

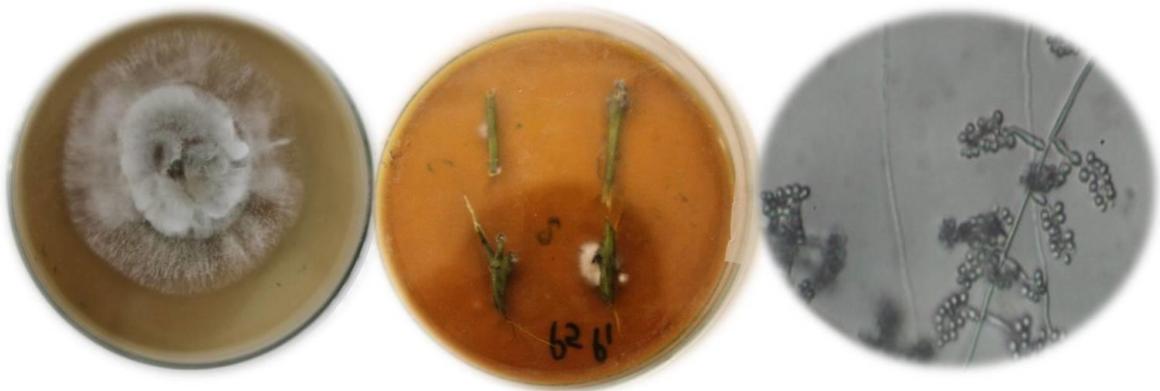
**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Agronomía**

**Efectos de plaguicidas químicos empleados en
Phaseolus vulgaris L. sobre el crecimiento, colonización
y patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y
Metarhizium anisopliae (Mest.) Sorok**

Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo

Autor: Lisneyi Machado Monteagudo

Tutor: MSc. Yordanys Ramos González



SANTA CLARA, CUBA

2016

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Agronomía**



**Efectos de plaguicidas químicos empleados en
Phaseolus vulgaris L. sobre el crecimiento, colonización
y patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y
Metarhizium anisopliae (Metch.) Sorok**

Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo

**Autor: Lisneyi Monteagudo
Tutor: MSc. Yordanys Ramos González**

SANTA CLARA, CUBA

2016

Pensamiento

“El futuro de nuestra patria tiene que ser necesariamente un futuro de hombres de ciencia”...

Fidel Castro Ruz

Dedicatoria

A mi madre Darkis Monteagudo Díaz por ser mi faro de luz en las noches oscuras, por siempre extenderme su mano y estar ahí presente para mí, por su sacrificio, entrega y amor incondicional. A mi padre Alfredo Machado.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que han formado parte de esta larga y maravillosa travesía con momentos de desesperación y hasta a veces agotadora pero sin dudas a mi corta edad la mejor de todas

A mi tutor MSc. Yordanys Ramos González por toda la disposición y ayuda durante el desarrollo de esta tesis.

A la MSc. Annarella Chea González por su tiempo dedicado en el laboratorio.

A mi familia en especial a mi padre Alfredo Machado y a mi abuelo Onidio Monteagudo, a mi tío y tías por estar siempre atentos.

A mi novio Valdemar Barbas Marcos por todo su amor, paciencia, dedicación y apoyo.

A mis compañeros de aula por todos los momentos de risas, de estudios, tensiones y fiestas en estos años, me encantó compartir con ustedes esta experiencia.

A todos los que de una forma u otra pusieron su granito de arena en este trabajo con el Ing. René Cupul.

Al DrC. Ahmed Chacón por siempre guiarme y por sus atenciones en estos años.

A Susy y familia por preocuparse tanto por mí.

Agradecer además, a todos los profesores que han contribuido en mi formación.

A todos de verdad les deseo lo mejor y les doy mis más sinceros agradecimientos.

Resumen

RESUMEN

El siguiente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de plaguicidas químicos empleados en *Phaseolus vulgaris* L. sobre la esporulación, germinación, colonización radicular y patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Los experimentos se realizaron en los laboratorios de Fisiología Vegetal y Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Las evaluaciones correspondientes a la cuantificación del número de conidios y la germinación de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. se realizaron a través de la cámara de Neubauer y un microscopio (400x). El efecto de los plaguicidas químicos en la colonización radicular inducida por estos hongos en *P. vulgaris* se determinó mediante el método de inoculación del tejido endofítico en un medio de cultivo, mientras que la patogenicidad de estos entomopatógenos se determinó a través del método del insecto cebo con el uso de *Galleria Mellonella* L. Los resultados revelaron que el fungicida tebuconazole, inhibió la esporulación y germinación de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Por otra parte, las dos concentraciones de glufosinato de amonio, tebuconazole y mancozeb, afectaron la colonización radicular y la patogenicidad inducida por *B. bassiana* y *M. anisopliae* en *P. vulgaris* y *G. mellonella*, respectivamente. Además, se demostró que los tratamientos de espirotetramat, diazinon, abamectina y etilen bis de zinc no afectaron la esporulación, germinación, colonización y patogenicidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Estos resultados contribuirán al manejo integrado de plagas y enfermedades.

Índice

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Potencialidad de los plaguicidas químicos en el control de plagas y enfermedades	3
2.1.1	Insecticidas	3
2.1.2	Fungicidas	5
2.2	Principales plaguicidas químicos empleados para el control de plagas y enfermedades del frijol común	7
2.3	Hongos entomopatógenos como controladores de insectos	9
2.3.1	Generalidades de los hongos entomopatógenos	9
2.3.2	Modo de acción de los hongos entomopatógenos	9
2.3.3	Características del género <i>Beauveria</i> (Bálsamo) Vuillemin	10
2.3.4	Características generales de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin.	15
2.3.5	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin como agente de control biológico.	16
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1	Efecto de plaguicidas químicos sobre la esporulación y germinación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
3.2	Efecto de plaguicidas químicos sobre la colonización radicular inducida por <i>Beuaveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i>	19
3.3	Efecto de plaguicidas químicos sobre la patogenicidad de <i>Beauveria</i>	20

	<i>bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	
3.4	Análisis estadísticos	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1	Efecto de plaguicidas químicos sobre la esporulación y germinación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
4.2	Efecto de plaguicidas químicos sobre la colonización radicular inducida por <i>Beuaveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i>	24
4.3	Efecto de plaguicidas químicos sobre la patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	27
5.	CONCLUSIONES	33
6.	RECOMENDACIONES	34
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8.	ANEXOS	

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son, después de las bacterias, el mayor grupo de microorganismos colonizadores del suelo. Entre ellos, las especies entomopatógenas juegan un papel importante como uno de los factores naturales que controlan las poblaciones de insectos plaga (Bajan *et al.*, 1995). Se ha estimado que alrededor del 90% de los artrópodos que dañan las plantas, pasan al menos parte de su ciclo de vida en el suelo (Gaugler, 1988; Klingen y Haukeland, 2006). Los insectos plaga que hayan muerto en el suelo como resultado de una micosis, son fuente de inóculo y sus esporas son diseminadas con ayuda de factores bióticos y abióticos. Es por esto, que la presencia, abundancia y patogenicidad de los hongos entomopatógenos está condicionada por un gran número factores ambientales, así como las prácticas agrícolas producidas por la actividad humana (Tkaczuk *et al.*, 2012).

Recientemente se ha comprobado que los hongos entomopatógenos también actúan como endófitos en la naturaleza (Vega *et al.*, 2009). Estos hongos se han aislados de tejidos de un gran número de cultivos como son *Z. mays* (Wagner y Lewis, 2000), *Theobroma gileri* L. (cacao de monte) (Evans *et al.*, 2003), *Papaver somniferum* L. (adormidera) (Quezada-Moraga *et al.*, 2006), *Coffea arabica* L. (café) (Posada *et al.*, 2007), *Sorghum* spp. (Tefera y Vidal, 2009), *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común) (Akuste *et al.*, 2013), *Cucumis melo* L. (melón) (Jaber y Salem, 2014) y *Allium cepa* L. (cebolla) (Muvea *et al.*, 2015).

Otras de las estrategias empleadas en el control de insectos plaga consiste en la diseminación del patógeno a través de insectos cebos. Estos insectos son previamente infectados en los laboratorios y posteriormente colocados en los agroecosistemas donde pueden transmitir el patógeno a otros insectos no infectados (Akuste *et al.*, 2013).

Actualmente el principal método de control utilizado por los productores para la reducción de las plagas y las enfermedades es el uso de plaguicidas químicos,

a veces empleados de forma excesiva. Ligado a esto, está el gran desconocimiento que existe en cuanto al efecto que producen estos plaguicidas en la esporulación, germinación, colonización radicular y patogenicidad de los hongos entomopatógenos que viven de forma natural en el suelo.

Dada esta problemática nos trazamos la siguiente **hipótesis:**

Si se conoce el efecto que producen los plaguicidas químicos empleados en agroecosistemas de *Phaseolus vulgaris* sobre la esporulación, germinación, colonización radicular y patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se podrán tomar medidas en cuanto al uso racional de estos químicos y la conservación de estos hongos entomopatógenos.

Para cumplimentar la anterior hipótesis nos trazamos el siguiente **objetivo general:**

Determinar el efecto de plaguicidas químicos empleados en *Phaseolus vulgaris* L. sobre la esporulación, germinación, colonización radicular y patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Del cual se derivan los siguientes **objetivos específicos:**

1. Evaluar el efecto de plaguicidas químicos empleados en el *Phaseolus vulgaris* sobre la esporulación y germinación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
2. Determinar el efecto de plaguicidas empleados en *Phaseolus vulgaris* sobre la colonización radicular inducida por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en *Phaseolus vulgaris*.
3. Evaluar el efecto de plaguicidas empleados en *Phaseolus vulgaris* sobre la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Revisión Bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Potencialidad de los plaguicidas químicos en el control de plagas y enfermedades.

2.1.1 Insecticidas

Los insecticidas químicos han sido una herramienta importante para el manejo de los insectos plagas de los bosques canadienses. Aplicaciones aéreas de insecticidas, comenzaron desde los años 1920 y se ha expandido ampliamente después de la segunda guerra mundial con la adopción del DDT, primeramente para la eliminación de *Choristoneura fumiferana* Clemens. (Lepidoptera: Tortricidae) y otros insectos defoliadores. Después de esto, se alcanzaron progresos significativos con el desarrollo de nuevos insecticidas químicos y formulaciones que incluían Fenitrothion y Tebufenozide, así como una nueva tecnología de aplicación de insecticidas contra varios insectos plaga. Sin embargo, la oposición a la aplicación de estos insecticidas en los bosques, ha provocado una significativa reducción en el número de insecticidas registrados en Canadá. Después de 1920, se ha avanzado en la adopción de nuevos insecticidas, formulaciones y tecnologías que no afecten al resto de los organismos y sus subsecuentes ecosistemas (Holmes y MacQuarrie, 2015).

Se ha evaluado la efectividad de Espinosad, Imidacloprid, Clorfenapir, Novaluron, Abemectina, Espiromesifen, Ciflutrina, Metiocarbamato y Azadiractina en el control de *Scirtothrips dorsalis* Hood. (Trip de los chiles). Sin importar el número de aplicaciones que se utilizaron, Clorfenapir fue el más efectivo en la reducción los niveles poblacionales de adultos y larvas de *S. dorsalis*, seguido por Espinosad e Imidacloprid. La efectividad de los otros insecticidas fue inconsistente (Seal *et al.*, 2006).

