UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Aislamiento y caracterización de cepas de hongos patógenos a *Praelongorthezia acapulcoa*"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A:

M. en B. Silvia Hernández Hernández

Director de tesis: Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

Codirector de tesis: Dr. Facundo Rafael Muñiz Paredes

CUERNAVACA, MORELOS **MAYO 2025**

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se contó con el apoyo de la beca CONAHCYT (CVU 738828).

El comité tutoral estuvo conformado por:

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

Dr. Facundo Rafael Muñiz Paredes

Dr. Guadalupe Peña Chora

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

Dra. Mary Carmen Torres Quintero

Agradecimientos

A mi poder superior que es Dios

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt), por la beca otorgada durante el periodo de mis estudios de doctorado (CVU 738828).

Al Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez por confiar en mí y darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto bajo su dirección.

Al Dr. Facundo Rafael Muñiz Paredes, por apoyarnos con la dirección del proyecto y por todas su enseñanzas y atenciones durante mi estancia en el CNRCB.

Dr. Guadalupe Peña Chora, gracias por todas sus enseñanzas y apoyo con los invernaderos y su guía durante todo el proceso.

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, por facilitarme el uso de equipos de su laboratorio, por sus observaciones durante el proyecto.

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, le agradezco por su confianza y apoyo durante todo el proceso, pero sobre todo por otorgarme las facilidades aun durante mi horario de trabajo para lograr la conclusión de mi doctorado, por estar siempre pendiente de mí.

Dra. Mary Carmen Torres Quintero, por todas sus observaciones durante este proyecto, así como por el aporte de sus ideas.

Al biólogo marco Antonio Díaz Manjarrez (CESVMOR) por su apoyo durante las colectas en campo, que fueron muchas y durante el periodo de pandemia, aun así el nunca se rindió.

A la maestra Laura Lina, por su apoyo en la enseñanza de técnicas ´para los bioensayos y aporte de ideas para realizarlos, además de su guía durante muchos años de mi formación.

A la doctora Verónica Obregón Barbosa, por guiarme durante tantos años, por su amistad y apoyo, por siempre estar presente.

A la maestra Alicia Fonseca, por compartir conmigo sus conocimientos, apoyarme con el uso del equipo de laboratorio y por su amistad y confianza de tantos años.

A los compañeros de Control Biológico que siempre han hecho amenas las horas de trabajo, gracias por las memorables horas de café, los quiero mucho chicos: Mare, Checo, Edwin, Andy, Duns, Héctor, Caleb, Karla, Tania, Amayrani, Julio, Yare; a mis niños de hongos: Frida, Betsa, Paquito, Marcos.

A los chicos LEFIP: Moni, Zuri, Mariana, Dari,Valfre un especial agradecimiento a la doctora Adri, por ayudarme con mis bloqueos mentales y animarme a concluir.

A mis amigos de muchos años y a los que apenas llegan: Paty, Sitla, Mau, Rodo, Mare, Julian, Al, pero de manera muy especial agradezco al doctor Víctor Carpanta, por su apoyo incondicional, por sus cuidados, atenciones y paciencia durante tantos años; los quiero mucho chicos.

A los administrativos del Centro de Investigación en Biotecnología, por su apoyo durante todo el proceso, Víctor, Sandra, Gracia, Rocío.

A mi querido grupo " La búsqueda Tres Marías" por escucharme siempre con atención, y enseñarme a respetar y disfrutar la vida.

Dedicatoria

A ti mi niño Jesús Fabián, por ser mi fortaleza, quien me mantiene de pie día con día ,que hace muy feliz mi vida.

A mi mami Tomy que siempre confiaste en mí y por tu amor incondicional, a papá Toño por heredarme este carácter tan peculiar, a Fabian, a mis hermanos y cuñadas: Jesús y Wanda; Noe y Norma; Marco y Ede , así como a mis sobrinos: Anto, Lalo, Bere, Nadia, Diana, Pepe Toño y Sarita

Índice

Índice de Figuras 8
Índice de tablas 11
1. Introducción 1
2. Marco teórico 2
2.1 Insectos escama 2
2.2 Descripción de *Praelongorthezia acapulcoa* 3
2.3 Ciclo de vida de *Praelongorthezia acapulcoa* 4
2.4 Distribución de *Praelongorthezia acapulcoa* 5
2.5 Daños a cultivos de gramíneas provocados por *Praelongorthezia acapulcoa* 5
2.6 Métodos de control de *Praelongorthezia acapulcoa* 6
2.7 Control biológico con hongos entomopatógenos 7
2.10 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos 9
2.11 Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de insectos 12
2.8 Importancia de la sistemática molecular en control biológico 13
3. Justificación 14
4. Hipótesis 14
5. Objetivos 15
5.1 Objetivó general 15
5.2 Objetivos particulares 15
6. Metodología 16
6.1 Estrategia experimental 16
6.2 Colecta de ejemplares de *Praelongorthezia acapulcoa* 17
6.3 Establecimiento de la cría de *Praelongorthezia acapulcoa* 18
6.4 Aislamiento de hongos provenientes de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa* 19
6.5 Cultivos Monospóricos de las cepas de hongos aislados de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa* 21
6.6 Determinación de la concentración de conidios 22
6.7 Evaluación de patogenicidad a *Praelongorthezia acapulcoa* 24
6.8 Determinación de la virulencia de aislados fúngicos patógenos de *Praelongorthezia acapulcoa* 25

6.9 Postulados de Koch 25
6.10 Identificación morfológica de los hongos aislados a partir de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa* 26
6.11 Identificación molecular de las cepas de hongos aislados a partir de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa* 26
6.11.1 Extracción de ADN genómico de los aislados fúngicos 28
6.11.2 Amplificación de Marcadores moleculares por Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) 29
6.11.3 Amplificación de BLOC 31
6.11.4 Amplificación de TEF 32
6.11.5 Amplificación de *β-Tubulina* 33
6.11.6 Amplificación de RPB2 34
6.11.7 Amplificación de LSU 34
6.11.8 Verificación de amplificación de marcadores moleculares BLOC, TEF EXON, *β-TUBULINA*, RPB2 Y LSU 35
6.11.9 Purificación de los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los marcadores moleculares 36
6.11.10 Curación de los resultados de secuenciación de los marcadores moleculares 36
6.11.11 MLST y análisis filogenéticos 37
6.12 Análisis estadístico 38
7 RESULTADOS 38
7.1 Establecimiento de la cría de *Praelongorthezia acapulcoa* 39
7.2 Identificación morfológica de cultivos monospóricos de los aislados fúngicos obtenidos a partir de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa* 40
7.3 Bioensayo de patogenicidad en *Praelongorthezia acapulcoa* 41
7.4 Signos de infección en *Praelongorthezia acapulcoa* 43
7.5 Evaluación de la virulencia por medio de la concentración letal media 45
7.6 Identificación molecular de cepas de hongos entomopatógenos 46
7.7 Análisis filogenético 48
8.0 Discusión 52
9. Conclusión 56
10. Literatura citada 57
11. Anexos 61

Índice de Figuras

Figura 1(A) En la parte posterior se muestran pupas del macho de la especie Praelongorthezia praelonga., en el recuadro se muestra al macho con alas. (B) Hembra adulta con la presencia del penacho de cera y ninfas de la especie Praelongorthezia praelonga.....3

Figura 2 (A) Hembra adulta que presenta el penacho de cera y ninfas de la especie Praelongorthezia acapulcoa en el inciso (B), se puede observar un macho con alas de la especie P. acapulcoa 4

Figura 3. (*A*) Presencia de *Praelongorthezia acapulcoa* en México, en los estados de Nayarit Guerrero y Morelos. (*B)* Distribución *P. acapulcoa* en los municipios de Xochitepec, Emiliano Zapata, Jojutla, Tlaquiltenango, Yautepec, Ayala, Puente de Ixtla, Cuautla, Zacatepec y Jojutla del estado de Morelos (marcados con los símbolos rojos). 5

Figura 4. Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos tomado de (Mburu et al., 2009) 11

Figura 5. A). hojas de caña de azúcar colocadas en esponja floral con las cuales se alimentó a las hembras de P. acapulcoa; B) contenedor de plástico tiene orificios en la tapa, que les permiten respirar a los insectos; C) el sistema de mantenimiento que contiene en el interior a los insectos 19

Figura 6 . En el inciso A se muestra un insecto con visible micosis a partir del cual se realizó un aislamiento en agar dextrosa Sabouraud tal como se puede ver en el inciso B, obteniendo al principio micelio de diferentes hongos, lo que se puede apreciar en el inciso C y este proceso se lleva a cabo hasta obtener micelio único como el observado en el inciso D. 20

Figura 7. A) Montaje de la cámara húmeda para obtener aislados de hongos; B) Hembra de P. acapulcoa con el cuerpo cubierto de micelio después de pasar 7 días dentro de la cámara húmeda; C) Aislado de micelio único en agar 20

Figura 8. Descripción de la secuencia para la obtención de cultivos monospóricos, en el inciso A se pueden ver los materiales necesarios, en el inciso B se observa una caja de Petri de agar agua con una cuadricula dibujada por la parte inferior y externa de la caja, esta cuadricula se realiza con la finalidad de que se coloque una gota con la dilución más pequeña en cada cuadro. A las 24 horas se revisa el crecimiento del micelio en el microscopio como se puede ver en el inciso D, posteriormente se marca el cuadro en donde se encuentren esporas únicas con la presencia de una punta de hifa y se corta el cuadro de agar en donde se haya localizado para finalmente transferirlo a un caja Petri con agar dextrosa Sabouraud como en el inciso F. 22

Figura 9. Para realizar el conteo de conidios en la cámara de Neubauer, el primer paso fue la recuperación de esporas a partir de una caja de Petri con micelio de 12 días de crecimiento, lo cual podemos observar en el inciso A. Para esto se agregaron 10 mL de agua con Tween 80 al 0.1%, y con ayuda de un micropipeta se recuperó la suspensión de conidios y se colocó en un microtubo de 10 mL de capacidad. Posteriormente, se realizaron dos diluciones 1 en 10 y 1 en 100; de la dilución 1 en 100 se tomaron 100 µL y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo, todo el proceso de conteo se realizó bajo el microscopio con el objetico de 40x. En el inciso B se observa la colocación de la cámara Neubauer y en el incisoC podemos

observar las cuadriculas de la cámara en un aumento de 40X, esto con la ayuda de la cámara conectada el microscopio. 23
Figura 10 . En el inciso A se muestran las 12 ninfas de P. acapulcoa en frasco seleccionadas para cada tratamiento, mientras que en el inciso B se muestra el sistema de evaluación elaborado con hojas de caña y esponja sintética en el que se colocaron los bioensayos. 24
Figura 11 . Descripción de la estrategia seguida para la identificación molecular de los aislados de hongos(Tomado de Muñiz, 2023) 27
Figura 12. Las flechas negras y la línea punteada indican la región que se amplificó del marcador ITS y arriba de las flechas se indica la posición de los cebadores utilizados; ITS 5 en sentido forward e ITS 4 en sentido reverse para la subunidad 5.8 ribosomal. 30
Figura 13 .Se aprecia una línea punteada con flechas en los extremos que indican la región a amplificar, así como la dirección, sobre las flechas en color negro se observan los cebadores utilizados para la secuenciación, en la parte inferior de la barra se encuentran las flechas en color negro que indican la dirección y la región amplificadas con los cebadores internos. Las condiciones para la amplificación del marcador BLOC se muestran en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**3. 31
Figura 14. Representación del gen TEF, se observan flechas negras unidad por una línea punteada que indican la región TEF exón amplificada además de la dirección de los marcadores moleculares; el marcador 983 F en sentido forward y el marcador 2218 R en sentido reverse. 32
Figura 15 . Representación del gen β-Tubulina la región amplificada se indica con las flechas negras unidas por la línea punteada, la punta de las flechas indica el sentido de los marcadores utilizados T1 forward y T22 reverse. 33
Figura 16. Se muestra la región amplificada entre la línea punteada que une las flechas negras, las puntas de las flechas indican la dirección de los cebadores. 34
Figura 17. Entre la línea punteada unida por las flechas negras se indica la región amplificada, así como la dirección de los cebadores utilizados para la amplificación. 35
Figura 18. (A) Se observa la presencia de P. acapulcoa en materia orgánica y en raíces (B) de caña de azúcar. Las observaciones se realizaron durante la etapa de pelillo de las plantas (C). 39
Figura 19 Mortalidad causada por las cepas de hongos entomopatógenos en Praelongorthezia acapulcoa. 42
Figura 20. Árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de ITS, TEF y BLOC, construido por el método de *Maximum LIkelihood*, que muestra la relación entre el aislado SH13 y SH134 con especies relacionadas en MEGA 7. Los números de cada nodo representan los valores de soporte 49
Figura 21. Árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de ITS, β-Tubulina y RPB2, construido por el método de Maximum LIkelihood, que muestra la relación entre los aislados SH22 y SH25 y especies relacionadas en MEGA7 50

Figura 22 Árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de ITS, TEF EXON y LSU, construido por el método de *Maximum Likelihood*, que muestra la relación entre el aislado SH52 y especies relacionadas en MEGA 11. 51
Figura 23. (Anexo 1) Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ADN genómico de los aislados fúngicos SH13, SH22, SH25, SH52 y SH134. 61
Figura 24. (Anexo 2) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR resultado de la amplificación de los marcadores moleculares ITS de los aislados fúngicos SH13, SH22, SH25, SH52 y SH134 62
Figura 25. (Anexo 3) Electroforesis en gel con los productos de PCR, resultado de la amplificación de cada marcador molecular de los cinco aislados fúngicos 64
Figura 26(Anexo 4) Gráficas de análisis Probit CL_{50} 64

Índice de tablas

Tabla 1. Coordenadas de los lugares de colecta 17
Tabla 2. Condiciones de PCR para la región ITS 30
Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación del marcador BLOC 31
Tabla 4. Programa de PCR para la amplificación del marcador TEF exón. 32
Tabla 5. Programa para amplificación de β-Tubulina 33
Tabla 6. Programa de PCR para la amplificación del marcador RPB2. 34
Tabla 7. Condiciones de PCR para la amplificación del marcador RPB2. 35
Tabla 8. Imágenes de la macromorfología y micromorfología de los aislados fúngicos 40
Tabla 9. Signos de infección observados en Praelongorthezia acapulcoa a los 8 días de tratamiento con las diferentes cepas. 43
Tabla 10. Virulencia de hongos entomopatógenos hacia Praelongorthezia acapulcoa, estimada mediante análisis probit 45
Tabla 11. Análisis BLAST del marcador ITS para cada aislado fúngico. 46
Tabla 12. Resultados del análisis BLAST realizado para cada uno de los cinco aislados fúngicos con las secuencias resultantes de la amplificación de los dos marcadores moleculares, usados comúnmente para la identificación a nivel de especie, se incluyen las secuencias con los números de acceso a GenBank 47

1. Introducción

Una de las principales agroindustrias en México es la producción de azúcar a partir de la planta de caña (*Sacharum officinarum),* logrando una producción anual de casi 6 millones de toneladas de azúcar. Esto ubica a México como el séptimo productor a nivel mundial; esta industria representa un impacto socioeconómico positivo, así como una mejora en la rentabilidad y competitividad (Murphy, n.d.) .

El estado de Morelos cuenta con una diversidad de climas para desarrollar cultivos de importancia económica, como caña de azúcar y arroz (*Oryza sativa*). En cuanto a superficie sembrada, la caña de azúcar es el tercer cultivo más importante a nivel nacional después del sorgo y maíz, ambos para grano, ya que anualmente se producen 2 millones 232 mil 803 toneladas de caña lo que representa 1 mil 976 millones de pesos de acuerdo a los informes del 2020 de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural en su portal oficial https://www.gob.mx/agricultura/morelos.

El manejo inapropiado de recursos como suelo, agua y agroquímicos representa un gran reto ya que provoca impactos importantes en el ambiente, se han presentado efectos secundarios nocivos como: la degradación del suelo, consumo elevado de agua y contaminación de los mantos freáticos.

Algunos otros contribuyen al aumento del efecto invernadero y la contaminación atmosférica como es el caso de la quema de bagazo y basura que provocan emisiones de gases; el uso excesivo de productos químicos para el control de plagas ha provocado también pérdida de biodiversidad (Lahlali et al., 2022).

Uno de los principales problemas que enfrenta esta agroindustria es la presencia de plagas y enfermedades de las plantas. Recientemente se han detectado pérdidas en cultivos de caña de azúcar y arroz, provocadas por la plaga *Praelongorthezia acapulcoa* (*Hemíptera: Orthezidae*), vista por primera vez en gramíneas de Acapulco, Guerrero, México y descrita por Morrison en el año 1952. Se trata de un insecto fitófago de tres milímetros de largo por dos de ancho conocido comúnmente como escama acanalada debido a su apariencia, esta plaga se encuentra ampliamente distribuida en Morelos (Carapia-Ruiz et al., 2019).

Es un insecto que succiona la savia de las hojas y posteriormente secreta una mielecilla que favorece la fumagina causada por el hongo *Capnodium* spp. Esta enfermedad cubre las hojas lo que impide que se lleve a cabo correctamente la fotosíntesis de la planta, retrasando su desarrollo y provocando una disminución en la producción total de azúcar (Chomnunti et al., 2014). Para controlar esta plaga se utilizan comúnmente productos químicos como por ejemplo: Engeo 247 SC elaborado con Thiametoxan+lambda-cyalotrina; o el producto Jade G. Por otra parte, también se aplica el control biológico mediante la utilización de parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos. Un ejemplo de productos comerciales es Spectrum Protat MB, formulado con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en dosis de 2L/ha (Márquez-Gutiérrez et al., 2017).

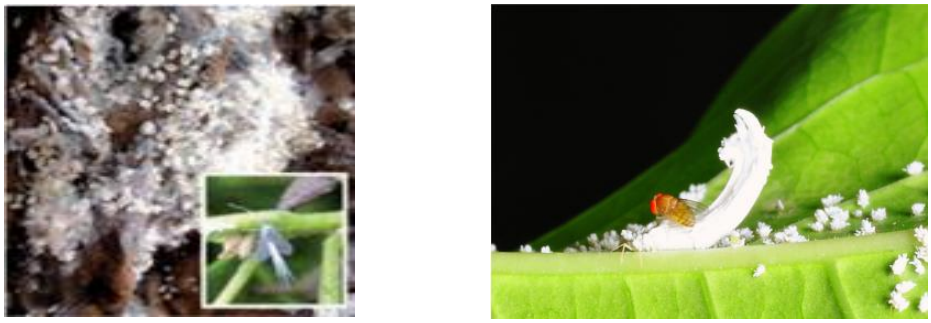
Con el objetivo de encontrar alternativas al control químico, este trabajo se centró en aislar y probar la patogenicidad y virulencia de hongos provenientes de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa*, para determinar su potencial como posibles agentes de control biológico, así como realizar la caracterización molecular de los aislados con capacidad entomopatógena.

2. Marco teórico

2.1 Insectos escama

Los insectos escama son miembros de la superfamilia Coccoidea, tienen el cuerpo recubierto de placas de cera color blanco debido a la presencia de numerosas glándulas, así como poros donde segregan cera y laca que cubre todo su cuerpo por lo que aparentan un mayor tamaño. Estos insectos presentan una forma más bien cuadrangular (Xu et al., 2023); su desarrollo puede presentar una metamorfosis completa si se trata de machos e incompleta si son hembras ya que ellas conservan su apariencia durante todo el ciclo de vida aun siendo maduras sexualmente. Los machos poseen un aparato bucal atrofiado, pero tienen un par de alas anteriores y posteriores que les sirven como balancines, lo que les da la capacidad de volar

(Kondo et al., 2012). Se muestran las diferencias entre machos (1A) y hembras en la Figura 1 B, a la izquierda se muestra un macho capaz de volar y a la derecha se puede observar una hembra adulta rodeada de ninfas que no puede volar.



