



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

---

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS Y METABOLITOS DE *Beauveria bassiana*  
(ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) Y SU EVALUACIÓN COMO  
AGENTES DE CONTROL DE *Bradysia impatiens* (DIPTERA:  
SCIARIDAE)**

**TESIS**

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:**

**VÍCTOR HUGO MARÍN CRUZ**

**COMITÉ TUTORAL**

Director:

**Dra. Silvia Rodríguez Navarro**

Co-Director:

**Dr. Juan Esteban Barranco Florido**

Asesor:

**Dr. David Cibrián Tovar**

**Ciudad de México, septiembre de 2018.**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00007

Matrícula: 2143805932

Producción de enzimas y metabolitos de *Beauveria bassiana* (Ascomycota Hypocreales) y su evaluación como agentes de control de *Bradysia imbricatus* (Diptera: Sciaridae)



En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 13 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE TULIO MENDEZ MONTIEL
- DR. DAVID CIBRIAN TOVAR
- DR. JUAN ANTONIO CRUZ RODRIGUEZ
- DRA. SILVIA EDITH GARCIA DIAZ
- DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

DE: VICTOR HUGO MARIN CRUZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

## APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

MTRO. RAFAEL DIAZ GARCIA

PRESIDENTE

DR. JOSE TULIO MENDEZ MONTIEL

VOCAL

DR. DAVID CIBRIAN TOVAR

VOCAL

DR. JUAN ANTONIO CRUZ RODRIGUEZ

VOCAL

DRA. SILVIA EDITH GARCIA DIAZ

SECRETARIO

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO  
CASTAÑEDA

**Dedico esta tesis doctoral**

**A**

**Mi esposa**

**Martha Susana**

**Mis hijos**

**David Axayacatl,**

**Tonantzin Verónica**

**Victor Tlacaelel**

**Mi madre**

**Martha Elba**

# AGRADECIMIENTOS

Me es grato agradecerle a la Dra. Silvia Rodríguez Navarro, quien me recibió como su alumno sin conocerme, brindándome toda la confianza y apoyo, además de siempre realizarme sugerencias y/o correcciones muy atinadas.

Agradezco sinceramente al Dr. Juan Esteban Barranco Florido, por abrirme las puertas de su proyecto de investigación y por apoyarme incondicionalmente, con sus conocimientos, brindándome sus consejos y/o correcciones, las cuales me hicieron crecer como persona e investigador.

Mi reconocimiento a el Dr. David Cibrián Tovar, quien siempre me ofreció sus consejos y apoyo.

Mi gratitud a la Dra. Maria Celina Micaela Llandea Cazares, quien me brindo su tiempo y conocimientos para revisar mi trabajo del tracto digestivo de *Bradysia impatiens*.

Agradezco al M.C. Osvaldo López Díaz, por haberme dado todas las facilidades en su laboratorio para realizar los cortes histológicos de *Bradysia impatiens*.

Mi reconocimeinto a C. Ricardo Marín Cruz, por brindarme sus conocimientos en diseño, para realizar los esquemas en este estudio.

**Sinceramente muchas gracias a todos**

## **Comité tutorial**

Director Dra. Silvia Rodríguez Navarro

Profesora del Departamento de Producción Agrícola y Animal

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Co-Director Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Profesor del Departamento de Sistemas Biológicos

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor Dr. David Cibrián Tovar

Profesor de la División de Ciencias Forestales

Universidad Autónoma Chapingo

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Sistemas Biológicos, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Laboratorio del Insectario del Departamento de Producción Agrícola y Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Laboratorio de histopatología del Departamento de Producción Agrícola y Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Centro Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC), de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Esta tesis fue realizada dentro del programa del Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

El financiamiento de esta tesis fue otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca número 258065 durante el período 2014-2018.

## TRABAJOS REALIZADOS DURANTE EL DOCTORADO.

### Artículos en revistas indizadas

1. **Marín-Cruz, V. H.**, Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Florido, J. E., Cibrián-Tovar, D. 2017. Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 23(3): 329- 340.
2. Rodríguez, N. S., Barranco, F. J. E., Terrón, S. R. A., **Marín, C. V. H.** 2017. Extractos crudos producidos por fermentación de hongos entomopatógenos para el control de *Macrodactylus infuscatus* Bates (Coleoptera: Melolonthidae): Una alternativa hacia la sustentabilidad. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente. 17(33): 17-30.
3. Sánchez-Pérez, Ll., Rodríguez-Navarro, S., **Marín-Cruz, V. H.**, Ramos-López, M. A., Palma Ramos, A., Barranco-Florido, J. E. 2016. Assessment of *Beauveria bassiana* and Their Enzymatic Extracts against *Metamasius spinolae* and *Cyclocephala lunulata* in Laboratory, Advances in Enzyme Research. 4: 98-112.
4. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Barranco, F. J. E., Cibrián, T. D. 2015. Hongos entomopatógenos y sus metabolitos, una alternativa sustentable para el control de plagas en viveros forestales y agricultura protegida: caso *Bradysia impatiens* (Johannsen), Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente 15: 111-134.



### **Artículos en revisión en revistas indizadas**

1. Metabolitos y Conidios de *Beauveria bassiana* Como Control de Mosco Negro Fungoso, Bajo Condiciones de Invernadero. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Barranco, F. J. E., Terrón, S. R. A., Cibrián, T. D. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Universidad Autónoma Chapingo. **Aceptado el 25 de julio de 2018 en la revista Southwestern Entomologist (ISSN: 0147-1724).**
2. Morfología, fisiología e histología del tracto digestivo en larvas *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). **MARÍN-CRUZ, V. H.** RODRÍGUEZ-NAVARRO, S., BARRANCO-FLORIDO, J. E., TERRÓN-SIERRA, R. A. y CIBRIÁN-TOVAR, D. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Universidad Autónoma Chapingo. **Enviado a la revista Colombiana de Entomología, marzo de 2018 (ISSN: 0120-0488).**

### **Publicación de capítulos de libro científico**

1. **Marín C., V. H.**, Huerta. H., Rodríguez N., S. (2017). TITULO: Familia Sciaridae. En: Cibrián T., D. (Ed.). *Fundamentos de Entomología Forestal*. (pp: 444-446). Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México, México.
2. Huerta., H. y **Marín C., V. H.** (2017). TITULO: Familia CECIDOMYIIDAE. En: Cibrián T., D. (Ed.). *Fundamentos de Entomología Forestal*. (pp: 447-450). Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México, México.



## Presentaciones en congresos

1. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Terrón, S. R. A. y Barranco, F. J. E. 2018. Enemigos Naturales de *Stenomacra marginella* (Herrich-Schaefer) (Hemiptera: Largidae). En Tercera Reunión Científica Interinstitucional sobre Biodiversidad Biológica. Presentación: Cartel.
2. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Terrón, S. R. A. y Barranco, F. J. E. 2018. Incidencia de Enemigos Naturales en el Ciclo Biológico de *Stenomacra marginella* (Herrich-Schaefer) (Hemiptera: Largidae). En Tercera Reunión Científica Interinstitucional sobre Biodiversidad Biológica. Presentación: Cartel.
3. Rodríguez, N. S., Terrón, S. R. A., Ramírez, S. S. E., **Marín, C. V. H.** y Barranco, F. J. E. 2018. Araña Roja Asociada a Moringa en Invernadero, en “Las Animas” Tulyehualco, Ciudad de México. En Tercera Reunión Científica Interinstitucional sobre Biodiversidad Biológica. Presentación: Cartel.
4. **Marín, C. V. H.** y Huerta, H. 2017. Aspectos generales sobre la taxonomía y biología de las familias SCIARIDAE y CECIDOMYIIDAE. En XIX Simposio Nacional de Parasitología Forestal. Presentación: Ponencia.
5. Rodríguez, N. S., Ojeda, C. M., **Marín, C. V. H.** y Barranco, F. J. E. 2017. Incidencia de *Tetranychus merganser* boudreaux (TETRANYCHIDAE) En *Moringa oleifera* LAM. (MORINGACEAE) En Acuexcomatl, CD. de México. En 6ra congreso y 2a Feria Técnico-Científica Del Departamento de Producción Agrícola y Animal 2017. Presentación: Cartel.

6. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Terrón, S. R. A. y Barranco F. J. E. 2017. Enemigos Naturales de *Stenomacra marginella* HERRICH-SCHAEFFER (HEMIPTERA: LARGIDAE). En 6<sup>to</sup> congreso y 2a Feria Técnico-Científica Del Departamento de Producción Agrícola y Animal 2017. Presentación: Cartel.
7. Rodríguez, N. S., **Marín, C. V. H.**, Barranco F. J. E. y Terrón, S. R. A. 2017. Alternativas Para el Control de Plagas en Agricultura Urbana de la CD. de México. En 1a Jornada de Trabajo e Investigación Científica 2017. Presentación: Ponencia.
8. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Barranco F. J. E. y Terrón, S. R. A. 2017. Efecto Insecticida e Insectistático de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) en Larvas de *Bradysia impatiens* Johannsen (DIPTERA: SCIARIDAE). En 1a Jornada de Trabajo e Investigación Científica 2017. Presentación: Cartel.
9. Rodríguez, N. S., **Marín, C. V. H.** y Barranco F. J. E. 2017. Introducción de *Aceria malherbae* Nuzzaci (ACARI: ERIOPHYIDAE) para el Control Biológico de *Convolvulus arvensis* L. (SOLANALES: CONVOLVACEAE) en el Estado de Sonora, México. En Foro Avances y Perspectivas del que Hacer Científico, Académico y Social del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca. Presentación: Ponencia.
10. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2017. Producción de Enzimas y Metabolitos de *Beauveria bassiana* (ASCOMYCOTA: HIPOCREALES) y su Evaluación como Agentes de Control de *Bradysia impatiens* (DIPTERA: SCIARIDAE). En Foro Avances y Perspectivas del que

Hacer Científico, Académico y Social del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco. Presentación: Ponencia.

11. **Marín, C. V. H.,** Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2017. Efecto Insectistático de Metabolitos Secundarios, Enzimas y Conidios de *Bradysia impatiens* (DIPTERA: Sciaridae). En XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Presentación: Cartel.
12. **Marín, C. V. H.,** Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2017. Efecto Insecticida de Conidios, Metabolitos Secundarios y Enzimas de *Beauveria bassiana* Como Agentes de Control de *Bradysia impatiens* (DIPTERA: Sciaridae). En XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Presentación: Cartel.
13. **Marín, C. V. H.,** Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2017. Fisiología del Intestino Medio en Larvas de Cuarto Estadio de *Bradysia impatiens* (DIPTERA: Sciaridae). En XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Presentación: Cartel.
14. **Marín, C. V. H.,** Sánchez, L. A. R. A., Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2017. Conidios y Extractos Enzimáticos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, para el Control de *Dendroctonus* spp. (COLEOPTERA: Scolytidae) en Laboratorio. En XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Presentación: Cartel.
15. **Marín, C. V. H.,** Terrón, S. R. A. Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2016. Control Biológico de *Malacosoma incurvum* Edwards (LEPIDOPTERA: LASIOCAMPIDAE), con *Beauveria bassiana* Steinhaus en Condiciones de

- Laboratorio. En XXXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Presentación: Cartel.
16. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2016. Efecto insecticida de enzimas y metabolitos secundarios de *Beauveria bassiana* en larvas de *Malacosoma incurvum* (Lepidoptera: Lasiocampidae) en laboratorio. En V Congreso Internacional de Avances de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y Todas las Disciplinas. Presentación: Cartel.
  17. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2016. Anatomía del Tubo Digestivo en Larvas de Cuarto Estadio de *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). En V Congreso Internacional de Avances de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y Todas las Disciplinas. Presentación: Cartel.
  18. Terrón, S. R. A., Rodríguez, N. S. y **Marín, C. V. H.** 2016. Estudio Preliminar de un Parasitoide de Ninfas y Adultos de *Stenomacra marginella* (Herrich-Schaefer) (Hemiptera: Largidae) en México. En 5° Congreso y 1a feria Técnico-científica del Departamento de Producción Agrícola y Animal. Presentación: Cartel.
  19. Rodríguez, N. S., Barranco F. J. E., Terrón, S. R. A. y **Marín, C. V. H.** 2016. Control de *Macrodactylus infuscatus* Bates (Coleoptera: Melolonthidae) con Extractos Enzimáticos de Hongos Entomopatógenos *in vitro*. En 5° Congreso y 1a feria Técnico-científica del Departamento de Producción Agrícola y Animal. Presentación: Cartel.
  20. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S. y Barranco F. J. E. 2016. Avances Sobre la Morfología del Intestino en Larvas de Cuarto Estadio de *Bradysia impatiens*

- (Diptera: Sciaridae). En LI Congreso Nacional de Entomología. Presentación: Ponencia.
21. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Terrón, S. R. A. y Barranco F. J. E. 2016. Efectividad de Conidios, Enzimas y Metabolitos Secundarios de Hongos Entomopatógenos para el Control de *Stenomacra marginella* Herrich-Schaeffer (Hemiptera: Lagidae) en Laboratorio. En Primer Reunión Científica Interinstitucional Sobre Biodiversidad Biológica. Presentación: Cartel.
  22. Sánchez, L. A. R. A., Barranco F. J. E., **Marín, C. V. H.**, y Rodríguez, N. S. 2016. Hongos Entomopatógenos: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, una Alternativa para el Control de *Dendroctonus* spp. (Coleoptera: Scolytidae) en Condiciones de Laboratorio. En Primer Reunión Científica Interinstitucional Sobre Biodiversidad Biológica. Presentación: Cartel.
  23. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Barranco F. J. E. y Cibrián T. D. 2015. Evaluación de Conidios de Hongos Entomopatógenos Sobre *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae), Bajo Condiciones de Laboratorio. En XVIII Simposio Nacional de Parasitología Forestal. Presentación: Ponencia.
  24. **Marín, C. V. H.**, Sánchez, P. Ll., Rodríguez, N. S., Barranco F. J. E. y Almeida, A. C. A. 2015. Alternativas para el Control Biológico de *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae), Bajo Condiciones de Laboratorio. En XII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. Presentación: Cartel.
  25. Sánchez, P. Ll., Rodríguez, N. S., Barranco F. J. E. **Marín, C. V. H.**, y Almeida, A. C. A. 2015. Efecto Insecticida de Enzimas Hidrolíticas de *Beauveria bassiana* Obtenidas de FMS Sobre *Cyclocephala lunulata* Burm.

Bajo Condiciones de Laboratorio. En XII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. Presentación: Cartel.

26. **Marín, C. V. H.**, Rodríguez, N. S., Barranco F. J. E., Sánchez, P. Ll. y Terrón, S. R. A. 2015. Evaluación de Conidios de Hongos Entomopatógenos Sobre *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae), Bajo Condiciones de Laboratorio. En Reunión para el Rescate Integral de la Cuenca de Xochimilco. Presentación: Cartel.

27. Sánchez, P. Ll., Rodríguez, N. S., Barranco F. J. E. **Marín, C. V. H.**, Terrón, S. R. A. 2015. Persistencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de *Phyllophaga* spp. en cultivo de fresa orgánica, en San Mateo, Xalpa, Xochimilco. En Reunión para el Rescate Integral de la Cuenca de Xochimilco. Presentación: Cartel.

#### **Dirección de tesis de licenciatura**

1. Evaluación de Métodos de Control Biológico en *Chrysomela acripta* Fabricius y su Efecto en las interacciones de *Salix bonplandiana* Kunth. Universidad Autónoma Metropolitana, Licenciatura de Agronomía. Estudiante: Ahinoam Flores Aggi. Matricula: 2123025474.

## RESUMEN

Con la finalidad de proponer alternativas para el control químico de *Bradysia impatiens*; el objetivo de ésta tesis fue: evaluar conidios, enzimas y metabolitos de *Beauveria bassiana* como control de *B. impatiens*. Los resultados en laboratorio fueron: los conidios tuvieron una actividad insecticida (31.1% de mortalidad corregida), la actividad de las enzimas es nula. Los metabolitos a los 20 días tuvieron efecto insectistático, el cual se expresa en la malformación de adultos, pupas y una mortalidad de 47.5%. Al fraccionar los metabolitos de *B. bassiana* se encontró que tienen un efecto insecticida e insectistático, ocasionando una mortalidad de 76-92%. En el invernadero, los resultados del bioensayo en plántulas de ocote (*Pinus montezumae*) fueron: los conidios, metabolitos 500 y 1000 ppm, ofrecen una protección hasta por 60 días de 99.5, 97.5 y 100% respectivamente. El estudio del tracto digestivo en larvas de *B. impatiens* mostró que se divide en estomodeo, mesenteron y proctodeo; no presentan buche; el intestino medio está compuesto por células columnares, regenerativas y endocrinas; tienen dos ciegos gástricos; la membrana peritrófica es permeable a moléculas de 150 kDa; posee un gradiente de pH que va de alcalino-neutro, además tiene un mecanismo de recirculación que mejora la digestión. Las características morfofisiológicas de *B. impatiens* confirman su adaptación como detritívoros. En conclusión, los conidios y metabolitos de bajo peso molecular de *B. bassiana* son una alternativa para la prevención y control de poblaciones de *B. impatiens*.

**Palabras clave:** efecto insecticida; efecto insectistático; *Bradysia impatiens*; *Beauveria bassiana*; conidios; metabolitos.



## **Abstract**

In order to have alternatives to the chemical control of *Bradysia impatiens*. The objective of this thesis was: to evaluate conidia, enzymes and metabolites of *Beauveria bassiana* as a control of *B. impatiens*. The results in the laboratory were: the conidia had an insecticidal activity (31.1% of corrected mortality), the activity of the enzymes is null. The metabolites at 20 days had an insectistatic effect, which is expressed in the malformation of adults, pupae and a mortality of 47.5%. When fractionating the metabolites of *B. bassiana* it was documented that they have an insecticidal and insectistatic effect, causing a mortality of 76-92%. The results of the bioassay in greenhouse and ocote seedlings (*Pinus montezumae*) were: the conidia, metabolites 500 and 1000 ppm, offer protection for up to 60 days of 99.5, 97.5 and 100% respectively. The study of the digestive tract in *B. impatiens* larvae revealed that it is divided into stomodeum, mesenteron and proctodeum; The larvae do not present crop; the midgut is composed of columnar, regenerative and endocrine cells; they have two gastric caeca; the peritrophic membrane is permeable to 150 kDa molecules; It has a pH gradient that goes from alkaline-neutral, it also has a recirculation mechanism that improves digestion. The morphophysiological characteristics of *B. impatiens* confirm their adaptation as detritivores. In conclusion, conidia and low molecular weight metabolites of *B. bassiana* are an alternative for the prevention and control of populations of *B. imaptiens*.

**Keywords:** *insecticidal effect; Insectistatic effect; Bradysia impatiens; Beauveria bassiana; conidia; metabolites.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Objetivos específicos.....</b>	<b>4</b>
<b>3. CAPITULO 1.....</b>	<b>5</b>
<b>Insectistatic and Insecticide Activity of <i>Beauveria bassiana</i> in <i>Bradysia</i></b>	
<b><i>impatiens</i> (Diptera: Sciaridae).....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>3.3. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>3.4. Materiales y métodos.....</b>	<b>8</b>
<b>3.5. Resultados y discusión.....</b>	<b>10</b>
<b>3.6. Conclusión.....</b>	<b>15</b>
<b>3.7. Referencias.....</b>	<b>15</b>
<b>4. CAPITULO II</b>	<b>18</b>
<b>Metabolitos y Conidios de <i>Beauveria bassiana</i> Como Control de Mosco</b>	
<b>Negro Fungoso, Bajo Condiciones de Invernadero.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Resumen. ....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Introducción.....</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Materiales y métodos.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Resultados.....</b>	<b>26</b>
<b>4.5. Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>4.6. Referencias citadas.....</b>	<b>39</b>

<b>5. CAPÍTULO III.....</b>	<b>45</b>
<b>Aspectos morfo-fisiológicos del tracto digestivo en larvas de IV de</b>	
<b><i>Bradysia impatiens</i> (Diptera: Sciaridae).....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Resumen.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2. Astrabct.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3. Introducción.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4. Materiales y métodos.....</b>	<b>48</b>
<b>5.5. Resultados.....</b>	<b>50</b>
<b>5.6. Discusión.....</b>	<b>59</b>
<b>5.7. Literatura citada.....</b>	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERENCIAS GENERALES.....</b>	<b>70</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

En México, la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) tiene como objetivo la restauración de un millón de hectáreas durante el periodo 2013-2018, con una meta anual de 170 mil hectáreas, en total se plantarán un promedio de 180 millones de plantas. Para cubrir la demanda de planta, la producción en viveros forestales se realiza con sistemas intensivos de producción; sin embargo, estos procesos de producción también han favorecido el desarrollo de plagas que en muchos casos dificulta su control, tal es el caso del mosco fungoso negro *Bradysia impatiens* Johannsen, 1912 (Diptera: Sciaridae). Las larvas de este insecto se alimentan de hongos, algas, materia orgánica en descomposición, raíces y semillas carnosas (Cibrián *et al.*, 2008; Cloyd, 2015; Marín-Cruz *et al.*, 2015a;). Las plantas dañadas por *B. impatiens* presentan síntomas de pérdida de vigor, marchitez, desprendimiento de hojas, escaso crecimiento y amarillamiento de follaje (Marín-Cruz *et al.*, 2015b), y en infestaciones severas ocasionan la muerte de la planta. Además, las larvas y adultos de *B. impatiens* pueden ser vectores de hongos fitopatógenos (Braun *et al.*, 2009; Cloyd, 2015; Hurley *et al.*, 2007; Marín-Cruz *et al.*, 2015a). En México, *B. impatiens* llega a causar pérdidas de hasta el 30% de plántulas en viveros forestales (Marín-Cruz *et al.*, 2015a, b); el control de *B. impatiens* se hace mediante la aplicación de insecticidas químicos (Marín-Cruz, *et al.*, 2015a; Cibrián, 2008), sin embargo, algunas poblaciones son resistentes a éstos productos (Cloyd, 2015; Marín-Cruz *et al.*, 2015b).

En los viveros forestales, el manejo de plagas de insectiles se debe realizar desde una visión sustentable para reducir los efectos negativos. Una alternativa son

los hongos entomopatógenos (HE) como agentes de control biológico y sus metabolitos (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) es un HE de distribución cosmopolita que ataca diversos órdenes de insectos (Lozano-Tovar *et al.*, 2013; Zibae *et al.*, 2011). Este HE produce metabolitos de bajo peso molecular que tienen propiedades insecticidas e importantes aplicaciones en la biotecnología (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014), entre los que se encuentran bassianólidos, bassiacridina, bassianina, beauvericina, beauverolidos y tenellin (Quesada-Moraga and Vey, 2004). Existen estudios sobre el efecto de *B. bassiana* en insectos del orden Diptera, como *Musca domestica* L. (Muscidae), *Ceratitis capitata* Wiedemann (Tephritidae) y *Aedes aegypti* L. (Culicidae) (Acharya *et al.*, 2015; Lozano-Tovar *et al.*, 2013). Sin embargo, en *B. impatiens* no se han realizado estudios de *B. bassiana* como alternativa de control. Por tal motivo, el conocer el potencial de *B. bassiana* como alternativa de control del mosco fungoso negro es de gran interés.

A pesar de la importancia agronómica de *B. impatiens* como plaga, no existen estudios detallados sobre el tracto digestivo de las larvas. No obstante, en los insectos el intestino es un órgano esencial para el crecimiento, desarrollo y estado nutricional, ya que puede afectar los subsiguientes estados de desarrollo (Chapman 1998).

