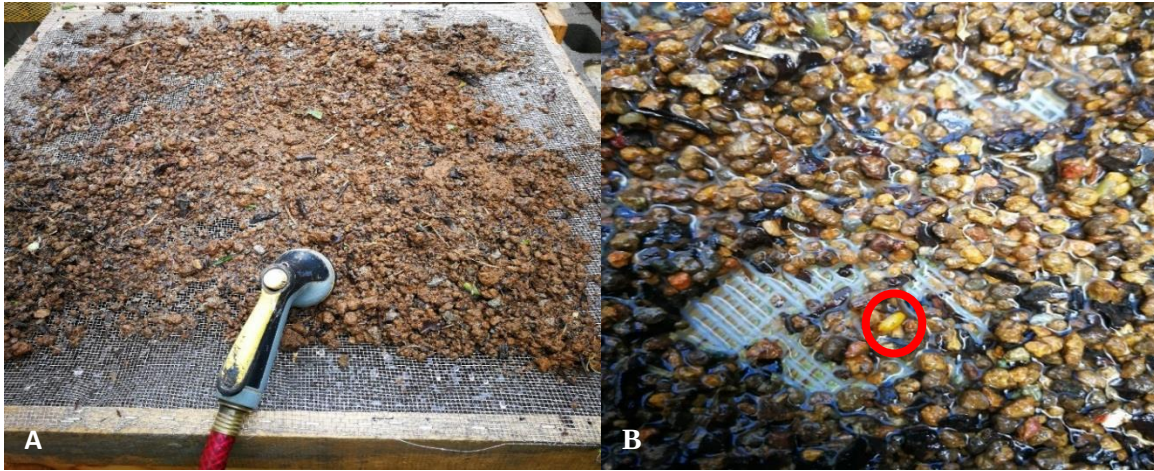


Figura 4. Tamizado de muestras de suelo (A) y localización de puparios en muestras de suelo (B).

2.2.2. Patogenicidad y virulencia de aislados de hongos entomopatógenos sobre *Ceratitis capitata*

Con el fin de evaluar algunas cepas de la micoteca del Laboratorio de Control Biológico de la UNA, se seleccionaron las cepas con potencial comercial de algunas otras plagas de interés comercial para el país, para evaluarlas sobre puparios de *C. capitata*. Para realizar las pruebas de patogenicidad, se tomaron los puparios del pie de cría del Programa Nacional de Mosca de la Fruta, Costa Rica. El método de cría se detalla en Anexo 1.

Los aislamientos evaluados pertenecen al Laboratorio de Control Biológico de la Universidad Nacional. Las cepas seleccionadas fueron las siguientes (factor cepa): Bv-ECA-1, Bv-ECA-9, Bv-ECA-14, Bv-ECA-31, que corresponden a cepas de *Beauveria bassiana*.

También se evaluaron las cepas MTR-ECA-4, MTR-ECA-6 y MTR-ECA-8, que corresponden a *Metarhizium anisopliae*. Las cepas Bv-ECA-9 y Bv-ECA-31 son costarricenses, pero Bv-ECA-1 (donada por el Instituto Nacional de Aprendizaje) y Bv-ECA-14 (donada por el Centro Agronómico Tropical para la Investigación y Enseñanza, CATIE) no cuentan con datos geográficos específicos. La cepa de *M. anisopliae* MTR-ECA-4 es costarricense, pero se desconoce el origen de las cepas MTR-ECA-6 y MTR-ECA-8, ambas donadas por CATIE.

Los ensayos con las cepas de *B. bassiana* se realizaron con puparios procedentes de un mismo lote de producción, de la misma manera se realizó con las cepas de *M. anisopliae*; sin embargo, ambos entomopatógenos fueron evaluados en diferentes momentos y con lotes de producción diferentes debido a que era imposible realizar todas las inoculaciones para cada concentración y cada cepa de cada hongo evaluado.

Anteriormente se evaluaron las cepas Bv-ECA-15 y Bv-ECA-36, pero no se observó patogenicidad, por lo que los datos no fueron incluidos en los resultados.

Se realizaron diversos ensayos previos con el objetivo de mejorar la metodología y adaptarla a las características de los puparios y del experimento. Luego de unas pruebas con gasa de diferentes tamaños de orificios, se determinó que el uso de bolsitas de tergal de 5 cm de alto x 4 cm de alto previamente autoclavadas, con cierre de pabito (figura 5) eran la mejor forma para poder manipular las unidades experimentales durante la desinfección en beakers con 400 ml de agua destilada estéril e hipoclorito de sodio al 0,05% durante 30 segundos. Luego se sumergieron en tres beakers con 400 ml de agua destilada estéril, con el fin de realizar triple lavado.

Se evaluaron cinco tratamientos, que consistían en diferentes concentraciones: 0, 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 conidios/ml (factor concentración). Estas concentraciones son las más utilizadas

para producción comercial, razón por la cual se eligieron para evaluar su virulencia. Los puparios inoculados eran de *C. capitata* con 72 horas de haber entrado al estado de pupa. Cada unidad experimental consistió en 50 puparios, y se utilizaron 6 repeticiones de cada combinación de cepa y concentración de conidios por mililitro utilizado. El diseño experimental consistió en irrestricto con arreglo factorial de dos factores (cepa y concentración) 5 x4 para *Beauveria bassiana* y 3 x 4 para *Metarhizium anisopliae*.



Figura 5. Bolsas de tergal utilizadas para desinfectar los puparios.

Una vez desinfectados los puparios, se procedió a colocarlas sobre una bandeja con papel toalla estéril por 30 minutos dentro de la cámara de flujo laminar.

Cuando el exceso de humedad drenó, se procedió a incorporar cada unidad experimental en filtros de acero inoxidable especiales para té como se muestra en la figura 6. Este tipo de filtro se utilizó para evitar o disminuir la pérdida de puparios durante la inoculación, ya que, al probar con gasa estéril, éstos se quedaban en las diluciones y existía mucha pérdida de

material perteneciente a la unidad experimental. Además, en fibras sintéticas más cerradas, hay mayor posibilidad de que los conidios se queden adheridos, minimizando la cantidad de esporas inoculadas directamente en las pupas. Esta metodología se creó luego de probar con diferentes tipos de materiales, pero se determinó que los filtros de té podían evitar que se salieran los puparios durante el proceso de inoculación.

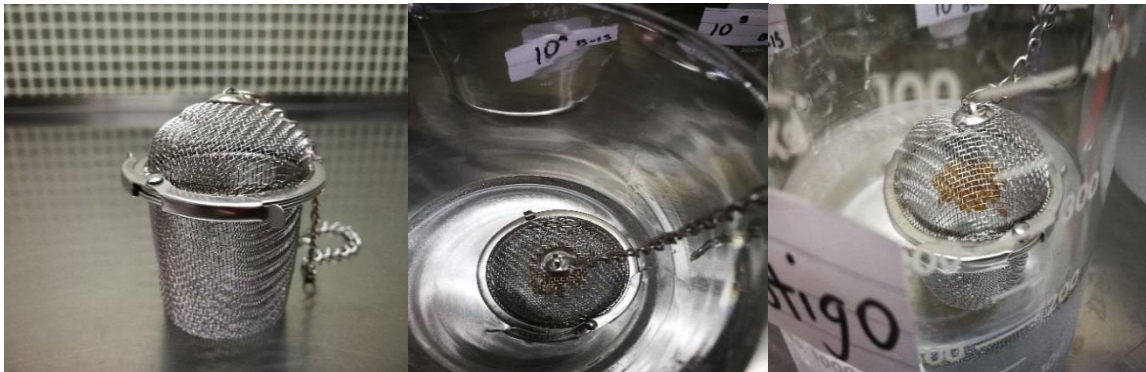


Figura 6. Filtros de té de acero inoxidable esterilizados, utilizados para la inmersión de puparios de *Ceratitis capitata* en las diferentes concentraciones de entomopatógenos evaluados.

Para realizar la inoculación a diferentes concentraciones primero se realizó un conteo de conidios/ml, utilizando la cámara de Neubauer. Se realizó en conteo en los cinco puntos de las dos cuadrículas, tres veces en cada cuadrícula, se obtuvo un promedio por cuadrícula, y luego se realizó un promedio de las tres repeticiones. Con esta información se utilizó la siguiente fórmula para obtener la cantidad de agua destilada estéril que se requiere para llegar a la mayor concentración requerida:

$$\frac{\text{\# de conidios/ml}}{\text{concentración deseada}} \times \text{volumen inicial} = \text{cantidad de agua para aforar}$$

El número de conidios/ml es el promedio obtenido en el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, el volumen inicial corresponde al volumen de agua donde se diluyeron las esporas, y la concentración deseada corresponde a la concentración que se desea evaluar.

La mayor concentración evaluada fue de 1000 000 (1×10^6 conidios/ml), la dilución se realizó con agua destilada estéril más 0,1 % de humectante Tween 20. Se realizó la inoculación mediante inmersión, con un filtro previamente autoclavado. Posteriormente, se fue diluyendo y ajustando la cantidad de agua destilada estéril para cada concentración, hasta llegar a la menor concentración a evaluar: 1000 (1×10^3 conidios/ml) (Figura 7).

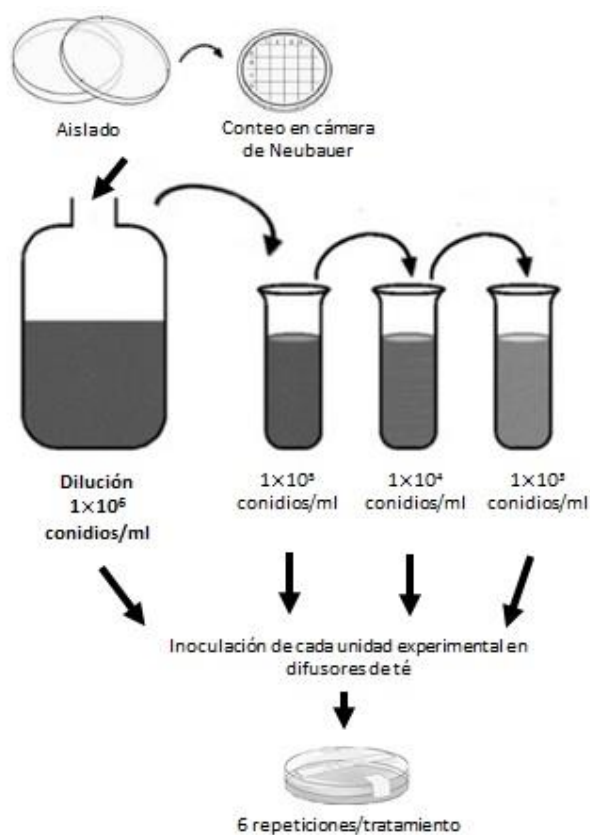


Figura 7. Metodología empleada para preparar las concentraciones de cada cepa e inocular los puparios de *Ceratitis capitata*.

Se utilizó agua destilada estéril como testigo (France *et al.* 2002). Este tratamiento se realizó antes de preparar la disolución con esporas del hongo, para evitar la contaminación en la cámara de flujo laminar.

Los 50 puparios se introdujeron en un plato de Petri de 90 x 20 cm de vidrio, autoclavado, con papel toalla estéril y humedecido con 3000 μ L de agua destilada estéril. Se rotularon, se sellaron con Parafilm® y se incubaron en una cámara bioclimática Frigidaire a 80% HR y 27 °C. Inicialmente se tomaron los testigos y se colocaron en bolsas, luego aparte, en otra bolsa los platos que contenían los puparios inoculados con la mayor concentración, y así sucesivamente.

Se midieron las variables micosis o avance de micelio/día en la unidad experimental durante nueve días, a partir de las 24 horas después de la inoculación y emergencia del adulto. Algunas pupas con micelio visible y no emergidas se disectaron para corroborar la razón de no emergencia.

Los resultados de micosis en el tiempo y de emergencia se evaluaron estadísticamente con un modelo de análisis de regresión logística con corrección por autocorrelación, dado que la respuesta es dicotómica (binomial) y los resultados de los puparios dentro de cada plato Petri no son independientes. Para cada factor experimental se calculó la razón de ventaja (OR) de pupas emergidas de las no emergidas, y de puparios con micosis de puparios sin micosis.

Para estudiar los datos de micosis, se analizó un modelo con el fin de determinar si existía interacción entre la cepa y la concentración, o sus efectos simples.

El cálculo de CL_{50} se realizó mediante un modelo lineal general (GLM) con link de Probit con límites de confianza del 95%, en el programa JMP versión (SAS Institute, versión 9),

únicamente para las cepas Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8. La CL_{90} no se pudo realizar debido a que la virulencia fue inferior al 50% de la población expuesta a las cepas de entomopatógenos.

2.2.3. Observación de entradas naturales de los puparios en alta resolución

Para entender la forma en que los entomopatógenos pueden penetrar hacia el interior del pupario se efectuaron micrografías de la morfología del pupario. Se realizaron diversos barridos completos de las pupas para identificar diferencias con un microscopio electrónico Jeol JSM-6460LV. Se tomaron 25 puparios parasitados y 25 puparios no parasitados con 6 días de haber entrado a estado de pupa. Los puparios no fueron cubiertos con oro debido a los costos elevados de dicho material, por lo que se trabajó con presión de 20 Pa y voltaje acelerador de 10 KV, con el fin de proteger la muestra y obtener imágenes a baja magnificación. Se realizó un barrido en un portamuestras de aluminio con cinta doble fase de carbono conductor, con ángulo de 45 grados y también perpendicular para poder observar los extremos del pupario y buscar la zona espiracular.

2.3 Crecimiento y germinación de las esporas de las diferentes cepas evaluadas

A las cepas evaluadas se les caracterizó por su crecimiento radial y porcentaje de germinación con el objetivo de obtener información para elegir las cepas más promisorias comercialmente. El crecimiento radial se realizó por 7 días, ya que este es el tiempo promedio que tarda una mosca de *C. capitata* en emerger una vez que se ha convertido en pupa en las condiciones de Costa Rica.

2.3.1 Porcentaje de germinación (viabilidad)

Se realizaron diluciones de 1×10^6 conidios/ml de cada cepa evaluada. En un portaobjeto estéril se colocó una alícuota de Agar-Agua líquida y, con un cubreobjetos, previamente flameado, se distribuyó el Agar-Agua sobre el cubreobjetos de manera uniforme. Una vez que el Agar-Agua se solidificó, se dispersó una alícuota de 25 μ L de cada dilución de cada cepa, en seis portaobjetos con Agar (repeticiones).

Cada portaobjetos se introdujo en un plato Petri de vidrio de 90×20 cm de vidrio esterilizado, con papel toalla en el fondo esterilizado y humedecido con agua destilada estéril (cámara húmeda), luego se tapó y se selló con Parafilm® y se llevó a la incubadora a 26 °C y 100% HR. A las 24 y 48 horas después de la inoculación en Agar-Agua, se contabilizó el total de esporas y las esporas germinadas.

2.3.2 Crecimiento radial

Con un sacabocados de 1 cm de diámetro se procedió a cortar un disco de PDA con micelio de cada cepa, y posteriormente, se colocó en un plato Petri de vidrio de 90×20 cm de vidrio previamente autoclavado, con Papa Dextrosa Agar (PDA). Cada disco se colocó a una distancia de 1,5 cm del ancho del plato. Cada plato Petri estaba marcado a la mitad con una línea.

Durante 7 días se midió el desarrollo del micelio a partir de las 24 horas después de inocular los platos Petri. Se utilizó un Caliper Electrónico Digital C3 (Chicago Brand modelo no. 50001) para realizar las mediciones de avance de micelio. Se realizaron cinco repeticiones

y el análisis estadístico utilizado fue un análisis de varianza con medidas repetidas (MR) con el fin de encontrar diferencias entre los patrones de crecimiento del hongo de cada variedad.

2.4 Efecto de dos cepas sobre el desarrollo de *Diachasmimorpha longicaudata* en pupas parasitadas

Se seleccionaron las cepas promisorias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que mostraron mejor control sobre la emergencia de adultos de *C. capitata*. Estas cepas se inocularon por inmersión sobre pupas parasitadas por *D. longicaudata*. Se utilizó la misma metodología de inoculación que el ensayo de virulencia en pupas sin parasitar, pero únicamente a la concentración de 1×10^6 conidios/ml. Los puparios se sometieron a un proceso de lavado, tres veces, con agua destilada estéril e hipoclorito de sodio al 0,5%, al finalizar se colocaron sobre papel filtro para que se secaran.

Las pupas de *C. capitata* parasitadas con *D. longicaudata* fueron criadas de acuerdo con la metodología empleada en el Programa Nacional de Mosca de la Fruta (Anexo 2). Los puparios inoculados fueron irradiados con rayos X, con el equipo Rad Source RS-2400 a 50 Gy por 7 minutos, para evitar la emergencia de las moscas. Este material fue tamizado y expuesto 7 días antes de realizar la inoculación, con el fin de observar el efecto en los parasitoides cercano a su fecha de emergencia.

El ensayo se mantuvo bajo las condiciones del laboratorio de la Universidad Nacional de Costa Rica. Se llevó un registro de la temperatura y humedad relativa utilizando un HOBO UX100-003, que estuvo programado para realizar las mediciones cada hora. Una vez que

emergieron los parasitoides, con el fin de activarlos, se expusieron por 14 días a una iluminación incandescente colocada fuera de las jaulas.

Se midieron los siguientes aspectos de calidad con el objetivo de evaluar si los entomopatógenos obstaculizaron el desempeño del parasitoide:

- **Porcentaje de parasitismo y proporción sexual:** se tomaron 100 puparios al azar del lote, en platos Petri de vidrio de 90 x 20 cm, rotulados, con 6 repeticiones para cada tratamiento, para un total de 600 puparios. Cuando los parasitoides de cada tratamiento emergieron, se contabilizaron, además se obtuvo la proporción de hembras y machos.
- **Habilidad de vuelo:** en baldes de 20 L de capacidad con el interior pintado con pintura de agua negra mate, se colocó un tubo negro de PVC (10 cm de diámetro por 10 cm de alto). Las paredes internas del tubo se impregnaron de fécula de maíz fina sin color ni olor, para evitar que los parasitoides se escaparan caminando. Dentro del tubo se colocó un plato Petri, sin tapa con 50 puparios. El balde se cubrió con tela tergal impregnada de pegamento incoloro y sin olor, con el fin de evitar que los parasitoides que vuelen se pasen a otras unidades, lo cual podría interferir con el conteo de los mismos (figura 8). Cinco días después de la emergencia, los parasitoides que se encontraron dentro del tubo se consideraron sin capacidad de vuelo. Se realizaron cinco repeticiones (Poncio *et al.* 2016). Se contabilizó la cantidad de parasitoides que no lograron salir del tubo y puparios vanos, con estas cantidades se obtuvo el porcentaje de parasitismo.

Esta metodología es una adaptación de invención propia a la metodología aplicada por Cancino *et al.* 2006a, que se realizó con el objetivo de separar las unidades

experimentales para evitar que se convirtieran en una sola estadísticamente. Los cobertores de tergal incoloros se utilizaron para evitar que los parasitoides voladores se pasaran a otras unidades experimentales afectando el conteo (figura 8).



Figura 8. Recipientes utilizados para realizar las pruebas de habilidad de vuelo de los parasitoides.

- **Mortalidad con estrés:** (metodología tomada de Cancino *et al.* 2006a) en jaulas de 50 cm de ancho $\times$ 59,6 cm de alto $\times$ 39 cm de profundidad, de color blanco con malla antiáfido (50 mesh) y vidrio en la cara superior se colocaron 50 puparios de 72 horas (unidad experimental) en un plato Petri de vidrio de 90 x 20 cm, con agua. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Durante 14 días se contabilizó la cantidad de hembras y machos que morían, y al final, se contabilizaron el total de vivos y muertos. Se decidió evaluar la mortalidad con estrés porque la miel que servía de alimento a los parasitoides atrajo hormigas en el laboratorio, las cuales devoraban las pupas aún

no emergidas, y a los parasitoides adultos. Tal motivo generó la necesidad de repetir el ensayo y eliminar el alimento.

Los datos de parasitismo y proporción sexual se analizaron mediante ANOVA, y la comparación de medias se realizó mediante la Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

Los datos de habilidad de vuelo y mortalidad se analizaron estadísticamente con el modelo análisis de regresión logística con corrección por autocorrelación con el paquete estadístico R (R v3.2.2/R Studio (0.99.473) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Prospección de hongos entomopatógenos sobre puparios de *Ceratitis capitata*

El uso de cepas endémicas normalmente genera resultados de patogenicidad y virulencia muy promisorios (Dembilio *et al.* 2010), ya que son organismos adaptados a las diferentes condiciones del sitio donde se desarrolla la plaga, por lo que se realizó una prospección en zonas frutícolas con historial de incidencia de *C. capitata*.

Se realizaron muestreos de acuerdo con la distribución de *C. capitata* en los trampeos realizados por el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) durante los años 2016 y 2017 (figura 1). Con el fin de encontrar material para realizar la prospección, se determinaron algunos lugares donde anteriormente se habían encontrado adultos. Se encontró que especies del

género *Anastrepha* son predominantes en las zonas frutícolas; únicamente en dos localidades se encontró la presencia de *C. capitata*: en un cultivo de mandarina en Acosta y en el cultivo de ciruela en La Pastora, en San Marcos de Tarrazú (cuadro 1), ambas zonas contaban con cultivos aledaños de café.

Jirón y Zeledón (1979) determinaron la presencia de *C. capitata* en diferentes zonas del país y distintos hospederos como mango, zapote, jocote y manzana rosa dentro de zonas boscosas. También Jirón y Soto-Manitiú (1987), encontraron que *C. capitata* se presentaba en altas poblaciones, principalmente en la Meseta Central, esto propone que las poblaciones de *C. capitata* y su localización se han modificado en los últimos 32 años.

