

Universidad de Costa Rica  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología

Tesis presentada para optar por el grado de  
Licenciatura en Biología con Énfasis en Zoología

Control de *Aphis citricidus* (Kirk.) (Hemiptera: Aphididae) por medio del uso de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilli. (Hypocreales: Cordycipitaceae) en condiciones de laboratorio

Tania Leandro Espinoza  
A83396

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
2018

## Miembros del Tribunal

Ph. D. Mauricio Montero Astúa

Tutor de tesis

---

Ph. D. Paul Hanson

Lector

---

Ph. D. Priscila Chaverri

Lectora

---

Ph. D. Melissa Mardones

Miembro del tribunal examinador

---

M.Sc. Daniel Briceño Lobo

Representante del decano

---

Tania Leandro Espinoza

Postulante

---

## Dedicatoria

A mi mamá Carolina,  
mi papá Raschid,  
mi hermana Ariela,  
por su amor,  
apoyo y compañía.  
Siempre.

## Agradecimientos

Primero, quiero agradecer profundamente a mi familia, en especial a mis padres y mi hermana menor, por su apoyo incondicional siempre. A mi papá por sus chistes, sus comidas y su cariño que siempre relajan y me ponen de buen humor. A mi madre por sus consejos, su apoyo y comprensión. Al Genius por ponerme atención cuando lo necesito y escuchar mis pequeños ataques de ansiedad jeje también por su amistad y complicidad. Me gustaría agradecer también a mi hermana Caro, mi abuela, tías, tíos, primas y primas por sus buenos deseos.

Agradezco también a mis amigas y amigos por estar siempre ahí para mí, por ser mi soporte, por escucharme y entenderme mejor que nadie! A Meli (mi corazón), In, Beatriz (cc la mita), Kim, Raque, el chinese, Lola, Flores, a los bizcochos, etc. Gracias por todas las risas y los tragos. A Josué por su cariño, su apoyo y su comprensión.

En mi comité de tesis, le agradezco profundamente a Mauricio por sus ideas geniales, por tenerme paciencia y por querer que todo que siempre lo mejor posible. A Paul por su apoyo y comprensión. A Lisela, que aunque no fue parte del comité, siempre estuvo presente.

## Índice de contenido

Índice de ilustraciones .....	vii
Índice de cuadros .....	xi
Índice de anexos .....	xii
Resumen .....	xiii
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	4
2.1. <i>Aphis citricidus</i> .....	4
2.1.1. Ámbito de hospederos .....	5
2.1.2. Control.....	5
2.1.3. <i>Aphis citricidus</i> en Costa Rica .....	5
2.2. Hongos entomopatógenos.....	6
2.2.1. <i>Beauveria bassiana</i> .....	7
2.2.1.1. Estado de la situación en Costa Rica .....	8
2.2.2. Bioensayos <i>in vitro</i> para evaluar la patogenicidad de hongo entomopatógenos en áfidos .....	9
3. Justificación.....	11
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos .....	12
4. Materiales y métodos .....	13
4.1. Aspectos generales.....	13
4.2. Ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i> de 15 aislamientos de <i>B. bassiana</i> sobre el áfido café de los cítricos.....	14
4.3. Ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i> de cuatro aislamientos de <i>B. bassiana</i> sobre el áfido café de los cítricos. ....	16
4.4. Detección de <i>B. bassiana</i> a partir de un solo áfido.....	16
4.4.1. Extracción de ADN .....	16
4.4.2. PCR para la detección de <i>B. bassiana</i> .....	17
4.5. Análisis estadístico.....	18

5. Resultados .....	20
5.1. Variables ambientales .....	20
5.2. Ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i> de 15 aislamientos de <i>B. bassiana</i> sobre el áfido café de los cítricos.....	21
5.3. Ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i> de cuatro aislamientos de <i>B. bassiana</i> sobre el áfido café de los cítricos. ....	26
5.4. Detección de <i>B. bassiana</i> a partir de un solo áfido.....	30
6. Discusión.....	40
6.1. Bioensayos <i>in vitro</i> para observar la patogenicidad de aislamientos de <i>B. bassiana</i> sobre el áfido café de los cítricos.....	40
6.2. PCR para la detección de <i>B. bassiana</i> a partir de un solo áfido <i>Aphis citricidus</i> .....	46
Conclusiones.....	49
Recomendaciones .....	50
Bibliografía.....	52
Anexos.....	63

## Índice de ilustraciones

- Fig. 1:** Promedio de humedad relativa, temperatura (°C) y áfidos muertos en las placas control de acuerdo al mes en el cual se realizó cada bioensayo. Se incluye el porcentaje de mortalidad promedio de cada bioensayo realizado y adicionalmente, el dato de cinco ensayos preliminares (EP) realizados. .... 20
- Fig. 2:** Mortalidad de individuos de *Aphis citricidus* expuestos a 15 aislamientos de *Beauveria bassiana* o tratamiento control. Las barras son el promedio de dos repeticiones del tratamiento en el tiempo (en total cuatro unidades experimentales) ( $p < 0.0001$ ). Las barras representan el error estándar. .... 24
- Fig. 3:** Porcentaje de mortalidad de individuos de *Aphis citricidus* expuestos a cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* o tratamiento control. Cada barra corresponde al promedio de cuatro repeticiones del bioensayo (un total de 12 unidades experimentales por tratamiento) ( $\chi^2 = 20,3$ ;  $gl = 4$ ;  $p = 0,00015$ ). Las barras representan el error estándar. .... 28
- Fig.4:** Extracción de ADN con tres diferentes protocolos a partir de cadáveres de *Aphis citricidus* expuestos a tratamientos con *Beauveria bassiana*, tres sin micelio visible creciendo sobre el cadáver y tres con micelio visible. M. Marcador de peso molecular (1Kb), carriles 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15 corresponden a cadáveres sin micelio visible; y los carriles 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17 y 18 corresponden cadáveres con micelio visible. .... 30
- Fig. 5:** PCR anidado para la detección de *Beauveria bassiana* según Landa *et al.* (2013) en cadáveres del áfido café de los cítricos (*Aphis citricidus*). Carriles en común entre ambos geles. M. Marcador de peso molecular (1Kb), carriles 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15 corresponden a extracciones de cadáveres sin micelio visible; y los carriles 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17 y 18 corresponden a extracciones a partir de cadáveres con micelio visible. Gel A. Primera ronda con los imprimadores ITS5/ITS4. Carril 19. control positivo (ADN de *B. bassiana*). El control negativo (agua) se corrió en otro gel con resultado negativo. Gel B. Segunda ronda con los imprimadores BB.fw/BB.rv. Carril 19. Vacío; 20. Control positivo (ADN de *B. bassiana*); y 21. Control negativo (agua). .... 31
- Fig. 6:** PCR realizado, modificando Landa *et al.* (2013), directamente (sin la primera ronda de amplificación) con imprimadores internos (BB.fw/BB.rv) para detección de *Beauveria*

*bassiana* en cadáveres del áfido café de los cítricos (*Aphis citricidus*). Gel A: M. Marcador de peso molecular (1Kb), carriles 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15 corresponden a extracciones de cadáveres sin micelio visible; carriles 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17 y 18 corresponden a extracciones a partir de cadáveres con micelio visible, carril 19 Control positivo (ADN de *B. bassiana*). Gel B: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 20. Control negativo (ADN de *Metarhizium anisopliae*, aislamiento MTR16), 21. Control negativo (agua), 22. Control negativo (hongo contaminante sin identificar), 23. Control negativo (ADN de *A. citricidus* sin tratar)..... 32

**Fig. 7:** Prueba con imprimadores internos para la detección de *Beauveria bassiana* según Landa *et al.* (2013) en ADN de *B. bassiana* (gel A) y *Metarhizium anisopliae* (gel B). Gel A: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 1. BV-ECA0, 2. BV-ECA1, 3. BV-ECA8, 4. BV-ECA9, 5. BV-ECA11, 6. BV-ECA12, 7. BV-ECA13, 8. BV-ECA14, 9. BV-ECA15, 10. BV-ECA16, 11. BV-ECA18, 12. BV-ECA20, 13. BV-ECA21, 14. BV-ECA23, 15. BV-ECA25, 16. BV-ECA26, 17. BV-ECA27, 18. BV-ECA28, 19. BV-ECA29, 20. BV-ECA30, 21. BV-ECA31, 22. BV-ECA32. Gel B: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 23. MTR0, 24. MTR1, 25. MTR3, 26. MTR4, 27. MTR5, 28. MTR6, 29. MTR7, 30. MTR8, 31. MTR9, 32. MTR10, 33. MTR11, 34. MTR12, 35. MTR16, 36. MTR17, 37. MTR28, 38. MTR29, 39. MTR34, 40. MTR38, 41. Vacío, 42. Control negativo (agua).... 33

**Fig. 8:** Análisis capilar electroforético de productos de PCR obtenidos del protocolo de Landa *et al.* (2013) para la detección específica de *B. bassiana* utilizando QiAxcel (QIAGEN, USA). Solo se utilizaron los imprimadores de la segunda ronda. Gel A: M. M. Marcador molecular de peso molecular (1Kb), 1-32: BV-ECA0, BV-ECA1, BV-ECA8, BV-ECA9, BV-ECA11-BV-ECA16, BV-ECA18, BV-ECA20, BV-ECA21, BV-ECA23, BV-ECA25-BV-ECA37, BV-ECA43-BV-ECA47. Gel B: 33-49: MTR0, MTR1, MTR3-MTR12, MTR16, MTR28, MTR29, MTR34, MTR38. Gel C: 50. C negativo (ADN de áfido no expuesto a *B. bassiana*), 51-53: cadáveres de tres áfidos expuestos a *B. bassiana* sin micelio visible, 54-56: cadáveres de tres áfidos expuestos a *B. bassiana* con micelio visible. Gel D: 57-59: C negativo (tres muestras de *Talaromyces* spp.), 60. C negativo (agua)..... 34

**Fig. 9:** SCARS para la detección de *B. bassiana* según las condiciones descritas en la publicación Castrillo *et al.* 2003. M. Marcador de peso molecular (100 bp), 1. BV-ECA11,

2. BV-ECA12, 3. BV-ECA14, 4. BV-ECA15, 5. BV-ECA16, 6. BV-ECA18, 7. BV-ECA20, 8. BV-ECA23, 9. BV-ECA25, 10. BV-ECA26, 11. BV-ECA28, 12. BV-ECA29, 13. BV-ECA30, 14. BV-ECA31, 15. BV-ECA32, 16. MTR6, 17. MTR7, 18. MTR8, 19. Control negativo (*Talaromyces* sp.), 20. Hongo 1 (ADN extraído de áfido tratado con micelio visible), 21. Control negativo (agua), MM. Marcador de peso molecular (50bp)... 35

**Fig. 10:** Resultado de SCARS descritos por Castrillo *et al.* 2013 con un gradiente de temperaturas de anillamiento (TA) para la detección de *B. bassiana*. Para cada una de las variaciones de temperatura se utilizaron las mismas muestras de hongo en el siguiente orden: MTR1, MTR10, MTR11, BV-ECA0, BV-ECA21, BV-ECA31; ADN de áfido expuesto a *B. bassiana* sin micelio visible, control negativo (*Talaromyces* sp.). Gel A: M. Marcador de peso molecular (50 pb), 1-8. TA de 62°C. 10-17. TA de 61,2°C. 9-16. TA de 61.2°C. 17-24. TA de 60,2°C. 25-30. TA = 59,1°C. Gel B: M. Marcador de peso molecular (50pb), 31-33. TA = 59,1°C. 34-41. TA = 58,4°C. 42. Vacío. 43. Control negativo (agua).  
..... 36

**Fig. 11:** Análisis capilar electroforético utilizando QiAxcel (QIAGEN, USA) de productos de PCR. Gel A y Gel B son repeticiones de productos de PCR obtenidos siguiendo el protocolo de Landa *et al.* (2013) para la detección específica de *B. bassiana* en cadáveres de *Aphis citricidus* expuestos a bioensayos con este hongo. Solo se utilizaron los imprimadores de la segunda ronda (BB.fw/BB.rv). El Gel C muestra los resultados de amplificación de la región COX I. Cada gel está dividido en cadáveres con y sin micelio visible luego de siete días en cámara húmeda y controles positivos y negativos. En los gels se utilizaron las mismas muestras en el mismo orden, para cada carril se indica el aislamiento empleado en ese tratamiento. Con micelio: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 1-10: cadáveres procedentes del bioensayo 1, 1-2: BV-ECA1, 3-4: BV-ECA13, 5-6: BV-ECA14, 7-8: BV-ECA15, 9-10: tratamiento control. 11-20: cadáveres procedentes del bioensayo 2, 11-12: BV-ECA1, 13-14: BV-ECA13, 15-16: BV-ECA14, 17-18: BV-ECA15, 19-20: tratamiento control. 21-30: cadáveres procedentes de bioensayo 4, 21- 22: BV-ECA1, 23- 24: BV-ECA13, 25- 26: BV-ECA14, 27- 28: BV-ECA15, 29-30: tratamiento control. Sin micelio: M. Marcador molecular de 1Kb, 31-35: cadáveres procedentes de bioensayo 1. 31\* y 32\*: BV-ECA13, 33\*: BV-ECA14, 34-35 tratamiento control, 36-42: cadáveres procedentes de bioensayo 2. 36-37: BV-ECA13, 38-39: BV-

ECA14, 40: BV-ECA15, 41-42: tratamiento control. 43-50 cadáveres procedentes de bioensayo 4. 43-44: BV-ECA1, 45-46: BV-ECA13, 47-48: BV-ECA14, 49- 50\*: tratamiento control. Controles: ADN de aislamiento: 51: BV-ECA1, 52: BV-ECA13, 53: BV-ECA14, 54: BV-ECA15, 55: ADN de áfido sin tratar, 56: Agua..... 38

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1:</b> Aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> (n = 23) y número de bioensayos (dos repeticiones por aislamiento) en que fueron evaluados con respecto a su patogenicidad al áfido café de los cítricos, <i>Aphis citricidus</i> . En rojo se representan los bioensayos que obtuvieron una mortalidad alta en el control mayor al 80%, en celeste los que obtuvieron una mortalidad moderada en el control (entre 50-80%).....	22
<b>Cuadro 2:</b> Diferencias significativas en la mortalidad del áfido café de los cítricos ( <i>Aphis citricidus</i> ) entre tratamientos (15 aislamientos de <i>B. bassiana</i> y el tratamiento control)....	25
<b>Cuadro 3:</b> Comparaciones del efecto de cuatro aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> y un control sobre la mortalidad (muertos/total de individuos) de <i>Aphis citricidus</i> . Probabilidades obtenidas de la prueba exacta de Fisher con un $\alpha=0,005$ según corrección de Bonferroni.....	27
<b>Cuadro 4:</b> Razón de posibilidades (OR: “odds ratio”) e intervalos de confianza (99,5% con corrección de Bonferroni) para cada comparación de mortalidad producida sobre <i>Aphis citricidus</i> entre tratamientos con <i>Beauveria bassiana</i> o control.....	29
<b>Cuadro 5:</b> Resumen (número de amplificaciones positivas / total de muestras) de los resultados satisfactorios de PCR según Landa <i>et al.</i> (2013) para la detección de <i>B. bassiana</i> a partir de cadáveres del áfido café de los cítricos.....	39

## Índice de anexos

<b>Anexo 1:</b> Datos disponibles sobre sitio de recolección, orden y especie de la que fue recolectada, cultivo y país de los aislamientos utilizados en esta investigación.....	63
<b>Anexo 2:</b> Detección de <i>Beauveria bassiana</i> mediante PCR (Landa <i>et al.</i> , 2013) en cadáveres de <i>Aphis citricidus</i> provenientes de bioensayos donde los áfidos se expusieron a cuatro aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> o a tratamiento control.....	65
<b>Anexo 3:</b> Áfidos muertos, cadáveres con micelio visible a la hora de la recolección y cadáveres con micelio visible luego de siete días en cámara húmeda obtenidos luego de seis bioensayos realizados utilizando 15 aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Aphis citricidus</i> .....	67
<b>Anexo 4:</b> Áfidos muertos, cadáveres con micelio visible a la hora de la recolección y cadáveres con micelio visible luego de siete días en cámara húmeda obtenidos luego de cuatro bioensayos según el tratamiento de <i>Beauveria bassiana</i> utilizado sobre <i>Aphis citricidus</i> .....	68

## Resumen

El comercio de los cítricos es de gran importancia mundial. Sin embargo, gran cantidad de insectos pueden afectar estas plantas incluidos los áfidos. Entre las especies de áfidos más peligrosos para los cítricos se encuentra *Aphis citricidus*, ya que transmite eficazmente el *Citrus tristeza virus*. Actualmente, la utilización de hongos como agentes de control de plagas es cada vez mayor, ya que éstos representan una alternativa al uso de agroquímicos. *Beauveria bassiana* ha sido ampliamente utilizado con resultados positivos en varias especies de insectos plaga, incluido algún tipo de control sobre las poblaciones de otras especies de áfidos. Existe una colección de muestras de este hongo en la Universidad Nacional (UNA); sin embargo muchas de estas han sido donadas con poca o ninguna información de su procedencia o sustrato sobre el que se encontraban al ser recolectados. El objetivo general de esta investigación fue evaluar el potencial patogénico de aislamientos de *B. bassiana* de la colección de la UNA como agente de control biológico de *A. citricidus*.

Para poder determinar el potencial patogénico de *B. bassiana* se realizaron bioensayos para un total de 23 aislamientos; sin embargo para ocho bioensayos, los tratamientos control contaron con mortalidades demasiado altas por lo que no se utilizaron para los análisis. Se observó una variabilidad muy alta en la mortalidad producida por los 15 aislamientos analizados, algunos aislamientos produjeron una mortalidad del 100% o cercana, mientras otras causaron mortalidades similares a los valores observados en las placas control. Posteriormente, se realizaron otra serie de bioensayos con solamente cuatro aislamientos donde se observó que el aislamiento BV-ECA15 produjo las mortalidades más altas, con probabilidad de producir la muerte de un áfido entre el doble y cuatro veces mayor que los otros.

Con el fin de asociar la muerte de los áfidos con la aplicación del hongo de interés (presencia del hongo en el cadáver) y no por otros factores, se utilizaron dos protocolos de PCR descritos en la literatura como específicos para la detección de *B. bassiana*. Sin embargo, uno de los protocolos no presentó amplificaciones aunque se cambiaron las condiciones de PCR. Con el segundo protocolo se logró amplificar consistentemente tres de

los aislamientos utilizados en la segunda ronda de bioensayos, mientras que otro aislamiento no amplificó en todas las repeticiones.

Los aislamientos de *B. bassiana* utilizados presentaron una alta variabilidad en su capacidad patogénica contra *A. citricidus*; dicha variabilidad puede deberse a diversos factores incluyendo variables ambientales, características intrínsecas tanto de cada aislamiento como del áfido de interés. Los protocolos de PCR utilizados resultaron ineficientes para la amplificación de las muestras de *B. bassiana* utilizadas en esta investigación. Se destaca la importancia de estudiar las colecciones de hongos ya que algunas de los aislamientos podrían ser de gran potencial para controlar de manera amigable con el ambiente varias especies de insectos plaga.

## 1. Introducción

Según la FAO, para el año 2010 habían aproximadamente 8.7 millones de hectáreas de cítricos sembradas a nivel mundial, para una producción cercana a los 122 millones de toneladas (FAO, 2010 en El-Otmani & Ait-Oubahou 2011). Existen tres géneros de cítricos de importancia comercial, *Poncirus*, *Fortunella* y *Citrus*, aunque en el último se incluyen las especies más cultivadas (Agustí 2000). China, Brasil y Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) son los tres mayores productores (FAO 2010 en El-Otmani & Ait-Oubahou 2011). Aunque Costa Rica tiene una baja representación en relación a la producción de cítricos a nivel mundial, se observa un crecimiento de producción en el país (Quirós-Arias 2005).