Por lo tanto, este proyecto de investigación doctoral evaluó en laboratorio el potencial de conidios, enzimas y metabolitos de *B. bassiana* producidos mediante fermentación sólida, como control de larvas de tercer-cuarto estadio de *B. impatiens*. Posteriormente, por medio de un tamizado molecular se fraccionaron los metabolitos y se suministraron en la dieta de *B. impatiens* para cuantificar su efecto

insecticida e insectistático. Para determinar el daño que ocasionan los metabolitos en el tracto digestivo de *B. impatiens*, se realizaron cortes histológicos en larvas de cuarto estadio sanas y con tratamiento. Por último, los metabolitos y conidios fueron evaluados en invernadero en plántulas de ocote (*Pinus montezumae*), para definir el grado y tiempo de protección que ofrecen, así como la mejor dosis de aplicación.

## 2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de conidios, enzimas y los metabolitos de *Beauveria bassiana* como control y manejo de *Bradysia impatiens* de (mosco fungoso negro).

### 2.1. Objetivos específicos

1. Determinar la acción patogénica de los conidios y enzimas de *Beauveria bassiana*, en larvas de *Bradysia impatiens*.
2. Determinar si los metabolitos secundarios de bajo peso molecular de *B. bassiana* tienen acción insecticida en larvas de *Bradysia impatiens*.
3. Evaluar la susceptibilidad de larvas de *Bradysia impatiens* en laboratorio y en inverandero a los conidios, extracto enzimático y metabolitos secundarios de *Beauveria bassiana*.
4. Establecer la dosis letal de conidios, enzimas y metabolitos secundarios para el control biológico de larvas de *Bradysia impatiens*, en plántulas de *Pinus montezumae*.
5. Conocer el tiempo que permanecen activos los conidios, metabolitos y el extracto de *Beauveria bassiana*, para la determinación del número de aplicaciones.
6. Determinar la histopatología del intestino de *Bradysia impatiens* después de alimentarse de harina de papa tratadas con metabolitos de *Beauveria bassiana*.



# CAPÍTULO I

## **Insectistatic and Insecticide Activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae)**

Victor H. Marín-Cruz, Silvia Rodríguez-Navarro, Juan E. Barranco-Florido,  
David Cibrián-Tovar

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco  
Universidad Autónoma Chapingo

Publicado en la revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 2017, 23(3),  
329-340 (ISSN: 2007-4018)

# Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae)

Actividad insecticida e insectistática de *Beauveria bassiana* en *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae)

Víctor H. Marín-Cruz<sup>1\*</sup>; Silvia Rodríguez-Navarro<sup>2</sup>; Juan E. Barranco-Flórido<sup>3</sup>; David Cibrián-Tovar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud. C. P. 04960. Coyoacán, Cd. de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud. C. P. 04960. Coyoacán, Cd. de México, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud. C. P. 04960. Coyoacán, Cd. de México, México.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

\*Corresponding author: victormarin@hotmail.es, tel.: 52+ (55) 39 70 93 59

## Abstract

**Introduction:** *Bradysia impatiens* causes significant losses in nurseries and greenhouses in Mexico.

**Objective:** The insecticidal and insectistatic effect of *Beauveria bassiana* was evaluated on *B. impatiens*.

**Materials and methods:** The insecticidal and insectistatic effect of conidia ( $10^7$  conidia·mL<sup>-1</sup>), enzymes (10 000 ppm), metabolites (10 000 ppm) and crude extract of *B. bassiana* were evaluated at 8 and 20 days. Corrected mortality data of larvae and pupae of *B. impatiens* and relative emergence of adults, transformed with the arcsine function, in an analysis of variance and comparison of Tukey's means ( $P < 0.05$ ).

**Results and discussion:** At day 8, conidia had the highest insecticidal activity with 31.1 % of corrected mortality, and zero enzymes activity. At 20 days, treatments of metabolites and conidia had the greatest effect on mortality, 47.5 and 42.1 %, respectively. These treatments had the highest insectistatic activity. The emergence of adults at 20 days was lower with conidia (6 %), while with the enzymes it was 100 %. Metabolites caused that 65 % of adults had malformations.

**Conclusions:** Metabolites and conidia of *B. bassiana* could be used for the control of larvae and pupae of *B. impatiens*.

## Resumen

**Introducción:** *Bradysia impatiens* causa pérdidas significativas en viveros e invernaderos de México.

**Objetivo:** El efecto insecticida e insectistático de *Beauveria bassiana* se evaluó sobre *B. impatiens*.

**Materiales y métodos:** El efecto insecticida e insectistático de conidios ( $10^7$  conidios·mL<sup>-1</sup>), enzimas (10 000 ppm), metabolitos (10 000 ppm) y extracto crudo de *B. bassiana* se evaluó a los 8 y 20 días. Los datos de mortalidad corregida de larvas y pupas de *B. impatiens* y emergencia relativa de adultos, transformados con la función arcoseno, se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Resultados y discusión:** En el día 8, los conidios tuvieron la mayor actividad insecticida con 31.1 % de mortalidad corregida, mientras que la actividad de las enzimas fue nula. A los 20 días, los tratamientos de metabolitos y conidios tuvieron el mayor efecto en la mortalidad, 47.5 y 42.1 %, respectivamente. Dichos tratamientos tuvieron la mayor actividad insectistática. La emergencia de adultos a los 20 días fue menor con los conidios (6 %), mientras que con las enzimas fue de 100 %. Los metabolitos provocaron que 65 % de los adultos mostraran malformaciones.

**Conclusión:** Los metabolitos y conidios de *B. bassiana* podrían emplearse para el control de larvas y pupas de *B. impatiens*.

**Keywords:** entomopathogenic fungi, fungus gnats, conidia, enzymes, metabolites.

**Palabras clave:** hongos entomopatógenos, mosco fungoso, conidios, enzimas, metabolitos.

## Introduction

In Mexico, the *Bradysia impatiens* Johannsen (Diptera: Sciaridae) fungus gnats is considered a pest with forest and agricultural importance for nurseries and greenhouses in the center of the country, especially for the production of seedlings (Cibrián, García, & Don Juan, 2008; Marín-Cruz, Cibrián-Tovar, Méndez-Montiel, Pérez-Vera, & Cadena-Meneses, 2015a). *Bradysia impatiens* larvae feed on decaying organic matter, fungi and roots (Mohrig & Menzel, 2009). The root, being damaged, is exposed to the entry of pathogenic fungi, and larvae may carry spores of them (Shamshad, Clift, & Mansfield, 2009).

It has been reported that *B. impatiens* damages roots and bulbs, mainly in greenhouses and nurseries, ornamental, from vegetables and in gardens (Marín-Cruz et al., 2015a). The control is carried out by means of organosynthetic insecticides, growth regulators and biopesticides; however, some populations of *B. impatiens* are resistant to chemical treatments (Marín-Cruz et al., 2015a). An alternative is the use of entomopathogenic fungi (EF), which are found in the environment and have potential as insect controllers, causing fungal infections in arthropods (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) is an EF with cosmopolitan distribution that attacks different orders of insects (Lozano-Tovar, Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Trapero-Casa, & Quesada-Moraga, 2013; Zibae, Bandani, Talaei-Hassanlouei, & Malagoli, 2011). The fungus infects insects from the order Diptera and has effective control of *Musca domestica* Linnaeus (Muscidae), *Ceratitis capitata* Wiedemann (Tephritidae) and *Aedes aegypti* Linnaeus (Culicidae) (Acharya, Seliga, Rojotte, Jenkins, & Matthew, 2015; Lozano-Tovar et al., 2013).

The fungus *B. bassiana* produces secondary metabolites that have insecticidal properties and important applications in biotechnology (Sánchez-Pérez, Barranco-Florido, Rodríguez-Navarro, Cervantes-Mayagoitia, & Ramos-López, 2014), including bassianolides, bassiacriin, bassianin, beauvericin, beauverolides and tenellin (Quesada-Moraga & Vey, 2004). Bassianolide affects populations of Lepidoptera such as *Galleria mellonella* Linnaeus (Pyralidae), *Helicoverpa zea* Boddie (Noctuidae) and *Spodoptera exigua* Hübner (Noctuidae) (Xu et al., 2009). The bassiacridin injected into *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) causes alterations in the epithelial cells of the trachea and displacement of the integument (Quesada-Moraga & Vey, 2004). Secondary metabolites of *B. bassiana* disrupt the mechanisms of the insect's immune system, allowing the fungus to invade and kill its host (Zibae et al., 2011).

## Introducción

En México, el mosco fungoso *Bradysia impatiens* Johannsen (Diptera: Sciaridae) se considera una plaga de importancia forestal y agrícola en viveros e invernaderos del centro del país, sobre todo en la producción de plántulas (Cibrián, García, & Don Juan, 2008; Marín-Cruz, Cibrián-Tovar, Méndez-Montiel, Pérez-Vera, & Cadena-Meneses, 2015a). Las larvas de *B. impatiens* se alimentan de materia orgánica en descomposición, hongos y raíces (Mohrig & Menzel, 2009). La raíz, al ser dañada, queda expuesta a la entrada de hongos patógenos, y las larvas pueden llevar esporas de los mismos (Shamshad, Clift, & Mansfield, 2009).

Se ha reportado que *B. impatiens* daña raíces y bulbos, principalmente en invernaderos y viveros forestales, ornamentales, de hortalizas y en jardines (Marín-Cruz et al., 2015a). El control se hace por medio de insecticidas organosintéticos, reguladores de crecimiento y bioplaguicidas; sin embargo, algunas poblaciones de *B. impatiens* son resistentes a los tratamientos químicos (Marín-Cruz et al., 2015a). Una alternativa es el uso de hongos entomopatógenos (HE), los cuales se encuentran en el medio ambiente y tienen potencial como controladores de insectos, provocando infecciones fungosas en artrópodos (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) es un HE de distribución cosmopolita que ataca diversas órdenes de insectos (Lozano-Tovar, Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Trapero-Casa, & Quesada-Moraga, 2013; Zibae, Bandani, Talaei-Hassanlouei, & Malagoli, 2011). El hongo infecta insectos del orden Diptera y controla *Musca domestica* Linnaeus (Muscidae), *Ceratitis capitata* Wiedemann (Tephritidae) y *Aedes aegypti* Linnaeus (Culicidae) de manera efectiva (Acharya, Seliga, Rojotte, Jenkins, & Matthew, 2015; Lozano-Tovar et al., 2013).

El hongo *B. bassiana* produce metabolitos secundarios que tienen propiedades insecticidas e importantes aplicaciones en la biotecnología (Sánchez-Pérez, Barranco-Florido, Rodríguez-Navarro, Cervantes-Mayagoitia, & Ramos-López, 2014), entre los que se encuentran bassianólidos, bassiacridin, bassianina, beauvericina, beauverolidos y tenellin (Quesada-Moraga & Vey, 2004). El bassianólido afecta poblaciones de lepidópteros como *Galleria mellonella* Linnaeus (Pyralidae), *Helicoverpa zea* Boddie (Noctuidae) y *Spodoptera exigua* Hübner (Noctuidae) (Xu et al., 2009). La bassiacridina inyectada en *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) causa alteraciones en las células epiteliales de la tráquea y desplazamiento del integumento (Quesada-Moraga & Vey, 2004). Los metabolitos secundarios de *B. bassiana* inhabilitan los mecanismos del sistema inmune del insecto,



The present study evaluated the insecticidal and insectistatic potential of strain 11 *B. bassiana* using conidia, crude extract (CE) and lyophilized (enzymes and metabolites) in third instar larvae of *B. impatiens*.

## Materials and methods

### Biological material

#### Collection and breeding of *B. impatiens* insects

In the forest nursery of Temamatla, Estado de México, larvae and adult *B. impatiens* were collected from 200 seedlings of *Pinus montezumae* (Lamb) (Pinales: Pinaceae) during November 2014. *B. impatiens* adults were collected using a bee vacuum pump and larvae were collected with a brush directly from the root and growth substrate of the pine.

The insects collected were taken to the insectarium laboratory of the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), and were maintained under photoperiod conditions at 12:12 h, relative humidity (RH) of 75 %, temperature  $23 \pm 2$  °C, with 2 g of potato slices as food (Marín-Cruz et al., 2015b).

#### Activation of *B. bassiana*

Strain 11 *B. bassiana* from the biotechnology laboratory of UAM-X was grown on Dextrose-Saboraud agar for 15 days at 25 °C. Conidia were harvested with 0.05 % of Tween 80 by means of gentle scraping and were counted with a hemocytometer; the concentration was adjusted to  $10^7$  conidia·mL<sup>-1</sup> (Barranco et al., 2009).

#### Conidia and crude enzymatic extract of *B. bassiana*

A solid state medium consisting of shrimp shell, sugar cane bagasse, mineral salts (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> and MnSO<sub>4</sub> was prepared using Erlenmeyer flasks (Barranco et al., 2009). *B. bassiana* EF was inoculated at a concentration of  $10^7$  conidia·mL<sup>-1</sup>. Growing conditions were pH 5.0 and 25 °C (Barranco-Florido, Alatorre-Rosas, Gutiérrez-Rojas, Viniegra-González, & Saucedo-Castañeda, 2002). Conidia were harvested at 15 days using 0.05 % of Tween 80 1:10 (v / v), the count was carried out using a hemocytometer and the concentration was adjusted to  $10^7$  conidia·mL<sup>-1</sup>. The enzymatic crude extract was obtained at 5 days with distilled water in a ratio of 1:1 (v/v) (Barranco-Florido et al., 2002).

#### Semipurification of crude enzymatic extract

The crude extract was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min (Sorvall® model RC-5B, USA). Subsequently a second centrifugation was carried out to separate the

permitiendo que el hongo se establezca y mate a su hospedero (Zibae et al., 2011).

El presente trabajo evaluó el potencial insecticida e insectistático de *B. bassiana* cepa 11, usando conidios, extracto crudo (EC) y liofilizados (enzimas y metabolitos) en larvas de tercer estadio de *B. impatiens*.

## Materiales y métodos

### Material biológico

#### Recolecta y cría de insectos de *B. impatiens*

En el vivero forestal de Temamatla, Estado de México, se recolectaron larvas y adultos de *B. impatiens* en 200 plántulas de *Pinus montezumae* (Lamb) (Pinales: Pinaceae), durante noviembre de 2014. Los adultos de *B. impatiens* se capturaron con un aspirador manual y las larvas se recolectaron con un pincel directamente de la raíz y del sustrato de crecimiento del pino.

Los insectos recolectados se establecieron en una cría en el laboratorio del insectario de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), y se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo 12:12 h, humedad relativa (HR) de 75 %, temperatura  $23 \pm 2$  °C, con 2 g de rodajas de papa como alimento (Marín-Cruz et al., 2015b).

#### Activación de *B. bassiana*

La cepa 11 de *B. bassiana*, del cepario del laboratorio de Biotecnología de la UAM-X, se cultivó en agar Dextrosa-Saboraud durante 15 días a 25 °C. Los conidios se cosecharon con Tween 80 al 0.05 %, por medio de un raspado suave y se contaron con un hemocitómetro; la concentración se ajustó a  $10^7$  conidios·mL<sup>-1</sup> (Barranco et al., 2009).

#### Obtención de conidios y extracto enzimático crudo de *B. bassiana*

En matraces Erlenmeyer se preparó un medio de cultivo sólido que consistió en caparazón de camarón, bagazo de caña, sales minerales (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> y MnSO<sub>4</sub> (Barranco et al., 2009). El HE *B. bassiana* se inoculó a una concentración de  $10^7$  conidios·mL<sup>-1</sup>. Las condiciones de cultivo fueron pH 5.0 y 25 °C (Barranco-Florido, Alatorre-Rosas, Gutiérrez-Rojas, Viniegra-González, & Saucedo-Castañeda, 2002). Los conidios se cosecharon a los 15 días con Tween 80 al 0.05 % 1:10 (v/v), el conteo se realizó con un hemocitómetro y la concentración se ajustó a  $10^7$  conidios·mL<sup>-1</sup>. El extracto crudo enzimático se obtuvo a los cinco días con agua destilada en proporción 1:1 (v/v) (Barranco-Florido et al., 2002).

molecular size from the supernatant (BECKMAN®, GPR model, USA) using 10 kDa Centricon tubes (BioRad®, Ireland) at 3 000 rpm for 30 min (Ali, Ren, Huang, & Wu, 2010). The upper extract, greater than 10 kDa, corresponds to the enzymes; and the lower, less than 10 kDa, to metabolites. For application in the treatments, metabolites and enzymes were lyophilized (Labconco®, model 7753022, USA) and resuspended in distilled water at a dose of 10 000 ppm.

#### Bioassay of insecticidal and insectistatic activity of *B. bassiana*

Products from the purification of enzymatic extract and conidia of *B. bassiana* were evaluated in third instar *B. impatiens* larvae, deposited in transparent plastic boxes (1.5 cm diameter) with cover, to avoid dehydration; a piece of 1 x 1 cm adsorbent paper containing the treatments was placed in each box. The larvae were fed with 20 µg of potato flour, used for the consumption of treatments (Table 1). The dose was a single application of 130 µL of each treatment and distilled water was applied to the control treatment. As for the conditions, a temperature of 23 ± 3 °C was maintained and RH of 60 to 70 %. A total of 20 µL of distilled water was added to the plastic boxes every 72 h to conserve moisture, with checks every 24 hours. The experimental design was completely randomized with five replications per treatment; each replication consisted of 10 larvae, using 50 larvae in total per treatment.

#### Evaluated variables

##### Insecticidal activity (mortality) of *B. bassiana*

The number of dead larvae and pupae was recorded every 24 h for eight days; with these data mortality

#### Semipurificación del extracto crudo enzimático

El extracto crudo se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min (Sorvall® modelo RC-5B, EUA). Posteriormente se hizo una segunda centrifugación para la separación por tamaño molecular del sobrenadante (BECKMAN®, modelo GPR, EUA), utilizando tubos Centricon (BioRad®, Irlanda) de 10 kDa a 3 000 rpm durante 30 min (Ali, Ren, Huang, & Wu, 2010). El extracto superior, mayor de 10 kDa, corresponde a las enzimas; y el inferior, menor de 10 kDa, a los metabolitos. Para su aplicación en los tratamientos, las enzimas y metabolitos liofilizados (Labconco®, modelo 7753022, EUA) se resuspendieron en agua destilada en una dosis de 10 000 ppm.

#### Bioensayo de actividad insecticida e insectistática de *B. bassiana*

Los productos de la purificación del extracto enzimático y conidios de *B. bassiana* se evaluaron en larvas de *B. impatiens* de tercer estadio, depositadas en cajas de plástico transparentes (1.5 cm de diámetro) con tapa, para evitar la deshidratación; en cada caja se colocó un trozo de papel adsorbente de 1 x 1 cm que contenía los tratamientos. Las larvas se alimentaron con 20 µg de harina de papa, utilizada como conducto para el consumo de los tratamientos (Cuadro 1). La dosis fue una sola aplicación de 130 µL de cada tratamiento y al testigo se le aplicó agua destilada. En cuanto a las condiciones, se mantuvo una temperatura de 23 ± 3 °C y HR de 60 a 70 %. En las cajas de plástico se agregaron 20 µL de agua destilada cada 72 h para conservar la humedad, con revisiones cada 24 h. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento; cada repetición consistió en 10 larvas, utilizando 50 larvas en total por tratamiento.

**Table 1. Treatments and doses of *Beauveria bassiana* applied to larvae of *Bradysia impatiens* to determine the insecticidal and insectistatic activity of the fungus.**

**Cuadro 1. Tratamientos y dosis de *Beauveria bassiana* aplicados a larvas de *Bradysia impatiens* para determinar la actividad insecticida e insectistática del hongo.**

Treatment/Tratamiento	Dose on adsorbent paper (µL)/ Dosis en papel adsorbente (µL)	Dose in food (µg·µL <sup>-1</sup> )/ Dosis en alimento (µg·µL <sup>-1</sup> )
Conidia (10 <sup>7</sup> conidia·mL <sup>-1</sup> )/Conidios (10 <sup>7</sup> conidios·mL <sup>-1</sup> )	130	5.7
Crude extract/Extracto crudo	130	5.7
Enzymes (10 000 ppm)/Enzimas (10 000 ppm)	130	5.7
Metabolites (10 000 ppm)/Metabolitos (10 000 ppm)	130	5.7
Control/Testigo	130	5.7



corrected by means of the Abbott equation (1925) was calculated to eliminate the natural mortality obtained in the control:

$$CM = \frac{Mtr - Mte}{100 - Mte} * 100$$

where:

CM = corrected mortality (%)

Mtr = mortality in treatment (%)

Mte = mortality in control (%).

#### Insectistatic activity of *B. bassiana*

The criteria for defining insectistatic activity were: 1) duration of *B. impatiens* pupa, 2) relative emergence of adults from pupa, and 3) morphological alterations in larvae, pupae and adults. Revisions were made every 24 h for 20 days, and relative emergence was calculated using the following formula (Aguilera, 2001):

$$E = \frac{Etr}{Ete} * 100$$

where:

E = emergence (%)

Etr = emergence in treatment (%)

Ete = emergence in control (%).

#### Statistical analysis

The percentage of corrected mortality and relative emergence had a binomial distribution; to normalize them we used the formula of angular or arcsine transformation ( $\arcsine \sqrt{\text{percentage}/100}$ ). The transformed data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey mean comparison test ( $P < 0.05$ ) was carried out using the program JMP version 8 (Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc.], 2009).

## Results and Discussion

#### Insecticidal activity of *B. bassiana*

Table 2 shows the results of corrected mortality of *B. impatiens* (larvae and pupae) ( $F_{3,16} = 311.58, P < 0.001$ ). Figure 1 shows that conidia and crude extract treatments had an effect on the mortality rate after 48 h, while metabolites and enzymes showed effect until the sixth and eighth day, respectively.

According to the results, at eight days, mortality is less than 40 % in all treatments, therefore, insecticidal activity is considered reduced. The effect of treatments

## Variables evaluadas

#### Actividad insecticida (mortalidad) de *B. bassiana*

El número de larvas y pupas muertas se registró cada 24 h durante ocho días; con estos datos se calculó la mortalidad corregida mediante la ecuación de Abbott (1925), para eliminar la mortalidad natural obtenida en el testigo:

$$MC = \frac{Mtr - Mte}{100 - Mte} * 100$$

donde:

MC = mortalidad corregida (%)

Mtr = mortalidad en el tratamiento (%)

Mte = mortalidad en el testigo absoluto (%).

#### Actividad insectistática de *B. bassiana*

Los criterios para definir la actividad insectistática fueron: 1) duración del estado de pupa de *B. impatiens*, 2) emergencia relativa de adultos a partir de la pupa, y 3) alteraciones morfológicas en larvas, pupas y adultos. Las revisiones se hicieron cada 24 h durante 20 días, y la emergencia relativa se calculó utilizando la siguiente fórmula (Aguilera, 2001):

$$E = \frac{Etr}{Ete} * 100$$

donde:

E = emergencia (%)

Etr = emergencia en el tratamiento (%)

Ete = emergencia en el testigo absoluto (%).

#### Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de mortalidad corregida y emergencia relativa tuvieron una distribución binomial; para normalizarlos se utilizó la fórmula de transformación angular o arcoseno ( $\arccoseno \sqrt{\text{porcentaje}/100}$ ). Los datos transformados se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y se hizo una prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) con el programa JMP versión 8 (Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc.], 2009).

## Resultados y discusión

#### Actividad insecticida de *B. bassiana*

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos de mortalidad corregida de *B. impatiens* (larvas y pupas) ( $F_{3,16} = 311.58, P < 0.001$ ). En la Figura 1 se observa que los

at 20 days was statistically different ( $F_{3,16} = 73.02$ ,  $P < 0.001$ ). From day 8 to 20, metabolites significantly (31.95 units) increased mortality compared to conidia (10.99 units) (Table 2). Crude extract did not increase mortality in that period (Figure 1).