(A) *(B)*

*Figura 1(*A) En la parte posterior se muestran pupas del macho de la especie *Praelongorthezia praelonga., en el recuadro se muestra al macho con alas*. *(*B) Hembra adulta con la presencia del penacho de cera y ninfas de la especie *Praelongorthezia praelonga*

Estos insectos presentan hermafroditismo, diploidismo y haploidismo debido a una amplia variación en el número de cromosomas, estructura del espermatozoide y sistema genético. La hembra adulta presenta la capacidad de madurar en una forma juvenil lo que se conoce como pedomorfosis, mientras que el macho adulto después de pasar por el estadio de prepupa y pupa se convierte en un alate con el aparato bucal no funcional (Kondo et al., 2012).

2.2 Descripción de *Praelongorthezia acapulcoa*

P. acapulcoa pertenece a la superfamilia Coccoidea, se trata de un insecto fitófago con cuerpo ovoide de 3 mm de largo por 2 mm de ancho, posee unas placas de cera en forma de mechones de color blanquecino que recubren su cuerpo ver Figura 2A (Mascarin et al., 2016). Presenta dimorfismo sexual, su reproducción es asexual cuando se trata de hembras, pero puede presentar una alternancia de generaciones con la presencia de machos, bajo esa circunstancia se realiza un apareamiento sexual. En la figura 2A podemos observar hembras de diferentes estadios ninfales de la especie P. acapulcoa mientras que a la derecha en la figura 2B se observa el macho de la misma especie



(A) *(B)*

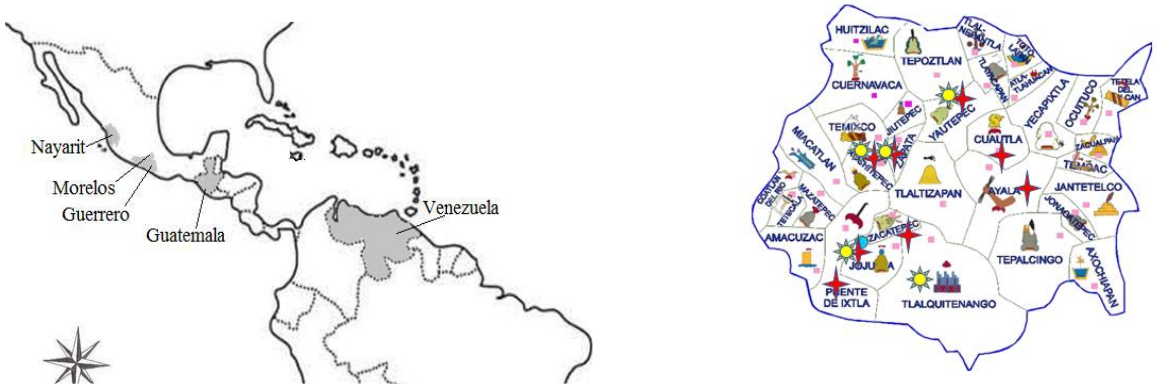
Figura 2 (A) Hembra adulta que presenta el penacho de cera y ninfas de la especie *Praelongorthezia acapulcoa en el inciso (B),* se puede observar un macho con alas de la especie *P. acapulcoa*

2.3 Ciclo de vida de *Praelongorthezia acapulcoa*

Este insecto pasa por los estadios de huevo, larva, ninfa y adulto. Aproximadamente después de los 15 días posteriores a la eclosión, se dan los primeros cambios de estadio quedando adheridas las exuvias (exoesqueleto de la muda), a la hoja en el sitio donde se alimentaron. En este periodo las ninfas se agrupan en colonias de aproximadamente 100 individuos, después de 2 semanas se preparan para mudar al tercer estadio, en el que se presenta mayor dispersión en la planta. Después de 2 semanas, mudan a la etapa de hembra adulta; los dos primeros estadios del macho son similares a los de la hembra. Sin embargo, después de terminar el segundo estado ninfal, los machos dejan de alimentarse, se convierten en prepupa y después en pupa hasta convertirse en un macho alado. Su tipo de reproducción es por partenogénesis; sin embargo, se sugiere de forma alterna un tipo de reproducción sexual con presencia de machos, aunque no ha sido completamente descrita esta forma de reproducción (Carapia Ruiz, 2009).

2.4 Distribución de *Praelongorthezia acapulcoa*

P. acapulcoa está distribuida en algunos países del continente americano como Guatemala, Venezuela y México país en el que se ha reportado en los estados de Guerrero, Nayarit y Morelos (Figura 3ª), particularmente en el estado de Morelos(CABI & EPPO, 2019), se distribuye en 9 municipios (Figura 3B) (Agenda técnica Morelos 2017).



(A) (B)

Figura 3. (*A*) Presencia de *Praelongorthezia acapulcoa* en México, en los estados de Nayarit Guerrero y Morelos. (*B)* Distribución *P. acapulcoa* en los municipios de Xochitepec, Emiliano Zapata, Jojutla, Tlaquiltenango, Yautepec, Ayala, Puente de Ixtla, Cuautla, Zacatepec y Jojutla del estado de Morelos (marcados con los símbolos rojos).

2.5 Daños a cultivos de gramíneas provocados por *Praelongorthezia acapulcoa*

En Morelos se han detectado pérdidas provocadas por la plaga *P. acapulcoa* en cultivos de caña de azúcar y recientemente en cultivos de arroz (Carapia-Ruiz et al., 2019). La primera vez que se aisló esta escama, fue a partir de gramíneas no identificadas localizada en colinas de Acapulco, Guerrero, México (Morrison, 1952). Posteriormente fue encontrada por Flores en Actopan, Morelos en 1953, con daños en la variedad de caña CO – 290; luego en 1957, en Ixtlán del Río, Nayarit; y en 1960 en Tezoyuca, Morelos. En el 2010 hubo pérdidas principalmente en

plantas de caña de la variedad CP 72-2086 y ITV 92-1424. En fechas recientes, reapareció este insecto escama en el estado de Morelos; aunque según los reportes solamente atacando a caña de azúcar. Recientemente se observó en cultivos de arroz y en sorgo, en el Estado de Morelos (Carapia-Ruiz et al., 2019).

P. acapulcoa es una plaga generalista y los daños que provoca pueden ser de manera directa a través de la alimentación ya que, al succionar la savia del floema de las hojas, causa una coloración amarilla, que inicia en el borde hasta la nervadura central de las hojas causando un rápido envejecimiento de la planta,.Cuando se presenta una alta infestación llega a provocar pérdidas de hasta el 50% de la planta, se estima que podría causar una pérdida importante de hasta 14 toneladas métricas por hectárea (Cahuer & Chavera, 2015).

2.6 Métodos de control de *Praelongorthezia acapulcoa*

En la naturaleza podemos encontrar microorganismos con la habilidad de causar patologías en insectos y esta característica los hace excelentes candidatos para ser utilizados como agentes de control biológico. Entre los microorganismos entomopatógenos se incluyen hongos, bacterias, virus y nemátodos, siendo las bacterias las que han tenido mayor relevancia debido a su rentabilidad económica (Lahlali et al., 2022).

En el estado de Morelos para controlar esta plaga en estadios tempranos del desarrollo del insecto, se utilizan productos químicos como Malathion al 50%y Thiamethoxan. Además, se puede llevar a cabo un control mecánico que consiste en eliminar de forma manual al insecto retirando los órganos de la planta infestados para quemarse posteriormente (Comunicación personal CESVMOR). Y en menor medida se realiza control biológico con enemigos naturales como las catarinas *Brachianta sp*., insecticidas biológicos como el producto Mycotrol y bacterias entomopatógenas.

Sin embargo, aunque en el estado de Morelos se emplean estos tres métodos de control, específicamente en el control biológico se siguen explorando enemigos naturales que sean más efectivos. Algunas investigaciones han evaluado productos químicos en condiciones de laboratorio y campo un ejemplo es la comprobación de la eficacia del 99% del detergente enzimático (Nudisoit®) contra el insecto *Praelongorthezia olivicola* (*Hemiptera: Ortheziidae*),

el cual es una plaga de los olivos. En ese estudio se evaluó la eficacia del detergente en estadíos de ninfa y hembras oviponentes; sin embargo, en las pruebas de campo el detergente presentó una eficacia menor de 74% en ninfas y del 48% en hembras oviponentes (Cahuer & Chavera, 2015). Se atribuyó que probablemente la diferencia de eficacia entre las pruebas de laboratorio y campo se deben a la intervención del follaje que impide una correcta aspersión del detergente, ya que este actúa por contacto y la eficiencia quizá se ve disminuida.

2.7 Control biológico con hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son un grupo importante de agentes de control biológico debido a que representan una de las mejores alternativas para el control de plagas por su baja toxicidad que tienen sobre otros organismos benéficos presentes en el ambiente y porque actualmente se utilizan como controladores de plagas en cultivos de importancia económica. Cabe resaltar que aproximadamente el 60 % de las enfermedades producidas en insectos son causadas por hongos entomopatógenos (Mantzoukas et al., 2022). El control biológico de insectos escama representa un reto, ya que estos insectos son impermeables y capaces de oponer altos niveles de resistencia a tratamientos con productos insecticidas químicos. Con frecuencia se han utilizado hongos entomopatógenos en programas de manejo integrado de plagas (MIP), ya que estos actúan por contacto sobre el insecto plaga, sin necesidad de que el agente controlador sea ingerido, además de que pueden causar infecciones repetitivas una vez que logran establecerse en campo (Demirci et al., 2011). Su especificidad puede variar a nivel de familia e incluso a nivel de especies aún muy relacionadas. Algunos autores han sugerido que existen 90 géneros de hongos entomopatógenos aproximadamente (Hernández-Rosas et al., 2019), de los cuales se han descrito más de 750 especies que infectan insectos.

Los géneros de hongos más representativos y conocidos en control biológico como insecticidas son: *Metarhizium, Beauveria, Aschersonia, Entomophthora, Zoophthora, Erynia*, *Eryniopsis*, Akanthomyces, *Fusarium, Hirsutella, Hymenostilbe, Paecelomyces* y *Verticilum*. Además, se tienen reportes de *Colletotrichum*, *Colletotrichum fiorinae* y *Colletotrichum nymphaeae* (Mascarin et al., 2016) Estos son considerados cosmopolita puesto que se han encontrado en

diversos sistemas como árboles, hojas y suelo en descomposición(Hernández-Rosas et al., 2019).

Uno de los hongos entomopatógenos más estudiados es Beauveria bassiana ya que resulta interesante que después del proceso de penetración en la cutícula proceso necesario para invadir a los insectos huéspedes; *B. bassiana* lleva a cabo una producción de metabolitos secundarios como las toxinas beauvericina, bassianina, bassianolida, beauverolidas, tenelina, oosporeína y algunos compuestos orgánicos como el ácido oxálico. Estas toxinas ayudan *a B. bassiana* a parasitar y matar a los huéspedes de una manera más rápida (Wang et al., 2021) .

Los hongos entomopatógenos presentan diferentes estructuras de acuerdo a la fase de desarrollo en la que se encuentren como: Conidioforos, conidios, esporas y micelio; estructuras que facilitan su cultivo a gran escala, estas características los hacen interesantes como agentes de control biológico. Lo que a su vez ha llevado a una creciente necesidad de identificar de manera certera algunas especies crípticas de hongos, para lo cual se hace uso de estudios taxonómicos basados en secuencias de ADN.

Para llevar a cabo la identificación molecular de especies crípticas se realizan análisis multi locus, en que se amplifican varios marcadores moleculares que posteriormente serán secuenciados, un ejemplo de ello es el análisis realizado a varias especies crípticas de género *Beauveria* en el que se utilizaron las secuencias Bloc y el factor de elongación 1-α como marcadores moleculares con lo que se logró la identificación de 25 haplotipos de *Beauveria bassiana* (Camargo et al., 2014)

2.10 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos a diferencia de otros agentes de control biológico cuentan con mecanismos de acción que les permiten actuar sin la necesidad de ser ingeridos por el insecto, ya que lo infectan por contacto y adhesión de las esporas a su cuerpo y justo es el proceso con el que inician la infección.

1.- El primer paso que se lleva a cabo es la adhesión de la espora a la cutícula del hospedero ya sea en los espiráculos, partes bucales, membranas intersegmentales, o el ano, entre otros. Posteriormente ocurre la germinación de la espora; que comprende desde el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteíca en el insecto, la adhesión de la espora a la epicutícula por la presencia de adhesinas, y culmina con la germinación de la espora y formación del apresorio para iniciar la fase de penetración (Camargo et al., 2014).

2.- Penetración en el hemocele.

Algunas propiedades de la cutícula del insecto son muy importantes en esta etapa, como: el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. Durante este proceso se llevan a cabo dos fenómenos: uno físico y otro químico tal como se muestra en la Figura 4 . El primero se trata de la formación del haustorio (punta de la hifa), estructura cuya función es la de ejercer presión hasta romper las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. Por otra parte, el mecanismo químico consiste en liberación de enzimas como proteasas, lipasas, lipooxigenasas y quitinasas principalmente, que degradan el tejido en la zona a penetrar llevando a cabo la digestión del integumento (Camargo et al., 2014).

3.- Replicación en el hemocele.

Una vez que los hongos llegan a la hemolinfa del huésped producen propágulos similares a las levaduras llamados blastosporas, esto es posible debido a la acción del factor de transcripción forkhead *Fkh2* y la proteína quinasa *Bbsnf1* identificados en *B. bassiana* como genes involucrados en la formación de blastosporas; estas estructuras son muy importantes en la virulencia del hongo durante el periodo de enfermedad del insecto (Shin et al., 2020).

Se trata de una estrategia de los hongos para tener una rápida reproducción ya que estas estructuras les permiten evadir al sistema inmune del insecto y multiplicarse por división y gemación lo que favorece la colonización del cuerpo del insecto en un menor tiempo además de producir metabolitos secundarios como es el caso de algunas enzimas que tiene como objetivo acelerar las muerte del insecto debido a la septicemia (Mascarin et al., 2016).

El insecto muestra síntomas como falta de coordinación, convulsiones, comportamientos alterados, parálisis, daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluidos y consumo de nutrientes, los cuales culminan con la muerte del insecto.

Particularmente el hongo *Metarhizium* contiene el factor Proteasa Pr1, considerado importante en la virulencia, lo que demuestra que la secreción de enzimas hidrolíticas son parte de la virulencia de cada cepa (Gao et al., 2011).

Se sabe que los hongos pueden expresar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) altamente conservados, los cuales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) expresados en los fagocitos del insecto, causando un estímulo de la respuesta inmune de los insectos. Por ejemplo, los glucanos en la superficie celular de los hongos pueden servir como PAMP y ser reconocidos por los PRR, induciendo las respuestas inmunes humorales y celulares en los insectos (D. Liu et al., 2023). Sin embargo, la evitación conductual se considera la defensa más eficaz contra los patógenos. Ejemplos de esto incluyen insectos sociales, como la termita *Macrotermes michaelseni* que puede determinar la virulencia a distancia de las cepas de *Metarhizium* y *Beauveria (Mburu et al., 2009),* por lo tanto, repelen las cepas más virulentas. El insecto *Anthocoris nemorum* evita buscar alimento y ovipositar en plantas contaminadas con esporas *de Beauveria* sp. (Meyling et al., 2006).

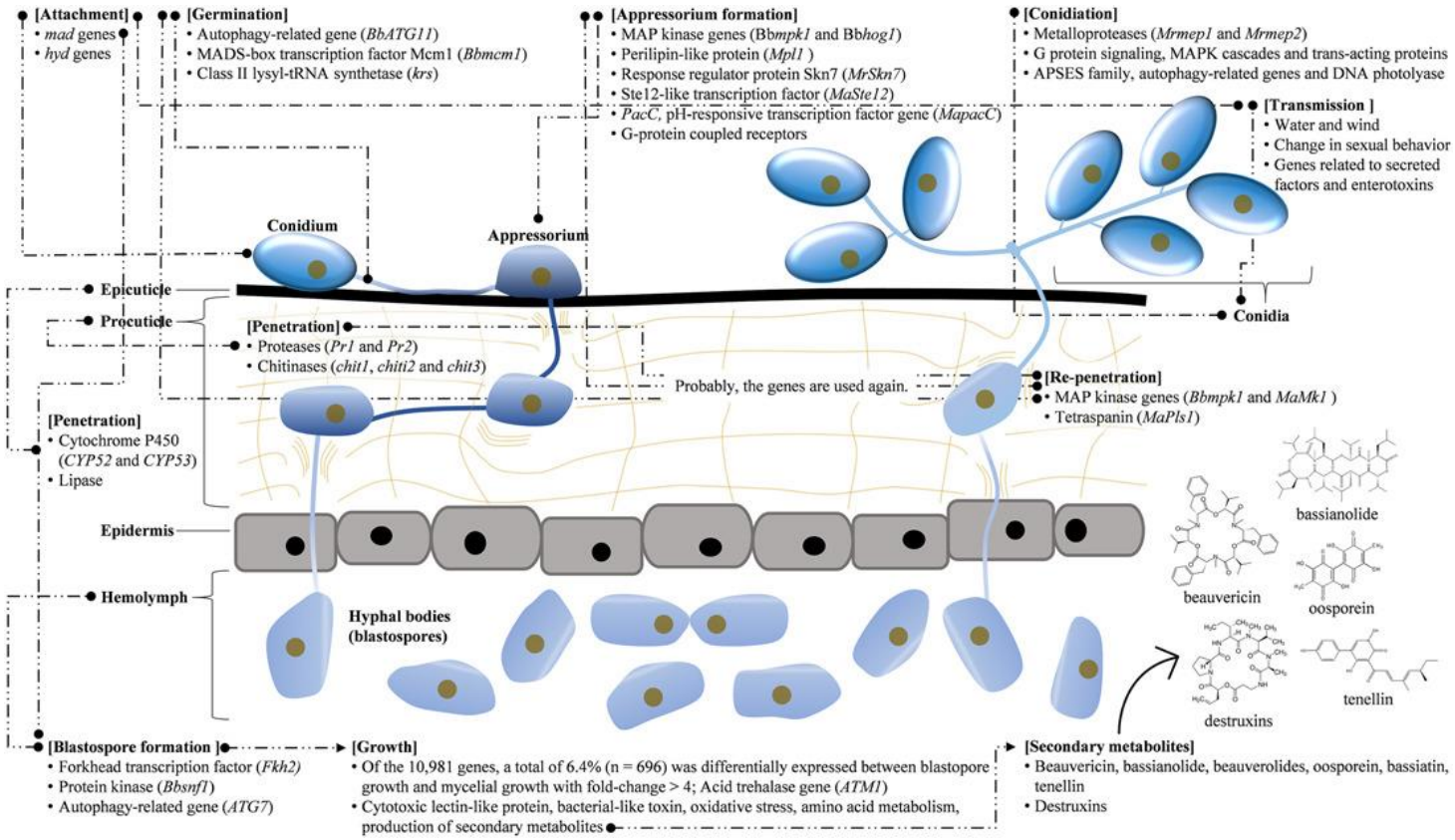


Figura 4. Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos tomado de (Mburu et al., 2009)

2.11 Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de insectos

A la fecha, se han realizado diversos estudios con la finalidad de detectar y aislar hongos entomopatógenos que ataquen a plagas que afectan a cultivos de importancia comercial. Entre estos estudios destaca la prevalencia estacional de un hongo entomopatógeno endémico de Brasil (Hongo Salmón) identificado como *Colletotrichum nymphaeae* (Sordariomycetes: Glomerellales). Este hongo infecta a poblaciones de insectos escamas de la especie *Praelongorthezia praelonga* que es una plaga de cítricos. Los resultados revelaron que se observaron altas proporciones de insectos infectados con el hongo *Lecanicillium* sp. después de los picos de infección de *C. nymphaeae.* Además, ambos hongos contribuyeron al 95% de la mortalidad general de *P. praelonga* durante la temporada de lluvias, concluyendo que el efecto combinado de ambos hongos mejora considerablemente el control biológico de *P. praelonga*.