Los cítricos tienen varios problemas fitosanitarios importantes, los cuales incluyen virus, bacterias, nematodos, moluscos e insectos. Dentro de los insectos nocivos de mayor importancia económica se encuentran especies de moscas de la fruta (Tephritidae: Diptera), termitas (Blattodea), thrips (Thripidae), áfidos (Aphididae) y minadores de hojas (Lepidoptera) (El-Otmani & Ait-Oubahou 2011).

Los áfidos son insectos de cuerpo blando, los cuales se alimentan de sustancias transportadas por el floema de las plantas (Voegtlin *et al.* 2003). En las zonas templadas, son muy abundantes y con ciclos de vida complejos; mientras que en los trópicos, no se da la reproducción sexual, por lo que las poblaciones se conforman solamente por hembras partenogénicas (Agustí 2000; Voegtlin *et al.* 2003).

La presencia de estos insectos en una planta puede tener consecuencias directas e indirectas sobre la fisiología de ésta. Entre las consecuencias directas está el debilitamiento de la planta por la cantidad de savia del floema extraída (Agustí 2000). También pueden provocar daño físico y disminuir la capacidad fotosintética al provocar enrollamiento de la hoja o clorosis (Rafi *et al.* 1997). Entre las consecuencias indirectas se encuentra la presencia de fumagina, la cual es un crecimiento de hongo negro que puede bloquear la luz del sol e interferir con la fotosíntesis. La fumagina se forma sobre las excreciones azucaradas de los áfidos, siendo más grave cuando las poblaciones de estos insectos son muy altas (Liu & Sparks 2001). Otra consecuencia indirecta es la transmisión de virus de plantas (Agustí 2000).

Dentro de las especies de áfidos de mayor importancia económica para el cultivo de los cítricos se encuentra *Aphis citricidus* (Michaud 1998; Lagos *et al.* 2014), conocido como el áfido café de los cítricos. Se trata de una especie originaria de Asia aunque en la actualidad es prácticamente cosmopolita (Voegtlin *et al.* 2003). El factor más importante a considerar en *A. citricidus* es su habilidad de transmitir muy eficientemente el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), el cual ha provocado la pérdida de millones de árboles de cítricos y durante la década de 1930 causó una severa epidemia en Suramérica (Voegtlin & Villalobos 1992; Voegtlin *et al.* 2003; Rodríguez-Leyva & Lomelí-Flores 2013). En Costa Rica, los cultivos de naranja presentan aumentos rápidos en la presencia del CTV, más lento en toronja y aún menor en cultivos de limón (Gottwald *et al.* 2002). En dicho estudio también se observó que *A. citricidus* presenta una gran habilidad para transmitir el virus a grandes distancias (incluso 4,6 Km).

Tradicionalmente, *A. citricidus* se ha controlado utilizando plaguicidas, que según permisos de uso por país, cultivo y desarrollo de nuevas moléculas pueden variar de una región a otra. Entre los productos que menciona la literatura están abamectina, acetamiprida, malatión o diazinón, fluvalinato, pirimicarb, carbosulfan, y acefato (Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola 1991; Agustí 2000; El-Otmani & Ait-Oubahou 2011). Sin embargo, el uso de biocontroladores está en aumento por dos razones: primero, las preocupaciones por las consecuencias de los agroquímicos en el ambiente y la salud humana. En segundo lugar, debido a las demandas de productos orgánicos de los mercados importadores de cítricos, especialmente de Europa y Estados Unidos (Quirós-Arias 2005).

Actualmente, la utilización de hongos como agentes de control de plagas es cada vez mayor, ya que son controladores naturales de las poblaciones de insectos, por lo que representan una alternativa al uso de agroquímicos (Chase *et al.* 1986, Güerri-Agulló *et al.* 2011). La ventaja del uso de hongos entomopatógenos es que, además de matar el organismo plaga directamente, también se propagan por las fructificaciones de esporas que se dan en los cadáveres micotizados (Kim *et al.* 2013). Los agentes de biocontrol más utilizados se basan en las especies *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (Vega *et al.* 2012).

La Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) condujo un rescate de colecciones de hongos entomopatógenos realizadas por otras instituciones en Costa Rica en las décadas de 1980 y 1990. Actualmente, en la UNA cuentan con una colección de aislamientos de *B. bassiana*, de la cual se tienen pocos datos del lugar de procedencia y otros datos importantes de la colecta (Anexo 1). Esta investigación tiene como objetivo determinar la patogenicidad de algunos de esos aislamientos contra *A. citricidus* como un primer paso para ser utilizados en un control de este áfido de una manera más amigable con el ambiente.

## 2. Antecedentes

### 2.1. *Aphis citricidus*

Dentro de las especies de áfidos de mayor importancia económica para el cultivo de los cítricos se encuentra *Aphis citricidus*. Este áfido es conocido popularmente como el áfido café de los cítricos. Este insecto pertenece al Orden Hemiptera, Suborden Sternorrhyncha, Superfamilia Aphidoidea, Familia Aphididae (Blackman & Eastop 2000; Rodríguez-Leyva & Lomelí-Flores 2013). Este áfido se consideraba del género *Toxoptera*; sin embargo, reciente evidencia molecular lo coloca como un subgénero dentro del género *Aphis* (Lagos *et al.* 2014).

Se trata de una especie originaria de Asia aunque en la actualidad es prácticamente cosmopolita, ya que es conocida en África, Australia, Nueva Zelanda, India, Madagascar, en ciertas regiones del Mediterráneo, y a lo largo de las Américas (Blackman & Eastop 2000; Voegtlin *et al.* 2003, Zamora-Mejías *et al.* 2011). Se cree que esta especie se dispersó accidentalmente por medio del movimiento de sus plantas hospederas, debido a la producción e importación masiva de cítricos. Posteriormente, se dispersó de cultivo en cultivo en cada región (Michaud 1998).

Las poblaciones existentes en Costa Rica presentan un ciclo de vida anholocíclico (Michaud 1998, Voegtlin *et al.* 2003, Rodríguez-Leyva & Lomelí-Flores 2013); es decir, no presentan generaciones sexuales. Así, las poblaciones están conformadas únicamente por hembras partenogénicas. El ciclo de vida inicia con el nacimiento de ninfas y las colonias se originan principalmente de una hembra alada en brotes inmaduros de sus plantas hospederas (Rodríguez-Leyva & Lomelí-Flores 2013).

La duración del ciclo de vida de los áfidos depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre un individuo en específico (Rodríguez-Leyva & Lomelí-Flores 2013). En condiciones óptimas, su desarrollo se completa entre 6 y 8 días, aunque se puede extender hasta los 21 días (máximo de 30 generaciones por año). En promedio, una hembra puede generar hasta 20 ninfas en 4 o 5 días y cada individuo pasa por cuatro estadios ninfales para alcanzar la madurez (Michaud 1998; Rodríguez-Leyva & Lomelí-Flores 2013).

### 2.1.1. Ámbito de hospederos

Tanto las ninfas como los adultos se alimentan principalmente de hojas tiernas del género *Citrus*, aunque existen reportes de su capacidad para colonizar ciertos géneros de la familia Rutaceae (Michaud 1998). Normalmente, plantas de otras familias no son hospederas adecuadas para este áfido pero pueden ser colonizadas si no hay follaje de cítricos disponible (EPPO 2006).

### 2.1.2. Control

Tradicionalmente, *A. citricidus* se controla utilizando plaguicidas (Agustí 2000; Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola 1991; El-Otmani & Ait-Oubahou 2011). Sin embargo, el uso de biocontroladores está en aumento debido a, primero, las preocupaciones por las consecuencias de los agroquímicos en el ambiente y la salud humana. En segundo lugar, por las demandas de productos orgánicos de los mercados importadores de cítricos, especialmente de Europa y Estados Unidos (Quirós-Arias 2005). Existen algunas experiencias de control biológico para este áfido, ya sea utilizando depredadores (Michaud 2001; Wang & Tsai 2001), parasitoides (Persad *et al.* 2007; Coceo *et al.* 2009), hongos (Hunter *et al.* 2011) así como el uso combinado de parasitoides y hongos (Pick *et al.* 2012).

### 2.1.3. *Aphis citricidus* en Costa Rica

Los estudios de *A. citricidus* en Costa Rica son relativamente escasos. Se confirma su presencia en el país desde 1991 (Voegtlin & Villalobos 1992). En un estudio de la distribución del CTV en el país, se determinó que este áfido contribuye eficientemente a la transmisión en larga distancia del CTV en Costa Rica (Gottwald *et al.* 2002). Posteriormente, un estudio realizado por Zamora-Mejías *et al.* (2012), en que se realizaron colectas en muchas regiones del país, lo identifica como uno de los cinco áfidos más comunes de Costa Rica. Dicho estudio indica que sus poblaciones son extensas y estables en el país. Su nombre también aparece en dos estudios sobre la fauna de parasitoides de los áfidos presentes en el país en general (Zamora-Mejías *et al.* 2010) y otro sobre el complejo de parasitoides de *A. citricidus* en específico (Zamora-Mejías *et al.* 2011).

## 2.2. Hongos entomopatógenos

Los primeros microorganismos identificados como causantes de enfermedades en insectos fueron los hongos debido a que era posible observar su crecimiento sobre el cuerpo de éstos (Góngora-Botero *et al.* 2009). Actualmente, la utilización de hongos como agentes de control de plagas es cada vez mayor. Éstos representan una alternativa al uso de agroquímicos; por lo que se ha hecho un esfuerzo por encontrar pesticidas naturales, comúnmente denominados micopesticidas (Chase *et al.* 1986). Además, los hongos entomopatógenos son controladores naturales de poblaciones de insectos (Güerri-Agulló *et al.* 2011).

Una característica importante de los hongos entomopatógenos es que, a diferencia de bacterias y virus, pueden ingresar al organismo de un insecto a través de los espiráculos y especialmente a través de la cutícula. Esto le permite infectar insectos independientemente de su modo de alimentación, ya que el insecto no requiere ingerir al patógeno (Bustillo-Pardey 2003). Otra ventaja del uso de micopesticidas es que, además de matar el organismo plaga directamente, también se propagan por las fructificaciones de esporas que se dan en los cadáveres micotizados (Kim *et al.* 2013). Los hongos entomopatógenos más utilizados como micopesticidas pertenecen a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* (Bustillo-Pardey 2003; van Driesche *et al.* 2007).

Aunque existe mucha variación en el modo de infección de hongos, en general presentan la siguiente secuencia: la invasión inicia cuando las esporas entran en contacto con la cutícula del insecto y se adhieren a ella. Una vez adherida, la espora germina formando un tubo germinal, el cual penetra la cutícula mediante fuerzas mecánicas y enzimas digestivas que la degradan. Una vez que las hifas llegan al hemocele, el hongo se reproduce rápidamente, ya sea como hifas o como cuerpos similares a levaduras (Bustillo-Pardey 2003b, van Driesche *et al.* 2007). Posterior a la muerte del insecto, los hongos crecen como saprófitos dentro del cadáver y forman un micelio de gran extensión; los conidióforos surgen del cuerpo del insecto bajo las condiciones ambientales apropiadas de humedad y temperatura, y producen los conidios (van Driesche *et al.* 2007).

### 2.2.1. *Beauveria bassiana*

En los últimos años han ocurrido grandes cambios en la taxonomía dentro del Reino Fungi. Actualmente, *B. bassiana* pertenece al Filo Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales (Vega *et al.* 2012). Éste está compuesto por siete familias monofiléticas, en tres de las cuales hay especies capaces de infectar insectos: Clavicipitaceae s.s., Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae (Spatafora *et al.* 2007, Sung *et al.* 2007). La especie *B. bassiana* es anamórfica (asexual o conídica) y se clasifica dentro de la familia Cordycipitaceae. Su teleomorfo (sexual) es *Cordyceps bassiana* (Sung *et al.* 2007).

*Beauveria bassiana* posee una gran cantidad de hospederos, se le ha encontrado atacando unas 700 especies de insectos y, actualmente, es la especie de entomopatógeno comercialmente más utilizada alrededor del mundo (Góngora-Botero *et al.* 2009; Peteira *et al.* 2011). Ha sido utilizado para controlar varios tipos de plagas, incluyendo holometábolos como coleópteros (Tafoya *et al.* 2004, Güerri-Agulló *et al.* 2011) y lepidópteros (Knutson & Gilstrap 1990; Lonzano-Gutiérrez & España-Luna 2008; Wraight *et al.* 2010); así como hemimetábolos, como los “chinchas” (Krueger *et al.* 1996, Reinert *et al.* 1999), thrips (Castineiras *et al.* 1996; Ludwig & Oetting 2002) y áfidos (Akbari *et al.* 2014; Castillo-Lopez *et al.* 2014). Se ha utilizado contra plagas de gran importancia económica como la mosca blanca de hoja plateada (*Bemisia argentifolii*) (Wraight *et al.* 2000) y la broca del café (Bustillo-Pardey 2003a; Góngora-Botero *et al.* 2009). Incluso se ha utilizado en otros artrópodos difíciles de controlar como las garrapatas (Kirkland *et al.* 2004).

La literatura sobre investigaciones en las que se haya utilizado *B. bassiana* para control de áfidos es muy escasa. Hernández-Torres *et al.* (2006) realizaron experimentos en condiciones de vivero en donde utilizaron dicho hongo (entre otras especies de hongos entomopatógenos) contra *A. citricidus*. En ese caso solamente se utilizó una cepa de *B. bassiana*, la cual presentó el menor promedio de mortalidad (49%) de todas los aislamientos de hongos evaluados.

En otra investigación realizada en Vietnam (Loc *et al.* 2010), se obtuvieron 16 aislamientos de *B. bassiana* (también aislaron *M. anisopliae*) de dos regiones del país. Se evaluó su patogenicidad sobre dos plagas importantes de cítricos (*Aphis* sp. y *Diaphorina citri*) mediante bioensayos con suspensiones de  $10^7$  conidios/ml. Basándose en esos

resultados escogieron 10 para más estudios, y de éstos luego seleccionaron dos para pruebas en invernadero. Se menciona que obtuvieron una patogenicidad catalogada como buena (70-77% de mortalidad), por lo que produjeron bioinsecticidas con esos aislamientos y fueron probados en invernadero. Posteriormente, solo uno fue probado en el campo generando mortalidades similares, 71,7 y 76,6% a los 7 y a los 10 días de realizada la aplicación, respectivamente.

Otros dos ejemplos del control de áfidos, por medio de este hongo son relativamente recientes. Akbari *et al.* (2014) probaron diferentes concentraciones de una cepa de *B. bassiana* contra *Brevicoryne brassicae* y observaron que la mortalidad se relacionó positivamente con la concentración de esporas utilizada. Ésta varió de un 54% a un 83% al utilizar una concentración de  $10^3$  conidios/ml o  $10^7$  conidios/ml, respectivamente. Rashki & Shirvani (2013) obtuvieron resultados similares al utilizar una cepa de *B. bassiana* contra *Aphis gossypii*. En este caso al aumentar la concentración de esporas también aumentó la mortalidad, en adición se detectó una disminución en el ritmo de reproducción del áfido conforme aumentó la concentración de esporas del hongo.

#### 2.2.1.1. Estado de la situación en Costa Rica

En el país se ha evaluado el uso de *B. bassiana* junto con *Metarhizium anisopliae* para controlar al picudo de la caña de azúcar (*Metamasius hemipterus*, Curculionidae). Los resultados en el laboratorio indicaron que la dosis de  $1 \times 10^{11}$  de ambos hongos disminuyeron la población de dicho coleóptero (Badilla *et al.* 1993). También se estudió dicho hongo para el control de una cochinilla en fruto de la piña en San Carlos. Sin embargo, los resultados no fueron prometedores, ya que el hongo no produjo una mortalidad importante en campo (Miranda-Vindas & Blanco-Metzler 2013). En otro estudio, se utilizaron varias cepas de *B. bassiana* contra la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*, Tephritidae) en condiciones de laboratorio, así como si su eficiencia se veía disminuida con la presencia de insecticidas; en dicha investigación se recomiendan varias cepas para ser probadas en campo contra esta mosca plaga de frutos (Porras & Lecuona 2008).

Actualmente, la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA) utiliza el control biológico dentro de sus programas de control de plagas. Ellos logran el control de

varios insectos plaga de la caña de azúcar de manera exitosa con el uso de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, producidos por ellos mismos. Entre las plagas controladas se encuentran salivazos (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* sp., Cercopidae), la cigarrita antillana (*Saccharosydne saccharivora*, Delphacidae) y la chinche de encaje (*Leptodyctya tabida*, Tingidae) (Salazar-Blanco 2010).

#### 2.2.2. Bioensayos *in vitro* para evaluar la patogenicidad de hongo entomopatógenos en áfidos

Existen varios métodos para evaluar la patogenicidad de hongos entomopatógenos contra áfidos. Se utiliza el método de hojas cortadas de la planta, esterilizadas y colocadas en placas de petri (el control 0,05% de Tween 80) y los áfidos son sumergidos en varias soluciones a diferentes concentraciones de conidios del hongo para observar la LC<sub>50</sub> y LC<sub>95</sub> (LC = “lethal concentration”, dosis que logra matar ya sea el 50% o el 95% de la muestra, Akbari *et al.* 2014).

Otra forma de poner en contacto el hongo con el insecto es rociando las esporas directamente empleando rociadores (“spray”) automáticos que permiten conocer el volumen exacto que se está colocando. Shapiro-Ilan *et al.* (2008) y Jandricic *et al.* (2014) rociaron áfidos alados colocados en discos de hojas sobre placas Petri con agar-agua. Loc *et al.* (2010) también utilizaron este método pero rociaron la solución con esporas del hongo sobre brotes de cítricos colocados dentro de recipientes cubiertos con muselina, mientras que Aqueel & Leather (2012) también rociaron la disolución con esporas pero directamente sobre la planta en la que se encontraban los áfidos.

También se utilizan en bioensayos filtrados de los cultivos del hongo entomopatógeno para evaluar los efectos de sus metabolitos secundarios, así se evita los efectos de las variables ambientales sobre los conidios. De un total de 47 filtrados evaluados de varias especies de hongos, un aislamiento de *B. bassiana* mostró la mayor mortalidad (78-100%) (Kim *et al.* 2013).

#### 2.4. Herramientas moleculares para la detección de hongos entomopatógenos

En muchas de las investigaciones en las que se evalúa el efecto de hongos biocontroladores contra algún insecto, se recolectan los cadáveres de los individuos tratados

para realizar una confirmación visual del crecimiento del hongo y corroborar que la mortalidad observada se dio por la acción del hongo (Shapiro-Ilan *et al.* 2008, Tafoya *et al.* 2004). Sin embargo, también se han utilizado técnicas moleculares para la detección por medio de imprimadores específicos para cada especie o género de hongo (Díaz *et al.* 2008, Ownley *et al.* 2008), los cuales permiten detectar el ADN de interés dentro de una mezcla de ADN (del hospedero).

Para la detección de estos hongos se han utilizado en su mayoría imprimadores que permiten amplificar las secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS-5.8-ITS2) del ARN ribosomal nuclear. Éstos poseen varias ventajas, como el hecho de que presentan unidades repetidas y además evolucionan rápido, por lo que pueden presentar variaciones entre géneros, especies e incluso poblaciones (White *et al.* 1990).

En el caso de *B. bassiana*, se han desarrollado varios protocolos específicos para su detección; la mayoría basados en la región ITS (Landa *et al.* 2013, Griffin 2007, Quesada-Moraga *et al.* 2006). También se han desarrollado SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”) específicos derivados de regiones amplificadas aleatoriamente (RAPD) (Castrillo *et al.* 2003).