The insecticidal activity of *B. bassiana*, per contact, has been demonstrated in larvae of the orders Coleoptera and Lepidoptera (Ahmed & El-Katatny, 2007; Guzmán-Franco et al., 2012; Michelle et al., 2013). Also Acharya et al. (2015) evaluated the insecticidal activity of *B. bassiana* in adults of *M. domestica* (Diptera) and reported 100 % of mortality in a period of six to 10 days after application. There is few information regarding the ingestion of *B. bassiana* conidia by diptera larvae.

tratamientos conidios y extracto crudo tuvieron efecto en el porcentaje de mortalidad a partir de las 48 h, mientras que los metabolitos y las enzimas mostraron efecto hasta el sexto y octavo día, respectivamente.

De acuerdo con los resultados, a los ocho días, la mortalidad es menor de 40 % en todos los tratamientos, por tanto, la actividad insecticida se considera reducida. El efecto de los tratamientos a los 20 días fue estadísticamente diferente ( $F_{3,16} = 73.02$ ,  $P < 0.001$ ). Del día 8 al 20, los metabolitos incrementaron significativamente (31.95 unidades) la mortalidad en comparación con los conidios (10.99 unidades) (Cuadro 2). El extracto crudo no incrementó la mortalidad en ese periodo (Figura 1).

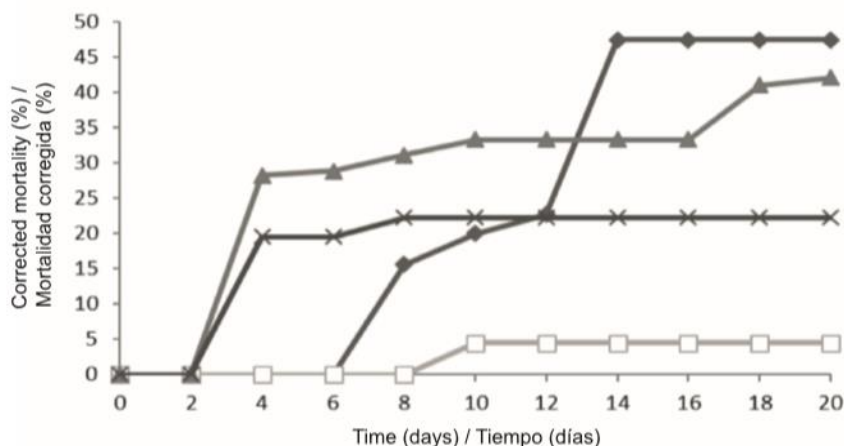
**Table 2. Corrected and transformed mortality of larvae and pupae of *Bradysia impatiens*, evaluated at 8 and 20 days after the application of *Beauveria bassiana* treatments.**

**Cuadro 2. Mortalidad corregida y transformada de larvas y pupas de *Bradysia impatiens*, evaluada a los ocho y 20 días después de la aplicación de los tratamientos de *Beauveria bassiana*.**

Period (days)/ Periodo (días)	Treatment/Tratamiento	Corrected mortality (%)/ Mortalidad corregida (%)	Arcsine transformation/ Transformación Arcoseno
8	Control/Testigo	0.0	0.0 <sup>d</sup>
	Metabolites/Metabolitos	15.5	23.22 <sup>c</sup>
	Enzymes/Enzimas	0.0	0.0 <sup>d</sup>
	Conidia/Conidios	31.1	33.90 <sup>a</sup>
	Crude extract/Extracto crudo	22.2	28.12 <sup>b</sup>
20	Control/Testigo	0.0	0.0 <sup>d</sup>
	Metabolites/Metabolitos	47.5	43.56 <sup>a</sup>
	Enzymes/Enzimas	4.4	12.16 <sup>c</sup>
	Conidia/Conidios	42.1	40.45 <sup>a</sup>
	Crude extract/Extracto crudo	22.2	28.12 <sup>b</sup>

Different letters in a same period indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) in the effect of treatments, according to the Tukey test (HSD,  $n = 50$ ).

Letras diferentes en un mismo periodo indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el efecto de los tratamientos, de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD,  $n = 50$ ).



**Figure 1. Mortality of larvae and pupae of *Bradysia impatiens*, after application of conidia (▲), crude extract (X), metabolites (◆) and enzymes (□) of *Beauveria bassiana*.**

**Figura 1. Mortalidad de larvas y pupas de *Bradysia impatiens*, después de la aplicación de conidios (▲), extracto crudo (X), metabolitos (◆) y enzimas (□) de *Beauveria bassiana*.**



### Insectistatic activity of *B. bassiana*

Metabolites did not cause mortality of *B. impatiens* larvae in the first six days, but produce mortality in the following days. This may be because toxicity was cumulative, due to feeding, causing death. It should be noted that after 14 days mortality ceases, but the effect of metabolites continues at physiological level interfering in the development of *B. impatiens*, which is denominated insectistatic effect.

The insectistatic effect is manifested in the inhibition of feeding, growth, development and oviposition of the insect (Rodríguez, 2003). In our study, low molecular weight metabolites had higher insectistatic effect than insecticidal activity. The insectistatic effect was demonstrated with the inhibition of the growth of larvae, causing their death.

### Pupae of *B. impatiens*

Figure 2 shows the percentage of larvae that passed to the pupal stage in the different treatments, with significant difference among them ( $F_{4,20} = 175.32$ ,  $P < 0.001$ ). As effect of the insectistatic activity, mortality of the pupae in treatments was: control 12 % (5); Low molecular metabolites 44 % (16); Enzymes 8 % (6); Conidia 71 % (5) and CE 14 % (6). The number of dead pupae and malformed adults is evidence of inhibition of development as a result of insectistatic

La actividad insecticida de *B. bassiana*, por contacto, ha sido demostrada en larvas de las órdenes Coleoptera y Lepidoptera (Ahmed & El-Katatny, 2007; Guzmán-Franco et al., 2012; Michelle et al., 2013). También Acharya et al. (2015) evaluaron la actividad insecticida de *B. bassiana* en adultos de *M. domestica* (Diptera) y reportaron 100 % de mortalidad en un periodo de seis a 10 días después de la aplicación. Existe poca información respecto a la ingestión de conidios de *B. bassiana* por larvas de dípteros.

### Actividad insectistática de *B. bassiana*

Los metabolitos no causaron mortalidad de larvas de *B. impatiens* en los primeros seis días, pero sí en los siguientes. Esto puede deberse a que la toxicidad fue acumulativa, debido a la alimentación, ocasionando posteriormente la muerte. Cabe destacar que después de los 14 días cesa la mortalidad, pero el efecto de los metabolitos continúa a nivel fisiológico interfiriendo en el desarrollo de *B. impatiens*, a lo que se le denomina efecto insectistático.

El efecto insectistático se manifiesta en la inhibición de la alimentación, crecimiento, desarrollo y oviposición del insecto (Rodríguez, 2003). En nuestro estudio, los metabolitos de bajo peso molecular tuvieron un efecto insectistático mayor que la actividad insecticida. El efecto insectistático se demostró con la inhibición del crecimiento de larvas, provocando su muerte.

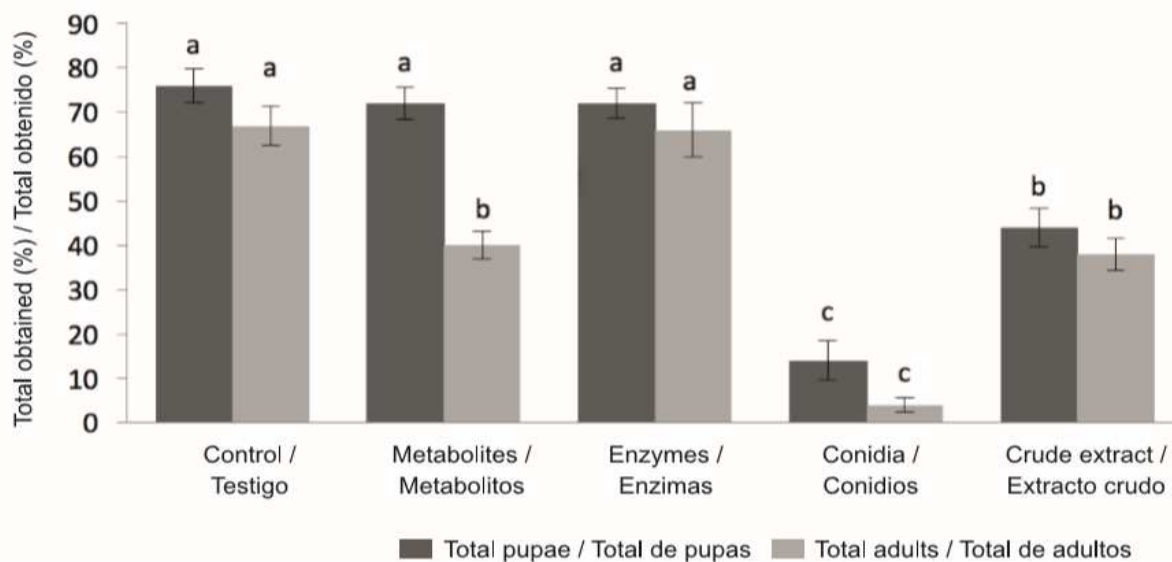


Figure 2. Pupae obtained and adult emergence of *Bradysia impatiens*. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the Tukey's test (HSD).

Figura 2. Pupas obtenidas y emergencia de adultos de *Bradysia impatiens*. Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD).

activity, and may be related to juvenile hormones, which cause insect larvae to continue molting. If the production of these hormones ceases during the last larval or nymphal stage, then transformation occurs to pupal stage and later to adult (Rodríguez, 2003). The insectistatic effect of metabolites of EF has not been demonstrated, only the effect of extracts of plants have been mentioned, where the main result is the extension of the larval and pupal stages of *Spodoptera frugiperda* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (Zavala-Sánchez, Pérez-Gutiérrez, Romo-Asunción, Cárdenas-Ortega, & Ramos-López, 2013).

Moreover, it was observed that, at the end of the treatment with metabolites, there was no presence of *B. impatiens* larvae and pupae. The results obtained in this study are similar to those reported by Lozano-Tovar et al. (2013), who obtained 45 % of maximum mortality caused by *B. bassiana* in pupae of *C. capitata*.

#### Emergence of adults of *B. impatiens*

Table 3 shows the relative emergence results for adults at 8 and 20 days ( $F_{4,20} = 158.70$ ,  $P < 0.001$ ). Of the 20 adults who emerged in the treatment with low molecular metabolites, 13 (65 %) showed malformations, representing 26 % of the total of 50 treated insects; in addition, only seven adults, 14 % of the total larvae, emerged with reproduction capacity.

The emergence of malformed adults reduces the number of adults adequate for reproduction; this symptom is consistent with that reported by Abd El-Ghany, El-Sheikh, Abd El-Rahman, and Abd El-Nasser (2012), who observed malformations in adults of *G. mellonella* after application of crude extract of *B. bassiana*. These malformations may be caused by cyclic depsipeptides nature called beauvericin. This toxin also produces alterations in the processes of moulting and metamorphosis (Ferron, 1978).

The insecticidal activity of the crude extracts of EF has been evaluated in several genera of insects, mainly in the orders Coleoptera and Lepidoptera (Guzmán-Franco et al. 2012; Zibae et al., 2011). Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Santiago-Álvarez, and Quesada-Moraga (2009) had 80 % of mortality five days after the application of crude enzymatic extract of *Metarhizium anisopliae* (Mestch) in the adult food of *C. capitata*. Regarding the purified metabolites, Quesada-Moraga and Vey (2004) reported the insecticidal effect of bassiacridin on *L. migratoria*; however, in this study there was lower mortality in the treatments with enzymes and crude extract, compared to those obtained by these authors. This can be attributed to the survival capacity of *B. impatiens* (Marín-Cruz et al., 2015b), as dipterans have evolved into niches where pathogens, such as fungi and bacteria, abound (Kuraishi, Hori, & Kurata,

#### Pupas de *B. impatiens*

La Figura 2 muestra el porcentaje de larvas que pasaron al estado de pupa en los diferentes tratamientos, con diferencia significativa entre ellos ( $F_{4,20} = 175.32$ ,  $P < 0.001$ ). Como efecto de la actividad insectistática, la mortalidad de las pupas en los tratamientos fue: testigo 12 % (5); metabolitos de bajo peso molecular 44 % (16); enzimas 8 % (6); conidios 71 % (5) y EC 14 % (6). El número de pupas muertas y adultos malformados es evidencia de la inhibición del desarrollo como resultado de la actividad insectistática, y puede estar relacionado con las hormonas juveniles, las cuales provocan que las larvas de insectos continúen mudando. Si la producción de estas hormonas cesa durante el último estadio larvario o ninfal, entonces ocurre la transformación a pupa y posteriormente a adulto (Rodríguez, 2003). El efecto insectistático de los metabolitos de HE no ha sido demostrado, solo se ha mencionado el de extractos de plantas, donde el resultado principal es la prolongación de la fase de los estados de larva y pupa de *Spodoptera frugiperda* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (Zavala-Sánchez, Pérez-Gutiérrez, Romo-Asunción, Cárdenas-Ortega, & Ramos-López, 2013).

Por otra parte, se observó que, al final del tratamiento con los metabolitos, no hubo presencia de larvas y pupas de *B. impatiens*. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Lozano-Tovar et al. (2013), quienes obtuvieron 45 % de mortalidad máxima ocasionada por *B. bassiana* en pupas de *C. capitata*.

#### Emergencia de adultos de *B. impatiens*

El Cuadro 3 presenta los resultados de emergencia relativa de adultos a los 8 y 20 días ( $F_{4,20} = 158.70$ ,  $P < 0.001$ ). De los 20 adultos que emergieron en el tratamiento con metabolitos de bajo peso molecular, 13 (65 %) presentaron malformaciones, representando 26 % del total de los 50 insectos tratados; además, únicamente siete adultos, 14 % del total de larvas, emergieron con capacidad de reproducción.

La emergencia de adultos malformados disminuye la cantidad de adultos aptos para la reproducción; este síntoma concuerda con lo reportado por Abd El-Ghany, El-Sheikh, Abd El-Rahman, y Abd El-Nasser (2012), quienes observaron malformaciones en adultos de *G. mellonella* después de la aplicación de extracto crudo de *B. bassiana*. Estas malformaciones pueden ser ocasionadas por la toxina de naturaleza peptídica cíclica denominada beauvericina. Esta toxina también produce alteraciones en los procesos de muda y metamorfosis (Ferron, 1978).

La actividad insecticida de los extractos crudos de los HE se ha evaluado en diversos géneros de



2013). In addition to the above, dipterans have defense mechanisms such as physical barriers (peritrophic membrane type II) and regeneration of damaged cells in the epithelium, which are very efficient in detecting and counteracting the effect of foreign agents (Kuraishi et al., 2013).

#### Symptomatology of *B. impatiens* treated with extracts of *B. bassiana*

Due to treatments, dead larvae showed rigidity and melanization in all the treatments, in contrast to dead larvae of the control, which were flaccid and kept a light color. This symptomatology agrees with what has been pointed out by other authors. Chávez, Rodríguez, Sánchez, Hamdan, and Barranco (2014) reported that the application of crude extract of *B. bassiana* in larvae of *Phyllophaga* spp. Harris (Coleoptera: Melolonthidae) causes melanization of them self. Melanization is a response process from the insect humoral immune system to the presence of some external agent (González-Sántoyo & Córdoba-Aguilar, 2012); the change of color, characteristic of the *B. impatiens* pupae, may be due to this process. The insectistatic effect is manifested by the prolongation of the time that a larva or pupa remains in a stage; in the case of *B. impatiens* pupae, this effect has an average duration of four days (Marín-Cruz et al. 2015b). In the present study, pupae from which no

insectos, principalmente en las órdenes Coleoptera y Lepidoptera (Guzmán-Franco et al. 2012; Zibae et al., 2011). Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Santiago-Álvarez, y Quesada-Moraga (2009) obtuvieron 80 % de mortalidad a los cinco días de la aplicación de extracto enzimático crudo de *Metarhizium anisopliae* (Mestch) en el alimento de adultos de *C. capitata*. Respecto a los metabolitos purificados, Quesada-Moraga y Vey (2004) reportaron el efecto insecticida de la basiacridina sobre *L. migratoria*; sin embargo, en el presente estudio hubo menor mortalidad en los tratamientos con enzimas y extracto crudo, respecto a los obtenidos por dichos autores. Esto se puede atribuir a la capacidad de supervivencia de *B. impatiens* (Marín-Cruz et al. 2015b), pues los dípteros han evolucionado en nichos donde los agentes patógenos, como hongos y bacterias, abundan (Kuraishi, Hori, & Kurata, 2013). Aunado a lo anterior, los dípteros presentan mecanismos de defensa tales como barreras físicas (membrana peritrofica tipo II) y regeneración de células dañadas en el epitelio, las cuales son muy eficientes para detectar y contrarrestar el efecto de agentes extraños (Kuraishi et al., 2013).

#### Sintomatología de *B. impatiens* tratado con extractos de *B. bassiana*

Debido a los tratamientos, las larvas muertas presentaron rigidez y melanización en todos los

**Table 3. Relative emergence of adults of *Bradysia impatiens* treated with *Beauveria bassiana*.  
Cuadro 3. Emergencia relativa de adultos de *Bradysia impatiens* tratados con *Beauveria bassiana*.**

Period (days)/ Periodo (días)	Treatment/ Tratamiento	Adults (%)/ Adultos (%)	Relative emergence (%)/ Emergencia relativa (%)	Arcsine transformation/ Transformación Arcoseno
8	Control/Testigo	46	100	90a
	Metabolites/Metabolitos	13	28	32b
	Enzymes/Enzimas	46	100	90a
	Conidia/Conidios	0	0	0d
	Crude extract/ Extracto crudo	2	4	12c
20	Control/Testigo	67	100	90a
	Metabolites/Metabolitos	40	60	51b
	Enzymes/Enzimas	67	100	90a
	Conidia/Conidios	4	6	14c
	Crude extract/ Extracto crudo	38	57	49b

\*Different letters in the same period indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) according to the Tukey Means Test (HSD).

\*Letras distintas en un mismo periodo indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de medias de Tukey (HSD).

adult emerged, after seven days, began to decompose and become dark in color. The treatment of conidia generated mycelium of *B. bassiana* in some cases. Dead larvae due to low molecular weight metabolites were rigid; in addition, 13 adults had malformations in the wings that prevented them to spread their wings and flying. In the case of malformed pupae there was no adult emergence. This insectistatic effect is important because, although it does not have an immediate effect or in the first days, its action of inhibiting the growth and normal development of larvae and pupae of *B. impatiens* causes that they do not complete their cycle.

## Conclusions

Conidia and extracts of *Beauveria bassiana* (enzymes, metabolites and crude extract) had different effects on larvae and pupae of *Bradysia impatiens*. Conidia (ingestion-topical application) produced greater insecticidal action than insectistatic activity. Metabolites of *B. bassiana* had an insectistatic effect on the larvae; this mode of action is reported for the first time in this entomopathogenic fungus. Therefore, metabolites and conidia of *B. bassiana* have potential as biocontrol agents of *B. impatiens* populations.

## Acknowledgments

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the PhD scholarship granted to M. C. Victor Hugo Marín Cruz, and to the Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) for funding to develop this study.

*End of English version*

## References / Referencias

- Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265–267.
- Abd El-Ghany, T. M., El-Sheikh, H. H., Abd El-Rahman, G. A., & Abd El-Nasser, A. M. (2012). Biodiversity of entomopathogenic fungi new cultivated soil with their using to control of *Galleria mellonella*. *International Journal of Current Research and Review*, 4(24), 17–31. Retrieved from <http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=31051>
- Acharya, N., Seliga, A. R., Rojotte, G. E., Jenkins, E. N., & Matthew, B. T. (2015). Persistence and efficacy of a *Beauveria bassiana* biopesticide against the house fly, *Musca domestica*, on typical structural substrates of poultry houses. *Biocontrol Science and Technology*, 25(6), 697–715. doi: 10.1080/09583157.2015.1009872
- Aguilera, M. (2001). Estudios de efectividad biológica con plagas de granos almacenados. En N. Bautista, & Y. O. Díaz (Eds.), *Bases para realizar estudios de efectividad*

tratamientos, en contraste con las larvas muertas del testigo que se mostraron flácidas y conservaron un color claro. Esta sintomatología concuerda con lo señalado por otros autores. Chávez, Rodríguez, Sánchez, Hamdan, y Barranco (2014) reportaron que la aplicación de extracto crudo de *B. bassiana* en larvas de *Phyllophaga* spp. Harris (Coleoptera: Melolonthidae) ocasiona melanización de las mismas. La melanización es un proceso de respuesta del sistema inmune humoral de los insectos ante la presencia de algún agente externo (González-Sántoyo & Córdoba-Aguilar, 2012); el cambio de coloración, característico de las pupas de *B. impatiens*, puede deberse a dicho proceso. El efecto insectistático se manifiesta con la prolongación del tiempo que una larva o pupa permanece en un estadio o estado; en el caso de las pupas de *B. impatiens* tiene una duración promedio de cuatro días (Marín-Cruz et al. 2015b). En el presente estudio, las pupas de las que no emergieron adultos, después de siete días, comenzaron a descomponerse y a tornarse de un color oscuro. El tratamiento de conidios generó micelio de *B. bassiana* en algunos casos. Las larvas muertas debido a los metabolitos de bajo peso molecular estuvieron rígidas; además, 13 adultos presentaron malformaciones en las alas que les impidió desplegar y volar. En el caso de las pupas malformadas no hubo emergencia de adultos. Este efecto insectistático es importante debido a que, si bien no se tiene un efecto inmediato o en los primeros días, su acción de inhibición del crecimiento y desarrollo normal de las larvas y pupas de *B. impatiens* provoca que no completen su ciclo.

## Conclusiones

Los conidios y extractos de *Beauveria bassiana* (enzimas, metabolitos y extracto crudo) tuvieron diferentes efectos en larvas y pupas de *Bradysia impatiens*. Los conidios (aplicación ingestión-tópica) produjeron mayor acción insecticida que insectistática. Los metabolitos de *B. bassiana* tuvieron efecto insectistático en las larvas; este modo de acción es reportado por primera vez en este hongo entomopatógeno. Por lo anterior, los metabolitos y conidios de *B. bassiana* tienen potencial como agentes de biocontrol de las poblaciones de *B. impatiens*.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado otorgada al M. C. Víctor Hugo Marín Cruz, y a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) por el financiamiento para desarrollar el presente trabajo.