Jirón y Hedstrom (1988) muestrearon hospederos de zonas boscosas y cultivos, y encontraron que *C. capitata* estaba presente en guayaba, cas, mango y caimito, en bajas proporciones, de hecho, en la publicación se menciona que se encuentra en bajas poblaciones a lo largo del país, sin causar daño económico, también encontró que dañaba el 5% de las cerezas del café, donde mantiene niveles bajos poblacionales durante el año. Esta información coincide con el hallazgo de pocos puparios de *C. capitata* en las zonas muestreadas, y que en las zonas aledañas a cafetales es donde se encuentran con mayor prevalencia.

Jirón *et al.* (1988) encontraron en el país 28 especies de moscas del género *Anastrepha*, de las cuales las especies *obliqua*, *serpentina* y *striata* son consideradas las plagas más importantes de las frutas de importancia comercial en el país. Sin embargo, en este estudio las especies predominantes en los cultivos muestreados fueron *ludens*, *obliqua* y *striata*.

Esta baja prevalencia de *Ceratitis* se mantiene luego de 31 años, probablemente ha cambiado la preferencia de hospederos y zonas, debido a los cambios geográficos y climáticos. Sin embargo, por deberse a una plaga de importancia cuarentenaria (Gutiérrez 2010; Villaseñor

y Ortiz 2010), se deben mantener las prácticas de control y erradicación, como la técnica del insecto estéril (Juan-Blasco *et al.* 2014).

En el cuadro 1 se pueden ver los hongos asociados a puparios de moscas de la fruta, encontradas en diversas regiones donde se realizaron los muestreos (figura 2), los hongos de los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Mucor* coinciden con los encontrados por Albornoz (2014). Esta investigadora encontró 4 cepas de *B. bassiana*, las cuales no se pudieron encontrar en esta investigación, la metodología de colecta fue muy similar, con la diferencia que la cantidad de suelo colectado fue de 700 g por punto de muestreo y en este estudio se colectó aproximadamente 200 g, además, los cultivos fueron diferentes y la cantidad de puparios encontradas en el suelo fue inferior al 5% de los puparios colectados para esta investigación. Los pocos puparios encontrados redujeron mucho las posibilidades de encontrar entomopatógenos adaptados al suelo. Otra observación que es importante realizar es que las pupas emergidas de frutos colectados estaban muy cerca de hongos del género *Penicillium*, encontrado en los frutos colectados, que entraban en descomposición con el paso del tiempo. Esta posibilidad de contaminación de los puparios podría explicar la razón por la cual casi en todos los sitios de muestreo se encontró este hongo (cuadro 1).

En la investigación de Albornoz (2014) se aprecia un pupario con micelio de donde se extrajo la cepa *B. bassiana*, lo cual es muy similar a la figura 9A, empero en el aislamiento de este estudio lo que se recuperó fue un hongo del género *Penicillium*. Esto puede deberse a que en el suelo existen muchos hongos fitopatógenos con altos niveles de colonización que no le permiten a los entomopatógenos desarrollarse (Bruck 2010, Meyling y Jayek 2010). En algunos estudios se ha encontrado que los hongos entomopatógenos presentan en el suelo

otros nichos y múltiples roles tales como el de reguladores de crecimiento en las plantas (Vega *et al.* 2009).

El suelo es un ambiente muy complejo, en el cual aún no se han determinado muchas de las interrelaciones entre reinos, incluso a nivel de hongos de suelo se desconoce la totalidad de las interacciones (Bruck 2010). Algunas características del suelo pueden limitar el desarrollo de hongos como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, tales como textura del suelo, pH, materia orgánica y contenidos de carbonato (Garrido-Jurado *et al.* 2011). Se ha demostrado que en suelos arcillosos las esporas de *B. bassiana* pueden quedar retenidas, mientras que la retención del suelo para *M. anisopliae* fue mayor en suelos arenosos. La mayoría de los suelos muestreados eran suelos con muchas piedras, suelos franco-arcillosos y arcillosos, pero no se realizaron análisis que pudieran explicar la ausencia o presencia de entomopatógenos.

El manejo del cultivo, y de la finca como tal inciden directamente en generar un ambiente propicio para el crecimiento de ciertos hongos entomopatógenos, en este caso, la prospección se realizó pensando en aspectos como: sitios donde *C. capitata* pudiera ser encontrada y cultivos de interés para el sector agrícola costarricense. Esto limitaba mucho las fechas de colecta debido a la disponibilidad de fruta. La baja prevalencia de la plaga limitó la posibilidad de elegir diferentes tipos de manejo de fincas, y esta variable es de suma importancia, ya que aspectos como la aplicación de herbicidas, como el glifosato, pueden reducir hasta un 50% la virulencia de hongos como *M. brunneum* (Yousef *et al.* 2015).

Cuadro 1. Hongos asociados a puparios de *Ceratitis capitata* colectadas en frutos y suelo, en zonas frutícolas de Costa Rica (2018).

Sitio	Fruto hospedero	Género de mosca	Géneros de hongos asociados a pupas
Santa Eulalia, Atenas Latitud 10; 0; 33.113478999999643, Longitud 84; 22; 14.8114010000013475	Naranja	<i>Anastrepha</i>	<i>Phoma</i>
			<i>Penicillium</i>
			<i>Geotrichum</i>
			<i>Mucor</i>
			Levadura (sin identificar)
Finca Hermanos Morales. Brasil, Santa Ana Latitud 9; 56; 37.319411999996959, Longitud 84; 13; 53.230589999991942	Naranja	<i>Anastrepha</i>	<i>Mucor</i>
			<i>Penicillium</i>
			<i>Phoma</i>
			<i>Fusarium</i>
Acosta Latitud 9; 48; 10.18707200000512, Longitud 84; 11; 29.309691999980707 Latitud 9; 48; 10.18707200000512, Longitud 84; 11; 29.309691999980707 Latitud 9; 37; 52.885893999998927, Longitud 83; 59; 34.923705999972441	Mandarina	<i>Ceratitis</i>	<i>Cladosporium</i>
			<i>Penicillium</i>
			Levadura (sin identificar)
			<i>Fusarium</i>
			Zigomycete
			Levadura (sin identificar)
	Naranja	<i>Anastrepha</i>	<i>Penicillium</i>
	Cas	<i>Anastrepha</i>	Levadura (sin identificar)
			<i>Fusarium</i>
La Pastora, San Marcos de Tarrazú Latitud 9; 37; 52.885893999998927, Longitud 83; 59; 34.923705999972441	Ciruela	<i>Ceratitis</i>	<i>Penicillium</i>
			<i>Fusarium</i>
Tuis, Turrialba Latitud 9; 50; 20.484923999996738, Longitud 83; 34; 47.237548000004494	Guayaba	<i>Anastrepha</i>	Zigomycete
			<i>Phytophthora</i>
			<i>Zigomycete</i>
			Levadura (sin identificar)
Tuis, Turrialba Latitud 9; 50; 20.484923999996738, Longitud 83; 34; 47.237548000004494	Guayaba	<i>Anastrepha</i>	<i>Fusarium</i>
			<i>Phytophthora</i>
			<i>Zigomycete</i>
			Levadura (sin identificar)

En estudios a nivel de laboratorio, se ha encontrado que el proceso de infección y desempeño del hongo entomopatógeno va a depender en gran medida de las condiciones de humedad,

temperatura relativa y de suelo (González-Reyes 2003). La humedad óptima fue de 60 a 100% para obtener la mayor mortalidad, y la humedad del suelo de 5 a 20%, a una temperatura de 25°C. Estos datos no fueron evaluados en las muestras de suelo que se tomaron en esta investigación; sin embargo, es preciso destacar, que la mayoría de las fechas de cosecha, en las cuales se tomó la muestra, coincidía con días soleados y calurosos, únicamente la zona de Tuis de Turrialba y en Acosta estaban cayendo algunas lluvias para el momento del muestreo.

En algunos casos se encontraban sintomatologías en puparios que podían generar sospecha de ser un entomopatógeno; sin embargo, al momento de realizar los aislamientos se encontraban hongos normalmente conocidos como fitopatógenos. En la figura 9 se pueden apreciar pupas enfermas (A y B), que provenían de un cultivo de naranja en Brasil de Santa Ana, finca que tiene un sistema de producción sostenible y el productor se encarga de utilizar abonos a base de las excretas de sus animales.

De la misma forma sucedió con unos puparios encontrados en el cultivo de mandarina en Acosta, los cuales mostraban un micelio verde oscuro, el cual, al aislarlo tenía una coloración rojiza en el medio, en este caso se aisló en PDA y en Sabourad, mostró un mayor crecimiento en el medio Sabourad; sin embargo, al momento de identificarlo pertenecía al género *Penicillium*.

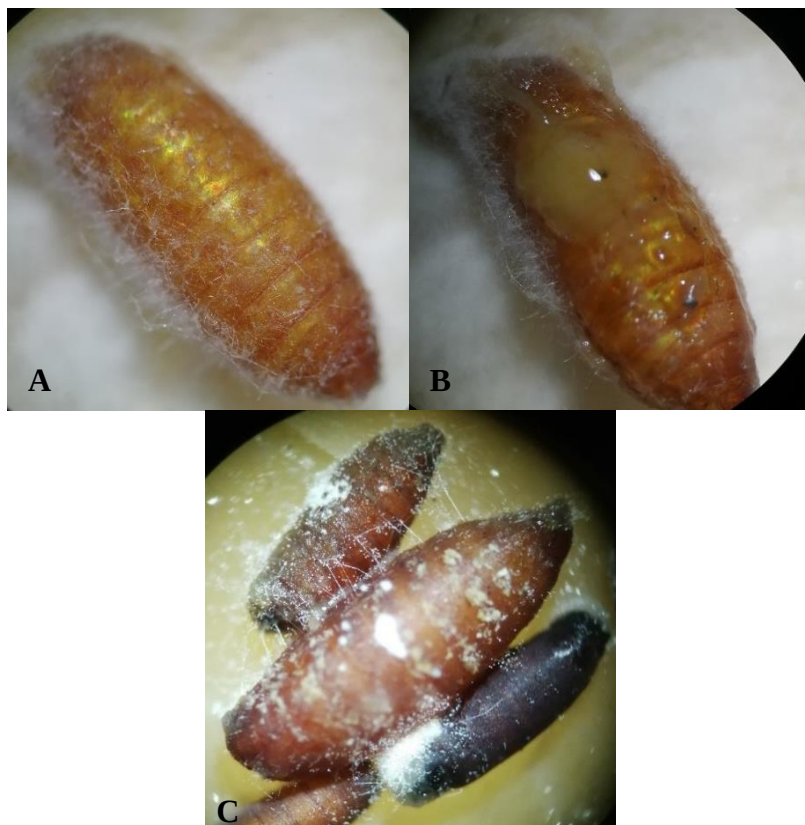


Figura 9. A y C. Puparios de *Ceratitidis capitata* colectadas en Brasil de Santa Ana, con crecimiento fungoso. B. Pupa con pudrición.

Resulta importante para futuros ensayos probar otras metodologías, con el fin de encontrar alguna que permita recuperar únicamente hongos entomopatógenos, como el uso de algún medio de crecimiento con extractos de pupas de *C. capitata*.

3.1.1 Parasitoides encontrados

Algunos de los puparios colectados de los frutos muestreados en campo, contenían pupas parasitadas por las especies que se muestran en la figura 10 y el cuadro 2. Resulta difícil

asegurar el género de tefrítido que fue parasitado; sin embargo, el tamaño de los puparios, sugiere que estos parasitoides se desarrollaron en tefrítidos del género *Anastrepha*.

Cuadro 2. Parasitoides encontrados en puparios de *Ceratitis capitata* durante la prospección.

Sitio	Cultivo	Género del Hospedero	Parasitoide
Acosta	Cas	<i>Anastrepha</i>	<i>Diachasmimorpha longicaudata</i> <i>Doryctobracon zeteki</i> <i>Aganaspis</i> sp.
Acosta	Mango	<i>Anastrepha</i>	<i>Asobara anastrephae</i> (Alysiinae) o <i>A. rubra</i> ?
Acosta, Guaitil	Pupario en suelo	<i>Anastrepha</i>	<i>D. longicaudata</i>
Tuis, Turrialba	Guayaba	<i>Anastrepha</i>	<i>Diachasmimorpha longicaudata</i> <i>Doryctobracon zeteki</i>

Wharton *et al.* (1981) realizaron una prospección de parasitoides en Costa Rica, y encontraron dos braconidos: *Doryctobracon zeteki* (Muesebeck) en moscas del género *Anastrepha* y *Biosteres longicaudatus*, actualmente clasificado como *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead, se atribuye su presencia y abundancia a las liberaciones efectuadas por OIRSA desde 1971. Esta información coincide con lo encontrado durante la prospección (cuadro 2).

Wharton *et al.* (1998) reportó parasitoides de la familia Eucoilidae en Costa Rica, Argentina y Bolivia asociados a moscas de la fruta, entre ellos nombra *Aganaspis* sp. (Brèthes), el cual fue encontrado en cas en la zona de San Ignacio de Acosta (cuadro 2).

De acuerdo con Ovruski *et al.* (2000), el parasitoide de la familia Braconidae, *Asobara anastrephae* (Muesebeck), han sido encontrados en Brasil y Colombia, y concluyen que también en el resto de Latinoamérica. Este parasitoide tiene pocos reportes de parasitismo en tefrítidos, por lo que resulta poco común haber encontrado este parasitoide en el muestreo realizado.

D. zeteki se ha encontrado en guayaba principalmente (Wharton *et al.* 1981), lo que coincide con lo encontrado en el muestreo realizado durante el periodo 2018 (cuadro 2, figura 10).

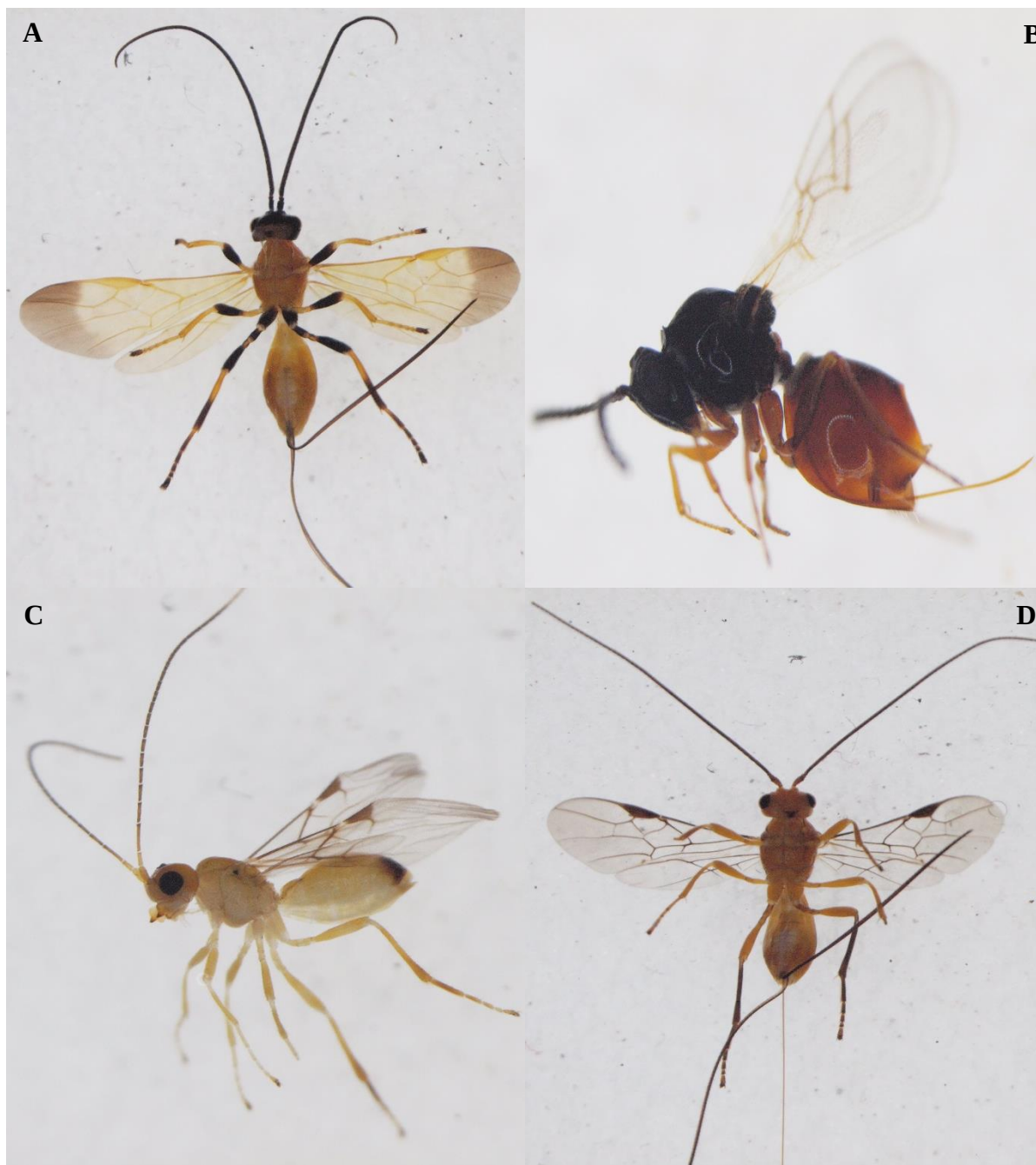


Figura 10. Parasitoides de moscas de la fruta encontrados en muestreo realizado en zonas frutícolas de Costa Rica. **A.** *Doryctobracon zeteki* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae). **B.** *Aganaspis* sp. (Brèthes) (Hymenoptera: Eucoilidae). **C.** *Asobara anastrephae* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae). **D.** *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Identificación realizada por Dr. Paul Hanson y fotografías por Dr. Manuel Solís.

3.2 Determinación de la patogenicidad, virulencia y la Concentración Letal Media (CL₅₀) de hongos entomopatógenos sobre puparios de *Ceratitis capitata*.

Los hongos entomopatógenos han sido clasificados dentro de las clases Entomophthorales y Ascomycota. Sin embargo, el orden con mayor número de entomopatógenos ha sido Hypocreales. *B. bassiana* pertenece al orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae, se ha reconocido por ser un entomopatógeno agresivo, además pueden ser endófitos de plantas facultativos y *Metarhizium* pertenece a la familia Clavicipitaceae, es endófito facultativo de raíces de plantas (Kepler *et al.* 2017).

Los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* han sido los más estudiados en los últimos años, ambos géneros son fácilmente encontrados en residuos de plantas en descomposición, suelo y raíces, pero únicamente *Metarhizium* se ha demostrado su adaptación a la rizosfera. *M. anisopliae* puede penetrar tejidos radicales, e intercambiar nitrógeno, además se ha encontrado como promotor de crecimiento radical de las plantas (Kepler *et al.* 2017).

3.2.1 Patogenicidad de cepas de *Beauveria bassiana* sobre pupas de *Ceratitis capitata*

Shapiro-Ilan *et al.* (2005) plantea que el término correcto para definir patogenicidad es la habilidad de producir enfermedad en invertebrados, lo cual es un término cualitativo. Por lo tanto, la patogenicidad se demuestra con las evaluaciones de mortalidad ligadas a factores externos, como la exposición del huésped al patógeno, incluyen infectividad, que está definida como entrada, establecimiento y propagación del agente de la enfermedad. La patogenicidad se ve como un prerequisite de la virulencia y está definido genéticamente.

En esta investigación se logró medir la patogenicidad y virulencia de las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, ya que al compararse con el testigo absoluto se aprecian diferencias estadísticas capaces de mostrar un efecto de los entomopatógenos sobre puparios de *C. capitata* tanto a nivel de micosis como a nivel de mortalidad en pupas (figuras 12, 14, 16 y 18), sugerida por la no emergencia.

Debido a la morfología de la pupa (la cual se explorará más adelante a través de micrografías) resulta complicado establecer si la mortalidad de la pupa corresponde a la acción del entomopatógeno evaluado. Por lo tanto, se evaluó emergencia del adulto con el fin de corroborar si el entomopatógeno tuvo algún efecto sobre el desarrollo de la pupa. Ambos parámetros se utilizaron para determinar la patogenicidad y virulencia de las cepas evaluadas.

3.2.1.1 Micosis presente en puparios inoculados con *B. bassiana*

En investigaciones realizadas por Hernández Díaz-Ordaz *et al.* (2010) se ha evaluado el uso de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre moscas de la fruta. Se han encontrado que la cepa Bb₂₆ de *B. bassiana* fue la cepa más promisorio para adultos, controlando en un 100%. En estado de larva, *Anastrepha* sp. presentó 100% de mortalidad por *B. bassiana* en condiciones de laboratorio (Arias-López *et al.* 2014), y en estado de adulto también se han reportado mortalidades del 100% (Toledo *et al.* 2006a).

Este entomopatógeno ha sido ampliamente estudiado debido a que se ha encontrado en diversidad de familias y órdenes de insectos, como Coleoptera (France *et al.* 2002), así como en diversidad de microclimas, como en Groenlandia, en condiciones árticas (Meyling *et al.* 2012).

Los puparios del testigo no presentaron micosis, por lo que no fueron considerados en el análisis de comparación para la variable puparios con micosis, tampoco fueron incluidos en la figura 11. Estos datos muestran que no existió contaminación y que el efecto de inoculación de los demás tratamientos evaluados generó la micosis observada y descrita a continuación.

Durante el último día de evaluación (9 ddi) no existió interacción cepa*concentración, pero el efecto de las cepas fue significativo ($p= 7,38 \times 10^{-6}$) y el de la concentración también ($p= 0,00851$).