### 3. Justificación

El comercio de los cítricos es de gran importancia mundial. Hay millones de hectáreas sembradas con dichas plantas, lo que representa más de 135 millones de toneladas de producción (FAO 2016). Sin embargo, un factor relevante es que dichas plantas presentan gran diversidad de insectos plagas incluidos, los áfidos. Entre las especies de áfidos más peligrosos para los cítricos se encuentra *A. citricidus*, ya que transmite eficazmente el *Citrus tristeza virus*. Este virus causa una de las enfermedades más importantes que afectan los cultivos de cítricos, pues puede ocasionar la muerte de variedades susceptibles, como la naranja agria (El-Otmani & Ait-Oubahou 2011). Los estudios sobre *A. citricidus* en Costa Rica son relativamente escasos (Voegtlin & Villalobos 1992, Gottwald *et al.* 2002, Zamora-Mejías *et al.* 2010, 2011, 2012) y en general, ninguno trata sobre su posible control con métodos amigables con el ambiente. Los estudios en esta área son necesarios para ejercer un control eficaz de esta plaga y que sea responsable con el ambiente. Además, esta necesidad cobra mayor importancia por el potencial incremento de las poblaciones de insectos plaga y de la transmisión de virus de plantas como consecuencia del cambio climático (Canto *et al.* 2009, Jones & Berbetti 2012, Pautasso *et al.* 2012). Así el patosistema áfido-cítricos es un buen modelo para analizar una primera evaluación de patogenicidad hacia áfidos por parte de hongos entomopatógenos. Los resultados son válidos para entender la biología y caracterizar hongos pero también pueden tener una aplicación en campo sobre un problema de las plantaciones de cítricos.

*Beauveria bassiana* ha sido ampliamente utilizado con resultados positivos en varias especies de insectos plaga, incluido algún tipo de control sobre las poblaciones de especies de áfidos (Akbari *et al.* 2014, Castillo-López *et al.* 2014). No obstante, los estudios con *A. citricidus* son escasos (Hernández-Torres *et al.* 2006). Debido a la existencia de una colección de aislamientos de este hongo en la UNA, con muy poca información del lugar y condiciones de colecta es que el presente trabajo pretende analizar los efectos de aislamientos de este hongo entomopatógeno como agente de control biológico sobre el áfido café de los cítricos.

### Objetivo general

Evaluar el potencial patogénico de 15 aislamientos de *Beauveria bassiana* como agente de control biológico de *Aphis citricidus* (Hemiptera: Aphididae).

### Objetivos específicos

- a. Categorizar *in vitro* la patogenicidad de 15 aislamientos de *B. bassiana* sobre *A. citricidus*.
- b. Determinar *in vitro* la patogenicidad de cuatro aislamientos de *B. bassiana* sobre el áfido café de los cítricos.
- c. Estandarizar un método de PCR para la detección del hongo entomopatógeno a partir de un sólo áfido parasitado.

#### 4. Materiales y métodos

##### 4.1. Aspectos generales

- Colonia de *Aphis citricidus*

Se estableció una colonia monoclonal de *A. citricidus* en plantas de naranja (*Citrus sinensis* var. Valencia Roja injertada sobre Flying Dragon) en el invernadero del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica. La identidad de la especie fue establecida previamente por métodos morfológicos y por secuenciación y comparación en GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) de la secuencia de la subunidad C del gen de la citocromo oxidasa mitocondrial (COX I). Para los experimentos se utilizaron solamente ninfas de segundo o tercer instar, el uso de solo este estadio se debió a las disponibilidades de la colonia.

- Aislamientos de *Beauveria bassiana sensu lato*

Se utilizaron aislamientos de la colección de la Escuela de Ciencias Agrarias de Universidad Nacional (UNA, Heredia, Costa Rica), conformada por donaciones de fuentes públicas y privadas. Se tiene poca información sobre la procedencia de estos aislamientos (Anexo 1). En la UNA, los aislamientos se conservan en aceite mineral, una muestra de éstos se revivió en agar-agua y se cultivaron en medio papa-dextrosa-agar (PDA). Para cada aislamiento se obtuvo un cultivo monoespórico, estos cultivos se emplearon para producir inóculo de los hongos sobre arroz. En breve, el protocolo de producción de inóculo consiste en utilizar las placas de cultivo monoespórico y traspasarlo en botellas de cultivo de 1 litro con 200 gramos de arroz precocido, en dos semanas, se utilizan 20 ml de dicha suspensión para inocular bolsas de plástico con la cantidad de arroz que se desee (50, 100, 400 gramos, etc). El último paso es incubar las bolsas por aproximadamente 15 días a 24-26°C (Rodríguez & Sáenz 1999).

4.2. Ensayos de patogenicidad *in vitro* de 15 aislamientos de *B. bassiana* sobre el áfido café de los cítricos.

- A. Generalidades: los ensayos de patogenicidad se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica. Los hongos debidamente identificados se recibieron en bolsas de arroz inoculado.
- B. Desinfección y preparación de hojas de cítrico: se recolectaron mínimo 20 hojas de naranja, aproximadamente de la misma edad, presentes en los alrededores del invernadero del CIBCM. Para eliminar posibles esporas de hongos y otros organismos que las hojas pueden tener en la filósfera, se lavaron con una solución de jabón en polvo y abundante agua. Seguidamente, se remojaron en cloro comercial al 1% durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada para remover rastros de cloro. Luego se secaron con papel toalla y se cortó la parte distal de la lámina foliar para que quedaran de un tamaño semejante, dejando siempre el pecíolo y la parte basal de lámina foliar. Para realizar los cortes se utilizaron tijeras previamente desinfectadas con alcohol al 70%.
- C. Recolección de áfidos: se recolectaron áfidos aleatoriamente (del estadio de interés) utilizando un pincel fino ligeramente humedecido. Todos los áfidos necesarios para el bioensayo se colectaron previo a cualquier contacto con los aislamientos de hongo para evitar contaminar la colonia. Los áfidos se transportaron al laboratorio en un recipiente de plástico con papel toalla húmedo y hojas de cítrico previamente desinfectadas.
- D. Preparación del inóculo de hongo: diez gramos del arroz inoculado por cada cepa se agitaron durante 10 minutos con pastilla magnética en un beaker con 100 mL de agua destilada autoclavada con el dispersante Tween 20 (al 0,02%). De esta suspensión se tomaron 30  $\mu$ L con una micropipeta (Eppendorf, Alemania) y se contó la cantidad de esporas utilizando un hemacitómetro o cámara de Neubauer (Boeco, Alemania). Se contó el número de esporas en los cuadrantes de las cuatro esquinas y el central (French & Hebert 1980). La concentración de esporas elegida para este proyecto fue de  $10^7$  esporas por ml. Si se excedía de dicha concentración se realizaron diluciones hasta obtener la concentración deseada. La concentración de esporas se obtuvo multiplicando el promedio de esporas de los 5 cuadrantes por el inverso de la disolución empleada por

el inverso del volumen de un cuadrante ( $4 \times 10^{-6}$  ml). Como control se utilizó una disolución de agua destilada con Tween 20 al 0,02%.

- E. Preparación de unidades experimentales: las hojas de naranja limpias se sumergieron por 10 segundos en la disolución de esporas, se escurrió el exceso de solución por 20 segundos y se depositaron, con el haz de la hoja expuesto, en placas Petri. Sobre las hojas de naranja se colocaron 10 áfidos escogidos aleatoriamente de los recolectados del invernadero. Una vez que se colocaron todos los áfidos, se humedeció el papel filtro con 1 ml de agua destilada estéril para mantener la humedad de la placa. El día 2 y/o 3 del experimento se colocó 1mL extra en cada placa para reponer el agua evaporada y mantener la humedad dentro de cada placa.

Para proteger los áfidos de algún depredador o evitar el escape de algún áfido, las placas se colocaron dentro de un envase de plástico previamente desinfectado con cloro comercial al 10% por mínimo 10 minutos, se removió el cloro con agua y se dejaron secar al aire antes de ser utilizadas. Las placas se colocaron dentro de uno de los laboratorios del CIBCM donde no recibieron luz solar directa y bajo condiciones ambientales de fotoperiodo, humedad y temperatura naturales del laboratorio.

- F. Toma de datos y recolecta de áfidos muertos: la duración de cada bioensayo fue de siete días, el día del inicio del bioensayo se contó como el día 0, las mediciones se realizaron los días dos, tres y siete. Se contaron los áfidos vivos de manera acumulativa y los áfidos muertos fueron contabilizados y recolectados en cada día en específico. Cada áfido muerto se recolectó con un pincel fino específico para cada tratamiento o control y se colocó en un tubo de microcentrífuga (1.5ml) autoclavado con un trozo de papel filtro ligeramente humedecido con agua destilada estéril. Cada tubo de microcentrífuga se rotuló con el tratamiento, repetición y día de recolección (ej. aislamiento BV-ECA13, placa II, día 2).

Los cadáveres recolectados los días 2 y 3 del experimento se mantuvieron en refrigeración para detener el crecimiento del hongo. El día siete todos se colocaron bajo condiciones ambientales para promover el crecimiento del hongo. El día 14 luego de iniciado el bioensayo (siete días después de concluido el experimento), se observaron al estereoscopio todos los cadáveres y se anotó cuáles de los áfidos muertos contaban con micelio visible o no. Es decir, se contó con tres mediciones: la cantidad de áfidos

muertos totales, los cadáveres con micelio visible recolectados en el momento de realizar los conteos y los cadáveres con micelio visible luego de siete días en cámara húmeda.

Se contó con un datalogger modelo 42270 (Extech Instruments, EEUU) el cual registró las mediciones de temperatura y humedad relativa cada tres horas. Este se colocó dentro de un envase de plástico igual al utilizado para las placas de Petri para que se encontrara bajo las mismas condiciones que las placas tratamiento.

Para esta sección se realizaron dos placas por aislamiento de *B. bassiana* y únicamente dos repeticiones en el tiempo. Además, no todos los aislamientos se compararon en el mismo experimento (Cuadro 1).

#### 4.3. Ensayos de patogenicidad *in vitro* de cuatro aislamientos de *B. bassiana* sobre el áfido café de los cítricos.

Para esta sección el protocolo del manejo de los tratamientos y áfidos se mantiene, la diferencia consiste en que se contó con tres placas (unidades experimentales) por tratamiento (aislamiento de *B. bassiana* o control) y seis repeticiones en el tiempo. Los cadáveres de tres de esas repeticiones se utilizaron para realizar una confirmación molecular mediante PCR de la presencia de *B. bassiana* a partir de un solo áfido.

#### 4.4. Detección de *B. bassiana* a partir de un solo áfido.

##### 4.4.1. Extracción de ADN

Se probaron tres protocolos para la extracción del ADN de cadáveres de áfidos que fueron tratados con *B. bassiana* en un bioensayo preliminar. Tres cadáveres con micelio visible sobre el cuerpo y tres sin micelio visible. Los tres protocolos utilizados fueron el kit NucleoSpinTissue (Macherey-Nagel), Kit Blood & Tissue (Qiagen) y el protocolo de extracción realizado por Hoyos-Carvajal *et al.* (2008). Los ADNs extraídos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5% y cuantificados en el Nanodrop (ThermoScientific, Estados Unidos) para evaluar la calidad y realizar una cuantificación de los ácidos nucleicos totales. Se decidió utilizar el kit de NucleoSpinTissue para los cadáveres resultantes de los bioensayos posteriores. Todas las extracciones de ADN fueron cuantificadas con Nanodrop (ThermoScientific, Estados Unidos).

#### 4.4.2. PCR para la detección de *B. bassiana*

Se probaron dos métodos para lograr la detección del hongo entomopatógeno a partir de un solo individuo. El primero de ellos fue el PCR anidado descrito por Landa *et al.* (2013) con una modificación, se utilizó el ITS5 en lugar del ITS1-F para la primera ronda de amplificación. Según White *et al.* (1990) estos imprimadores incluyen las mismas regiones por lo que no debió afectar el protocolo descrito. El otro método que se probó fue el uso de marcadores SCAR utilizando el procedimiento de PCR múltiple descrito en Castrillo *et al.* (2003). La segunda ronda de PCR se realizó tal y como se describe en Landa *et al.* (2013).

Ambos PCRs se realizaron en el CIBCM y consistieron de una mezcla de reacción de 12,5  $\mu$ l de DreamTaq Master Mix (ThermoScientific, Estados Unidos), 0,5 $\mu$ l de cada primer (concentración final de 0,2  $\mu$ M), 8,5  $\mu$ l de agua y 3 $\mu$ l de ADN (entre 0.1-4.3 ng/ $\mu$ l), para un volumen final de 25  $\mu$ l. Se utilizaron los termocicladores marca CorbettResearch (Australia) y BioRad (Singapur). La visualización de los resultados de PCR se hizo mediante geles de agarosa al 1.5% corridos por 45 min a 90V y tinción del ADN con GelRed (Biotium, USA; dilución final de 3,3X); o mediante electroforesis capilar (QIAxcel, QIAGEN, Alemania).

En el caso de Landa *et al.* (2013) el perfil térmico para la primera ronda de amplificación con los imprimadores ITS5/ITS4 fue 94°C x 2min; 1 x (94°C x 2min, 55°C x 30s, 72°C x 30s); 10 x (94°C x 30s, 66°C x 30s, 72°C x 1min); 36 x (94°C x 30s, 55°C x 30s, 72°C x 1min); 72°C x 10min. El protocolo para el PCR anidado (segunda ronda, imprimadores internos) fue 95°C x 2min; 35 x (94°C x 1min, 65°C x 1min, 72°C x 1min); 72°C x 5min.

Para el PCR múltiple descrito por Castrillo *et al.* (2003), el perfil térmico de amplificación fue 94°C x 2min; 10 x (94°C x 15s, 63°C x 30s, 72°C x 45s); 15 x (94°C x 15s, 63°C x 30s, 72°C x 45s [5s por ciclo]); 72°C x 7min. Para este PCR se probó un segundo perfil térmico con un gradiente de temperaturas de anillado de 58.4, 59.1, 60.2, 61.2 y 62°C, con el objetivo de mejorar la amplificación.

Para realizar el PCR según Landa *et al.* (2013) en los cadáveres de áfidos provenientes de los bioensayos, se utilizaron únicamente los imprimadores internos. A estas muestras

también se les realizó un PCR para amplificar la región de la subunidad C del gen de la citocromo oxidasa mitocondrial (Footit *et al.* 2013) como un control interno de muestra. El objetivo fue detectar la presencia de ADN del insecto y confirmar de alguna manera que la extracción de ADN fue efectiva y poder distinguir muestras negativas de aquellas donde por una mala extracción (degradación o presencia de inhibidores) no se obtenga amplificación. Así, una reacción de PCR donde no se obtiene amplificación para el protocolo de Landa *et al.* 2013 y para la misma muestra se obtiene amplificación de COX I se considera un resultado negativo válido. Por el contrario, sino se obtiene amplificación para COX I, no se considera una muestra confiable.

#### 4.5. Análisis estadístico

Para el análisis de los bioensayos con cuatro aislamientos se realizaron tablas de contingencia y se analizaron por medio de la prueba exacta de Fisher (Zar 1999) para determinar diferencias significativas en la proporción de áfidos vivos y muertos entre tratamientos. Inicialmente se realizó una comparación general y después comparaciones pareadas entre tratamientos. Por tratarse de comparaciones múltiples se utilizó la corrección de Bonferroni (Armstrong 2014) y se determinó un nivel de confianza del 99.5% para aceptar o rechazar una hipótesis nula. Esta corrección se hace al dividir la probabilidad utilizada de cada comparación (usualmente se utiliza un 95% de confianza, es decir una probabilidad de 0.05) entre el número de comparaciones (10), por lo que la probabilidad utilizada para aceptar o rechazar la hipótesis nula se convierte en 0.005.

Posteriormente, se realizó un Modelo Linear Generalizado (Agresti 2002) y un Wald Test (Agresti 2002) para determinar cuáles tratamientos eran diferentes entre sí. También se hicieron comparaciones múltiples, pero en este caso la forma de aceptar o rechazar la hipótesis nula es por intervalos de confianza y no por probabilidad. Si el intervalo de confianza obtenido incluye el número uno, indica que los tratamientos analizados y comparados son similares y por lo tanto, se interpreta que no hay diferencias significativas entre ellos. Si el intervalo de confianza no incluye al número uno, los tratamientos analizados en dicha comparación son diferentes con un 99.5% de confianza.

Para los bioensayos realizados, con el propósito de categorizar 15 aislamientos se realizó una prueba exacta de Fisher para determinar si los aislamientos se comportaron de

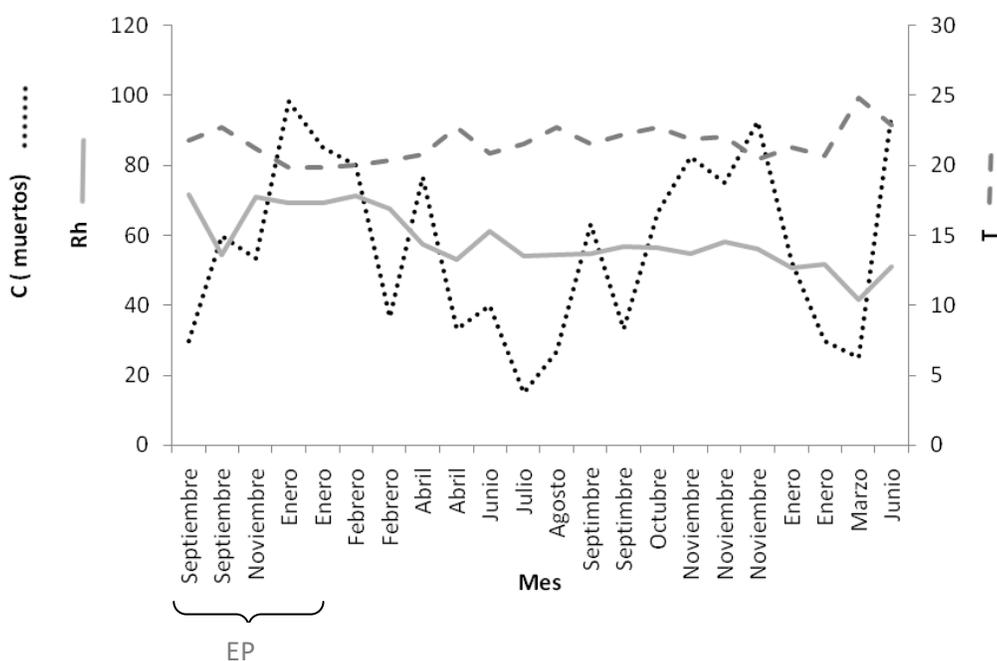
manera diferente a los controles. Posteriormente, se realizó un diseño de Bloques Parcialmente Incompletos (Lawson 2015) para determinar si existieron diferencias entre los aislamientos utilizados. Este método permite analizar los datos de experimentos desbalanceados como éste. Los datos cumplieron con el principio de normalidad pero no con el de homoscedasticidad, para corregirlo se realizó un ANOVA con Modelo Linear de Pesos (Weighted Linear Model) (Lawson 2015). En este caso, aunque se realizaron comparaciones múltiples, no es necesario realizar ninguna corrección ya que el método empleado incluye la corrección de Tukey.

Para esta investigación, la variable respuesta es la mortalidad de los áfidos, la cual se espera que varíe de acuerdo al aislamiento utilizado y el control. Todos los análisis se realizaron en el programa R Studio versión 1.0.153 (Lawson 2015).