Earias bittella Fab. Es una plaga clave del algodónero (*Gossypium hirsutum* L.) en Pakistan. Para la reducción de los niveles poblacionales de este insecto, se han hecho evaluaciones para determinar el nivel de tolerancia de los mismos a diferentes insecticidas químicos del grupo de los Piretroides y de los

Organofosforados. Los resultados demostraron, que una aplicación alternada de insecticidas con diferentes modo de acción, puede reducir la tolerancia que muestra *E. bittella* a estos insecticidas cuando son aplicados por si solos (Ahmad y Arif, 2008). Por otra parte, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. es una plaga devastadora *G. hirsutum*, así como de muchos otros cultivos. Este insecto plaga ha desarrollado la habilidad de ser resistente a diversos insecticidas químicos. En un experimento de laboratorio se aplicaron los insecticidas nitenpyram, acetamiprid y benzoato de emamectina con el objetivo de controlar los niveles poblacionales de *P. solenopsis*. Los insectos mostraron mayor tolerancia a los tratamientos basados en acetamiprid. (Saddiq *et al.*, 2015).

En el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se aplicaron los insecticidas químicos acetamiprid, lufenuron, imidacloprid, novaluron, triflumuron y piriproxifen para evaluar su efecto sobre las diferentes etapas de desarrollo de *Trichogramma pretiosum* (parasitoide de huevo). La aplicación de piriproxifen durante el periodo de huevo-larva de *T. pretiosum* fue ligeramente perjudicial a la capacidad de parasitismo de las hembras de la generación F1 y la tasa de emergencia de adultos de la generación F1 y F2. Las aplicaciones de acetamiprid resultaron ligeramente perjudiciales en el ciclo de vida de este parasitoide. Sin embargo, los insecticidas novlafuron y triflumuron cuando se aplicaron en los estadios inmaduros de *T. pretiosum* fueron inofensivos para las generaciones F1 y F2 (Carvalho *et al.*, 2010).

Por otra parte, seis grupos diferentes de insecticidas *i.e.* Ripcord® 10 CE, Siron®, CE, Confidor®, 20 LS, Methomyl® 20 CE, Regent®, 50 CS, y Tracer® 240 CS, fueron evaluados para encontrar el más efectivo en el control de *Helicoverpa armígera* en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Todos los tratamientos fueron significantes en el control de la plaga. Basados en el nivel de infección, los insecticida Tracer 240® CS y Methomyl® 20 CE fueron los más recomendados y promisorios en el manejo de *H. armígera* en este cultivo (Badshah *et al.*, 2011).

En Brasil, se aplicaron diferentes concentraciones de Tiametoxan y nematodos entomopatógenos en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) para el control de *Sphenophorus levis* Vaurie Col. En este sentido, no se encontraron diferencias significativas entre el empleo de este químico sintético y el empleo de nematodos entomopatógenos en la reducción de los niveles poblacionales de esta plaga (Leite *et al.*, 2012).

Plutella xylostella L., se ha tratado con mezclas de insecticidas del grupo de los Piretroides para ver el posible efecto sinérgico de estas mezclas. Como resultado, existió una variación en la respuesta de este insecto plaga tratado con lambda-cialotrina, profenofos, benzoato de emamectina y lufenuron. Cuando se mezclaron los insecticidas lambda-cialotrina con benzoato de emamectina se pudo observar que existió un efecto sinérgico, mientras que otras mezclas presentaron efecto antagónico (Nasir *et al.*, 2013).

Bemisia tabaci Genn. es una plaga importante en las regiones tropicales y subtropicales. Para la disminución de los niveles poblacionales de este insecto, se ha evaluado el efecto de dosis subletales de pimetrocina y neemarin. En condiciones de laboratorio estos insectos han sido sumergidos en una dilución de estos insecticidas. Los análisis de su ciclo de vida revelaron que existieron diferencias significativas en cuanto al potencial reproductivo de estos insectos una vez tratados con los insecticidas. Los menores valores en este sentido se obtuvieron con las aplicaciones de pimetrocina, mientras que neemarin causó mayores afectaciones en la actividad reproductiva de *B. tabaci* (Jafarbeigi *et al.*, 2014).

2.1.2. Fungicidas

Se ha comprobado la efectividad de los fungicidas carbendazim, flutolanil, mancozeb, metalaxyl+Mancozeb, pencycuron, thiram+tolclofos-methyl y thiophanate-methyl a concentraciones entre los 50 a 800 ppm sobre hongos del suelo. Los resultados revelaron que carbendazim a una concentración de 100 ppm inhibió completamente el crecimiento radial de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.,

Fusarium oxysporum Schldl, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y *Sclerotinia sclerotiorum*. (LIB) DE BARY Además, el resto de los fungicidas mostraron un mayor efecto inhibitorio al aumentar su concentración (Elshahawy *et al.*, 2015).

El tebuconazol y el carbendazim son los principales fungicidas utilizados en las prácticas agrícolas, y su potencial toxicológico ha recibido especial atención. Cuando altas concentraciones de cada uno de estos fungicidas son aplicados al suelo, se ve afectada la disipación de los mismos. Sin embargo, la aplicación de ambos fungicidas en conjunto o separados pero a bajas concentraciones, no afecta la respiración ni los procesos enzimáticos del suelo (Wang *et al.*, 2016).

Formulaciones de carbendazim, benomyl, thiophanate methyl y methyl 4-(2-(2-dimethylamino acetamide) phenyl)-3- thioallophante fueron comprobado contra *R. solanii*. Todos los fungicidas causaron inhibición del crecimiento miceliar de este hongo fitopatógeno (Taneja y Grover, 2008). En Tunisia, los fungicidas tradicionales para el control de *R. solani* no han sido del todo efectivos y no ha satisfecho a los productores. Por esta razón se evaluó el efecto de Monceren[®] (pencycuron) y Amistar[®] (azoxystrobin) en el control de esta enfermedad. Los resultados revelaron que estos dos nuevos fungicidas fueron efectivos en el control de *R. solani*. Además, las semillas de *Solanum tuberosum* L. tratadas con Amistar[®] proveyeron una mayor protección en los dos años de experimentación (djéballi *et al.*, 2010).

El cultivo del tabaco también se ve afectado por *R. solani*, por esta razón se ha estudiado el efecto de los fungicidas Bavistin[®] (carbendazim 50% WP) Companion[®] (carbendazim 12% + mancozeb 63% WP), Dithane-M 45 (mancozeb-75%), Indofil-Z-78[®] (zineb 75%), Kavach[®] (chlorothalonil 75% WP), Kocide 101[®] (copper hydroxide-77%), Mateo[®] (metalaxyl 8% + mancozeb 64% WP), Ridomil-Gold[®] (metalaxyl-M 4% + mancozeb 64% WP), Roko[®] (thiophanate methyl 70% WP), Score[®] (difenoconazole 25% EC) and Tilt[®] (propiconazole 25% EC), en la reducción de esta enfermedad. Los fungicidas Bavistin[®], Companion[®], Score[®] y

Tilt® resultaron los de mejor efecto en la reducción del crecimiento micelial de este hongo (Seerna *et al.*, 2010).

2.2 Principales plaguicidas químicos empleados para el control de plagas y enfermedades del frijol común.

Los insecticidas químicos han permanecido como un componente fundamental en la regulación de plagas agrícolas. Sin embargo, constituyen motivo de discusiones y controversias debido al cambio de actitudes y percepciones de las empresas y grupos agroecologistas en cuanto a su empleo (Lu *et al.*, 2012). Curiosamente, el uso de estos insecticidas sintéticos se ha incrementado principalmente en países desarrollados y en vías de desarrollo. Este incremento se ha posibilitado a pesar de la popularidad que ha alcanzado el uso de organismos genéticamente modificados, así como al creciente empleo del control biológico (Oliveira *et al.*, 2014).

Dentro de las tácticas existentes para el control de insectos plaga, el uso de insecticidas químicos convencionales sigue siendo la más empleada y efectiva (Panizzi, 2013). Dentro de estos insecticidas los piretroides y los organofosforados tienen similar efecto sobre *Nezara viridula* L. y *Acrosternum hilare* Say., mientras que *Euschistus servus* Say. ha mostrado ser más tolerante ante el efecto de estos insecticidas sintéticos (Temple *et al.*, 2009). Por otra parte, estudios conducidos en laboratorio han demostrado que *P. guildinii* es menos susceptible que *N. viridula* a los insecticidas químicos (Temple *et al.*, 2011).

Algunos insecticidas sintéticos son efectivos sobre huevos de insectos. El Acefato, Lambda-cihalotrina y Tiametoxam pueden provocar hasta el 100% de mortalidad de las puestas de huevos de los insectos. En la agricultura se emplea el acefato (Orthene 97®), beta-ciflutrin (Baythroid XL®), acefato+beta-ciflutrin, bifentrin (Brigade 2EC®), lambda-cihalotrina (Karate Z®), lambda-cihalotrina+tiametoxam (Endigo ZC®), tiametoxam (Centric 40 WG®) y espinosad (Tracer®). para el control de huevos de insectos (Koppel *et al.*, 2011). El bifentrin provoca el menor grado de eclosión de las ninfas y larvas, por lo que va acompañada de una mayor mortalidad. Además tratamientos de bifentrin, seguido en orden por Beta-

ciflutrin+acefato y acefato, resultan ser promisorios como ovicidas, mientras que Espinosad no es tan efectivo en este sentido. (Brown *et al.*, 2012).

En este mismo sentido, se ha evaluado la eficacia de insecticidas organofosforados, piretroides y neonicotinoides en el control de plagas agrícolas de diferentes órdenes (Hemiptera, Coleóptera y Thysanoptera). Los adultos del pentatómido *A. hilare*, es altamente susceptible a un gran número de insecticidas químicos, excepto al acefato (organofosforado) y al acetamiprid (neonicotinoide), mientras que las ninfas si son susceptibles a tratamientos de este insecticida. Por otra parte, el tiametoxam y el acetamiprid (ambos del grupo de los neonicotinoides) resultan promisorios para el control de plagas (Kamminga *et al.*, 2009). En un experimento para determinar la susceptibilidad de *P. guildinii* ante un grupo de insecticidas empleados para su control en los Estados Unidos de América y Brasil, emplearon dosis medias de Lambda-cihalotrin, Acefato, Metamidofos, Imidacloprid y Timetoxam, siendo los dos últimos, los únicos en ser efectivos en el control de insectos con aparato bucal picador-chupador (Baur *et al.* 2010).

Después del año 2000, con la reducción del precio de los insecticidas convencionales, se adoptó el aumento del uso de piretroides. Debido a esto, se evidenció una reducción en cuanto a los principios del manejo integrado de plagas y el control de las mismas empezó a fallar. El número de aplicaciones de insecticidas sintéticos convencionales, se hizo cada vez mayor y comenzó la resistencia de los pentatómidos y otras plagas a estos productos, así como las afectaciones a los enemigos naturales. El cultivo en *G. max*, la situación del manejo integrado de plagas volvió a ser como el de los años 1970, cuando se empleaban hasta cinco aplicaciones de insecticidas por estación de cultivo (Panizzi, 2013).