De acuerdo con los resultados que se observan en el cuadro 3, la cepa Bv-ECA-1 obtuvo mayor ventaja de tener micelio respecto a las demás cepas (87% más que las cepas Bv-ECA-14 y Bv-ECA-31 y 150% más que la cepa Bv-ECA-9 seguida de la cepa Bv-ECA-31. Las cepas Bv-ECA-9 y Bv-ECA-14 no presentaron diferencias entre sí en cuanto a ventajas de tener micelio.

Cuadro 3. Ventaja de puparios con micosis en las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* evaluadas a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.

Comparación entre cepas	Razón de ventaja	Probabilidad asociada
Bv-ECA-1 versus Bv-ECA-14	1,8781	0,0013
Bv-ECA-1 versus Bv-ECA-31	1,8781	0,0013
Bv-ECA-1 versus Bv-ECA-9	2,5067	0,0000
Bv-ECA-31 versus Bv-ECA-14	1,1833	0,0000
Bv-ECA-14 versus Bv-ECA-9	1,3347	0,3662
Bv-ECA-31 versus Bv-ECA-9	1,5792	0,0487

En la figura 11 se puede apreciar que esta cepa obtuvo valores de 28,28% de puparios con micelio, seguida de la cepa 31 con 22,48% de puparios con micelio. La virulencia de un hongo entomopatógeno depende de muchos factores, entre ellos la germinación y desarrollo del micelio (Pedrini *et al.* 2007). Esto muestra la gran importancia de evaluar el desarrollo de la micosis después de la inoculación y la caracterización de cada cepa respecto a su tasa de crecimiento. En un estudio realizado en África, en el cual se evaluaron cepas de *B. bassiana* sobre puparios de Mosca del Mediterráneo, se obtuvieron porcentajes de micosis mayores al 80% (Ekesi *et al.* 2002) y coincide con la mortalidad encontrada. En la figura 12C y D se puede apreciar un pupario con micelio que, al ser disectado, se puede comprobar la colonización del hongo en la pupa. Sin embargo, algunas veces se pudo apreciar presencia de micelio en el pupario, pero había emergencia de adulto.

Cuadro 4. Ventaja de puparios con micosis en las diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana* evaluadas a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.

Comparación entre concentraciones	Razón de ventaja	Probabilidad asociada
1 x 10 ⁶ conidios/ml versus 1 x 10 ⁵ conidios/ml	1,6784	0,0000
1 x 10 ⁶ conidios/ml versus 1 x 10 ⁴ conidios/ml	1,2762	0,0000
1 x 10 ⁶ conidios/ml versus 1 x 10 ³ conidios/ml	1,5533	0,0000
1 x 10 ⁴ conidios/ml versus 1 x 10 ⁵ conidios/ml	1,3152	0,4719
1 x 10 ⁴ conidios/ml versus 1 x 10 ³ conidios/ml	1,2171	0,0000
1 x 10 ³ conidios/ml versus 1 x 10 ⁵ conidios/ml	1,0806	0,9777

El efecto de la concentración se muestra en el cuadro 4. Se aprecia que la concentración 1×10⁶ conidios/ml obtuvo mayor ventaja de tener micelio que todas las concentraciones

evaluadas. Sin embargo, la concentración 1×10^5 conidios/ml no presentó diferencias significativas en la ventaja de tener micelio con las concentraciones 1×10^4 conidios/ml y 1×10^3 conidios/ml. La concentración 1×10^4 conidios/ml sí muestra mayor ventaja de tener micelio que la concentración 1×10^3 conidios/ml.

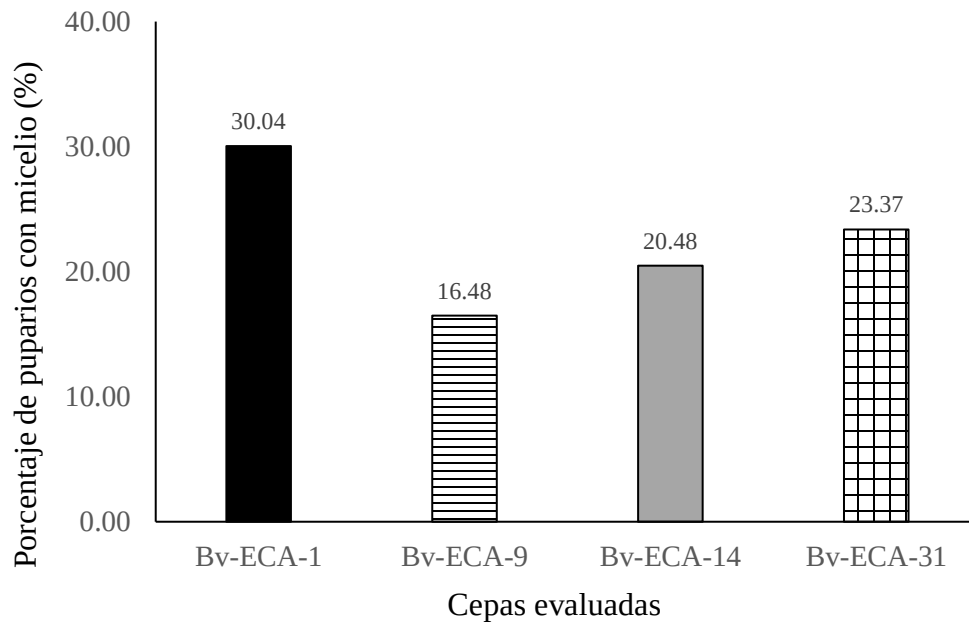


Figura 11. Micosis en puparios de *Ceratitis capitata* en la muestra. Las cepas evaluadas fueron Bv-ECA-1, Bv-ECA-9, Bv-ECA-14 y Bv-ECA-31 de *B. bassiana* (n= 6).

Ekesi *et al.* (2002) también encontró que la edad de la pupa influía en la micosis de las dos cepas de *B. bassiana* evaluadas, donde las pupas con más de 48 horas obtenían micosis inferiores a 25%. Las larvas al convertirse en pupas cuentan con un pupario esclerotizado y con una cutícula cerosa, por lo tanto, una pupa de mayor edad presenta menores posibilidades de ser atacada por un hongo, ya que éste se encuentra con una barrera física que le impide penetrar y atacar la mosca en desarrollo (Cossentine *et al.* 2010).

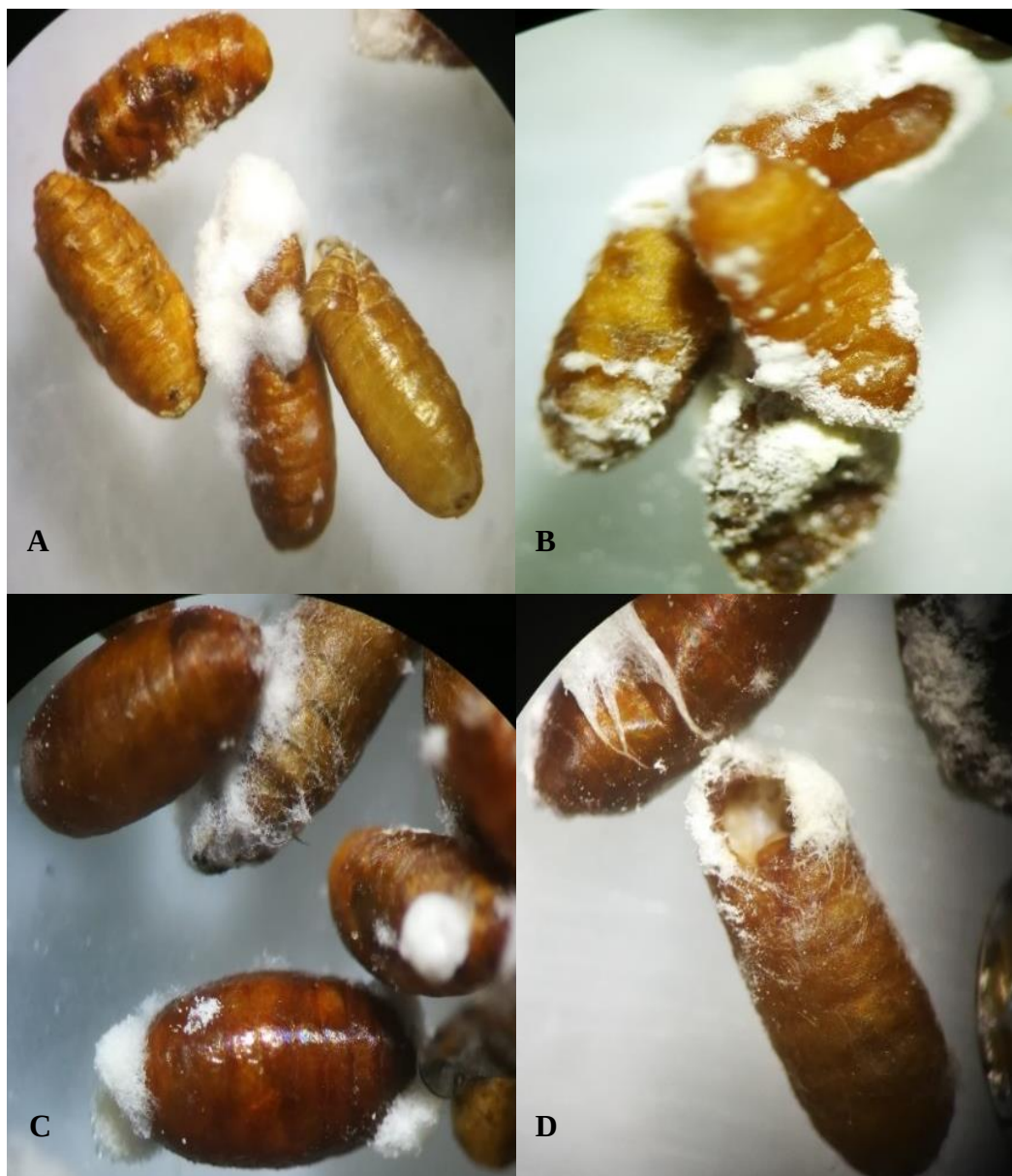


Figura 12. A y C. Puparios con micosis, inoculadas con la cepa Bv-ECA-1 (9 ddi) a una concentración de 1×10^6 conidios/ml. B y D. Puparios disectados para corroborar patogenicidad.

En esta investigación las pupas evaluadas tenían 72 horas de edad. Para la muestra de la cepa Bv-ECA-1 todas las concentraciones obtuvieron micosis superiores al 25%, las muestras de

la cepa Bv-ECA-31, sólo la concentración de 1×10^6 conidios/ml, obtuvo micosis superior a 25%, las demás muestras de las cepas, independientemente de sus concentraciones, no mostraron micosis superiores a 25%. Estos resultados sugieren que la cepa Bv-ECA-1 podría ser evaluada como controlador de pupas de *C. capitata* en una segunda fase experimental, a nivel de campo o de invernadero. Además, pese a la edad avanzada de la pupa, las cepas evaluadas fueron capaces de generar micosis sobre el hospedero.

Beris *et al.* 2013 evaluaron micosis sobre puparios de 96 a 120 horas y obtuvieron resultados de 55% de puparios con micosis, provocadas por las cepas de *B. bassiana*. Los adultos presentaron micosis en todas las cepas y concentraciones casi en su totalidad, después de los tres días de emergidos. Quesada-Moraga *et al.* (2006) en la primera etapa utilizó cepas de menos de 24 horas y obtuvo que las cepas de *B. bassiana* Bb-1333 y EABb 01/103-Su en suspensión causaron mortalidades de más del 50%, pero evaluaron otras formas de inoculación a nivel de laboratorio, como inocular los puparios colocándolos sobre arena con esporas de cada cepa, y lograron elevar la virulencia a 70%.

En el caso de algunas moscas de la fruta, como *Rhagoletis indifferens* Curran (Diptera: Tephritidae), que fueron inoculadas con cepas de *B. bassiana*, se observó que pupas con menos de 24 horas, fueron controladas únicamente en menos de un 20%, pero en estado de larva se apreció más del 80% de control, también a nivel de prepupa se probó, mostrando en el interior del pupario micosis, condición que aumentó al aplicar el doble de la dosis (Cossentine *et al.* 2010). De la misma manera la figura 12 muestra que *B. bassiana* es capaz de penetrar el pupario y colonizar, pese a que el pupario es una estructura fuerte y difícil de penetrar.

3.2.1.2 Emergencia de adulto de las pupas inoculadas con cepas de *B. bassiana*

En esta variable se incluyeron los testigos dentro del análisis estadístico, ya que en ellos sí se presentó emergencia de adulto, y era muy importante compararlos con las cepas evaluadas para determinar si existía patogenicidad. La interacción entre cepa-concentración fue significativa ($p=0,01019$) por lo que las comparaciones entre cepas se hicieron por separado para cada concentración.

En el cuadro 5 se puede apreciar que en el tratamiento testigo se encontraron razones de ventaja de emergencia de adulto significativas para las comparaciones que no incluían la cepa Bv-ECA-1. La cepa Bv-ECA-9 obtuvo mayor ventaja que la cepa Bv-ECA-31 y, la cepa Bv-ECA-14. La cepa Bv-ECA-1 no mostró diferencias significativas con ninguna de las cepas. Sin embargo, la cepa Bv-ECA-1, que no presentó diferencias en el tratamiento testigo, mostró de forma consecuente en casi todas las concentraciones evaluadas una menor ventaja de emergencia de adulto. En la concentración 1×10^3 conidios/ml obtuvo 46% menos que la cepa Bv-ECA-14, 34% menos que la cepa Bv-ECA-31 y 89% menos que la cepa Bv-ECA-9; en la concentración 1×10^5 conidios/ml presentó 28% menos que la cepa Bv-ECA-14, 35% menos que la cepa Bv-ECA-31 y 78% menos que la cepa Bv-ECA-9 y en la mayor concentración, a 1×10^6 conidios/ml se puede observar 78% menos que la cepa Bv-ECA-14, 47% menos que la cepa Bv-ECA-31 y 69% menos que la cepa Bv-ECA-9.

Cuadro 5. Ventaja de emergencia de adultos para las cepas evaluadas de *Beauveria bassiana* a diferentes concentraciones (0 conidios/ml= Testigo, 1×10^3 conidios/ml, 1×10^4 conidios/ml, 1×10^5 conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml) (n= 6). Prob. Asoc: probabilidad asociada. Valores en negrita son significativos.

Comparación entre cepas	0 conidios/ml		1×10^3 conidios/ml		1×10^4 conidios/ml		1×10^5 conidios/ml		1×10^6 conidios/ml	
	Razón de ventaja	Prob. asoc.	Razón de ventaja	Prob. asoc.	Razón de ventaja	Prob. asoc.	Razón de ventaja	Prob. asoc.	Razón de ventaja	Prob. asoc.
Bv-ECA-1 versus Bv-ECA-14	4,4587	0,1388	0,5436	0,0000	1,5325	0,9036	0,7182	0,0000	0,2176	0,0000
Bv-ECA-1 versus Bv-ECA-31	1,9408	0,8702	0,6596	0,0000	0,4358	0,0000	0,3533	0,0000	0,5313	0,0000
Bv-ECA-1 versus Bv-ECA-9	1,0359	10,000	0,1134	0,0000	0,4833	0,0000	0,2221	0,0000	0,3137	0,0000
Bv-ECA-14 versus Bv-ECA-31	0,4353	0,0000	1,2133	0,9951	0,2844	0,0000	0,4918	0,0000	2,4418	0,3888
Bv-ECA-14 versus Bv-ECA-9	0,2323	0,0000	0,2086	0,0000	0,3154	0,0000	0,3092	0,0000	1,4416	0,9535
Bv-ECA-31 versus Bv-ECA-9	0,5337	0,0000	0,1719	0,0000	1,1088	0,9996	0,6287	0,0000	0,5904	0,0000

Sin embargo, a la concentración 1×10^4 conidios/ml la cepa Bv-ECA-1 obtuvo 53% más ventaja de emergencia que la cepa Bv-ECA-14; pero 56% menor ventaja de emergencia de adulto respecto a la cepa Bv-ECA-31 y 52% menor ventaja de emergencia respecto la cepa Bv-ECA-9. Este comportamiento es el responsable de la interacción que se aprecia en cepa y concentración, tanto en el análisis estadístico mostrado en el cuadro 5, como en la representación muestral de la figura 13.

En la figura 13 se puede apreciar la interacción entre las cepas Bv-ECA-31 y Bv-ECA-14, las cuales a la menor concentración la cepa Bv-ECA-14 presentó mayor porcentaje de adultos

emergidos, mientras que a una concentración de 1×10^4 conidios/ml se observó el efecto contrario muy marcado. A una concentración de 1×10^5 conidios/ml la cepa Bv-ECA-31 mostró mayor porcentaje de emergencia, y a una concentración 1×10^6 conidios/ml se observó el efecto contrario.

El comportamiento muestral de la cepa Bv-ECA-1 evitó la emergencia de 50,29% en una concentración de 1×10^6 conidios/ml, y a esa misma concentración logró un 30,04% de puparios con micelio. Estos datos coinciden mucho con los que encontraron Quesada-Moraga *et al.* (2006), quienes evaluaron cepas autóctonas de España, en pupas y adultos, en adultos se inocularon en la zona ventral y mostraron mortalidades de 0 a 100%, pero al inocular las pupas de 24 horas por inmersión (grupos de 10 y 3 repeticiones), únicamente la cepa de *B. bassiana* Bb-1333 causó el 50% de mortalidad, en una segunda fase, inocularon arena con cinco cepas y colocaron larvas del tercer estadio a punto de convertirse en pupa, y obtuvieron mortalidades de 52,5 a 70,0%, esto indica que a mayor edad de la pupa, menores son las posibilidades de infección por parte de los entomopatógenos, lo que se explicará más adelante cuando se describa a través de micrografías la morfología de las pupas de 72 horas.

La virulencia es medida mediante la CL_{50} (concentración letal media), se define como el grado de patogenicidad en un grupo de especies y no se encuentra definido genéticamente (Shapiro-Ilan *et al.* 2005). La CL_{50} obtenida es de $1 \times 10^{5,23}$ conidios/ml, lo que indica que a una concentración aproximada de 100 000 conidios/ml es promisorio para controlar la emergencia del 50% de las pupas. En la investigación de Quesada-Moraga *et al.* (2006) también evaluaron la cepa Bb-1333 a concentraciones de 1×10^5 a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (cfu) sobre pupas y obtuvieron una CL_{50} de $4,9 \times 10^5$ cfu/ml, información muy similar a la obtenida en este ensayo.

Esta concentración obtenida es mucho más baja que la obtenida por Porras y Leucona (2008), quienes realizaron pruebas con adultos de *C. capitata*, y obtuvieron valores para la CL₉₀ entre 1×10^9 para la cepa Bb 238 y $3,8 \times 10^{11}$ para la cepa Bb 26, pero fue evaluadas en adultos. También se han evaluado cepas de *B. bassiana* sobre adultos de *Bractocera* spp. en China a concentraciones 1×10^8 conidios/ml (Mar y Lumyong 2012). Esto sugiere que la patogenicidad es mucho mayor posiblemente por la cantidad de entradas que poseen estos insectos en esta etapa. Sin embargo, France *et al.* (2002) evaluaron cepas de *B. bassiana* sobre coleópteros y obtuvo una CL₅₀ de $1 \times 10^{4,7}$ conidios/ml, de acuerdo con las observaciones de los autores, luego de 72 horas se observaron signos de micosis, mientras que en esta investigación las cepas Bv-ECA-14y Bv-ECA-31 mostraron alrededor de 2% de puparios con micosis 24 horas después.

Normalmente se puede apreciar en este tipo de investigaciones, que conforme aumenta la concentración, aumenta la mortalidad (Dias de Almeida *et al.* 2007), empero en este ensayo no se apreció este comportamiento en todas las cepas ni para todas las concentraciones. Se cree que el efecto observado, pudo deberse en gran parte a la oportunidad que tuvieron los hongos de ingresar por las aperturas naturales de los puparios de *C. capitata*, que se describirán mediante micrografía en el apartado 4.

En investigaciones con el psílido de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), se evaluaron cepas de *B. bassiana* a las concentraciones 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 and 1×10^9 conidios/ml sobre ninfas y se obtuvieron CL₅₀ de $0,4 \times 10^7$ conidios/ml (Ferreira-Pinto *et al.* 2012); este trabajo sugiere, junto con los demás, que normalmente las cepas de *B. bassiana* son más virulentas a concentraciones más altas que las utilizadas en esta investigación.