Sayed y Dunlap, en el 2019, realizaron aislamientos de hongos a partir de cadáveres de *Icerya seychellarum* un insecto escama plaga de árboles de mango blanco, del que se obtuvieron un total de 87 aislados de hongos, de los cuales se formó un subconjunto de siete aislamientos que se eligieron para realizar estudios de patogenicidad y virulencia. Cabe resaltar que este trabajo fue el primero en reportar la presencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* infectando de manera natural a la cochinilla *Icerya seychellarum.*

Mediante estudios morfológicos y moleculares se logró diferenciar a dos taxones de hongos patógenos de plantas del género *Fiorna externa,* se trata de los hongos *Colletotrichum fiorinae y Colletotrichum nymphaceae* que anteriormente eran especies crípticas simplemente conocidas como el hongo salmón.

Se desconocía su capacidad como patógenos de insectos, sin embargo, hay una excepción y es que se comportan como entomopatógenos exclusivamente de insectos escama pertenecientes al género *Praelongorthezia,* ya que hasta ese momento solo se conocían estas dos cepas de hongos aislados de los insectos escama, la afinidad por el hospedero es una característica que hace a estos hongos muy interesante como agentes de control biológico hacia *Praelongorthezia praelonga*(Wynns et al., 2020).

2.8 Importancia de la sistemática molecular en control biológico

La sistemática molecular es una herramienta muy importante debido a que es esencial para lograr diferenciar entre especies que son consideradas crípticas (Francis y Manchegowda, 2023). La identificación de hongos entomopatógenos ayuda a entender la dinámica entre el agente controlador y la plaga asegurando el impacto deseado en el control, lo que ha llevado a un gran desarrollo en diagnósticos moleculares (Korosi et al., 2019). El uso de oligonucleótidos específicos y el análisis de marcadores moleculares como microsatélites son usados para diferenciar especies y evaluar la diversidad genética de poblaciones. Con la correcta identificación se puede predecir el rango de hospederos de enemigos naturales para así seleccionar un agente de control biológico apropiado tomando en cuenta características como la adaptabilidad climática (Vianna et al., 2020).

3. Justificación

Praelongorthezia acapulcoa, es una plaga polífaga que ataca cultivos importantes como caña de azúcar y arroz. Esta plaga genera pérdidas en el estado de Morelos, afectando la producción de dichos cultivos. Hasta ahora se ha controlado con productos químicos de manera deficiente debido a que la capa cerosa que recubre a estos insectos no permite que penetren. Para controlar esta plaga se requieren mejores agentes de control biológico, por lo que es indispensable la búsqueda de nuevos agentes que sean más específicos en el control de esta plaga e inocuos para otros organismos vivos. Dado lo anterior, en este trabajo se planteó como objetivo aislar e identificar diferentes hongos entomopatógenos provenientes de los cadáveres del insecto *P. acapulcoa*. Los candidatos serán evaluados en cuanto a patogenicidad y virulencia para demostrar el potencial de ser utilizados como alternativa en el control de *Praelongorthezia acapulcoa*.

4. Hipótesis

Los aislados de hongos provenientes de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa* serán patógenos hacia este insecto.

5. Objetivos

5.1 Objetivó general

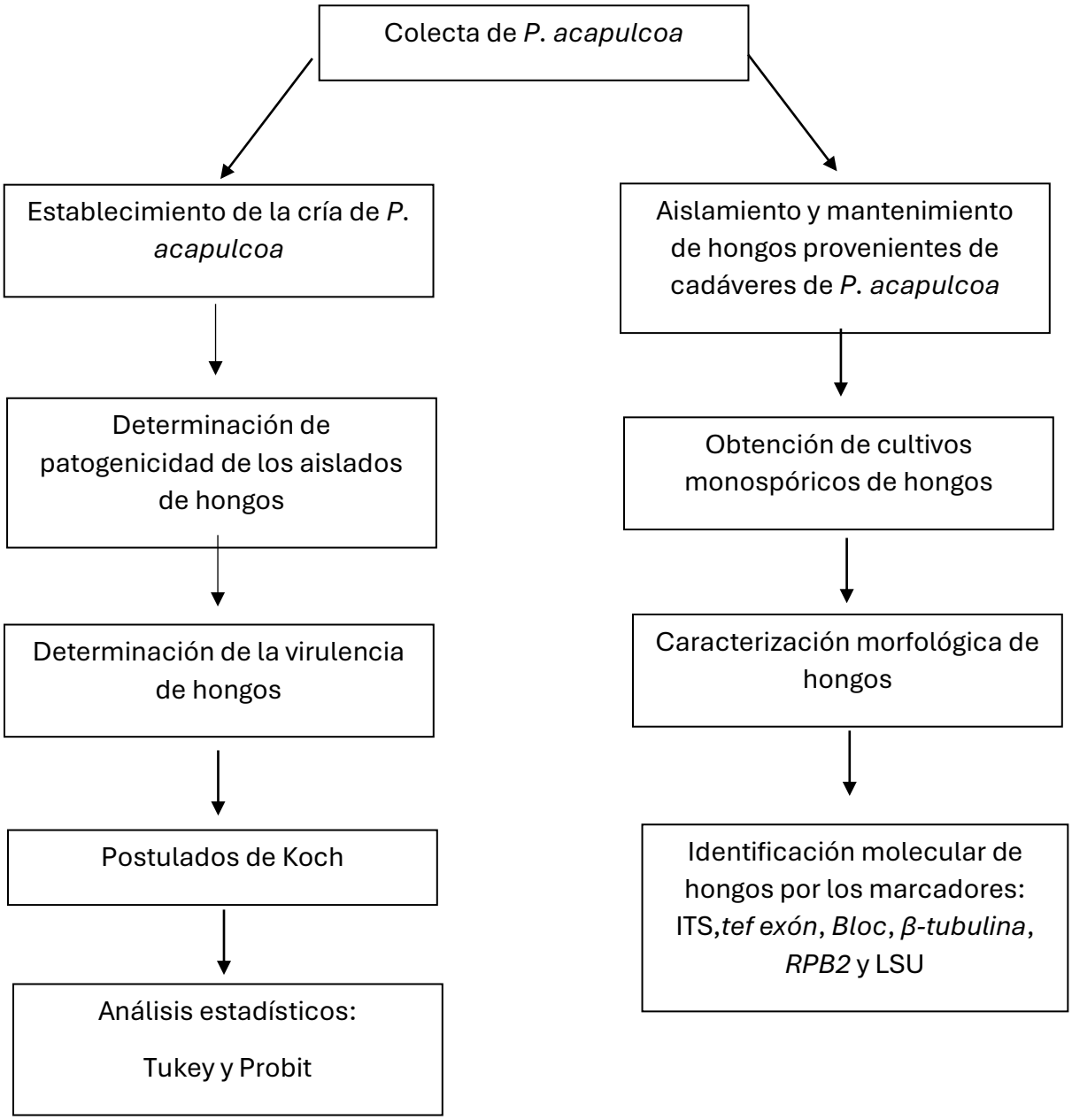
Evaluar la patogenicidad y virulencia de los hongos aislados de *P. acapulcoa*, así como identificar molecularmente los aislados que presenten patogenicidad y virulencia.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener aislados de hongos a partir de cadáveres de *P. acapulcoa* colectados en campo.
- Establecer un pie de cría de *P. acapulcoa.*
- Evaluar la patogenicidad de aislados de hongos provenientes de cadáveres de *P. acapulcoa.*
- Determinar la virulencia de los aislados de hongos que presenten patogenicidad en *P. acapulcoa.*
- Identificar molecularmente los aislados de hongos con mayor virulencia hacia *P. acapulcoa*

6. Metodología

6.1 Estrategia experimental



6.2 Colecta de ejemplares de *Praelongorthezia acapulcoa*

Debido a que solo las hembras de *Praelongortehzia acapulcoa* tienen la capacidad de alimentarse al contrario de los machos que tienen el aparato bucal atrofiado; las colectas fueron dirigidas a cadáveres de insectos en estadio de hembra adulta, con la finalidad de hacer aislamientos de hongos, así como ejemplares vivos para establecer un pie de cría y tener suficientes individuos para los bioensayos. Las colectas se llevaron a cabo en diferentes municipios del estado de Morelos como Xochitepec, Emiliano Zapata, Jojutla, Tlaquiltenango, Yautepec, Ayala, Puente de Ixtla, Cuautla, Zacatepec, Zapata y Jojutla donde se reportó la presencia de está causando daños principalmente a la variedad ITV 92-1424 de caña de azúcar. Además, se realizó una colecta en el municipio de Miacatlán debido a que productores informaron a la junta de Caña, perteneciente al Comité de Sanidad Vegetal Morelos, la presencia de la escama acanalada como se le llama de manera común. Esta plaga se presenta en plantas adultas de seis a ocho meses principalmente en la etapa de lluvias y unas semanas después; por lo que las colectas se llevaron a cabo en los meses de septiembre, octubre y noviembre. En la Tabla 1 se presenta una relación de los lugares con presencia de la plaga y donde fueron colectados cadáveres del insecto.

Tabla 1. Coordenadas de los lugares de colecta

Fecha	**Municipio**	**Campo**	**Coordenadas**
24-09-19	E. Zapata	El Castillo	18°52’00”N 99°09’00”O
24-09-19	Xochitepec	Real del puente parcela 1	18°80’56”N 99°02’00”O
24-09-19	Jojutla	Tlatenche parcela 1	18°35’47”N 99°11’11”O
24-09-19	Jojutla	Tlatenche parcela 2	18°35’47”N 99°11’11”O
25-10-19	Xochitepec	Real del puente parcela 2	18°80’54”N 99°02’00”O
06-11-19	Jojutla	La palma	18°36’53’’N 99°10’49’’O
06-11-19	Tlaquiltenango	Aurrera	18°37’57’’N 99°9’47’’O
06-11-16	Tlaquiltenango	La telaraña	18°37’57’’N 99° 9’47’’O
07-11-19	Yautepec	La chirimoya	18°53'00’’N 99°04’00’’ O
07-11-19	Yautepec	Los baños	18°53'00’’N 99°04’00’’ O
07-11-19	Yautepec	Los hermanos	18°45’6’’N 99°22’33’’O
27-08-2020	Miacatlán	Los Guillermos	18°45’2’’N 99°22’31’’O
01-09-2020	Ayala	Anenecuilco	18°46’41”N 98°59’10”O

Como se mencionó anteriormente, se realizaron exploraciones en 12 municipios de los cuales se logró recolectar especímenes en 7 de ellos (Tabla 1). Los cadáveres colectados se llevaron a laboratorio y se procedió a realizar aislamientos .

6.3 Establecimiento de la cría de *Praelongorthezia acapulcoa*

Se estableció la cría de *P. acapulcoa* en invernadero con el fin de tener ejemplares disponibles para los bioensayos requeridos. Para la cría se usaron plantas de caña crecidas en invernadero libres de plagas de la variedad CP 72-2086. Posterior a la colecta en campo, se realizó la identificación de la especie, para ello se colocaron 10 individuos en cada planta de caña y se hicieron observaciones para reconocer los estadios biológicos y observar su comportamiento. También se eliminó la presencia de cualquier enemigo natural. Se observó una disminución de los insectos probablemente debido a las condiciones climáticas que no favorecen a su desarrollo, aun así, se siguieron los cuidados necesarios para lograr que se desarrollara la colonia de insectos.

Originalmente se había establecido el pie de cría en invernadero, pero con la llegada del invierno, se observó la muerte de más de la mitad de los insectos, por lo que se procedió a cambiar la estrategia y los insectos fueron colocados en contenedores de plástico de capacidad de 1 litro con la tapa horadada. Dentro de los contenedores se colocaron hojas de caña sostenidas en esponja floral para mantener la hidratación, y se mantuvieron en el laboratorio a una temperatura de 27°C y fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad (Figuras 5 A, B y C).



(A)



(B)



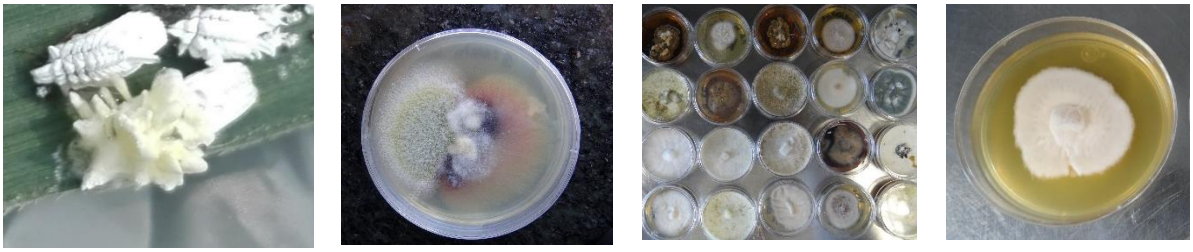
(C)

Figura 5. A). hojas de caña de azúcar colocadas en esponja floral con las cuales se alimentó a las hembras de *P. acapulcoa; B)* contenedor de plástico tiene orificios en la tapa, que les permiten respirar a los insectos; *C)* el sistema de mantenimiento que contiene en el interior a los insectos

6.4 Aislamiento de hongos provenientes de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa*

Se recolectaron cadáveres con y sin signos visibles de micosis . Los cadáveres fueron colocados en microtubos de 1.5 mL y se tomaron las muestras raspando la superficie del insecto con micelio y se inocularon en una caja con medio papa dextrosa agar (PDA). La caja se incubó a una temperatura de 27 °C hasta observar el crecimiento de micelio fúngico. Una vez que la caja se cubrió con micelio, se aislaron de forma individual cada una de las colonias con morfología distinta en otra caja de Petri con PDA, se repitió este proceso hasta que se logró obtener micelio único tal como se observa en la Figura 6.

Una vez que se obtuvieron cajas con micelio único se procedió a realizar cultivos monospóricos, ya que este procedimiento facilita la identificación mediante características fenotípicas como la morfología de los conidios e hifas (Chen et al., 2021; Geremew et al., 2024; Moslem et al., 2010)



(A) (B) (C) (D)

Figura 6 . En el inciso A se muestra un insecto con visible micosis a partir del cual se realizó un aislamiento en agar dextrosa Sabouraud tal como se puede ver en el inciso B, obteniendo al principio micelio de diferentes hongos, lo que se puede apreciar en el inciso C y este proceso se lleva a cabo hasta obtener micelio único como el observado en el inciso D.

Los cadáveres de insectos que no presentaron signos visibles de micosis fueron colocados en una cámara húmeda con la finalidad de favorecer la germinación de esporas que posiblemente se encontraran en el interior de los insectos. Para ello, primero se sumergieron los cadáveres en hipoclorito de sodio (0.5% del producto activo) durante 5 minutos. Después se enjuagaron los insectos cuatro veces con agua destilada estéril; posteriormente, se colocó papel filtro estéril en una caja Petri esterilizada y se agregó agua destilada estéril. Los cadáveres de los insectos se colocaron sobre el papel filtro dentro de la caja, y por último se selló la placa con Parafilm®.

Los cadáveres de los insectos se incubaron a 28 °C durante 7 días; con una aguja de siembra y dentro de la cámara de flujo laminar se tocó levemente el cuerpo del insecto donde se observaba crecimiento fungoso, el cual fue transferido a medio de cultivo PDA (Figura 7).



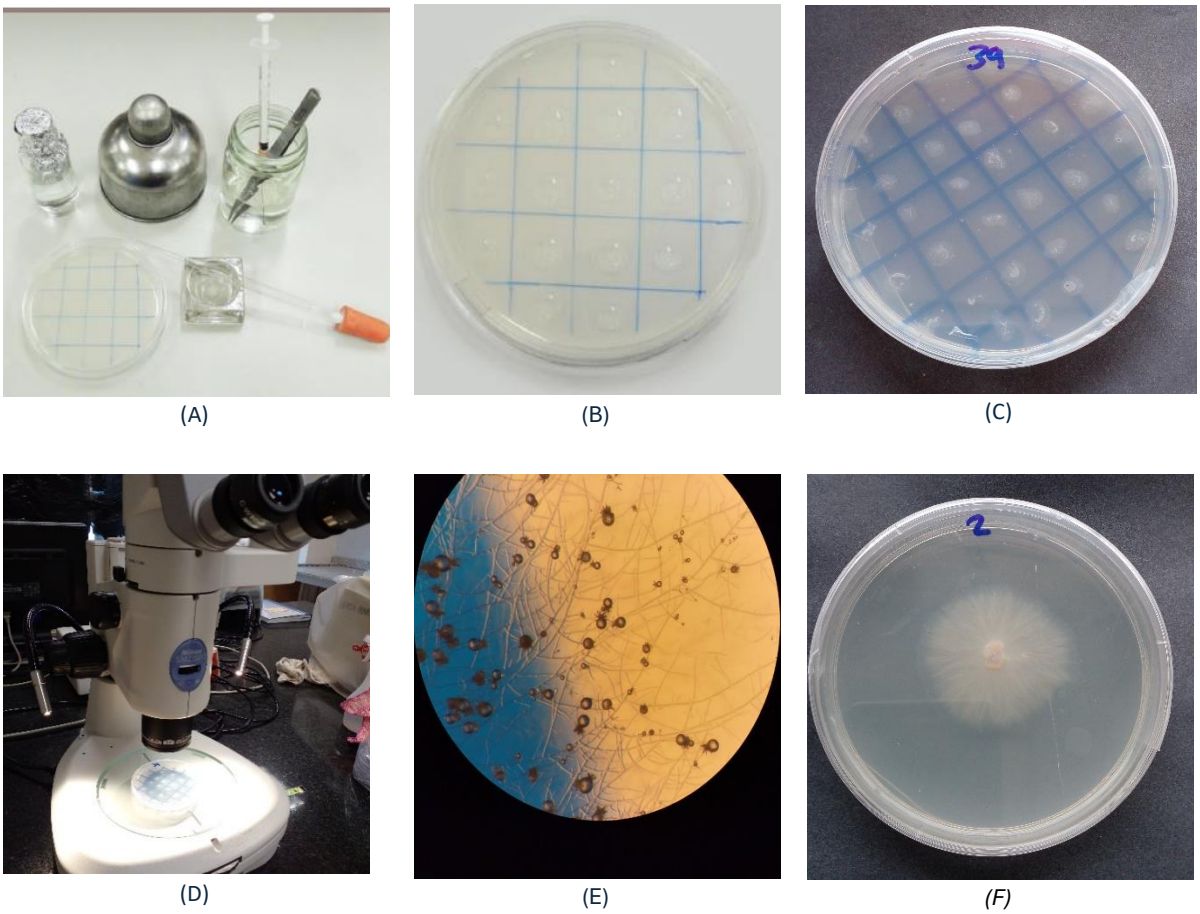
(A) (B) (C)

Figura 7. A) Montaje de la cámara húmeda para obtener aislados de hongos; *B)* Hembra de *P. acapulcoa* con el cuerpo cubierto de micelio después de pasar 7 días dentro de la cámara húmeda; *C)* Aislado de micelio único en agar

6.5 Cultivos Monospóricos de las cepas de hongos aislados de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa*

Para la obtención de cultivos monospóricos se realizó la metodología propuesta por Chomnunti et al. (2014). Con la ayuda de un asa bacteriológica se obtuvo una muestra de conidios del cultivo polispórico (cultivo que proviene de diversas esporas) y se diluyó en un microtubo con 1mL de solución Tween 80 al 0.1%. La muestra se agitó y con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocaron gotas pequeñas en placas con agar agua al 2%, cuidando que cada gota quedara en el centro de cada cuadro de una cuadricula marcada previamente por la parte externa de la caja Petri.