2.3 Hongos entomopatógenos como controladores de insectos

2.3.1 Generalidades de los hongos entomopatógenos

Los hongos microscópicos fueron los primeros patógenos de insectos en ser empleados como control microbiano. Aproximadamente el 80% de las enfermedades de insectos tienen como agentes etiológicos a los hongos. La ocurrencia de estos hongos en condiciones naturales, tanto enzoótica como epizóticamente es un factor importante en la reducción de las poblaciones de plagas (Alves, 1998). La mayoría de los hongos entomopatógenos presentan crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos, sin embargo algunas especies no producen crecimiento superficial o producen muy poco. Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas, en particular, alta humedad relativa (óptima para germinación, por encima de 95%) y temperatura (entre 20 y 30° C) adecuada para la esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Alean, 2003).

2.3.2 Modo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos son patógenos de amplio espectro, pueden infectar diferentes estadios de desarrollo del hospedero, como huevos, larvas, pupas y adultos, siendo esta característica la más deseable y peculiar. La mayoría son altamente especializados en la penetración vía tegumento, que los coloca en ventaja cuando son comparados con otros grupos de patógenos que solo ingresan al insecto por vía oral, penetrando a través del mesenterio (Alves, 1998). El proceso de infección de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* fue descrito en tres etapas por Tanada y Kaya (1993). La primera etapa consiste en la adhesión y germinación de las esporas sobre la cutícula del insecto, la segunda es la penetración dentro del hemocele, mientras que la última se basa en el desarrollo del hongo que culmina con la muerte del insecto. En estudios posteriores, este proceso infectivo se ha descrito en seis etapas (Zimmermann, 2007; y da Silva *et al.*, 2015). Estas etapas incluyen: 1 Adhesión, en la cual los conidios se adhieren a la cutícula del insecto

empleando proteínas especializadas; 2: Germinación y formación del apresorio; 3: Penetración a través de la cutícula; en esta fase los patógenos producen enzimas como proteasas, quitinasas y lipasas que ayudan a su introducción dentro del hemocele; 4: Represión de las defensas inducidas por el hospedante, a veces por la producción de nuevas destruxinas; 5: Proliferación dentro del hospedante; generalmente el patógeno produce blastosporas o hifas; y por último, 6: Crecimiento externo a través de los espiráculos y la cutícula del insecto; aquí se producen nuevos conidios infectivos los cuales son diseminados por factores bióticos y abióticos.

La superficie de la cutícula de los insectos está compuesta en gran medida por lípidos antimicrobianos, fenoles, enzimas inhibitorias, proteínas y otros compuestos que hacen de la cutícula una gran barrera contra la incidencia de predadores y patógenos. Los hongos entomopatógenos tienen que vencer esta barrera o reprimir estas defensas que imponen los insectos para lograr una virulencia efectiva (Pedrini *et al.*, 2013). De esta manera, la virulencia de los hongos, es frecuentemente relacionada con una rápida germinación y crecimiento sobre la cutícula. Las altas tasas de germinación del entomopatógeno, puede aumentar la probabilidad de infección antes que las esporas sean eliminadas de la cutícula. La composición de la cutícula, está también asociada con la susceptibilidad de los hongos entomopatógenos. En este sentido, los insectos que poseen una mezcla de cadenas lipídicas saturadas, son más susceptibles a la incidencia de los hongos que aquellos con predominio de cadenas insaturadas o la presencia de algunos compuestos con función antibiótica, tales como los derivados de las quinonas o cadenas de lípidos cortas (da Silva *et al.*, 2015.).

2.3.3 Características del género *Beauveria* (Bálsamo) Vuillemin

Algunas enzimas han sido caracterizadas para *B. bassiana*. Por ejemplo en medio líquido YPDA (Extracto de Levadura Papa Dextrosa Agar), YDA (Extracto de Levadura Dextrosa Agar), diferentes aislamientos del hongo fueron capaces de producir y liberar al medio de cultivo una [alfa]-amilasa digestiva. No se

observaron variaciones en la intensidad de la actividad en esta banda para los diferentes aislamientos estudiados. Los autores de este estudio revelan que este es un método simple y sensible que podrá usarse satisfactoriamente no sólo para la evaluación de diferentes hongos entomopatogénicos, sino también, para hacer una determinación rápida de posibles variaciones genéticas debidas a la presencia o ausencia de una enzima específica. *B. bassiana* ha sido aislada como colonizador endofítico de algunas especies vegetales. También se ha mostrado su efecto protector en las plantas contra fitopatógenos o inhibiendo el crecimiento micelial *in vitro* de fitopatógenos foliares y de suelo, entre los que se encuentran: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; *Sclerotium cepivorum*, *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*; *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *P. debaryanum*, y *Septoria nodorum*.

Clasificación taxonómica

Agostino Bassi fue el primer científico en demostrar en 1935 que *Beauveria bassiana* afectaba al gusano de seda *Bómbix mori* Linnaeus. A partir de este momento se han descrito varias especies de *Beauveria*, según sus características morfológicas y genéticas, tales como *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. amorpha*, *B. vermiconia*, *B. velata* y *B. calendonica* (Willoughby *et al.*, 1998), sin embargo las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *B. brongniartii* (De Lacroix) Siemszko.

La clasificación taxonómica de *Beauveria* sp. es la siguiente:

Reino: FUNGI

División: MYCOTA

Subdivisión: EUMYCOTINA

Clase: DEUTEROMYCETES

Subclase: HYPHOMYCETES

Orden: MONILIALES

Familia: MONILIACEAE

Género: *Beauveria*

Descripción morfológica.

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco, las fiálides están representadas por células con una región basal más voluminosa en el que se organizan los conidióforos, densamente agrupados en espirales o solitarios (Figura 1). Las conidias globosas, ovoides, cilíndricas, verrugosas curvadas o no, aparecen sobre las fiálides que pueden ser simples, con algunas ramificaciones en la parte superior o zigzageante. *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2- 3 x 2.0-2.5 μm) y las estructuras conidióforas forman densos grupos (Alves, 1998).

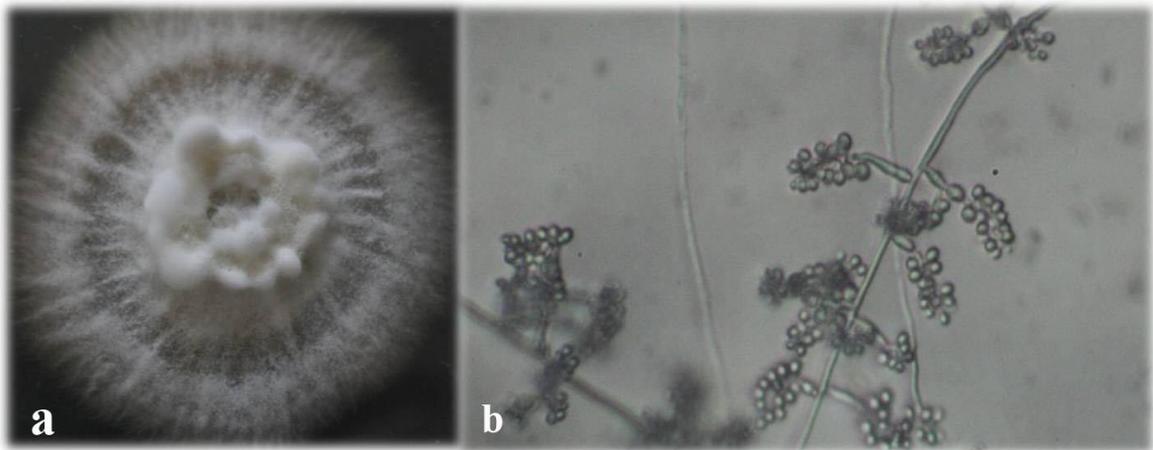


Figura 1: Características morfológicas de *Beauveria bassiana*, a: masa de conidios; b: células conidiógenas con la base hinchada y dentada. Los raquis denticulados se extienden apicalmente con conidios formados sucesivamente sobre cada dentículo (esterigma). (Foto: Yordanys Ramos).

Antecedentes de la actividad entomopatógena de *Beauveria* spp.

Cabrera y Pinedo, (1994) evaluaron una formulación comercial del hongo *B. bassiana* para el control del “gorgojo de la chupadera” *Eutinobothrus gossypii* Costa Lima, (Coleoptera: Curculionidae) plaga del algodón, encontrando que el

insecto es susceptible a una dosis de 0,35% del producto, en condiciones de laboratorio; mientras que en el campo la eficacia del producto solo se presentó en plantas de algodón provenientes de semillas en las que se obtuvieron buenos resultados a la semana de aplicación, sin embargo en plantas provenientes de soca (brote de la planta de algodón cortada luego de la primera cosecha), la población de larvas no fue afectada por el producto.

Luz *et al.*, (1998) evaluaron diferentes cepas de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) a una humedad relativa cercana a la saturación y a 25 °C, registrando una mortalidad en ninfas del tercer estadio cercana al 100% a los 15 días después del tratamiento. Asimismo se pudo notar en dicho estudio, que los aislamientos de *B. bassiana* causaron una mortalidad más alta en comparación a los aislamientos de *M. anisopliae*.

Willoughby *et al.*, (1998) realizaron aislamientos de *B. bassiana* mediante el empleo de medios selectivos y evaluaron su virulencia sobre el “gorgojo de la raíz del trébol” *Sitona lepidus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). Aislaron 3 cepas de *B. bassiana* identificadas como F267, F268 y F269. Las cepas F267 y F268 fueron empleadas en los bioensayos, empleando una alta concentración: 1013 conidias/ha de cada cepa. La cepa con mayor patogenicidad fue F267, que mostró 100% de mortalidad de adultos a los 29 días después de la aplicación. Con F268, la misma aplicación resultó en solo 80% de mortalidad a los 48 días, sin embargo para este tiempo la mortalidad de los controles había alcanzado el 40%.

Lecuona *et al.*, (2001), evaluaron el efecto de 8 cepas de *B. bassiana* sobre larvas, pupas y hembras adultas de la “mosca de la fruta mexicana”, *Anastrepha ludens* Loew (Díptera: Tephritidae). La mortalidad de los estados inmaduros fue baja, de 2-8 % en larvas y 0% en pupas. Sin embargo, niveles muy altos de mortalidad fueron obtenidos para moscas adultas, con valores de 100, 98 y 98% para las cepas Bb16, Bb24 y Bb26, respectivamente. Los valores de CL50 para las tres cepas evaluadas fueron de $3,12 \times 10^6$ a $9,7 \times 10^6$ conidias/mL. El TL50 fue de 2,8,

3,7 y 4,2 días para las cepas Bb16, Bb26 y Bb24, respectivamente, con un promedio de TL50 de 4,4 días para todas las cepas. El porcentaje máximo de esporulación registrado fue de 66,4 a 74,7% para las cepas más virulentas.

Batta (2007) comparó el efecto de dos cepas de *B. bassiana* formulada y no formulada y su efecto biocida sobre *Scolytus amygdali* Geurin-Meneville (Coleoptera: Curculionidae), los resultados obtenidos de ambas exposiciones indican que el tratamiento de adultos de *S. amygdali* con el hongo formulado presentó un porcentaje de mortalidad media más alta cuando se comparó con el tratamiento del hongo no formulado. La mortalidad registrada fue de 81,2 a 100% a los 10 días después del tratamiento con el hongo formulado y de 66,7% de mortalidad a los 10 días después del tratamiento con el hongo no formulado.