## 5. Resultados

### 5.1. Variables ambientales

Para observar si las variables ambientales (temperatura y humedad relativa) tuvieron algún efecto sobre la sobrevivencia de los áfidos en los bioensayos, se analizó solamente el comportamiento de la mortalidad de las placas control de todos los bioensayos (incluidos algunos de los preliminares) contra los promedios de dichas variables ambientales para determinar si se distinguía algún patrón. Sin embargo, no se observó ningún patrón distinguible que indique una relación clara entre las variables de las cuales se tenía información y la mortalidad observada (Fig. 1).



**Fig. 1:** Promedio de humedad relativa, temperatura (°C) y áfidos muertos en las placas control de acuerdo al mes en el cual se realizó cada bioensayo. Se incluye el porcentaje de mortalidad promedio de cada bioensayo realizado y adicionalmente, el dato de cinco ensayos preliminares (EP) realizados.

5.2. Ensayos de patogenicidad *in vitro* de 15 aislamientos de *B. bassiana* sobre el áfido café de los cítricos.

Para categorizar los 23 aislamientos de *B. bassiana*, se realizaron dos repeticiones en el tiempo a lo largo de nueve bioensayos, los cuales se realizaron entre el 2015 y 2016. Sin embargo, para algunos de estos bioensayos se obtuvo mortalidades en los grupos control consideradas arbitrariamente como muy altas (>80%) o moderadas (entre 50-80%) (Cuadro 1). Debido a que en este apartado se contaba con un menor número de repeticiones por tratamiento, se decidió utilizar para los análisis aquellos aislamientos en los que al menos una de las repeticiones contara con una mortalidad en el control menor al 50%. Por lo que, se analizaron solamente los resultados de 15 aislamientos llevados a cabo en seis bioensayos.

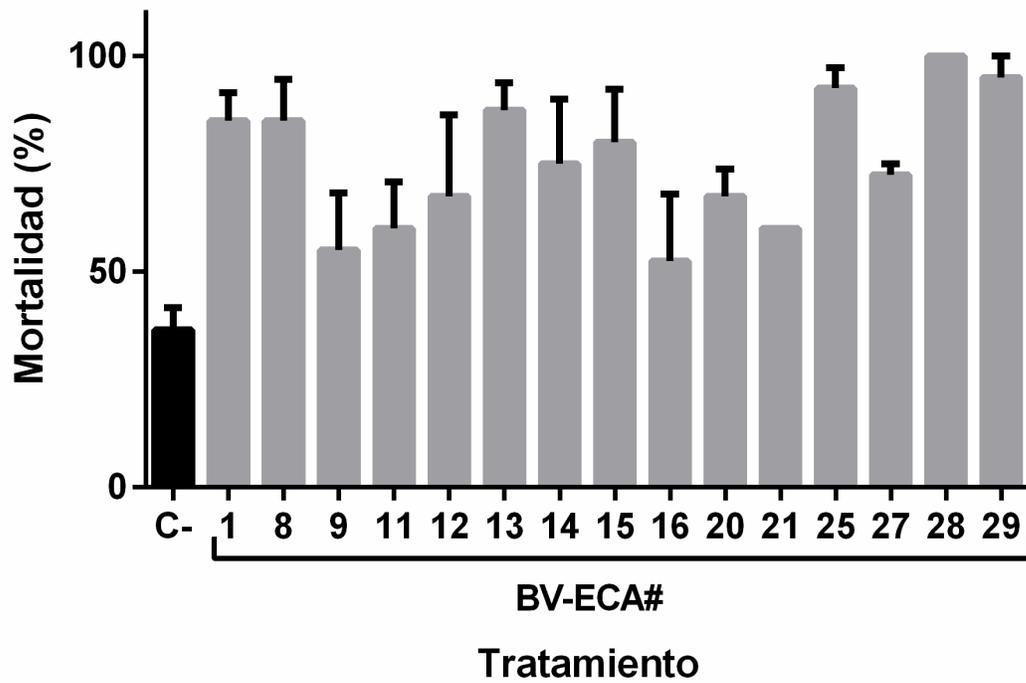
**Cuadro 1:** Aislamientos de *Beauveria bassiana* (n = 23) y número de bioensayos (dos repeticiones por aislamiento) en que fueron evaluados con respecto a su patogenicidad al áfido café de los cítricos, *Aphis citricidus*. En negrita se representan los bioensayos que obtuvieron una mortalidad alta en el control mayor al 80%, en color gris y en negrita los que obtuvieron una mortalidad moderada en el control (entre 50-80%).

Aislamiento	N° de bioensayo	Aislamiento	N° de bioensayo
BV-ECA0	23	BV-ECA21	21
BV-ECA1	18	BV-ECA23	25
BV-ECA8	18	BV-ECA25	22
BV-ECA9	18	BV-ECA27	22
BV-ECA11	19	BV-ECA28	22
BV-ECA12	18	BV-ECA29	22
BV-ECA13	18	BV-ECA30	25
BV-ECA14	18	BV-ECA32	25
BV-ECA15	18	BV-ECA33	25
BV-ECA16	21	BV-ECA35	25
BV-ECA18	25	BV-ECA36	25
BV-ECA20	21		

En los seis bioensayos, se contabilizaron en total 527 áfidos muertos, de los cuales 456 desarrollaron micelio creciendo sobre el cuerpo luego de siete días en cámara húmeda. La diferencia promedio entre estos dos sets de datos fue 11.83 individuos (ámbito: 3-30), es decir por bioensayo, aproximadamente a 11 áfidos muertos no se les observó crecimiento de hongo y si se decidía utilizar los datos de parasitismo, se estarían eliminado solamente 11 áfidos por bioensayo (Anexo 3). Por ser un número tan bajo en relación a la cantidad de áfidos muertos totales y al no tener la certeza de que el micelio observado sea en realidad de *B. bassiana* y no algún hongo contaminante o saprófito, se decidió utilizar para los análisis solamente los datos de mortalidad obtenida. Los datos de cadáveres con micelio creciendo sobre el cuerpo en el mismo momento de la recolección no se utilizaron debido a

que las observaciones fueron muy bajas (96) comparado con el total de áfidos muertos (527), ya que por el ciclo del hongo requiere de cierto tiempo para crecer.

Mediante una tabla de contingencia general y la prueba exacta de Fisher, se observaron diferencias entre los tratamientos (sin hongo versus con hongo) (Fig. 2,  $p < 0.0001$ ). Al realizar el análisis Modelo Linear de Pesos se obtuvieron 22 comparaciones con diferencias significativas de las 120 comparaciones posibles (Cuadro 2) (por el alto número de comparaciones realizadas, solamente se incluyeron en dicho cuadro las comparaciones que presentan diferencias significativas). Nueve de los 15 aislamientos fueron diferentes al tratamiento control (BV-ECA1, BV-ECA8, BV-ECA13, BV-ECA20, BV-ECA21, BV-ECA25, BV-ECA27, BV-ECA28 y BV-ECA29), además 13 de las comparaciones entre aislamientos resultaron diferentes estadísticamente (BV-ECA1 vs BV-ECA21, BV-ECA9 vs BV-ECA28, BV-ECA11 vs BV-ECA28, BV-ECA13 vs BV-ECA21, BV-ECA20 vs BV-ECA28, BV-ECA20 vs BV-ECA29, BV-ECA21 vs BV-ECA25, BV-ECA21 vs BV-ECA27, BV-ECA21 vs BV-ECA28, BV-ECA21 vs BV-ECA29, BV-ECA25 vs BV-ECA27, BV-ECA27 vs BV-ECA28 y BV-ECA27 vs BV-ECA29). Cabe recalcar que la comparación BV-ECA20 vs BV-ECA29 tiene una probabilidad en el límite (0.0462). El aislamiento con mayor número de diferencias fue el BV-ECA21, el cual resultó diferente a siete tratamientos, al control y a los aislamientos BV-ECA1, BV-ECA13, BV-ECA25, BV-ECA27, BV-ECA28 y BV-ECA29.



**Fig. 2:** Mortalidad de individuos de *Aphis citricidus* expuestos a 15 aislamientos de *Beauveria bassiana* o tratamiento control. Las barras son el promedio de dos repeticiones del tratamiento en el tiempo (en total cuatro unidades experimentales) ( $p < 0.0001$ ). Las barras representan el error estándar.

**Cuadro 2:** Diferencias significativas en la mortalidad del áfido café de los cítricos (*Aphis citricidus*) entre tratamientos (15 aislamientos de *B. bassiana* y el tratamiento control).

Comparación	Probabilidad
Control vs BV-ECA1	<0.0001
Control vs BV-ECA8	0.0015
Control vs BV-ECA13	<0.0001
Control vs BV-ECA20	0.0138
Control vs BV-ECA21	0.0010
Control vs BV-ECA25	<0.0001
Control vs BV-ECA27	<0.0001
Control vs BV-ECA28	<0.0001
Control vs BV-ECA29	<0.0001
BV-ECA1 vs BV-ECA21	0.0115
BV-ECA9 vs BV-ECA28	0.0490
BV-ECA11 vs BV-ECA28	0.0197
BV-ECA13 vs BV-ECA21	0.0021
BV-ECA20 vs BV-ECA28	0.0001
BV-ECA20 vs BV-ECA29	0.0462
BV-ECA21 vs BV-ECA25	<0.0001
BV-ECA21 vs BV-ECA27	0.0002
BV-ECA21 vs BV-ECA28	<0.0001
BV-ECA21 vs BV-ECA29	<0.0001
BV-ECA25 vs BV-ECA27	0.0197
BV-ECA27 vs BV-ECA28	<0.0001
BV-ECA27 vs BV-ECA29	0.0069

<sup>1</sup> Solo se incluye las comparaciones estadísticamente significativas. Un total de 120 comparaciones.

### 5.3. Ensayos de patogenicidad *in vitro* de cuatro aislamientos de *B. bassiana* sobre el áfido café de los cítricos.

Para la segunda serie de bioensayo se realizaron seis repeticiones de bioensayos de patogenicidad; sin embargo, se decidió incluir en los análisis estadísticos solamente aquellos con una mortalidad en los controles menor a un 50%. Mortalidades mayores al 50% en los controles se consideraron poco informativos. Por esta razón se eliminaron dos de las repeticiones, ya que obtuvieron mortalidades de un 80% y un 76,67% en las placas control.

En los cuatro bioensayos, se contabilizaron en total 414 áfidos muertos, de los cuales 376 desarrollaron micelio creciendo sobre el cuerpo luego de siete días en cámara húmeda. La diferencia promedio entre estos dos sets de datos fue 9.5 cadáveres (7-13), es decir por bioensayo (Anexo 4), aproximadamente a nueve áfidos muertos no se les observó crecimiento de hongo, por lo que solamente nueve datos serían los eliminados si se decía utilizar los datos de micelio visible luego de siete días en cámara húmeda. Por lo que, al igual que en la sección anterior, se decidió utilizar para los análisis solamente los datos de mortalidad obtenida. Los datos de cadáveres con micelio creciendo sobre el cuerpo en el mismo momento de la recolección no se utilizaron debido a que las observaciones fueron bajas (133) comparado con el total de áfidos muertos (414), ya que por el ciclo del hongo requiere de cierto tiempo para crecer.

Al realizar la prueba exacta de Fisher para determinar si hay diferencias entre los controles y los tratamientos con hongo (en general) se observaron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ). Por lo tanto, se realizó una tabla de contingencia para comparar cada tratamiento con los otros, para un total de diez comparaciones (Cuadro 3). Se detectaron diferencias entre el control y los cuatro aislamientos de *B. bassiana* utilizados, también al comparar los aislamientos BV-ECA1 vs BV-ECA 15, BV-ECA 13 vs BV-ECA15 y BV-ECA14 vs BV-ECA15.

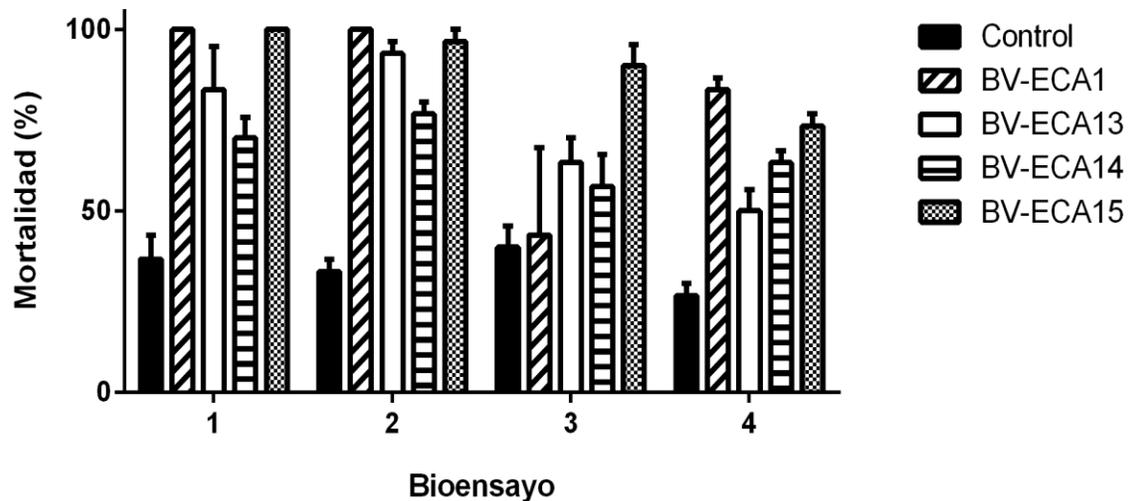
**Cuadro 3:** Comparaciones del efecto de cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* y un control sobre la mortalidad (muertos/total de individuos) de *Aphis citricidus*. Probabilidades obtenidas de la prueba exacta de Fisher con un  $\alpha=0,005$  según corrección de Bonferroni.

Comparación	Probabilidad	Proporción	
		A	B
Control(A) vs BV-ECA1(B)	<0.0001*	41/120	86/120
Control(A) vs BV-ECA13(B)	<0.0001*	41/120	91/120
Control(A) vs BV-ECA14(B)	<0.0001*	41/120	78/120
Control(A) vs BV-ECA15(B)	<0.0001*	41/120	113/120
BV-ECA1(A) vs BV-ECA13(B)	0.5575	86/120	91/120
BV-ECA1(A) vs BV-ECA14(B)	0.3314	86/120	78/120
BV-ECA1(A) vs BV-ECA15(B)	<0.0001*	86/120	113/120
BV-ECA13(A) vs BV-ECA14(B)	0.0893	91/120	78/120
BV-ECA13(A) vs BV-ECA15(B)	<0.0001*	91/120	113/120
BV-ECA14(A) vs BV-ECA15(B)	<0.0001*	78/120	113/120

\*Resultado estadísticamente significativo

Al realizar un GLM y un Wald Test a los datos de mortalidad se observaron diferencias entre los tratamientos (Fig. 3;  $\chi^2 = 20,3$ ; gl = 4; p = 0,00015). En el Cuadro 4 se pueden observar que todos los aislamientos resultaron diferentes al compararse con el control, siendo que el aislamiento BV-ECA1 tuvo más de ocho veces la probabilidad de provocar la muerte de un áfido que cuando no se aplica hongo, de igual forma para los aislamientos BV-ECA13 y BV-ECA14 presentaron más de cinco veces y casi cuatro veces más, respectivamente, de probabilidad de causar la muerte en un áfido que cuando no se aplican hongos. La diferencia más marcada la obtuvo el aislamiento BV-ECA15 con más de 17 veces la probabilidad de provocar la muerte en el áfido empleado que cuando no se aplican esporas de hongo. El efecto del aislamiento BV-ECA1 no fue diferente al de los otros aislamientos, mientras que BV-ECA15 presentó diferencias significativas al ser

comparado con BV-ECA13 y BV-ECA14. El aislamiento BV-ECA15 tiene aproximadamente cuatro veces mayor probabilidad de provocar la muerte de individuos del áfido café de los cítricos en relación a BV-ECA13 y BV-ECA14.



**Fig. 3:** Porcentaje de mortalidad de individuos de *Aphis citricidus* expuestos a cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* o tratamiento control. Cada barra corresponde al promedio de cuatro repeticiones del bioensayo (un total de 12 unidades experimentales por tratamiento) ( $\chi^2 = 20,3$ ; gl = 4; p = 0,00015). Las barras representan el error estándar.

**Cuadro 4:** Razón de posibilidades (OR: “odds ratio”) e intervalos de confianza (99,5% con corrección de Bonferroni) para cada comparación de mortalidad producida sobre *Aphis citricidus* entre tratamientos con *Beauveria bassiana* o control.

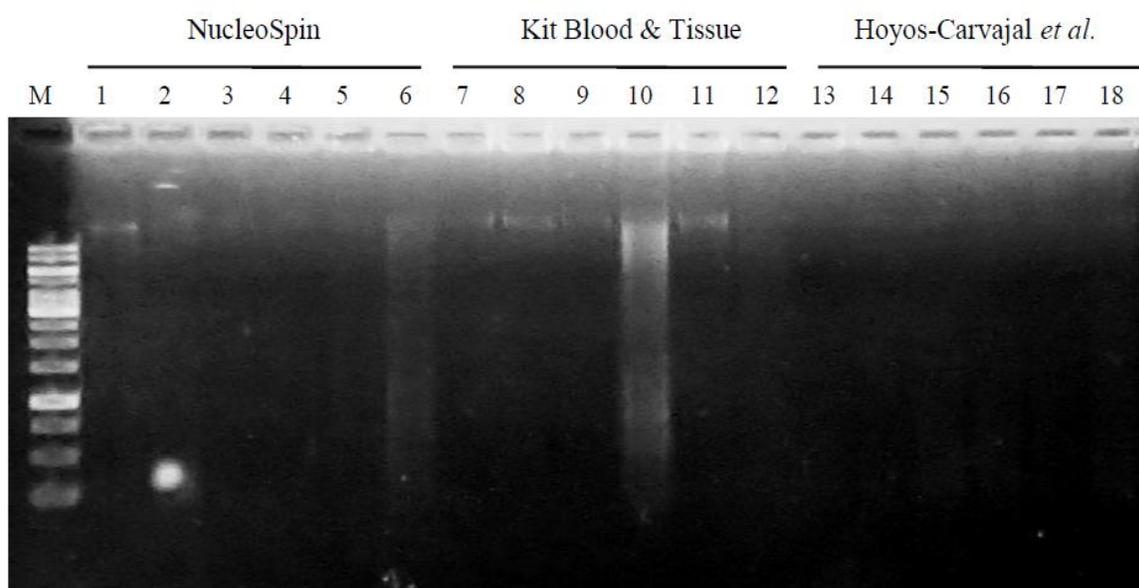
Comparación	OR	Intervalos	
		0.30%	99,80%
Control vs BV-ECA1*	8.58	3.76	20.98
Control vs BV-ECA13*	5.08	2.35	11.43
Control vs BV-ECA14*	3.85	1.81	8.45
Control vs BV-ECA15*	17.34	6.72	52.06
BV-ECA1(A) vs BV-ECA13(B)	0.59	0.24	1.41
BV-ECA1(A) vs BV-ECA14(B)	0.45	0.19	1.04
BV-ECA1(A) vs BV-ECA15(B)	2.02	0.70	6.35
BV-ECA13(A) vs BV-ECA14(B)	0.76	0.34	1.67
BV-ECA13(A) vs BV-ECA15(B)*	3.41	1.27	10.31
BV-ECA14(A) vs BV-ECA15(B)*	4.50	1.72	13.44

\*Resultado estadísticamente significativo

Cabe recalcar que solamente dos de los aislamientos (BV-ECA1 y BV-ECA13) utilizados en la sección de 15 aislamientos, resultaron diferentes al control y solamente esos dos aislamientos presentaron diferencias con otras de las muestras utilizadas (Cuadro 2). BV-ECA14 y BV-ECA15 no presentaron diferencias al ser comparadas ya sea con el control o con los otros aislamientos. Tampoco se detectaron diferencias al comparar ninguno de estos cuatro aislamientos entre sí. Sin embargo, al realizar el diseño experimental más robusto con solamente cuatro aislamientos (más placas por repetición y más repeticiones en el tiempo), los cuatro aislamientos obtuvieron resultados diferentes al control y el aislamiento BV-ECA15 produjo una mayor mortalidad que los otros tres aislamientos, por lo que parece poseer una mayor capacidad para infectar y colonizar *A. citricidus* (Cuadro 3).