Las placas de Petri se incubaron a una temperatura de 28 °C durante la noche. Después de este periodo de tiempo las placas fueron examinadas para detectar la germinación de esporas bajo el microscopio. Los cuadrantes en que se encontraron esporas únicas germinadas fueron marcados y posteriormente se cortaron los trozos de agar de esos cuadrantes y fueron transferidos a placas Petri con PDA. Se realizó la incubación de las placas a una temperatura de 28°C hasta que el micelio cubrió toda la caja, en la Figura 8A-F se muestran imágenes de la secuencia de obtención de cultivos monospóricos.



(A) (B) (C)

(D) (E) *(F)*

Figura 8. Descripción de la secuencia para la obtención de cultivos monospóricos, en el inciso A se pueden ver los materiales necesarios, en el inciso B se observa una caja de Petri de agar agua con una cuadricula dibujada por la parte inferior y externa de la caja, esta cuadricula se realiza con la finalidad de que se coloque una gota con la dilución más pequeña en cada cuadro. A las 24 horas se revisa el crecimiento del micelio en el microscopio como se puede ver en el inciso D, posteriormente se marca el cuadro en donde se encuentren esporas únicas con la presencia de una punta de hifa y se corta el cuadro de agar en donde se haya localizado para finalmente transferirlo a un caja Petri con agar dextrosa Sabouraud como en el inciso F.

6.6 Determinación de la concentración de conidios

Para ajustar la concentración en cada bioensayo, se determinó la concentración de conidios provenientes de cultivos monospóricos, estos se recuperaron con una solución de Tween 80 al 0.1%. La suspensión fue transferida a un tubo de 50 mL, y homogenizada en vortex.

Para el conteo de conidios se utilizó un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Figura 9). Se colocaron 100 µL de la suspensión de conidios en la cámara dejando sedimentar por 3 minutos antes de iniciar el conteo de conidios con ayuda de un contador. El conteo fue realizado en un microscopio óptico con el objetivo de 40X, contando los cuadrantes de las 4 esquinas y el

cuadrante central, del total contado en las cinco celdas se calculó el promedio y fue determinada la concentración.



(A) (B) (C)

Figura 9. Para realizar el conteo de conidios en la cámara de Neubauer, el primer paso fue la recuperación de esporas a partir de una caja de Petri con micelio de 12 días de crecimiento, lo cual podemos observar en el inciso A. Para esto se agregaron 10 mL de agua con Tween 80 al 0.1%, y con ayuda de un micropipeta se recuperó la suspensión de conidios y se colocó en un microtubo de 10 mL de capacidad. Posteriormente, se realizaron dos diluciones 1 en 10 y 1 en 100; de la dilución 1 en 100 se tomaron 100 µL y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo, todo el proceso de conteo se realizó bajo el microscopio con el objetico de 40x. En el inciso B se observa la colocación de la cámara Neubauer y en el incisoC podemos observar las cuadriculas de la cámara en un aumento de 40X, esto con la ayuda de la cámara conectada el microscopio.

Cálculo de la concentración de conidios

$$concentración\ de \frac{conidios}{mL} = A \times 25 \times 10{,}000 \times Factorde\ dilución$$

A: Número de conidios/Número de celdas contabilizadas

25: Número total de celdas contabilizadas

10,000: Número total de conidios contenidos en la diez milésima parte de un mililitro

Factor de dilución: 10mL/1mL

6.7 Evaluación de patogenicidad a *Praelongorthezia acapulcoa*

Con el fin de evaluar la patogenicidad de los aislados monospóricos obtenidas de aislados fúngicos en *P. acapulcoa,* se utilizó una concentración de conidios de $1x10^7$ conidios/mL. Los insectos del estadio de ninfa adulta pre-reproductiva se sumergieron en la suspensión de conidios adicionada de Tween 80 (Sigma-Aldrich) durante 30 segundos. Posteriormente, los insectos se colocaron en el sistema de evaluación elaborado con hojas de caña de azúcar como se muestra en la Figura 10. La unidad experimental estuvo constituida por 12 insectos en cada recipiente, para cada uno de los tratamientos. En total se probaron seis tratamientos para los que se realizaron tres repeticiones por cada cepa y un control que consistió en sumergir los insectos en solución Tween 80 al 0.01% estéril. Las unidades experimentales se mantuvieron a una temperatura de 27 °C, el monitoreo se realizó durante 12 días, registrando la mortalidad. El diseño utilizado fue completamente al azar y cada unidad experimental estuvo conformada por 12 individuos.



(A) *(B)*

Figura 10 . En el inciso A se muestran las 12 ninfas de *P. acapulcoa* en frasco seleccionadas para cada tratamiento, mientras que en el inciso B se muestra el sistema de evaluación elaborado con hojas de caña y esponja sintética en el que se colocaron los bioensayos.

6.8 Determinación de la virulencia de aislados fúngicos patógenos de *Praelongorthezia acapulcoa*

Una vez que se probó la patogenicidad hacia *P. acapulcoa* se determinó la virulencia calculando la concentración letal 50 (CL_{50}), esta es la concentración a la cuál mueren el 50% de los organismos tratados. Se emplearon cinco concentraciones, las cuales se eligieron de acuerdo con los resultados obtenidos en los bioensayos de patogenicidad. Cada tratamiento fue aplicado con el mismo sistema que en los bioensayos de patogenicidad, la mortalidad fue registrada a partir de las 24 horas y hasta por 12 días esperando que los insectos se cubrieran de micelio. De los datos obtenidos en los bioensayos de virulencia se realizó un análisis Probit, con el programa Polo Plus versión 1.0, para determinar la concentración letal media.

6.9 Postulados de Koch

Una vez evaluadas los aislados y realizados los bioensayos de virulencia, se tomaron al azar cinco organismos muertos por infección fúngica, y fueron colocados en microtubos de 1.5 mL los insectos se lavaron con agua estéril. Posteriormente, los cadáveres fueron macerados y colocados en microtubos de 1.5 mL con medio LB líquido. Después de 24 horas de incubación, se inocularon en cajas Petri con agar dextrosa Sabouraud y se incubaron a 27 °C hasta que el micelio cubrió una tercera parte de la caja. De las cajas inoculadas, se preparó una suspensión de conidios a la concentración que presentó mayor virulencia para cada aislado. Posteriormente, la suspensión de conidios fue aplicada sumergiendo a cinco organismos sanos para que adquirieran la infección siguiendo el protocolo antes mecionado, para documentar los signos de infección se tomaron fotografías hasta que el organismo infectado estuvo cubierto de micelio. Por último, se llevó a cabo un re-aislamiento a partir del hospedador recién infectado para comprobar de esta manera que se tratara del agente etiológico.

6.10 Identificación morfológica de los hongos aislados a partir de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa*

Se realizó la caracterización de los aislados fúngicos para lo cual se utilizaron inicialmente métodos tradicionales basados en características morfológicas del micelio tales como: forma, color, tamaño y crecimiento de las esporas e hifas y tipo de estructuras reproductivas. Posteriormente, las características morfológicas fueron comparadas con las descripciones disponibles en la literatura consultada(Geremew et al., 2024; Moslem et al., 2010; Chen et al., 2021) .

6.11 Identificación molecular de las cepas de hongos aislados a partir de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa*

Debido a que la identificación morfológica algunas veces es insuficiente por la existencia de especies crípticas es decir que poseen características morfológicas similares (Francis y Manchegowda, 2023), y con la finalidad de identificar de manera certera a los hongos evaluados, se realizó la identificación molecular de los aislados.

La estrategia para seguir fue la identificación por medio de la taxonomía de ADN que utiliza varias regiones (*MLST: multilocus sequencing typing*), y a partir de relaciones filogenéticas se asignan identidades. En la Figura 11 se describe la estrategia seguida para la identificación molecular:

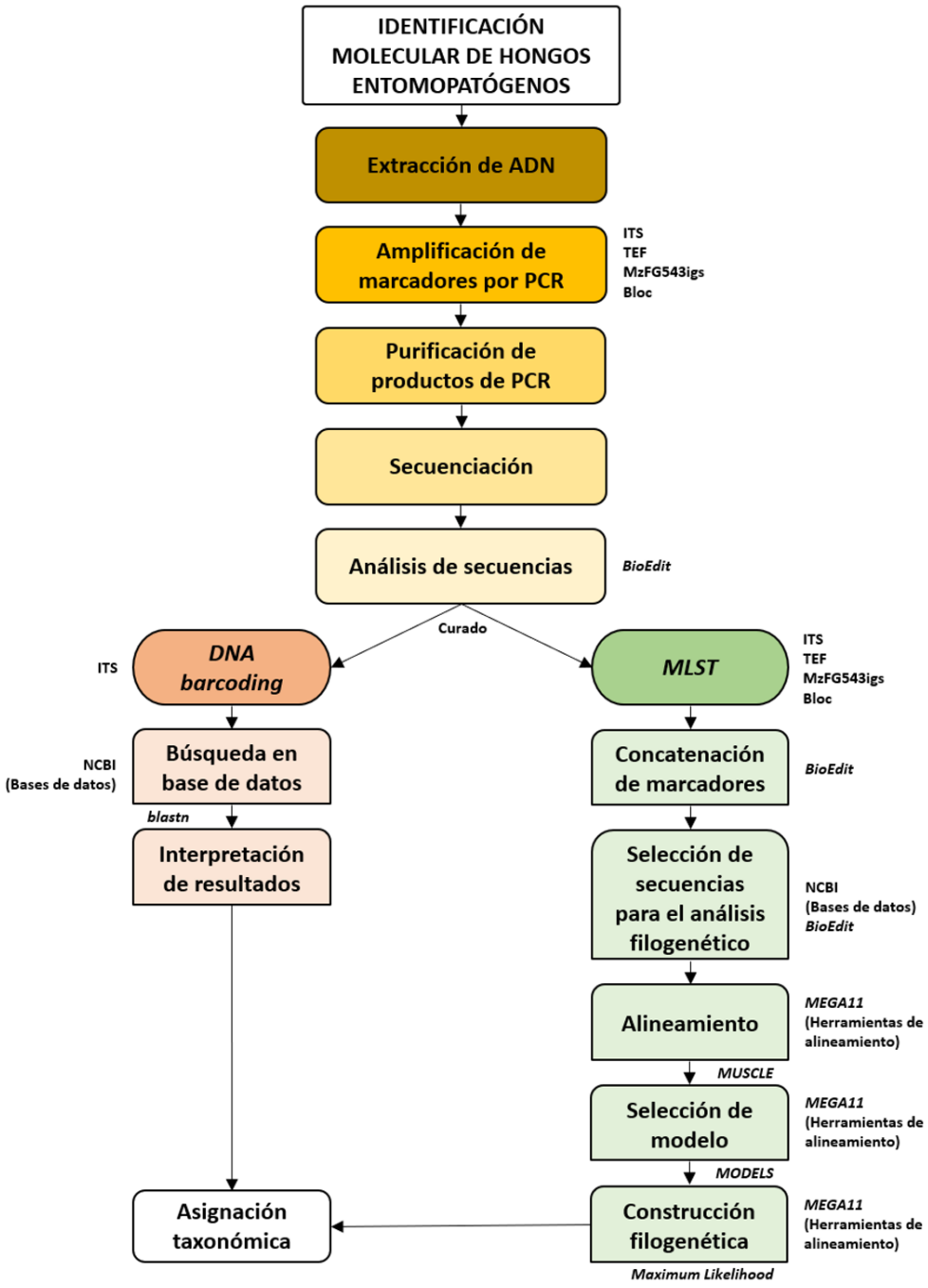


Figura 11 . Descripción de la estrategia seguida para la identificación molecular de los aislados de hongos(Tomado de Muñiz, 2023)

6.11.1 Extracción de ADN genómico de los aislados fúngicos

Para la extracción de ADN genómico se inició con el rompimiento de la estructura celular fúngica. De una caja Petri con micelio de una semana de crecimiento se tomó una cuarta parte del micelio separándolo cuidadosamente del agar utilizando una espátula estéril. El micelio se colocó en un mortero estéril y se procedió a macerar con el pistilo. Después, se realizó la lisis celular agregando 400µL de Buffer de lisis (200mM Tris-HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0.5% SDS), y se mezclaron en el mortero. Se recuperaron 400 µL en un microtubo de 1.5mL, al cual se le añadieron 6µL de RNasa. Los microtubos se agitaron vigorosamente con ayuda del vortex y se incubaron a 65 °C por 10 minutos en el Termoblock, agitando suavemente los tubos por inversión de 2 a 3 veces.

Posteriormente, se precipitaron las proteínas al añadir 130 µL acetato de sodio 3M y se homogenizaron por 10 segundos a velocidad media en el vortex. Los microtubos se incubaron a 4 °C por 30 minutos, completado el tiempo las muestras fueron centrifugadas a 13,000rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido con la micropipeta a un microtubo estéril, evitando aspirar el pellet de proteínas, por lo que solo se tomaron 350 µl del sobrenadante. Para la precipitación del ADN, se agregaron 350 µl de isopropanol, es decir un volumen igual al del sobrenadante, mezclando por inversión suave de 6 a 10 veces. Posteriormente, los microtubos se incubaron a -20 °C durante 15 minutos con la finalidad de incrementar la cantidad de ADN precipitado. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, formandose un pellet pequeño en el fondo del microtubo de apariencia transparente o ligeramente colorido. Se agregaron 700 µl etanol al 95% y se dieron lavados por inversión del microtubo, después se centrifugaron los tubos a 3,000 rpm por 5 minutos, se vació el líquido teniendo cuidado de no tirar el pellet. Se realizó un segundo lavado agregando 700 µl de etanol al 70%, los microtubos se invirtieron dos veces y se procedió a centrifugar a 3,000 rpm por 5 minutos. Se vació el líquido teniendo cuidado de no tirar el pellet, si quedaban restos se retiraron con ayuda de una micropipeta (Raja et al., 2017)

Para resuspender el producto de la extracción se añadieron 100 µl de Buffer TE, dando unos pequeños golpes con el dedo y se colocaron las muestras en el Termoblock durante 5 minutos a 65°C. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

La calidad y concentración del ADN se determinó en Nanodrop, también se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.6 % colocando 100 ng de ADN por muestra.

6.11.2 Amplificación de Marcadores moleculares por Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron diferentes marcadores moleculares, para identificar los aislados de hongos. Se inicio con la amplificación del marcador ITS para los cinco aislados que se seleccionaron. La región ITS es conocida como un marcador universal para el reino Fungi (Schoch et al., 2012). Esto nos permitió la identificación de los hongos a nivel de género, para posteriormente orientarnos en los siguientes marcadores a amplificar.

El ribosoma tiene dos subunidades, la subunidad pequeña del ribosoma 18S SSU y la subunidad grande 28S LSU; entre estas dos subunidades se encuentran la región ITS (*internal transcribed spacer*) que está conformada por aproximadamente 600 pares de bases , a su vez esta región está formada por las regiones ITS1, la región ITS2 y la subunidad 5.8 ribosomal las cuales se muestran en la Figura 12 (Bellemain et al., 2010). Para amplificar esta región se utilizaron como cebadores el marcador ITS5 (sentido *forward*) (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) y el ITS4 (antisentido o *reverse*) (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) Las condiciones de PCR para amplificar el marcador ITS se presentan en la Tabla 2.

Cabe resaltar que en adelante las figuras en las que se representan las regiones amplificadas son solo ejemplificaciones por lo tanto los tamaños no son correspondientes al tamaño real de cada región.

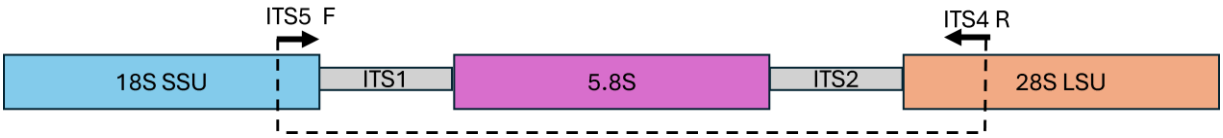


Figura 12. Las flechas negras y la línea punteada indican la región que se amplificó del marcador ITS y arriba de las flechas se indica la posición de los cebadores utilizados; ITS 5 en sentido forward e ITS 4 en sentido reverse para la subunidad 5.8 ribosomal.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la región ITS

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1X
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	57 °C	30 seg	34X
Extensión	72 °C	42 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1X

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en la secuenciación del marcador ITS se determinó a que género pertenecen los hongos y se amplificaron otras regiones más específicas para cada especie de hongos como son las regiones: BLOC, TEF EXON, β- TUBULINA, RPB2 Y LSU.

6.11.3 Amplificación de BLOC

Para la identificación del género *Beauveria* se utiliza el marcador B locus conocido comúnmente como BLOC, está conformado por 1,500pb (Bischoff et al., 2009). Se encuentra constituido por una región parcial de la esfingomielina fosfodiesterasa, una región intergénica nuclear y una región parcial de una glicosil hidrolasa se muestra un esquema con la región amplificada en la figura 13.

Para la amplificación de Bloc se utilizó el marcador B5.1F en sentido *forward* (CGA CCC GGC CAA CTA CTT TGA) y B3.1R en sentido *reverse* (GTC TTC CAG TAC CAC TAC GCC). Debido al tamaño del fragmento se necesita usar dos cebadores internos más, en este caso fueron usados el marcador B22Udg en sentido *forward* (GTC GBA GCC AGA GCA ACT) y BRn2 en sentido *reverse* (CTC CAC GCA TTC CGC ACC AG). Las condiciones de amplificación para este marcador se presentan en la Tabla 3.