Este hongo ha sido efectivo en el control de numerosos insectos, se encuentra entre lo que tienen mayor rango de hospedantes. Las especies principales son *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin; *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Pech y *Beauveria amorpha* Samson y Evans (Humber, 2012)

En los casos de control exitoso en América Latina están *Cylas formicarius* Fabricius, *Cosmopolites sordidus* Germar., *Hypothenemus hampei* Ferrari, *Heterotermes tenuis* Hagen Solenopsis spp. (Castiñeiras *et al*, 1982, Jimenez, 1998, Alves, 1998). En Cuba, se produce con tecnologías artesanales y se obtienen un biopreparado que se destina al control de varias de las plagas citadas.

B. bassiana es un agente de control biológico para artrópodos plaga. En el proceso de desarrollo de un agente de control biológico como producto, es necesario el estudio de su modo de acción, los metabolitos que en él participan y su expresión en las cepas del hongo, a fin de garantizar conocimiento útil para la selección, optimización de la producción, formulación e identidad de la cepa.

2.3.4. Características generales de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin.

El género *Metarhizium* presenta conidias alargadas, de color verde, producidas en forma aglomerada a partir de fiálides; las conidias son ramificadas en forma simple, en pares o verticilos, están en forma alineada formando una capa esporógena. La pared celular de este hongo ofrece propiedades lipofílicas puesto que su capa bilipídica está compuesta especialmente por ácidos grasos poli insaturados que contienen de 16 a 18 carbonos (Griffin, 1981). *M. anisopliae* presenta un crecimiento micelial que puede ser flojo o firme, con una apariencia acolchonada y con estructuras conidiales (Figura 2). Las conidias están frecuentemente unidas formando la estructura conocida como sinemata. La formación de esta sinemata se debe probablemente a una necesidad ecológica para habitar sobre el hospedero ya que no es muy frecuente su presencia cuando el hongo se cultiva en medios artificiales (Griffin, 1981).

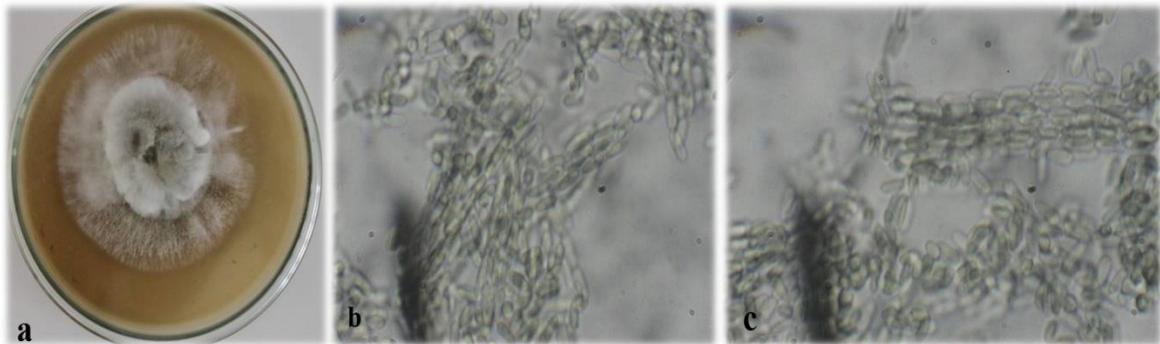


Figura 2. Características morfológicas de *Metarhizium anisopliae*, a: masa de conidios; b-c: cadenas de conidios que muestran la colocación de las esporas en las cadenas adyacentes; c: grandes conidióforos ramificados, integración de cada conidio para formar una superficie densa (himenio). (Foto: Yordanys Ramos).

2.3.5 *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin como agente de control biológico.

Este hongo entomopatógeno, ha sido encontrado afectando a ninfas de *Cyrtoneurus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) (Sánchez y Bellotti, 1997) sobre adultos de *Hypothenemus hampei* Ferrari (González *et al.*, 1993); sobre colonias de *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera: Formicidae) (López *et al.*, 1999); en larvas de *Premnotrypes vorax* Hustache (Torres y Cotes, 1999), en *Metamasius hemipterus* L., y *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae); además, se ha utilizado en el control de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) (Villamizar *et al.*, 1996). *M. anisopliae* var. Major ha sido aislado de larvas de *S. valida* en palmas de Tumaco, además se ha encontrado afectando larvas de *O. cassina* en el municipio de Puerto Wilches (Calvache, 2002).

Los estudios de *M. anisopliae* se iniciaron en Cuba en la década de los 70 del siglo pasado, pero no es hasta 1993 que comienzan a producirse en cantidades mayores y a utilizarse para el control de plagas de insectos en varios cultivos. Al igual que *B. bassiana*, se cultiva sobre soporte sólido, básicamente cabecilla de arroz (*Oryza sativa* L.), el producto final después del secado queda con la apariencia de un granulado; el granulo es la pequeña partícula de arroz recubierta de esporas de hongo. En ese estado puede conservarse hasta tres meses a temperatura de 20 °C. Entre 1993 a 1999 se produjeron 735 toneladas en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos del MINAG. (Pérez, 2008)

La aplicación puede realizarse en forma de gránulo o como una suspensión de conidios. Los conidios pueden ser suspendidos en agua separándolos del soporte sólido. En este último caso hay que tener la preocupación de realizar la aplicación antes de ese momento comienza la germinación de los conidios (Pérez, 2008).

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Efecto de plaguicidas químicos sobre la esporulación y germinación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Inoculación de los entomopatógenos y aspersión de los plaguicidas

Se realizó un experimento en condiciones controladas, para determinar cómo influyen algunos plaguicidas químicos empleados en *P. vulgaris* sobre la germinación y esporulación de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Para esto se utilizó la cepa de *B. bassiana* Bb-18, suministrada por el Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos perteneciente a la Empresa de Cultivos Varios “Valle del Yabú”, Villa Clara, mientras que en el caso de *M. anisopliae* se utilizó la cepa Ma-30 proveniente del Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos de la Empresa Arrocera Sur del Jíbaro, Sancti Spíritus.

Ambos hongos entomopatógenos fueron inoculados en un medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA) (BioCen, La Habana) con 0,4 g L⁻¹ de cloranfenicol en placas de Petri (9 cm de diámetro). Posterior a la inoculación se asperjaron sobre los hongos inoculados, siete plaguicidas químicos a dos concentraciones (concentración media y concentración recomendada) según recomendaciones del MINAG (2014) (Tabla 1). Las placas fueron incubadas durante 72 h en una cámara climática (TP, modelo RTOP-310D, China) a 25 °C, completa oscuridad y 75% de humedad relativa (HR). El experimento contó con cuatro réplicas.

Para determinar la esporulación y germinación de los conidios se aislaron los hongos entomopatógenos procedentes de cada uno de los tratamientos y estos fueron observados a un microscopio (400x, Speed fair, China). El criterio para la confirmación de la esporulación fue la formación de esporas, mientras que el de la germinación fue el crecimiento del tubo germinativo. Además se realizaron conteos de conidios para determinar el efecto de estos plaguicidas en la concentración de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Tabla 1. Especificación de los plaguicidas utilizados en el experimento

Nombre comercial	Ingrediente activo	Tipo	Grupo químico	Concentración recomendada	Concentración media
Finale	glufosinato de amonio	herbicida	Fosfórico	0,16 mL	0,08 mL
Movento	Spirotetramat	insecticida	Piretroide	4,0 mL	2,0 mL
Diazinon	Diazinon	insecticida	organofosforado	0,075 mL	0,0375 mL
Silvacur combi	tebuconazole	fungicida	Triazol	0,039 mL	0,0195 mL
Mancozeb	Mancozeb	fungicida	Ditiocarbonato	0,1 g	0,05 g
Abaco	Abamectina	Insecticida	Abamectina	0,036 mL	0,018 mL
Zineb	Etilen bis de zinc	Fungicida	Ditiocarbonato	0,1 g	0,05 g

Conteo de conidios

Para determinar el efecto de los plaguicidas químicos evaluados, en la concentración de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se tomó un disco (1 cm de diámetro) de los hongos esporulados por cada réplica y tratamiento y se resuspendió en 10 mL de agua destilada y estéril con Triton X-100 al 0,5% y se agitó vigorosamente mediante el uso de un vortex (Genie Touch mixer, Scientific Industries, EE.UU.). Posteriormente se dejó reposar 15 min y se procedió a un segundo vortex para homogenizar los conidios en la solución acuosa. Con el contenido acuoso se realizaron diluciones decimales hasta 1×10^5 . La cámara de

Neubauer se cargó con un tubo capilar estéril y en todos los casos se evitó burbujas de aire. La suspensión de conidios se dejó reposar por 2 min y luego se procedió a su conteo en un microscopio (400x Motic). Finalmente, para determinar el número de conidios mL⁻¹ se empleó la siguiente fórmula:

$$x = \frac{H2O \times FC \times NEC \times DC}{DM}$$

Donde:

X= Concentración de conidios

H2O= volumen de agua

FC= factor de la cámara

NEC= Número de conidios en la cámara

DC= Diámetro de la colonia

DM= Diámetro de la muestra

3.2 Efecto de plaguicidas químicos sobre la colonización radicular inducida por *Beuaveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en *Phaseolus vulgaris*

Inoculación de los entomopatógenos y aspersion de los plaguicidas

Para cumplimentar este objetivo, se sembró bajo condiciones semicontroladas la variedad comercial de *P. vulgaris*, ICA Pijao (testa negra). El suelo colectado para la siembra fue Pardo mullido medianamente lavado (Hernández *et al.*,1999), el cual fue esterilizado tres veces en una estufa eléctrica a 170 °C por 2 h. Para comprobar la calidad de la esterilización, se realizaron diluciones del suelo y se inocularon en un medio de cultivo selectivo de PDAY (del inglés *Potato Dextrose Agar Yeast*) sin antibióticos. El suelo se colocó en bandejas de plástico (22 cm de largo x 3,5 cm de profundidad). El mismo se inoculó con un biopreparado de los hongos entomopatógenos a una concentración de 1x10⁸ conidios. mL⁻¹. Posterior a los tres días de inoculación se procedió a la siembra de *P. vulgaris* y a los tres

días de sembrado se realizó la aspersión de los plaguicidas. Una vez que las plantas alcanzaron el segundo trifolio (V2) (García, 1996) (Anexo 1) estas fueron extraídas y llevadas al laboratorio de Microbiología de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas para su posterior procesamiento.