*Fin de la versión en español*



- biológica de plaguicidas (pp. 43–50). Montecillo, Texcoco, México: Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.
- Ahmed, A. M., & El-Katatny, M. H. (2007). Entomopathogenic fungi as biopesticides against the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*: between biocontrol promise and immune-limitation. *Journal of the Egyptian Society of Toxicology*, 37, 39–51. Retrieved from [http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/ahmed\\_el-katatny-2007.pdf](http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/ahmed_el-katatny-2007.pdf)
- Ali, S., Ren, S. X., Huang, Z., & Wu, J. H. (2010). Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2(1), 15–22. Retrieved from <http://www.formatex.info/microbiology2/isbn1-contents.pdf>
- Barranco-Florido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 910–915. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00032-7
- Barranco, F. J. E., Bustamante, C. P., Mayorga, R. L., González, C. R., Martínez, C. P., & Azaola, A. (2009).  $\beta$ -N Acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* ATCC 26854 by solid state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia*, 34(5), 356–360. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/inici/v34n5/art11.pdf>
- Chávez, I. E., Rodríguez, N. S., Sánchez, P. Ll. C., Hamdan, P. A., & Barranco, F. J. A. (2014). Actividad insecticida *in vitro* de extracto crudo de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin sobre larvas de *Phyllophaga* spp. (Harris). *Revista Protección Vegetal*, 29(3), 226–230. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n3/rpv12314.pdf>
- Cibrián, T. D., García, D. S., & Don Juan, M. B. (2008). *Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros*. México: Comisión Nacional Forestal.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Reviews Entomology*, 23, 409–442. doi: 10.1146/annurev.en.23.010178.002205
- González-Sántoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142, 1–16. doi: 10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x
- Guzmán-Franco, A. W., Hernández-López, J., Enríquez-Vara, J. N., Alatorre-Rosas, R., Tamayo-Mejía, F., & Ortega-Arenas, L. D. (2012). Susceptibility of *Phyllophaga polyphylla* and *Anomala cincta* larvae to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates, and the interaction with soil properties. *BioControl*, 57, 553–563. doi: 10.1007/s10526-011-9421-3
- Kuraishi, T., Hori, A., & Kurata, S. (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 4(375), 1–8. doi: 10.3389/fphys.2013.00375
- Lozano-Tovar, M. D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Traperó-Casa, A., & Quesada-Moraga, E. (2013). Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control*, 67, 409–420. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.09.006
- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Pérez-Vera, O. A., & Cadena-Meneses, J. A. (2015a). Control del mosquito fungoso negro *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) y *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) en *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Mexicana Ciencias Forestales*, 6(27), 90–100. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v6n27/v6n27a8.pdf>
- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Pérez-Vera, O. A., Cadena-Meneses, J. A., Huerta, H., ... Cruz-Rodríguez, J. A. (2015b). Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Madera y Bosques*, 21(1), 113–128. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/mb/v21n1/v21n1a9.pdf>
- Michelle, S. V., Vieira, T. P., Pereira, B. J. D., Mesquita, P. L., Alves, L. E. A. L., & Figueiredo, P. A. L. (2013). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. *African Journal of Biotechnology*, 2(46), 6491–6497. doi: 10.5897/AJB2013.11972
- Mohrig, W., & Menzel, F. (2009). Sciaridae (Black fungus gnats). In B. V. Brown, A. Borkent, J. M. Cumming, D. M. Wood, N. E. Woodley, & M. A. Zumbado (Eds.), *Manual of Central American Diptera* vol. 1 (pp. 279–292). Canada: National Research Council of Canada.
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, 6, 77–90. doi: 10.4136/1980-993X
- Ortiz-Urquiza, A. I., Garrido-Jurado, C., Santiago-Álvarez, C., & Quesada-Moraga, E. (2009). Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science*, 65, 1130–1139. doi: 10.1002/ps.1803
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A. (2004). Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 108, 441–452. doi: 10.1017/S0953756204009724
- Rodríguez, H. C. (2003). Cuantificación de la inhibición del crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales. En C. M. Tornero, J. F. López-Olguín, & A. Aragón (Eds.), *Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable* (pp. 223–242). México: Benemérita Universidad de Puebla.
- Sánchez-Pérez, Ll. C., Barranco-Florido, J. E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J. F., & Ramos-López, M. A. (2014). Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. *Advances in Enzyme Research*, 2, 65–76. doi: 10.4236/ajer.2014.22007

- Shamshad, A., Clift, A. D., & Mansfield, S. (2009). The effect of tibia morphology on vector competency of mushroom sciarid flies. *Journal of Applied Entomology*, 133(6), 484–490. doi: 10.1111/j.1439-0418.2008.01362.x
- Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc]. (2009). JMP version 8. Statistical Discovery. From SAS. USA: Author.
- Xu, Y., Orozco, R., Kithsiri, W. E. M., Espinosa-Artiles, P., Gunatilaka, L. A. A., Stock, P. S., & Molnar, I. (2009). Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 353–364. doi: 10.1016/j.fgb.2009.03.001
- Zavala-Sánchez, M., Pérez-Gutiérrez, S., Romo-Asunción, D., Cárdenas-Ortega, N. C., & Ramos-López, A. (2013). Activity of four *Salvia* species against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Southwestern Entomologist*, 38(1), 67–73. doi: 10.3958/059.038.0107
- Zibae, A., Bandani, A. R., Talei-Hassanlouei, R., & Malagoli, D. (2011). Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *Journal of Insect Science*, 11, 138. doi: 10.1673/031.011.13801

## **CAPÍTULO II**

### **Metabolitos y Conidios de *Beauveria bassiana* Como Control de Mosco Negro fungoso<sup>1</sup>, Bajo Condiciones de Invernadero**

Marín Cruz Víctor Hugo, Silvia Rodríguez Navarro, Juan Esteban Barranco Florido,  
Roberto Terrón Sierra, David Cibrián Tovar.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco  
Universidad Autónoma Chapingo

Aceptado el 25 de julio de 2018 en la revista Southwestern Entomologists, (ISSN: 0147-1724).



## **Metabolitos y Conidios de *Beauveria bassiana* Como Control de Mosco Negro fungoso<sup>1</sup>, Bajo Condiciones de Invernadero**

Marín Cruz Víctor Hugo<sup>2</sup>, Silvia Rodríguez Navarro<sup>3</sup>, Juan Esteban Barranco Florido<sup>4\*</sup>, Roberto Terrón Sierra<sup>3</sup> y David Cibrián Tovar<sup>5</sup>.

<sup>3</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México, Tel. 54 83 7000. \*Autor de correspondencia e-mail: [barranco@correo.xoc.uam.mx](mailto:barranco@correo.xoc.uam.mx)

**Resumen.** En los últimos años se ha cuestionado la eficacia de los insecticidas químicos para controlar el mosco fungoso negro (Familia Sciaridae), debido a que las poblaciones han desarrollado resistencia. En el presente trabajo se evaluó el potencial bioinsecticida que tienen los metabolitos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra larvas de *Bradysia impatiens* (Johannsen) en laboratorio y de conidios y metabolitos para el grado de protección de plántulas de *Pinus montezumae* (Lamb) en invernadero; así como la sintomatología que presentan las larvas tratadas con metabolitos por ingestión. Los resultados en laboratorio mostraron un efecto insecticida de 1-10 días: metabolitos, F- 5-7, F 8-10, F 11-13 y

---

<sup>1</sup>*Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae)

<sup>2</sup>Doctorado en Ciencias Agropecuarias UAM-X.

<sup>3</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal UAM-X.

<sup>5</sup>División de Ciencias Forestales UACH.

testigo con una mortalidad de 18, 20, 32, 20, 12%. El efecto insectistático se determinó de los 11-30 días y fue de 58, 70, 40, 60 y 12 %. La evaluación del efecto insecticida e insectistático acumulado a los 30 días alcanzó niveles entre 72-90% de mortalidad. La sintomatología confirmó que los metabolitos tienen un mayor efecto insectistático que insecticida, ya que se manifiesta con un aumento en la duración del estado larval, malformaciones de pupas y adultos. En las larvas, los metabolitos de *B. bassiana* causan alteraciones en el intestino medio y los ciegos gástricos, provocando que las larvas no puedan asimilar los nutrientes de los alimentos ingeridos. En invernadero el grado de protección de conidios, metabolitos 500 y 1000 ppm en *P. montezumae* a los 60 días fue: 99.5 97.5 y 100 % respectivamente. En conclusión, los conidios y metabolitos de *B. bassiana* son una alternativa biológica para el control de *B. impatiens* en condiciones de invernadero debido a su efecto insecticida e insectistático.

## Introducción

En México, existe el Plan de Desarrollo 2013-2018, en donde está incluido el Programa Sectorial de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT 2014) las metas planteadas es reforestar un millón de ha en el periodo 2013-2018; para lo cual fue necesario producir 180 millones de plantas (Comisión Nacional Forestal 2015). En México, la producción de plantas en viveros es afectada por la presencia de insectos considerados como plagas primarias; los géneros *Bradysia* (*B. impatiens*) y *Lycoriella* (*L. ingenua* (Doufour)) (Diptera: Sciaridae) son organismos que consumen raíces de las plantas en viveros, invernaderos y cultivos hortícolas

(Marín et al. 2017a); las larvas causan daño directo alimentándose de la raíz e indirecto por la capacidad de transmitir hongos fitopatógenos (Cloyd, 2015; Marín et al. 2015a). En los sistemas de producción de invernadero y viveros, el control de poblaciones de moscos fungosos negros, se lleva a cabo mediante el uso de diferentes estrategias, como el control biológico, los métodos de control físico, culturales, de saneamiento y la aplicación de insecticidas sistémicos (Marín et al. 2015b). Los insecticidas organofosforados han provocado surgimiento de poblaciones de insectos resistentes. La discusión en torno a la resistencia a los insecticidas, con frecuencia se centra sobre los insectos plaga que atacan las partes aéreas de las plantas. Sin embargo, son escasos los trabajos sobre resistencia en plagas asociadas al suelo, en el caso de los moscos fungosos negros; Cloyd y Ardenson 2013, señalan que pueden desarrollar resistencia si son expuestos a una “presión de selección” continua. La resistencia, se ha demostrado en otras especies de ciáridos como *Lycoriella castanescens* (Lengersdorf) y *Lycoriella mali* (Fitch) presentes en el champiñón (*Agaricus bisporus*) (Lange) Imbach (Cloyd and Ardenson 2013; Bartlett and Keil 1996). Estas especies muestran resistencia a los insecticidas: diazinon® (Knox OUT, actualmente prohibido su uso en el invernadero), la permetrina (Astro®) y el diclorvos (Vapona®). Además, desde la década de 1980 *Lycoriella auripila* (Winnertz) mostró resistencia a los insecticidas organofosforados, en particular al clorpirifós® (White 1981); y recientemente *B. impatiens* al carbofuran® (Marín et al. 2015b), con un incremento de su población. Por lo que, los metabolitos de los hongos entomopatógenos (HE), en particular de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales), pueden ser una alternativa para el control de ciáridos. *B. bassiana* produce distintos metabolitos

secundarios que tienen propiedades insecticidas (Sánchez-Pérez et al. 2014), como bassianólidos, bassiacridina, bassianina, beauvericina y beauverólidos (Quesada-Moraga and Vey 2004). Como antecedente, se ha reportado que las larvas de *B. impatiens* son altamente susceptibles a los conidios y metabolitos de *B. bassiana* cuando son ingeridos en el alimento (Marín et al. 2017b). Los objetivos del trabajo fueron: evaluar el grado de protección que proporcionan los conidios y metabolitos de *B. bassiana* en plántulas de *P. montezumae* Lamb (Pinales: Pinaceae) afectadas por larvas de *B. impatiens* a nivel de invernadero e identificar el efecto insecticida e insectistático de metabolitos de *B. bassiana* a nivel de laboratorio, así como también la sintomatología y el daño a nivel del tracto digestivo:

## **Materiales y métodos**

**Recolecta y cría de insectos.** La recolecta de larvas y adultos de *B. impatiens* se realizó, de forma directa de las plántulas de *P. montezumae* (100 plántulas); en febrero de 2016, en el vivero forestal de Temamatla, Estado de México. Los adultos se capturaron con un aspirador manual y las larvas se recolectaron con un pincel directamente de la raíz y del sustrato. Se estableció la cría en laboratorio del Insectario, en la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco (UAM-X), en condiciones de fotoperiodo 12:12 h; 75 % HR; temperatura  $23 \pm 2$  °C, y como alimento papa (2 g) (Marín et al. 2015b).

**Condiciones de cultivo de *B. bassiana*.** La cepa 11 de *B. bassiana* del laboratorio de Biotecnología de la UAM-X, se activó en agar Dextrosa-Saboraud durante 15 días a 25 °C. Los conidios fueron cosechados en Tween 80 al 0.05 % y

la concentración de conidios se ajustó a  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  para el inóculo (Barranco et al. 2009). Después, se realizó un cultivo sólido en matraces Erlenmeyer, con caparazón de camarón, sales minerales  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  y  $\text{MnSO}_4$  y se inoculó *B. bassiana* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Las condiciones de cultivo fueron pH 5.0 y 25 °C (Barranco et al. 2002).

**Obtención de Conidios y metabolitos.** Los conidios fueron cosechados a los 15 días y la obtención de los metabolitos a los 15 días, los conidios fueron obtenidos con Tween 80 al 0.05 % 1:10 (v/v) y se ajustó una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . El extracto crudo del cultivo se obtuvo con agua destilada en una proporción de 1:1 (v/v) (Barranco et al. 2002). Semipurificación de Metabolitos. Se realizó un proceso de semipurificación del extracto crudo del cultivo. Primero se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min (Sorvall® modelo RC-5B). Después una segunda centrifugación (BECKMAN®, modelo GPR) para la separación por tamizado molecular del sobrenadante, utilizando tubos Centricom (BioRad®) con membrana de corte de 10 kDa a 3,000 rpm durante 30 min (Ali et al. 2010). Se colectaron los metabolitos con peso molecular inferior a 10 kDa, los conidios y metabolitos se liofilizaron (Labconco®, modelo 7753022). Para su aplicación en los tratamientos en invernadero.

**Obtención de fracciones de metabolitos.** Para determinar que fracciones tienen actividad biológica sobre las larvas de *B. impatiens*, se obtuvieron 15 fracciones de 6 mL, mediante cromatografía de exclusión (Econo-Column, BIO-RAD®), se utilizó como eluyente TRIS (2-amino-2-hidroximetil-propano-1, 3-diol) (BIO-RAD®) 50 mM a un pH de 8, el flujo establecido fue de 0.8 ml/min. La

concentración de péptidos se determinó mediante Bradford a 595 nm en un espectrofotómetro (CARY 50®) (Bradford 1976). Las fracciones colectadas fueron de F 5-7, F 8-10 y F 11-13, después se liofilizaron y se conservaron para su posterior uso en el bioensayo en laboratorio.

### **Bioensayos.**

**Fracciones de metabolitos sobre larvas de *B. impatiens* en laboratorio.** Para determinar el efecto insecticida e insectistático de los metabolitos de *B. bassiana* en L3 de *B. impatiens*; se usaron cajas de plástico transparentes con tapa de 1.5 cm de diámetro, a las cuales se les colocó un trozo de papel absorbente de 1X1 cm, para evitar la deshidratación de las larvas, se introdujo una larva en cada caja; se alimentaron con 20 µg de harina papa. El liofilizado de los cinco tratamientos se resuspendió en agua destilada y se aplicó directamente sobre 20 µg del alimento. Dosis: tres aplicaciones, una cada 72 h, cada aplicación con una concentración de 750 ppm; T1: testigo, se aplicó TRIS; T2: metabolitos; T3: F 5-7; T4: F 8-10; y T5 F 11-13. Condiciones: temperatura  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$  y HR 60-70%; se conservó la humedad de las cajas de plástico agregando 20 µL de agua destilada, cada 72 h. Las revisiones se hicieron cada 24 h. Diseño experimental: completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento, 10 larvas por repetición; se utilizaron 50 larvas por tratamiento y un total de 250 larvas de *B. impatiens*. Variables evaluadas. Efecto insecticida: porcentaje de mortalidad; efecto insectistático: malformaciones en larvas, pupas y adultos; duración del ciclo de vida, y capacidad de reproducción. La evaluación fue a los 10 y 30 días.

**Efecto de los metabolitos secundarios en el tracto digestivo en larvas L3 de *B. impatiens*.** Se aplicaron 5000 ppm de metabolitos, sin fraccionar en el

alimento a 20 larvas de L3. Cortes histológicos. Las larvas muertas se fijaron en solución de Bouin durante 48 horas, el fijador se eliminó por medio de lavados en alcohol al 70%. Posteriormente las larvas se incluyeron en parafina Merck®. Con un micrótopo (Spencer® modelo 820) se realizaron cortes longitudinales y transversales seriados de 5 µm, desde la boca hasta el ano, en la región dorsal y en la ventral; los cortes se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina, se montaron en laminillas para ser observados en un microscopio óptico compuesto (Zeiss® modelo Axiostar Plus) y se tomaron fotografías (cámara digital Canon® modelo A 620 Power Shot) y se compararon con 20 larvas sanas que se sometieron al mismo procedimiento.

**Conidios y metabolitos de *B. bassiana* para la protección de larvas de *B. impatiens* en invernadero:** En el invernadero del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC) de la UAM-X, se utilizaron plántulas de *P. montezumae* establecidas en contenedores de plástico con 54 tubetes de 210 mL de capacidad. La composición del sustrato fue: 1: de turba, 2: de perlita, 2: de vermiculita y 6.3 g de fertilizante (osmocote Exact Hi.End®) por tubete. Se colocaron 20 larvas L3, en cada plántula de *P. montezumae* de siete meses de edad, posteriormente, se realizó una aplicación de 10 mL con una jeringa en el cuello de la raíz para cada tratamiento. T1 Testigo agua; T2 metabolitos 1000 ppm mL<sup>-1</sup>; T3 metabolitos 500 ppm mL<sup>-1</sup>; T4 metabolitos 5000 ppm en un gramo de grasa vegetal como atrayente (Inca®: 30% de lípidos); y T5 conidios 1X10<sup>7</sup> conidios por mL<sup>-1</sup>. Se regaron cada cuatro días. Después, de 60 días se recolectaron todas las plántulas y se evaluó el daño en las plántulas con un estereoscopio (Zeiss® modelo Stemi 2000-C). Para evaluar el nivel de protección, los indicadores fueron: el nivel de daño

relacionado con a) porcentaje de marchites del follaje; b) porcentaje de pudrición de la raíz; c) presencia de larvas, pupas o adultos. Para el último indicador, cada plántula se colocó en bolsas de polietileno transparente selladas, la revisión fue diaria durante 30 días. Se usó un diseño completamente al azar, cada tratamiento con tres repeticiones (9 plántulas por tratamiento).

**Análisis estadístico.** Para el análisis estadístico se usó el software SAS versión 2009. Los datos de porcentaje se normalizaron usando la transformación angular o arcoseno  $\arcseno\sqrt{\text{porcentaje}/100}$ . Los datos de porcentaje de daño de plántulas, mortalidad de *B. impatiens* se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y se realizó una prueba de medias de Tukey.

## Resultados

**Bioensayo: efecto de fracciones de metabolitos sobre larvas de *B. impatiens* en laboratorio.** Los datos obtenidos a los 30 días, de emergencia de adultos aptos para la reproducción (AAR), muestran que todos los tratamientos tienen diferencia significativa respecto al testigo ( $F_{4,20} = 20.56$ ,  $P < 0.0001$ ) que obtuvo 76% (38 adultos) de AAR, con los metabolitos un 40% (20 adultos) (Fig. 1), de los cuales seis no fueron AAR debido a la presencia de malformaciones (Fig. 2), en la fracciones 5-7 emergieron siete, uno de los cuales no fue AAR, en la F 8-10 y en F 11-13 emergieron 13 y 10 AAR. Respecto al efecto insecticida (TMI) la mortalidad de larvas y pupas fue de 20-34%, en donde los tratamientos no tienen diferencia significativa respecto al testigo ( $F_{4,20}=2.03$ ,  $P > 0.0001$ ). Mientras que el efecto insectistático ( $F_{4,20}=14.76$ ,  $P < 0.0001$ ) ocasionó que el estado larvario se



prolongara, las larvas no lograron pasar al estado de pupa, mortalidad de larvas y pupas, y además, adultos malformados, que en su conjunto correspondería a la mortalidad por éste efecto (TMTA) (Fig. 2 y 3). La mortalidad acumulada de larvas y pupas de *B. impatiens* a los 30 días, así como adultos con malformación alcanzó el 72-90 %, con una diferencia significativa ( $F_{4.20}=26.56$ ,  $P<0.0001$ ) respecto al testigo que fue del 24%, con la fracción 5-7 fue la mayor mortalidad (Cuadro. 1).

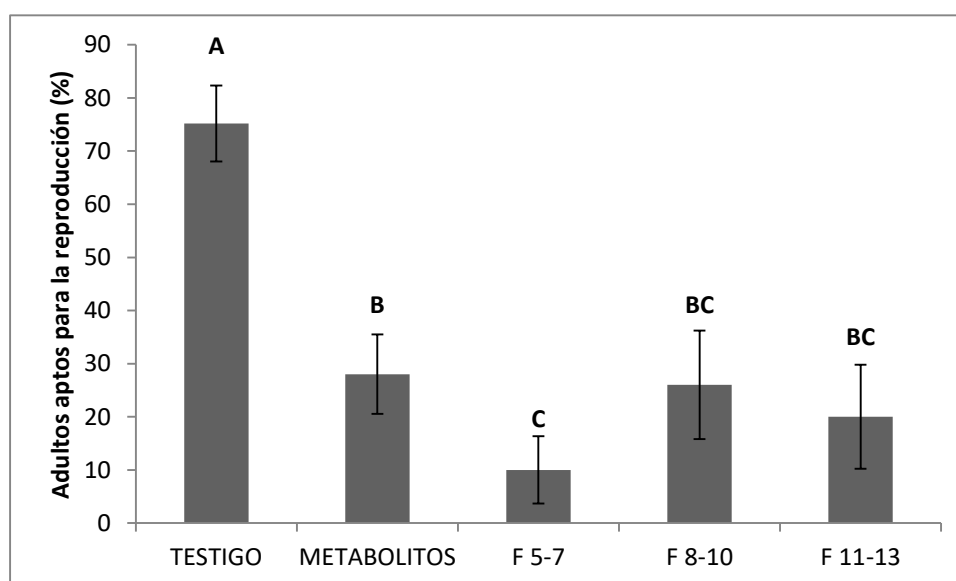


Fig. 1. Porcentaje de emergencia de adultos aptos para la reproducción (AAR) de *B. impatiens* a los 30 días. Letras diferentes de las medias señalan diferencias estadísticas a  $P < 0.05$ , con la prueba de Tukey.

Cuadro. 1. Efecto Insecticida e Insectistático de metabolitos y fracciones de *B. bassiana* en larvas, pupas y adultos de *B. impatiens*.

Tratamientos	A) 1-10 DÍAS (%) Efecto insecticida				B) 11-30 DÍAS (%) Efecto insectistático					
	LM	PM	TMI	LV	LM	PM	A	AM	TMTA	AAR

Testigo	10	2	12 a	0	2	10	76 a	0	12 c	76 a	24 c
Metabolitos	18	2	20 a	0	12	28	40 b	16	58 ab	28 bc	78 ab
F 5-7	20	0	20 a	10	48	12	12 c	2	70 a	10 c	90 a
F 8-10	32	2	34 a	2	16	22	24 bc	0	40 b	26 b	74 b
F 11-13	20	0	20 a	10	26	24	20 bc	0	60 ab	20 bc	80 ab

LM: larvas muertas; PM: pupas muertas; TMI: total de mortalidad efecto insecticida (LM+PM); LV: larvas vivas; A: adultos ( $F_{4,20}=24.20$ ,  $P<0.0001$ ); AM: adultos malformados; TMTA: total de mortalidad efecto insectistático (LV+LM+PM+AM); AAR: adultos aptos para la reproducción; MT: Mortalidad total (TMI+TMTA). Letras diferentes señalan que son estadísticamente diferentes a  $P < 0.05$ , con la prueba de Tukey.

Los indicadores de sintomatología provocada por los metabolitos en los individuos de *B. impatiens* fueron: Las larvas que no lograron pasar al estado de pupa, por mortalidad (30 días) o presentaron malformaciones en larvas, pupas y adultos. En el caso de los adultos fue su incapacidad de extender las alas. En los primeros 10 días se evaluó la mortalidad de los individuos de *B. impatiens* debido al efecto insecticida de los tratamientos. Posteriormente, de 11-30 días, la mortalidad y malformaciones se relacionaron con el efecto insectistático (Fig. 2 y 3).



Fig. 2. Adultos de *B. impatiens*, a) adulto sano, b-c) adultos con malformaciones en las alas.