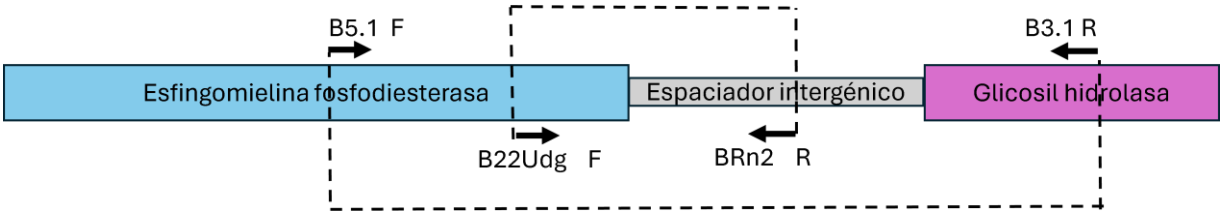


Figura 13 .Se aprecia una línea punteada con flechas en los extremos que indican la región a amplificar, así como la dirección, sobre las flechas en color negro se observan los cebadores utilizados para la secuenciación, en la parte inferior de la barra se encuentran las flechas en color negro que indican la dirección y la región amplificadas con los cebadores internos. Las condiciones para la amplificación del marcador BLOC se muestran en la ***¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.****3.*

Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación del marcador BLOC

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1X
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	56 °C	30 seg	35X
Extensión	72 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1X

6.11.4 Amplificación de TEF

Para la identificación a nivel de especie de *Beauveria spp*. e *Isaria spp*. Se ha utilizado el marcador *TEF exón* que tiene un tamaño cercano a los 1,000 pb., aunque existen dos regiones que se utilizan como marcadores; la región *5´TEF* o *TEF intrón* y la región *TEF exón*. En la Figura 14 se indica con flechas negras y la línea punteada la región amplificada, se trata de solo una imagen representativa por lo que los tamaños de las regiones no son reales.

Para amplificar la región de *TEF exón* se utilizaron los cebadores 983F en sentido forward (GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT) y 2218R en sentido *reverse* (ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG). En la tabla 4 se presentan las condiciones para la amplificación de este marcador.

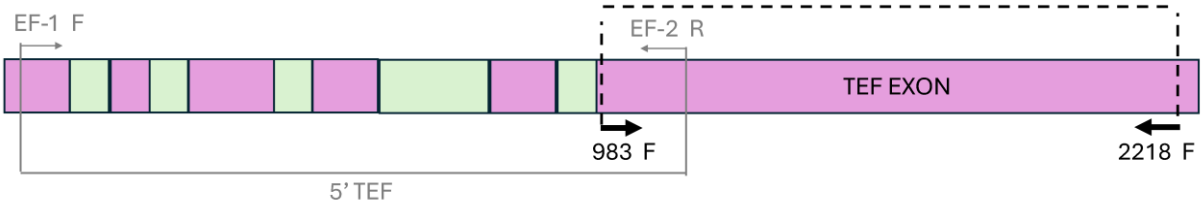


Figura 14. Representación del gen TEF, se observan flechas negras unidad por una línea punteada que indican la región *TEF exón* amplificada además de la dirección de los marcadores moleculares; el marcador 983 F en sentido forward y el marcador 2218 R en sentido reverse.

Tabla 4. Programa de PCR para la amplificación del marcador TEF exón.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1X
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	66 °C	30 seg	10X
Extensión	72 °C	1 min 10 seg	
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	56 °C	30 seg	30X
Extensión	72 °C	1 min 10 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	

6.11.5 Amplificación de *β-Tubulina*

El gen nuclear que codifica para la *β-tubulina* comúnmente se utiliza para la identificación a nivel de especie a partir del género *Beauveria,* se llevó a cabo la amplificación por PCR para lo cual se utilizaron los primers T1 en sentido forward (AAC ATG GAG ATT GTA AGT) y T22 en sentido reverse (TCT GGA TGT TGG GAP TCC), estos marcadores dan como resultado un amplicon de 518 pb. En la Figura 14 se puede observar una representación del gen de la *β-Tubulina* así como marcadores moleculares. Los cebadores se indican con flechas. Secciones de color rosado representan los intrones, mientras que las amarillas los exones. Los tamaños de cada región son ilustrativos y no corresponden al tamaño real de cada región. En la tabla 5 se muestran las condiciones para la amplificación de este marcador molecular

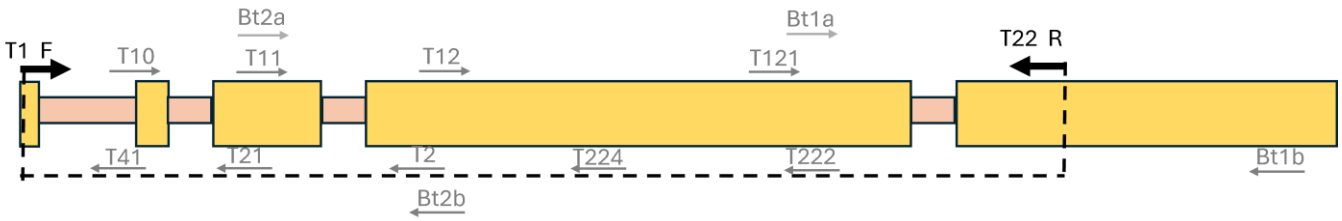


Figura 15 . Representación del gen *β-Tubulina* la región amplificada se indica con las flechas negras unidas por la línea punteada, la punta de las flechas indica el sentido de los marcadores utilizados T1 forward y T22 reverse.

Tabla 5. Programa para amplificación de *β-Tubulina*

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1X
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	54 °C	55 seg	40X
Extensión	72 °C	1.45 min	
Extensión final	72 °C	5 min	1X

6.11.6 Amplificación de RPB2

Se realizó la amplificación de la segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RPB2), se usaron los cebadores fRPB2-5F en sentido forward (GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG) y fRPB2-7eR en sentido reverse (CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT), en la Figura 15 se indican con flechas los cebadores indicados anteriormente así como la región amplificada es señalada con la línea que une las flechas, los tamaños de la figura son ilustrativos así que no se trata del tamaño real; las condiciones de PCR para la amplificación se muestran en la Tabla 6.



Figura 16. Se muestra la región amplificada entre la línea punteada que une las flechas negras, las puntas de las flechas indican la dirección de los cebadores.

Tabla 6. Programa de PCR para la amplificación del marcador RPB2.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1X
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	55°C	45 seg	30X
Extensión	72°C	60 seg	
Extensión final	72°C	7 min	1X

6.11.7 Amplificación de LSU

Se amplifico la región LSU que corresponde al gen de ARN ribosómico de la subunidad larga, se observa una representación de dicha región entre la línea punteada que une las flechas negras en la Figura 16. Para la amplificación de la región LSU los cebadores utilizados son LROR en sentido forward (ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC) y LR5 en sentido reverse (GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT). El tamaño del amplicon varía con el género y especie, pero se conoce que

en el género *Metarhizium* tiene un tamaño aproximado de 800 pb. Para la amplificación de este marcador molecular las condiciones utilizadas se presentan en la Tabla 7.



Figura 17. Entre la línea punteada unida por las flechas negras se indica la región amplificada, así como la dirección de los cebadores utilizados para la amplificación.

Tabla 7. Condiciones de PCR para la amplificación del marcador RPB2.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1X
Desnaturalización	94 °C	30 seg	35X
Alineamiento	55 °C	2 min	
1° c/5 seg a 72°C*			
Extensión	72 °C	1.05min	
Extensión final	72 °C	5 min	1X

*Se indica un rampeo de 1° cada 5 segundos para la extensión.

6.11.8 Verificación de amplificación de marcadores moleculares BLOC, TEF EXON, *β-TUBULINA*, RPB2 Y LSU

Una vez obtenidos los productos de PCR con los respectivos programas, lo siguiente fue verificar la correcta amplificación de los marcadores de interés, para esto se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el que se cargaron de 2 a 5 µL del producto de PCR y se corrieron los geles al menos 45 minutos a 90 voltios.

6.11.9 Purificación de los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los marcadores moleculares

Una vez que fue verificada la amplificación de los productos de PCR y que se observó que su tamaño correspondía al esperado, se prosiguió con la purificación de los productos. Cuando en el gel de verificación se observó una sola banda, el resto del producto de PCR se purificó de manera directa con el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System.

En caso de que se observaran amplificaciones inespecíficas, se procedió a cargar el producto de PCR en un gel de agarosa al 1.8% y se corrió a bajo voltaje (70 V), hasta que el colorante del tampón de carga estaba a punto de llegar al extremo del gel. Después, se cortó la banda de interés con ayuda de un bisturí y luz UV, utilizando el equipo de protección necesario y una vez cortada la banda se purificó con ayuda del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System.

Una vez purificados los productos de PCR, fueron enviados a secuenciación a la empresa Macrogen (Corea del Sur).

6.11.10 Curación de los resultados de secuenciación de los marcadores moleculares

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación se realizó una curación de estos, a partir del archivo que tiene la extensión "*.ab1*". Para este paso se utilizó el programa *BioEdit*.

6.11.11 MLST y análisis filogenéticos

El *MLST* consiste en la secuenciación de varios marcadores moleculares, de ahí su nombre (*multilocus sequencing typing*), por lo general estas secuencias de marcadores se utilizan para el establecimiento de relaciones filogenéticas e identidades respecto a una relación evolutiva.

El primer paso después de la curación de la secuencias es la concatenación de los marcadores de cada aislado. La concatenación consiste en juntar las secuencias de tal forma que obtengamos una sola. El orden establecido para la concatenación de las secuencias de los marcadores en realidad es indistinto; sin embargo, se debe mantener este orden para todas las secuencias que se utilizarán en la filogenia. Este paso se realizó utilizando el programa Bloc de notas, y al guardar el archivo se utiliza la extensión .fas para generar un archivo FASTA.

El siguiente paso fue seleccionar las secuencias para construir los árboles filogenéticos, eligiendo secuencias que se encuentran en bases de datos como NCBI y se puede acceder a ellas con su número de acceso. Para ello se buscó bibliografía que estableciera filogenias de la especie que deseábamos establecer, se revisaron marcadores moleculares de distintas especies de un mismo género y por medio del análisis filogenético se agruparon estas especies.

Para tener un análisis de calidad aceptable la cantidad de secuencias que se incluyen en cada uno de los grupos es muy importante; sin embargo, la cantidad de especies que cuentan con ambos marcadores en bases de datos algunas veces son muy pocas, y en tales casos pueden añadirse al menos dos. También se incluyó la secuencia de un grupo externo, es decir un organismo que no estaba relacionado con el género de los organismos que identificábamos, las secuencias del grupo externo se agregaron al Bloc de notas que contenía todas las secuencias concatenadas.

Una vez que todas las secuencias estuvieron concatenadas en un solo archivo formato FASTA se realizó un alineamiento, con la herramienta MUSCLE, que se incluye en el programa *MEGA* en la versión 11 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), es importante verificar

visualmente la coincidencia de colores que indican que el alineamiento sea correcto y guardarlo antes de cerrar esta ventana.

Posteriormente para seleccionar el mejor modelo se utilizó el programa MEGA cuenta con la herramienta MODELS que permite evaluar cual modelo es mejor.

A partir del alineamiento se eligieron las preferencias de secuencias no codificantes , una vez que se obtuvieron los modelos sugeridos para nuestro método, se realizó la construcción filogenética con las secuencias previamente alineadas.

Para realizar el árbol filogenético en la vista principal de *MEGA* seleccionamos la herramienta *PHYLOGENIE*, y la opción *Construct/Test Maximum Likelihood Tree*. Fueron seleccionadas las preferencias del análisis, el valor de Bootstrap utilizado fue de 1000 réplicas.

6.12 Análisis estadístico

Una vez se obtuvieron los datos de los bioensayos de patogenicidad y virulencia se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y una prueba Tukey para la comparación múltiple de medias a través de diferencia mínima significativa (DMS). Para el cálculo de la CL_{50} se realizó un análisis Probit, con el programa Polo Plus.

7 RESULTADOS

En el mes de marzo se realizó una visita para corroborar algunas coordenadas geográficas del campo Los Guillermos en el municipio de Miacatlán. Durante ese mes las plantas de caña de azúcar se encontraban en etapa de pelillo y aparentemente no estaba presente la plaga ya que se había fumigado una semana antes. En la literatura se reporta que la *P. acapulcoa* solo se presenta en temporada de lluvias y un poco después, cuando la planta ya se encuentra en

etapa de maduración. No fue posible observar la plaga en hojas, pero al remover varias plantas, detectamos la presencia de la plaga en la materia orgánica que rodeaba a la planta, así como en las raíces de las plantas (Figuras 4 A, B y C). Con la finalidad de poder cubrir casi el total de la parcela se realizó un muestreo de cinco de oros que consistió en revisar un total de 25 plantas de las cuales se encontró la presencia de la plaga en 10 de las 25 plantas, representando un porcentaje del 40% de la muestra.



(A) (B) (C)

Figura 18. (A) Se observa la presencia de P. acapulcoa en materia orgánica y en raíces (B) de caña de azúcar. Las observaciones se realizaron durante la etapa de pelillo de las plantas (C).

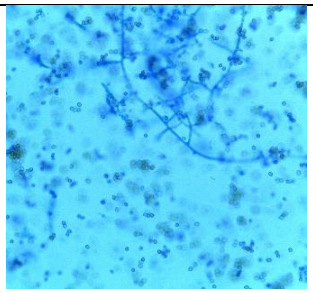
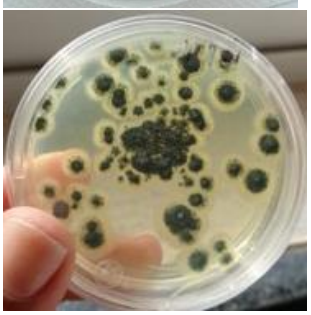
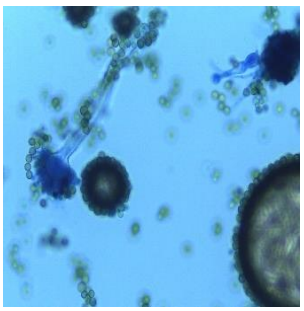
7.1 Establecimiento de la cría de *Praelongorthezia acapulcoa*

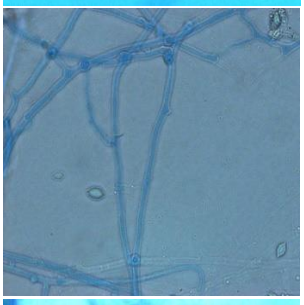
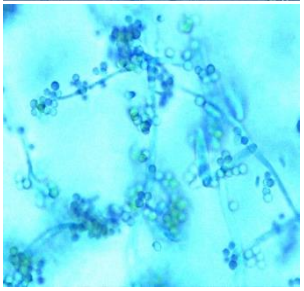
Uno de los objetivos planteados fue el de establecer una cría de *P. acapulcoa* con la finalidad de contar con suficientes ejemplares durante el desarrollo de los bioensayos. Se probaron dos sistemas para el mantenimiento de la cría; uno fue en invernadero en el que se utilizaron 20 plantas de caña crecidas en invernadero libres de plagas de la variedad CP 72-2086. Sin embargo, con la disminución de temperatura a la llegada del invierno se observó una mortalidad de más de la mitad de los insectos por lo que se buscó un sistema alternativo para poder mantener la cría en el laboratorio bajo condiciones controladas de luz y temperatura. El sistema utilizado ya se ha descrito anteriormente, los insectos lograron mantenerse en laboratorio alrededor de 1 año, tiempo suficiente para realizar los bioensayos necesarios.

7.2 Identificación morfológica de cultivos monospóricos de los aislados fúngicos obtenidos a partir de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa*

De los cadáveres colectados en campo se realizaron aislamientos fúngicos obteniéndose un total de 52 aislados; posteriormente, se realizaron cultivos monospóricos y fueron preservados en glicerol al 20%. En una primera etapa fueron seleccionados cinco aislados, de los que se realizó la identificación utilizando métodos tradicionales basados en características morfológicas tales como: forma y crecimiento de las esporas e hifas y tipo de estructuras reproductivas. En todos los aislamientos se realizaron montajes microscópicos para evaluar la presencia de estructuras reproductivas y sus características morfológicas y compararlas con las descripciones disponibles en la literatura consultada. En la Tabla 8 se presentan imágenes de las características observadas.

Tabla 8. Imágenes de la macromorfología y micromorfología de los aislados fúngicos

Aislado	Micelio	Micromorfología	Descripción
Beauveria SH13			Colonias blancas algodosnosas a polvorientas, conidióforo ramificado y conidios hialinos y lisos con una disposición esférica a subglobosas con hifas aseptadas (Geremew et al., 2024)
Penicillium SH 22			Las colonias de crecimiento restringido presentan conidióforos ramificados a manera de penicilos, conidios elipsoidales, a veces subglobosos, entre hialinos y verdosos, y de paredes lisas(Moslem et al., 2010).

Penicillium SH 25			No forma colonias definidas, el color del micelio es verde grisaceo con exudados, los conidióforos son penicilados, conidios globosos, entre hialinos y verdosos, y de paredes lisas (Moslem et al., 2010).
Phlebiopsis SH 52			Mostró un micelio blanco aterciopelado, de consistencia dura y superficie elevada, presencia de exudados con hifas septadas hialinas (Chen et al., 2021).
Beauveria SH134			Colonia en color blanco textura superficial de algodonosa a suave y elevación de colonias, hifas aseptadas, conidióforo ramificado en forma de racimo, conidios lisos y esféricos (Geremew et al., 2024).

7.3 Bioensayo de patogenicidad en *Praelongorthezia acapulcoa*

Para determinar la patogenicidad de los cinco aislados se realizaron bioensayos sobre el mismo insecto del que fueron aislados originalmente *P. acapulcoa,* se prepararon suspensiones de conidios de los aislados SH13, SH22, SH25, SH52 Y SHS134. Se utilizó una concentración de $1x10^7$ conidios/mililitro y cada unidad experimental estuvo constituida por un sistema de alimentación ya descrito en la metodología en el que se colocaron 12 ninfas adultas de *P. acapulcoa* en etapa prerreproductiva. Como control negativo se utilizó una solución de Tween 80 al 0.1%.

Una vez concluido el bioensayo de patogenicidad, se logró observar que todos los aislados causaron mortalidad a *P. acapulcoa* como se observa en la Figura 19, el control mostró un porcentaje menor al 12%. Encontramos que los aislados causaron mortalidad con porcentajes

que van de 52.78% a 83.33%. Los aislados SH22 y SH52 presentaron mortalidades apenas por encima del 50%, mientras que las cepas SH13 y SH134 presentan porcentajes de mortalidad superiores del 60%. El aislado SH25 presentó el porcentaje de mortalidad más alto con un 83.33%. Por otra parte, el control negativo resultó con un porcentaje de mortalidad de 11.11%

Posterior al bioensayo de patogenicidad y con los resultados de esta prueba se realizó una comparación múltiple de medias, a través de la prueba de diferencia mínima significativa, se observó que fueron estadísticamente diferentes con un valor de alfa (α) de 0.05, letras distintas indican que hay diferencia, tal como se puede observar en la tabla 9.

como se puede observar en la Figura 19.