Inoculación del tejido endofítico de raíces de *Phaseolus vulgaris* en PDA

Las raíces de *P. vulgaris* colectadas, se sometieron a un proceso de esterilización según Akuste *et al.* (2013). El material vegetal con signos de daños mecánicos se desechó para evitar la muerte del tejido endofítico al entrar en contacto con los desinfectantes. La efectividad de este proceso se comprobó según Parsa *et al.* (2013). Una vez concluida la esterilización, las raíces se cortaron asépticamente en seis piezas y se inocularon en placas de Petri (0,5x9 cm) con un medio de cultivo PDA con Sulfato de Estreptomicina (0,05%) como antibiótico. Las placas con el material vegetal se incubaron en una cámara climática a 25±1 °C, en completa oscuridad (Akuste *et al.*, 2013) para propiciar la germinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Para la obtención de colonias puras se inocularon esporas simples de ambos hongos entomopatógenos. La inoculación y la posterior incubación de las esporas, se realizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

3.3 Efecto de plaguicidas químicos sobre la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

El suelo colectado, fue sometido a un secado a la sombra para evitar la proliferación de nematodos entomopatógenos (Zimmermann, 1998). Posteriormente este fue introducido en frascos de cristal (250 mL) y humedecido con 50 mL de agua destilada y estéril. Fueron utilizados como insecto cebo, larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) con cinco semanas de edad y suministradas por el Centro de Reproducción de Entomopatógenos perteneciente a la Empresa de Cultivos Varios “Valle del Yabú” del municipio de Santa Clara. Para evitar que las larvas pasaran al estadio de pupa, estas fueron sometidas a un estrés térmico según Woodring y Kaya (1988). El aislamiento de *M. anisopliae* y *B.*

bassiana con el insecto cebo se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Klingen *et al.* (2002). Para esto se le abrieron 15 orificios (0,5 mm) a la tapa de los frascos para favorecer la aireación. Las larvas muertas fueron lavadas con agua destilada y estéril y colocadas en placas de Petri (0,5x9 cm) con un papel de filtro humedecido e incubadas a 25 ± 1 °C hasta la esporulación de los hongos. Esporas de ambos hongos entomopatógenos fueron aisladas de las larvas e inoculadas en un medio de PDA con cloranfenicol $0,4\text{g L}^{-1}$ como antibiótico (Akuste *et al.*, 2013).

3.4 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en esta investigación se analizaron estadísticamente mediante el empleo de pruebas contenidas en el programa *STATGRAPHICS* plus versión 5.1 (Manugistics Inc, 1992). En todos los casos se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Los análisis consistieron en un ANOVA de clasificación simple con la posterior aplicación de la prueba DHS de Tukey con un 95% de confiabilidad.

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto de plaguicidas químicos sobre la esporulación y germinación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

La aplicación de tebuconazole sobre *B. bassiana* inoculada en un medio de cultivo de PDA inhibió la esporulación y germinación de este hongo entomopatógeno, mientras que la concentración media de mancozeb solo permitió un 25% de esporulación. A pesar de esto, no se evidenció la germinación de los conidios. Por otra parte las aplicaciones de espirotetramat, diazinon, abamectina y etilen bis de zinc no impidieron la esporulación ni germinación de *B. bassiana* obteniéndose valores de 100% de esporulación y germinación con cada uno de los tratamientos antes mencionados (Tabla 2). Por consiguiente, estos plaguicidas químicos pueden ser empleados en los agroecosistemas sin que causen perjuicios al desarrollo de *B. bassiana*. Además, pueden ser aplicados en conjunto con estos entomopatógenos.

Cabe resaltar, que el tebuconazole (grupo de los triazoles) es un inhibidor de la demetilación del esterol. Este fungicida inhibe la biosíntesis del ergosterol en las membradas celulares, por lo que detiene el desarrollo de los hongos. Este químico también impide el desarrollo de las hifas secundarias del patógeno dentro del tejido de las plantas, e impide en menor escala, el desarrollo y la virulencia de los conidios de los hongos (Muños-Leoz *et al.*, 2011). Por todas estas razones, se puede inferir que las aplicaciones de este fungicida sobre *B. bassiana* inhibieron la esporulación de este entomopatógeno comparado con el testigo.

Por su parte, el mancozeb es un fungicida constituido por los elementos químicos zinc y un 80% de manganeso. Este producto afecta el metabolismo de los lípidos, la respiración celular e inhibe la producción de ATP (trifosfato de adenosina). Además, libera gradualmente un gas denominado etileno diisotiocianato, el cual forma un halo de inhibición sobre los hongos patógenos. Cabe resaltar que en este trabajo se utilizó también el fungicida zineb, constituido por zinc, y este no inhibió la esporulación ni la germinación de *B. bassiana*. Por esta razón, se asume

que el responsable de la pobre esporulación producida por mancozeb sobre este hongo entomopatógeno fue su alto contenido de manganeso.

No solo los fungicidas pueden afectar la esporulación y germinación de los hongos entomopatógenos. En este trabajo se demostró que el herbicida glufosinato de amonio afectó la producción de esporas de *B. bassiana*, pues solo el 25% del hongo tratado con este producto y distribuido en las diferentes réplicas, esporuló. Sin embargo, no se evidenció la germinación de los conidios. Según Asadet *al.* (2016) el principal elemento químico de este herbicida es el fósforo, por lo que este mineral, también puede inhibir los parámetros evaluados. Tal es así, que inhibió la esporulación del hongo *M. anisopliae*.

Tabla 2. Efecto de dos concentraciones de plagicidas agrícolas sobre la esporulación y germinación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Tratamientos	<i>Beauveria bassiana</i>				<i>Metarhizium anisopliae</i>			
	Esporulación (%)		Germinación (%)		Esporulación (%)		Germinación (%)	
	CR	CM	CR	CM	CR	CM	CR	CM
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
glufosinato	0	25	0	0	0	0	0	0
espirotetramat	100	100	100	100	100	100	75	100
diazinon	100	100	100	100	100	100	75	100
tebuconazole	0	0	0	0	0	0	0	0
mancozeb	0	25	0	0	0	0	0	0
abamectina	100	100	100	100	100	100	100	100
etilen bis de zinc	100	100	100	100	100	100	100	100

CR: concentración recomendada; CM: concentración media

4.2 Efecto de plaguicidas químicos sobre la colonización radicular inducida por *Beuaveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en *Phaseolus vulgaris*

Tanto la concentración media como la recomendada de espirotetramat y diazinon no ejercieron poder inhibitorio sobre la esporulación de *M. anisopliae*, pero solo se observó el 75% de los conidios germinados cuando se aplicó la concentración recomendada de ambos productos. Esto significa que al menos la concentración media de estos químicos, puede emplearse al suelo o en conjunto con *M. anisopliae* sin que esto afecte su poder germinativo. Por otra parte, el efecto de tebuconazole sobre este entomopatógeno resultó ser el mismo que el de *B. bassiana* (inhibitorio), mientras que mancozeb en este caso también inhibió por completo la esporulación de *M. anisopliae*. La abamectina y el etilen bis de zinc no ejercieron ningún efecto negativo sobre este hongo (Tabla 2).

Con excepción de la aplicación de tebuconazole, el número de conidios de *B. bassiana* cuantificados después de la aplicación de los plaguicidas químicos, no difirió con el control (Figura 1). Por otra parte, se evidenció que *M. anisopliae* cuando fue tratado con espirotetramat y diazinon, produjeron números de conidios estadísticamente similares y sin diferencias con el control.

Sin embargo, el resto de los tratamientos aunque no mostraron diferencias entre sí, lo hicieron con respecto al testigo, al espirotetramat y al diazinon (Figura 2). Es importante señalar, que la esporulación o germinación contempladas en la tabla 2, no necesariamente tiene que coincidir con el número de conidios cuantificados. Estos son aspectos diferentes, pues un hongo puede o no esporular (Tabla 2), pero pueden existir diferencias en cuanto a un mayor o menor número de conidios por unidad de superficie (Figuras 1 y 2).

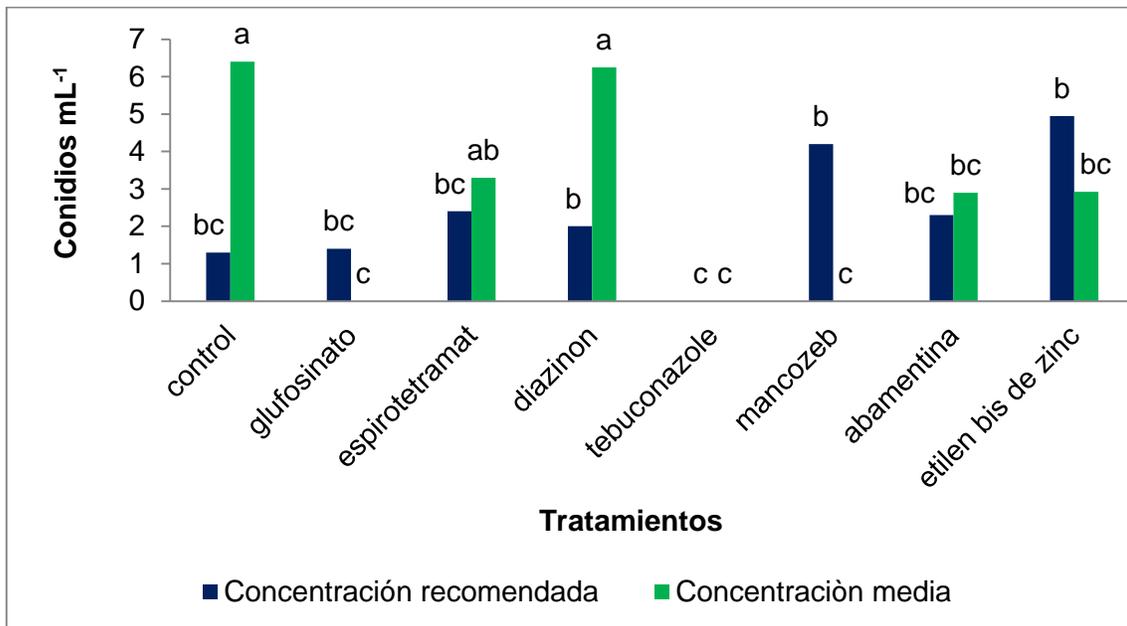


Figura 1. Efecto de dos concentraciones de plaguicidas químicos sobre el número de conidios de *Beauveria bassiana*. El criterio de comparación está basado el efecto del tipo de plaguicida químico en una misma concentración. Barras con letras distintas denotan diferencias significativas según prueba DHS de Tukey ($p < 0,05$).

En los programas de control de plagas, la interacción entre diferentes factores tales como las condiciones ambientales, productos agroquímicos y plaguicidas biológicos, pueden afectar la producción de conidios de los hongos entomopatógenos, así como su viabilidad (Anderson y Roberts, 1983; Loria *et al.*, 1983; Benz, 1987). Por esta razón, conocer el efecto de los plaguicidas químicos sobre estos microorganismos resulta de gran interés para su aplicación conjunta en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades.