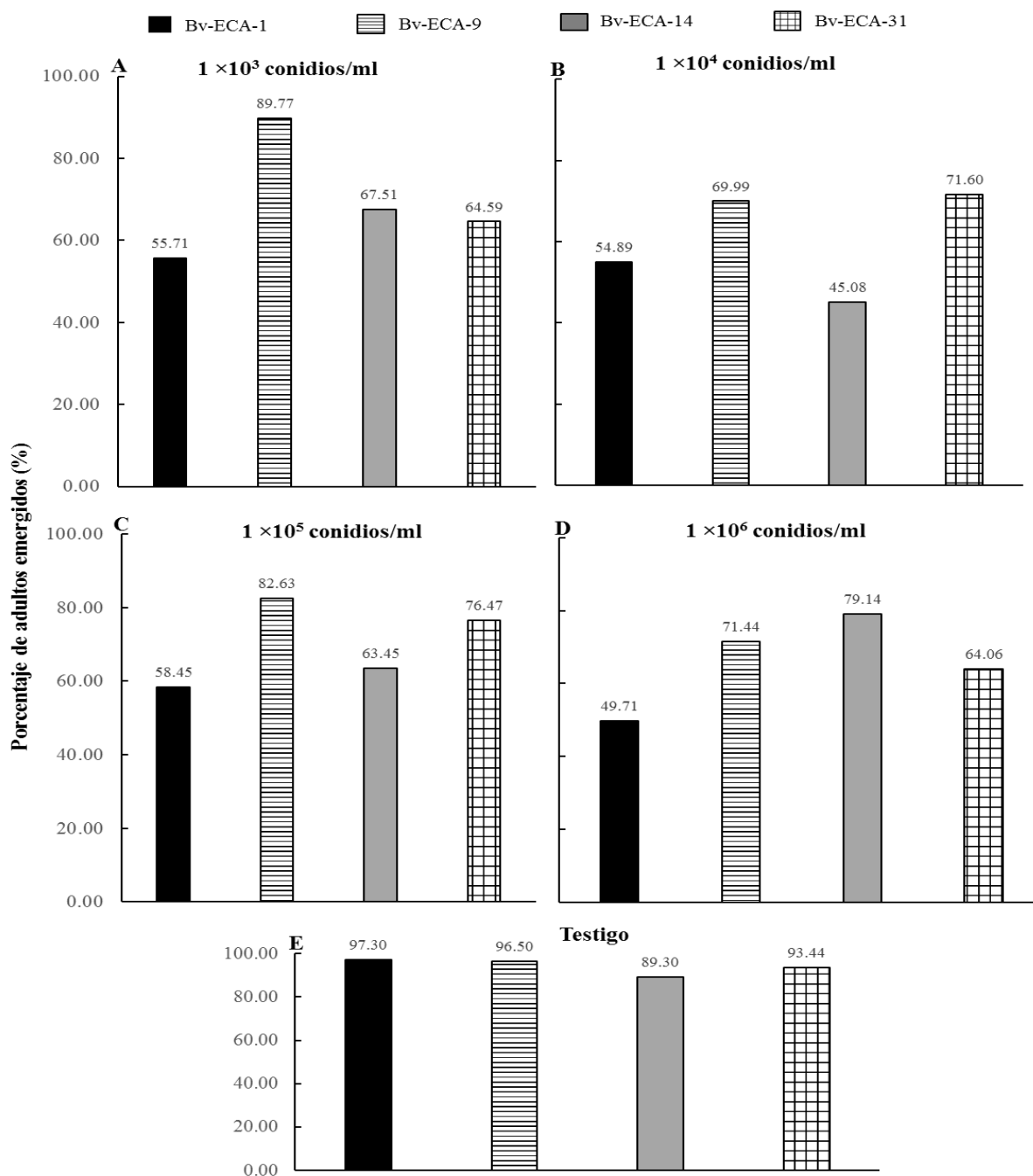


Figura 13. Emergencia de adultos en puparios de *Ceratitidis capitata* inoculadas con las cepas Bv-ECA-1, Bv-ECA-9, Bv-ECA-14 y Bv-ECA-31 de *Beauveria bassiana* a diferentes concentraciones 1×10^3 (A), 1×10^4 (B), 1×10^5 (C), 1×10^6 (D) conidios/ml y 0 (Testigo) (E). (n= 6) en la muestra.

Esta investigación mostró que existen cepas de *B. bassiana* capaces de interferir con la emergencia de adultos de *C. capitata*, aplicando el hongo sobre pupas con 72 horas, en condiciones experimentales. Esta primera prueba de laboratorio dio como resultado que la cepa Bv-ECA-1 es promisoría para el control de *C. capitata*, pero se hace imprescindible la evaluación en una segunda etapa, en condiciones de campo, donde las interacciones con otros microorganismos podrían cambiar el panorama.

De acuerdo con los datos muestrales, la cepa Bv-ECA-1 evitó la emergencia del 50,29% de los adultos con la concentración 1×10^6 conidios/ml, y obtuvo porcentaje de puparios con micosis de 30% a esa misma concentración. Beris *et al.* (2013) evaluaron mortalidad de pupas de 96 a 120 horas inoculadas con *B. bassiana* a una concentración de $1,5 \times 10^7$ conidios/ml, y obtuvieron resultados de 18,7 a 23,9%. En esta investigación las cepas Bv-ECA-31, Bv-ECA-1 y Bv-ECA-14 obtuvieron mortalidades de 20,86% a 69,83%, con concentraciones inferiores a las utilizadas por los investigadores anteriormente citados. Únicamente la cepa Bv-ECA-9 presentó mortalidades de 10,23 a 30%, las cuales fueron inferiores a las demás cepas, pero similares a las encontradas por Quesada-Moraga *et al.* (2006) y Beris *et al.* (2013).

Ekesi *et al.* (2002) inocularon cepas ICIPE 44 e ICIPE 82 de *B. bassiana* que provenían de Kenya, a una concentración de 1×10^8 conidios/ml, en arena y colocó larvas del tercer estadio a punto de convertirse en pupa, obtuvieron mortalidad de más del 80%. Una vez más coincide que la larva, de cuerpo blando, con más espiráculos y entradas naturales para el hongo, son potencialmente más infectivos.

Según Song y Feng (2011) algunas cepas de *B. bassiana* que se habían probado sobre *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae), inicialmente no mostraban patogenicidad; sin embargo, al realizar diversas “pasadas del hongo sobre los insectos, el hongo entomopatógeno se comenzó a tornar más virulento. Por lo tanto, resulta interesante realizar un pequeño ensayo con Bv-ECA-1 para poder observar si su virulencia aumenta al inducirle la colonización e infección a las pupas *C. capitata*.

Existen aspectos que han sido subestimados al momento de considerar la adaptación de un entomopatógeno en el agrosistema, además de aspectos abióticos como radiación, humedad, temperatura, pH del suelo. Y bióticos como su interacción con el filoplano, que puede ser una gran limitante, ya que aspectos como microbiota presente, aspectos químicos como la composición de la cutícula de las plantas y la influencia de residuos de plaguicidas pueden ser responsables del éxito o fracaso del entomopatógeno utilizado (Jaronski 2010).

En el caso de las pupas de moscas de la fruta, el ambiente del suelo resulta un gran reto, ya que, además de la cantidad de hongos y microbiota que se encuentra en el suelo, algunas raíces generan efectos supresivos sobre los esfingolípidos (Luo *et al.* 2015). Estos son parte del metabolismo de *B. bassiana*, el cual los utiliza para tener una regulación metabólica flexible a los cambios del ambiente, por esto, algunos exudados pueden dañar su adaptación y desempeño. Estos aspectos deben ser considerados para una posterior evaluación en campo.

Las ventajas del uso de entomopatógenos como *B. bassiana* se ha estudiado ampliamente, además de figurar como un excelente controlador de un amplio rango de insectos, Este ha mostrado capacidad para distribuirse de forma endófito en las plantas, como, por ejemplo, en la caña de azúcar, se encontró que el método para inocularla fue mediante inyección al tallo,

en el cual se encontró una alta capacidad de colonización. Sin embargo, se apreció poca movilidad del hongo dentro de la planta.

Otros métodos como el drench al suelo y la aspersión a las hojas, verificaron un aumento de raíces (Donga *et al.* 2018), también se ha encontrado en cultivos como la alcachofa (Guesmi-Jouini *et al.* 2014) con la capacidad de colonizar tejidos. Esta técnica permite mantener al entomopatógeno “sistémicamente” dentro de la planta, para protegerlo de las adversidades de algunos factores bióticos o abióticos, capaces de afectar gravemente su desempeño en el control de plagas insectiles. Sin embargo, estas herramientas para el control de pupas de *C. capitata* no funcionarían, ya que ellas se encuentran en el suelo y la pupa no tiene contacto con la planta, por lo que pensar en una inoculación mediante drench se hace necesario.

Dentro de las posibilidades de aplicación de hongos, está la técnica del insecto estéril, la cual es aplicada en diversas partes del mundo para el control de *C. capitata*. Se evaluaron cepas de *B. bassiana* sobre los machos estériles, con el fin de evaluar la capacidad de dispersión a las hembras silvestres (Novelo-Rincón *et al.* 2009) y encontraron que esta técnica no afecta el desempeño sexual de los mismos, y es excelente forma de transmisión horizontal. Esto respalda la posibilidad de utilizar las moscas adultas que emergen de los puparios que se controlaron con el hongo, para infectar a las demás moscas. En la figura 14 se aprecia la capacidad de la cepa Bv-ECA-1 de infectar rápidamente a los adultos que emergieron de pupas tratadas con la cepa.

Actualmente, la ingeniería genética ha permitido modificar algunas características en algunos entomopatógenos como *B. bassiana*, induciendo mutaciones para mejorar algunas características como virulencia, la cual se ha alterado a través de la delección de la proteína terminal O-mannosyltransferases (He *et al.* 2017). Incluso se ha tratado de generar características fenotípicas que le permitan adaptarse mejor a ciertos ambientes hostiles para

su crecimiento (Fan *et al.* 2011). Ante esto, se hace necesario investigar cuáles son las verdaderas limitantes que enfrentaron los hongos entomopatógenos para poder infectar las pupas de *C. capitata*, e identificar los genes que permitan inmunosuprimir las respuestas de defensa, para que el hongo sea más virulento.

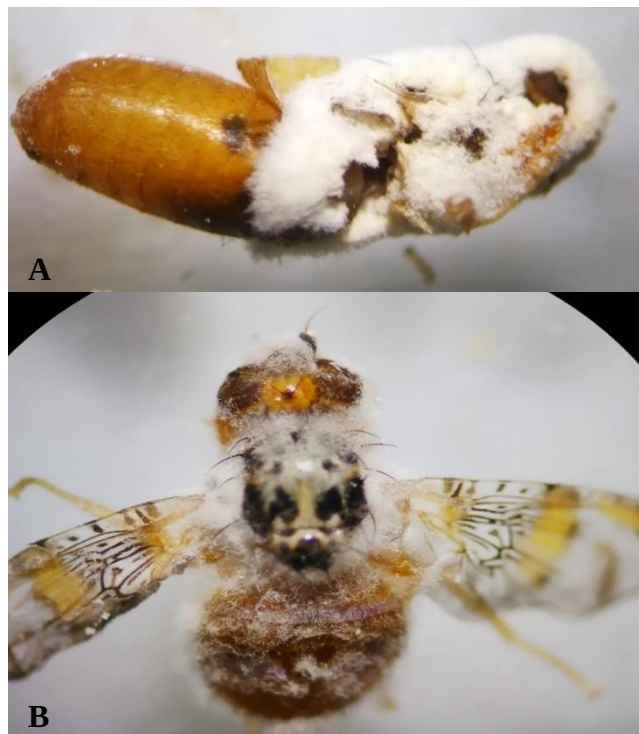


Figura 14. **A.** Adulto de *Ceratitits capitata* en proceso de emergencia del pupario, infectado por cepa Bv-ECA-1 concentración 1×10^6 conidios/ml. **B.** Adulto de *Ceratitits capitata* infectado por cepa Bv-ECA-1 concentración 1×10^6 conidios/ml.

Dentro de las diferentes fases de investigación que conlleva el desarrollo de un entomopatógeno a nivel comercial, se encuentra el de generar formulaciones adecuadas para aplicar el hongo, potenciar su adaptación y sobrevivencia. Diversos sustratos se han evaluado para la producción masiva de *B. bassiana* (Jaronski 2014), uno de ellos es el caolín. Storm *et al.* (2016) encontraron un efecto sinergista entre el hongo y caolín, se probó una

formulación del aislamiento IMI389521 con caolín para controlar adultos de *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) (Coleoptera: Silvanidae) en trigo almacenado, a una dosis de 1×10^{10} conidios/kg. Se encontró que el caolín aumenta la efectividad hasta en un 88% en el día 7, y hasta 99% en el día 14. Esto permite incorporar dentro de objetivos futuros, la evaluación de este material dentro de una posible cepa comercial formulada.

3.2.2 Patogenicidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre pupas de *Ceratitis capitata*

Hernández Díaz-Ordaz *et al.* (2010) encontraron que la cepa Cengicaña de *M. anisopliae* provocó la mayor tasa de mortalidad con el menor TL_{50} 3,9 días pese a que presentó la menor tasa de infección 89,8%. En esta investigación las cepas evaluadas MTR-ECA-4 y MTR-ECA-8 presentaron patogenicidad, no obstante, sólo la cepa MTR-ECA-8 mostró datos que permitieron calcular la CL_{50} .

3.2.2.1 Micosis presente en puparios inoculados con *Metarhizium anisopliae*

Los puparios sin inocular (testigo) no mostraron micosis durante los 7 días de evaluación, por lo que se apartaron del análisis estadístico para poder visualizar diferencias entre las concentraciones y cepas que presentaron micosis (Figura 15).

A los 9 ddi, no existió interacción cepa-concentración ($p=0,3418$), pero el efecto de la cepa fue significativo ($p= 2,2 \times 10^{-16}$) y el de concentración ($p= 0,03385$) también (cuadro 6).

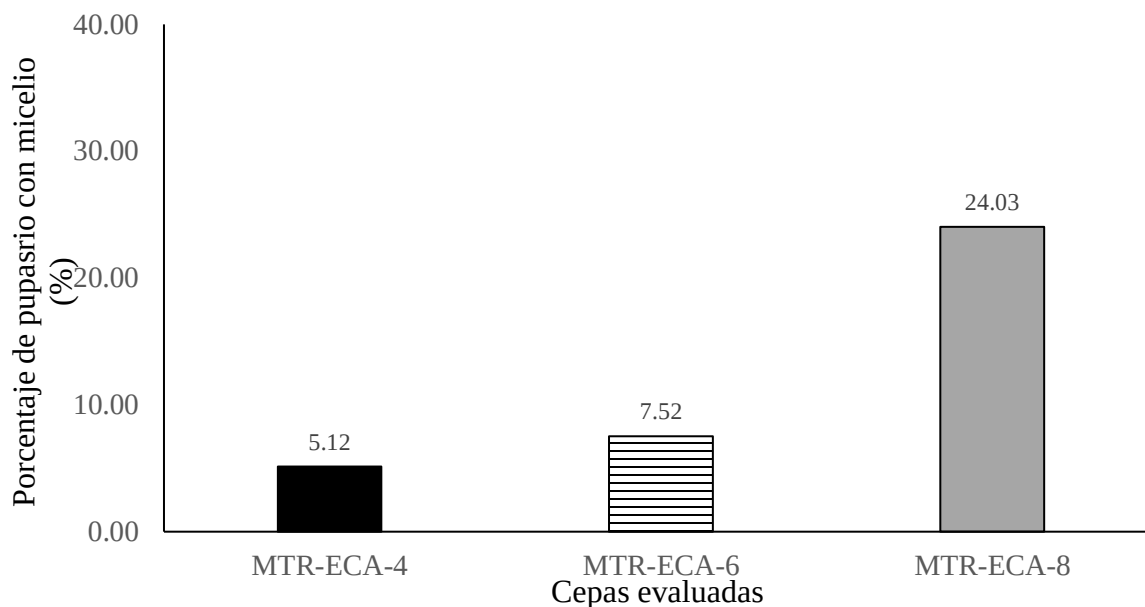


Figura 15. Porcentaje de puparios de *Ceratitits capitata* con micosis. Las cepas evaluadas fueron MTR-ECA-4, MTR-ECA-6 y MTR-ECA-8 de *Metarhizium anisopliae* a diferentes concentraciones 1×10^3 (**A**), 1×10^4 (**B**), 1×10^5 (**C**), 1×10^6 (**D**) (n= 6). El testigo no mostró micosis para todas las cepas.

En el cuadro 6 se puede apreciar que la cepa con mayor ventaja de tener micosis fue la cepa MTR-ECA-8, la cual presentó 521% más micelio que la cepa MTR-ECA-4 y 311% más que la cepa MTR-ECA-6. La cepa MTR-ECA-4 obtuvo 51% más ventaja de tener micelio que la cepa MTR-ECA-6.

Cuadro 6. Ventaja de puparios con micosis para las cepas evaluadas de *Metarhizium anisopliae* en una a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.

Comparación entre cepas	Razón de ventaja	Probabilidad asociada
MTR-ECA-6 versus MTR-ECA-4	1,5099	0,0000
MTR-ECA-8 versus MTR-ECA-4	6,2189	0,0000
MTR-ECA-8 versus MTR-ECA-6	4,1169	0,0000

En el cuadro 7 se aprecia el efecto de la concentración sobre el ensayo con cepas de *M. anisopliae*. En este caso, se aprecia que las cepas mostraron un comportamiento creciente esperado de micosis, en el cual todas las comparaciones fueron significativas, de manera que la mayor concentración evaluada de 1×10^6 conidios/ml obtuvo mayor ventaja de micelio respecto a las demás concentraciones. La de menor concentración, 1×10^3 conidios/ml, obtuvo la menor ventaja de micelio respecto a todas las concentraciones evaluadas.

Cuadro 7. Ventaja de puparios con micosis para las concentraciones evaluadas de *Metarhizium anisopliae* en una a los 9 ddi (n= 6). Valores en negrita son significativos.

Comparación entre concentraciones	Razón de ventaja	Probabilidad asociada
1 x 10 ⁶ conidios/ml versus 1 x 10 ⁵ conidios/ml	1,2298	0,0000
1 x 10 ⁶ conidios/ml versus 1 x 10 ⁴ conidios/ml	1,3526	0,0000
1 x 10 ⁵ conidios/ml versus 1 x 10 ⁴ conidios/ml	1,0999	0,0000
1 x 10 ⁶ conidios/ml versus 1 x 10 ³ conidios/ml	1,5370	0,0000
1 x 10 ⁵ conidios/ml versus 1 x 10 ³ conidios/ml	1,2498	0,0000
1 x 10 ⁴ conidios/ml versus 1 x 10 ³ conidios/ml	1,1365	0,0000

En la investigación de Beris *et al.* (2013) los puparios y adultos inoculados con *Metarhizium* no obtuvieron micelio. También Ekesi *et al.* (2002) encontraron que entre más edad tuviera la pupa, menor cantidad de micelio desarrollaban las cepas ICIPE 18 e ICIPE 20 a una concentración de 1×10⁸ conidios/ml, por lo tanto, pupas de 12 horas presentaron 63,8% de micosis, pupas de 48 horas presentaban micosis de 36,3% y pupas de 96 horas presentaban 23,8%. Por otro lado, en este ensayo, en todas las cepas de *M. anisopliae* evaluadas durante esta investigación, sí se encontró micosis (figura 15, 16 y cuadro 7), pese a que las concentraciones evaluadas fueron menores a las de la investigación de Ekesi *et al.* (2002).

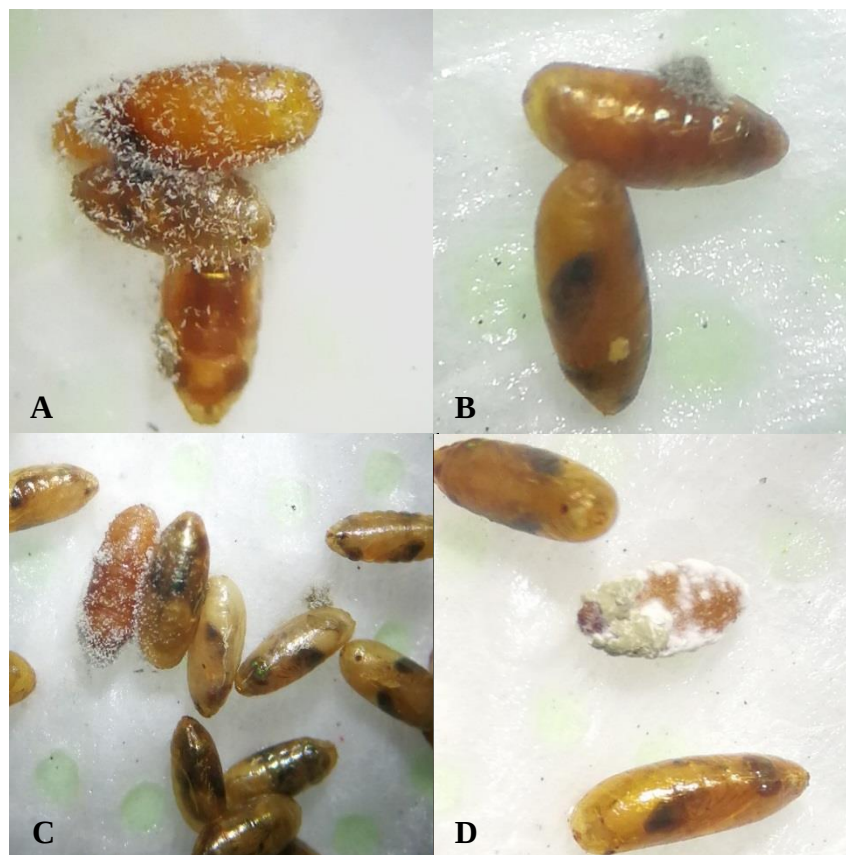


Figura 16. A. Puparios con micosis, inoculados con la cepa MTR-ECA-4 (9 ddi). B. Puparios con micosis inoculados con la cepa MTR-ECA-6 (9 ddi). C. Puparios con micosis, inoculados con la cepa MTR-ECA-8 (6 ddi). D. Pupario inoculado con la cepa MTR-ECA-8 con desarrollo de micelio a los 9 ddi. Todas las cepas mostradas fueron inoculadas a 1×10^6 conidios/ml.

3.2.2.2 Emergencia de adulto de las pupas inoculadas con cepas de *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae produce microesclerocios, y la formulación en gránulos le permite ser más eficaz en el suelo (Jaronski y Jackson 2008), por lo que esto propone que la capacidad de la cepa MTR-ECA-8 es promisorio (figura 17).

Respecto a la variable emergencia de adulto, las cepas presentaron una interacción cepa*concentración significativa ($p=0,0280$). De acuerdo con el cuadro 8, los tratamientos testigos de los tratamientos no mostraron diferencias entre cepas para el tratamiento testigo.

Cuadro 8. Ventaja de emergencia de adultos para las cepas evaluadas de *Metarhizium anisopliae* a los 9 ddi a diferentes concentraciones (0 conidios/ml= Testigo, 1×10^3 conidios/ml, 1×10^4 conidios/ml, 1×10^5 conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml) (n= 6). Prob. Asoc: probabilidad asociada. Valores en negrita son significativos.