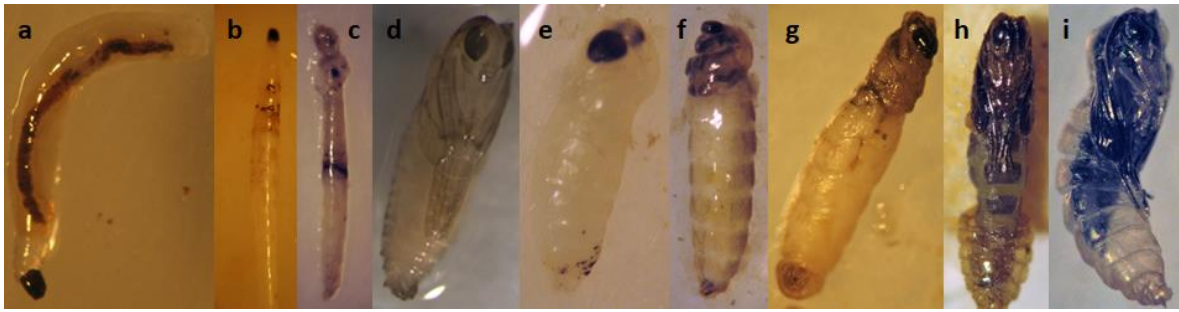


Fig. 3. Larvas y pupas de *B. impatiens* malformadas por toxicidad de metabolitos de *B. bassiana*. a) larva sana; b y c) larvas malformadas, mostrando la melanización en el intestino medio y ciegos gástricos, con un crecimiento anormal en b; d) pupa sana; e, g y f) pupas sin diferenciación del tórax y cápsula cefálica, extremidades sin desarrollar y con retención de caracteres morfológicos de la larva; h) pupa con alteraciones presentando exuvia de larva; i) pupa que no alcanzó a desprender el exoesqueleto de la larva.

**Efecto de los metabolitos secundarios a nivel del tracto digestivo en larvas L3 de *B. impatiens*.** Los tratamientos con metabolitos y las fracciones de *B. bassiana* causaron daño a las larvas de *B. impatiens*, manifestando melanización, aspecto frágil, poca movilidad y superficie corporal flácida. Posteriormente, con la pérdida total del movimiento.

Las larvas que murieron a los cinco días de exposición a metabolitos de *B. bassiana*, presentaron las tres regiones del mesenterón y los ciegos gástricos severamente dañados, las células perdieron su forma cúbica y alargada (Fig. 4d-f). Las células de la región anterior presentaban vacuolas grandes y vesículas apicales. La región media (Fig. 4e) mostró células con abundantes vacuolas, de formas irregulares y aumento del espacio intercelular. En la región posterior y los ciegos gástricos, las células con la mismas características de la región media (Fig. 4e-f), con intensa actividad secretora y aumento del espacio entre la unión de las células.

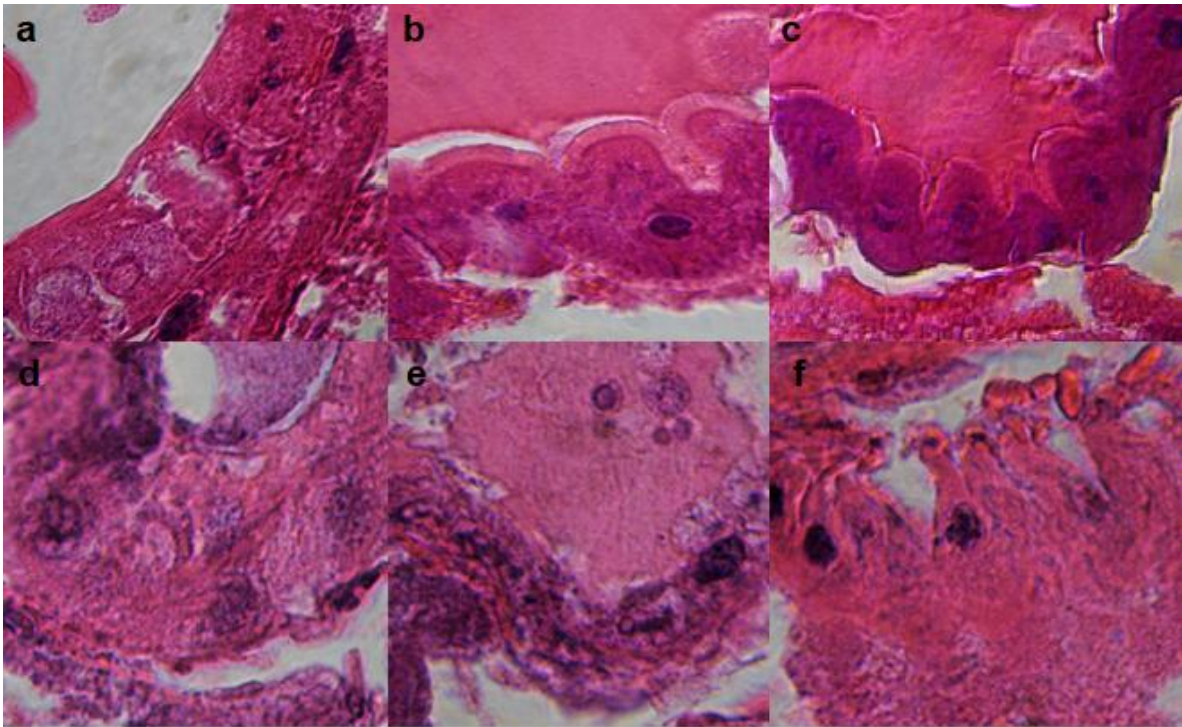


Fig. 4. Intestino medio y ciegos gástricos de L4 de *B. impatiens* sano y con daño por metabolitos de *B. bassiana*. a-b intestino medio y ciegos gástricos sanos; a) intestino medio con células columnares bien formadas; b) ciego gástrico medio con células epiteliales y microvellosidades desarrolladas; c) ciego gástrico posterior con células definidas; d-f) intestino medio con daño por el efecto del tratamiento con metabolitos; d) intestino medio con células columnares con lisis y desintegración del núcleo; e) ciego gástrico con células sin microvellosidades y lisadas; f) ciego gástrico posterior, células con alargamiento, espacio intercelular presente y lisis.

**Conidios y metabolitos de *B. bassiana* para el control de larvas de *B. impatiens* en invernadero:** Los datos obtenidos a los 60 días, mostraron un efecto significativo ( $F_{4,10}=52.97$ ,  $P<0.0001$ ) en los tratamientos: metabolitos (1000 ppm y 500 ppm), así como en conidios ( $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) con una diferencia significativa respecto al testigo y los metabolitos con atrayente. Los tratamientos de metabolitos con dosis de 1000 y 500 ppm; así como los conidios redujeron drásticamente el daño en *P. montezumae* a 0, 2.5 y 0.5 % respectivamente (Cuadro

2). Sin embargo, los metabolitos suministrados con atrayente, presentaron un porcentaje similar al testigo respecto al daño de plantas, del 60.1 y 61.8 % respectivamente. Los daños ocasionados en las plantas de *P. montezumae* por larvas de *B. impatiens* (Fig. 5) fue severo en el follaje, con pérdida de vigor, marchitez y desprendimiento de acículas, la raíz presentó poco desarrollo y pudrición. En el cuello de la raíz, se encontraron larvas alimentándose del xilema y floema de las plántulas. Además, emergieron adultos en el 66.7 % plántulas aisladas en bolsas de plástico. En los tratamientos de metabolitos de 500 ppm y conidios, las plántulas no mostraron los síntomas antes mencionados, sin embargo, en dos plántulas aisladas en bolsas de plástico, hubo una emergencia mínima de uno y dos adultos, respectivamente. Por último, en el tratamiento de 1000 ppm no hubo evidencia de daños en las plántulas de *P. montezumae*, ni emergencia de adultos (Fig. 5).

Cuadro 2. Porcentaje de daño en plantas *P. montezumae* a los 60 días de infestación con larvas de *B. impatiens*.

	Testigo	Metabolitos		Atrayente 5000 ppm/g	Conidios 1x10 <sup>7</sup> mL <sup>-1</sup>
		1000 ppm mL <sup>-1</sup>	500 ppm mL <sup>-1</sup>		
% Marchitez	52.2 ± 7.8	0	0	52.5 ± 14.3	0
% Pudrición de raíz	55.5 ± 11.3	0	0	61.1 ± 20.7	0

% Presencia de insectos	77.7 ± 15.7	0	7.4 ± 5.2	66.6 ± 0	3.7 ± 5.2
% total de daño	61.8 ± 11.3 a	0 B	2.4 ± 1.7 b	60.1 ± 5.8 a	1.2 ± 1.7 b

Letras diferentes señalan que son estadísticamente diferentes a  $P < 0.05$ , con la prueba de Tukey.

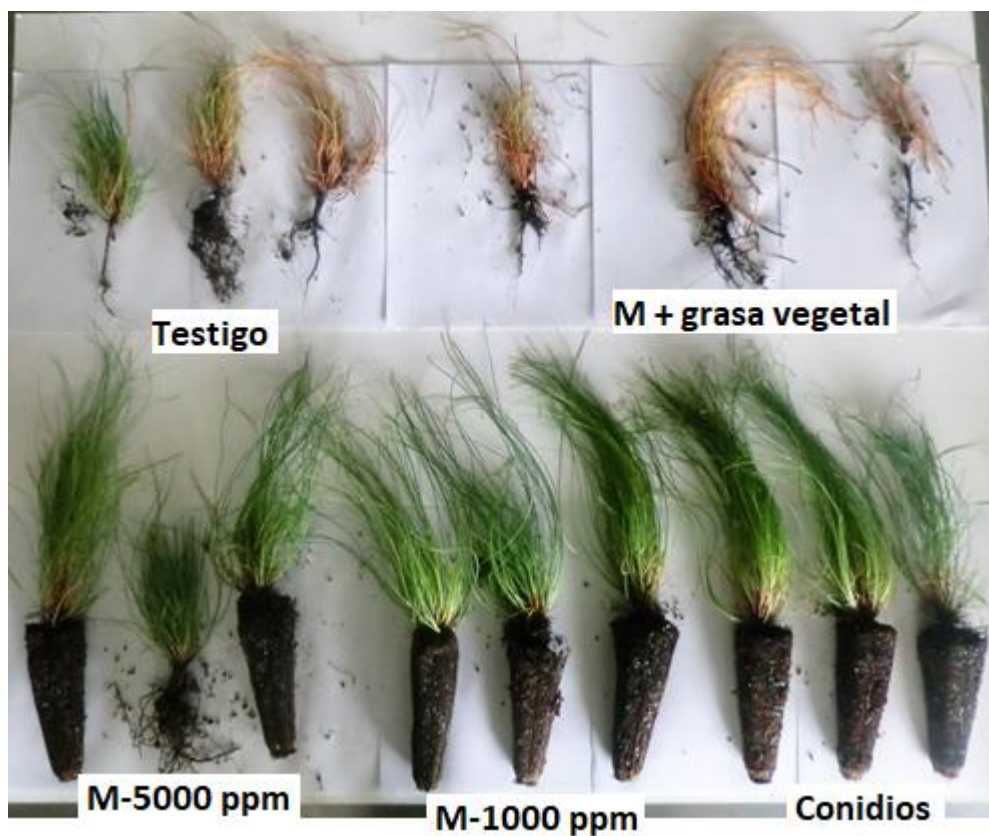


Fig. 5. Estado de las plantas de *P. montezumae* después de 60 días de la exposición a las larvas de *B. impatiens* y la aplicación de los tratamientos.

## Discusión

Los métodos de control de *B. impatiens* con insecticidas químicos han sido cuestionados con el surgimiento de poblaciones resistentes, por lo que las moléculas producidas por los hongos entomopatógenos, y en particular la combinación de conidios y metabolitos de *B. bassiana*, pueden ser una alternativa



para el control de estos ciáridos; ya que producen un control preventivo efectivo para *B. impatiens*.

Los datos obtenidos con los metabolitos y las diferentes fracciones de estos demuestran que tienen un efecto insecticida reducido en los primeros días. Solo en el tratamiento F 8-10 el efecto insecticida es muy semejante al insectistático. Sin embargo, en los demás tratamientos el efecto insectistático observado posterior a los 11 días, es el responsable de entre 58–70 % del total de la mortalidad e individuos malformados de *B. impatiens*.

En todos los tratamientos, excepto el testigo, la suma del efecto insecticida y el efecto insectistático alcanzó niveles de control de 74-90 %. El efecto insectistático ha sido ampliamente documentado en metabolitos de extractos de plantas, Quintana-López et al. (2016), reportaron que el extracto de *Senna crotalarioides* (Kunth) (Irwin y Barneby) tienen este efecto sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith).

De acuerdo con Rodríguez (2003), el efecto insectistático se manifiesta en alteraciones del ciclo biológico y causa malformaciones del insecto, lo cual provoca que el organismo no complete su ciclo de vida normal. Estas alteraciones fueron evidentes en este estudio, la sintomatología es típica del efecto insectistático en las larvas de *B. impatiens*, ocasionando reducción de la alimentación y el movimiento, además, algunos individuos permanecieron en estado larval y no lograron pupar; otros con malformación de larvas, pupas y adultos (Figuras 2 y 3). Los adultos de *B. impatiens* con alas malformadas no fueron AAR. La actividad insectistática se atribuye, a toxinas que produce *B. bassiana*, estas son moléculas de bajo peso molecular de naturaleza péptidica cíclica y lineal, denominadas depsipéptidos

(Quesada-Moraga and Vey 2004). Para su aplicación estos metabolitos no fueron completamente purificados con el objetivo de evitar una posible generación de resistencia del insecto a una molécula específica. Este grupo de metabolitos requiere de un mayor tiempo para causar un daño gradual, que termina con la muerte o incapacidad fisiológica del insecto. Los daños que causan los metabolitos secundarios de *B. bassiana* son: alteración de la permeabilidad de las membranas, alteraciones en el núcleo de las células, afectando el proceso de muda y metamorfosis, cambios en la fecundidad e interferencia en las interacciones ligando-receptor que ocurren en la membrana plasmática y deformaciones en las estructuras de los insectos, principalmente en alas (Borges et al. 2010). El-Ghany et al. (2012), reportan que el extracto crudo de *B. bassiana* produce malformaciones en las alas de los adultos de *Galleria mellonella* (L.), la beauvericina fue el metabolito responsable de ocasionar estos síntomas. Ferron (1978) documentó que esta toxina produce alteraciones en los procesos de muda y metamorfosis. Con los metabolitos secundarios producidos por *B. bassiana*, sugerimos que la beauvericina está presente por la sintomatología presentada en *B. impatiens*.

La sintomatología relacionada con el efecto insectistático daña principalmente el sistema digestivo de las larvas de *B. impatiens*, en gran parte por las alteraciones producidas en el intestino medio, a nivel celular y de las membranas. En las larvas muertas por los metabolitos, el daño se observó en las células epiteliales del intestino medio y en los ciegos gástricos, las cuales sufrieron lisis y las células columnares presentaron un número elevado de vacuolas. Esto sugiere un desequilibrio osmótico (Costa et al. 2012), Alves et al. (2010), reportaron que la formación elevada de vacuolas en *Culex quinquefasciatus* (Say) es la posible



respuesta de desintoxicación celular. Otras alteraciones a nivel celular fueron: ausencia de los límites citoplasmáticos, formación vesicular apical, disminución de microvellosidades (reduce la absorción de nutrientes), aumento del espacio intercelular y desprendimiento en las células epiteliales de la membrana basal. Estos resultados son similares a los obtenidos en larvas de otras especies de dípteros. En larvas *Aedes aegypti* (L.) se han reportado síntomas similares provocados por el aceite de resina de *Copaifera reticulata* (Ducke) (Addad et al. 2007) y con tanino catéquico, extraído de *Magonia pubescens* (St. Hil) (Ferreira et al. 2010). La exposición de larvas *C. quinquefasciatus* a insecticidas organofosforados provoca una sintomatología similar (Alves et al. 2010). Los daños en estos dípteros fueron producidos en un periodo menor a 24 h. Sin embargo, los metabolitos requieren de mayor tiempo (cinco días o más) para producir daños similares. Esto permite suponer que los metabolitos causan gradualmente un daño en el intestino medio que es irreversible provocando la destrucción de las células columnares y células regenerativas epiteliales (Roelfstra et al. 2010). La destrucción de las células epiteliales impide la asimilación de nutrientes, ocasionando la deficiencia y se manifiesta como el efecto insectistático, y si el daño es severo causa la muerte.

La deficiencia de nutrientes puede causar malformaciones en larvas, pupas y adultos, tal como se observó en este estudio. En un trabajo con dietas deficientes en nutrientes en larvas de *Heliothis virescens* (Fabricius), se encontró que provoca malformaciones en larvas y pupas (Parra 2012), estas malformaciones son similares a las manifestadas por los metabolitos de *B. bassiana* en *B. impatiens*, por lo que se puede atribuir que los metabolitos ocasionan la disminución de la capacidad de

las larvas de asimilar los nutrientes de los alimentos ingeridos, provocando un consumo deficiente de nutrientes por las larvas, la cual se manifiesta en la sintomatología de malformaciones y prolongación del estado larval. Las alteraciones provocadas por los metabolitos de *B. bassiana*, en las células del intestino medio de las larvas de *B. impatiens*, indica su potencial tóxico y larvicida.

En el invernadero se evaluaron metabolitos sin fraccionar y conidios dentro de un proceso de escalamiento para la producción de estos bioinsecticidas. Los metabolitos en dosis de 500 ppm, 1000 ppm y los conidios  $1 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> proporcionaron protección a plántulas de *P. montezumae* de larvas de *B. impatiens* en su totalidad durante 60 días, este resultado permite sugerir que los metabolitos y conidios de *B. bassiana* son eficientes para el manejo de poblaciones de *B. impatiens*.

El alto porcentaje de control de *B. impatiens* con conidios en el bioensayo del invernadero puede deberse a las condiciones microambientales de temperatura y humedad en el tubete, favorecen el óptimo establecimiento y desarrollo de *B. bassiana* y crece saprófitamente sobre material vegetal en descomposición (Ferron 1978). Rohlf and Churchill (2011) mencionan que el hongo compiten por el alimento con insectos saprófagos y atacan insectos huéspedes para su crecimiento y reproducción. También tiene la facultad de actuar como antagonista de hongos fitopatógenos (Culebro-Ricaldi 2017). Estas características contribuyeron al grado de protección mayor al 98% de *P. montezumae*, ya que *B. bassiana* actuó no solo sobre las larvas de *B. impatiens*, sí no también compiten por los recursos alimenticios de las larvas, además, pudo tener un efecto antagónico sobre los hongos fitopatógenos que porta este díptero, Gran parte del daño que ocasiona *B.*

*impatiens* se asocia con la inoculación que realiza este insecto en las plantas (Cloyd 2015; Marín et al. 2015a).

El grado de protección de metabolitos y conidios de *B. bassiana* en plántulas de *P. montezumae* fue mayor que respecto al bioinsecticida *Bacillus thuringiensis var israelensis* y semejante con spirotetramat, imidacloprid, clorpirifos y oxamil (Marín et al. 2015b), pero estos se aplicaron cada 20 días y en dosis 10% mayores a las recomendadas, a diferencia de los conidios y metabolitos *B. bassiana* con una sola aplicación.

La aplicación tópica de conidios y extractos de *B. bassiana* ha sido documentada ampliamente (Ahmed and El-Katatny 2007; Michelle et al. 2013; Acharya et al. 2015; Resquin-Romero et al. 2016). Sin embargo, los huevos y larvas de *L. ingenua* no son susceptibles a la aplicación tópica de *B. bassiana* (Andreasdis et al. 2016), de igual forma se demostró en el laboratorio para *B. impatiens* (Marín et al. 2017b), a diferencia, mediante la aplicación por ingestión en este trabajo se comprobó que es altamente susceptible.

Cuando se evaluó el atrayente en laboratorio se comprobó que las larvas de *B. impatiens* son atraídas por la grasa vegetal (resultados no mostrados). Sin embargo, el alto porcentaje de daño en las plántulas de *P. montezumae* en el tratamiento con el atrayente, puede deberse a que la mezcla de metabolitos y la grasa vegetal se aplicaron en el cuello de la raíz de la planta, las larvas al inicio del experimento consumieron casi por completo el tratamiento en los primeros días. Sin embargo, las hembras adultas de *B. impatiens* pudieron ser atraídas por la grasa vegetal y ovipositar, eclosionando una nueva generación de larvas sin ser afectadas por los metabolitos.

En conclusión los metabolitos y conidios de *B. bassiana* ofrecen una protección en invernadero de hasta el 100 % a plántulas de *P. montezumae* contra larvas de *B. impatiens* durante 60 días. En las larvas, la sintomatología causada por metabolitos de *B. bassiana* muestra alteraciones en el intestino medio y los ciegos gástricos, lo cual provoca que las larvas no puedan asimilar los nutrientes de los alimentos ingeridos; y además, afecta la duración de ciclo de vida, metamorfosis y causa malformaciones al insecto. Los conidios y metabolitos de *B. bassiana* suministrados por ingestión son una alternativa potencial para el manejo de poblaciones de *B. impatiens*.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado otorgada al M. C. Víctor Hugo Marín Cruz, y a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) por el financiamiento para desarrollar el presente trabajo, y en especial al M. C. Osvaldo López Díaz responsable del laboratorio de Histopatología, perteneciente a la Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAM-X.

### **Referencias Citadas**

Acharya, N., Seliga, A. R., Rojotte, G. E., Jenkins, E. N., and Matthew, B. T. 2015.

Persistence and efficacy of a *Beauveria bassiana* biopesticide against the

- house fly, *Musca domestica*, on typical structural substrates of poultry houses. *Biocontrol Science and Technology*, 25: 697–715.
- Addad, A. R., Cavasin, G. M., Garcia, S. H. H., Geris, R. e Garcia, S. I. 2007. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linneus, 1672) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosea). *Revista Patología Tropical*. 36: 75-86.
- Andreadis, S. S., Cloonan, R. K., Bellicanta, S. G., Paley, K., Pecchia, J. and Jenkins, E. N. 2016. Efficacy of *Beauveria bassiana* formulations against the fungus gnat *Lycoriella ingenua*. *Biological Control*. 103: 165-171.
- Ahmed, A. M., and El-Katatny, M. H. 2007. Entomopathogenic fungi as biopesticides against the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*: between biocontrolpromise and immune-limitation. *Journal of the Egyptian Society of Toxicology*. 37: 39–51.
- Ali, S., Ren, S. X., Huang, Z. and Wu, J. H. 2010. Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2: 15-22.
- Alves, N. S., Serrão, J. E. and Melo, L. A. 2010. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron*. 41: 592-597.
- Barranco, F. J. E., Bustamante, C. P., Mayorga, R. L., González, C. R., Martínez, C. P. and Azaola, A. 2009.  $\beta$ -N Acetylglucosaminadase production by

- Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia*. 34: 356-360.
- Barranco, F. J. E., Alatorre, R. R., Gutiérrez, R. M., Viniegra, G. G. and Saucedo, G. G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 910-915.
- Bartlett, R. G. and Keil, B. O. C. 1996. Permetrin resistance in *Licoriella mali* (Diptera: Sciaridae) populations from *Agaricus* mushroom farms. In Royse (Ed.) *Mushroom biology and mushroom products* (pp: 459-471) Penn State Univ. USA.
- Borges, D.; Díaz, A.O.; San Juan, A.N. and Gómez, E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar* 44: 49-55.
- Bradford, M. M. 1976. Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Cloyd, A. R. 2015. Ecology of Fungus Gnats (*Bradysia* spp.) in Greenhouse Production Systems Associated with Disease-Interactions and Alternative Management Strategies. *Insects*. 6: 325-332.
- Cloyd, A. R. and Anderson, D. T. 2013. Fungus gnats & insecticide resistance. *GrtowerTalks, Pest Management*. Consultado el 1-XII-2017.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) 2015. "CONAFOR incrementa la calidad de la producción de planta", en *Boletín* 154, Jalisco, México

- Costa, M. S., Pinheiro, D. O., Serrão, J. E. and Pereira, M. J. B. 2012. Morphological Changes in the Midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Larvae Following Exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) Extract. *Neotropical Entomology*. 41: 311–314.
- Culebro-Ricaldi, J. M., Ruiz-Valdivieso, V. M., Rodríguez-Mendiola, M. A., Ávila-Miranda, M. E., Gutiérrez-Miceli, F. A., Cruz-Rodríguez, R. I., Dendooven, L. and Montes-Molina, J. A. 2017. Antifungal properties of *Beauveria bassiana* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* race 3 in tomato crop. *Journal of Environmental Biology*. 38: 821-827.
- El-Ghany, T. M. A., El-Sheikh, H. H., Abd El- Rahman, G. A. and Abd El-Nasser, A. M. (2012). Biodiversity of entomopatogeic fungi new cultivated soil with their using to control of *Galleria mellonella*. *International Journal of Current Research and Review (Section: General Sciences)*. 4: 17-31.
- Ferreira, B. V. C., Cavasin, G., Garcia, S. H. H., Geris, R. e Garcia, S. I. 2010. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da plantado cerrado magonia pubescens (Sapindaceae). *Revista Patologia Tropical*. 39: 309-321.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Reviews Entomology*. 23: 409–442.
- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., PérezVera, O. A., and Cadena-Meneses, J. A. 2015a. Black fungus gnats *Lycoriella ingenua* (Dufor, 1989) and *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) in *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Mexicana Ciencias Forestales*. 6: 90–100.

- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Pérez-Vera, O. A., Cadena-Meneses, J. A., Huerta, H., Rodríguez-Yam, G. and Cruz-Rodríguez, J. A. 2015b. Biology of *Lycoriella ingenua* and *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Madera y Bosques*. 21: 113–128.
- Marín, C.V. H., Huerta, H. y Rodríguez, N. S. 2017a. Familia Sciaridae. *In* Cibrián, T. D. (Ed.). *Fundamentos de entomología forestal*. (pp:444-446). Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.
- Marín-Cruz, V. H., Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Florido, J. E. and Cibrián-Tovar, D. 2017b. Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 23: 329-340.
- Michelle, S. V., Vieira, T. P., Pereira, B. J. D., Mesquita, P. L., Alves, L. E. A. L., and Figueiredo, P. A. L. 2013. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. *African Journal of Biotechnology*. 2: 6491–6497.
- Parra, P. J. R. 2012. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. *In*: A. R. Panizzi and R. P. Parra, eds. *Insect bioecology and nutrition for integrated pest management*. Taylor & Frnacis Gruop, LLC. United States of America. 51-92 pp.
- Quesada-Moraga, E., and Vey, A. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*. 108: 441–452.
- Quintana-López, C. M., Ramos-López, M. A., Figueroa-Brito, R., Bah, M. M., Rico-Rodríguez, M. A. y Pacheco-Aguila, J. R. 2016. Actividad insecticida e



insectistática de *Senna crotalarioides* (Irwin y Barneby, 1979) (FABACEAE) sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). Entomología Mexicana. 3: 171-176.

Resquín-Romero, G., Garrido-Jurado, I. and Quesada-Moraga, E. 2016. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littorales* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Biological Control. 92: 101-110.

Rodríguez, H. C. 2003. Cuantificación de la inhibición del crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales. En C. M. Tornero, J. F. López-Olguín, & A. Aragón (Eds.), Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable (pp. 223–242). México: Benemérita Universidad de Puebla.

Roelfstra, L., Vlimant, M., Betschart B., Pfister, K. and Diehl, P-A. 2010 Light and electron microscopy studies of the midgut and salivary glands of second and third instars of the horse stomach bot, *Gasterophilus intestinalis*. Medical and Veterinary Entomology. 24: 236-249.

Rohlf, M. and Churchill, C. L. A. 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. Fungal Genetics and Biology. 48: 23-34.

Sánchez-Pérez, L. C., Barranco-Florido, J. E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J. F., and Ramos-López, M. A. 2014. Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. Advances in Enzyme Research. 2: 65–76.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2014, Anuario estadístico de la producción forestal, 2013, México.

Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc]. 2009. JMP version 8. Statistical Discovery. From SAS. USA.

White, P. F. (1981). Chemical control of the mushroom sciarid, *Lycoriella uripila* (Winn.). Mushroom Science 12: 265-273.

# CAPÍTULO III

## **Aspectos morfo-fisiológicos del tracto digestivo en larvas de IV estadio de *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae)**

VÍCTOR HUGO MARÍN-CRUZ, SILVIA RODRÍGUEZ-NAVARRO, JUAN ESTEBAN  
BARRANCO-FLORIDO, ROBERTO ALEJANDRO TERRÓN-SIERRA y DAVID  
CIBRIÁN-TOVAR

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco  
Universidad Autónoma Chapingo

Enviado a la revista Colombiana de Entomología, marzo de 2018 (ISSN: 0120-0488)

**Aspectos morfo-fisiológicos del tracto digestivo en larvas de IV estadio de *Bradysia impatiens*  
(Diptera: Sciaridae)**

**Morphophysiological aspects of the digestive tract in IV stage larvae of *Bradysia impatiens*  
(Diptera: Sciaridae)**

**Título corto:** Intestino de larvas de *Bradysia impatiens*

VICTOR HUGO MARÍN-CRUZ<sup>1</sup>, SILVIA RODRÍGUEZ-NAVARRO<sup>2</sup>, JUAN ESTEBAN BARRANCO-FLORIDO<sup>3</sup>, ROBERTO ALEJANDRO TERRÓN-SIERRA<sup>4</sup> y DAVID CIBRIÁN-TOVAR<sup>5</sup>

**Resumen**

La morfología, citología y algunos aspectos fisiológicos del tracto digestivo de larvas de cuarto estadio del siárido *Bradysia impatiens* se estudiaron utilizando microscopía de campo brillante. Se observó la división del tracto digestivo (estomodeo, mesenterón y proctodeo); las células que lo componen son columnares, regenerativas y endocrinas. Las larvas no presentan buche y la digestión del bolo alimenticio se realiza en el intestino medio; tienen dos ciegos gástricos bien desarrollados, que permiten suponer que existe una gran absorción de nutrientes. La membrana peritrófica es del tipo II, con un tamaño de poro que permite el paso de moléculas de hasta 150 kDa y divide el intestino medio en dos regiones, el espacio endo y ectoperitrófico. Tiene cuatro tubos de Malpighi. El intestino medio posee un gradiente de pH que va de alcalino en el intestino anterior a neutro en los ciegos gástricos y el intestino posterior. Tiene un mecanismo de recirculación que mejora la digestión y reutilización de enzimas digestivas, que va del espacio endoperitrófico al ectoperitrófico y viceversa. Las características morfofisiológicas mostradas en las larvas de *B. impatiens* permiten confirmar que son organismos bien adaptados como detritívoros. Además, la membrana peritrófica protege al intestino medio de agentes patógenos.

**Palabras clave:** Estomodeo. Mesenteron. Proctodeo. Membrana peritrófica. Ciegos gástricos.

## Abstract

Morphology, cytology and some physiological aspects of the digestive tract of *Bradysia impatiens* fourth-instar larvae were studied using bright-field microscopy. The division of the digestive tract into stomodeum (foregut), mesenteron (midgut) and proctodeum (hindgut) was observed; the second of which is composed of endocrine, regenerative, column-shaped cells. The larvae present no crop; hence the digestion of the bolus occurs in the midgut. They have two well developed gastric caeca, where it can be assumed that great nutrient absorption takes place. The peritrophic membrane is type II, with a pore size that allows the passage of molecules up to 150 kDa, and which divides the midgut into two regions: the endoperitrophic and ectoperitrophic spaces. There are four Malpighian tubules present. The midgut has a pH gradient ranging from mildly alkaline in the foregut, to neutral in the caeca and hindgut. It has a recirculation mechanism stretching from the endoperitrophic to the ectoperitrophic space and vice versa, which improves digestion and optimizes enzyme production. The morphophysiological features observed in *B. impatiens* larvae confirm that these organisms are well adapted detritivores. Additionally, the peritrophic membrane protects the midgut from pathogenic.

**Key words:** Stomodeo. Mesenteron. Proctodeum. Peritrophic membrane. Gastric caeca.

## Introducción

*Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae), es un díptero con distribución mundial. En México se le encuentra en invernaderos de ornamentales y viveros forestales (Marín-Cruz *et al.* 2017). Este díptero ataca las raíces de plántulas de árboles como eucaliptos y coníferas (Hurley *et al.* 2010; Menzel *et al.* 2006). Cibrián *et al.* (2008) reportan severos daños en viveros forestales en el centro de México, causando la pérdida de hasta 30% de plántulas de coníferas. Las larvas de *B. impatiens* son detritívoras y consumen materia orgánica en descomposición, hongos y raíces (Marín-Cruz *et al.* 2015a); debido a que son pobres en nutrientes, es necesario que continuamente ingieran una gran cantidad de alimento. Generalmente las larvas de las especies de insectos detritívoros producen grandes cantidades de enzimas proteolíticas que hidrolizan los nutrientes que están en su alimento (Sharma *et al.* 1984). Tanto en el cuerpo como en el intestino de las larvas de *B. impatiens* se han aislado los géneros de hongos *Verticillium* (Nees 1816), *Penicillium* (Link 1809), *Alternaria* (Nees 1816), *Fusarium* (Link 1809), *Paecilomyces* (Bainier 1907), *Aspergillus* (P. Micheli 1729) y *Mucor* (P. Micheli ex L. 1753) (Marín-Cruz *et al.*, 2015b), algunos de los cuales son fitopatógenos,

por los que podrían ser vectores de enfermedades de plantas. Las larvas de *B. impatiens* ingieren continuamente microorganismos que pueden ser patógenos o sus toxinas, por lo que en el intestino deben de tener mecanismos bien desarrollados que les permitan contrarrestar un posible daño. El intestino de los insectos al igual que en otros animales, es un órgano importante para realizar funciones vitales como la digestión, absorción de nutrientes, regulación de iones y pH, así como la desintoxicación y eliminación de heces (Terra y Ferreira 2012; James 2002). En los insectos el intestino es un órgano esencial para el crecimiento y estado nutricional de las larvas, ya que puede afectar los subsiguientes estados de pupa, adulto y su potencial reproductivo (Chapman 1998). Pese a la importancia agronómica de *B. impatiens* como insecto plaga y posible agente vector de hongos fitopatógenos en viveros, invernaderos y en la producción intensiva de hongos comestibles (*Agaricus bisporus*) (Lange) Imbach, 1946 (Menzel *et al.* 2003). La anatomía interna y condiciones fisiológicas en el intestino de las larvas se ha investigado en otras especies de dípteros como *Ochlerotatus togoi* (Theobald, 1907) (Diptera: Culicidae) (Intakhan *et al.* 2014); “mosca negra” 45 especies (Diptera: Simuliidae) (Kim y Adler, 2009); *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) (Do Vale *et al.* 2007); *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) (Boonsriwong *et al.* 2006); *Odontosciara* sp. (Rübsaamem, 1908) (Diptera: Sciaridae) (Da Cruz y Morelli 1985) y *Tipula abdominalis* (Say, 1823) (Diptera: Tipulidae) (Sharma *et al.* 1984). En este trabajo se describió la anatomía del intestino de larvas de cuarto estadio de *B. impatiens*, el tipo de células que lo componen, el gradiente de pH en el intestino medio y los ciegos gástricos y el mecanismo de recirculación del bolo alimenticio en el intestino medio, así como la permeabilidad de la membrana peritrófica.

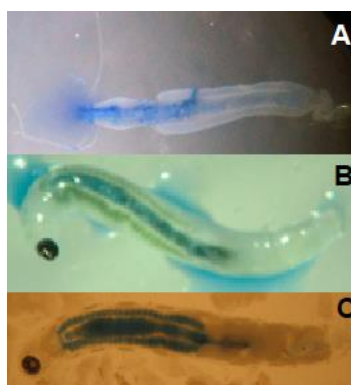
## **Materiales y métodos**

**Insectos.** Los insectos adultos se recolectaron con un aspirador manual, en febrero de 2015 en plantas de *Pinus montezumae* (Lamb) (Pinales: Pinaceae) del vivero forestal de Temamatla, Estado de México (19°45'11" norte y 99°11'15" oeste). La identificación se realizó con las claves taxonómicas de la familia Sciaridae de Mohrig y Menzel (2009), Mohrig *et al.* (2012) y Shin *et al.* (2012). Se estableció una cría en el insectario de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Las cámaras de cría consistieron en recipientes de plástico transparente de medio litro de capacidad con tapa. En las tapas se realizó un corte circular de 1.5 cm de diámetro para introducir los adultos de la *B. impatiens*; se colocaron 10 hembras y dos machos. Dieta: 5 g de bagazo de caña molido y rodajas de papa. Para conservar la humedad se agregaron 40 ml de agua destilada, cada cuatro días. Las cámaras de cría se mantuvieron a una temperatura  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (Marín-Cruz *et al.* 2015a).

**Descripción anatómica del intestino.** Se disecaron 20 larvas en solución Ringer para obtener el sistema digestivo e identificar cada una de las partes (Martínez, 1999). Se realizó un corte transversal en el ano de la larva y después se realizaron cortes en la unión del tegumento con la cabeza de la larva. Todas las observaciones se realizaron con un microscopio óptico compuesto Zeiss® Axiostar Plus, un estereoscopio Zeiss® Stemi 2000-C y una cámara digital Canon® A 620 Power Shot.

**Determinación de tipo de células del intestino.** Las L4 se fijaron en solución de Bouin durante 48 h, se eliminó el fijador con cuatro lavados en alcohol: 70, 90, 96 y 100 % y se incluyeron en parafina Merck®. Se realizaron cortes longitudinales y transversales seriados de 5 µm con un micrótomo Spencer® 820. Los cortes se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Uría y Mora 1996).

**pH del intestino medio y ciegos gástricos.** Se utilizaron los indicadores de pH azul de bromotimol (pKa 7), rojo de fenol (pKa 7,9) y azul de timol (pKa 8,2). Cada indicador de pH se suministró por separado y se mezcló en una concentración de 0,4 % (p/p) con 0,5 g de harina de papa esterilizada. Los experimentos se realizaron con 60 larvas que fueron colocadas individualmente en cajas Petri de 1,5 cm de diámetro y cada larva se alimentó libremente con la mezcla de harina de papa y el colorante indicador. Después de 24 h se estimó el pH en cada región del intestino (Gontijo *et al.* 1998), para lo cual se compararon los colores dentro de éste con los de soluciones tampón de pH conocido, preparadas con los mismos indicadores, a partir de las imágenes obtenidas. Las larvas se observaron sin disección, ya que el tegumento larvario es transparente. Se realizaron 20 observaciones para cada indicador de pH.



**Figura 1.** A) Tracto digestivo de larva de cuarto estadio de *Bradysia impatiens*. B) estructuras del intestino medio con coloración diferente por el indicador de pH azul de bromotimol. C) Larva tenida con azul de dextran de 20,000 Da.

**Recirculación del bolo alimenticio.** El mecanismo de recirculación (contra corriente) en el intestino medio se determinó en 120 larvas, colocadas en grupos de 40, que se ubicaron en cajas Petri de 9 cm



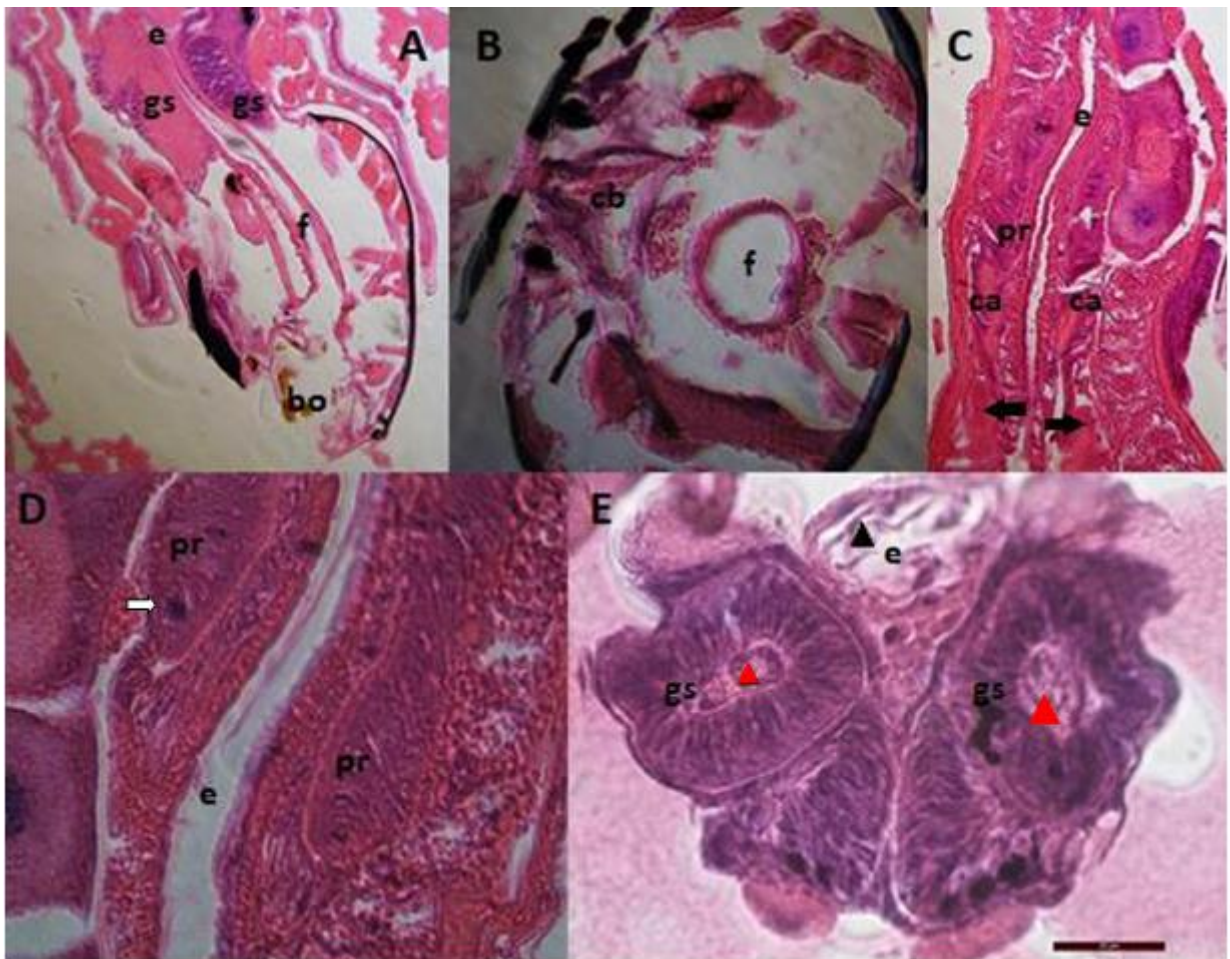
de diámetro. Se alimentaron con harina de papa (0,1 g) y 150 µl azul de dextran de 20,000 Da, al 0,05 % p/p. Una vez que todo el intestino medio se tiñó con el azul de dextran, las larvas se cambiaron de cajas de Petri, y el colorante, se sustituyó por agua destilada. Se observaron a 15, 30, 45 min y a 1, 2, 4, 8, 24 y 48 h.

**Permeabilidad de la membrana peritrófica (MP).** Se utilizó azul de dextran de peso molecular de 5,000, 10,000, 20,000 y 500,000 Da (SIGMA-ALDRICH) 0,05 % p/p y como alimento se utilizó 0,04 g de harina de papa. Cada azul de dextran de diferente peso molecular se suministró a 50 larvas por separado. Se realizaron revisiones con un estereoscopio (Zeiss® Stemi 2000-C) cada 15, 30, 60 min y 2, 4, 8, 16, 24 y 48 h. Una vez que el espacio endoperitrófico se teñía del azul de dextran, las larvas se enjuagaban con agua destilada y se colocaban en un recipiente sin colorante, con la finalidad de no saturar el intestino.

## Resultados

El tracto digestivo en las L4 de *B. impatiens* se compone de un tubo, dividido en tres regiones bien definidas: estomodeo, mesenterón y proctodeo. Las glándulas salivales, ciegos gástricos y tubos de Malpighi, se proyectan del tubo principal del tracto digestivo (Fig. 1A).

**Intestino anterior o estomodeo.** Se compone de boca, faringe, esófago y finaliza en la región anterior del proventrículo. Está revestido internamente con una capa cuticular compuesta de una epicutícula interna y una endocutícula externa con las células epiteliales aplanadas. En esta sección el bolo alimenticio tiene un tránsito muy rápido. La faringe es un tubo simple (Fig. 2A-B). Las dos glándulas salivales se componen de células epiteliales de forma cónica simple y núcleos ovalados, estrechamente empaquetadas y proyectan en su parte apical hacia el lumen central de la glándula. También se observa un compuesto que posiblemente sea la secreción de saliva, este se conecta en la boca y la faringe en el cibarium por medio de un conducto deferente (Fig. 2A-B y E). El esófago es un tubo recto que conecta la faringe con el proventrículo, invaginándose en este último (Fig. 2C-D), circundado por músculos circulares que rodean este tejido. Las L4 de *B. impatiens* poseen un proventrículo globoso y el canal alimentario que lo atraviesa es estrecho y circundado. Los cortes histológicos del proventrículo mostraron que esta estructura se compone de dos regiones, una con tejido característico del intestino anterior y otra correspondiente al intestino medio (Fig. 2C). El tejido posterior del intestino anterior se observa como dos compartimentos separados y redondeados (Fig. 2C-D), además, muestra células epiteliales columnares, y presenta músculos longitudinales y circulares internos que envuelven el epitelio externamente. Los núcleos ovales grandes son conspicuos dentro de las células epiteliales y musculares (Fig. 2D).

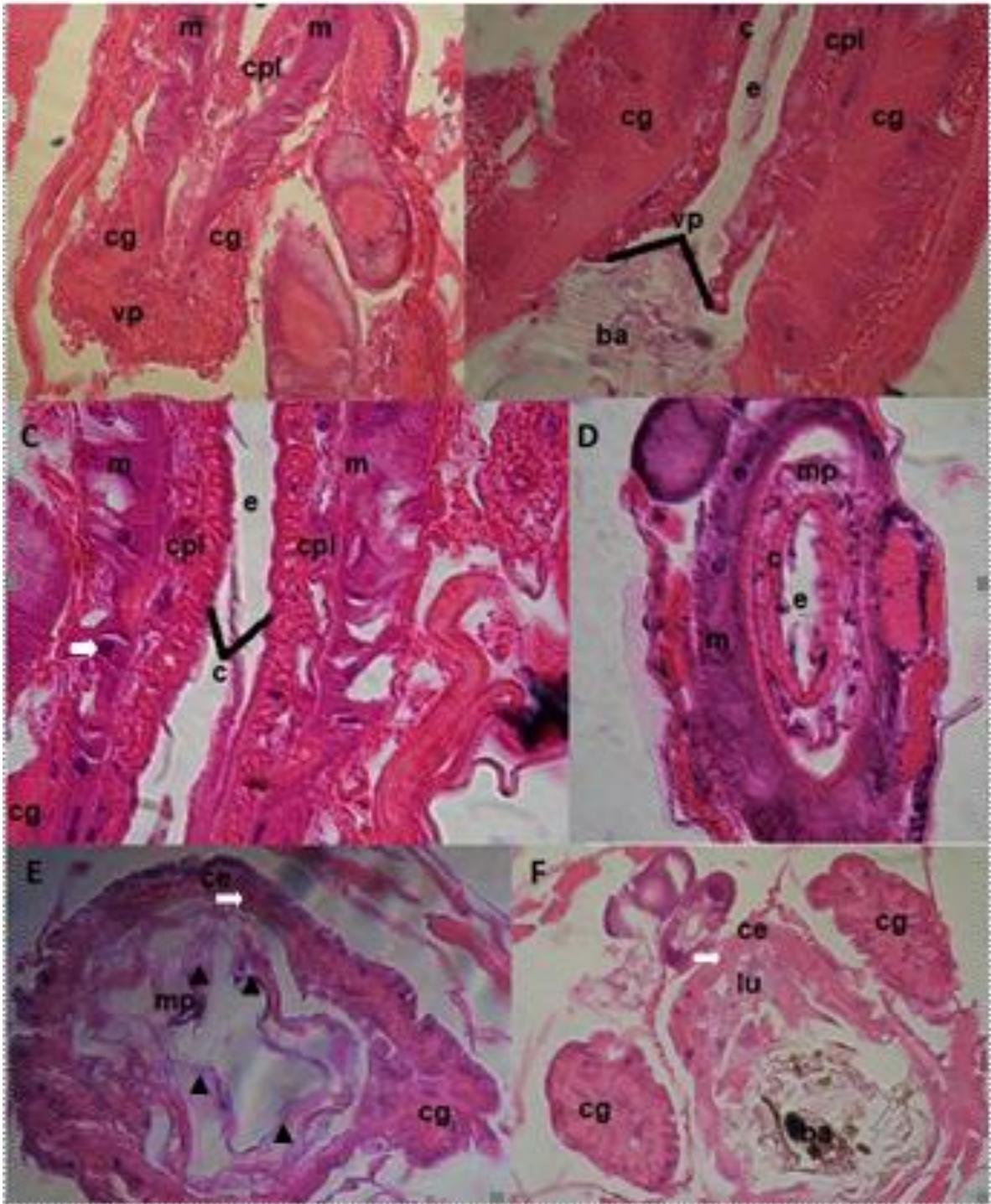


**Figura 2.** Intestino anterior (estomodeo) de larvas de cuarto instar de *Bradysia impatiens*. A) corte longitudinal de cabeza (40x); B) sección transversal de cabeza (100x); C) vista longitudinal de proventrículo (40x); D) corte longitudinal de esófago invaginándose en el proventrículo (100x); E) glándulas salivales y esófago. Boca (bo), cardia (ca), cibarium (cb), esófago (e), faringe (f), glándulas salivales (gs), proventrículo (pr), cabeza de flecha roja saliva (secreción); cabeza de flecha negra secreción de membrana peritrófica; flecha negra unión del ciego gástrico con el intestino anterior.