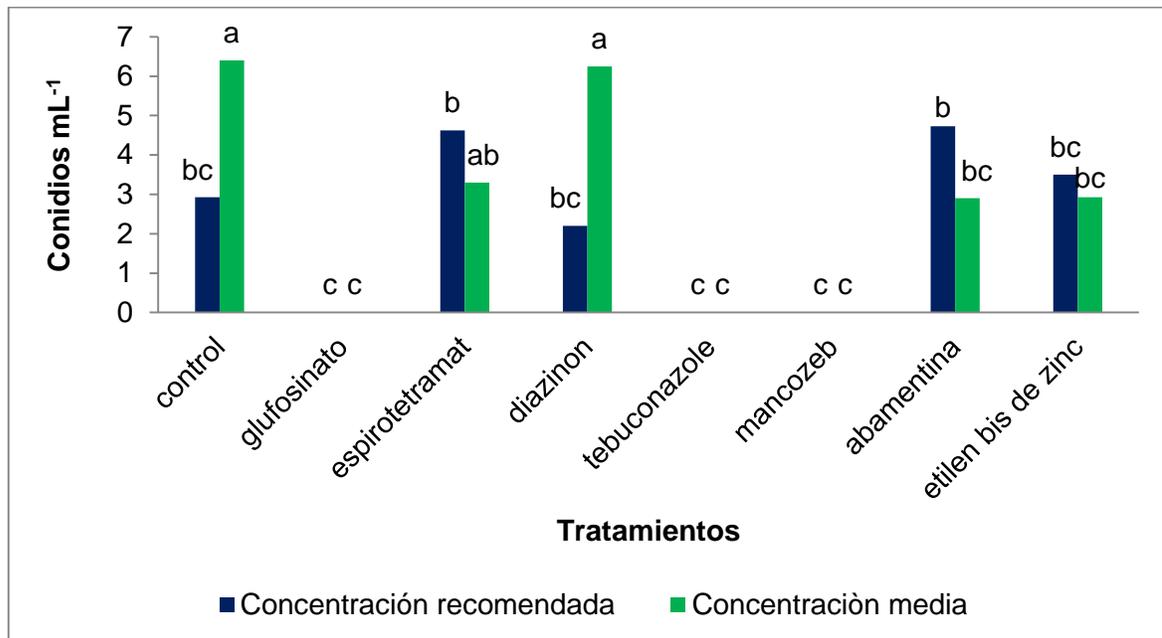


Figura 2. Efecto de dos concentraciones de plaguicidas químicos sobre el número de conidios de *Metarhizium anisopliae*. El criterio de comparación está basado el efecto del tipo de plaguicida químico en una misma concentración. Barras con letras distintas denotan diferencias significativas según prueba DHS de Tukey ($p < 0,05$).

Experimentos *in vitro* realizados por Schumacher y Poehling (2012) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de fipronil, permetrina, imidacloprid, NeemAzal y amitraz, como candidatos potenciales para su aplicación combinada con *M. anisopliae*. Los resultados demostraron que todos los plaguicidas fueron compatibles con este entomopatógeno. Solamente el fipronil en su máxima dosis (40 a 200 ppm) resultó ser moderadamente tóxico sobre *M. anisopliae*. Por otra parte, las altas concentraciones del resto de los plaguicidas, causaron una ligera inhibición (15%) de la germinación de los conidios, así como la reducción en el diámetro de las colonias de *M. anisopliae*. Como conclusión, los autores revelan que es posible combinar estos plaguicidas con el hongo *M. anisopliae* y de esta forma ser empleados en programas de manejo integrado de plagas.

Fătu *et al.* (2011) determinaron el efecto de la concentración recomendada y la media de varios plaguicidas químicos en la esporulación y germinación de *B. bassiana*. En este sentido, demostraron que las formulaciones con pendimetalina y

deltametrina no son compatibles con *B. bassiana* y causan una alta inhibición de su desarrollo. Los productos que resultaron compatibles con este hongo fueron tribenuron-metilo (concentración recomendada), tiuran (Concentración recomendada y media), y imazomox (concentración media).

La compatibilidad de formulaciones de clorfenapyr, fenpyroximate, amitraz, acrinatrina, pyridaben, abamectina, hexythioazox y fenbutatin fue evaluada partiendo de dos concentraciones (concentración media y la mitad de la concentración media) sobre los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (Wise) Brown y Smith. Los resultados demostraron que la acrinatrina, la abamectina y el hexythiozox no afectaron el crecimiento, la germinación y la conidiogénesis de los hongos entomopatógenos evaluados (De Oliveira *et al.*, 2002).

La germinación de los conidios es un estadio crucial para los hongos entomopatógenos, pues esto es necesario para crear suficientes sitios de penetración para una infección satisfactoria (Anderson y Roberts, 1983).

4.3 Efecto de plaguicidas químicos sobre la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* colonizó el 50% de las raíces tratadas con la concentración recomendada de espirotetramat, diazinon y abamectina. Sin embargo, con la aplicación de las concentraciones medias de espirotetramat y abamectina se obtuvo una colonización radicular de un 100% correspondiente a cada tratamiento. La concentración media de diazinon, permitió la colonización del 75% de las raíces. Es importante resaltar, que tanto las concentraciones recomendadas y medias de glufosinato de amonio, tebuconazole y mancozeb, inhibieron la colonización de *B. bassiana* en las raíces de *P. vulgaris* (Figura 3).

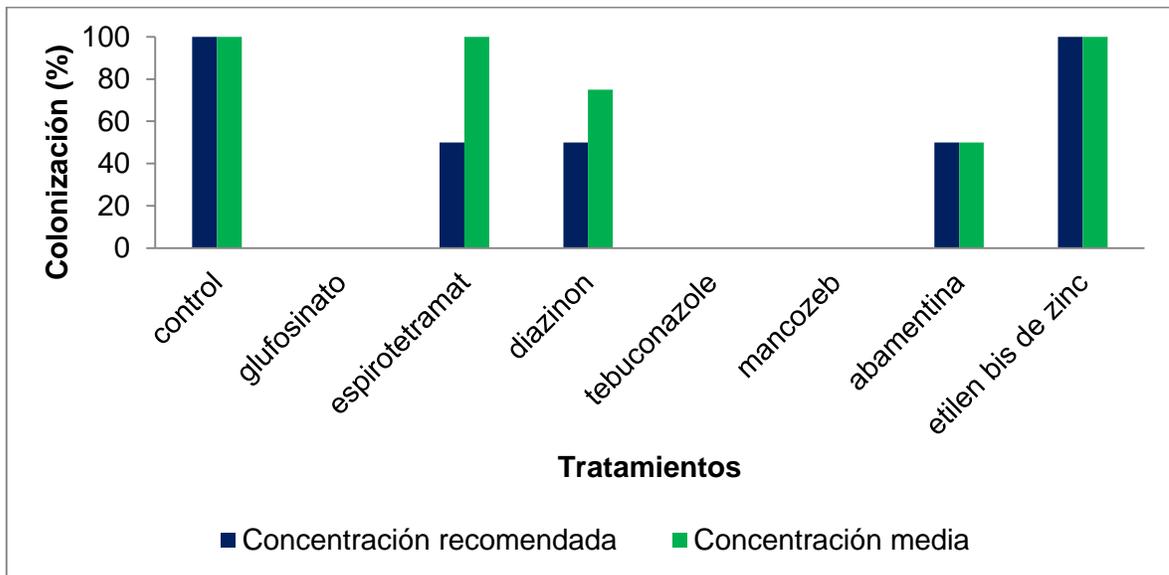


Figura 3. Efecto de dos concentraciones de plaguicidas químicos sobre la colonización radicular de *Beauveria bassiana*.

El hongo *M. anisopliae* no logró colonizar el 100% de las raíces de *P. vulgaris*, producto de la susceptibilidad de este hongo a los plaguicidas químicos empleados. Las concentraciones recomendadas de espirotetramat, abamectina y etilen bis de zinc inhibió el 50% de la colonización de *M. anisopliae* en las raíces de *P. vulgaris*, mientras que concentraciones medias de estos productos permitieron que este hongo entomopatógeno colonizara el 75% de las raíces de las plantas. Sin embargo, al igual que con *B. bassiana*, los tratamientos glufosinato de amonio, tebuconazole y mancozeb inhibieron por completo la colonización de *M. anisopliae* en raíces de *P. vulgaris*. Estos resultados revisten gran importancia por el hecho de que la actividad endofítica de *M. anisopliae* está dirigida fundamentalmente a la colonización de las raíces (Keyser *et al.*, 2014). Por esta razón, el conocimiento del efecto que producen los plaguicidas químicos y sus diferentes concentraciones sobre los hongos entomopatógenos, posibilitará un aporte en las diferentes estrategias de conservación de la microbiota benéfica de los agroecosistemas. Además cabe resaltar, que la actividad endofítica de los hongos entomopatógenos en las plantas, constituye un elemento a tener en cuenta en los programas de manejo integrado de plagas.

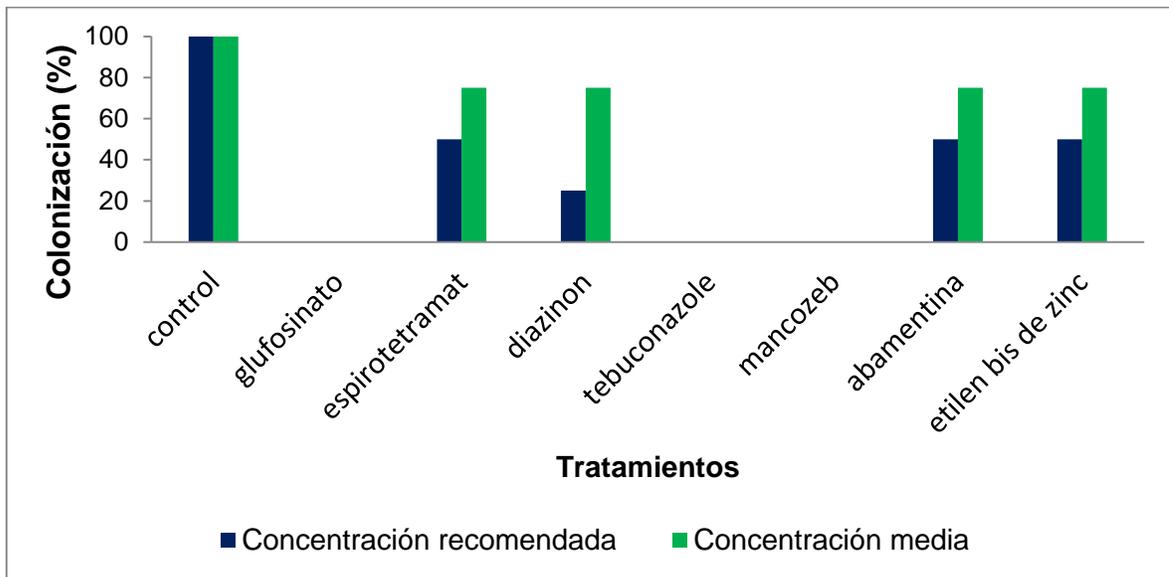


Figura 4. Efecto de dos concentraciones de plaguicidas químicos sobre la colonización radicular de *Metarhizium anisopliae*.

En la tabla 3 se puede ver además el efecto de estos plaguicidas químicos en la patogenicidad de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Los tratamientos con espirotetramat, diazinon, abamectina, y etilen bis de zinc, no mostraron diferencias entre sí, ni con el control en cuanto al número de larvas de *G. mellonella* infectadas con *B. bassiana*. Sin embargo, el glufosinato de amonio, el tebuconazole y el mancozeb, mostraron diferencias estadísticas con los tratamientos antes mencionados, inhibiendo y a veces reduciendo la patogenicidad de este hongo entomopatógeno. Resultados similares fueron obtenidos cuando se aplicaron estos plaguicidas químicos sobre las larvas de *G. mellonella* situadas en un suelo inoculado con *M. anisopliae*. Cabe señalar que en ninguno de los casos se evidenciaron diferencias entre el efecto de las dos concentraciones empleadas.