#### 5.4. Detección de *B. bassiana* a partir de un solo áfido.

En una prueba preliminar, la concentración de ADN de 18 cadáveres de áfidos individuales obtenidos a partir de tres protocolos (seis cadáveres por protocolo) de extracción de ADN diferentes fue en promedio 4.27 ng/μl (0,1-20.4ng/μl) (Fig. 4). Para las extracciones de ADN de áfidos provenientes de los bioensayos se obtuvo una concentración de ADN promedio de 1.11 ng/μl (0.1-4.3 ng/μl). Debido a las bajas concentraciones de ADN, las soluciones de ADN se utilizaron directamente sin homogenizar o diluir.

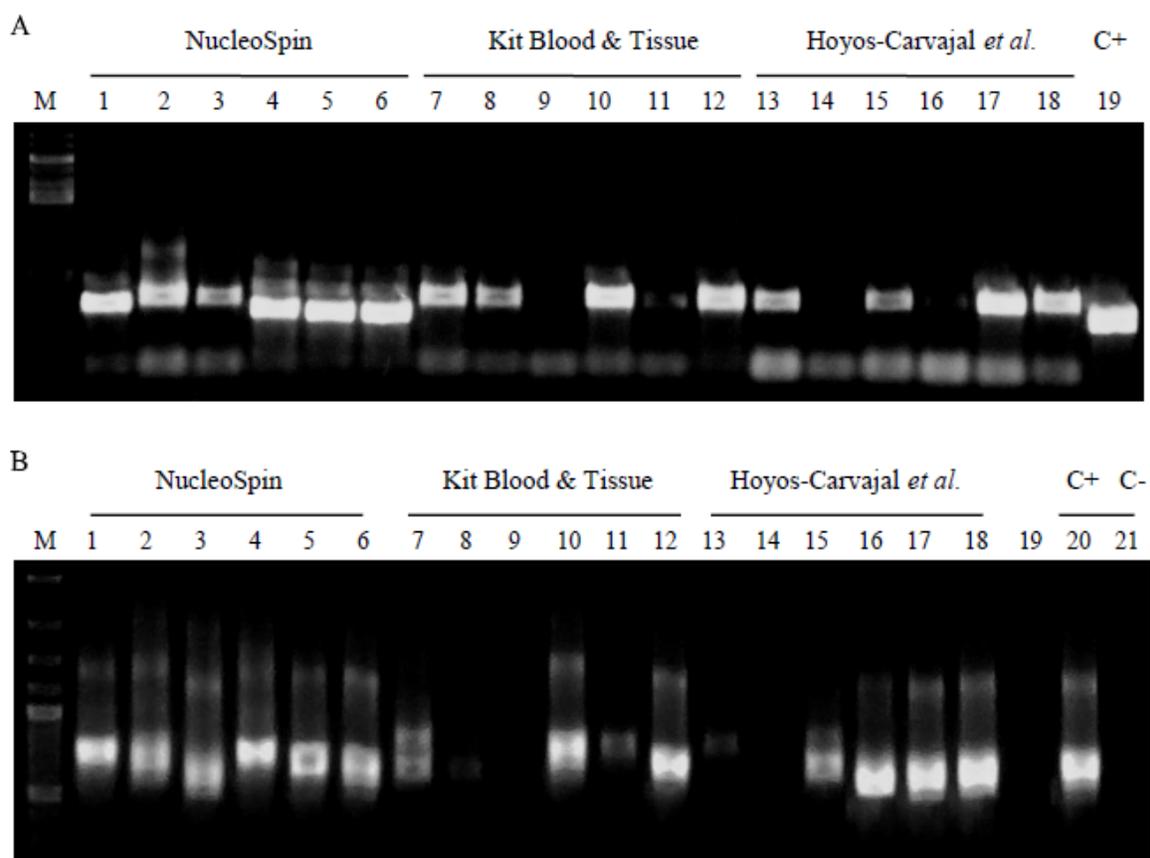


**Fig.4:** Extracción de ADN con tres diferentes protocolos a partir de cadáveres de *Aphis citricidus* expuestos a tratamientos con *Beauveria bassiana*, tres sin micelio visible creciendo sobre el cadáver y tres con micelio visible. M. Marcador de peso molecular (1Kb), carriles 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15 corresponden a cadáveres sin micelio visible; y los carriles 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17 y 18 corresponden cadáveres con micelio visible.

##### 5.4.1. PCR para la detección de *B. bassiana*

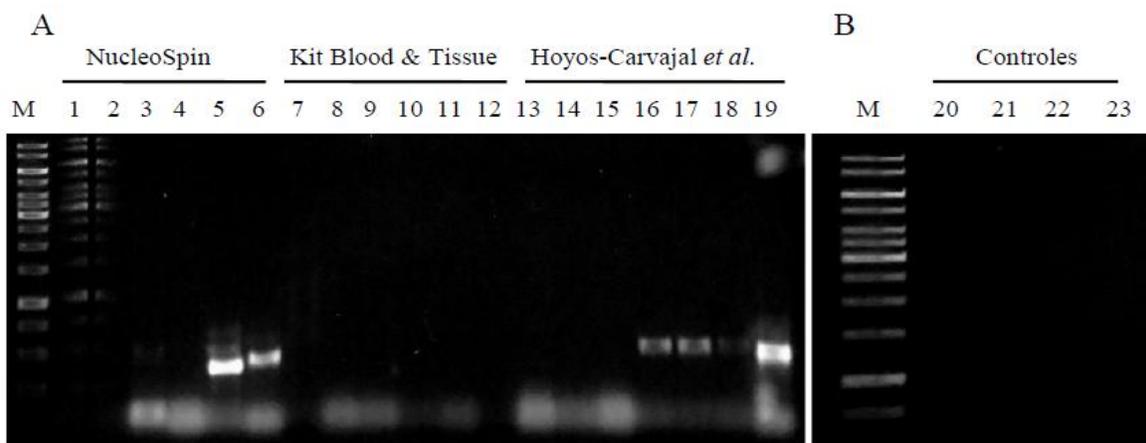
Al realizar un protocolo de PCR anidado descrito por Landa *et al.* (2013) en cadáveres de áfido café de los cítricos provenientes de bioensayos preliminares, se observó una

amplificación inespecífica. Tanto los áfidos con micelio visible como los controles (cadáveres sin micelio visible), en la mayoría de los casos, amplificaron como positivos (Fig. 5), incluido el ADN de *Metarhizium anisopliae* y cadáveres del áfido café de los cítricos que no habían estado en contacto con ningún hongo. Con el propósito de mejorar la especificidad de la amplificación, se realizó un PCR utilizando únicamente los imprimadores de la segunda ronda; en este caso, amplificó solamente uno de los controles (cadáver sin micelio visible, Fig. 6).



**Fig. 5:** PCR anidado para la detección de *Beauveria bassiana* según Landa *et al.* (2013) en cadáveres del áfido café de los cítricos (*Aphis citricidus*). Carriles en común entre ambos gels. M. Marcador de peso molecular (1Kb), carriles 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15 corresponden a extracciones de cadáveres sin micelio visible; y los carriles 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17 y 18 corresponden a extracciones a partir de cadáveres con micelio visible. Gel A. Primera ronda con los imprimadores ITS5/ITS4. Carril 19. control positivo (ADN de *B.*

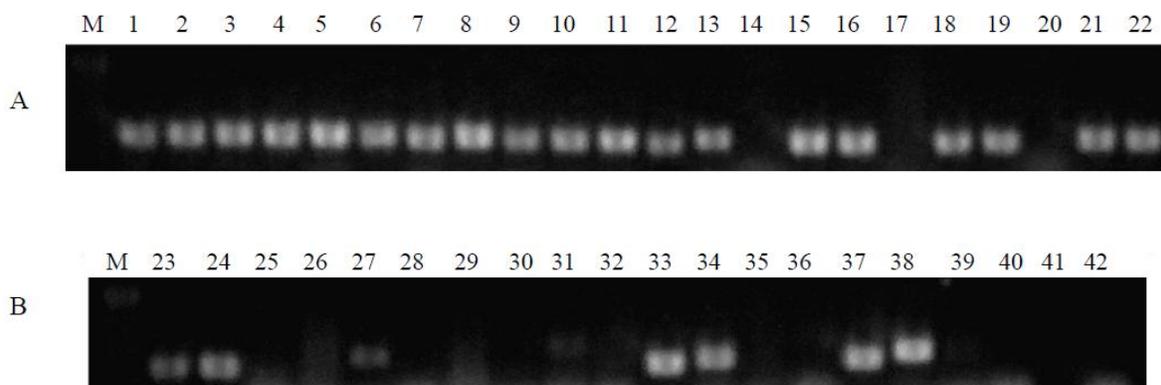
*bassiana*). El control negativo (agua) se corrió en otro gel con resultado negativo. Gel B. Segunda ronda con los imprimadores BB.fw/BB.rv.Carril 19. Vacío; 20. Control positivo (ADN de *B. bassiana*); y 21. Control negativo (agua).



**Fig. 6:** PCR realizado, modificando Landa *et al.* (2013), directamente (sin la primera ronda de amplificación) con imprimadores internos (BB.fw/BB.rv) para detección de *Beauveria bassiana* en cadáveres del áfido café de los cítricos (*Aphis citricidus*). Gel A: M. Marcador de peso molecular (1Kb), carriles 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15 corresponden a extracciones de cadáveres sin micelio visible; carriles 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17 y 18 corresponden a extracciones a partir de cadáveres con micelio visible, carril 19 Control positivo (ADN de *B. bassiana*). Gel B: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 20. Control negativo (ADN de *Metarhizium anisopliae*, aislamiento MTR16), 21. Control negativo (agua), 22. Control negativo (hongo contaminante sin identificar), 23. Control negativo (ADN de *A. citricidus* sin tratar).

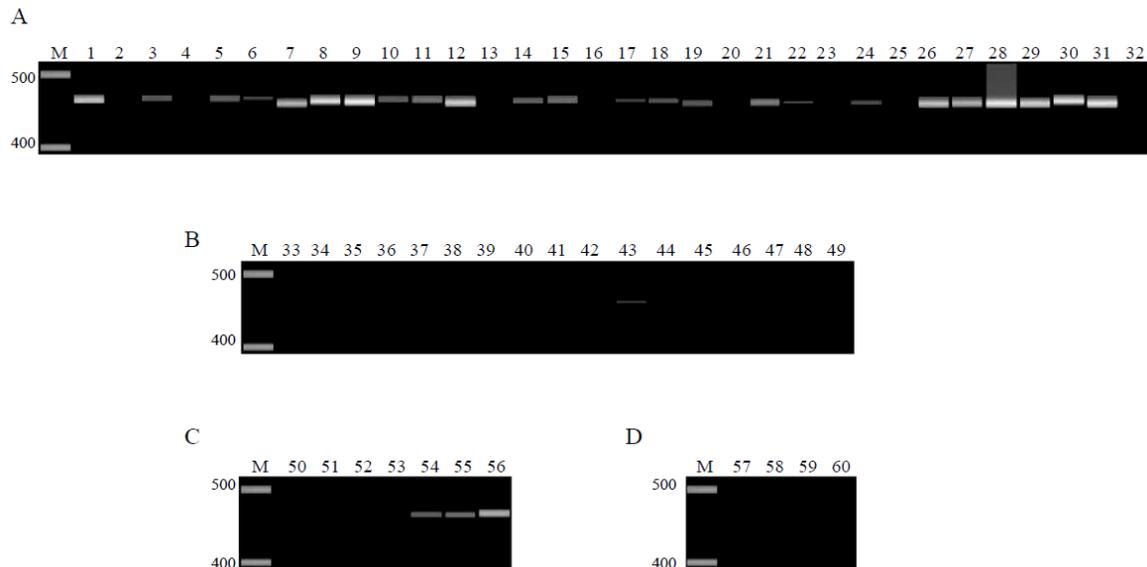
Debido a la inespecificidad observada, se probaron los imprimadores internos (los que determinan la especificidad de la amplificación) descritos por Landa *et al.* (2013) con ADNs de los diferentes aislamientos de hongo en cultivo puro. Se incluyeron 22 muestras de ADN de *B. bassiana* (BV-ECA0, BV-ECA1, BV-ECA8, BV-ECA9, BV-ECA11, BV-ECA12, BV-ECA13, BV-ECA14, BV-ECA15, BV-ECA16, BV-ECA18, BV-ECA20, BV-ECA21, BV-ECA23, BV-ECA25, BV-ECA26, BV-ECA27, BV-ECA28, BV-ECA29, BV-

ECA30, BV-ECA31 y BV-ECA32) y 18 de *M. anisopliae* como controles negativos (MTR0, MTR1, MTR3, MTR4, MTR5, MTR6, MTR7, MTR8, MTR9, MTR10, MTR11, MTR12, MTR16, MTR17, MTR28, MTR29, MTR34 y MTR38) (Fig. 7). En este caso, solamente tres ADN de *B. bassiana* no amplificaron (BV-ECA23, BV-ECA27 y BV-ECA30); sin embargo, varios ADN de *M. anisopliae* amplificaron (MTR0, MTR1, MTR5, MTR9, MTR11, MTR12, MTR28 y MTR29). Posteriormente, se repitió el mismo PCR con un mayor número de aislamientos, 32 de *B. bassiana* y 17 de *M. anisopliae*, y se analizó los resultados por electroforesis capilar (QIAxcel) para tener una mayor resolución de los amplicones (Fig. 8). En este caso, no amplificaron ocho aislamientos de *B. bassiana* (BV-ECA1, BV-ECA9, BV-ECA21, BV-ECA26, BV-ECA30, BV-ECA33, BV-ECA35, BV-ECA47) y solamente un aislamiento de *M. anisopliae* amplificó (MTR11). Se observaron algunas coincidencias entre las dos repeticiones que se realizó el mismo PCR con las mismas muestras, pero también algunas diferencias. En el primer PCR, las muestras de BV-ECA1, BV-ECA9, BV-ECA21 y BV-ECA26 amplificaron mientras que en la segunda repetición no, y muchas muestras *M. anisopliae* no amplificaron la segunda vez aunque si lo habían hecho la primera. Entre las coincidencias está que el aislamiento BV-ECA30 no amplificó en ninguno de los dos PCRs y el MTR11 mostró amplificación en ambas.



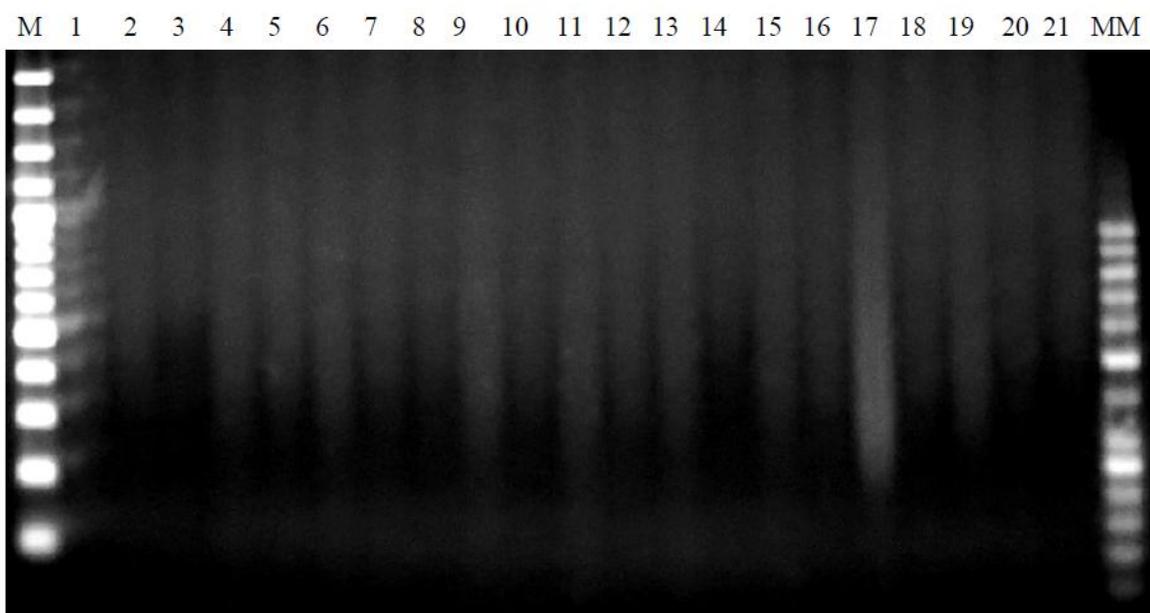
**Fig. 7:** Prueba con imprimadores internos para la detección de *Beauveria bassiana* según Landa *et al.* (2013) en ADN de *B. bassiana* (gel A) y *Metarhizium anisopliae* (gel B). Gel A: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 1. BV-ECA0, 2. BV-ECA1, 3. BV-ECA8, 4. BV-ECA9, 5. BV-ECA11, 6. BV-ECA12, 7. BV-ECA13, 8. BV-ECA14, 9. BV-ECA15,

10. BV-ECA16, 11. BV-ECA18, 12. BV-ECA20, 13. BV-ECA21, 14. BV-ECA23, 15. BV-ECA25, 16. BV-ECA26, 17. BV-ECA27, 18. BV-ECA28, 19. BV-ECA29, 20. BV-ECA30, 21. BV-ECA31, 22. BV-ECA32. Gel B: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 23. MTR0, 24. MTR1, 25. MTR3, 26. MTR4, 27. MTR5, 28. MTR6, 29. MTR7, 30. MTR8, 31. MTR9, 32. MTR10, 33. MTR11, 34. MTR12, 35. MTR16, 36. MTR17, 37. MTR28, 38. MTR29, 39. MTR34, 40. MTR38, 41. Vacío, 42. Control negativo (agua).

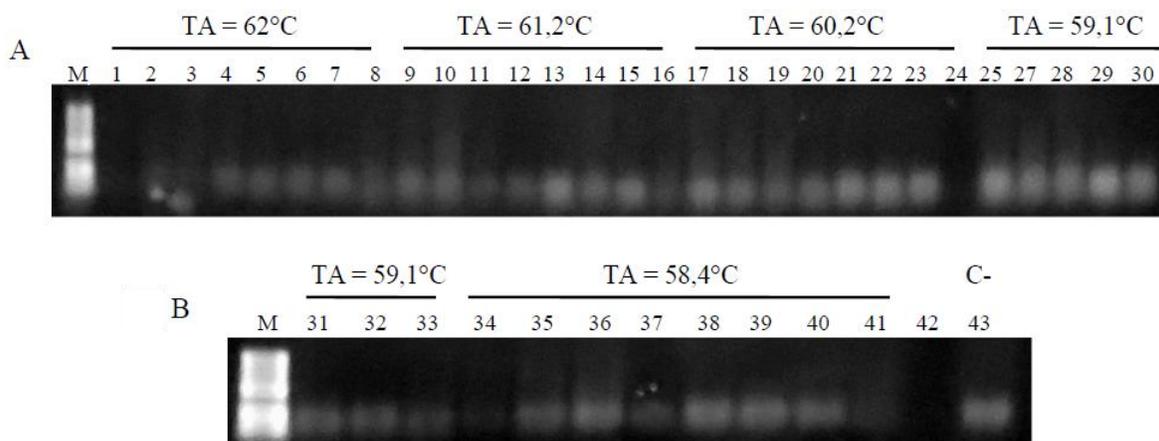


**Fig. 8:** Análisis capilar electroforético de productos de PCR obtenidos del protocolo de Landa *et al.* (2013) para la detección específica de *B. bassiana* utilizando QiAxccl (QIAGEN, USA). Solo se utilizaron los imprimadores de la segunda ronda. Gel A: M. M. Marcador molecular de peso molecular (1Kb), 1-32: BV-ECA0, BV-ECA1, BV-ECA8, BV-ECA9, BV-ECA11-BV-ECA16, BV-ECA18, BV-ECA20, BV-ECA21, BV-ECA23, BV-ECA25-BV-ECA37, BV-ECA43-BV-ECA47. Gel B: 33-49: MTR0, MTR1, MTR3-MTR12, MTR16, MTR28, MTR29, MTR34, MTR38. Gel C: 50. C negativo (ADN de áfido no expuesto a *B. bassiana*), 51-53: cadáveres de tres áfidos expuestos a *B. bassiana* sin micelio visible, 54-56: cadáveres de tres áfidos expuestos a *B. bassiana* con micelio visible. Gel D: 57-59: C negativo (tres muestras de *Talaromyces* spp.), 60. C negativo (agua).