**Intestino medio o mesenterón.** Es un tubo simple, cuya longitud corresponde a la mitad del total del intestino en *B. impatiens*. Inicia en la región posterior del proventrículo, donde comienza la cardia, justo antes de la unión de los ciegos gástricos (Fig. 3A-B). El intestino medio termina donde se une con el píloro y los tubos de Malpighi. La cardia es un compartimiento redondeado, compuesto por células epiteliales. En el interior del lumen central de la cardia se observa una estructura plegada, que probablemente sea la MP (Fig. 3D-F). Las células epiteliales de esta región tienen grandes núcleos ovales (Fig. 3C).

Las larvas de *B. impatiens* producen permanentemente la MP tipo II, la cual recorre todo el intestino medio hasta invaginarse en el píloro. Esta membrana divide al ventrículo en espacio endoperitrófico y espacio ectoperitrófico (Fig. 3B).

*Bradysia impatiens* presenta dos ciegos gástricos bien desarrollados, que se insertan inmediatamente encima de donde se origina la MP. Los ciegos gástricos son de forma tubular, tan largos como las dos terceras partes del largo del intestino medio y cada uno de ellos tan anchos como la cuarta parte del intestino medio. Tanto los músculos internos circulares como los externos envuelven los ciegos gástricos. Las paredes internas del espacio ectoperitrófico están compuestas de células epiteliales cuboidales que forman un tubo y presentan un arreglo de forma ondulante (arriñonada) que hace lento el recorrido del líquido a través del lumen (Fig. 3E). Las características de los ciegos gástricos permiten suponer que en esta región es donde se realiza la mayor parte de la absorción de los nutrientes y del agua del intestino medio. El ciego gástrico se conforma por tres tipos de células: columnares, de regeneración y secretoras. La mayor parte de los núcleos de las células son grandes y ovales. Además, las células presentan microvellosidades que rodean el área de la célula que está en contacto con el lumen, lo que permite aumentar el espacio de absorción de nutrientes (Fig. 4E). Las células regenerativas se encontraron diseminadas por todo el epitelio, asociadas a las células columnares, lo que indica que el epitelio puede renovarse regularmente o bajo ciertas condiciones. En la parte anterior del intestino medio emerge de la cardia, su aspecto externo es similar al del ciego gástrico, en la superficie es muy lisa con los músculos internos circulares (Fig. 4A). El tejido del intestino medio anterior contiene MP dentro de su lumen central y está rodeado por una sola capa de células epiteliales cuboidales (Fig. 4A).



**Figura 3.** Proventrículo y cardia. A) corte longitudinal de unión del intestino medio anterior e intestino medio, cardia con válvula del proventrículo cerrada (40x); B) vista longitudinal de cardia con válvula del proventrículo abierta (100x); C) cardia (40x); D) corte transversal de la cardia (40x); E) corte transversal de unión de ciegos gástricos y la cardia, membrana peritrófica (40x); F) unión de

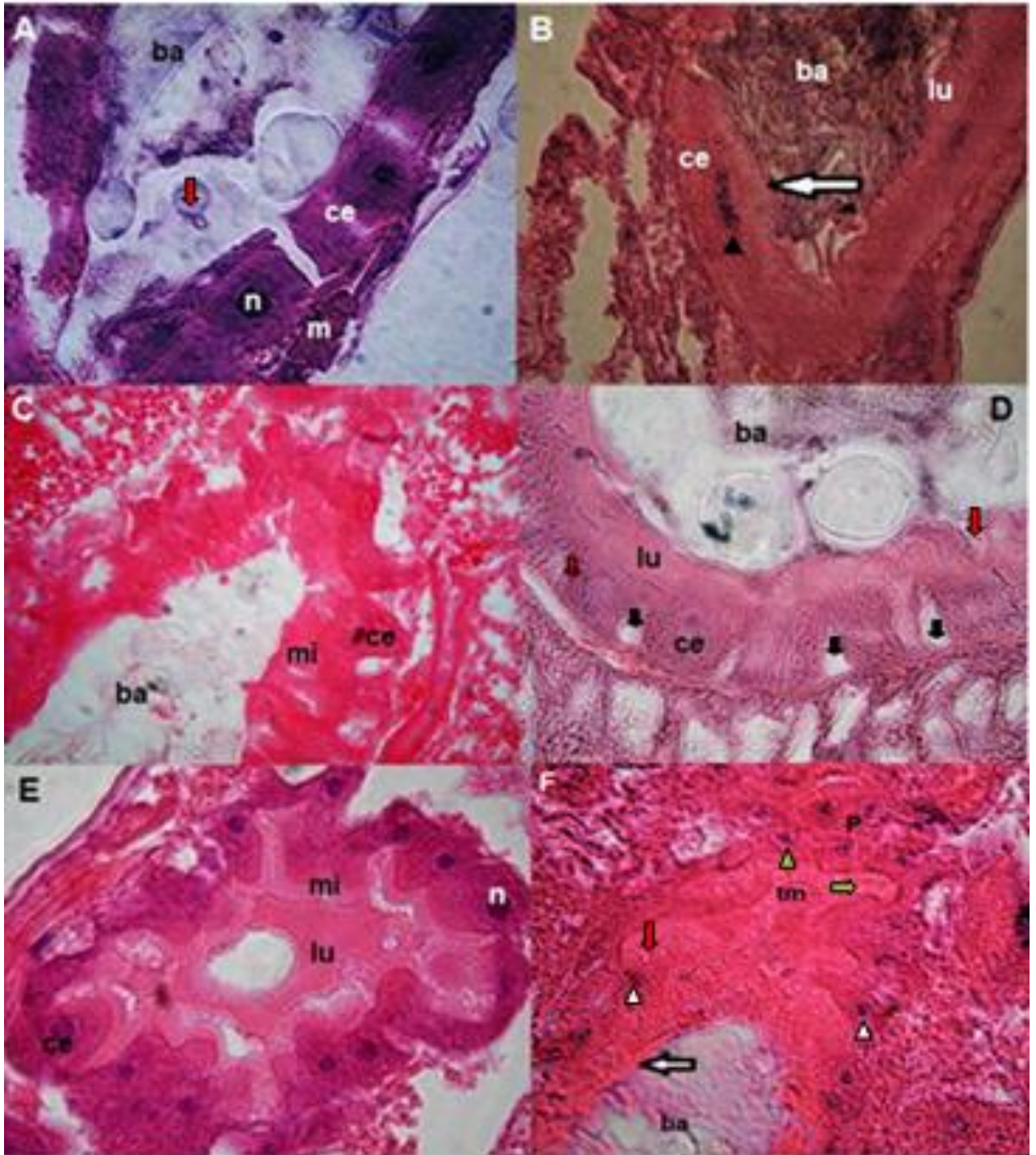


ciegos gástricos e intestino medio. Bolo alimenticio (b<sub>oa</sub>), células epiteliales (ce) del intestino anterior flecha blanca, células productoras de lámina (membrana peritrófica) (cpl), ciegos gástricos (cg), cutícula (c), esófago (e), lumen (lu), músculo (m), membrana peritrófica (mp) cabeza de flecha negra, válvula del proventrículo relajada (vp) punta de flecha grande.

La parte media del mesenterón es una región más dilatada (Fig. 4B) y su estructura es semejante a la del intestino medio anterior, con la MP dentro del lumen rodeado por una capa de células epiteliales cuboidales. La MP se presenta como una membrana fina y transparente (Fig. 4B), mientras que las células epiteliales del intestino medio contienen numerosos gránulos secretorios tanto interna como externamente (fig. 4B). Además, las células del cuerpo graso también son evidentes entre estas células epiteliales. Estas células epiteliales se proyectan hacia adentro desde sus membranas de base y cada una tiene microvellosidades largas que cubren sus superficies apicales internas. El intestino medio posterior está limitado por el píloro. En esta zona se acumula el material del bolo alimenticio que no ha sido digerido por las otras regiones del intestino, empaquetándolo en segmentos para ser enviado al proctodeo. Sin embargo, la morfología de las células epiteliales es sinuosas y muestra gran cantidad de vellosidades largas, lo que sugiere que su función es de absorción de nutrientes y secreción (Fig. 4C-D).

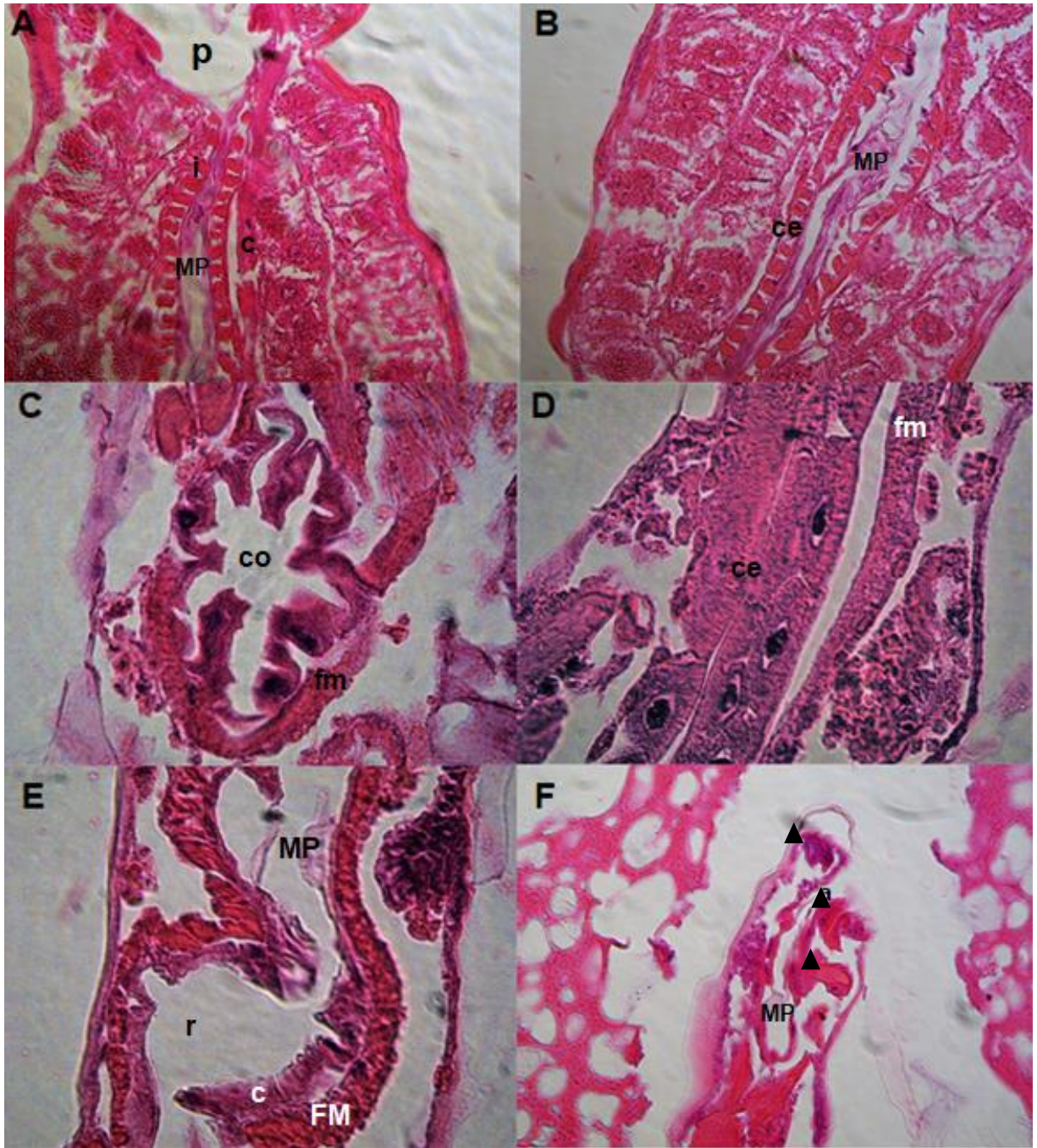
**El intestino posterior (Proctodeo)** de las L4 de *B. impatiens* está compuesto por el píloro, los túbulos de Malpighi, el íleon, el colon, el recto y el ano posterior. En el píloro se observó una capa única característica de células epiteliales cuboidales aplanadas, membrana peritrófica y capa muscular (Fig. 4F). También se observaron grandes gránulos secretorios. Estos gránulos son similares a los encontrados en las células del intestino medio, pero que se presentan en menor cantidad y sólo aparecen en la región apical de las células pilóricas con núcleos relativamente grandes. Los túbulos de Malpighi emergen de la unión del intestino medio y el intestino posterior. Cada uno diverge distalmente en dos estructuras tubulares, formando los cuatro túbulos de Malpighi (Fig. 4F). Los túbulos de Malpighi consisten en largas cadenas de células cuboidales. En un corte transversal se observa que las células contienen un núcleo grande, numerosos gránulos diminutos, microvellosidades cortas y abundantes en su superficie apical que está en contacto con el lumen (Fig. 4F). La superficie externa del íleon, colon, recto y del ano es similar a la del intestino medio al estar cubierta con una capa muscular e incrustada con abundantes traqueolas para el intercambio gaseoso (Fig. 5A-B). Se observó una cutícula característica del intestino posterior, que rodeaba el lumen del íleon (Fig. 5A). En una sección transversal del íleon, se observa que su pared está formada principalmente por una capa de células epiteliales cuboidales con grandes núcleos ovalados y alguna fibra muscular periférica (Fig. 5A y B) y en esta región se observó la MP. Una sección del colon (Fig.

5C) y del recto (Fig. 5D) mostró tener características similares con el íleon, excepto que exhibieron más fibra muscular que éste. En la región anal, las células mioepiteliales que son uninucleadas o multinucleadas comprenden el componente más grande de la pared del tubo anal (Fig. 5F). La MP se observa dentro del tubo anal (Fig. 5F).



**Figura 4.** Intestino medio, ciegos gástricos y tubos de Malpighi (100x). A) células epiteliales del intestino medio anterior; B) células epiteliales del intestino medio medio; C y D) células epiteliales del intestino medio posterior con abundantes microvellosidades; E) vista transversal de ciego gástrico; F) corte longitudinal de tubos de Malpighi. Bolo alimenticio (ba), células epiteliales (ce), lumen (lu), músculo (m), microvellosidades (mi), núcleo celular (n), píloro (p), tubos de Malpighi (tm), punta de flechas blancas señalan membrana peritrófica, flecha roja gránulos secretores, flechas negras células del cuerpo graso, cabeza de flecha negra núcleo celular. Cabeza de flecha blanca núcleos células pilóricas, cabeza de flecha verde células cuboidales con núcleos grandes, flecha verde microvellosidades de las células de los tubos de Malpighi.



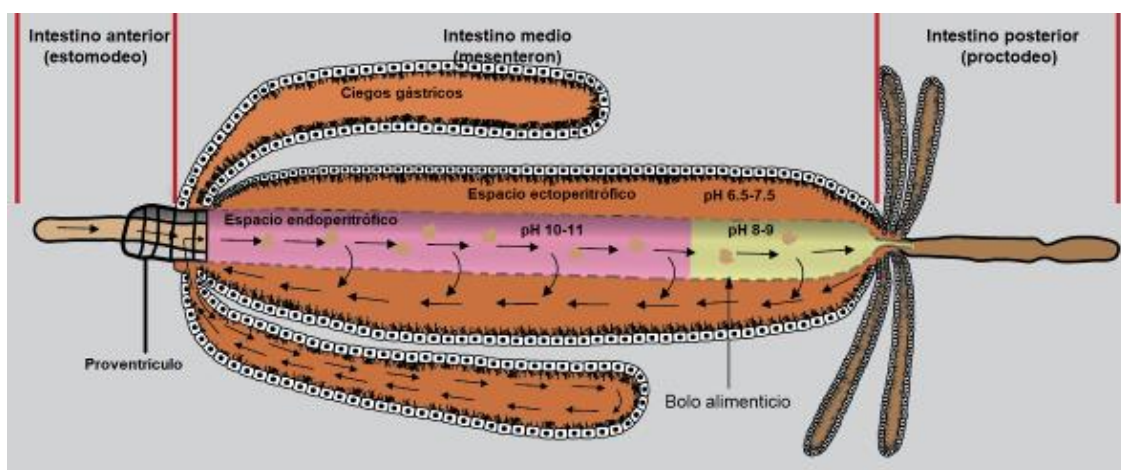


**Figura 5.** Intestino posterior (proctodeo). A) vista longitudinal del píloro e íleon (40x); B) corte longitudinal del íleon (100x); C) vista transversal colon (100x); D) vista longitudinal del recto (40x); E y F) vista longitudinal del recto y ano (100x y 40x respectivamente). Ano (a), células epiteliales (ce), colon (co), cutícula (c), Íleon (i), membrana peritrófica (MP), Píloro (p), recto (r), fibra muscular (fm), cabeza de flecha negra células mioepiteliales.

**pH del intestino medio y ciegos gástricos.** El intestino medio en las L4 de *B. impatiens*, tiene un gradiente de pH que varía de 10-11 en el intestino medio anterior a 6.5-7.5 en el intestino medio posterior en la región del espacio endoperitrófico, mientras que en el espacio ectoperitrófico y los ciegos gástricos el pH es neutro (Fig. 6). Observaciones previas mostraron que el alimento pasa rápidamente por el intestino anterior y posterior, por lo cual no fue posible medir el pH en estas regiones del tubo digestivo.

**Recirculación del intestino medio.** En 2 h el azul de dextran de 20 kDa recorrió el tracto digestivo de las L4 de *B. impatiens*, aunque no se observó tinción en el intestino anterior, mientras que el intestino posterior se tiñó solo cuando el bolo alimenticio era empujado en forma de excretas. Sin embargo, en el intestino medio el espacio endoperitrófico se comenzó a teñir a los 15 min y después de 30 min quedó teñido por completo; el espacio ectoperitrófico comenzó a teñirse a los 45 min y los ciegos gástricos a los 60 min. Se observó que en las larvas de *B. impatiens* existe un mecanismo de recirculación del bolo alimenticio en todo el intestino medio (espacio endo y ecto peritrófico). Dependiendo del tamaño de las fracciones alimenticias pueden atravesar la MP y entrar al espacio ectoperitrófico y pasar a formar parte del líquido del lumen, el cual recorre el intestino medio en dirección del píloro a los ciegos gástricos. Posteriormente el líquido del lumen recorre los ciegos gástricos y las fracciones que no son asimiladas regresan nuevamente al espacio endoperitrófico, para recircularse o pasar al intestino posterior para ser evacuado (Fig. 6).

**Permeabilidad de la membrana peritrófica.** La MP en las L4 de *B. impatiens* fue permeable al azul de dextran de 5, 10 y 20 kDa, una hora después de su aplicación. En todos los casos el espacio endoperitrófico se tiñó de azul en 30 min, la tinción del espacio ectoperitrófico y los ciegos gástricos a los 60 min. A las 24 h el azul de dextran de 500 kDa se encontró en el espacio endoperitrófico y después de 48 h el azul de dextran permaneció en el espacio endoperitrófico. Esto indica que la MP es impermeable a este tamaño de molécula.



**Figura 6.** Esquema del sistema de recirculación y pH en el intestino medio en larvas de cuarto instar de *Bradysia impatiens*.

## Discusión

El tracto digestivo de las L4 de *B. impatiens* presentó una estructura similar a la mayoría de los insectos dividiéndose en tres regiones: estomodeo, mesenteron y proctodeo (Terra y Ferreira 2012; Chapman 1998). En las L4 no fue posible identificar un divertículo (buche), lo que indica que no hay almacenamiento de alimento en el estomodeo. Además, con la tinción del bolo alimenticio no se observó que permaneciera almacenado en algún órgano, sino que pasa de manera inmediata al intestino medio, lo que también permite considerar que en las larvas de *B. impatiens* no existe el buche. Esta característica también se presenta en las larvas de cuarto estadio de *L. longipalpis* (Do Vale *et al.* 2007). En el orden Diptera, el buche es una estructura que tiene la función de almacenamiento y digestión del flujo del bolo alimenticio (Stoffolano y Halselton 2013). Las células del estomodeo no intervienen en el proceso de secreción de enzimas o absorción de nutrientes, característica que es similar a la de otros insectos (Terra y Ferreira 2012). La cutícula (epi- y endocutícula) que se observó en el esófago de la L4 de *B. impatiens* fue similar en estructura a la descrita en las de la mosca *C. megacephala* (Boonsriwong *et al.* 2006).

Las características morfológicas de las glándulas salivales de *B. impatiens* se asemejan a las mostradas por Evangelista y Leite (2007) para la larva de primer estadio de *Dermatobia hominis* (L., 1781) (Diptera: Oestridae) y *C. megacephala* (Boonsriwong *et al.* 2006), que tienen glándulas tubulares simples que se abren en estrechos conductos eferentes en cada lado, pero *B. impatiens* difieren en que convergen para formar un solo conducto deferente mediano que conduce a la cavidad oral.

La cardia es el órgano donde se encuentran las células que producen la MP, la cual es del tipo II y distingue al orden Diptera (Hegedus *et al.* 2009). Las L4 de *B. impatiens* poseen un proventrículo globoso. Esta estructura también se observa en *Stomoxys calcitrans* (L., 1758) (Diptera: Muscidae) (Lehane 1997) o en la mosca de la fruta, *Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912) (Diptera: Tephritidae) (Lee *et al.* 1998); *C. megacephala* (Boonsriwong *et al.* 2006) y en *L. longipalpis* (Do Vale *et al.* 2007). Además, se observó que la MP es producida de forma continua por la cardia y se distribuye a lo largo del intestino medio (Terra y Ferreira 2012).