Comparación entre cepas	0 conidios/ml		1×10^3 conidios/ml		1×10^4 conidios/ml		1×10^5 conidios/ml		1×10^6 conidios/ml	
	Razón de ventaja	Prob. Asoc.	Razón de ventaja	Prob. Asoc.	Razón de ventaja	Prob. Asoc.	Razón de ventaja	Prob. Asoc.	Razón de ventaja	Prob. Asoc.
MTR-ECA-4 versus MTR-ECA-6	1,6911	0,4166	0,6046	0,0000	0,6457	0,5834	0,6457	0,0000	0,3979	0,0000
MTR-ECA-4 versus MTR-ECA-8	2,0143	0,1378	2,4247	0,0179	1,9647	0,1406	1,9647	0,1284	1,5052	0,6062
MTR-ECA-6 versus MTR-ECA-8	1,1912	0,9755	4,0106	0,0000	3,0426	0,0014	3,0426	0,0512	3,7831	0,0001

Para el tratamiento testigo (cuadro 8) no existieron diferencias significativas entre tratamientos. En la concentración 1×10^3 conidios/ml la cepa MTR-ECA-8 obtuvo la menor ventaja de emergencia (59% menos ventaja de emergencia que la cepa MTR-ECA-4 y 75% menos ventaja que la cepa MTR-ECA-6). Para la concentración 1×10^4 conidios/ml la cepa MTR-ECA-8 presentó 67% menos ventaja de emergencia que la cepa MTR-ECA-6. Y para la mayor concentración evaluada, presentó 74% menos ventaja de emergencia de adulto respecto a la cepa MTR-ECA-6.

Para la concentración 1×10^5 conidios/ml únicamente existieron diferencias entre las cepas MTR-ECA-6 y MTR-ECA-4, siendo la cepa MTR-ECA-6 la de mayor ventaja de emergencia. Este comportamiento diferente respecto a las demás concentraciones provocó que existiera una interacción cepa y concentración.

De acuerdo con los datos muestrales, la cepa MTR-ECA-8 logró controlar la emergencia en 52,9% en una concentración de 1×10^6 conidios/ml, y a esa misma concentración logró un 24% de puparios con micelio. La CL_{50} obtenida es de $1 \times 10^{4,69}$ conidios/ml, lo que indica que a una concentración aproximada de 100 000 conidios/ml es promisorio para controlar la emergencia del 50% de las pupas. En España se encontró que con cepas autóctonas de *M. anisopliae* se logró mortalidad únicamente con la cepa EAMA 01/58-Su del 50%, con una CL_{50} de $2,0 \times 10^6$ cfu/ml (Quesada-Moraga *et al.* 2006) y de igual manera otros estudios muestran CL_{90} del aislado más virulento con valores de 10^6 a 10^8 conidios (Gerding *et al.* 2000), por lo que la CL_{50} para la cepa MTR-ECA-8, de esta investigación es menor. Jaronski y Jackson (2008) encontraron que *M. anisopliae* produce microesclerocios en el suelo, que le permiten sobrevivir y ser un entomopatógeno promisorio para el control de plagas insectiles de suelo.

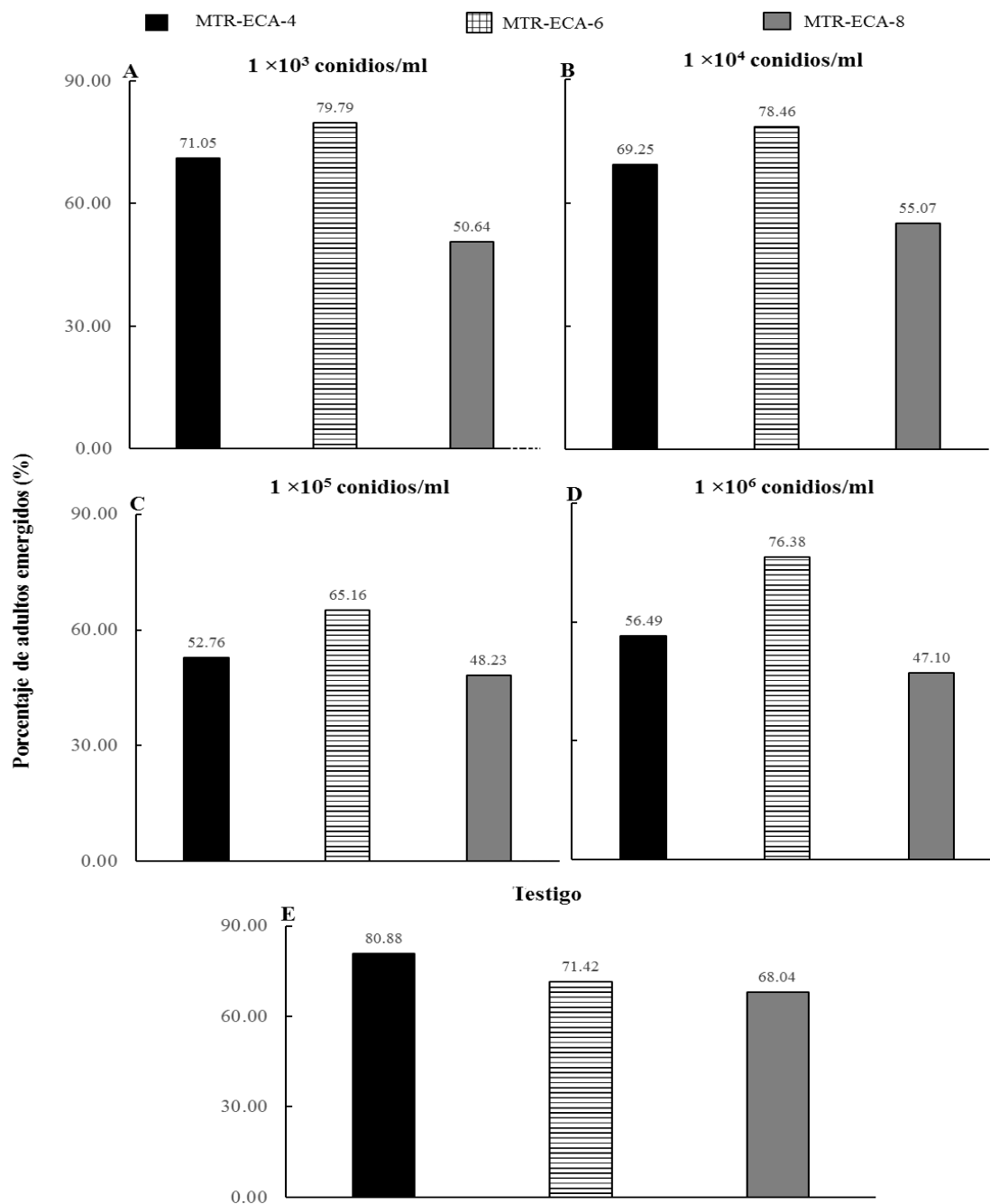


Figura 17. Porcentaje de emergencia de adultos en la muestra de puparios de *Ceratitis capitata* inoculados con cepas MTR-ECA-4, MTR-ECA-6 y MTR-ECA-8 de *Metarhizium anisopliae* a diferentes concentraciones 1×10^3 (A), 1×10^4 (B), 1×10^5 (C), 1×10^6 (D) conidios/ml y 0 conidios/ml (Testigo) (E) (n= 6).

En el caso de las cepas evaluadas de *M. anisopliae*, al igual que en *B. bassiana*, no presentaron un comportamiento sigmoide en el aumento de mortalidad de acuerdo con el aumento de concentración. Gerding *et al.* (2000) evaluaron tres aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y también variaron en el rango de mortalidad a diferentes concentraciones.

Por otro lado, Ekesi *et al.* (2002) probaron el efecto de cepas africanas de *M. anisopliae* sobre pupas de 12, 48 y 96 horas a una concentración de 1×10^8 conidios/ml, y obtuvo mortalidad de 22,5 a 63,8%. Al evaluar la edad, encontraron que entre más edad tuvieran las pupas, la mortalidad era menor, por lo que pupas de 12 horas tenían 77% de mortalidad, las de 48 horas presentaron 56% de mortalidad y pupas de 96 horas presentaban 36,2% de mortalidad. Este comportamiento sugiere que entre más madura es la pupa existe más dificultad para el entomopatógeno de infectar, posiblemente por su morfología y composición. En esta investigación la cepa MTR-ECA-8 mostró mortalidad de 44,93 a 52,9%, y la cepa MRT-ECA-4 mostró mortalidad de 28 a 47% en concentraciones menores a las evaluadas por Ekesi *et al.* 2002, pero similares a estudios en países Mediterráneos (Beris *et al.* 2013). Quesada-Moraga *et al.* (2006) encontraron que únicamente la cepa de *M. anisopliae* EAMa 01/58-Su causó 50% de mortalidad de las pupas.

Mediante estudios filogenéticos, biogeográficos, rangos de hospederos y abundancia de *C. capitata*, realizados por De Meyer *et al.* (2002), determinaron que esta plaga proviene del continente africano. Los estudios anteriormente citados determinaron que África oriental dio origen a esta plaga; sin embargo, los estudios moleculares proponen alta diversidad de ADN mitocondrial en África occidental, por lo que se cree que el Oeste de África es la cuna de *C. capitata*. Una vez planteado su origen, se puede concluir que los resultados de Ekesi *et al.* (2002) fueron muy promisorios porque utilizaron cepas de Kenya y Congo, las cuales

probablemente han coevolucionado con *C. capitata* por mucho tiempo, presentando mejor virulencia que las evaluadas en este estudio, que provienen del continente americano.

Anteriormente se ligaba la patogenicidad de los hongos entomopatógenos al género de insecto hospedero en el que se encontraba asociado; sin embargo, actualmente se ha encontrado que los hongos no se diferencian por el tipo de hospedero, sino por el tipo de condiciones ambientales en las que se desarrolla (Goble *et al.* 2014). *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentan gran diversidad en virulencia y genética, y se ha demostrado la diversidad de especies del género *Beauveria* en diferentes partes del mundo, lo que respalda que la adaptación a un insecto hospedero y un ambiente, son los responsables de mayor virulencia. Además, ciertos factores externos al hongo pueden incidir en el éxito de su dispersión.

Las moscas de la fruta tienen comportamientos sexuales muy específicos, dependiendo de la especie. En el caso de moscas de la fruta de origen tropical, tales como *C. capitata*, presentan dentro de su ecología la formación de leks, que consiste en una agregación de machos que realizan llamados para atraer la hembra (Prokopy y Hendrich 1979). En estos grupos se presenta la competencia intrasexual (entre machos) e intersexual (elección de la hembra). El macho libera una feromona mientras genera un llamado, como una especie de canto, este proceso de cortejo es largo, se crea un espacio de mucho contacto entre machos compitiendo por llamar la atención de la hembra, y de la hembra hacia los machos, tratando de elegir con cuál o cuáles va a copular (Shelly 2012).

Dentro de las herramientas para el manejo de *C. capitata* el uso de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) es muy utilizada en países como México, y han aprovechado esta estrategia para inocular machos estériles con el fin de utilizar la oportunidad de roce entre individuos que

ofrece el comportamiento entre machos y hembras anteriormente descrito, creando un espacio óptimo para la transmisión de esporas (FAO/IAEA 2019).

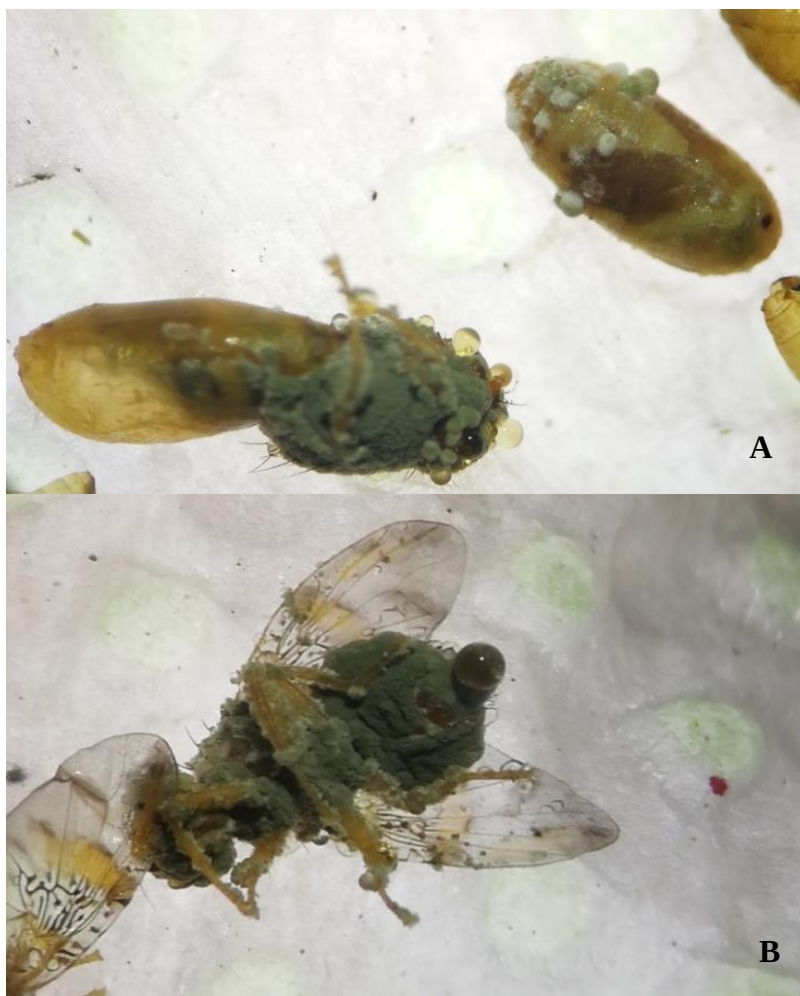


Figura 18. **A.** Adulto de *Ceratitidis capitata* en proceso de emergencia del pupario, infectado por cepa MTR-ECA-8 concentración 1×10^6 conidios/ml. **B.** Adultos de *Ceratitidis capitata* infectados por cepa MTR-ECA-8 concentración 1×10^6 conidios/ml.

Dimbi *et al.* (2013) estudiaron la transmisión horizontal de *M. anisopliae*, y encontraron mortalidades del 100% en adultos de *C. capitata* en 5 a 6 días, esto plantea la posibilidad de generar epizootias en el campo a través de la transmisión de los adultos que emergen del pupario contaminado, como lo muestra la figura 18, incluso, se ha encontrado que *M. anisopliae* redujo la fecundidad de las hembras en un 82%. Esto que significaría un excelente controlador en campo; sin embargo, la generación de epizootias depende de factores intrínsecos del agente controlador, del insecto hospedero, manejo del cultivo, plantas hospederas del insecto hospedero y del ambiente, el cual Hesketh *et al.* (2010) otorgaron especial importancia en el establecimiento de dinámicas de hongos entomopatógenos.

3.3 Crecimiento y germinación de esporas en las cepas evaluadas

El tiempo que tarda el insecto en morir debido al efecto del hongo entomopatógeno, depende en gran medida del insecto hospedero y de los factores ambientales (Bidochka *et al.* 2001; Kepler *et al.* 2017). La duración del estado de pupa en *C. capitata* para los lotes evaluados fue muy corta (7 días en promedio, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad), lo que demanda una cepa capaz de germinar y penetrar rápidamente. Por este motivo, se caracterizó el crecimiento y la germinación de esporas de las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* evaluadas en esta investigación, con el fin de identificar las más promisorias para producción industrial y si sus características coinciden con la virulencia evaluada.

3.3.1 Crecimiento radial de las cepas evaluadas de *Beauveria bassiana*

Se realizó una comparación de medidas repetidas, para verificar si existió un patrón definido de crecimiento en las cepas. El crecimiento presentó diferencias entre cepas ($p=0,0023$) en cuanto al tiempo, sin embargo, se presentó una sola tendencia de crecimiento. A los 7 días, la cepa Bv-ECA-1 alcanzó un crecimiento de 6,904 mm, la cepa Bv-ECA-14 alcanzó los 6,5075mm, la cepa Bv-ECA-9 mostró un crecimiento de 5,23 mm y la cepa Bv-ECA-31 mostró 4,59 mm (figura 19).

En esta variable la cepa Bv-ECA-1 mostró el mayor crecimiento, lo cual muestra el potencial de esta cepa. Sin embargo, se propone considerar algunos aspectos de la metodología, tales como el repetir las pruebas a diferentes rangos de temperatura y humedad, ya que la diversidad genética de *B. bassiana* es muy amplia, y su desempeño podría variar en diferentes condiciones climáticas (Bidochka *et al.* 2001; Kepler *et al.* 2017). Aunado a lo anterior, Porras y Leucona (2008) argumentaron que el orden al que pertenezca el hospedero no es relevante para un hongo entomopatógeno, el aspecto más importante es el ecosistema donde se desarrolla. Esto plantea la necesidad de evaluar las cepas promisorias en diferentes microclimas del país, a diferentes ámbitos de temperatura similares a los que se presentan en las zonas hortofrutícolas del país.

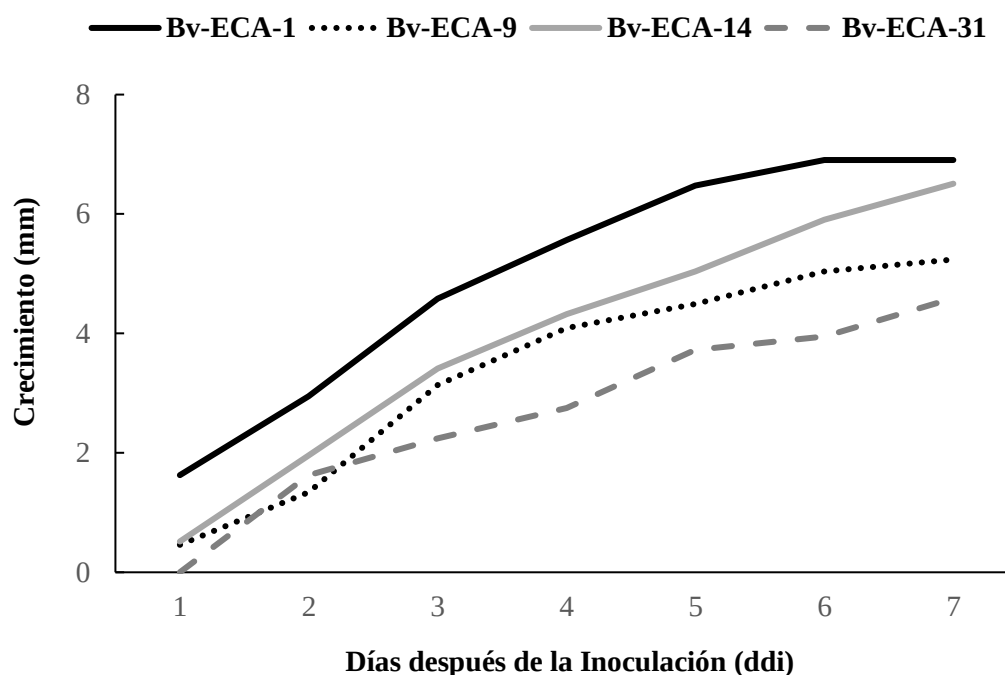


Figura 19. Crecimiento radial de las cepas evaluadas de *Beauveria bassiana* durante 7 días (n= 6). A 26 °C y 100% HR.

Dimbi *et al.* (2004) comprobaron que existe un efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial y el porcentaje de germinación de esporas de hongos entomopatógenos como *M. anisopliae*. Por ello, se hace indispensable evaluar el comportamiento de crecimiento de este hongo con diferentes rangos de temperatura y humedad.

3.3.2 Pruebas de germinación de esporas de las cepas evaluadas de *Beauveria bassiana*

Las cepas de *B. bassiana* mostraron diferencias en el porcentaje de germinación a las 24 horas ($p= 0,0033$). De acuerdo con las comparaciones múltiples de Tukey, se obtuvo que a

las 24 horas las cepas con mayor porcentaje de germinación fueron Bv-ECA-9 (con 51,63%) y Bv-ECA-31 (con 51,11%), seguidas de la cepa Bv-ECA-14 con 13% y, por último, la cepa Bv-ECA-1 con un 3,6% (cuadro 9).

En las pruebas de germinación de esporas, la cepa Bv-ECA-1 obtuvo la menor germinación a las 24 y 48 horas (cuadro 9), pese a los resultados obtenidos en las variables de micosis y emergencia de adultos, donde se mostró que fue la cepa con mayor virulencia respecto a las demás (cuadro 5 y figura 13). Este porcentaje de germinación no necesariamente va a determinar el éxito de la penetración del hongo, ya que aspectos como la duración de la germinación, tipo de spora, agresividad para colonizar y la susceptibilidad del hospedero interfieren en el proceso (Pedrini *et al.* 2007). A pesar de que se presentó un bajo porcentaje de germinación de esporas para la cepa Bv-ECA-1, respecto a las demás, mostró bajos porcentajes de emergencia y de micosis respecto a las otras cepas. Probablemente, esta cepa es más agresiva sobre medios con extractos de insectos, que el Agar Agua, que no tiene nutrientes.

La germinación de esporas para *B. bassiana* depende de la temperatura, se puede alcanzar 95% de germinación en rangos de 15 a 35% (Valencia-Cortés 2015), por lo que es muy importante evaluar rangos de temperatura similares a los sitios donde potencialmente se podrían aplicar.

Resulta muy importante evaluar las sustancias tóxicas que puedan ser producidas por la cepa Bv-ECA-1, pues la muerte del insecto se da, principalmente, por la secreción de sustancias tóxicas llamadas micotoxinas, producidas en hongos de la clase Ascomycota, como es el caso de la *B. bassiana* (Murrin 1996). También se han encontrado extractos miceliales de

Beauveria bassiana-28 ethyl acetato, las cuales mostraron actividad mosquiticida en pupas y larvas de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) (Vivekanandhan *et al.* 2018).