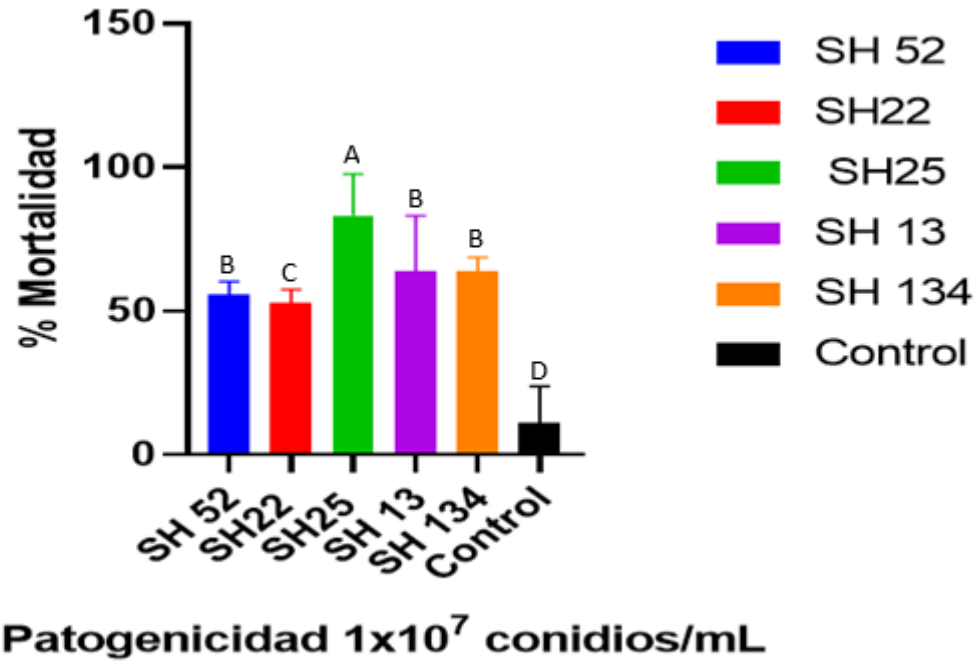


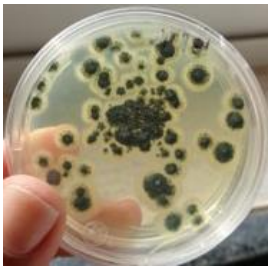
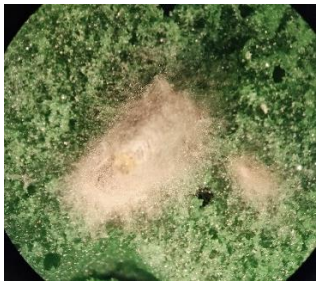
Figura 19 Mortalidad causada por las cepas de hongos entomopatógenos en Praelongorthezia acapulcoa.

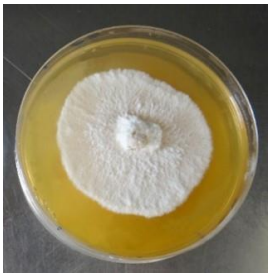
7.4 Signos de infección en *Praelongorthezia acapulcoa*

Para documentar los signos de infección en *P. acapulcoa* provocados por los cinco aislados de hongos entomopatógenos SH13, SH22, SH25, SH52, SH134, se tomaron fotografías hasta el día 8 posterior a la aplicación de la suspensión de conidios.

En Tabla 11 se pueden apreciar fotografías de los insectos con la presencia de micelio en comparación con los insectos control que se observan sin la presencia de micelio y aún con vida.

Tabla 9. Signos de infección observados en *Praelongorthezia acapulcoa* a los 8 días de tratamiento con las diferentes cepas.

Cepa		Fotografía a los 8 días de infección
***Beauveria bassiana* SH13**		
***Penicillium custrosum* SH22**		
***Penicillium custrosum* SH25**		

***Phlebiopsis flavidoalba* SH52**		
***Beauveria bassiana* SH134**		
Control	Tween 80 al 0.1%	

7.5 Evaluación de la virulencia por medio de la concentración letal media

Se realizó un análisis Probit en el que se calculó la concentración letal media de cada uno de los aislados, la unidad experimental estuvo constituida por 12 hembras en etapa pre-reproductiva previamente impregnadas con la suspensión de conidios a 5 diferentes concentraciones: para el aislado SH13 se probaron ($1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ y $1x10^9$ conidios/ml), para SH22 ($1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ y $1x10^9$ conidios/ml) , en el caso de SH25 ($1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$ y $1x10^8$ conidios/ml), SH 52($1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ y $1x10^9$ conidios/ml), SH134 ($1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$ y $1x10^8$ conidios/ml). Los bioensayos se realizaron como se ha descrito con anterioridad en el apartado de metodología. El experimento se mantuvo por un total de 12 días y al finalizar se realizó el conteo de la mortalidad a tiempo final, en la Tabla 11 se muestran los resultados.

Tabla 10. Virulencia de hongos entomopatógenos hacia *Praelongorthezia acapulcoa*, estimada mediante análisis probit

Especie	Aislado	CL_{50}
Beauveria bassiana	**SH13**	**$1x10^5$ conidios /ml**
Penicillium custrosum	**SH22**	**$2.5\ x10^4$ conidios /ml**
Penicillium custrosum	**SH25**	**$1.6x10^4$ conidios /ml**
Phlebiopsis flavidoalba	**SH52**	**$9.7x10^6$ conidios/ ml**
Beauveria bassiana	**SH134**	**$2x10^5$ conidios/ ml**

7.6 Identificación molecular de cepas de hongos entomopatógenos

Como se mencionó anteriormente, el MLST consiste en la secuenciación de varios marcadores moleculares. Inicialmente, se optó por secuenciar la región ITS para los cinco aislados con el fin de orientar la selección de los siguientes marcadores que fueran más útiles para el género resultante del análisis BLAST. En la Tabla 12 se muestran los resultados del análisis BLAST de las secuencias ITS de los cinco aislados seleccionados. En el caso de los aislados SH13 y SH134 mostraron una similitud del 100% con el género *Beauveria*. Por otra parte, los aislados SH22 y SH25, mostraron una identidad del 100% con hongos del género *Penicillium*. Para el caso de la cepa SH52, se encontró una similitud del 100% con hongos del género *Phlebiopsis*. Este primer análisis, nos permitió hacer una identificación de los marcadores más útiles para el MLST de cada uno de los aislados. Para los aislados SH13 y SH134 se utilizó el marcador TEF EXON; para los aislados SH22 Y SH25 se amplificaron los marcadores *β*-Tubulina y RPB2; y para el aislado SH52 se utilizaron los marcadores TEF EXON y LSU.

Tabla 11. Análisis BLAST del marcador ITS para cada aislado fúngico.

Aislado	Marcador	Nombre científico	Cobertura (%)	Identidad (%)	Numero de acceso	Longitud (pb)
SH13	ITS	*Beauveria bassiana*	100%	100%	MGO12972.1	528
SH134	ITS	*Beauveria bassiana*	100%	100%	MH922808.1	516
SH22	ITS	*Penicillium sp.*	100%	100%	MT446164.1	526
SH25	ITS	*Penicillium sp.*	100%	100%	MT446164.1	523
SH52	ITS	*Phlebiopsis flavidoalba*	100%	100%	MT000450.1	590

En la Tabla 13 se muestran los resultados del análisis BLAST realizado con las secuencias producto de la amplificación de los dos marcadores extras utilizados para cada aislado, antes ya se ha mencionado que estos marcadores fueron elegidos debido al resultado del análisis BLAST realizado con las secuencias de las regiones ITS.

En total se amplificaron 3 marcadores para los aisaldos SH13 y SH134: el espaciador transcrito interno (ITS), TEF EXON y BLOC.. Los aislados SH22 y SH25 pertenecen al género *Penicillium*, por lo tanto se amplificaron otros dos marcadores: *β- Tubulina* y RPB2, corroborando la identidad de los aislados con la especie *Penicillium nordicum* para el SH25, mientras que para SH25 fue identificado como *Penicillium custrossum*. Para el aislado SH52 se amplificaron los

marcadores TEF EXON y la subunidad grande del ribosoma identificando a dicho aislado como *Phlebiopsis flavidoalba*.

Tabla 12. Resultados del análisis BLAST realizado para cada uno de los cinco aislados fúngicos con las secuencias resultantes de la amplificación de los dos marcadores moleculares, usados comúnmente para la identificación a nivel de especie, se incluyen las secuencias con los números de acceso a GenBank .

Aislado	Marcador	Nombre científico	Cobertura (%)	Identidad (%)	Numero de acceso	Longitud (pb)
SH13	TEF EXON	*Beauveria bassiana*	100%	100%	MH203473.1	936
	BLOC	*Beauveria bassiana*	100%	97.68%	DQ384416.1	1506
SH134	TEF EXON	*Beauveria bassiana*	100%	99.79%	MH203471.1	930
	BLOC	*Beauveria bassiana*	99%	97.61%	KY587221.1	1506
SH22	B-Tubulina	*Penicillium nordicum*	99%	96.45%	MG701894.1	1060
	RPB2	*Penicillium crustosum*	100%	100%	MK450832.1	968
SH25	B-Tubulina	*Penicillium nordicum*	100%	97.12%	MG701894.1	943
	RPB2	*Penicillium nordicum*	100%	99.81%	OP321279.1	1027
SH52	TEF EXON	*Phlebiopsis pilatii*	98%	90.60%	MZ913617.1	1082
	LSU	*Phlebiopsis flavidoalba*	100%	100%	KX752607	917

7.7 Análisis filogenético

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación de todos los marcadores moleculares se realizó la construcción filogenética.

Para la construcción filogenética de los aislados SH13 y SH134 se utilizó el método de Máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3. En la Figura 20 se muestra el árbol con mayor probabilidad logarítmica (-8542,36). Se aplicaron los algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ, se utilizó una distribución Gamma discreta (5 categorías (parámetro +G, parámetro = 0,2336); este análisis incluyó 17 secuencias de nucleótidos.

En el árbol se puede observar que los aislados se agrupan con el clado *Beauveria bassiana* con un soporte de 99, como grupo externo se incluyeron las secuencias de *Cordyceps militaris* ARSEF 5050; Los análisis se realizaron en MEGA7 .

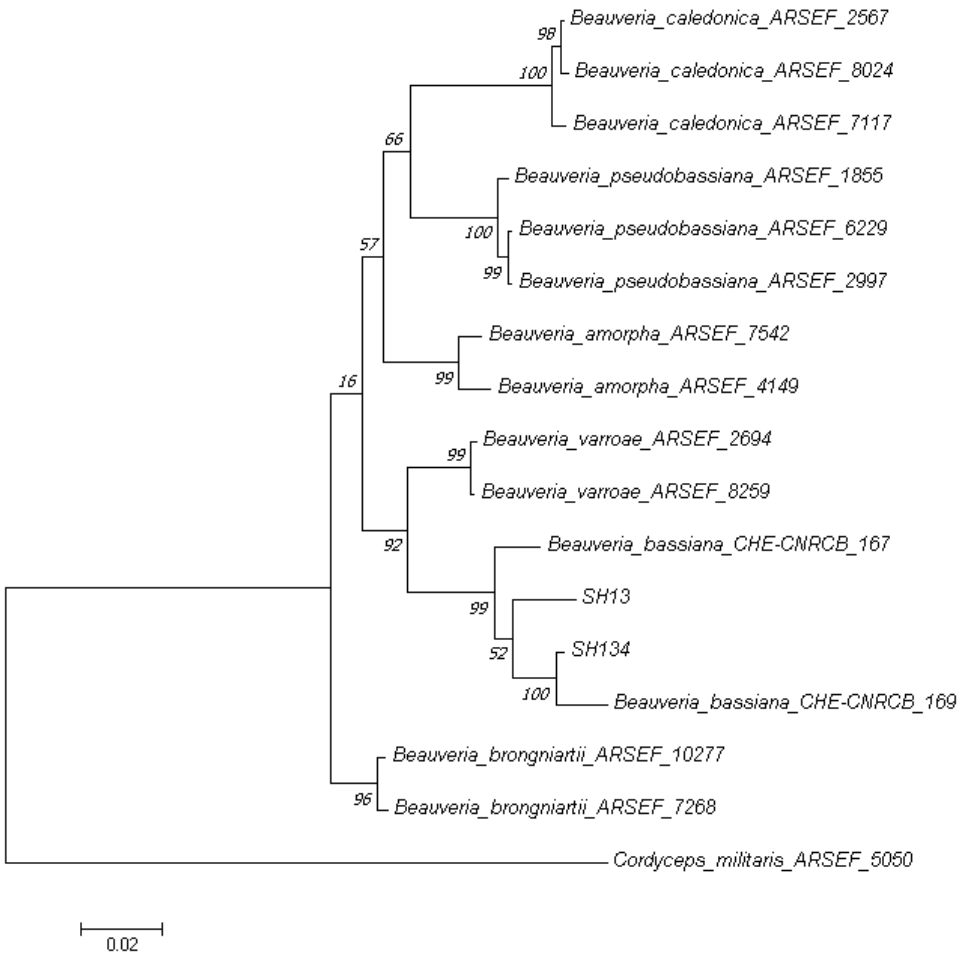


Figura 20. Árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de ITS, TEF y BLOC, construido por el método de *Maximum LIkelihood*, que muestra la relación entre el aislado SH13 y SH134 con especies relacionadas en MEGA 7. Los números de cada nodo representan los valores de soporte .

El siguiente árbol filogenético (Figura 21), muestra la relación entre los aislado SH22 y SH25 con especies relacionadas. Se utilizó el método de máxima verosimilitud compuesta basado en el modelo Kimura 2, se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica(-4124,40), se igual manera se aplicaron los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ utilizando una distribución Gamma discreta.

Los números de cada nodo representan los valores de soporte, para este caso ubica a las dos cepas agrupadas en la especie de *Penicillium custrosum* ya que el valor del nodo es de 100, se realizaron 1000 réplicas para la construcción de la filogenia. Los números de acceso se encuentran a la derecha separados del nombre científico por un guion, el análisis incluyó 24 secuencias de nucleótidos y se utilizó como grupo externo *Aspergillus westerdijkiae* KF021547. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 .

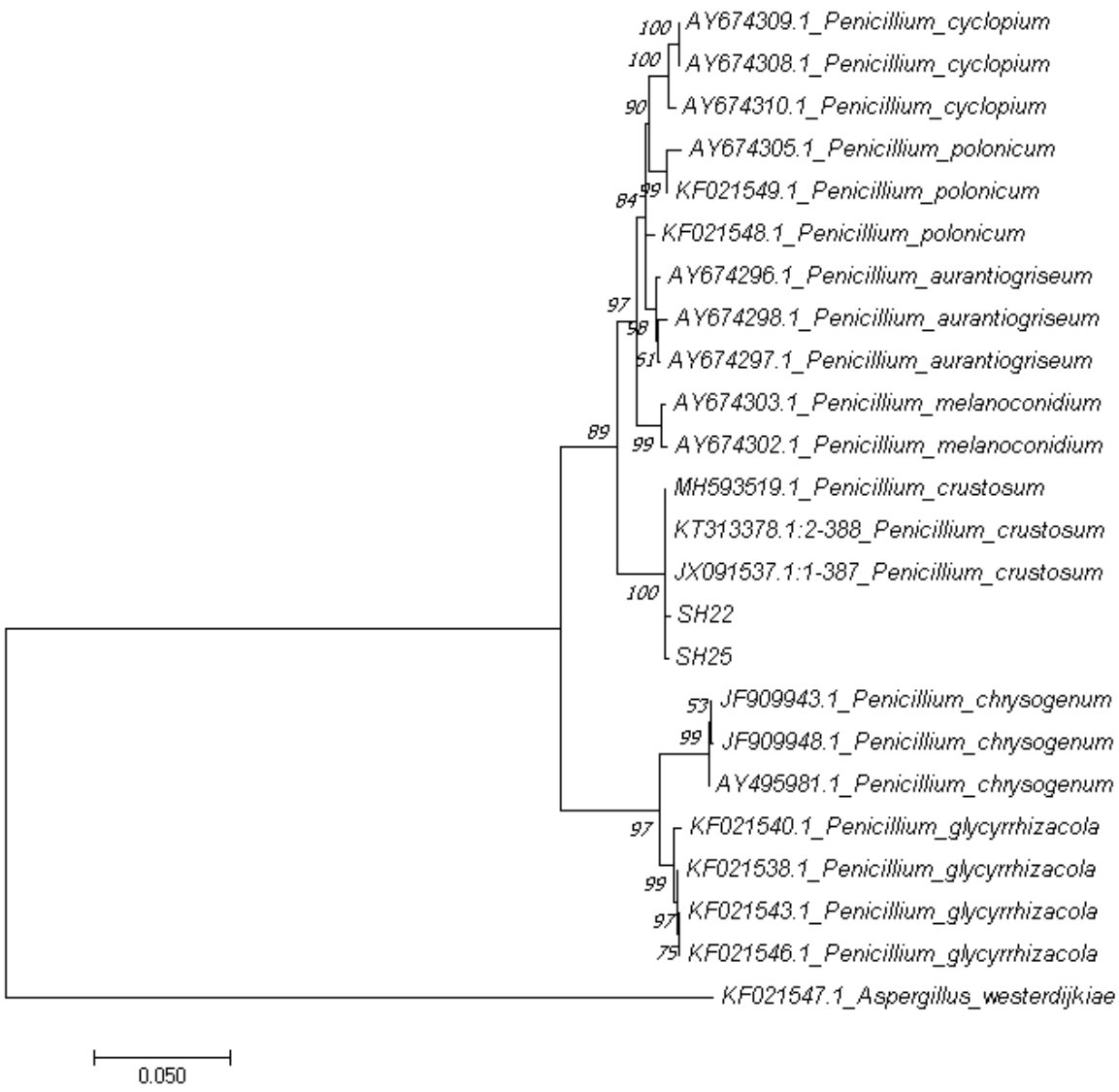


Figura 21. Árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de ITS, β-Tubulina y RPB2, construido por el método de Maximum LIkelihood, que muestra la relación entre los aislados SH22 y SH25 y especies relacionadas en MEGA7.

El árbol filogenético de la Figura 22 muestra la relación entre el aislado SH52 y especies relacionadas del género *Phlebiopsis.* El nodo en el que se encuentra agrupado tiene un valor de 99 lo que indica que se trata de *Phebiopsis flavidoalba* ya que los números de cada nodo representan los valores de soporte, la construcción filogenética se realizó con 1000 réplicas. Se usó a *Cordyceps militaris* ARSEF 5050 como grupo externo.

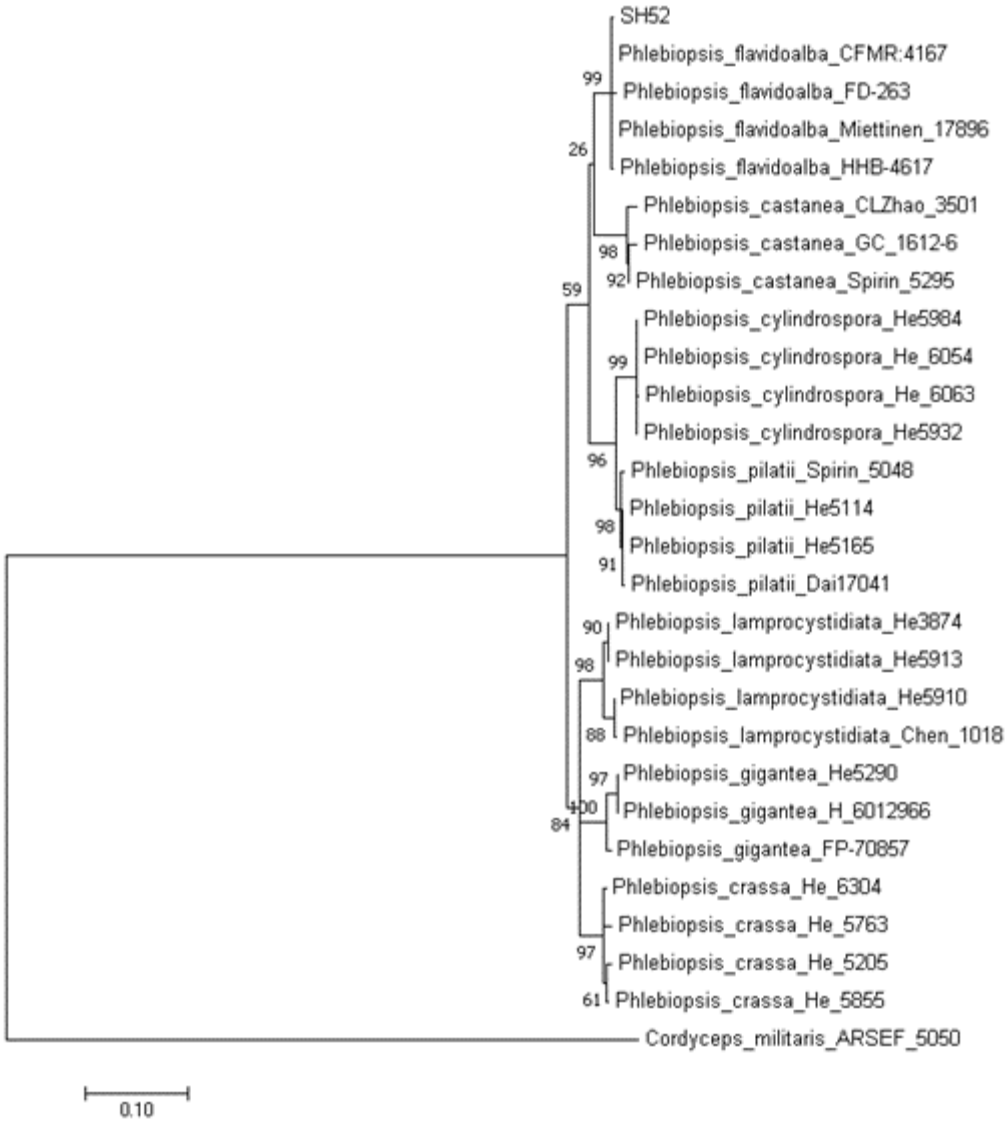


Figura 22 Árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de ITS, TEF EXON y LSU, construido por el método de *Maximum Likelihood*, que muestra la relación entre el aislado SH52 y especies relacionadas en MEGA 11.