Como se observaron inconsistencias e inespecificidad en la amplificación, se probaron imprimadores tipo SCARS (Castrillo, Vandenberg & Wraight, 2003) para la detección de *Beauveria*. Ninguna de las muestras utilizadas, de *B. bassiana* o *M. anisopliae*, resultaron positivas (Fig. 9). Tampoco se observaron resultados positivos al variar la temperatura de anillamiento (TA, “temperature of annealing”) empleando un gradiente (Fig. 10).



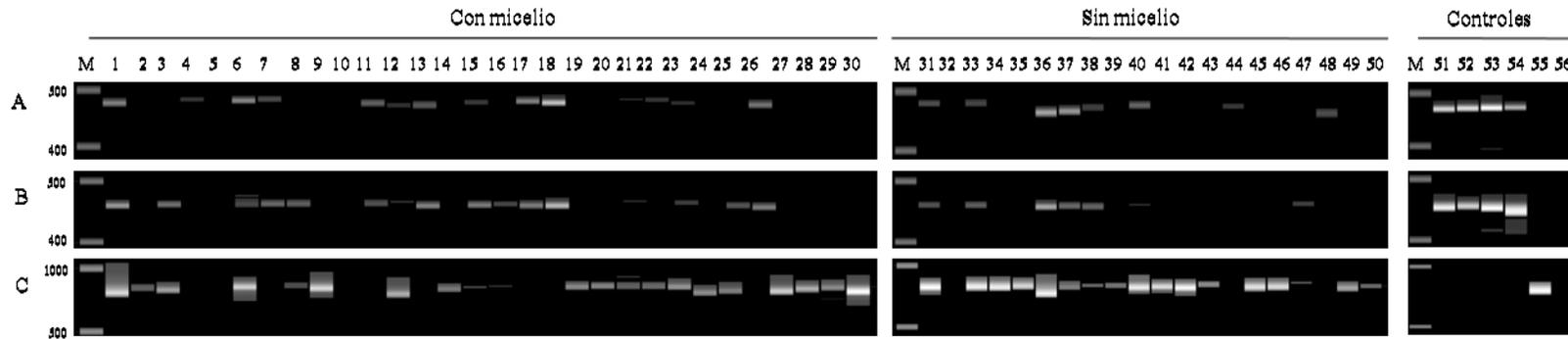
**Fig. 9:** SCARS para la detección de *B. bassiana* según las condiciones descritas en la publicación Castrillo *et al.* 2003. M. Marcador de peso molecular (100 bp), 1. BV-ECA11, 2. BV-ECA12, 3. BV-ECA14, 4. BV-ECA15, 5. BV-ECA16, 6. BV-ECA18, 7. BV-ECA20, 8. BV-ECA23, 9. BV-ECA25, 10. BV-ECA26, 11. BV-ECA28, 12. BV-ECA29, 13. BV-ECA30, 14. BV-ECA31, 15. BV-ECA32, 16. MTR6, 17. MTR7, 18. MTR8, 19. Control negativo (hongo contaminante no identificado), 20. Hongo 1 (ADN extraído de áfido tratado con micelio visible), 21. Control negativo (agua), MM. Marcador de peso molecular (50bp).



**Fig. 10:** Resultado de SCARS descritos por Castrillo *et al.* 2013 con un gradiente de temperaturas de anillamiento (TA) para la detección de *B. bassiana*. Para cada una de las variaciones de temperatura se utilizaron las mismas muestras de hongo en el siguiente orden: MTR1, MTR10, MTR11, BV-ECA0, BV-ECA21, BV-ECA31; ADN de áfido expuesto a *B. bassiana* sin micelio visible, control negativo (*Talaromyces* sp.). Gel A: M. Marcador de peso molecular (50 pb), 1-8. TA de 62°C. 10-17. TA de 61,2°C. 9-16. TA de 61.2°C. 17-24. TA de 60,2°C. 25-30. TA = 59,1°C. Gel B: M. Marcador de peso molecular (50pb), 31-33. TA = 59,1°C. 34-41. TA = 58,4°C. 42. Vacío. 43. Control negativo (agua).

Finalmente, de tres de los bioensayos realizados (números 1, 2 y 4) se obtuvo 50 cadáveres, 30 de ellos con micelio visible y 20 cadáveres sin micelio visible. Se probó el protocolo de PCR de Landa *et al.* (2013) para los ADNs extraídos de estos áfidos en dos repeticiones (Fig. 11). Solamente en cinco de las muestras no se detectó amplificación en general, para *Beauveria* (Landa *et al.* 2013) o para ADN de áfido (región COX I utilizado como un control interno de amplificación). También hubo muestras, donde amplificó la región COX I pero no se detectó al hongo (Fig. 11). Sin embargo, en algunas ocasiones no se obtuvo amplificación de la región COX I; pero si se detectó el ADN del hongo (Anexo 2). Se decidió eliminar todas aquellas muestras negativas para la amplificación de la región COX I, así como también aquellas muestras en las que se observaron incongruencias en las dos repeticiones del protocolo de Landa *et al.* (2013). En total, se obtuvieron 33 muestras con resultados de amplificación confiables. Es importante destacar que no se obtuvo

amplificación por medio del protocolo de Landa *et al.* (2013) con los áfidos provenientes de placas control, tanto si presentaron o no crecimiento de micelio cuando se compararon con los cadáveres provenientes de placas en las que hubo presencia de hongo entomopatógeno (Cuadro 5,  $p = 0.0016$ ). De las 22 muestras que si se esperaban resultados positivos, de 13 de ellas se obtuvieron amplificaciones (59.1%), para las muestras a las que se les observaba micelio visible en siete de 12 se observaron amplificaciones (58.33%) y para los cadáveres sin micelio visible creciendo sobre el cuerpo seis de las 10 muestras amplificaron (60%).



**Fig. 11:** Análisis capilar electroforético utilizando QiAxcel (QIAGEN, USA) de productos de PCR. Gel A y Gel B son repeticiones de productos de PCR obtenidos siguiendo el protocolo de Landa *et al.* (2013) para la detección específica de *B. bassiana* en cadáveres de *Aphis citricidus* expuestos a bioensayos con este hongo. Solo se utilizaron los imprimadores de la segunda ronda (BB.fw/BB.rv). El Gel C muestra los resultados de amplificación de la región COX I. Cada gel está dividido en cadáveres con y sin micelio visible luego de siete días en cámara húmeda y controles positivos y negativos. En los geles se utilizaron las mismas muestras en el mismo orden, para cada carril se indica el aislamiento empleado en ese tratamiento. Con micelio: M. Marcador de peso molecular (1Kb), 1-10: cadáveres procedentes del bioensayo 1, 1-2: BV-ECA1, 3-4: BV-ECA13, 5-6: BV-ECA14, 7-8: BV-ECA15, 9-10: tratamiento control. 11-20: cadáveres procedentes del bioensayo 2, 11-12: BV-ECA1, 13-14: BV-ECA13, 15-16: BV-ECA14, 17-18: BV-ECA15, 19-20: tratamiento control. 21-30: cadáveres procedentes de bioensayo 4, 21- 22: BV-ECA1, 23- 24: BV-ECA13, 25- 26: BV-ECA14, 27- 28: BV-ECA15, 29-30: tratamiento control. Sin micelio: M. Marcador molecular de 1Kb, 31-35: cadáveres procedentes de bioensayo 1. 31\* y 32\*: BV-ECA13, 33\*: BV-ECA14, 34-35 tratamiento control, 36-42: cadáveres procedentes de bioensayo 2. 36-37: BV-ECA13, 38-39: BV-ECA14, 40: BV-ECA15, 41-42: tratamiento control. 43-50 cadáveres procedentes de bioensayo 4. 43-44: BV-ECA1, 45-46: BV-ECA13, 47-48: BV-ECA14, 49- 50\*: tratamiento control. Controles: ADN de aislamiento: 51: BV-ECA1, 52: BV-ECA13, 53: BV-ECA14, 54: BV-ECA15, 55: ADN de áfido sin tratar, 56: Agua.

**Cuadro 5:** Resumen (número de amplificaciones positivas / total de muestras) de los resultados satisfactorios de PCR según Landa *et al.* (2013) para la detección de *B. bassiana* a partir de cadáveres del áfido café de los cítricos.

Tratamiento	Con micelio	Sin micelio	Total
Control	0/5	0/6	0/11
BV-ECA 1	4/5	0/1	4/6
BV-ECA13	1/3	3/5	4/8
BV-ECA14	2/2	2/3	4/5
BV-ECA 15	0/2	1/1	1/3
Total	7/12	6/10	13/22

En cuanto a los resultados obtenidos en general, la cantidad de resultados positivos de amplificación no varía significativamente ( $p = 1$ ) si se observó o no micelio sobre los cadáveres luego de siete días en cámara húmeda. La proporción fue de 6/16 sin micelio comparada con 7/17 para los cadáveres que si se contaban con micelio visible, es decir la mayoría de las muestras de cadáveres no presentaron amplificaciones, incluso a los que se les observó micelio visible luego de siete días en cámara húmeda. Este resultado llama la atención, ya que las pruebas de amplificación con ADN de cultivo puro de hongo, sugieren que el protocolo tiene la capacidad de detectar los cuatro aislamientos utilizados en los bioensayos; al menos los aislamientos BV-ECA13, BV-ECA14 y BV-ECA15 obtuvieron resultados positivos consistentes. El aislamiento BV-ECA1 amplificó en una ocasión (Fig. 7).

## 6. Discusión

### 6.1. Bioensayos *in vitro* para observar la patogenicidad de aislamientos de *B. bassiana* sobre el áfido café de los cítricos

Se observó mucha variabilidad en el porcentaje de mortalidad obtenido entre y dentro de los bioensayos, tanto para el tratamiento control como para los diferentes aislamientos de *Beauveria* utilizados (Fig. 2). Así mismo, en esta investigación no parece haber ninguna relación entre la mortalidad del áfido café de los cítricos en el tratamiento control y, los datos de temperatura y humedad relativa recopilados para cada bioensayo. Esta observación llama la atención porque las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla un áfido afectan la duración de su ciclo de vida (Rodríguez-Leyva & Lomelí-Flores 2013) y justamente, los efectos de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo, longevidad, sobrevivencia, reproducción y crecimiento poblacional en áfidos son muy estudiados (Agarwala & Bhattacharya 1995; Asante *et al.* 1991; Das *et al.* 2011; Ebwongu *et al.* 2001; Hirano *et al.* 1996; Jeffs & Leather 2014). Por lo tanto, se sugiere que otras variables ambientales a las que no se midieron en esta investigación potencialmente afectaron la mortalidad de los áfidos.

Entre otras variables ambientales a considerar, Maruthadurai (2018) observó que, aparte de la temperatura y la humedad relativa, aumentos en la evaporación de agua provocan efectos negativos en las poblaciones de *Aphis odinae*, mientras que aumentos en la cantidad de horas de luz favorece las poblaciones de este áfido. Por otra parte, el efecto de diferentes variables ambientales puede ser contrario según la época del año. La cantidad de horas de luz, temperatura (máxima y mínima), presión de vapor y velocidad del viento tuvieron efectos positivos en poblaciones de *Aphis odinae* durante el verano; por otro lado, la cantidad de horas de luz y temperatura máxima provocaron efectos negativos durante el periodo de las primeras lluvias (Dabhi *et al.* 2013). Sin embargo, en la literatura también se encuentran casos en los que ni la temperatura ni la humedad relativa (ni la cantidad de lluvia) tienen efecto sobre las poblaciones de áfidos (Meena *et al.* 2013), al igual que en esta investigación.

Aunque en la naturaleza las poblaciones de áfidos llegan a ser de muy alta densidad por tallo u hoja, Jandricic *et al.* (2014) mencionan que una menor densidad de áfidos de

*Aulacorthum solani* (tres áfidos por placa Petri) pudo haber contribuido a una mejor sobrevivencia que cuando se utilizaron 10 áfidos por placa. También se utilizan variables más complejas como “unidades de calor acumulado” (accumulated heat units, GDD) y “radio de humedad termal” (humidity termal ratio, HTR) las cuales, en resumen, se basan en el calor que requiere un insecto para desarrollarse y crecer (Narjary *et al.* 2013).

Estas observaciones indican que muchas variables ambientales pueden provocar diversos efectos sobre la supervivencia de áfidos y que la misma variable no siempre tiene el mismo resultado, ni siquiera en la misma especie de áfido, dependiendo de la época en la que se realice la investigación. Por todas estas razones, se recomienda tener control de las variables ambientales a la hora de realizar los bioensayos (una cámara de crecimiento), esto para que todos los bioensayos se realicen bajo las mismas condiciones y poder discernir cuáles de estas variables afectan las poblaciones de este áfido y poder tener un mejor entendimiento de cómo podrían comportarse las poblaciones en el campo.

Otra posible fuente de variación que se debe considerar es la manipulación de los insectos a la hora de trasladarlos hasta el laboratorio y luego al colocarlos en cada caja Petri. Este tema, aunque importante, no es capaz de explicar la mortalidad observada en los bioensayos realizados ya que ésta fue demasiado variable, incluso en los controles variando de un 15% a un 98.3% (Fig. 1). Hay que considerar además, que los bioensayos fueron realizados por la misma persona con los mismos materiales, lo cual debería reducir el nivel de variabilidad en la mortalidad por la manipulación. También se debe tener en cuenta el estrés que puede provocar sobre los individuos la manipulación.

Al trabajar con áfidos y hongos entomopatógenos se deben tomar en cuenta ciertas características de estos insectos que pueden influenciar la forma en que son afectados por los hongos. Entre éstas se han mencionado su desarrollo rápido y el hecho de que esto implique mudas relativamente rápidas. Experimentos con un aislamiento de *B. bassiana* y ninfas del áfido *Myzus persicae* (Liu *et al.*, 2003), encontraron una relación entre la inoculación y la primera muda luego de la inoculación. Entre menos tiempo pase entre la inoculación y la próxima muda, menor es el efecto del hongo entomopatógeno en la mortalidad producida en el áfido. En dicha investigación también observaron que las ninfas que resultaban infectadas morían antes de la siguiente muda; se sugiere que las mudas durante el desarrollo cumplen una función defensiva contra la penetración del

hongo en el organismo. También se ha mencionado que los áfidos son altamente móviles (comparados con otros insectos chupadores) y que sus patas delgadas minimizan el contacto con la superficie de la hoja y la parte más húmeda de ésta, lo cual podría influir en la adquisición por el áfido de dosis letales del hongo (Hall 1979 en Jandricic *et al.* 2014)

La presencia de bacterias endosimbiontes en áfidos es otra variable que puede afectar la mortalidad observada en los bioensayos con hongos entomopatógenos. Según la literatura, casi todas las especies de áfidos presentan al menos un endosimbionte primario (*Buchnera aphidicola*) con la posibilidad de hospedar uno o varios simbioses secundarios o facultativos, los cuales son importantes para la supervivencia y reproducción del insecto (Koga *et al.* 2003; Vicente *et al.* 2017).

Se ha observado que la presencia de simbiote(s) secundario(s) en el áfido de los guisantes (*Acyrtosiphon pisum*) le confiere resistencia a la infección por hongos (reducen la mortalidad). Además, cuando un áfido que posee el simbiote, se ve infectado y muere, el hongo presenta una frecuencia de esporulación menor en comparación con los áfidos que no presentaban el endosimbionte, con lo cual también se reduce la transmisión del hongo a insectos cercanos (Scarborough *et al.* 2005; Lukasik *et al.* 2012). Sin embargo, el tema de los endosimbiontes es mucho más complejo, ya que en otra investigación con las mismas especies de áfido y endosimbionte facultativo, se encontró que *Regiella insecticola* brinda protección contra un hongo entomopatógeno específico pero no contra uno generalista como *B. bassiana* (Parker *et al.* 2013). Esto recalca lo variable de trabajar con sistemas de este tipo, donde la comunidad de endosimbiontes presente en cada organismo puede reaccionar de forma diferente ante distintos tipos de hongos.

En cuanto a la variabilidad en la mortalidad producida por diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos, ya se ha observado una alta variabilidad entre varios aislamientos, incluidos aislamientos de *B. bassiana*, como se observó en este caso (Fig. 2). Jandricic *et al.* (2014) probaron 44 aislamientos de tres especies de hongos (*B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria javanica*) en las especies de áfidos *A. gossypii*, *M. persicae* y *Aulocorthum solani*, encontrando que la mortalidad producida para cada áfido varió no solo entre especies, sino entre aislamientos de la misma especie, es decir hubo aislamientos que provocaron una alta mortalidad contra una especie de áfido y muy baja

contra la otra. Posteriormente, eligieron el aislamiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que hubiera producido la mayor mortalidad contra ambas especies de áfidos y se compararon con dos cepas comerciales de *B. bassiana*. Ellos obtuvieron resultados variables de acuerdo al aislamiento que produjo mayor mortalidad contra cada especie de áfido aunque en todos los casos el aislamiento comercial (*B. bassiana* GHA) fue el que produjo las mortalidades más bajas. En esa investigación también concluyen que existen diferencias entre la susceptibilidad de las especies de áfidos utilizadas, ya que un mismo aislamiento de *B. bassiana* resultó ser bastante virulento contra *A. gossypii*, virulencia baja pero cuantitativa contra *M. persicae* y ser prácticamente no virulento contra *A. solani*. También hacen notar la importancia de experimentar con las muestras depositadas en colecciones, ya que en este caso, el aislamiento con mejor rendimiento fue uno no comercial.

Otro ejemplo similar se observa en Loc *et al.* (2010), en donde inicialmente contaron 16 aislamientos de *B. bassiana* y 19 de *M. anisopliae* contra *Aphis* sp. y *Diaphorina citri* (Psyllidae), ellos probaron la patogenicidad de los aislamientos mediante bioensayos hasta seleccionar tres para pruebas en invernadero (uno de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae*). Su comportamiento también se comparó contra dos bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos. Se menciona que uno de los aislamientos de *B. bassiana* obtuvo una patogenicidad catalogada como buena (70-77% de mortalidad), por lo que produjeron bioinsecticidas con esos aislamientos y fueron probados en invernadero. Posteriormente, solo uno fue probado en el campo generando mortalidades similares, 71,7 y 76,6% a los 7 y 10 días posteriores a la aplicación, respectivamente. Además, los aislamientos en estudio siempre produjeron mayor mortalidad contra el áfido que los bioinsecticidas.

