



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS
METANÓLICOS DE RICINO (*Ricinus communis* L.) Y
EXTRACTOS CRUDOS DE *Beauveria bassiana* EN *Anastrepha*
ludens, IN VITRO Y EN CAMPO

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Agropecuarias

P R E S E N T A

NELLY MARTÍNEZ FIEL

Ciudad de México, 31 de Octubre de 2019

Comité Tutorial:

Director: Dr. Esteban Barranco Florido
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos

Co-directora: Dra. Verónica María Teresa Nava Rodríguez
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal

Asesor: Dr. Antonio Flores Macías
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal

La presente tesis titulada “Estudio de la actividad insecticida de extractos metanólicos de ricino (*Ricinus communis* L.) y extractos crudos de *Beauveria bassiana* en *Anastrepha ludens*, *in vitro* y en campo” realizada por la ingeniera Nelly Martínez Fiel ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Agropecuarias

Sinodales

Director Dr. Miguel Ángel Ramos López

Secretario Dra. Silvia Rodríguez Navarro

Vocal Dr. Antonio Flores Macías

Ciudad de México, 31 de Octubre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo en el desarrollo de éste trabajo a través de la beca 623641

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco por haberme permitido formarme en ella.

Al Doctor Juan Esteban Barranco Florido, por su apoyo en el laboratorio y siempre acompañarme en mi proceso de formación con su experiencia y conocimiento

A la Doctora Dra. Verónica María Teresa Nava Rodríguez, por siempre darme ánimos y sus aportaciones en la presente investigación.

Al Doctor Antonio Flores Macías por sus aportaciones en el experimento y atenciones en el proceso de investigación.

Al Doctor Pablo Liedo por su amabilidad y apoyo constante en toda la fase experimental en infraestructura, diseño experimental y logística de campo.

Al Doctor Toledo por sus consejos en la fase experimental en laboratorio y en la logística de las actividades de campo.

A la Maestra en Ciencias Azucena por su gran apoyo en campo y por sus grandes atenciones durante mi estancia de investigación.

Al personal de Moscafrut por compartir su experiencia y conocimientos de moscas de la fruta conmigo.

Al SENASICA por aportarme los individuos de cría masiva de *Anastrepha ludens*.

A mi madre Leticia de Jesús Fiel Rosales y padre José Luis Martínez Velázquez por el amor recibido, la dedicación y la paciencia, por ser los principales promotores de mis sueños. Gracias por desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, siempre por el camino de los valores y el amor.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

Resumen.....	8
I.Introducción.....	9
II. Revisión de literatura.....	10
2.1 Anastrepha.....	10
2.1.1 Distribución mundial y nacional de moscas nativas de la fruta.....	10
2.1.2 Importancia económica de las moscas de la fruta.....	10-11
2.1.3 Ciclo de vida.....	12
2.1.4 Morfología de <i>Anastrepha ludens</i>	12-13
2.1.5 Signos y Síntomas.....	13
2.1.6 Dispersión.....	13-14
2.1.7 Control de moscas de la fruta.....	14-15
2.2 Bioplaguicidas botánicos.....	16-17
2.3 Ricino.....	18
2.3.1 Distribución.....	19
2.3.1 Metabolitos secundarios presentes en las semillas de ricino.....	19
2.3.2 Usos de la planta de <i>Ricinus communis</i> como bioinsecticida.....	20-21
2.4 Hongos entomopatógenos.....	21-22
2.5 <i>Beauveria bassiana</i>	22
2.5.1 Importancia económica.....	22-23
2.5.2 Patogenicidad de <i>B. bassiana</i>	23-24
2.5.3 <i>B. bassiana</i> como control biológico en moscas de la fruta.....	25-26
2.5.4 Extractos crudos de hongos entomopatógenos.....	26
2.5.5 Producción de extractos de <i>B. bassiana</i>	26-27
2.5.6 Aplicación de extractos crudos.....	27-28
III. Pregunta de investigación.....	29
IV. Hipótesis.....	29
V. Objetivos.....	30
VI. Metodología.....	31
6.1 Ricino.....	31
6.1.1 Material botánico.....	31
6.1.2 Obtención de extractos de semilla de <i>R. communis</i>	31
6.1.3 Pruebas fitoquímicas.....	32
6.2 <i>Beauveria bassiana</i>	32
6.2.1 Extractos crudos.....	32-33
6.2.2 Fermentación sólida.....	33
6.2.3 Obtención de extractos crudos.....	33-34
6.2.4 Determinación de la actividad enzimática y proteína total.....	34-35
6.3 Bioensayos en laboratorio.....	35
6.3.1 Bioensayo de mortalidad de ricino y <i>Beauveria bassiana</i> en <i>A. ludens</i>	35-36
6.3.2 Bioensayo de mortalidad de Captor.....	36-37