8.0 Discusión

Praelongorthezia acapulcoa es una plaga que se encuentra presente en el Estado de Morelos, con anterioridad se había reportado la presencia en cinco municipios, sin embargo, en esta investigación fue detectada en siete municipios. Este insecto representa potencial como plaga ya que se ha encontrado de manera persistente en los lugares de colecta de este estudio.

Uno de los retos mas grandes de este trabajo fue el de mantener una cría de insectos para poder tener organismos suficientes para los bioensayos, debido a que no existía una dieta o algún sistema de mantenimiento que indique como se lleva a cabo el mantenimiento de estos insectos, se implementó un sistema de mantenimiento (ampliamente descrito en la metodología), para los insectos lo que nos permitió mantenerlos en el laboratorio hasta por tres generaciones con las condiciones más controladas.

El sistema de mantenimiento consiste en un contenedor de plástico de capacidad de 1 L dentro del cual se coloca una esponja floral con hojas de caña de azúcar, la cantidad de hojas que se colocan nos garantiza que los insectos se alimenten durante 12 días como mínimo lo que nos permite hacer la evaluación de los bioensayos durante ese tiempo.

De los cadáveres de hembras de *Praelongorthezia acapulcoa* colectados en campo, se obtuvieron un total de 52 aislados, de los cuales se logró evaluar la patogenicidad y virulencia así como identificar un total de 5 aislados fúngicos.

Se realizó la identificación de las 5 cepas por medio de macro y micromorfología, apoyados con bibliografía, se hicieron observaciones del micelio de los cultivos monospóricos provenientes de los aislados, al hacer la comparación de estructuras morfológicas se logró clasificar a las 5 cepas a nivel de género, las cepas SH13 y SH134 fueron identificadas como *Beauveria* spp*.,* mientras que las cepas SH22 y SH25 fueron identificadas como *Penicillium* spp., y por último la cepas SH52 fue identificada como *Phlebiopsis* sp*.*

Posteriormente, se realizó la identificación molecular de las cinco cepas, para lograr una identificación a nivel de especie mediante un análisis Multi Locus que consiste en la amplificación y secuenciación de varios marcadores moleculares. Como primer paso una amplificación de la región ITS lo que permitió obtener una identificación a nivel de género. Con los resultados obtenidos de la secuenciación se realizó la curación de las secuencias y se realizó un análisis BLAST lo que permitió una orientación para elegir de manera apropiada los siguientes marcadores moleculares para amplificar. Para el caso de las cepas SH13 y SH134 se eligió amplificar los marcadores *TEF EXON* y *BLOC* adicionales al ITS; para las cepas SH22 y SH25 se amplificaron los marcadores *β-TUBULINA* y *RPB2*; por último para la cepa SH52 se amplificaron los marcadores *TEF EXON* y *LSU*.

Cabe mencionar que la identificación tanto morfológica como molecular coinciden en que las cepas SH13 y SH134 pertenecen a la especie *Beauveria bassiana* , mientras que las cepas SH22 y SH25 ambas cepas pertenecen a la especie de *Penicillium custrosum* y por otro lado la cepa SH52 corresponde a la especie *Phlebiopsis flavidoalba.* Esto fue corroborado mediante análisis filogenéticos que dieron como resultado arboles filogenéticos en los que se agruparon a los aislados obtenidos de *Praelongorthezia acapulcoa* en los nodos correspondientes a las especies antes mencionadas.

Beauveria es un género que se ha destacado como agente de control biológico (ACB), de hecho, es de los más utilizados, en esta investigación se lograron aislar y probar la patogenicidad de dos cepas de hongos identificadas como *Beauveria bassiana* por biología molecular.

Existen solo algunos reportes que describan la capacidad entomopatógena de hongos del género *Penicillium*. por lo tanto el hecho de haber demostrado la capacidad entomopatógena de las cepas SH22 y SH25 pertenecientes *Penicillium custrosum* representa un aporte más. Algunos hongos como *Penicillium corylophylum* y *Penicillium jantinellum* presentan actividad contra mosquitos, hasta 2023se habían identificado al menos 62 especies de *Penicillium* en diferentes insectos (Nicoletti et al., 2023). Dentro de las especies identificadas como entomopatógenas existe el registro de *Penicillium custrosum* aislado del coleóptero

Hypothenemus hampei conocido como la broca del café (Peterson et al., 2003). Nuestro trabajo contribuye al demostrar que los aislados de *P. custrosum* SH22 y SH25 tienen la capacidad de afectar a insectos escama que presentan una capa de cera. Parte de la actividad entomopatógenica podría deberse a la presencia de metabolitos secundarios, presentes en los extractos crudos, de los cuales no se ha realizado la caracterización de los compuestos bioactivos. Sin embargo, se han evaluado compuestos purificados como las micotoxinas en lepidópteros. Algunos ejemplos de ellas son citrinina, ocratoxina A y patulina entre otros. Se han encontrado alrededor de 60 metabolitos purificados de *Penicillium* que son inhibidores de la acetilcolinesterasa, lo que es muy relevante ya que este mecanismo de acción es el principal en insecticidas de origen natural (Peterson et al., 2003).

La mayoría de los hongos entomopatógenos comerciales pertenecen al filo Ascomycota (*Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. e *Isaria* spp.). No obstante, algunos miembros del grupo Basidiomycota también son conocidos como entomopatógenos (Araújo & Hughes, n.d.); por ejemplo, *Septobasidium* spp. es bien conocido por infectar cochinillas (H. Liu & Bauer, 2006). Los extractos de acetato de etilo de *Pleurotus ostreatus* y los extractos crudos de cultivos líquidos del basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus* mostraron actividad insecticida contra el pulgón de la rosa *Macrosiphum rosae* y las larvas de *Diatreaea magnifactella* (Díaz-Godínez et al., 2016). Se sabe que los basidiomicetos tienen compuestos bioactivos como fenoles, alcaloides, flavonoides y enzimas líticas. Sin embargo, no se conocen reportes sobre el control de *P. acapulcoa* por *Phlebiopsis flavidoalba*. La CL_{50} de *P. flavidoalba* SH52 fue similar a la de otros informes que utilizan hongos entomopatógenos comunes contra otras plagas (Gökçe & Er, 2003) y dos órdenes de magnitud inferior a la CL_{50} de *Phlebiopsis gigantea* contra el lepidóptero *Hyblaea puera* (Bijii.,2011).

En este trabajo la patogenicidad de los cinco hongos aislados se evaluó según los postulados de Koch, demostrando que eran responsable de la muerte de *P. acapulcoa*. Con una tasa de mortalidad mayor al 50% para todas las cepas en condiciones de laboratorio probablemente se consideraría baja. Hasta ahora no existe una clasificación universal que defina si una tasa de mortalidad es alta, baja o media. Se sabe que para un control, la mortalidad no debe ser

superior al 20%; por lo tanto, podría considerarse que cualquier valor superior al máximo permitido para un control ya indica cierto potencial como agente de control biológico.

La cepa que presenta una menor CL_{50} es *Penicillium custrosum* SH25 ya que es de $1.6x10^4$ conidios/ml, aun así, todas las cepas presentan una mortalidad mayor al 50 %; la cepa que presento una CL_{50} mayor fue *Phlebiopsis flavidoalba* SH52 con $9.7x10^6$ conidios /ml. En el mercado existen formulados para el control de diferentes insectos plaga, en el caso de *P. acapulcoa* no cuenta con algún producto en específico; sin embargo, mediante comunicación personal con el Comité de Sanidad vegetal del Estado de Morelos se conoció del uso del producto BAN-Bb de la empresa Biotecnología Andreb, que esta formulado con *Beauveria bassiana* a una concentración de $4.0x10^9$ conidios /ml, concentración que podríamos comparar con los aisaldos SH13 y SH 134 ambos identificados como *B. Bassiana*, ya que el primero tiene una CL_{50} de $1x10^5$ conidios /ml, mientras que la segunda cepa presenta una CL_{50} de $2x10^5$ conidios /ml, siendo las dos concentraciones menores a la concentración con la que se presenta al público el producto comercial, lo que indica que ambas cepas tiene potencial para elaborar una formulación.

9. Conclusión

El estudio demostró que cinco hongos, específicamente dos cepas identificadas molecularmente como *Penicillium custrosum*, dos cepas identificadas como *Beauveria bassiana* y una cepa de la especie *Phlebiopsis flavidoalba* exhibieron patogenicidad contra el insecto *Praelongorthezia acapulcoa*. Todos los hongos presentaron una mortalidad superior al 50% en las pruebas realizadas en condiciones de laboratorio. Los resultados sugieren que estos hongos tienen un gran potencial como agentes de control biológico para el manejo de *P. acapulcoa*. Futuras investigaciones podrían enfocarse en optimizar las condiciones para la producción y aplicación de estos hongos como agentes de control biológico.

Es importante mencionar que se logró el establecimiento de un pie de cría de *Praelongorthezia acapulcoa*, así como el establecimiento de un sistema de mantenimiento que es eficiente y nos permitió tener organismos disponibles para los bioensayos

Algunos otros aportes importantes de este trabajo son: el aislamiento de hongos a partir de cadáveres de *Praelongorthezia acapulcoa* ya que hasta el momento no se conocían hongos entomopatógenos aislados específicamente de *P. acapulcoa*, mucho menos se habían realizado evaluaciones de patogenicidad y virulencia de hongos en esta plaga en específico. Cabe destacar que dentro de los aislados se encuentra el aislado SH52 identificado como *Phlebiopsis flavidoalba*, se trata de un hongo basidiomicete que nunca antes había sido reportado como con actividad entomopatógena, lo que abre un área respecto al estudio de la actividad enzimática que le permite poder prosperar en insectos.

Por lo tanto, las cinco cepas identificadas en este trabajo por morfología y biología molecular representan cinco potenciales agentes de control biológico de *P. acapulcoa,* una plaga de la que no existe información sobre su control biológico con hongos entomopatógenos..

10. Literatura citada

Araújo, J. P. M., & Hughes, D. P. (n.d.). *Diversity of entomopathogens Fungi: Which groups conquered the insect body?* https://doi.org/10.1101/003756

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189

Bijii2011. (n.d.).

Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the Metarhizium anisopliae lineage. *Mycologia*, *101*(4). https://doi.org/10.3852/07-202

CABI, & EPPO. (2019). Praelongorthezia praelonga . [Distribution map]. . *Distribution Maps of Plant Pests*. https://doi.org/10.1079/dmpp/20193256152

Cahuer, V. C., & Chavera, G. S. (2015). Eficiencia de un detergente enzimático en el control de Praelongorthezia olivicola (Beingolea) (Hemiptera: Ortheziidae) en el norte de Chile. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, *47*(2).

Camargo, M. G., Marciano, A. F., Sá, F. A., Perinotto, W. M. S., Quinelato, S., GÔlo, P. S., Angelo, I. C., Prata, M. C. A., & Bittencourt, V. R. E. P. (2014). Commercial formulation of Metarhizium anisopliae for the control of Rhipicephalus microplus in a pen study. *Veterinary Parasitology*, *205*(1–2). https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.011

Carapia Ruiz, V. E. (2009). *Pralengorthezia acapulcoa (MORRISON) (HEMIPTERA: ORTHEZIIDAE) UNA NUEVA PLAGA PARA LA CAÑA DE AZUCAR*. https://www.researchgate.net/publication/323074109

Carapia-Ruiz, V. E., Romero-Hernandez, J. P., & Hernandez-Velazquez, V. M. (2019). First Report of Pralengorthezia acapulcoa on Rice in Morelos, Mexico. *Southwestern Entomologist*, *44*(1). https://doi.org/10.3958/059.044.0142

Chen, C. C., Chen, C. Y., & Wu, S. H. (2021). Species diversity, taxonomy and multi-gene phylogeny of phlebioid clade (Phanerochaetaceae, Irpicaceae, Meruliaceae) of Polyporales. *Fungal Diversity*, *111*(1), 337–442. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00490-w

Chomnunti, P., Hongsanan, S., Aguirre-Hudson, B., Tian, Q., Peršoh, D., Dhami, M. K., Alias, A. S., Xu, J., Liu, X., Stadler, M., & Hyde, K. D. (2014). The sooty moulds. *Fungal Diversity*, *66*(1), 1–36. https://doi.org/10.1007/s13225-014-0278-5

Demirci, F., Muştu, M., Kaydan, M. B., & Ülgentürk, S. (2011). Effects of some fungicides on Isaria farinosa, and in vitro growth and infection rate on Planococcus citri. *Phytoparasitica*, *39*(4). https://doi.org/10.1007/s12600-011-0168-2

Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M., Rodríguez, A., Obregón-Barbosa, V., De Lourdes Acosta-Urdapilleta, M., & Villegas, E. (2016). Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of Pleurotus pulmonarius and Pycnoporus cinnabarinus grown separately in an airlift reactor. *BioResources*, *11*(2), 4186–4200. https://doi.org/10.15376/biores.11.2.4186-4200

Francis, J. R., & Manchegowda, H. K. (2023). Molecular phylogenetic identification of Metarhizium and Beauveria and their bio-efficacy against chilli thrips, Scirtothrips dorsalis. *International Journal of Tropical Insect Science*, *43*(3). https://doi.org/10.1007/s42690-023-01002-w

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X. Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma, L. J., St. Leger, R. J., … Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and M. acridum. *PLoS Genetics*, *7*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264

Geremew, D., Shiberu, T., & Leta, A. (2024). Isolation, morphological characterization, and screening virulence of Beauveria bassiana and Metarhizium robertsii fungal isolates on Galleria mellonella. *F1000Research*, *12*. https://doi.org/10.12688/f1000research.134020.5

Gökçe, A., & Er, M. K. (2003). First description of the disease by Conidiobolus osmodes on Tipula paludosa larvae with the report of a natural epizootic. *Journal of Invertebrate Pathology*, *84*(2), 83–89. https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.09.004

Hernández-Rosas, F., García-Pacheco, L. A., Figueroa-Rodríguez, K. A., Figueroa-Sandoval, B., Salinas Ruiz, J., Sangerman-Jarquín, D. Ma., & Díaz-Sánchez, E. L. (2019). Análisis de las investigaciones sobre Metarhizium anisopliae en los últimos 40 años. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *22*. https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1866

Kondo, T., Peronti, A. L., Kozár, F., & Szita, É. (2012). Los insectos escama asociados a los cítricos, con énfasis en Praelongorthezia praelonga Douglas) (Hemiptera: Coccoidea: Ortheziidae). *Cítricos: Cultivo, Poscosecha e Industrialización*.

Korosi, G. A., Wilson, B. A. L., Powell, K. S., Ash, G. J., Reineke, A., & Savocchia, S. (2019). Occurrence and diversity of entomopathogenic fungi (Beauveria spp. and Metarhizium spp.)in Australian vineyard soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, *164*. https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.05.002

Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 3). https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596

Liu, D., Smagghe, G., & Liu, T. X. (2023). Interactions between Entomopathogenic Fungi and Insects and Prospects with Glycans. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Issue 5). https://doi.org/10.3390/jof9050575

Liu, H., & Bauer, L. S. (2006). Susceptibility of Agrilus planipennis (Coleoptera: Buprestidae) to Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae. In *J. Econ. Entomol* (Vol. 99, Issue 4). http://jee.oxfordjournals.org/

Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Natsiopoulos, D., & Eliopoulos, P. A. (2022). Entomopathogenic Fungi: Interactions and Applications. *Encyclopedia*, *2*(2). https://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044

Márquez-Gutiérrez, E. M., Gato-Cárdenas, Y., & Lequerque, A. (2017). El género Metarhizium Sorokin y su aplicación en el control de insectos plagas. *Revista Cubana De Ciencias Biológicas*, *5*(2).

Mascarin, G. M., Guarín-Molina, J. H., Arthurs, S. P., Humber, R. A., de Andrade Moral, R., Demétrio, C. G. B., & Delalibera, Í. (2016). Data on morphological features of mycosis induced by Colletotrichum nymphaeae and Lecanicillium longisporum on citrus orthezia scale. *Data in Brief*, *8*. https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.008

Mburu, D. M., Ochola, L., Maniania, N. K., Njagi, P. G. N., Gitonga, L. M., Ndung'u, M. W., Wanjoya, A. K., & Hassanali, A. (2009). Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana to the termite Macrotermes michaelseni. *Journal of Insect Physiology*, *55*(9). https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.04.015

Meyling, N. V., Pell, J. K., & Eilenberg, J. (2006). Dispersal of Beauveria bassiana by the activity of nettle insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, *93*(2). https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.010

Moslem, M., Abd-Elsalam, K., Yassin, M., & Bahkali, A. (2010). First morphomolecular identification of penicillium griseofulvum and penicillium aurantiogriseum toxicogenic isolates associated with blue mold on apple. *Foodborne Pathogens and Disease*, *7*(7). https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0507

Murphy, R. (n.d.). *Sugarcane : production systems, uses and economic importance*.