En otro caso, Vu *et al.* (2007) evaluaron varias especies de hongos entomopatógenos contra *A. gossypii* y *Myzus persicae*. Ellos obtuvieron que *Lecanicillium lecani* produjo la mayor mortalidad para ambas especies de áfidos aunque hubo variación entre los tres aislamientos utilizados. El aislamiento de *B. bassiana* utilizado produjo mayor mortalidad en *A. gossypii* que en *M. persicae*. Otro dato que apunta a que el mismo aislamiento puede provocar diferentes efectos según la susceptibilidad de la especie de áfido, es que el mismo aislamiento de *M. anisopliae* produjo una mortalidad muy alta para *A. gossypii* pero la mortalidad más baja de todos los aislamientos utilizados para *M. persicae*.

Los datos obtenidos en las investigaciones mencionadas concuerdan con los resultados de esta investigación, en la que se observó una alta variabilidad en la patogenicidad de *B. bassiana* sobre el áfido café de los cítricos. En donde algunos aislamientos se observaron mortalidades similares a las obtenidas en los controles, por ejemplo aislamiento BV-ECA9 y BV-ECA16 contra mortalidades del 100% o cercanas (BV-ECA28 y BV-ECA29) (Fig. 2).

En el estudio de Jandricic *et al.* (2014), ellos indican que la dosis de hongo (*B. bassiana*) que recibieron los áfidos pudo variar debido a la viabilidad de los conidios, es decir de la concentración que se coloca sólo un porcentaje de esporas germinará. Safavi *et al.* (2007) encontraron una relación entre la germinación de conidios y la virulencia para algunos aislamientos de *Beauveria*. Esta variable puede tener un efecto en la variabilidad de la mortalidad observada en esta investigación, ya que aunque se aplicó dosis de hongo del mismo orden de magnitud ( $10^7$ ) por tratamiento, se desconoce el porcentaje de viabilidad de cada aislamiento. Así, el número de conidios que pudieron germinar y potencialmente infectar a los áfidos pudo ser muy variable. Por estas razones, se recomienda realizar estudios de viabilidad de los conidios de los aislamientos antes de ser utilizados en el campo.

La variabilidad en la mortalidad de áfidos observada para los aislamientos de *B. bassiana* estudiados puede deberse al sustrato y los métodos de cultivo utilizados. El medio y condiciones en las que se cultiva un hongo puede afectar la producción y secreción de compuestos insecticidas de éste (Shah *et al.* 2005; Safavi *et al.* 2007, Peteira *et al.* 2011). Safavi *et al.* (2007) mencionan también el efecto que puede tener el medio de cultivo en la germinación de conidios, que como se indicó puede ser de gran importancia a la hora de conocer las dosis administradas. En estas publicaciones se muestran respuestas diferentes de varios aislamientos ante las mismas condiciones de cultivo, lo cual respalda la idea que cada aislamiento tiene *per se* diferencias intrínsecas. Bajo esa perspectiva, infectar y crecer sobre una especie de insecto en particular también representa otro “medio de cultivo” sobre el que algunos aislamientos se desarrollaran mejor que otros. Lo que sustenta que para cada plaga agrícola en particular, se debe seleccionar el aislamiento de *B. bassiana* más efectivo.

Por otra parte, se ha observado que realizar sub-cultivos en medios sintéticos (pases continuos en medio artificial) puede reducir significativamente las propiedades biológicas de los aislamientos de *B. bassiana*. Se observó una relación entre la frecuencia de subcultivos y la reducción en el crecimiento radial, esporulación y viabilidad de los conidios (Rajanikanth *et al.* 2011). No se sabe si éste sea el caso para alguno de los aislamientos utilizados en esta investigación, debido a la poca información respecto a su procedencia (Anexo 1) y al procedimiento de cultivo que fueron expuestos.

Cabe mencionar, que un factor importante a considerar cuando se habla de hongos entomopatógenos es la presencia de micovirus. Los virus que infectan hongos, al igual que los virus de animales y plantas, requieren de las células de otros organismos para replicarse pero con la diferencia de que no tienen una ruta de infección extracelular, por lo que solo se transmiten por medio de división celular, esporulación o fusión. La mayoría de micovirus poseen un genoma compuesta por ARNs de doble banda y una minoría por ARN de una sola banda (Son *et al.* 2015). Por lo tanto, patrones de bandas de ARNdb son los que se utilizan para determinar tentativamente la presencia de micovirus presentes en una muestra.

En la mayoría de los casos las infecciones por micovirus se consideran latentes o crípticas, ya que producen poco o ningún efecto en el huésped (Liu *et al.* 2012; Yu *et al.* 2015). Sin embargo, se ha observado que algunos causan crecimiento irregular, pigmentación anormal y reproducción sexual alterada. También son capaces de producir hipovirulencia en algunos hongos patógenos de plantas (Son *et al.*, 2015). Por esta razón, surgió un interés e investigación de los micovirus como posibles controladores de hongos nocivos para cultivos (Liu *et al.* 2012; Son *et al.* 2015; Yu *et al.* 2013, Yu *et al.* 2015).

La presencia de micovirus en hongos entomopatógenos se ha documentado. Herrero *et al.* (2012) estudiaron la diversidad de micovirus en aislamientos de *B. bassiana* de España y Portugal, encontrando una alta frecuencia de infección por estos virus (54% de las muestras) y que había un mayor porcentaje de infección en aislamientos endofíticos (66.7%) que en las muestras aisladas del suelo (51.7%). Así mismo, se determinó una alta variabilidad en los patrones de ARN doble banda, lo cual indica una alta diversidad de virus presente en este hongo, además de la posibilidad de infecciones mixtas según los patrones obtenidos.

Como se ha mencionado, investigaciones relativamente recientes hablan de que la presencia de micovirus puede provocar hipovirulencia; sin embargo, se encontró una investigación en la que mencionan que la presencia de este tipo de virus produjo una ligera hipervirulencia al comparar el comportamiento de un mismo aislamiento de *B. bassiana* infectado con micovirus y uno libre de infección contra larvas de una polilla (Kotta-Loizou & Coutts, 2017). No puede descartarse la posibilidad que alguno de los aislamientos utilizados en esta investigación puedan estar infectados por micovirus y que éstos puedan afectar la capacidad patogénica de los mismos. Antes de utilizar alguno de estos aislamientos en el control de *A. citricidus* o de cualquier otro insecto es recomendable determinar si el aislamiento de interés está infectado por micovirus.

#### 6.2. PCR para la detección de *B. bassiana* a partir de un solo áfido *Aphis citricidus*

En este trabajo se buscó la forma de confirmar que la muerte de los áfidos se debía a que habían sido infectados por el hongo de interés y descartar la muerte del insecto por algún otro factor. Por esta razón, se decidió probar dos protocolos de PCR para detectar *B. bassiana* a partir de un solo áfido. Inicialmente, se decidió probar los protocolos con muestras de ADN de los aislamientos puros, para observar si existían diferencias en la amplificación o si requerían de alguna modificación previa. Sin embargo, ninguno de los dos protocolos presentó resultados satisfactorios para todas las muestras (Fig. 5-10).

En el caso de los marcadores SCAR, esto pudo deberse a que los marcadores desarrollados a partir de RAPD-SCAR suelen presentar baja reproducibilidad entre laboratorios, además de que las bandas que resultan de la técnica son muy débiles, lo cual puede complicar el análisis ya que resulta complicado distinguir las bandas (Johny & Kuei-Poku 2014). En otra investigación en la que utilizan el protocolo descrito por Castrillo *et al.* (2003) mencionan que no todos los imprimadores presentaron la capacidad para amplificar ADN del aislamiento que estaban utilizando (Biswas *et al.* 2012), por lo que terminaron empleando solamente uno de los tres imprimadores. Aunque Biswas *et al.* (2015) aseguran que en un PCR múltiple es más eficiente para detectar diferentes aislamientos, también mencionan varios problemas con los tres pares de imprimadores de Castrillo *et al.* (2003), ya que producían tamaños de amplicones diferentes según el aislamiento utilizado y uno de los imprimadores solo era capaz de amplificar uno de 43 aislamientos empleados, a pesar

de variar las condiciones de PCR para poder observar resultados positivos, entre ellos: cambiaron el número de ciclos, el tiempo y la temperatura, desnaturalización inicial, número de desnaturalizaciones iniciales, ciclos de amplificación y tiempo, y temperatura de “annealing”.

En cuanto al protocolo de Landa *et al.* (2013), se obtuvo amplificaciones inespecíficas, aun cuando los autores aseguran que su protocolo es específico para *Beauveria bassiana* ya que a la hora de realizar los experimentos, no presentó amplificación cruzada con muestras de planta, otros hongos ni oomycetes. Sin embargo, Johnny & Kyei-Poku (2014) mencionan que no incluyeron otras especies de *Beauveria* para evaluar especificidad y amplificación cruzada de una manera más certera. Esto podría explicar los resultados inespecíficos y, en ocasiones, no reproducibles que se obtuvieron en esta investigación al utilizar este protocolo (Figs. 7 y 8).

Aún con las limitaciones del protocolo de Landa *et al.* (2013), fue posible observar que los cadáveres provenientes de placas control no obtuvieron amplificaciones, tuvieran o no micelio visible creciendo en ellos, lo cual da cierta seguridad de que al menos, los áfidos muertos en dichas placas no fueron infectados por *B. bassiana* (al menos por los aislamientos que dicho protocolo si es capaz de diferenciar). Aunque también se debe notar que la cantidad de amplificaciones positivas fue bastante baja en general, sin importar si los cadáveres tenían micelio visible o no (Cuadro 5). Lo cual indica que el protocolo es poco eficiente. Se debe tener en cuenta que la alta diversidad genética de *Beauveria* puede estar jugando un papel importante en que los protocolos utilizados no hayan sido capaces de identificar la variedad de aislamientos utilizados en esta investigación (Rehner *et al.* 2011).

La alta variabilidad de *B. bassiana* se ve ejemplificada en los resultados obtenidos en esta investigación. Cuando se probaron 15 aislamientos de *B. bassiana* contra el áfido café de los cítricos, se observó un amplio ámbito de respuesta en la mortalidad observada, desde casi similar al control hasta el 100% de áfidos muertos. En cuanto a la sección de probar la patogenicidad de cuatro aislamientos de *B. bassiana* contra *A. citricidus*, se pudo determinar con mayor seguridad que el aislamiento BV-ECA15 es capaz de producir una mortalidad más alta en el áfido empleado que los otros aislamientos. En cuanto a la detección de *B. bassiana* a partir de un solo áfido por medio de PCR, solo se obtuvo amplificaciones positivas con el protocolo de Landa *et al.* (2013), aunque éste fue incapaz de detectar todas

los aislamientos utilizados de manera certera y los resultados de amplificación fueron relativamente bajos.

## Conclusiones

- Los aislamientos utilizados de *Beauveria bassiana* presentaron una alta variabilidad en su capacidad patogénica contra el áfido café de los cítricos.
- Dicha variabilidad se puede deber a diversos factores incluyendo variables ambientales, características intrínsecas tanto de cada aislamiento como del áfido de interés.
- Algunos aislamientos de *B. bassiana* presentaron un potencial patogénico prometedor contra *A. citricidus*.
- La caracterización de 15 aislamientos de *B. bassiana* indican algunos aislamientos que podrían utilizarse para estudios futuros y poder evaluar en más detalle su capacidad para infectar *Aphis citricidus*.
- Al determinar la patogenicidad de cuatro aislamientos de *B. bassiana*, se concluye que el aislamiento BV-ECA15 produce una mayor mortalidad en *A. citricidus* en condiciones de laboratorio.
- Los protocolos de PCR utilizados resultaron ineficientes para la amplificación de las muestras de *B. bassiana* aquí utilizadas.

## Recomendaciones

- Realizar todos los bioensayos bajo condiciones estables (cámara de crecimiento) de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo para poder tener una mayor seguridad de que los resultados observados se deben solamente a las diferencias intrínsecas de cada uno de los aislamientos utilizados.
- Utilizar otros de los aislamientos con resultados prometedores (ej. BV-ECA28 y BV-ECA29) para realizar protocolos de bioensayos más robustos y poder obtener resultados más confiables sobre su capacidad patogénica.
- Para los bioensayos en general, aumentar el número placas y repeticiones en el tiempo de los aislamientos para obtener resultados más confiables.
- Disminuir al mínimo posible la manipulación innecesaria de los áfidos para reducir el número de posibles muertes por estrés o maltrato de los insectos.
- Realizar estudios de viabilidad de los conidios para tener el dato de la concentración realmente colocada de cada aislamiento y poder realizar comparaciones de los resultados con más fiabilidad.
- Realizar un estudio de micovirus en los aislamientos para discernir si la presencia de estos virus en las muestras utilizadas pueda estar afectando de alguna forma el comportamiento virulento de los hongos.
- Disminuir al mínimo el número de subcultivos de los aislamientos, ya que puede disminuir la virulencia de las muestras contra insectos.

- Utilizar otros imprimadores para la detección de *B. bassiana* mencionados en la literatura para poder obtener resultados satisfactorios a la hora de detectar la presencia de dicho hongo en las muestras de cadáveres expuestos a él.

## Bibliografía

- Agarwala, B.K. & Bhattacharya, S. (1995). Seasonal abundance of black citrus aphid *Toxoptera aurantii* in North-East India: role of Temperature. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, *B61*(5), 377-382.
- Agresti, A. (2002). *Categorical data analysis*. Florida: Wiley-Interscience.
- Agusti, M. (2000). *Citricultura*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Akbari, S., Safavi, S.A. & Ghosta, Y. (2014). Efficacy of *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* L. (Hem.: Aphididae) in laboratory condition. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *47*(12), 1454-1458.
- Aqueel, M.A. & Leather, S.R. (2012). Virulence of *Verticillium lecanii* (Z.) against cereal aphids; does timing of infection affect the performance of parasitoids and predators? *Pest Management Science*, *69*(4), 483-498.
- Armstrong, R.A. (2014). When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic & Physiological Optics*, *34*(5), 502-508. doi.org/10.1111/opo.12131
- Asante, S.K., Danthanarayana, W. & Heatwole, H. (1991). Bionomics and population growth statistics of apterous virginoparae of woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum*, at constant temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *60*(3), 261-270.
- Badilla, F., Alfaro, G., Chan, I, Sáenz, C., Madriz, T. (1993). Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* al picudo de caña de azúcar *Metamasius hemipterus* Linee, 1764 (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio y campo. Cartago: DIECA.
- Biswas, C., Dey, P., Gotyal, B.S. & Satpathy, S. (2015). A method of multiplex PCR for detection of field released *Beauveria bassiana*, a fungal entomopathogen applied for pest management in jute (*Corchorus olitorius*). *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(4), 675-679.
- Biswas, C., Dey, P, Satpathy, S. & Satya, P. (2012). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in yute

- (*Chorchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. *BioControl*, 57(4), 565-571.
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (2000). Aphids on the world's crops: an identification and information guide. Inglaterra: Ed. Wiley, J. & Sons LTD. 2<sup>nd</sup> Ed.
- Bustillo-Pardey, A.E. (2003). El uso de hongos para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). En Uribe-Mejía, P. (Ed), *Curso internacional teórico-práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos de la broca del café* (pp. 1-53). San José: CENICAFE.
- Bustillo-Pardey, A.E. (2003). Los hongos entomopatógenos en el control de insectos plaga. En Uribe-Mejía, P. (Ed), *Curso internacional teórico-práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos de la broca del café* (pp. 1-53). San José: CENICAFE.
- Canto, T., Aranda, M.A., & Fereres, A. (2009). Climate change effects on physiology and population processes of host and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biology*, 15(8), 1884-1894. doi: 10.1111/j.1365-2486.2008.01820.x
- Castillo-Lopez, D., Zhu-Salzman, K., Ek-Ramos, M., & Sword, G. A. (2014). The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. *Plos ONE*, 9(8), 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0103891
- Castineiras, A., Peña, J.E., Duncan, R. & Osborne, L. (1996) Potential of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as biological control agents of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Florida Entomologist*, 79(3), 458-461.
- Castrillo, L.A., Vandenberg, J.D. & Wraight, S.P. (2003). Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(2), 75-83. doi:10.1016/S0022-2011(02)00190-8

- Chase, A.R., Osbrone, L.S. & V.M. Ferguson.(1986). Selective insolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomologist*, 69(2), 285-292.
- Cocceo, A., Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A: (2009). Parasitism of the Brown Citrus Aphid in Dominica by *Lysiphlebus tetaceipes* and *Lipolexis oregmae* (Hymenoptera: Aphidiinae). *The Florida Entomologist*, 92(3), 497-499.
- Dabhi, M.V., Koshiya, D.J. & Korat, D.M. (2013). Effect of abiotic factor son population of aphid and damage by shoot & fruit borer in okra during summer and *kharif*season at Anand in Gujarat.*Journal of Agrometeorology*, 15(1), 71-74.
- Das, S, Pandey, V., Patel, H.R. & Patel, K.I. (2010). Effect of weather parameters on pest-disease of okra during summer season in middle Gujarat. *Journal of Agrometeorology*, 13(1), 38-42.
- Díaz, B.M., López-Lostra, C.C., Oggerin, M., Fereres, A. & Rubio, V (2008). Identificación de hongos entomopatógenos asociados a pulgones en cultivos hortícolas en la zona centro de la Península Ibérica. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 34, 287-296.
- Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. (1991). *Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica*. San José: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Ebwongu, M., Adipala, E., Kyamanywa, S, Ssekabembe, C.K. & Bhagsary, A.S. (2001). Influence of spatial arrangements in maize / *Solanum* potato intercrops on incidence of potato aphids and leaf hoppers in Uganda. *African Crop Science Journal*, 9(1), 175-184.
- El-Otmani, M. & Ait-Oubahou, A. (2011). *Citrus* spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. En Yahia, E. (Ed.), *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*, Volume 2 (pp. 437-514). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- FAO.(2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. Recuperado de [faostat3.org/home/E](http://faostat3.org/home/E)
- French, E.R. & Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José: IICA

- Góngora-Botero, C.E., Marín-Marín, P. & Benavides-Machado, P. (2009). *Claves para el éxito del hongo Beauveria bassiana como controlador del biológico de la broca del café*. Caldas, Colombia: CENICAFE.
- Gottwald, T.R., Villalobos, W. & Rivera, C. (2002). Comparative epidemiology of *Citrus tristeza virus* in plantings of various *Citrus* species in Costa Rica, and long distance spread by the brown citrus aphid. Fifteenth IOCV Conference, 102-116.
- Griffin, M.R. (2007). *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. PhD diss., University of Tennessee.
- Güerri-Agulló, B., López-Follana, R., Asensio, L. Barranco, P. & Lopez-Llorca, L.V. (2011). Use of a solid formulation of *Beauveria bassiana* for biocontrol of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) (Coleoptera: Dryophthoridae) under field conditions in SE Spain. *Florida Entomologist*, 94(4), 737-747.
- Hernández-Torres, I., López-Arroyo, J.I., Berlanga-Padilla, A., Loera-Gallardo, J. & Acosta-Díaz, E. (2006). Efectividad de hongos entomopatógenos y vehículos de aplicación para el control del pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). *Vedalia*, 13(1), 17-26.
- Herrero, N., Dueñas, E., Quesada-Moraga, E., Zabalgoeazcoa, I. (2012). Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8523-8530.
- Hirano, K., Honda, K. & Miyai, S. (1996). Effects of temperatura on development, longevity and reproduction of the soybean aphid, *Aphis glycines* (Homoptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 31(1), 178-180.
- Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M. Chet, I. & Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451.
- Hunter, W.B.; Avery, P.B.; Pick, D. & Powell, C.A. (2011). Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* against insect pests of citrus. *The Florida Entomologist*, 94(4), 1051-1054.
- Jandricic, S.E., Filotas, M., Sanderson, J.P. & Wraight, S.P. (2014). Pathogenicity of conidia-based preparation of entomopathogenic fungi against the greenhouse est

- aphids *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* and *Aulocorthum solani* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 118, 34-46.
- Jeffs, C.T. & Leather, S. (2014). Effects of extreme, fluctuating temperature events, on life history traits of the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 150(3), 240-249.
- Jones, R.A.C. & Barbetti, M.J. (2012). Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by virus and bacteria. *CAB Reviews*, 7(22), 1-31.
- Kim, J.J., Jeong, G., Han, J.H. & Lee, S. (2013). Biological control of aphid using fungal culture and culture filtrates of *Beauveria bassiana*. *Mycobiology*, 41(4), 221-224. doi:10.5941/MYCO.2013.41.4.221
- Kirkland, B.H.; Westwood, G.S. & Keyhani, N.O. (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes scappularis*. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 705-711.
- Knutson, A.E. & Gilstrap, F. E. (1990). Seasonal occurrence of *Beauveria bassiana* in the southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in the Texas High Plains. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 63(2), 243-2511.
- Koga, R., Tsuchida, T. & Fukatsu, T. (2003). Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270, 2543-2550. doi 10.1098/rspb.2003.2537
- Lagos, D.M., Voegtlin, D.J., Coeur d'acier, A., Giordano, R. (2014). *Aphis* (Hemiptera: Aphididae) species groups found in the Midwestern United States and their contribution to the phylogenetic knowledge of the genus. *Insect Science*, 21(3), 374-391. doi: 10.1111/1744-7917.12089
- Landa, B.B, López-Días, C., Jiménez-Fernández, D. Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F.J., Ortiz-Urquiza, A. & Quesada-Moraga, E. (2013). In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*, 144(2), 128-138.