Las L4 de *B. impatiens* presentan dos ciegos gástricos. El número de ciegos gástricos en las larvas de los dípteros puede variar de cero a ocho y así, en *Gasterophilus intestinalis* (De Geer, 1776) (Diptera: Oestridae) (Roelfstra *et al.* 2010) y *L. longipalpis* (Diptera: Psychodidae) (Do Vale *et al.* 2007) no

están presentes. En *Rhynchosciara americana* (Wiedemann, 1821) (Diptera: Sciaridae) se encuentran dos (Ferreira *et al.* 1981), mientras que, *Odontosciara* (Diptera: Sciaridae) (Da Cruz y Morelli 1985) y *C. megacephala* tienen cuatro (Boonsriwong *et al.* 2006) y las larvas de “mosca negra” (Diptera: Simuliidae) de cero a ocho (Kim y Adler 2009). El análisis morfológico de los ciegos gástricos en las larvas de *B. impatiens*, muestra que tienen mayor volumen con respecto a las larvas de las especies de dípteros antes mencionadas, característica que, junto con la forma arriñonada de las células epiteliales y la gran cantidad de microvellosidades apicales y laterales de las células columnares, permiten suponer que en esta región se realiza la mayor absorción de nutrientes. La presencia de microvellosidades en las células es indicativa de que su función es de absorción (Da Cruz y Morelli 1985). Además, los ciegos gástricos contribuyen de forma importante para crear el flujo de contracorriente en los espacios endo y ectoperitrófico (Terra *et al.* 1988, 1990), el mecanismo de flujo de contracorriente permite reciclar las enzimas que intervienen en el proceso de la digestión. En muchas de las larvas del suborden Nematocera, la excreción del agua del intestino medio se realiza en la parte posterior de los ciegos gástricos (Terra 1988). La tinción del intestino medio por el Azul de dextran de 20 kDa mostró que el agua entra a través del tracto digestivo y del intestino medio posterior, saliendo por los ciegos gástricos y reingresa al espacio ectoperitrófico por alguna región del intestino medio posterior o por los tubos de Malpighi. Proceso que fue descrito por Dow (1981) y sugiere que algunas de las funciones de los ciegos gástricos en las larvas de *B. impatiens* es la de absorción de nutrientes y recirculación del bolo alimenticio. Sin embargo, es necesario realizar estudios más detallados sobre este mecanismo en los estadios inmaduros de esta especie de Sciaridae. En las larvas de *B. impatiens* el intestino medio está dividido en dos regiones por la MP: espacio endoperitrófico y ectoperitrófico. Esta organización es característica de los dípteros como *Aedes aegypti* (L., 1762) (Diptera: Culicidae) (Ferreira *et al.* 2010), *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae) (Nunes *et al.* 2010) y *C. megacephala* (Boonsriwong *et al.* 2006). En el presente trabajo se evidenció que la MP de las L4 vivas de *B. impatiens* es permeable a moléculas iguales o menores de 20 kDa y es impermeable a moléculas de 500 kDa, resultados que son similares a los obtenidos en larvas de *R. americana*, en las cuales la MP es permeable a moléculas menores de 100 kDa (Bolognesi *et al.* 2008), en *A. aegypti* y *Anopheles gambiae* (Giles, 1902) (Diptera: Culicidae) la MP es permeable a moléculas iguales o menores a 148 kDa (Edwards y Jacobs-Lorena 2000). El paso de moléculas de hasta 148 kDa indica que la MP en larvas L4 de *B. impateins* tiene poros de hasta 9 nm (Edwards y Jacobs-Lorena, 2000). El tamaño de los poros de la MP en las larvas de los dípteros tiene un rango de 7.5-9 nm de diámetro (Bolognesi *et al.* 2008; Terra 2001; Edwards y Jacobs-Lorena 2000; Miller y Lehane 1990; Terra y Ferreira 1983). Este tamaño de poro sugiere que la MP es permeable a proteínas globulares de aproximadamente 148 kDa. Nuestros resultados son



consistentes con el hecho de que macromoléculas como las enzimas digestivas deben atravesar la MP para realizar la digestión del bolo alimenticio.

Las larvas de *B. impatiens* se han asociado con el transporte de hongos fitopatógenos (Marín *et al.* 2015a), debido a que los conidios pasan por el tracto digestivo sin sufrir daño alguno en su capacidad de germinación lo que podría indicar que el tamaño del poro de la MP impide el paso de los conidios al espacio ectoperitrófico, aunque se requiere de un estudio más detallado.

El intestino medio es la región responsable de la digestión y la absorción (Dow 1986). El presente estudio muestra que el intestino medio de la L4 *B. impatiens* está dividido en las regiones anterior, media y posterior, como se describió previamente para larvas de *G. intestinalis* (Roelfstra *et al.* 2010). Se observaron tres tipos de células: epiteliales, regenerativas y endocrinas, presentes también en la L4 de *O. togoi* (Intakhan *et al.* 2014). Las células epiteliales que constituyen el intestino medio anterior son columnares aplanadas, sin aumento del área que está en contacto con el lumen y su función parece ser de unión de los ciegos gástricos con el intestino medio, además de que presentan microvellosidades cortas. Las células columnares que constituyen el epitelio del intestino medio y posterior tienen microvellosidades largas en la membrana plasmática apical y por lo tanto, el área de la membrana disponible para la secreción o absorción se incrementa. La membrana plasmática basal tiene numerosos pliegues, que forman un laberinto de canales complejo, están generalmente relacionadas con el transporte activo de agua e iones (Terra *et al.* 1988) y pueden estar involucradas en flujos de intestino medio importantes para la translocación de enzimas y productos de la digestión (Terra y Ferreira 2005). Las células regenerativas en larvas de *B. impatiens* son similares a las reportadas por Evangelista y Leite (2003) en larvas de *D. hominis*, pero según Terra *et al.* (1988) parecen estar ausentes en algunas larvas de dípteros. El papel de la célula endócrina en el control de las funciones del intestino medio aún no está claro, pero en los vertebrados estas células tienen una función en la regulación de las actividades intestinales (Lehane 1997; Boonsriwong *et al.* 2006; Taha *et al.* 2010).

EL pH del intestino medio es una propiedad ambiental interna que afecta la actividad de las enzimas digestivas y es el resultado de la adaptación de un insecto ancestral a una dieta particular (Terra y Ferreira 2012). Por lo regular, las larvas de dípteros detritívoros de Nematocera tienen un gradiente de pH en el intestino medio, con una alta alcalinidad en el intestino medio anterior y bajo nivel del pH en la región del intestino medio posterior, característica que ha sido reportada en *L. longipalpis* (Do Vale *et al.* 2007), *A. gambiae* (Neira *et al.* 2008) *C. quinquefasciatus* (Nunes *et al.* 2010) y *T. abdominalis* (Martin *et al.* 1980). El pH en la L4 de *B. impatiens*, presenta un comportamiento similar al de las larvas de Nematocera, por lo que la función de cada región del intestino medio de *B. impatiens*, puede ser similar a la que reporta Neira *et al.* (2008) para larvas de *A. gambiae*, donde los

ciegos gástricos y el intestino medio posterior tienen una función de metabolismo de proteínas y carbohidratos y en menor medida el metabolismo y absorción de lípidos. Ferreira y Terra (1982), al analizar la actividad enzimática específica en diferentes regiones del intestino medio de larvas del síarido detritívoro *R. americana*, que se alimenta de hongos y materia orgánica, sugirieron que los ciegos gástricos y el intestino medio posterior son los principales compartimentos donde se produce la digestión de proteínas y carbohidratos, con poca o ninguna participación del intestino medio anterior y señalaron que en las larvas de los dípteros, los ciegos gástricos son particularmente ricos en peptidasas, mientras que la actividad de carbohidrasas fue más abundante en el intestino medio posterior.

Los altos niveles de alcalinidad del intestino medio anterior están relacionados con la solubilización de complejos proteína-tanino, o la extracción de hemicelulosa del detritus foliar ingerido (Terra, 1990). Además, la alta alcalinidad del intestino medio anterior puede actuar en las partículas de humus y en los microorganismos presentes en la dieta de la larva, lo que permite la solubilización y dispersión más fácil y rápida de proteínas, carbohidratos complejos y lípidos y facilita la acción de las enzimas digestivas (Terra 1988). Neira *et al.* (2008) reportan que el pH tan alcalino en el intestino medio sugiere que la absorción de lípidos es intensa en esta región, ya que las condiciones alcalinas en el intestino de insectos podrían reducir la precipitación de sustancias surfactantes como la lisolecitina, presentes en el fluido intestinal, lo que a su vez facilita la solubilización de lípidos en la dieta y el transporte a través de las células de la mucosa (De veau y Schultz 1992).

## **Conclusiones**

El tracto digestivo de larvas de cuarto instar de *B. impatiens* se divide en mesenterón, estomodeo y proctodeo. Las células que lo componen son columnares, regenerativas y endócrinas. La digestión del bolo alimenticio se realiza en el intestino medio, tienen dos ciegos gástricos bien desarrollados, donde existe una gran absorción de nutrientes. La MP es del tipo II, con un tamaño de poro que permite el paso de moléculas de hasta 150 kDa. Tiene cuatro tubos de Malpighi. El intestino medio tiene un gradiente de pH que va de alcalino (intestino anterior) a neutro (ciegos gástricos e intestino medio posterior). Presenta un mecanismo de recirculación que mejora la digestión y optimiza la producción de enzimas que van del espacio endoperitrófico al ectoperitrófico y viceversa. Las características morfofisiológicas mostradas por las larvas permiten confirmar que son organismos bien adaptados como detritívoros.

## Agradecimientos

Los autores agradecen: Osvaldo López Díaz responsable del laboratorio de Histopatología, perteneciente a la Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAM-X; Celina Llanderal Cázares por su valiosa aportación como revisora; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado otorgada a Víctor Hugo Marín Cruz, y a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y al Doctorado en Ciencias Agropecuarias (UAM-X) por el financiamiento para desarrollar el presente trabajo.

## Literatura citada

- BAKER, J. E.; WOO, S.; M; BYRD, R. V. 1984. Ultrastructural features of the gut of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) with notes on distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. *Canadian Journal of Zoology* 62 (7): 1251-1259.
- BOLOGNESI, R., TERRA, W. R.; FERREIRA, C. 2008. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency theoretical and experimental models. *Journal of Insect Physiology* 54: 1413-1422.
- BOONSRIWONG, W.; SUKONTASON, K.; OLSON, J. K.; VOGTSBERGER, R. C.; CHAITHONG, U.; KUNTALUE, B.; NGERN-KLUN, R.; UPAKUT, S.; SUKONTASON, K. L. 2006. Fine structure of the alimentary canal of the larval blow fly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Parasitology Research* 100 (3): 561-574.
- CHAPMAN, R. F. 1998. *The insects: structure and function*, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 770 p.
- CIBRIÁN, T. D.; GARCÍA, D. S.; DON JUAN, M. B. 2008. *Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros*. Comisión Nacional Forestal. México. 153 p.
- DA CRUZ, L. C.; MORELLI S. M. R. L. 1985. Aspectos da ultra-estrutura dos cecos gástricos da larva de *Odontosciara* sp. (Diptera: Sciaridae). *Revista Brasileira de Zoologia*. 3 (4): 181-188.
- DE VEAU, E. J. I.; SCHULTZ, J. C. 1992. Reassessment of interaction between gut detergents and tannins in Lepidoptera and significance for gypsy-moth larvae. *Journal of Chemical Ecology* 18 (8): 1437-1453.
- DO VALE, F. V.; PEREIRA, H. M.; FIGUEIREDO, N. G. 2007. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Insect Physiology* 53 (11): 1151-1159.



- DOW, J. A. T. 1986. Insect midgut function. p. 187-328. En: Evans, P. D.; Wigglesworth, V. B. (Eds.). *Advances in Insect Physiology*. Volumen 19: University Cambridge, Academic Press. London, England. 434 p.
- DOW, J. A. T. 1981. Countercurrent flows, water movements and nutrient absorption in the locust midgut. *Journal of Insect Physiology* 27 (9): 579-585.
- EVANGELISTA, L. G.; LEITE, A. C. 2007. Salivary glands of second and third instars of *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology* 44 (3): 398-404.
- EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. 2000. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology* 46 (9): 1313-1320.
- FERREIRA, C.; CAVASIN, G.; GARCIA, S. H. H.; GERIS, R.; GARCIA, S. I. 2010. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da plantado cerrado magonia pubescens (Sapindaceae). *Revista Patología Tropical* 39 (4): 309-321.
- FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. 1981. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. *Journal Insect Physiology* 27 (8): 559-570.
- FERREIRA, C.; TERRA, W. R. 1982. Function of midgut ceca and ventriculus microvilli bound enzymes from cells of different midgut regions of starving and feeding *Rhynchosciara americana* larvae. *Insect Biochem* 12 (3): 257-262.
- GONTIJO, N. F.; ALMEIDA-SILVA, S.; COSTA, F. F.; MARES-GUIA, M. L.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. 1998. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases and some speculations upon *Leishmania* development. *Experimental Parasitology* 90 (3): 212-219.
- HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOT, C.; TOPRAK, U. 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 54: 285-302.
- HURLEY, B. P.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B. D.; GOVENDER, P.; SMITH J. E.; WINGFIELD, M. J. 2010. Genetic diversity of *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) populations reflects movement of an invasive insect between forestry nurseries. *Biological Invasions* 12 (4): 729-733.
- INTAKHAN, N.; JARIYAPAN, N.; CHANMOL, W.; SOR-SUWAN, S.; PHATTANAWIBOON, B.; SAEUNG, A.; CHOOCHOTE, W.; BATES, P. A. 2014. Midgut ultrastructure of fourth instar *Ochlerotatus togoi* (DIPTERA: CULICIDAE). *Southeast Asian Journal of Medicine and Public Health* 45 (6): 1301-1315.
- JAMES, L. N. 2002. *Insect physiology and biochemistry*. CRS Press. Washington D.C. U.S.A. 485p.
- KIM, S. K.; ADLER, P. H. 2009. Digestive system of larval black flies (Diptera: Simuliidae): structure and phylogeny. *Invertebrate Biology* 128 (2): 182-204.

- LEE, W. Y.; CHEN, M. E.; LIN, T. L. 1998. Morphology and ultrastructure of the alimentary canal of Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (I): the structure of the foregut and cardia. *Zoological Studies* 37 (2): 95-101.
- LEHANE, M.J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*. 42:525-550.
- MARÍN-CRUZ, V. H.; HUERTA, H.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, S. 2017. Familia Sciaridae. p. 444-446. En: CIBRIAN-TOVAR, D (Ed.). *Fundamentos de entomología forestal*. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México, México. 531 p.
- MARÍN-CRUZ, V. H.; CIBRIÁN-TOVAR, D.; MÉNDEZ-MONTIEL, J. T.; PÉREZ-VERA, O. A.; CADENA-MENESES, J. A. 2015a. Control del mosquito fungoso negro *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) y *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) en *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Mexicana Ciencias Forestales* 6 (27): 90-100.
- MARÍN-CRUZ, V. H.; CIBRIÁN-TOVAR, D.; MÉNDEZ-MONTIEL, J. T.; PÉREZ-VERA, O. A.; CADENA-MENESES, J. A.; HUERTA, H.; RODRÍGUEZ-YAM, G.; CRUZ-RODRÍGUEZ, J. A. 2015b. Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Madera y Bosques* 21 (1): 113-128.
- MARTIN, M. M.; MARTIN, J. S.; KUKOR, J. J.; MERRITT, R. W. 1980. The digestion of protein and carbohydrate by the stream detritivore, *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae). *Oecologia* 46 (3): 360-364.
- MARTÍNEZ, M. I. 2002. Estudio de la anatomía microscópica en Insectos. *Folia Entomológica Mexicana* 30: 187-105.
- MENZEL, F.; SMITH, J. E.; COLAUTO, B. N. 2003. *Bradysia difformis* Frey and *Bradysia ocellaris* (Comstock): two additional neotropical species of black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) of economic importance: a redescription and review. *Annals of the Entomological Society of America* 96 (4): 448-457.
- MENZEL, F.; SMITH, J. E.; CHANDLER, J. P. 2006. The sciarid fauna of the British Isles (Diptera: Sciriadae), including descriptions of six new species. *Zoological Journal of the Linnean Society* 146 (1): 1-147.
- MILLER, N.; LEHANE, M. S. 1990. *In vitro* perfusión studies on the peritrophic membrane of the Tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Journal Insect Physiology* 36 (11): 813-818.
- MOHRIG, W.; F. MENZEL. 2009. Sciaridae (Black fungus gnats). p. 279-292. En: BROWN, B.V.; BORKENT, A.; CUMMING, J. M.; WOOD, D. M.; WOODLEY N. E.; ZUMBADO, M. A.

- (Eds.). Manual of Central American Diptera Vol 1. Monograph Publishing Program. Canada: National Research Council of Canada. 714 p.
- MOHRIG, W.; HELELR, K.; HIPPA, H.; VILKAMAA P.; MENZEL, F. 2012. Revision of black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) of North America. *Studia Dipterologica* 19 (1/2): 141-286.
- NEIRA, O. M.; VANEKERIS, L.; CORENA-MCLEOD, M. D. P.; LINSER, P. J. 2008. A microarray-based analysis of transcriptional compartmentalization in the alimentary canal of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insect Molecular Biology* 17 (1): 61-72.
- NUNES, A. S.; SERRÃO, J. E.; LANE, M. A. 2010. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron* 41 (6): 592-597.
- ROELFSTRA, L.; VLIMANT, M.; BETSCHART B.; PFISTER, K.; DIEHL, P. A. (2010) Light and electron microscopy studies of the midgut and salivary glands of second and third instars of the horse stomach bot, *Gasterophilus intestinalis*. *Medical and Veterinary Entomology* 24 (33): 236-249.
- SHARMA, B. R.; MARTIN, M. M.; SHAFER, J. A. 1984. Alkaline proteases from the gut fluids of detritus feeding larvae of the crane fly *Tipula abdominalis* (Say) (Diptera: Tipulidae). *Insect Biochemistry* 14 (1): 37-44.
- SHIN, S. G.; LEE, H. S.; LEE, S. 2012. Dark winged fungus gnats (Diptera: Sciaridae) collected from shiitake mushroom in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15 (1): 174-181.
- STOFFOLANO, G. J.; HASELTON, A. 2013. The adult dipteran crop: a unique and overlooked organ. *Annual Review of Entomology* 58: 205-225.
- TAHA, N.; ABDEL-MEGUID, A.; EL-EBIARIE, A.; TOHAMY, A. A. 2010. Ultrastructure of the Midgut of the Early Third Larval Instar of *Chrysomya megacephala* (Diptera:Calliphoridae). *Journal of American Science* 6 (10):1-6.
- TERRA, W. R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35: 181-200.
- TERRA, W. R. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47: 47-61.
- TERRA, W. R.; ESPINOZA-FUENTES, F. P., RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. 1988. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. *Journal of Insect Physiology* 34 (6): 463-472.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. 1983. Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara americana* do not enter the endoperitrophic space. *Insect Biochem* 13 (2): 143-150.

- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. 2005. Biochemistry of digestion. p. 171-224. En: Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford. 560 p.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. 2012. Molecular and evolutionary physiology of insect digestion. p. 93-115. En: Panizzi, A. R.; Parra, R. P. (Eds.). *Insect bioecology and nutrition for integrated pest management*. Taylor & Francis Group, LLC. United States of America. 732 p.
- URÍA, E.; MORA, C. 1996. *Apuntes para el curso teórico práctico de histología animal*. ENCB. IPN. México.

## CONCLUSIONES

1. Los conidios y metabolitos de bajo peso molecular de *B. bassiana*, producidos mediante fermentación sólida y suministrados por ingestión, en condiciones de laboratorio, son métodos efectivos para el manejo de larvas de *B. impatiens*.
2. Es el primer estudio científico que documenta el efecto insectistático de los metabolitos de bajo peso molecular de *Beauveria bassiana* sobre *B. impatiens*.
3. Los metabolitos y conidios de *B. bassiana* protegen entre 97-100% a las plántulas de *P. montezumae* contra larvas de *B. impatiens* durante 60 días en invernadero.
4. Los metabolitos de bajo peso molecular de *B. bassiana* dañan las células epiteliales del intestino medio y los ciegos gástricos, causando reducción en las microvellosidades, provocando que las larvas no puedan asimilar los nutrientes; ocasiona un efecto insectistático en *B. impateins*, manifestándose en la prolongación del ciclo de vida, alteración de la metamorfosis y malformaciones al insecto.
5. El intestino en las larvas de *B. impatiens* tiene características morfofisiológicas, que les permiten eficientar la asimilación de nutrientes confirmando que son fitófagas y detritívoras.
6. Los conidios y metabolitos de bajo peso molecular de *B. bassiana* son una alternativa para ser aplicados de manera preventiva y correctiva para el manejo de *B. impatiens* en plántulas de *P. montezumae* en invernadero y viveros.

Finalmente, los resultados obtenidos permitieron cumplir el objetivo general y los específicos de manera satisfactoria.

## PERSPECTIVAS

1. Identificación de las moléculas que se encuentran en los metabolitos secundarios de bajo peso molecular, así como las responsables del efecto insecticida e insectistático.
2. Establecer las condiciones para el escalamiento de la producción de moléculas con efecto insectistático de *B. bassiana*.
3. Validación en invernaderos y viveros comerciales el uso de conidios y metabolitos de bajo peso molecular de *B. bassiana* para el control del mosco fungoso negro.
4. Generar un protocolo de transferencia de tecnología de bioinsecticidas para el manejo de *B. impatiens* en viveros e invernaderos, para productores e instituciones gubernamentales.

## Referencias generales

- Acharya, N., A. R. Seliga, G. E. Rojotte, Jenkins, E. N. Jenkins and B. T. Matthew. 2015. Persistence and efficacy of a *Beauveria bassiana* biopesticide against the house fly, *Musca domestica*, on typical structural substrates of poultry houses. *Biocontrol Science and Technology*, 25(6): 697–715.
- Braun, S. E., J. P. Sanderson, E. B. Nelson, M. L. Daughtrey and S. P. Wraight. 2009. Fungus gnat feeding and mechanical wounding inhibit *Pythium aphanidermatum* infection of geranium seedlings. *Phytopathology*, 99(12): 1421-1428.
- Cibrián, T. D., D. S. E. García, y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en viveros forestales. CONAFOR. México. 62 p.
- Cloyd, R. A. 2015. Ecology of Fungus Gnats (*Bradysia* spp.) in Greenhouse Production Systems Associated with Disease-Interactions and Alternative Management Strategies. *Insects*, 6: 325-332. doi:10.3390/insects6020325
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), 2015, “CONAFOR incrementa la calidad de la producción de planta”, en Boletín 154, Jalisco, México.
- Chapman, R. F. 1998. *The insects: structure and function*, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 770 p.
- Hurley, B. P., B. Slippers, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, P. Govender and M. J. Wingfield. 2007. Molecular detection of fungi carried by *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) in South African forestry nurseries. *Southern Hemisphere Forestry Journal*, 69(2): 103-109.



- Lozano-Tovar, M. D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Trapero-Casa, A., & Quesada-Moraga, E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control*, 67: 409–420.
- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., PérezVera, O. A., & Cadena-Meneses, J. A. 2015a. Control del mosco fungoso negro *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) y *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) en *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Mexicana Ciencias Forestales*, 6(27): 90–100.
- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Pérez-Vera, O. A., Cadena-Meneses, J. A., Huerta, H., Rodríguez-Yam, G. y Cruz-Rodríguez, J. A. 2015b. Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Madera y Bosques*, 21(1): 113–128.
- Quesada-Moraga, E. and A. Vey, 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 108: 441–452.
- Sánchez-Pérez, Ll. C., Barranco-Florido, J. E., RodríguezNavarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J. F. and Ramos-López, M. A. 2014. Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. *Advances in Enzyme Research*, 2: 65–76.
- Zibae, A., A. R. Bandani, R. Talaei-Hassanlouei and D. Malagoli. 2011. Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *Journal of Insect Science*, 11: 138. doi: 10.1673/031.011.13801