El porcentaje de germinación de esporas a las 48 horas también presentó diferencias entre cepas ($p= 0,0089$). La cepa Bv-ECA-9 se mantuvo con el mayor porcentaje de germinación, seguido de la cepa Bv-ECA-14, aunque no se mostraron diferencias entre sí. La cepa Bv-ECA-1 obtuvo el menor porcentaje de germinación (cuadro 9) y la cepa Bv-ECA-31 presentó contaminación, por lo que no se contabilizó a las 48 horas.

Cuadro 9. Porcentaje de germinación de esporas de las cepas evaluadas de *Beauveria bassiana* a las 24 y 48 horas ($n= 5$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre columnas ($p= 0,05$). Los datos para la cepa Bv-ECA-31 a las 48 horas no se pudieron obtener debido a que se contaminó el agar.

Cepas	Porcentaje de esporas germinadas (%)	
	24 h	48 h
Bv-ECA-9	51,63 A	58,36 A
Bv-ECA-31	51,11 A	N.D
Bv-ECA-14	13,00 AB	39,26 AB
Bv-ECA-1	3,66 B	12,84 B

La germinación de esporas de un hongo entomopatógeno puede ocurrir en la cutícula de los insectos siempre y cuando la humedad, la temperatura y las necesidades nutricionales, químicas y físicas sean favorables. Luego de la germinación, se producen estructuras de penetración que son los tubos germinativos y el apresorio (Esparza-Mora *et al.* 2017).

Esparza-Mora *et al.* 2017 reportaron que *B. bassiana* requiere, para la germinación de sus esporas, de una fuente de carbón exógena como la quitina, ya que el carbón le permite tener

energía extra para continuar el proceso de germinación e infección. Un aspecto que puede detener o limitar la germinación de esporas de *B. bassiana* es su desarrollo sobre medios compuestos de ácidos grasos, ya que existen lípidos epicuticulares con posible actividad antifúngica, capaz de inhibir el crecimiento de las hifas. Ante esto, sería importante analizar la cantidad de ácidos grasos presentes en las pupas de acuerdo con su edad, ya que, es posible que, en pupas de menor edad, se encuentre menor cantidad de ácidos grasos, lo cual facilitaría el desarrollo del hongo entomopatógeno y la formación de hifas.

3.3.3 Crecimiento radial de las cepas evaluadas de *Metarhizium anisopliae*

El crecimiento presentó diferencias entre cepas ($p=0,0145$) (figura 20). A los 7 días, la cepa MTR-ECA-4 mostró un crecimiento de 5,4 mm y la cepa MTR-ECA-8 alcanzó 11,4 mm. Se realizó una comparación de medidas repetidas, para verificar si existió un patrón definido de crecimiento en las cepas. De la misma manera, en Colombia, Padilla-Melo *et al.* (2000) evaluaron cepas de *M. anisopliae* en diferentes órdenes de insectos, y obtuvieron diferencias significativas para todas las cepas y órdenes probados.

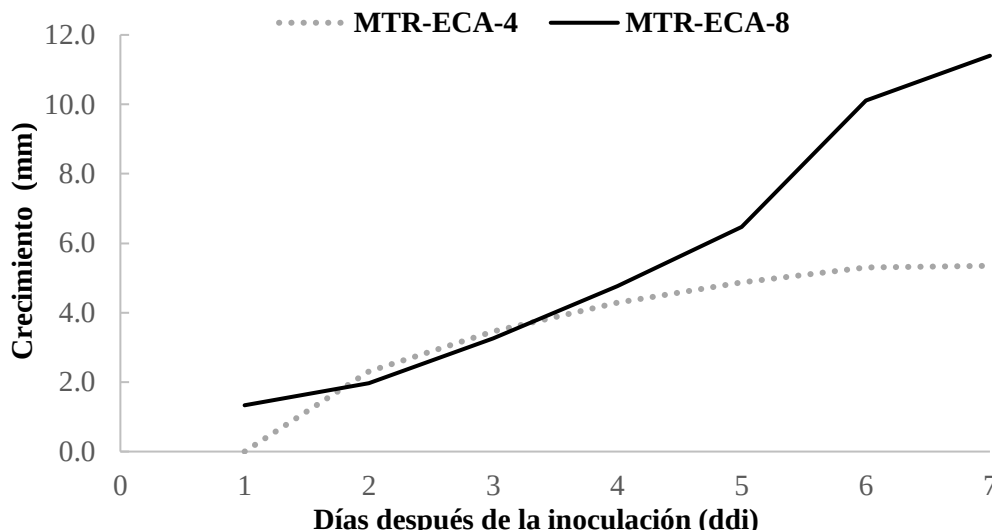


Figura 20. Crecimiento radial de las cepas evaluadas de *Metarhizium anisopliae* por 7 días (n= 6).

El crecimiento de *M. anisopliae* varía de acuerdo con el medio en el que se coloque, Sepúlveda *et al.* (2016) encontraron que las cepas encontradas en larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) crecen más en medios enriquecidos con estos insectos, también Pinto-Oliveira *et al.* (2015) encontraron que algunos ajustes en los medios pueden mejorar incluso la viabilidad de los hongos. Esto no sólo sugiere que la coevolución entre insecto hospedero – entomopatógeno es importante, sino también que a nivel de laboratorio es necesario mantener esa virulencia y “activos” a este tipo de hongos para poder mostrar su posible desempeño en campo.

Dimbi *et al.* (2004) evaluaron la tasa de crecimiento de cepas de *M. anisopliae* y encontraron que el rango óptimo de crecimiento es de 25 a 30°C, rango en el que se incubaron los platos Petri con las cepas evaluadas en este ensayo.

3.3.4 Pruebas de germinación de las cepas evaluadas de *Metarhizium anisopliae*

Las cepas evaluadas para el porcentaje de germinación de esporas de *M. anisopliae* fueron diferentes a las 24 horas ($p= 0,002$). La cepa MTR-ECA-8 presentó un 64,32%, la cepa MTR-ECA-4 presentó un 0% ($n= 5$).

La cepa MTR-ECA-6 no se pudo incluir entre este ensayo porque los respaldos de la micoteca estaban contaminados.

A las 48 horas el porcentaje de germinación de esporas también mostró diferencias ($p= 0,0001$). La cepa MTR-ECA-4 mostró un 11,47% y la cepa MTR-ECA-8 mostró 92,69%.

De acuerdo con Dimbi *et al.* (2004) las esporas de *M. anisopliae* son muy sensibles a los cambios de temperatura para germinar y crecer, a un rango de 20, 25 y 30°C se obtienen resultados de 80% de germinación en condiciones de laboratorio; sin embargo, el TL_{90} (tiempo letal que mata el 90% de la población) disminuía conforme aumentaba la temperatura; esta información es muy importante para considerar en condiciones de campo, donde la mayoría de las especies frutales son mayormente atacadas por la mosca de la fruta, producen cosecha en la época seca, donde las condiciones de alta temperatura y baja humedad relativa son constantes, estos factores limitan la germinación de esporas y la infección del entomopatógeno a *C. capitata*. La temperatura óptima para que la mortalidad de *C. capitata* adulto alcance un 100% fue de 30°C (Dimbi *et al.* 2004), por lo que en zonas muy cálidas es posible que el desempeño de cepas no adaptadas vea limitado su desempeño. Ante esto, se hace necesaria la búsqueda de cepas endémicas, adaptadas a las condiciones de las zonas, y que hayan coevolucionado con las plagas insectiles del agrosistema.

Esta caracterización del crecimiento y la germinación de esporas permite crear un perfil de comportamiento para los entomopatógenos evaluados, con la idea de tomarlo en cuenta al momento de estimar costos de producción. Adentro de estos se debe de considerar el costo de biopreparación del inóculo, por lo que aspectos como la producción de conidios (Jackson *et al.* 2010) y la CL₅₀ y la CL₉₀, resultan muy importantes. Puesto, entre menor sean el tiempo de conteo de esporas para realizar la concentración y crear la biopreparación para un formulado, tendrá un impacto importante en los costos (Alfazairy *et al.* 2014).

La evaluación de la producción de enzimas proteolíticas, quitinolíticas y toxinas fue un factor que no se midió en este estudio, y que probablemente pudo explicar la virulencia de las diferentes cepas evaluadas y su relación con el proceso de infección. Así, Peteira *et al.* (2011) evaluaron la cantidad de proteínas totales, actividad de quitinasa y de las glucanasas de seis cepas de *B. bassiana*, de las cuales las que mostraron mayor actividad de quitinasa fueron las de mayor virulencia.

Normalmente se generan prospecciones y pruebas pensando en factores como patogenicidad, adaptación al agrosistema donde serán utilizados. Pero también es importante considerar factores como el proceso productivo, con enfoque al que será sometido una vez se generen las formulaciones para control inundativo. Por lo que, las caracterizaciones de crecimiento y germinación de esporas deben ir de la mano con las pruebas de virulencia, que serán futuras causas de costos. En un sistema productivo industrial se debe garantizar un diseño y manejo simple del proceso, el cual, a su vez, debe garantizar la salud y seguridad del producto, el ambiente debe simular las condiciones al que será llevado (Leppla *et al.* 2014) y, por último, y no menos importante, el control de calidad (Jenkins y Grzywacz 2003), extensión de vida útil durante el almacenamiento y la mejora en la aplicación (Jackson *et al.* 2010).

El proceso de generación de un formulado a partir de un entomopatógeno es un proceso integrado, en el cual se deben contemplar aspectos intrínsecos del agente microbiano, el ambiente de aplicación y el proceso de manufactura (Behle y Birthiesel 2014). El agente microbiano que presenta las características promisorias para continuar con el proceso de validación de eficiencia en campo sería la cepa MTR-ECA-8, no sólo por su virulencia, sino también por su perfil fisiológico, pues su capacidad de producción de esporas es muy superior a Bv-ECA-1. En cuanto al ambiente de aplicación, se conoce que serán plantaciones de frutales, en su mayoría, en épocas secas, con alta radiación, baja humedad relativa y alta temperatura, suelos que van de un rango de Andisoles a Inceptisoles, para controlar pupas cuya morfología es más dura e impenetrable conforme su edad aumenta, sumergidas en suelo, por lo que las aplicaciones deberían pensarse para ser en drench. Como último aspecto, los procesos de manufactura, los cuales deben determinarse hasta que la etapa de campo sea evaluada, ya que, probablemente se puedan identificar aspectos limitantes en el desarrollo de esta cepa.

3.4 Observación de entradas naturales de los puparios en alta resolución

Barbosa *et al.* (2005) describió el pupario de *C. capitata*, criada en *Averrhoa carambola* L. (Oxalidacea), con forma cilíndrica, tamaño pequeño, transparente, de color amarillo ocre, muy translúcido, con once segmentos distintos. Las placas espiraculares se encuentran en la parte posterior del pupario, tienen color rojizo a rojo oscuro. Esta área está dividida en dos áreas distintas llamadas placas espiraculares, las cuales se ubican centralmente en línea horizontal. Cada espiráculo tiene tres entradas, tienen el área circundante más oscura en la

parte superior de una cresta bien definida (peritreme), estas placas espirales se parecen a un semicírculo. La punta o yema es pequeña y redonda, parece estar separada de la placa. No tiene depresión hexagonal. La placa anal pequeña y la superficie presenta discreta rugosidad y es color rojo oscuro. Esta descripción coincide con la obtenida en las micrografías (figura 21).

De acuerdo con Rabossi *et al.* (1992) desde el momento en que comienza la transformación de larva a pupa, transcurren 72 horas para tener una pupa completamente formada y madura. La cutícula toma un color rojizo a partir del comienzo de la fase “pupariación”. La deposición de la cutícula comienza 37 ± 1 horas. Por lo tanto, las pupas utilizadas en esta investigación muestran el momento de mayor defensa mecánica de la pupa hacia el ambiente edáfico.

Los esquemas que Rabossi *et al.* (1992) realizaron sobre el proceso de metamorfosis de *C. capitata*, sugieren que la parte que en este estudio se denominó como “inferior”, corresponde a la zona espiracular, cercana a la placa anal, donde se realiza el intercambio gaseoso (figuras 21 y 22).

En la figura 21 y 22A se puede observar la presencia de algunas entradas espiraculares, que parecen ser las únicas entradas naturales, las cuales no siempre están abiertas. Un estudio determinó que el intercambio gaseoso de una pupa aumenta 2 días antes de convertirse en adulto (Nestel *et al.* 2007), tiempo muy corto para que un hongo pueda penetrar, colonizar, e infectar al insecto.



Figura 21. Micrografías de los extremos de un pupario de *Ceratitidis capitata* con más de 72 horas de convertirse en pupa. **A.** Micrografía a 50 μm de la parte superior. **B.** Micrografía a 100 μm de la parte inferior o zona espiracular.

En este estudio también se pudo apreciar una membrana interna en la entrada espiracular (figura 22B), la cual se abre o se cierra por momentos. No se pudo determinar qué generaba la apertura o cierre de estas entradas, pero probablemente se debe al momento de desarrollo fisiológico del insecto, incluso a una respuesta ambiental.

Hagley *et al.* (1993) encontraron que el grosor de la pared del pupario en *Rhagoletis pomonella* Walsh (Diptera: Tephritidae) se va haciendo más gruesa conforme aumenta la edad de la pupa. También un estudio reportó un tefrítido que secretaba una sustancia que formaba una cámara que la protegía, le brindaba una cámara de alimentación y le servía para pupar (Frías 2008); esta información sugiere que *C. capitata* podría secretar alguna sustancia que hace su cutícula más cerosa, fuerte y antifúngica, principalmente como un mecanismo de defensa a un ambiente tan hostil y cargado de microorganismos descomponedores, como lo es el suelo. Esto explicaría el comportamiento que Ekesi *et al.* (2002) encontraron en la evaluación de dos cepas de *M. anisopliae* aplicadas en puparios de 12, 48 y 96 horas.

Algunos estudios han demostrado que los puparios de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) secretan alrededor de 129 proteínas, de las cuales 30 son inhibidores de proteasas (Gou *et al.* 2016), lo que sugiere que este estado tiene la capacidad de defenderse no sólo física, también químicamente.

Después de las 30 horas de la pupación, Tolmasky *et al.* (2001) encontraron que existen cambios en las fosforilasas y amilasas, mostrando reducción de los niveles de glicógeno, y a partir de las 50 horas de pupación la actividad de las grasas comienza a subir en el cuerpo. Por lo tanto, se comprueba que el estado de pupa es una fase de acumulación de grasa, donde baja su actividad metabólica para utilizarla en la metamorfosis, generando adultos activos que se reproduzcan rápido; sin embargo, esta acumulación de grasa es lo que probablemente hace que pupas maduras sean más difíciles de ser atacadas por entomopatógenos como *B. bassiana*, que ven su desarrollo inhibido por ácidos grasos (Esparza-Mora *et al.* 2017), tal y como se discutió en el apartado anterior.

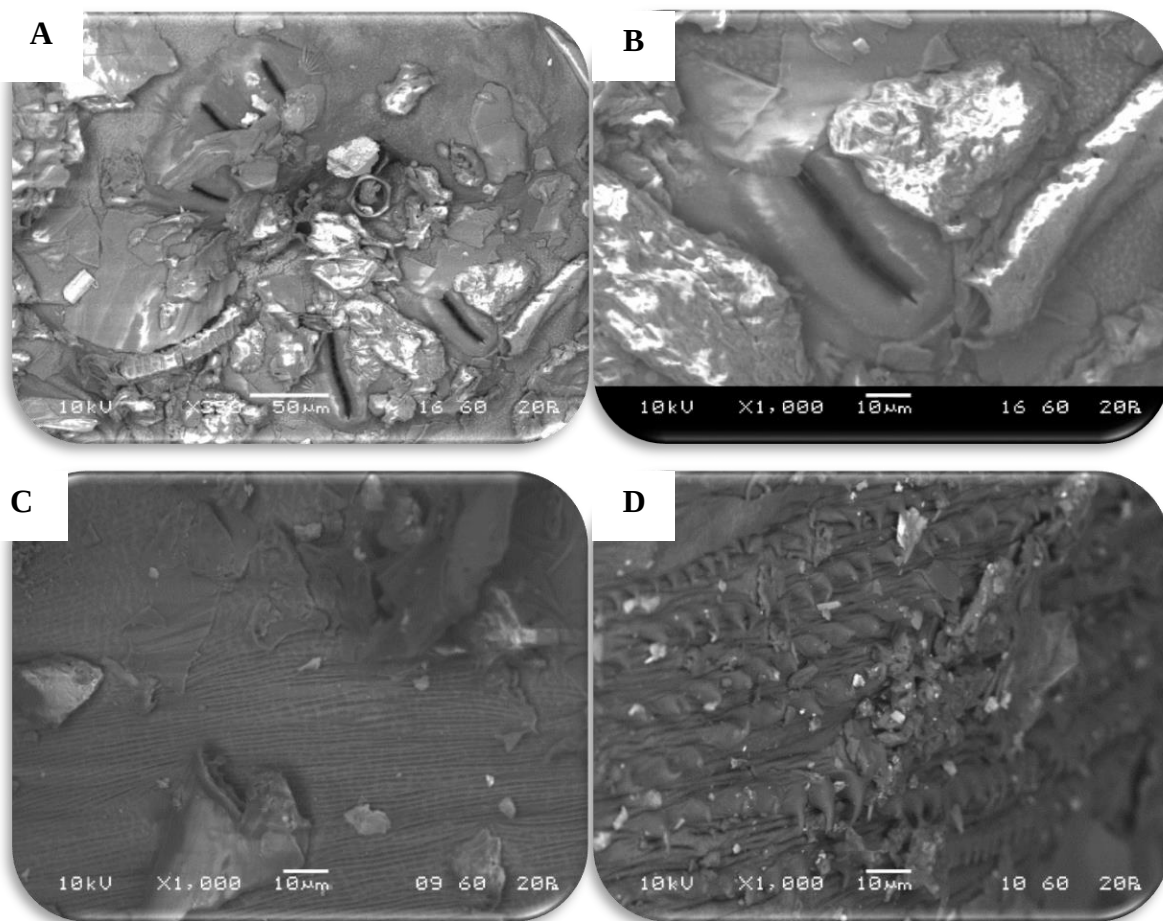


Figura 22. **A.** Micrografía a 50 μm de la parte inferior del pupario de *Ceratitis capitata*, donde se encuentran los espiráculos. **B.** Micrografía a 10 μm de una entrada espiracular, los cuales poseen una membrana interna. **C.** Micrografía a 10 μm de la pared del pupario sin parasitar. **D.** Micrografía a 10 μm de la pared del pupario parasitada por *Diachasmimorpha longicaudata*.

Shapiro-Ilan y Mizell III (2015) encontraron que algunos insectos como *Curculio caryae* Horn (Coleoptera: Curculionidae) cuyo estado de pupa pasa 3 años en el suelo, han desarrollado células con propiedades antimicrobianas, que son liberadas incluso al sustrato que lo rodea, se puede hipotetizar la misma situación con los puparios de moscas de la fruta,

razón por la cual los hongos entomopatógenos logran desarrollarse a más del 50%, haciendo la exclusión de los hongos africanos evaluados por Ekesi *et al.* (2002), que hasta el momento son los únicos que han obtenido porcentajes de mortalidad superiores al 80% sobre pupas maduras.

3.5 Efecto de cepas con mayor potencial patogénico sobre el desarrollo de *Diachasmimorpha longicaudata* en pupas de *Ceratitis capitata*

Los puparios parasitados con *D. longicaudata* se inocularon con Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8 para evaluar el efecto de estos entomopatógenos sobre aspectos de calidad del parasitoide, tales como habilidad de vuelo, mortalidad de machos y hembras, proporción sexual y parasitación.

La variable habilidad de vuelo de los adultos de *D. longicaudata* en los diferentes tratamientos evaluados no mostraron diferencias entre tratamientos ($p=0,3013$, $n=5$). Por lo tanto, la aplicación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* no afectó la habilidad de vuelo de los parasitoides.

Para la evaluación de mortalidad de hembras (figura 23) que emergieron de puparios inoculados con la cepa Bv-ECA-1, se observó que presentaron mayor mortalidad de pupas, seguida del tratamiento con la cepa MTR-ECA-8, y, por último, el tratamiento testigo, que representa la mortalidad natural de los parasitoides en condiciones de estrés. La temperatura del laboratorio osciló entre 22°C y 25°C, la humedad relativa entre 60 y 72%. No se

observaron respuestas en la mortalidad de los insectos ante los cambios de temperatura y humedad del laboratorio.

Al analizar la mortalidad de hembras, la interacción entre tratamientos fue significativa ($p=0,0002$). La ventaja de encontrar hembras muertas en el tratamiento de pupas parasitadas inoculadas con la cepa Bv-ECA-1 de *B. bassiana* fue superior al testigo, de igual manera para las pupas parasitadas con la cepa MTR-ECA-8 de *Metarhizium anisopliae* (cuadro 10). Sin embargo, entre las cepas evaluadas no existieron diferencias en cuanto a mortalidad. Esto sugiere que los entomopatógenos evaluados también son capaces de afectar a *D. longicaudata*.