- Lawson, J. (2015). *Design and analysis of experiments with R*. Utah: CRC Press.
- Liu, Y., Facheng, Z. & Shusheng, L. (2003). Effects of moulting in *Myzus persicae* on the virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Acta Entomologica Sinica*, 46(4), 441-446.
- Liu, H., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S., Li, G., Peng, Y., Yi, X. & Jiang, D. (2012). Evolutionary genomics of mycovirus-related dsRNA viruses reveals cross-family horizontal gene transfer and evolution of diverse viral lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 12(91), 2-15.
- Liu, T.X. & Sparks Jr, A.N. (2001). Aphids on cruciferous crops: identification and management. *Texas FARMER Collection*.
- Loc, N.T., Bichi-Chi, V.T., Nhan, N.T., Be-Hong, T.T., *et al.* (2010). Exploitation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as potential biocontrol agents in integrated pest management (IPM) on *Citrus*. *Omonrice*, 17, 152-163.
- Lozano-Gutiérrez, J. & España-Luna, M.P. (2008). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the white grub *Laniifera cyclades* (Lepidoptera: Pyralidae) under field and greenhouse conditions. *Florida Entomologist*, 91(4), 664-668.
- Ludwig, S.W. & Oetting, R.D. (2002) Efficacy of *Beauveria bassiana* plus insect attractants of enhanced control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Florida Entomologist*, 85(1), 270-272.
- Lukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J. & Godfray, H.C.J. (2012) Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology Letters*, 16(2), 214-218.
- Maruthadurai, R. (2018). Effect of weather parameters on population dynamics of aphid, *Aphis odinae* (van der Goot) (Hemiptera: Aphididae) on cashew in Goa. *Journal of Agrometeorology*, 20(1), 84-86.
- Meena, R.S., Ameta, O.P. & Meena, B.L. (2013). Population dynamics of sucking pests and their correlation with weather parameters in chilli, *Capsicum annum* L. crop. *The Bioscan*, 8(1), 177-180.
- Michaud, J. P. (1998). A review of the literature on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). *Florida Entomologist*, 81(1), 37-61.

- Michaud, J.P. (2001). Evaluation of green lacewings, *Chrysoperla plorabunda* (Fitch) (Neurop., Chrysopidae), for augmentative release against *Aphis citricidus* (Hom., Aphididae) in citrus. *Journal of Applied Entomology*, 125(7), 383-388.
- Miranda-Vindas, A. & Blanco-Metzler, H. (2013). Control de *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), en el fruto de piña, San Carlos, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 37(1), 103-111.
- Narjary, B., Adak, T., Meena, M.D. & Chakravarty, N.V.K. (2013). Population dynamics of mustard aphid in relation to humid thermal ratio and growing degree days. *Journal of Agricultural Physics*, 13(1), 39-47.
- Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W., Gwinn, K.D., Moulton, J.K. & Pereira, P.M. (2008). *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267-270.doi:10.1016/j.jip.2008.01.010
- Parker, B.J., Spragg, C.J., Altincicek, B. & Gerardo, N. (2013). Symbiont-mediated protection against fungal pathogens in pea aphids: a role for pathogen specificity?. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2455-2458.
- Pautasso, M., Döring, T.F., Gerbelotto, M., Pellis, L. & Jeger, M. (2012). Impacts of climate change on plant diseases opinions and trends. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 295-313.
- Persad, A.B., Hoy, M.A. & Nguyen, R. (2007). Establishment of *Lipolexis oregmane* (Hymenoptera: Aphidiidae) in a classical biological control program directed against the Brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Florida. *The Florida Entomologist*, 90(1), 204-213.
- Peteira, B., Gonzáles, I., Arias, Y., Fernández-Turro, A., Miranda, I., Martínez, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 16-22.
- Pick, D.A., Avery, P.B., Hunter, W.B, Powell, C.A. & Arthurs, S.P. (2012). Effect of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and *Lysiphlebus testaceipes*, (Hymenoptera: Braconidae) on the brown citrus aphid: preliminary assessment of a compatibility study. *The Florida Entomologist*, 95(3), 764-766.

- Porras, L. & Lecuona, R. (2008). Estudios de laboratorio para el control de *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae) (Mosca del mediterráneo) con *Beauveria bassiana*. *Agronomía costarricense*, 32(2), 119-128.
- Quesada-Moraga, E., Landa, B.B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R.M. & Santiago-Álvarez, C. (2006). Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, 161(5), 323-329.
- Quirós-Arias, L. (2005). Agricultura orgánica y desarrollo rural: la naranja orgánica en Costa Rica. *Revista Geográfica*, 137, 5-33.
- Rafi, M.M., Zemetra, R.S. & Quisenberry, S. S. (1997). Feeding damage of Russian wheat aphid on resistant and susceptible wheat genotypes. *Cereal Research Communications*, 25(1), 63-68.
- Rajanikanth, P., Subbaratnam, G.V. & Rahaman, S.J. (2011). Effect of frequency of subculturing of different isolates of *Beauveria bassiana* Vuillemin on their biological properties. *International Journal of Bio-Resource & Stress Management*, 2(1), 60-65.
- Rashki, M. & Shirvani, A. (2013). The effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on life table parameters and behavioural response of *Aphis gossypii*. *Bulletin of Insectology*, 66(1), 85-91.
- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L. & Humber, R.A. (2011). Phylogeny and systematic of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073. Doi:100.3852/10-302.
- Reinert, J.A. Knauf, T.A., Maranz, S.J. & Bishr, M. (1999). Effect of *Beauveria bassiana* fungus on the boxelder and red shouldered bugs (Hemiptera: Rhopalidae). *The Florida Entomologist*, 82(3). 469-474.
- Rodríguez, A. & Sáenz, C.E. (1999). Metodología para la reproducción y almacenamiento de los hongos entomopatógenos utilizados para el control de plagas en el cultivo de caña de azúcar. LAICA-DIECA. XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. 140.

- Rodríguez-Leyva, E. & Lomelí-Flores, J.R. (2013). *Pulgón café de los cítricos Toxoptera citricidus* (Kirkaldy). (Informe Num. 37). Coyoacán: México. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- Safavi, S.A., Shah, F.A. Pakdel, A.K., Rasoulían, G.A., Bandani, A.R. & Butt, T.M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116-123.
- Salazar-Blanco, J.D. (2010). Importancia del uso del control biológico. *Boletín Conexión 3* (pp. 5), LAICA.
- Scarborough, C.L., Ferrari, J. & Godfray, H.C.J. (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 16, 1781. doi: 10.1126/science.1120180
- Shah, F.A., Wang, C.S. & Butt, T.M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 259-266.
- Shapiro-Ilan, D.I., Cottrell, T.E., Jackson, M.A. & Wood, B.W. (2008). Virulence of Hypocreales fungi to pecan aphids (Hemiptera: Aphididae) in the laboratory, 99(3), 312-317. doi:10.1016/j.jip.2008.07.001
- Son, M.; Yu, J. & Kim, K-H. (2015). Five questions about mycoviruses. *PLoS Pathology*, 11(11), e1005172. doi:10.1371/journal.ppat.1005172
- Spatafora, J.W., Sung, G.H., Sung, J.M., Hywel-Jones, N.L. & White, J.F. (2007). Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and grass endophytes. *Molecular Ecology*, 16(8), 1701-1711. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03225.x
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J. Shrestha, B. & Spatafora, J.W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57, 5-59. doi:10.3114/sim.2007.57.01
- Tafoya, F, Zuñiga-Delgadillo, M., Alatorre, R., Cibrian-Tavor, J. & Stanley, D. (2004). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the cactus weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*, 87(4), 533-536.

- van Driesche, R.G., Hoddle, M.S. & Center, T.D. (2007). *Control de plagas y malezas por enemigos naturales*. US Department of Agriculture, US Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J. & Blackwell, M. (2012). Fungal Entomopathogens. En Vega, F.E. & Kaya, H.K. (Eds.), *Insect Pathology* (pp. 171-220). Massachusetts: Academic Press.
- Vicente.M.E., Alippi, A.M. & Castro, A.M. (2017). Análisis de la interacción biológica entre los pulgones verde (*Schizaphis graminum*) y negro de los cereales (*Sipha maydis*) y sus endosimbiontes bacterianos: mecanismo de antibiosis. *Investigación Joven*, 4(2), 65.
- Voegtlin, D. & Villalobos, W. (1992). Confirmation of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricidus*, in Costa Rica. *Florida Entomologist*, 75(1), 161-162.
- Voegtlin, D., Villalobos, W., Sánchez, MV, Saborío, G. & Rivera, C. (2003). Guía de los áfidos alados de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 51(2), 1-214.
- Vu, V.H., Hong, S.I. & Kim, K. (2007). Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6), 498-505.
- Wang, J.J. & Tsai, J.H. (2005). Development and functional response of *Coelophora inaequalis* (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on the brown citrus aphid, *Aphis citricidus* (Homoptera: Aphididae). *Agricultural and Forest Entomology*, 3(1), 65-69.
- White, T.J., Bruns, T, Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (315-322). New York: Academic Press, Inc.
- Wraight, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A., Garza, C.J., Galaini-Wraight, S. (2000). Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolli*. *Biological Control*, 17, 203-217.
- Wraight, S.P., Ramos, M.E., Avery, P.B., Jaronski, S.T. & Vandenberg, J.D. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 186-199.

- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S., Li, G., Yi, X. & Jiang, D. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as natural fungicide. *Proceedings of Natural Academy of Sciences*, 110(4), 1452-1457.
- Yu, L., Sang, W., Wu, M., Zhang, J., Yang, L., Zhou, Y., Chen, W., Li, G. (2015). Novel hypovirulence-associated RNA mycovirus in the plant-pathogenic fungus *Botrytis cinerea*: molecular and biological characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2299-2310. doi:10.1128/AEM.03992-14.
- Zamora-Mejías, D., Hanson, P.E. & Starý, P. (2010). Survey of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Costa Rica with information on their aphid (Hemiptera: Aphidoidea): plant associations. *Psyche: A Journal of Entomology*. doi:10.1155/2010/278643
- Zamora-Mejías, D., Hanson, P.E., Starý, P. & Rakhshani, E. (2011). Parasitoid (Hym., Braconidae, Aphidiinae) complex of the black citrus aphid, *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hem., Aphididae) in Costa Rica and its relationships to nearby areas. *Journal of Entomological Research Society*, 13(3), 107-115.
- Zamora-Mejías, D., Pérez-Hidalgo, N, Villalobos, W. & Hanson, P. (2012). New data about the Costa Rican aphid fauna (Hemiptera, Aphididae). *Graellsia*, 68(2), 305-312.
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall Inc. 4<sup>ta</sup> Ed.

## Anexos

**Anexo 1:** Datos disponibles sobre sitio de recolección, orden y especie de la que fue recolectada, cultivo y país de los aislamientos utilizados en esta investigación.

	Aislamiento	Donado por	Origen	Orden	Especie	País	Provincia	Cultivo
1	BV-ECA0	Miguel Obregón	Suelo	-	-	Costa Rica	Cartago	ND
2	BV-ECA1	INA	ND	-	-	ND	ND	ND
3	BV-ECA8	CATIE	Suelo	Lepidoptera	<i>Galleria melonella</i>	Costa Rica	Limón	ND
4	BV-ECA9	CATIE	Insecto	ND	Larva	Costa Rica	ND	En un río
5	BV-ECA11	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND
6	BV-ECA12	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	San José	Caña de azúcar
7	BV-ECA13	CATIE	Insecto	Coleoptera	<i>Hypothenemus hampei</i>	Honduras	Comayagua	Café
8	BV-ECA14	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND
9	BV-ECA15	CICAFE	ND	-	<i>Hypothenemus hampei?</i>	Costa Rica	ND	Café
10	BV-ECA16	CICAFE	ND	-	<i>Hypothenemus hampei?</i>	Costa Rica	Cartago	Café
11	BV-ECA18	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	San José	Caña de azúcar
12	BV-ECA20	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND
13	BV-ECA21	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	San José	Caña de azúcar
14	BV-ECA23	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND

15	BV-ECA25	CORBANA	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	Caña de azúcar
16	BV-ECA27	CORBANA	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	Banano
17	BV-ECA28	CORBANA	Suelo	-	-	Costa Rica	Limón	Banano
18	BV-ECA29	CORBANA	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	Banano
19	BV-ECA30	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND
20	BV-ECA32	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND
21	BV-ECA33	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND
22	BV-ECA35	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND
23	BV-ECA36	CATIE	Suelo	-	-	Costa Rica	ND	ND

---

**Anexo 2:** Detección de *Beauveria bassiana* mediante PCR (Landa *et al.*, 2013) en cadáveres de *Aphis citricidus* provenientes de bioensayos donde los áfidos se expusieron a cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* o a tratamiento control.

Micelio visible <sup>1</sup>	Identificación de cadáver	Bioensayo	Tratamiento	PCR <sup>2</sup>		
				I	II	COX I <sup>3</sup>
Si	1	1	BV-ECA1	+	+	+
Si	2	1	BV-ECA1	-	-	+
Si	3	1	BV-ECA13	-	+	+
Si	4	1	BV-ECA13	+	-	-
Si	5	1	BV-ECA14	-	-	-
Si	6	1	BV-ECA14	+	+	+
Si	7	1	BV-ECA15	+	+	-
Si	8	1	BV-ECA15	-	+	-
Si	9	1	Control	-	-	+
Si	10	1	Control	-	-	-
Si	11	2	BV-ECA1	+	+	-
Si	12	2	BV-ECA1	+	+	+
Si	13	2	BV-ECA13	+	+	-
Si	14	2	BV-ECA13	-	-	+
Si	15	2	BV-ECA14	+	+	+
Si	16	2	BV-ECA14	-	+	+
Si	17	2	BV-ECA15	+	+	-
Si	18	2	BV-ECA15	+	+	-
Si	19	2	Control	-	-	+
Si	20	2	Control	-	-	+
Si	21	4	BV-ECA1	+	+	+
Si	22	4	BV-ECA1	+	+	+
Si	23	4	BV-ECA13	+	+	+
Si	24	4	BV-ECA13	-	-	+

Si	25	4	BV-ECA14	-	+	+
Si	26	4	BV-ECA14	+	+	-
Si	27	4	BV-ECA15	-	-	+
Si	28	4	BV-ECA15	-	-	+
Si	29	4	Control	-	-	+
Si	30	4	Control	-	-	+
No	31	2	BV-ECA13	+	+	+
No	32	2	BV-ECA13	-	-	-
No	33	2	BV-ECA14	+	+	+
No	34	1	Control	-	-	+
No	35	1	Control	-	-	+
No	36	2	BV-ECA13	+	+	+
No	37	2	BV-ECA13	+	+	+
No	38	2	BV-ECA14	+	+	+
No	39	2	BV-ECA14	-	-	+
No	40	2	BV-ECA15	+	+	+
No	41	2	Control	-	-	+
No	42	2	Control	-	-	+
No	43	4	BV-ECA1	-	-	+
No	44	4	BV-ECA1	+	-	-
No	45	4	BV-ECA13	-	-	+
No	46	4	BV-ECA13	-	-	+
No	47	4	BV-ECA14	-	+	+
No	48	4	BV-ECA14	+	-	-
No	49	4	Control	-	-	+
No	50	2	Control	-	-	+
-	51 (BV-ECA1)	-	Control	+	+	-
-	52 (BV-ECA13)	-	Control	+	+	-
-	53 (BV-ECA14)	-	Control	+	+	-
-	54 (BV-ECA15)	-	Control	+	+	-

-	Afido	-	Control -	-	-	+
-	Agua	-	Control -	-	-	-

<sup>1</sup> Presencia de micelio en los cadáveres de áfido evaluada siete días después de terminado el bioensayo respectivo. Cadáveres incubados a temperatura ambiente en tubos de microcentrífuga.

<sup>2</sup> PCR realizado con imprimadores internos (segunda ronda de amplificación) del protocolo de Landa *et al.*, (2013). Se presenta el resultado de dos repeticiones: I y II. “+” = amplificación positiva y “-” = no hubo amplificación.

<sup>3</sup> PCR realizado con los imprimadores LepF y LepR para la detección de la citocromo oxidasa mitocondrial del insecto.

**Anexo 3:** Áfidos muertos, cadáveres con micelio visible a la hora de la recolección y cadáveres con micelio visible luego de siete días en cámara húmeda obtenidos luego de seis bioensayos realizados utilizando 15 aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre *Aphis citricidus*.

Bioensayo	Áfidos muertos	Micelio visible	Micelio visible (siete días)
18	101	34	98
19	29	6	25
21	61	15	51
22	139	20	109
23	132	14	116
29	65	7	57
<b>Total</b>	<b>527</b>	<b>96</b>	<b>456</b>

**Anexo 4:** Áfidos muertos, cadáveres con micelio visible a la hora de la recolección y cadáveres con micelio visible luego de siete días en cámara húmeda obtenidos luego de cuatro bioensayos según el tratamiento de *Beauveria bassiana* utilizado sobre *Aphis citricidus*.

Tratamiento		Bioensayo			
		1	2	3	4
Control		11	10	12	8
BV-ECA1		30	30	13	25
BV-ECA13	Muertos	25	28	19	15
BV-ECA14		21	23	17	19
BV-ECA15		30	29	27	22
<b>Total</b>		<b>117</b>	<b>120</b>	<b>88</b>	<b>89</b>
Control		0	1	5	0
BV-ECA1	Micelio	5	20	2	15
BV-ECA13	visible	1	12	1	1
BV-ECA14		7	12	6	4
BV-ECA15		3	16	14	8
<b>Total</b>		<b>16</b>	<b>61</b>	<b>28</b>	<b>28</b>
Control		7	7	12	7
BV-ECA1	Micelio	30	30	12	23
BV-ECA13	visible	23	22	17	12
BV-ECA14	(siete días)	17	20	15	17
BV-ECA15		30	28	25	22
<b>Total</b>		<b>107</b>	<b>107</b>	<b>81</b>	<b>81</b>