Estos resultados confirman, que los elementos químicos de los plaguicidas empleados en la agricultura convencional, pueden afectar la patogenicidad de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre los insectos plaga. Por lo tanto, formulaciones basadas en manganeso, fósforo y los plaguicidas del grupo de los triazoles, no deben ser aplicadas en conjunto con los hongos

entomopatógenos evaluados. El conocimiento del efecto de estos plaguicidas químicos sobre la patogenicidad de ambos entomopatógenos en insectos plagas, contribuirá a la elaboración de estrategias fitosanitarias que permitan la acción conjunta de los hongos entomopatógenos y los plaguicidas químicos.

Tabla 3. Efecto de dos concentraciones de plaguicidas químicos sobre la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Tratamientos	<i>Beauveria bassiana</i>		<i>Metarhizium anisopliae</i>	
	CR	CM	CR	CM
Control	5,0 a	5,0 a	5,0 a	5,0 a
glufosinato	0b	0,5b	0b	0b
espirotetramat	4,25 a	4,25 a	4,5 a	5,0 a
diazinon	3,75 a	5,0 a	5,0 a	4,0 a
tebuconazole	0 b	0 b	0 b	0 b
mancozeb	0,5 b	2,25 b	0 b	0,75 b
abamectina	4,25 a	5,0 a	4,25 a	4,75 a
etilen bis de zinc	4,75 a	4,5 a	4,25 a	4,5 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren según prueba DHS de Tukey ($p < 0,05$). CR: concentración recomendada; CM: concentración media

Experimentos realizados por D' Alessandro *et al.*, (2011) sobre el efecto de ocho fungicidas sintéticos sobre el crecimiento y virulencia de *I. fumosorosea* revelaron que azoxystrobin, carbandazim, triadimefon y procimidona, causaron las mayores afectaciones en la germinación de los conidios de este hongo, mientras que propamocarb, oxiclورو de cobre y fenarimol, no causaron afectaciones en este sentido. La virulencia fue evaluada sobre larvas de *Trialeurodes vaporariorum* West. (Hemiptera: Aleyrodidae). La mezcla de esporas de *I. fumosorosea* con oxiclورو de cobre o fenarimol cuando se aplicó sobre esta plaga, causó una

significativa reducción en la mortalidad de los insectos comparado con la aplicación del hongo entomopatógeno solamente.

Shah *et al.*, (2009) demostró que el azoxystrobin inhibió la germinación de *M. anisopliae* y que solamente el fungicida captan mostró efecto fungistático sobre *I. fumosorosea*. En este sentido, Bruck (2009) reveló que propamocarb no mostró efecto fungistático sobre este entomopatógeno, sin embargo, Rubigan 12 EC (fenarimol) afectó el crecimiento y la esporulación de *B. bassiana* (Sapieha-Waskiewicz *et al.*, 2004).

Tkaczuk *et al.*, (2015) evaluaron el efecto de tres plaguicidas químicos utilizados en *Zea mays* L. (maíz) en el crecimiento de *Hirsutella nodulosa* Petch. y *B. bassiana*. *H. nodulosa* fue más susceptible a la aplicación de los plaguicidas que *B. bassiana*. El mayor efecto inhibitorio sobre los hongos entomopatógenos fue producido por el herbicida chizalofop-P-etil. El insecticida Lambda- cyhalotrin a su concentración recomendada, produjo menor efecto tóxico sobre *H. nodulosa* y *B. bassiana*. Esto sugiere la posibilidad de emplear este insecticida en conjunto con los hongos entomopatógenos evaluados.

En este mismo sentido, Rodríguez de Castro *et al.* (2015) evaluaron el efecto de plaguicidas sintéticos y el empleo de sulfuro en la esporulación y germinación del hongo entomopatógeno *Neozygites floridiana* Wieser y Muma. Los autores demostraron que aplicaciones de sulfuro y cyprodinil+fludioxonil inhibieron completamente la esporulación y la germinación de los conidios. La aplicación del fungicida tebuconazole y los insecticidas fenpropatrina y abamectina, no afectaron drásticamente los parámetros evaluados.

Los resultados obtenidos en este trabajo, revelaron que tebuconazole, inhibió la esporulación y germinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, así como su colonización radicular en *P. vulgaris* y su patogenicidad ante insectos plaga. En este sentido, estos resultados no coinciden con los obtenidos por Rodríguez de Castro *et al.* (2015) quienes demostraron que este fungicida causó pocas afectaciones en la esporulación y germinación de *N. floridiana*.

Lo anteriormente expuesto confirma que el efecto de los plaguicidas químicos sobre la germinación, esporulación y crecimiento micelial de los hongos entomopatógenos, no solo depende de la acción de los plaguicidas, sino que las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de estos microorganismos influyen en la susceptibilidad o tolerancia a estos plaguicidas sintéticos. Por esta razón, un plaguicida puede afectar los parámetros de crecimiento, patogenicidad y virulencia de un entomopatógeno y no causar efectos negativos en otro.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. El fungicida tebuconazole inhibió la esporulación y germinación de los conidios de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, mientras que la acción del glufosinato de amonio y el mancozeb inhibieron estos parámetros en este último hongo.
2. Concentraciones medias de glufosinato de amonio y mancozeb permitieron la esporulación de *Beauveria bassiana*, pero no la germinación de sus conidios.
3. El empleo de las dos concentraciones de glufosinato de amonio, tebuconazole y mancozeb, afectaron la colonización radicular inducida por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en *Phaseolus vulgaris*.
4. Las dos concentraciones de glufosinato de amonio y el tebuconazole inhibieron la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, mientras que la concentración recomendada de mancozeb también inhibió la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*.
5. Los tratamientos de espirotetramat, diazinon, abamectina y etilen bis de zinc no afectaron la esporulación, germinación, colonización y patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, por lo que se pueden aplicar de forma conjunta.

Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto de otros plaguicidas agrícolas, así como otras concentraciones en la germinación, esporulación, colonización radicular y patogenicidad de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y otros hongos entomopatógenos.
2. Evaluar el efecto de los plaguicidas agrícolas sobre la colonización radicular inducida por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en *Phaseolus vulgaris* sembrado en otros tipos de suelos.
3. Utilizar formulaciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en conjunto con espirotetramat, diazinon, abamectina, etilen y bis de zinc sobre plagas y enfermedades presentes en agroecosistemas de *Phaseolus vulgaris*.

Referencias Bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, M., Arif, M.I. (2008). Resistance of Pakistani field populations of spotted bollworm *Earias vittella* (Lepidoptera: noctuidae) to pyrethroid, organophosphorous and new chemical insecticides. *Pest Management Science*, 65: 433-439.

Akuste, K.S.; Maniania, N.K; Fraboe, K.K.M.; Van den Berg, J.; Ekesi, S. (2013) Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huibobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecology*, 6: 293-301.

Alean, I. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Agrícola y Veterinaria.

Alves, S.B., Lecuona, R.E. (1998). Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insectos. "Controle Microbiano de Insectos" (Alves, S.B. Ed.). ESALQ, São Paulo. pp. 97–170.

Anderson, T.E., Roberts, D.W. (1983). Compatibility of *Beauveria bassiana* with insecticide formulations used in colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology*, 76:1437-1441.

Asad, M., Iqbal, M.N., Ashral, A., Mahmood, Z, Arshad, A., Raza, U., Kashij, M. (2016). Effect of post-emergence herbicides to control broad-leaved weeds in wheat under rainfed condition. *PSM microbiological research*, 1: 16-21.

Badshah, H., Wajid, A., Sattar, S., Saeed, M., Anwar, S. (2011). Testing the toxic effects of six different groups of chemical insecticides against tobacco bud worm *Helicoverpa arimegera* Hub. Lepidoptera: Noctuidae in FCV Tobacco *Nicotiana tabacum* L. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44: 33-39.

Bajan, C., Kmitowa, K., Mierzejewska, E., Popowska-Nowak, E., Miętkiewski, R., Górski, R., Miętkiewska, Z., Głowacka, B. (1995). Occurrence of entomopathogenic fungi in litter and soil of pine forest in a gradient of forest environmental contamination. *Prace IBL*. 24: 87–97.

Batta, Y. (2007). Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology*.

Baur, M.E., Sosa-Gómez, D.R., Ottea, J., Leonard, B.R., Corso, I.C., Da Silva, J.J., Temple, J., Boethel, D.J. (2010). Susceptibility to insecticides used for control of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae) in the United States and Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 103: 869-876.

Brown, S.A., Davis, J.A., Ritcher, A.R. (2012). Efficacy of foliar insecticides on eggs of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Florida Entomologist*, 95: 1182-1186.

Bruck, D. J. (2009). Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the Rhizosphere. Bulk Soil and in vitro. 54: 597- 606.

Cabrera, J., Pinedo, E. (1994). El hongo *Beauveria bassiana* en el control de algunas plagas agrícolas. *Revista Peruana de Entomología*. 37: 107-110.

Calvache, H. (2002). Manejo integrado de plagas en el agrosistema de la palma de aceite. Curso Nacional Manejo Integrado de Plagas en Palma de Aceite. Fonade – Cenipalma, 205p.

Carvalho, G.A., Godoy, M. S. Parreira, D.S., Rezende, D.T. (2010). Effect of chemical insecticides used in tomato crops on immature *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 36: 10-15.

Castiñeiras, A.; Caballero, G.; González, M. (1982). Efectividad técnico-económica en el empleo de la hormiga leona *Pheidole megacephala* (F.) en el control del tetuán del boniato *Cylas formicarius elegantulus*. *Ciencia y Técnica de la Agricultura. Protección de Plantas*, pp.101-109.

Cézary, T., Marta, H., Anna., K., Pawel, K. B.(2015). The effect of selected pesticides on the growth of entomopathogenic fungi *Hirsutella Nodulosa* and *Beuveria bassiana*. *Journal of ecological engineering*. 16: 177-183.

Cristian, F., Stefan, S., Viorel, F., Ana María, A. Laboratory study of biological interaction between entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And some pesticides used in integrated plant protection systems. *Montanologie*. 61: 154-161.

D' Alessandro, C. P., Padin, S., Urrutia, M. I., López Lastra, C. C. (2011). Interaction of fungicides with the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Science and Technology*, 21: 189 – 197.

Da Silva, R.A., Quintela, E.D., Mascarin, G.M., Pedrini, N., Lião, L.M., Ferri, P.H. (2015). Unveiling chemical defense in the rice stalk stink bug against the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127: 93-100.

Djébali, N., Belhassen, T. (2010). Field study of the relative susceptibility of eleven potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties and the efficacy of two fungicides against *Rhizoctonia solani* attack. *Crop Protection*, 29: 998-1002.

Elshahawy, I.E., Haggag, K.H.E., Abd, H. (2015). Compatibility of *Trichoderma* spp. with seven chemical fungicides used in the control of soil borne plant. *Pest Management Science* 35: 15-23.

Evans, H.C., Holmes, K.A., Thomas, S.E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and preliminary assessment of their potential as biocontrol agent of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2: 149-160.

Fătu, C., Sorin, S., Fătu, V., Andrei, A.M. (2011). Laboratory study of biological interaction between entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. And some pesticides used in integrated plant protection systems. *Montanologie*. 61: 154-161.

García, J. (1996). Fenología de cuatro variedades de caraota *Phaseolus vulgaris* L, sembradas en dos localidades y dos fechas del período septiembre - enero (Longitud del día decreciente). Tesis de Grado. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Instituto de Agronomía. 56p.

González, G., María T., Posada, F., Francisco, J., Bustillo, P., Alex, E. (1993). Bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología* 19: 123-130.