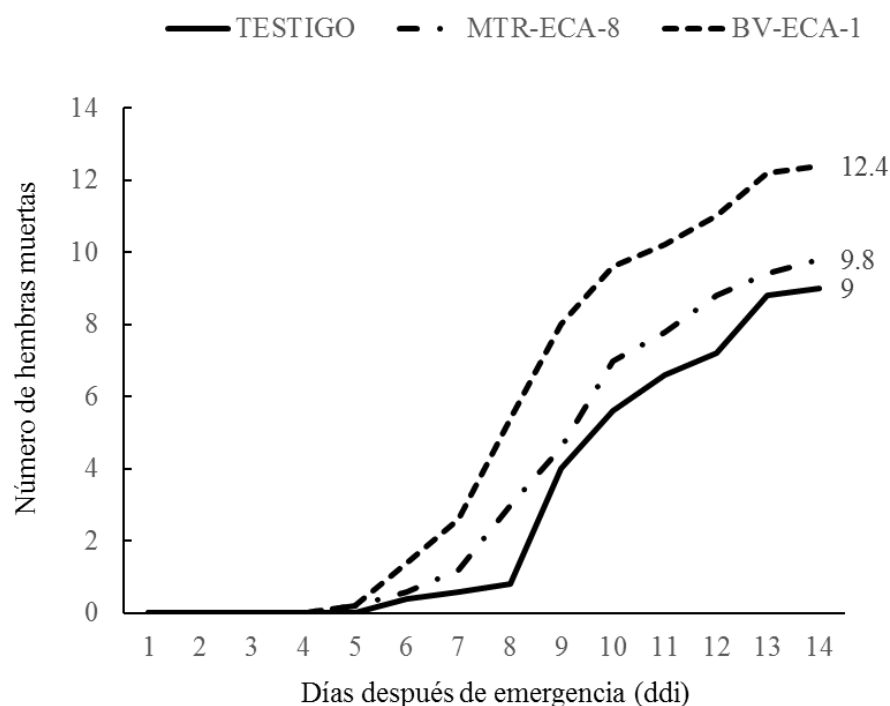


Figura 23. Mortalidad con estrés de hembras de *Diachasmimorpha longicaudata* durante 14 ddi (n= 5).

La variable mortalidad de machos no fue analizada, debido a que para el día 14 ddi todos los machos evaluados en todos los tratamientos estaban muertos.

Para la variable parasitismo, no existieron diferencias entre tratamientos ($p=0,0738$, $n=6$), lo que indica que la inoculación de estos dos entomopatógenos evaluados no genera ningún efecto en la parasitación.

Cuadro 10. Ventaja de mortalidad de hembras de *Diachasmimorpha longicaudata* que emergieron de puparios tratadas con MTR-ECA-8 y Bv-ECA-1, a una concentración 1×10^6 conidios/ml y del tratamiento testigo (concentración 0) ($n=5$). Valores en negrita son significativos.

Comparación entre tratamientos	Razón de ventaja	Probabilidad asociada
Testigo versus Bv-ECA-1	$3,4378 \times 10^{-16}$	0,0000
Testigo versus MTR-ECA-8	0,4000	0,0000
Bv-ECA-1 versus MTR-ECA-8	$1,1635 \times 10^{15}$	0,9999

La proporción sexual de los adultos de *D. longicaudata* en los diferentes tratamientos presentaron diferencias significativas ($p=0,0021$). El tratamiento donde se inocularon las pupas parasitadas con la cepa Bv-ECA-1 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml fue la de menor proporción (0,31), lo cual significa que hubo más machos que hembras. La proporción sexual de los tratamientos inoculados con la cepa MTR-ECA-8 a una concentración de 1×10^6

conidios/ml y el tratamiento testigo (con agua a 0 conidios/ml), no presentaron diferencias entre sí (figura 24).

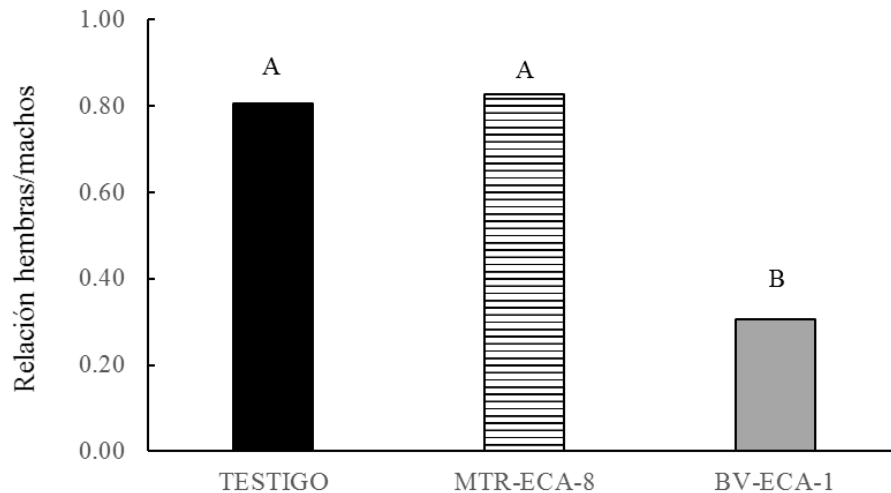


Figura 24. Proporción sexual de *Diachasmimorpha longicaudata* mostrada en el tratamiento testigo, en el tratamiento con inoculación de la cepa MTR-ECA-8 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml, y pupas parasitadas tratadas con la cepa Bv-ECA-1 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p = 0,05$) ($n=6$).

En algunos casos, existen parasitoides que son capaces de detectar el riesgo para su progenie, como *Trybliographa rapae* Westwood (Hymenoptera: Figitidae) que mostró la capacidad de colocar sus huevos sobre hospederos sanos de *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae) (Rännbäck *et al.* 2015). Sin embargo, algunos estudios como el de Montoya *et al.* (2011) sugieren que el parasitoide *D. longicaudata* tiene la capacidad de elegir sus hospederos y colocar huevos fertilizados (que en un futuro serán hembras) en hospederos más grandes o sin superparasitismo, de manera que la hembra elige desde el momento de la oviposición la

diferenciación de sexos en su progenie. Esto descartaría el hecho de que *B. bassiana* fue capaz de intervenir en la proporción sexual del parasitoide, porque fue inoculada en la larva ya parasitada; sin embargo, se podría pensar que *B. bassiana* pudo afectar más a los huevos o larvas de las hembras de *D. longicaudata* dentro de *C. capitata*, afectando así la proporción sexual.

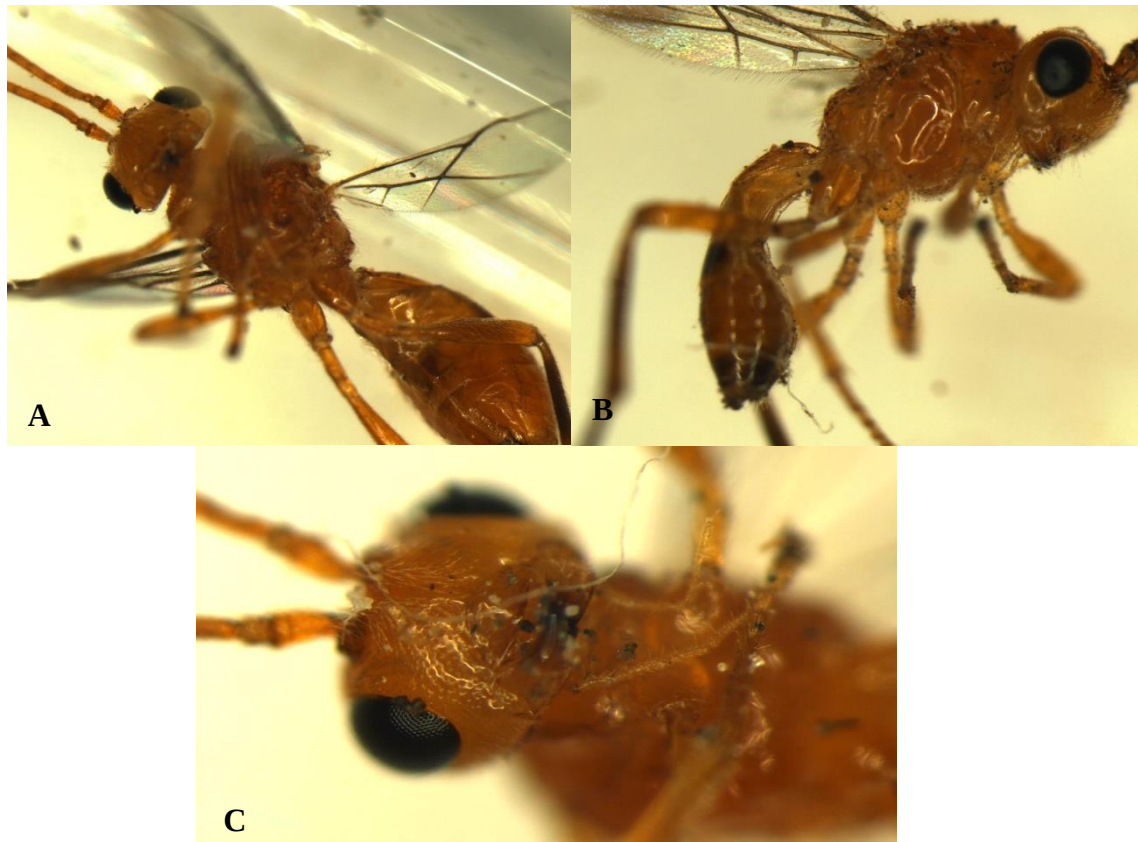


Figura 25. Adulto de *Diachasmimorpha longicaudata* emergido de puparios con tratamiento testigo (**A**), con inoculación de la cepa MTR-ECA-8 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml (**B**), y pupas parasitadas tratadas con la cepa Bv-ECA-1 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml (**C**).

En la figura 25 se pueden observar algunos de los adultos de *D. longicaudata* en los diferentes tratamientos, a los 14 ddi, y se aprecia que, pese a que la cepa de *M. anisopliae* fue capaz de

dispersarse por el cuerpo del adulto, no presentó micelio profuso, mientras que en el adulto que emergió de pupas parasitadas con la cepa de *B. bassiana*, se aprecia un tubo germinativo elongado cerca de su lengua.

Martínez-Barrera *et al.* (2019) encontraron que la aplicación de *B. bassiana* sobre pupas de *A. obliqua*, mediante el método de conidios en seco, no dañó ningún estadio de *Coptera haywardi* Liácono (Hymenoptera: Diapriidae); sin embargo, a los adultos los infecta en todas las edades, tanto hembras como machos, cuya mortalidad aumentó, pero no existió efecto en la fecundidad. Pese a estos resultados, en esta investigación se encontró que la inmersión de pupas parasitadas en diluciones con esporas de *B. bassiana* de la cepa de Bv-ECA-1, afectó la proporción sexual de *D. longicaudata* y, aumentó la mortalidad de hembras. Esto indica que *B. bassiana* no afecta a todos los parasitoides de la misma forma. Por ejemplo, Emami *et al.* (2013) también encontraron que inocular *B. bassiana* a una concentración de $5/3 \times 10^5$ conidios/ml sobre ninfas de áfidos parasitados por *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) disminuyó la proporción sexual e intervino en su desarrollo al disminuir la emergencia. Por otro lado, Martins *et al.* (2014) encontraron un decrecimiento en la longevidad de las hembras del parasitoide de *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), *Diaeretiella rapae* McIntosh (Hymenoptera: Braconidae), tal y como sucedió con *D. longicaudata* en esta investigación (cuadro 10 y figura 25).

Existen algunas técnicas que permiten mantener al entomopatógeno en el campo, aislado de otros insectos benéficos, y con la función de atraer únicamente a la plaga objetivo, tal como el dispositivo atrayente y contaminante de *M. anisopliae* para *C. capitata* (San Andrés *et al.* 2014). Esta técnica podría ser una opción para lograr una transmisión horizontal y aislada de parasitoides como *D. longicaudata*, para controlar adultos; sin embargo, en el caso de

hongos aplicados a suelo para controlar pupas, es indispensable utilizar cepas que no interfieran con *D. longicaudata* y su desempeño en campo, tal como la cepa MTR-ECA-8.

Otro aspecto importante para considerar es el manejo de los momentos de liberación de los parasitoides y la inoculación en campo del entomopatógeno, como por el ejemplo, Emami *et al.* (2013) determinaron que el mejor momento de aplicación de *B. bassiana* es de 3 a 4 días después de parasitar. Mientras que en el caso de Rashki *et al.* (2009), el mejor momento para utilizar ambas estrategias es inocular y en menos de 24 horas liberar parasitoides *Aphidius matricariae* Haliday (Hymenoptera: Braconidae), para que estos puedan tener un hospedero sano en el cuál desarrollarse.

En el caso de esta investigación se podría pensar en una aplicación conjunta del entomopatógeno y el parasitoide, ya que la cepa MTR-ECA-8 mostró bajo efecto sobre las pupas parasitadas con *D. longicaudata*.

IV. CONCLUSIONES

Como conclusión general se obtuvo que los porcentajes de virulencia en pupas de *C. capitata* de más de 72 horas, con cepas del continente americano, fueron similares a las reportadas en la literatura en la zona Mediterránea con cepas de igual o mayor edad. Sin embargo, en este estudio se observó que las moscas adultas que emergían se infectaban, esto puede utilizarse para aumentar la transmisión horizontal de los adultos, aprovechando la ecología de la mosca.

Otros resultados concluyentes fueron los siguientes:

1. En la prospección realizada en diferentes zonas frutícolas con historial de presencia de *C. capitata* no se encontraron hongos entomopatógenos atacando el estado de pupa.
2. Se observó un efecto de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* demostrado en la emergencia de adultos de *C. capitata* en estados avanzados de esclerotización; sin embargo, la virulencia no logró llegar a más del 50% de las pupas para las cepas Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8, por lo que se debe evaluar concentraciones mayores, como se ha realizado en otros estudios.
3. La cepa Bv-ECA-1 fue la cepa con mayor cantidad de micosis en los puparios en comparación con las demás cepas evaluadas de *B. bassiana*.
4. La cepa MTR-ECA-8 fue la cepa con mayor ventaja de micosis en los puparios en comparación con las demás cepas evaluadas de *M. anisopliae*.
5. Las cepas Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8 fueron las cepas con menor ventaja de emergencia de adultos de *C. capitata*.
6. Los adultos que emergían de los puparios inoculados con las cepas de Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8 mostraron micosis.
7. El crecimiento radial y la germinación de esporas no se asociaron a la patogenicidad y virulencia de las cepas evaluadas.
8. El uso de entomopatógenos en pupas de moscas plantea una situación muy adversa y diferente a la de los estados de adulto y larva. Se corroboró a través de micrografías que existen pocas entradas naturales en los puparios, que permitan la entrada de las hifas de los entomopatógenos.
9. La cepa Bv-ECA-1 inoculada en pupas parasitadas por *D. longicaudata* mostró efectos negativos sobre la proporción sexual.

10. Ambas cepas, Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8, mostraron efectos negativos sobre la mortalidad de las hembras de *D. longicaudata* a los 14 días después de la emergencia.

V. RECOMENDACIONES

1. Se deben evaluar otros métodos de muestreo que permitan evaluar los hongos entomopatógenos de suelo, capaces de afectar las pupas de *C. capitata* presente en las zonas frutícolas de Costa Rica.
2. Es necesario desarrollar una metodología que permita “rescatar” los entomopatógenos asociados a puparios encontradas en suelo y frutos muestreados.
3. Se recomienda evaluar mayores concentraciones de ambas cepas Bv-ECA-1 y MTR-ECA-8.
4. La caracterización de crecimiento y germinación de esporas es un dato que podría ser muy útil para proyectar el desempeño del entomopatógeno en los insectos; sin embargo, es precisa la evaluación de medios con macerado de pupas de *C. capitata*.
5. Pese a que los resultados son del 50% de mortalidad para las dos cepas promisorias, se debe pensar en la transmisión horizontal de los adultos emergidos de puparios inoculadas dentro de un manejo integrado.
6. La cepa MTR-ECA-8 debe evaluarse en campo, conjuntamente con programas de liberación del parasitoide *D. longicaudata* en diferentes momentos de aplicación para lograr el menor efecto negativo posible sobre el parasitoide.
7. Evaluar las cepas MTR-ECA-8 y Bv-ECA-1 en pupas de ≤ 24 horas, con el fin de corroborar si la virulencia fuera igual a las encontradas en el continente africano.

VI. REFERENCIAS

- Albornoz, P. 2014. Hongos entomopatógenos asociados a “moscas de la fruta” (Diptera: Tephritidae) en el sector austral de Las Yungas del noroeste argentino. Tesis de Doctor en Ciencias Naturales. Río de la Plata, Argentina. Universidad Nacional de la Plata. 135 pp.
- Alfazairy, A; Alfay, H; Karam, H; Zarif, G. 2014. Biopreparations - based on economic Mass propagation of certain entomopathogens. Egyptian Journal of Biological Pest Control 24(1): 113-120.
- Aluja, M; Guillén, J; Liedo, P; Cabrera, M; Ríos, E; De la Rosa, G; Mota, D. 1990. Fruit infesting tephritids (Dipt.: Tephritidae) and associated parasitoids in Chiapas, México. Entomophaga. 35: 39–48.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. Annual Review of Entomology 39: 155-178.
- Alves, S. 1998. Controle microbiano de insetos. FEALQ. Piracicaba, Brasil. 470 pp.
- Arias-López, P, Banda-Banda, B, Bejarano de la Cruz, R, Benites Salcedo, D, Arellano Barragaran, J. 2014. Efecto de *Beauveria bassiana* sobre la mosca *Anastrepha* sp. y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio. Rebiolest 2 (1): e27 Revista Científica de Estudiantes. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Barbosa, M; Tovar, F; Bressan-Nascimento, S. 2005. Morphological and Molecular characterization of three Species of *Anastrepha* Schiner and of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Neotropical Entomology 34(6): 917-925.
- Behle, R; Birthisel, T. 2014. Formulations of entomopathogens as bioinsecticides. En. Morales-Ramos, J; Rojas, G; Shapiro-Ilan, D. Mass Production of beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens. Elsevier. 764 pp.

- Beris, E; Papachristos, D; Fytrou, A; Antonatos, A; Kontodimas, D. 2013. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi on pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Pest Science* 86: 275–284.
- Bidochka, M; Kamp, A; Lavender, T; Dekoning, J; de Croos, J. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species. *Applied Environmental Microbiology* 67: 1335–1342.
- Brown, B. 2010. *Manual of Central American Diptera. Volumen 1.* National Research Council. Research Press. 728 pp.
- Bruck, 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *BioControl* 55: 103–112.
- Cancino, J; López, P; Villalobos, P; Hipólito, P; Quintero, J; Mattiacci, L. 2006a. Control de calidad en la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Fundamentos y Procedimientos.* Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Dirección General de Sanidad Vegetal (Senasica). México. 395 pp.
- Cancino, J; Ruiz, L; López, P; Moreno, F. 2006b. Cría masiva de parasitoides. En: Montoya P, Toledo J, Hernández E, editors. *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo.* México, D.F. 395 pp.
- Cancino, J; Ruiz, L; Viscarret, M; Sivinski, J; Hendrich, J. 2012. Application of nuclear techniques to improve the mass production and management of fruit fly parasitoids. *Insects* 3: 1105-1125.
- Cossentine, J; Thistlewood, H; Goettel, M; Jaronski, S. 2010. Susceptibility of preimaginal western cherry fruit fly, *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Clavicipitaceae (Hypocreales). *Journal of Invertebrate Pathology* 104: 105–109.
- Chen, A; Wang, Y; Shao, Y; Zhou, Q; Chen, S; Wu, Y; Chen, H; Liu, E. 2018. Genes involved in *Beauveria bassiana* infection to *Galleria mellonella*. *Archives of Microbiology* 200: 541– 552.

- Chernysh, S; Simonenko, N; Braun, A; Meister, M. 1995. Developmental variability of the antibacterial response in larvae and pupae of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) and *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae). European Journal of Entomology 92: 203-209.
- Dang, X; Tian, J; Yang, W; Wang, W; Ishibashi, J; Asaoka, A; Yi, H; Li, Y. 2009. Bactrocerin-1: a novel inducible antimicrobial peptide from pupae of oriental fruit fly *Bractocera dorsalis* Hendel. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 71 (3): 117–129.
- Dean, K.; Vandenberg, J.; Griggs, M.; Bauer, L; Fierke, M. 2012. Susceptibility of two hymenopteran parasitoids of *Agrilusplanis pennis* (Coleoptera: Buprestidae) to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Journal of Invertebrate Pathology 109: 303–306.
- De Meyer, M; Copeland, R; Wharton, R; McPherson, B. 2002. On the geographic origin of the Medfly *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Proceedings of 6th International Fruit Fly Symposium, Stellenbosch, South Africa. P. 45-53.
- Dembilio, O; Quesada-Moraga, E; Santiago-Álvarez, C; Jacas, J. 2010. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. Journal of Invertebrate Pathology 104: 214–221.
- Dias de Almeida; G; Pratissoli, D; Polanczyk, R; Holtz, A; Vicentini, V. 2007. Determinação da concentração letal média (CL 50) de *Beauveria bassiana* para o controle de *Brevicoryne brassicae*. IDESIA 25 (2): 69-72.
- Dimbi, S; Maniania, N; Lux, S; Ekesi, S; Mueke, J. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitidis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera:Tephritidae). Mycopathologia 156: 375–382.

- Dimbi, S; Maniania, N; Lux, S, Mueke, J. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49: 83–94.
- Dimbi, S; Maniania, M; Ekesi, S. 2013. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. *Insects* 4: 206-216.
- Donga, T; Vega, F; Klingen, I. 2018. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in sugarcane, *Saccharum officinarum*. *Fungal Ecology* 35: 70-77.
- Eilenberg, J; Hajek, A; Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387–400.
- Ekesi, S; Maniania, N; Lux, S. 2002. Mortality in three african tephritid fruit fly puparia and adults caused by entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 12: 7-17.
- Emami, F; Alich, M; Minaei, K. 2013. Interaction between the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the parasitoid wasp, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Entomological and Acarological Research* 45: e4.
- Enkerlin, W; Gutiérrez-Ruelas, J; Villaseñor-Cortés, A; Cotoc-Roldán, E; Midgarden, D; Lira, E; Zavala-López, J; Hendrichs, J; Liedo, P; Trujillo-Arriaga, F. 2015. Area freedom in Mexico from Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): A review of over 30 years of a successful containment program using an integrated area-wide SIT approach. *Florida Entomologist* 98 (2): 665-681.
- España-Mora, M; Contreiro-Castilho, A; Elias-Fragas, M. 2017. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico* 84: 1-10.