Nicoletti, R., Andolfi, A., Becchimanzi, A., & Salvatore, M. M. (2023). Anti-Insect Properties of Penicillium Secondary Metabolites. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 5). https://doi.org/10.3390/microorganisms11051302

Peterson, S. W., Pérez, J., Vega, F. E., & Infante, F. (2003). Penicillium brocae, a new species associated with the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. *Mycologia*, *95*(1). https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833143

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. In *Journal of Natural Products* (Vol. 80, Issue 3, pp. 756–770). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D.,

Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., … Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(16). https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109

Shin, T. Y., Lee, M. R., Park, S. E., Lee, S. J., Kim, W. J., & Kim, J. S. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. In *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* (Vol. 105, Issue 4). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1002/arch.21747

Vianna, M. F., Pelizza, S., Russo, M. L., Toledo, A., Mourelos, C., & Scorsetti, A. C. (2020). ISSR markers to explore entomopathogenic fungi genetic diversity: Implications for biological control of tobacco pests. *Journal of Biosciences*, *45*(1). https://doi.org/10.1007/s12038-020-00108-4

Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The Toxins of Beauveria bassiana and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343

Wynns, A. A., Jensen, A. B., Eilenberg, J., & Júnior, I. D. (2020). Colletotrichum nymphaeae var. Entomophilum var. nov. a natural enemy of the citrus scale insect, praelongorthezia praelonga (hemiptera: Ortheziidae). *Scientia Agricola*, *77*(5). https://doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0269

Xu, H., Liu, X., Wang, P., Li, H., & Wu, Sa. A. (2023). Phylogenetic Implications of Mitogenomic Sequences and Gene Rearrangements of Scale Insects (Hemiptera, Coccoidea). *Insects*, *14*(3). https://doi.org/10.3390/insects14030257

11. Anexos

1. En la Figura 23 de los anexos se muestran el resultado de una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observan las bandas de ADN genómico, obtenido de las extracciones de los 5 aislados fúngicos, en el primer carril podemos ver que se colocó un marcador de peso molecular de 1Kb, la electroforesis fue realizada con la finalidad de observar la presencia de ADN así como corroborar la integridad de la muestra.

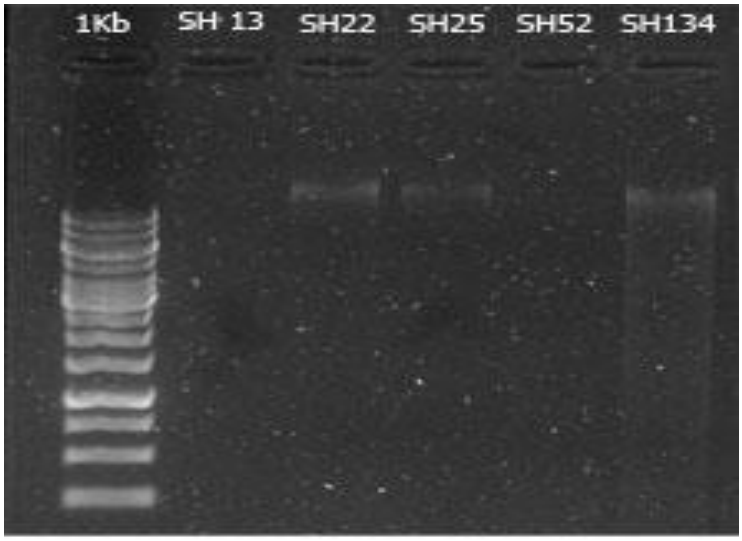


Figura 23. (Anexo 1) Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ADN genómico de los aislados fúngicos SH13, SH22, SH25, SH52 y SH134.

2. En la Figura 24 podemos observar la presencia de las bandas de los amplicones resultado de la PCR del marcador molecular ITS de los aislados fúngicos SH13, SH22, SH25, SH52 y SH134. En el primer carril del gel se puede observar el marcador de peso molecular 1kb, seguido de los cinco carriles en los que se colocaron las muestras y en los dos carriles de la derecha se colocaron los controles uno positivo consistió en la colocación de una muestra de ADN conocido mientras que el control negativo solo contenía la mezcla para PCR sin colocar la muestra.

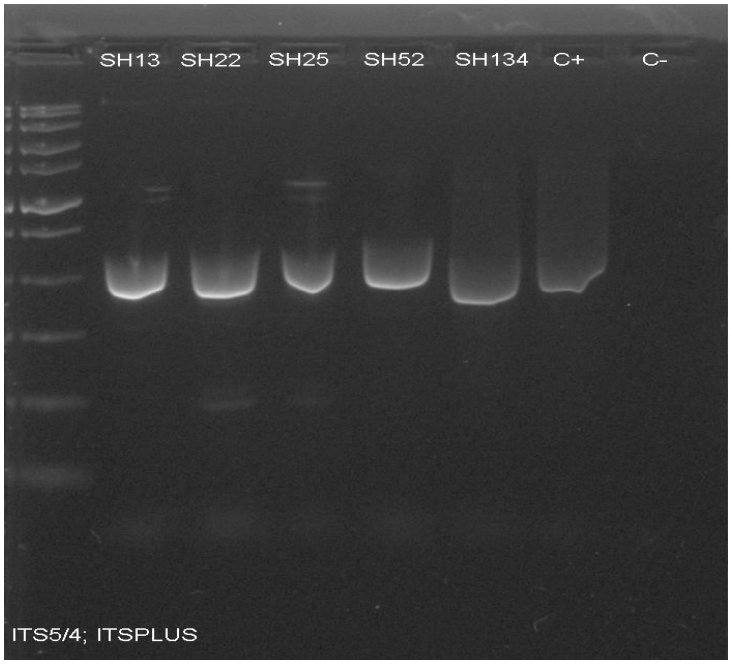
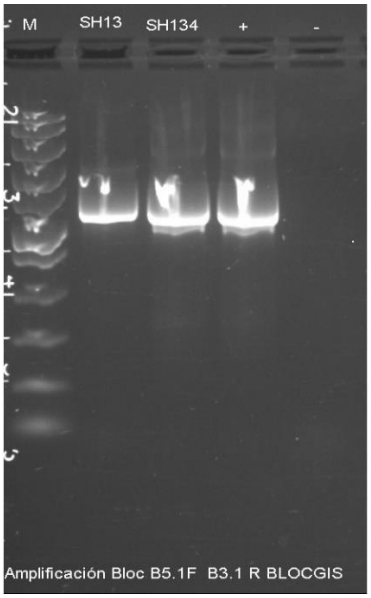
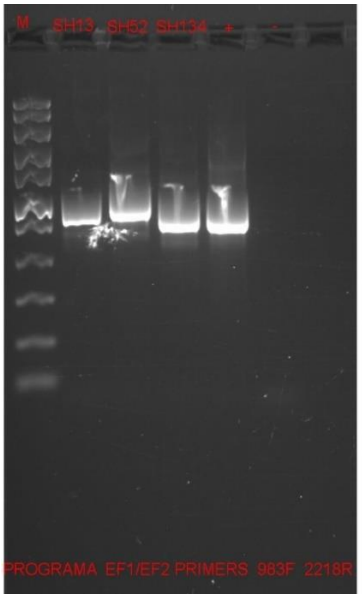


Figura 24. (Anexo 2) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR resultado de la amplificación de los marcadores moleculares ITS de los aislados fúngicos SH13, SH22, SH25, SH52 y SH134

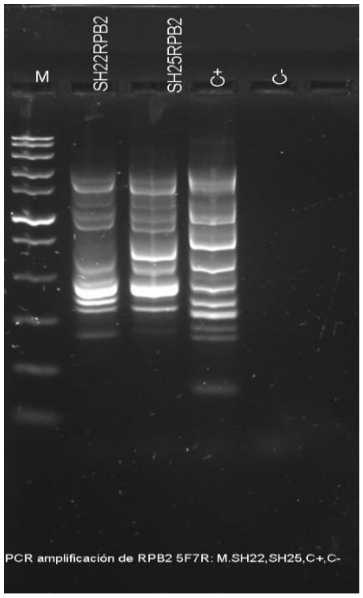
3. En la Figura 25 podemos observar los resultados de las electroforesis en gel de agarosa, en las que se colocaron las muestras con los amplicones obtenidos por medio de PCR de los diferentes marcadores moleculares: (A) Amplificación de BLOC para los aislado SH13 y SH134; (B) Amplificación de *TEF exón* ,para los aislados SH13 y SH134 ; (C) Amplificación de *RPB2* para los aislados SH22 y SH25, (D) Amplificación *de β-tubulina* para los aislados SH22 y SH25.



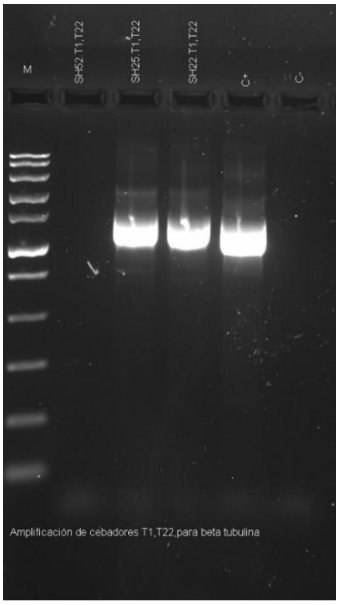
(A)



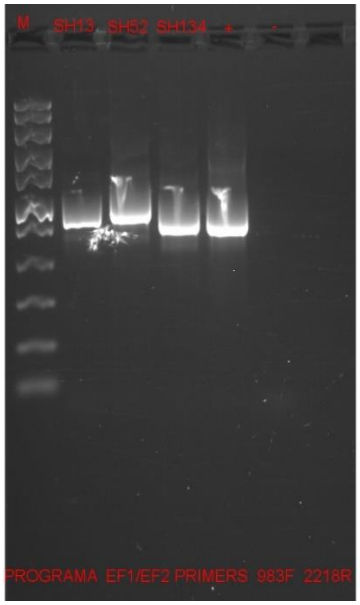
(B)



(c)



(D)



(E)

Figura 25. (Anexo 3) Electroforesis en gel con los productos de PCR, resultado de la amplificación de cada marcador molecular de los cinco aislados fúngicos .

4. Figura XX con los resultados del programa Probit Polo Plus en las que se ilustra la concentración letal media para cada una de las cinco cepas evaluadas: (A) cepa SH134; (B) cepa SH13; (C) cepa SH25; (D) cepa SH22 y (E) cepa SH52.

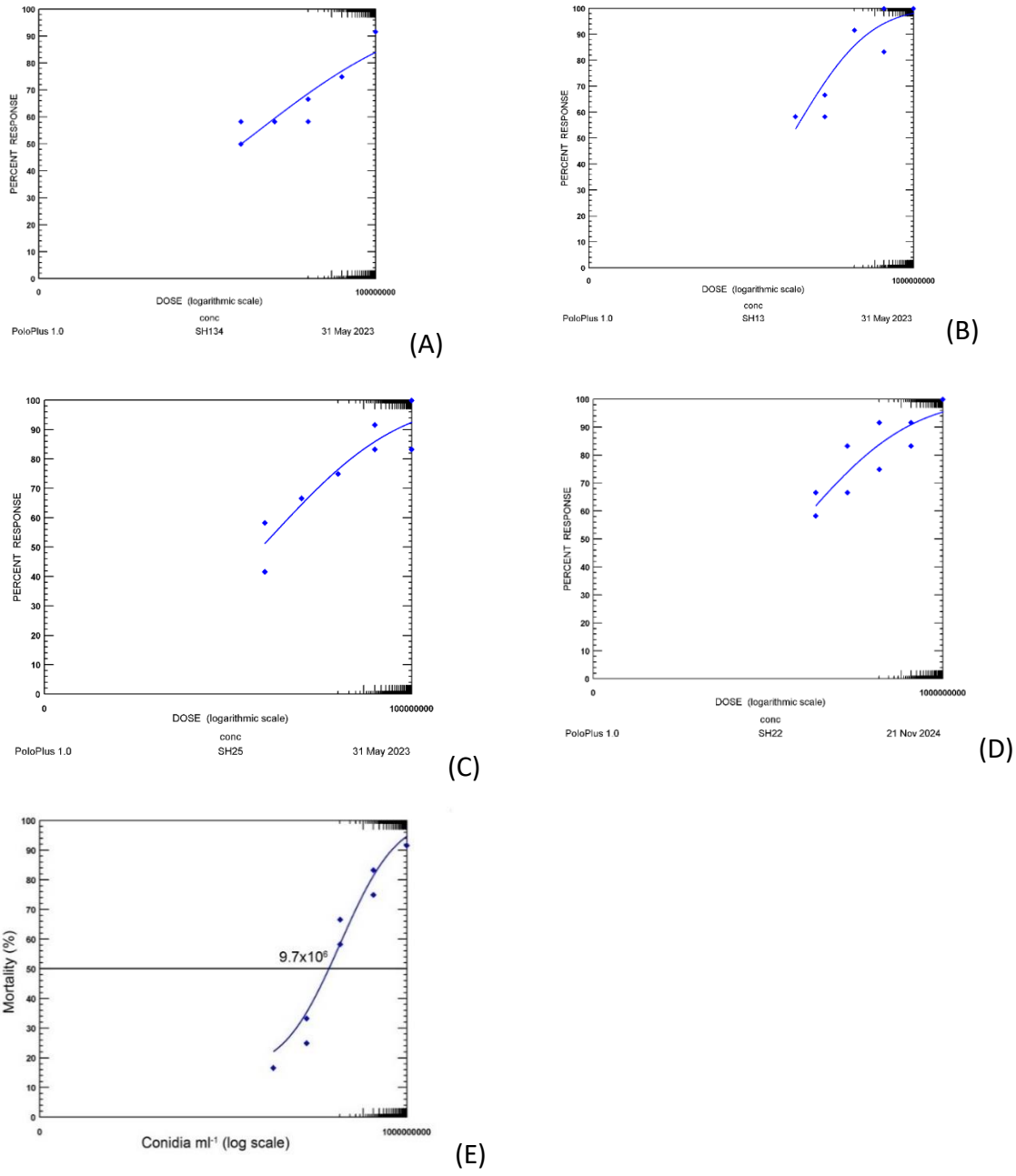


*Figura 26(*Anexo 4) Gráficas de análisis Probit CL_{50}

Cuernavaca, Morelos, 12 de mayo del 2025.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **"Aislamiento y caracterización de cepas de hongos patógenos a *Praelongorthezia acapulcoa*",** que presenta la **C. Silvia Hernández Hernández**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección del DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ y codirección del DR. FACUNDO RAFAEL MUÑIZ PAREDES, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO.**

.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ (director de tesis, CEIB UAEM)

DR. FACUNDO RAFAEL MUÑIZ PAREDES (codirector de tesis, SENASICA SAGARPA)

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA (CIB UAEM)

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (CEIB UAEM)

DR. VICTOR LOPEZ MARTINEZ (FCA UAEM)

DRA. MARY CARMEN TORRES QUINTERO (CCG UNAM)

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL (CEIB UAEM)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2025-05-12 12:40:57 | FIRMANTE

gb0AqgjLyyT3lzJXXrMXHNcB+27XD7a0BkAzt0KH/I2+uJUcNaypTr87E77SgQAjyi+sd4IuaZfpUImIIeCXznP7rmSYXDslcFZuLrJQ7k3OYM9pdoY1kVII986pX3xJXe+aSlHKJAZRe0KF6fQzXoDKCvq2H9Xt30LlIijRs0Ib84wiNbRuePJ9G3wTtVvdAkFbNDJde5Zkp0VKuFn9x3TH7BDwRE0uQAjROFGa2ZzNemSXP4fDXX/zDKByQm+zxF0wYIHaCkLo/+5RdGpIGZZH9fEKlayFxQRCgy+bXiO/KCqkpCEIXEFYiskYZiCKOWQT2LUVuhTkiSXk9WjWNQ==

FACUNDO RAFAEL MUÑIZ PAREDES | Fecha:2025-05-12 13:35:12 | FIRMANTE

NmkBzN65sd1suOxXmjN8JKzirHSNW8cN0SNNlhN2DTFa9m1s/zDbpY3f3uVsNgKp8dhQyZ51sHlGNa5pv9DDRv/AOpBZeWXsqU/THHR/2nHh1277IIPzC0IaOK/vLq1VQG5gh1VN+LlTKRijeZXcB2kMMBfJfc/GJ7hnCbC5Ot271EOwWlBhM/xG3UUb0doHYWQSWYjHFfl4TfU+Isw9IUewu0GAxsYTZo/hZ5cmbfyNSl2IKh9OjGkw+59Urwf7ulHFSLs4BV5oVQV1gwL1udJ/lxKtTbYH93eHrV+3dJF0j+7hoTld1jebtezonGBG1QEb7kAv1izF9j6dg4ZCxQ==

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2025-05-12 14:15:32 | FIRMANTE

A80tpY9yycoy6tKrmkUYAsD5BKih2pOgFsF0y6Nqhp6TcSzQJvUlPDJA6y/A6wnfxWyAH7OAZxwevWFLr0HUMvbPYvXyhBQ/8Q8PadldttI0/OqeotkxY/ERzRLqvfZ4hxApcX1/gjrlqBaMleQ8Z7vhfkbxYIjRjm6+sFz4c8EuUaeITw6ME0NWFms7EMxZUMxaAJYB9B/dAB5vu+QZRsCXwtEFeqSbGE8abofcakql/xCB00nVszruROdSf5l22pyQWDwYvrz+Iy46nVP30xQtmgAwM0wklt8ckA1Z84YMd9hB6R0p1P5kEV0oWJ4G6qsU7Im1PCYeJC5gx2o+NQ==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2025-05-12 14:41:21 | FIRMANTE

vodsE+DZCVnlsVSz5PIFCKb13MCL/pRgVj+WMsR2nLfUvkpRUsiEmgRHMVotbgiajsOkJ9JJUKI8mxeI4x6vky6oktmLkB9E9vXkOvWGyGoyvXuriPyUDumLjqgRjbKlrkS15Wp5IlaZFBoycQhJoylkJvzq5h4H4eFUJv7BvmXDUTpQt2EQOdKAP9+VYRqWoyJ8PHC/9T0AqWJE3Q5tsEE571VLadDy+Nwt6vAM2qSdHTdMBvGjiQQz38PqsMtCWNVEawGRf6NATXPA6un5FpO+FNbn1FzDbvOvLWphYxsp++WHsEt039ou1cBUJGzMcyt7yVnWG9ov4yCGSjCdyA==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2025-05-12 15:10:57 | FIRMANTE

R6YIC83sA3+BWGKAlmqeEydx6ibAI+S/HiZIY7xeiZhgggtnEUJvRtYs5JCsc4wvfoZuQqB6+EBa7mReDjPM/zOtn6ty4YCeD57JBXGYNBCym/BiNg39hdyGmCYIpg2Lu311nZ7KIq+ufXbCiynrug/PwLmhfA6M1q+yi9u90seNJnqI6rLfuCYrKfxKw4VlE9baDrylpInEq+ct4ZP4zuvpBl1XYtlxh0lP4AgQ/aXj7xtzYTixJCUeIASL+1joLXY80VHqDR/zKdMjTvLAW/zuggNuYoyl9nYcviMds8MSMhE3zCk4YiL1XsJ0AUxZoZ1H49keGwm9t9QSpQqNrQ==

MARY CARMEN TORRES QUINTERO | Fecha:2025-05-12 16:20:11 | FIRMANTE

ThBQnBAef/nRHzqzh9YYwCB30aw/5Bl+4NeFLz247IjcyeNmBbafNOka4q++FH6X6yCnWRpe3RYBRh5AijrrQG7KBawnWk8ALMYuj/7XQAQf5U7w7DgMfMoWOBnsnRGrenYmZ4Bu2gHqdL6e9CrNU0nORavtH0MyDCsZxQIKhnFHusC4Dnok6rACW0Q22PmC370SwVOWCu35maN1/aFdY3UpJoEv8MemgtJmkF1plILqhuWmZdbNCg/1cFUiDQDzMJx3NvOUcK5sYEh2kIUo6jwUGjZe5ZojRnrm04J8PuyG2FpyDTY83sRk2pa5Ycob5DoR8uVuxfqkniQ8N1i/Rg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

JcCFGVQ8Y

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/oud65ZlyMNb51ZesKyP5WliBhDtUEWUa