Griffin, D. (1981). Fungal physiology, a while-interscience publication. USA, pp. 102-111.

Guagler, R. (1988). Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 24: 351-360.

Hernández, A.; Pérez, J.; Bosch, D.; Rivero, R.; Camacho, E.; Ruiz, J. (1999). Nueva versión de clasificación genética de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR, pp.37-38.

Holmes, S.B., MacQuarrie, C.J.K. (2015). Chemical control in forest pest management. *The Canadian Entomologist*, 00: 1-26.

Humber, R.A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L.A (Ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2nd Edition. Academic Press, London, pp. 151-187.

Jaber, S.L., y Salem, N.M. (2014). Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. *Biocontrol Science and Technology*, 24: 1096-1109.

Jafarbeigi, F., Samih, M.A., Zarabi, M., Esmaeily, S. (2014). Age stage two-sex life table reveals sublethal effects of some herbal and chemical insecticides on adults of *Bemisia tabaci* (Hem.: Aleyrodidae). *Psyche*, 4: 1-9.

Kamminga, K.L., Herbert, D.A., Kuhar, T.P., Malone, S., Koppel, A. (2009). Efficacy of insecticides against *Acrosternum hilare* and *Euschistus servus* (Hemiptera: Pentatomidae) in Virginia and North Carolina. *Journal of Entomological Science*, 44: 1-10.

Kaya, H.

Keyser, C.A., Thorup-Kristensen, K., Meyling, N.V. (2014). *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. *Fungal Ecology*, 11: 122-131.

Klingen, I. Haukeland, S. (2006). The soil as reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. En: Eilenberg, J.; y Hokkanen, H.M.T. (Eds.). *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Springer publishers, The Netherlands, pp.145-211.

Klingen, I.; Eilenberg, J.; Meadow., R. (2002). Impact of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture Ecosystem and Environment*, 91: 191-198.

Koppel, A.L., Herbert Jr, D.A., Kuhar, T.P., Malone, S., Arrington, M. (2011). Efficacy of selected insecticides against eggs of *Euschistus servus* and *Acrosternum hilare* (Hemiptera: Pentatomidae) and the egg parasitoid *Telenomus podissi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Economic Entomology*, 104: 137-142.

Lecuona, R., Edelstein, J., Berretta, M., La Rosa, F., Arcas, A. (2001). Evaluation of *B. bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potencial Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 38: 172-179.

Leite, L., Martins, F., Machado, P.S., Batista, A., Polanczyk, R.A., Silber, F. (2012). Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus* sp. em cana de açúcar.

López, E., Romero, M., Ortiz, A., Orduz, S. (1999). Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectando reinas de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 25, 49-56.

Loria, R., Galaini, S., Roberts, D.W. (1983). Survival of inoculums of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. *Environmental Entomology*, 12: 1724-1726.

Lu, Y., Wu, K., Jiang, Y., Guo, Y., Desneux, N. (2012). Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487: 362-365.

Luz, C., Rocha, L., Nery, G. (1998). Detection of Entomopathogenic Fungi in Peridomestic Triatomine-Infested Areas in Central Brazil and Fungal Activity Against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) *Neotropical Entomology*. 33: 783-790.

Manugistics (1992). *STATGRAPHICS Plus*. Referencial Manual version 5.1. Rockville, MD, USA.

Muñoz- Leoz, B., Luis- Romera, E., Antugüedad, I., Garbisu, C. (2011). Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil biology and Biochemistry*, 43: 2176-2183.

Muvea, A.M., Meyhöfer, R., Maniania, N.K., Poehling, H.M., Ekesi, S., Subramanian, S. (2015). Behavioral responses of *Thrips tabaci* Lindeman to endophyte-inoculated onion plants. *Journal of Pest Science*, 88: 555-562.

Nasir, M., Imran, M., Munir, A. (2013). Pyrethroids synergize new chemical insecticides in field populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 45: 629-633.

Oliveira, C.M., Auad, A.M., Mendes, S.M., Frizzas, M.R. (2014). Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection*, 56: 50-54.

Panizzi, A.R. (2013). History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*, 42: 119-127.

Parsa, S., García-Lemos, A.M., Castillo, K., Ortiz, V., López-Lavalle, L.A.B., Braun, J., Vega, F.E. (2016). Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Fungal Biology*, 120: 783-790.

Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., Keyhani, N.O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4:24 10.3389/fmicb.2013.00024.

Pérez, N. (2008). Manejo ecológico de plagas. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba, pp.296.

Posada, F., Aime, M.C., Peterson, S.W., Rehner, S.A., Vega, F.E. (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research*, 111: 748-757.

Quezada-Moraga, E., Landa, B.B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R.M., Santiago-Álvarez, C. (2006). Endophytic colonization of *Opium poppy*, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, 161: 323-324.

Rodríguez de Castro, T., Roggia, S., Delalibra, I., Klingen, I. (2015). The effect of synthetic pesticides and sulfur used in conventional and organically grown strawberry and soybean on *Neozygites floricola*, a natural enemy of spider mites. *Pest management science*. (Sin publicar)

Saddiq, B., Shad, S. Aslam, M., Ijaz, M., Abbas, N. (2015). Monitoring resistance of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae) to new chemical insecticides in Punjab, Pakistan. *Crop Protection*, 74: 24-29.

Sánchez, S., Bellotti, C. (1997). Patogenicidad de hongos hyphomycetes sobre *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) chinche subterránea de la yuca. *Revista Colombiana de Entomología*, 23: 31-37.

Saphieha-Waszkiewicz, A., Marjanska-Cichon, B., Mietkiewski, R. (2004). The effects of fungicides applied in apple orchards on entomopathogenic fungi in vitro. *Electronic Journal of polish agricultural universities*. 7: 04.

Schumacher, V., Poehling, H.M. (2012). In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology*, 116: 121-132.

Seal, D.R., Ciomperlik, M., Richards, M.L. Klassen, W. (2006). Comparative effectiveness of chemical insecticides against the chilli thrips *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) on pepper and their compatibility with natural enemies. *Crop Protection*, 25: 949-955.

Shah, F. A., Anasari, M. A., Watkins, J., Phelps, Z., Cross, J., Butt, T. M. (2009). Influence of commercial fungicides on de germination, growth and virulence of four species of entomopathogenic fungi. *Biocontrol science and technology*. 19: 743 – 753.

Tanada, Y. Kaya, H. (1993). *Insect Pathology*. University of Minnesota. Academic Press, pp.666.

Taneja, M., Grover, R.K. (2008). Efficacy of benzimidazole and related fungicides against *Rhizoctonia solani* and *R. bataticola*. *Annals of Applied Biology*, 100: 425-432.

Tefera, T.; Vidal, S. (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endopytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 54: 663-669.

Temple, J.H., Davis, J.A., Hardke, J., Price, P., Micinski, S., Cookson, C., Ritcher, A., Leonard, B.R. (2011). Seasonal abundance and occurrence of the red banded stink bug in Louisiana soybeans. *Louisiana Agriculture*, 54: 20-22.

Temple, J.H.; Leonard, B.R.; Davis, J.A.; Fontenot, K. (2009). Insecticide efficacy against red banded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood), a new stink bug pest of Louisiana soybean. *Midsouth Entomology*, 2: 68-69.

Tkaczuk C., Krzyczkowski T., Wegensteiner R. (2012). The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from mid-field woodlots and adjacent small-scale arable fields. *Acta Mycologica*. 47 : 191–202.

Torres, T., Cotes, A. (1999). Actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos contra *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) mediante su utilización individual o combinada. *Revista Colombiana de Entomología*, 25: 121- 129.

Vega, F.E., Goettel, MS., Blackwell, M., Chander, D.; Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M.; Maniania, N.K., Monzon, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangel, D.E.N., Roy, H.E. (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2: 149-159.

Verona, S., Hans-Michael, P. (2012). In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *British Mycological Society*. 1: 121-132.

Villamizar, L., Cotes, A., Álvarez M. (1996). Estudio tecnológico para la producción masiva y preformulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. (Metschinicov) para el control biológico de la langosta de los llanos orientales (*Rhammatocerus schistocercoides*) In: XXIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, 1996, Cartagena. Resúmenes XXIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología., 1996. 18 – 18p.

Wagner, B.L. y Lewis, L.C. (2000). Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3468-3473.

Wang, C., Wang, F., Zhang, O., Liang, W. (2016). Individual and combined effects of tebuconazole and carbendazim on soil microbial activity. *European Journal of Soil Biology*, 72: 6-13.

Willoughby, B., Glare, T., Kettlewell, F., Nelson, T. (1998). *Beauveria bassiana* as a Potential Biocontrol Agent against The Clover Root Weevil, *Sitona lepidus*. *The New Zealand Plant Protection Society Incorporated*. 1: 9-15.

Woodring, J.L.; Kaya, H.K. (1988). *Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques*, Fayetteville, Arkansas: Arkansas Agricultural Experiment Station, pp. 1-30.

Yao, A. (2012). Toxicological assessment of effect of mancozeb. Treated lettuce (*Lactuca sativa*) on wistar rat liver. *Journal of Environmental Policy and Planning* 6: 67-73.

Zimmermann, G. (1998) Suggestions for a standardised method for re-isolation of entomopathogenic fungi from soil using the bait method (Zimmermann, G. J. (1986) *Appl. Ent.*, 102: 213-215). IOBC/WPRS Bulletin. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes*, 21, 289.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 879-920.

Anexos

8. ANEXOS

Anexo 1. Fases fenológicas del cultivo del frijol descritas por García (1996).

Fases fenológicas	Descripción
Ve (emergencia)	50% de las plantas con los cotiledones visibles al nivel del suelo
Vc (nudo cotiledonal)	50% de las plantas con los cotiledones por encima de la superficie del suelo
V1 (primer nudo)	50% de las plantas con las hojas primarias totalmente desplegadas en el primer nudo
V2 (segundo nudo)	50% de las plantas con la primera hoja trifoliolada suficientemente desarrollada en el segundo nudo sobre el tallo principal, comenzando por el nudo unifoliado
V3 (tercer nudo)	50% de las plantas con tres nudos sobre el tallo principal, comenzando con el nudo unifoliado con una hoja suficientemente desarrollada
V4 (cuarto nudo)	50% de las plantas con cuatro nudos sobre el tallo principal, comenzando por el nudo unifoliado
R1 (prefloración)	50% de las plantas con el primer racimo floral visible en cualquier nudo sobre el tallo principal comenzando por el nudo unifoliado
R2 (floración)	50% de las plantas con la primera flor abierta en cualquier nudo sobre el tallo principal comenzando por el nudo unifoliado
R3 (formación de la legumbre)	50% de las plantas con una legumbre de 3 mm a 2 cm de longitud con la corola colgando o desprendida en cualquier nudo sobre el tallo principal, comenzando por el nudo unifoliado
R4 (llenado de las legumbres)	50% de las plantas con una legumbre de 10 a 12 cm de longitud y sus cavidades llenas de granos de tamaño completo en los primeros siete nudos sobre el tallo principal, comenzando por el nudo unifoliado
R5 (inicio de la maduración)	50% de las plantas con una legumbre madura en cualquiera de los nudos sobre el tallo principal, comenzando por el nudo unifoliado (madurez fisiológica)
R6 (completa maduración)	50% de las plantas con el 95% de las legumbres de color marrón claro