- Falchi, G; Marche, M; Ura, M; Ruiiu, L. 2015. Hydrophobins from aerial conidia of *Beauveria bassiana* interfere with *Ceratitis capitata* oviposition behavior. *Biological Control* 81: 37-43.
- Fan, Y; Zhang, S; Kruer, K; Keyhani, N. 2011. High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 274–279.
- FAO/IAEA. 2019. Uso de hongos entomopatógenos para el control de moscas de la fruta en programas TIE en área amplia. A. Villaseñor, S. Flores, S. E. Campos, J. Toledo, P. Montoya, P. Liedo y W. Enkerlin (eds.), Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación/Organismo Internacional de Energía Atómica. Viena, Austria. 46 pp.
- Ferreira-Pinto, A; Batista-Filho, A; Marcondes de Almeida, J; Marchizeli-Wenzel, I. 2012. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psíldeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitosanitários. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47 (12): 1673-1680.
- France, A; Gerding, M; Sandoval, A. 2002. Patogenicidad de aislamientos chilenos de *Beauveria bassiana* en adultos de *Asynonychus cervinus* (Boh.) (Coleoptera: Curculionidae). *Agricultura Técnica (Chile)* 62 (4): 489-496.
- Frías, D. 2008. Morphology of immature stages in the Neotropical nonfrugivorous tephritinae fruit fly species *Rachiptera limbata* Bigot (Diptera: Tephritidae) on *Baccharis linearis* (R. et Pav.) (Asteraceae). *Neotropical Entomology* 37(5): 536-545.
- Garrido-Jurado, I; Torrent, J; Barrón, V; Corpas, A; Quesada-Moraga, E. 2011. Soil properties affect the availability, movement and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological control* 58: 277-285.

- Gerding, M; France, A; Cisternas, E. 2000. Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* sobre *Otiorhynchus sulcatus* fab. (Coleoptera: Curculionidae). Agricultura técnica 60 (3): 1-10.
- Goble, T; Rehner, S; Long, S; Gardescu, S; Ha jek, A. 2014. Comparing virulence of North American *Beauveria brongniartii* and commercial pathogenic fungi against Asian longhorned beetles. Biological control 72: 91-97.
- Goldshtein, E; Cohen, Y; Hetzroni, A; Gazit, Y; Timar, D; Rosenfeld, L; Grinshpon, Y; Hoffman, A; Mizrach, A. 2017. Development of an automatic monitoring trap for Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) to optimize control applications frequency. Computers and Electronics in Agriculture 139: 115-125.
- Gou, X; Dong, Z; Zhang, Y; Li, Y; Liu, H; Xia, Q; Zhao, P. 2016. Proteins in the cocoon of Silkworm Inhibit the Growth of *Beauveria bassiana*. PLoS ONE 11(3): e0151764.
- Guesmi-Jouini, J; Garrido-Jurado, I; Lopez-Díaz, C; Ben Halima-Kamel, M; Quesada-Moraga, E. 2014. Establishment of fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Bionectria ochroleuca* (Ascomycota: Hypocreales) as endophytes on artichoke *Cynara scolymus*. Journal of Invertebrate Pathology 119: 1–4.
- Guillén, D; Sánchez, R. 2007. Expansion of the National Fruit Fly Control Program in Argentina. En: Vreysen, MJ; Robinson, AS; Hendrichs, J (eds.). Area-Wide Control of insect pests: from research to field implementation. Springer. p. 653-660.
- González-Reyes, E. 2003. Efecto de la temperatura, humedad relativa y humedad de suelo sobre la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycete) en las larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencias, Área de Biotecnología. Colima, México. Universidad de Colima, México. 151 pp.

- Grzywacz, D; Moore, D; Rabindra, R. 2014. Mass production of entomopathogens in less industrialized countries. En: Morales-Ramos, J; Rojas, G; Shapiro-Ilan, D. Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens. Elsevier. 764 pp.
- Gutiérrez, J. 2010. El Programa Mosca de la Fruta en México. En: Montoya, P; Toledo, J; Hernández, E (eds.). Mosca de la fruta: fundamentos y procedimientos para su manejo. México, D.F. p. 3-9.
- Hagley, E; Biggs, A; Timbers, G; Coutu-Sundy, J. 1993. Effect of age of the puparium of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae), on parasitism by *Phygadeuon wiesmanni* Sachtl. (Hymenoptera: Ichneumonidae). (Abstract). The Canadian Entomologist 125 (4): 721-724.
- Harbi, A; Abbes, K; Chermiti, B; Hafsi, A; Sabater-Muñoz, B; Beitia, F. 2016. Life history parameters of *Diachasmimorpha longicaudata* on *Ceratitis capitata* under laboratory conditions: implications for mass rearing and biological control. Tunisian Journal of Plant Protection 11: 207-217.
- He, Z; Luo, L; Keyhani, N, Yu, X; Ying, S; Zhang, Y. 2017. The C-terminal MIR-containing region in the Pmt1O-mannosyltransferase restrains sporulation and is dispensable for virulence in *Beauveria bassiana*. Applied Microbiology and Biotechnology: 101: 1143–1161.
- Hesketh, H; Roy, H; Eilenberg, J; Pell, J; Hails, R. 2010. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. BioControl 55: 55–73.
- Hernández Díaz-Ordaz, N; Pérez, N; Toledo, J. 2010. Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de laboratorio. Acta Zoológica Mexicana 26 (3): 481-494.

- Jackson, M; Dunlap, C; Jaronski, S. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55: 129–145.
- Jaronski, S; Jackson, M. 2008. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*, 18(8): 849 -863.
- Jaronski, 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55: 159–185.
- Jaronski, S. 2014. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. En. Morales-Ramos, J; Rojas, G; Shapiro-Ilan, D. Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens. Elsevier. 764 pp.
- Jenkins, N; Grzywacz, D. 2003. Towards the standardization of quality control of fungal and viral biocontrol Agents. En: van Lenteren, J. Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedure. 341 pp.
- Jirón, L; Zeledón, R. 1979. El género *Anastrepha* (Diptera; Tephritidae) en las principales frutas de Costa Rica y su relación con pseudomiasis humana. *Revista Biología Tropical* 27 (1): 155-161.
- Jirón, L; Soto-Manitiú. 1987. Las moscas de las frutas (Diptera: Tephritidae) en Costa Rica: Situación actual. *Agronomía costarricense* 11 (2): 255-261.
- Jirón, L; Hedstrom, I. 1988. Occurrence of fruit flies of the genera *Anastrepha* and *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae), and their host plant availability in Costa Rica. *Florida Entomologist* 71 (1): 62-73.
- Jirón, L; Soto-Manitiú, J; Norbon, A. 1988. A preliminary list of the fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in Costa Rica. *Florida Entomologist* 71 (2): 130-137.

- Jirón, L; Mexzón, R. 1989. Parasitoid hymenopterans of Costa Rica: geographical distribution of the species associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Entomophaga* 34 (I): 53-60.
- Juan-Blasco, M; Sabater-Muñoz, B; Pla, I; Argilés, R; Castañera, P; Jacas, J; Ibáñez-Gual, M; Urbaneja, A. 2014. Estimating SIT-driven population reduction in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, from sterile mating. *Bulletin of Entomological Research* 104: 233–242.
- Kaya, H; Vega, F. 2012. Scope and basic principles of insect pathology. En: *Insect Pathology*, Second Edition: Academic Press. p.1-12
- Kepler, R, Maul, J, Rehner, S. 2017. Managing the plant microbiome for biocontrol fungi: examples from Hypocreales. *Current Opinion in Microbiology* 37: 48–53.
- Konstantopoulou, M; Mazomenos, B. 2005. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. *BioControl* 50: 293–305.
- Leppla, N; Morales-Ramos, J; Shapiro-Ilan, D; Rojas, G. 2014. Introduction. En: Morales-Ramos, J; Rojas, G; Shapiro-Ilan, D. *Mass Production of beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*. Elsevier. 764 pp.
- Luo, F; Wang, Q; Yin, C; Ge, Y; Hu, F; Huang, B; Zhou, H; Bao, G; Wang, B; Lu, R; Li, Z. 2015. Differential metabolic responses of *Beauveria bassiana* cultured in pupae extracts, root exudates and its interactions with insect and plant. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 154–164.
- Mar, T.; Lumyong, S. 2012. Evaluation of effective entomopathogenic fungi to Fruit Fly Pupa, *Bactrocera* spp. and Their Antimicrobial Activity. *Chiang Mai Journal of Science* 39 (3): 464-477.
- Marchini, D; Giordano, P; Amons, R; Bernini, L; Dallai, M. 1993. Purification and primary structure of Ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female

reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta: Diptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23 (5): 591-598.

- Martínez-Barrera, O; Toledo, J; Liedo, P; Gómez, J; Valle-Mora, J; Cancino, J; Montoya, P. 2019. Does *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) affect the survival and fecundity of the parasitoid *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae)? *Environmental Entomology* 48(1): 156–162.
- Martins, I; Silva, R; Alencar, j; Silva, K; Cividanes, F; Duarte, R; Agostini, L; Polanczyk, R. 2014. Interactions between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 107 (3): 933-938.
- Meylin, N; Hajek, A. 2010. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. *BioControl* 55: 39–54.
- Meyling, N; Schmidt, N; Eilenberg, J. 2012. Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland. *Polar Biology*: 35: 1439–1445.
- Mohamed, A; Hatcher, P. 2017. Combining entomopathogenic fungi and parasitoids to control the green peach aphid *Myzus persicae*. *Biological Control* 110: 44-55.
- Montoya, P; Liedo, P; Benrey, B; Cancino, J; Barrera, J; Sivinski, J; Aluja, M. 2000. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* (18): 216-224.
- Montoya, P; Toledo, J. 2010. Estrategias de Control Biológico. En: Moscas de la Fruta: fundamentos y procedimientos para su manejo. Eds. Montoya, P; Toledo, J; Hernández, E. México, D.F. p. 169-182.

- Montoya, P; Cancino, J; Pérez-Lachaud, G; Liedo, P. 2011. Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. *Biocontrol* 56: 11-17.
- Murrin, F. 1996. Fungi and insects. En: Howard, D.H; Miller, J.D (eds.). *The Mycota VI. Human and animal relationship*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. p. 365-388.
- Nestel, D; Nemny-Lavy, E; Alchanatis, V. 2007. Gas-exchange patterns of Mediterranean Fruit fly pupae (Diptera: Tephritidae): a tool to forecast developmental stage. *The Florida Entomologist* (1): 71-79
- Novelo-Rincón, L; Montoya, P; Hernández, V; Liedo, P; Toledo, J. 2009. Mating performance of sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Dipt. Tephritidae) males used as vectors of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Journal of Applied Entomology* (9-10): 702–710.
- O´neal-Coto, 2018. Agrónoma propone mejora en la producción de avispas que controlan la mosca de la fruta. Noticias Universidad de Costa Rica. Disponible en: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2018/10/30/agronoma-propone-mejora-en-la-produccion-de-avispa-que-controlan-la-mosca-de-la-fruta.html>
- Osorio-Fajardo, A; Canal, N. 2011. Selección de cepas de hongos entomopatógenos para el manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) en Colombia. *Revista de la Facultad Nacional Agrícola de Medellín* 64 (2): 6129-6139.
- Ovruski, S; Aluja, M; Sivinski, J; Wharton, R. 2000. Hymenopteran parasitoids on fruit infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Reviews* 5: 81-107.
- Padilla-Melo, G; Bernal-Urbe, M; Vélez-Arango, P; Montoya-Restrepo, E. 2000. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. *Cenicafé* 51 (1): 28-40.

- Padilla-Monge, M. 2012. Servicio Fitosanitario del Estado, nuestra huella en el tiempo. MAG/SFE. San José, C.R. p. 55.
- Padilla, M; Bonilla, N; Vargas, E. 2016. Implementarán estrategia en plantaciones de jocote, para el manejo integrado de la mosca de la fruta. Actualidad Fitosanitaria. Boletín No. 76 (octubre-noviembre 2016).
- Paladino, L; Carabajal, Z; Papeschi, A; Cladera, J. 2010. Immature stages of development in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. Journal of Insect Science 10 (56): 56.
- Pedrini, N; Crespo, R; Juárez, M. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology 146 (1-2): 124-37.
- Peteira, B; González, I; Arias, Y; Turro, F; Miranda, I; Martínez, B. 2011. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Revista de Protección Vegetal 26: 16-22.
- Pinto-Oliveira, D; Pauli, G; Mascarin, G; Delalibera, I. 2015. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. Journal of Microbiological Methods 119: 44–52.
- Poncio, S; Montoya, P; Cancino, J; Nava, D. 2016. Determining the functional response and mutual interference of *Utetes anastrephae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) larvae for mass rearing purposes. Annals of the Entomological Society of America: 1-8.
- Porras, L; Leucona, R. 2008. Estudios de laboratorio para el control de *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae) (Mosca del Mediterráneo) con *Beauveria bassiana*. Nota Técnica. Agronomía Costarricense 32 (2): 119-128.
- Prokopy, R; Hendrichs, J. 1979. Mating behavior of *Ceratitis capitata* in field cages on host trees. Annals of the Entomological Society of America, 72, 642-648.

- Quesada-Moraga, E; Ruiz-García, A; Alvarez, S. 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 99(6): 1955-1966.
- Rabossi, A; Wappner, P; Quesada-Allué, L. 1992. Larva to pharate adult transformation in the Meadfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *The Canadian Entomologist* 124: 1139-1147.
- Rännbäck, L; Cotes, B; Anderson, P; Rämert, B; Meyling, N. 2015. Mortality risk from entomopathogenic fungi affects oviposition behavior in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 78-86.
- Rashki, M; Kharazi-Pakdel, A; Allahyari, H; van Alphen, J. 2009. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae) and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Biological Control* 50: 324–328.
- Roessler, Y. 1989. Insecticidal bait and cover sprays. En *Fruit flies: Their biology, natural enemies and control*. World Crop Pests; Robinson, A.S, Hooper, G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, the Netherlands p. 329-336.
- Salcedo-Baca, D; Terrazas-González, G; Lomelí-Flores, R; Rodríguez-Leyva, E. 2010. Análisis costo-beneficio del Programa MOSCAMED. En: *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*. Eds. Montoya, P; Toledo, J; Hernández, E. México, D.F. p. 27-40.
- San Andrés, V; Ayala, L; Abad, M; Primo, J; Castañeda, P; Moya, P. 2014. Laboratory evaluation of the compatibility of a new attractant contaminant device containing *Metarhizium anisopliae* with *Ceratitis capitata* sterile males. *Biological Control* 72: 54–61.

- Saul, S; Tsuda, D; Wong, T. 1983. Laboratory and field trials of soil applications of methoprene and other insecticides for control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 76: 174-177.
- Sepúlveda, M; Vargas, M; Gerding, M; Ceballos, R; Oryazúa, P. 2016. Molecular, morphological and pathogenic characterization of six strains of *Metarhizium* spp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae). *Chilenean Journal of Agricultural Research* 76 (1): 77-83.
- Shapiro-Ilan, D., Fuxab, J., Lacey, L., Onstadd, D., Kayae, H. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 1–7.
- Shapiro-Ilan, D; Mizell III, R. 2015. An insect pupal cell with antimicrobial properties that suppress an entomopathogenic fungus. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 114–116.
- Shelly, T. 2012. Mate choice by wild and mass-reared females of the Mediterranean fruit fly. *Journal of Applied Entomology* 136: 238-240.
- Song, T; Feng, M. 2011. *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 211–216.
- Storm, C; Scoates, F; Numm, A; Potin, O; Dillon, A. 2016. Improving efficacy of *Beauveria bassiana* against stored grain beetles with a synergistic co-formulant. *Insects* 7: 42.
- Toledo, J; Liedo, P; Flores, S; Campos, S; Villaseñor, A; Montoya, P. 2006a. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: a novel approach. *Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance 10-15 September 2006, Salvador, Brazil.* pp. 127-132.

- Toledo, J; Rasgado, M; Ibarra, J; Gómez, A; Liedo, P; Williams, T. 2006b. Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in a mango orchard. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119: 155–162.
- Toledo, J; Flores, S; Campos, S; Villaseñor, A; Enkerlin, W; Liedo, P; Valle, A; Montoya, P. 2017. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 164: 340–349.
- Tolmasky, D; Rabossi, A; Quesada-Allué, L. 2001. Synthesis and mobilization of glycogen during metamorphosis of the Medfly *Ceratitis capitata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392 (1): 38-47.
- Valencia-Cortés, C. 2015. Caracterización de aislamientos de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* asociados a insectos plaga de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Entomología. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 119 pp.
- van Lenteren, J. 2003. Quality control and production of biological control agents: Theory and testing procedures. CABI Publishing. 341 pp.
- van Nieuwenhove, G; Bezdjian, L, Ovruski, S. 2012. Effect of exposure time and ratio of hosts to female parasitoids on offspring production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Florida Entomologist* (95) 1: 99-104.
- Vega, F; Goettel, M; Blackwell, M; Chandler, D; Jackson, M; Keller, S; Koike, M; Maniania, N; Monzón, A; Ownley, B; Pell, J; E.N Rangel, D, Roy, H. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159.
- Vega, F; Meyling, N; Luangsa-Ard, J; Blackwell, M. 2012. Fungal entomopathogen. En: *Insect Pathology*. Segunda edición. Academic Press. p. 171-220.

- Villaseñor, A; Ortiz, G. 2010. Organización de Programas de control/erradicación. En: Moscas de la Fruta: fundamentos y procedimientos para su Manejo. Eds. Montoya, P; Toledo, J; Hernández, E. México, D.F. p.11-25.
- Vivekanandhan, P; Kavitha, P; Karthi, S; Senthil-Nathan, S, Shivakumar, M. 2018. Toxicity of *Beauveria bassiana*-28 mycelial extracts on larvae of *Culex quinquefasciatus* mosquito (Diptera: Culicidae). International Journal of Environmental Research and Public Health 15: 440-451.
- Wharton, R; Guildstrap, F; Rhode, R; Fischel-M, M; Hart, W. 1981. Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. [Diptera: Tephritidae] in Costa Rica. Entomophaga 26 (3): 285-290.
- Wharton, R; Ovruski, S; Gilstrap, F. 1998. Neotropical Eucoilidae (Cynipoidea) associated with fruit-infesting Tephritidae, with new records from Argentina, Bolivia and Costa Rica. Journal of Hymenoptera Research 1998 7 (1):102-115.
- Yousef, M; Quesada-Moraga, E; Garrido-Jurado, I. 2015. Compatibility of herbicides used in olive orchards with a *Metarhizium brunneum* strain used for the control of preimaginal stages of tephritids in the soil. Journal of Pest Science 88:605-612.

ANEXOS

Anexo 1. Manejo del pie de cría de *C. capitata* utilizado por el Programa Nacional de Mosca de la Fruta en Costa Rica.

Los adultos de *C. capitata* se mantienen a 25-27°C, a una humedad relativa de 60-70%, las larvas en la dieta se mantuvieron a una temperatura de 29-31°C y una humedad relativa de 70-80%. Los huevos se burbujan por 24 horas y se estimula la oviposición con 8 horas luz.

En las jaulas se mantienen los adultos de ambas especies con agua y un suplemento alimenticio a base de Torula en polvo (50%) y azúcar (50%).

El huevecillo de *C. capitata* se siembra en una dieta (1 ml de huevecillo en 1 Kg de dieta) a base de 1000 gramos de polvo de olote, 619 gramos de torula en polvo, 1050 gramos de azúcar, 514 gramos de harina de maíz, 25 gramos de ácido cítrico, 20 gramos de benzoato de sodio, 10 gramos de goma Guar, 400 ml de agua.

Anexo 2. Procedimiento de parasitación de pupas de *C. capitata* por *D. longicaudata*.

Este procedimiento está compuesto por varios subprocesos:

a) Exposición larvaria

Este proceso inicia cuando se toman las larvas de *C. capitata*, 8 días de edad.

Los hospederos se separarán de las dietas a través del lavado con agua, con coladores metálicos de 25 cm de diámetro con malla de acero inoxidable de 30 x 30.

Posteriormente, se agrega 150 ml de polvo de olote/Litro de larva recuperada, luego se introducen 90 ml de larva en aros de polietileno de 1,2 cm de espesor, 11,5 cm de diámetro, cubiertos por una tela de punto lycra que tiene la capacidad de estirarse, que se adapta al aro y no permite que las larvas queden entre la tela y el aro. Se amarra la entrada con dos cordones que sirven para cerrar bien la estructura y evitar la salida de la larva. Cada uno de estos aros se introduce en una jaula horizontal de 71 x 47 x 38 cm, cubierta con malla antiáfido (50 mesh), donde se encuentran las hembras y machos adultos de *D. longicaudata* de 7-8 días de emergidos. El tiempo de exposición de la larva a parasitación debe ser de al menos 3 horas.

b) Período de post-exposición y desarrollo de parasitoides

Las larvas se dejan las bandejas en un cuarto de desarrollo a 26°C, 50-70% de humedad y en oscuridad. Luego se espera por 15 días para que el parasitoide se desarrolle completamente.

Un día antes de la emergencia, los puparios se separarán del polvo de olote por medio de tamizado. Se contabilizará el porcentaje de pupas parasitadas (las moscas emergen primero que el parasitoide).



Aros de exposición para *D. longicaudata* utilizados en el Programa Nacional Mosca de la Fruta. Aro de exposición con tela (A) y aros de exposición colocados sobre jaula de parasitoides para que *D. longicaudata* parasite las larvas (B).