6.4 Experimento en campo.....	37-41
VII. Resultados y discusión.....	42
7.1 Pruebas fitoquímicas en <i>R. communis</i>	42-43
7.2 Enzimas y metabolitos de <i>B. bassiana</i>	43-44
7.3 Efecto insecticida de ricino y <i>B. bassiana</i> en <i>A. ludens in vitro</i>	44-49
7.4 Calidad pupal.....	50
7.5 Efecto del atrayente Captor en la mortalidad de <i>A. ludens</i>	50-51
7.6 Efecto de extractos de ricino en campo.....	51-55
VIII. Conclusiones.....	56-57
IX. Bibliografía.....	58-66
X. Anexos.....	67-68
XI. Productos de trabajo.....	69-73
XII. Artículos.....	74
11.1 Artículo de revisión.....	74-87
11.2 Artículo científico.....	88-100

Índice de Figuras

Figura 1. Producción de frutales hospedantes de moscas nativas de la fruta	11
Figura 2. Huevo, larva, pupa y adulto de <i>Anastrepha ludens</i>	13
Figura 3. Signos y síntomas de <i>Anastrepha ludens</i>	13
Figura 4. Distribución de <i>Anastrepha</i> spp.....	14
Figura 5. Morfología de ricino.....	18
Figura 6. Semillas maduras de <i>R. communis</i>	31
Figura 7. Rota-evaporación de extractors de ricino.....	31
Figura 8. Proceso de siembra de condios de <i>Beauveria bassiana</i>	33
Figura 9. Proceso de obtención de extracto crudo de <i>Beauveria bassiana</i>	34
Figura 10. Dieta estándar de mosca de la fruta.....	36
Figura 11. Tratamientos del bioensayo de Captor.....	37
Figura 12. Estación cebo con el tratamiento.....	38
Figura 13. Distribución de tratamientos en huerta de mango.....	38
Figura 14. Tira de papel con azúcar.....	39
Figura 15. Calidad Pupal en celdillas.....	39
Figura 16. Calidad Pupal en bote.....	40
Figura 17. Calidad Pupal en bolsa.....	40
Figura 18. Macho adulto estéril marcado.....	41
Figura 19. Tramas Multilure.....	41
Figura 20. Pruebas fitoquímicas de extractos metanólicos y etanólicos.....	42
Figura 21. Crecimiento del hongo en el cultivo sólido.....	43
Figura 22. Huevos de <i>A. ludens</i> con tratamiento de metabolitos y enzimas.....	45
Figura 23. Gráfica de normalidad de ricino con la prueba de Anderson-Darling.....	46
Figura 24. Proporción de mortalidad de extractos Metanólicos a 900 ppm.....	47
Figura 25. Proporción de mortalidad de extractos Etanólicos a 900 ppm.....	47
Figura 26. Proporción de mortalidad de extractos Metanólicos a 600 ppm.....	47
Figura 27. Proporción de mortalidad de extractos Etanólicos a 600 ppm.....	47
Figura 28. Proporción de mortalidad de extractos Metanólicos a 300 ppm.....	47
Figura 29. Proporción de mortalidad de extractos Etanólicos a 300 ppm.....	47
Figura 30. Proporción de mortalidad de malatión.....	48
Figura 31. Proporción de mortalidad de dieta estándar.....	48
Figura 32. Análisis Probit de extractos metanólicos a 900 ppm.....	49
Figura 33. Análisis Probit de extractos Etanólicos a 900 ppm.....	49
Figura 34. Gráfica de normalidad de Captor con la prueba de Anderson-Darling.....	50
Figura 35. Porcentaje de mortalidad de <i>Anastrepha ludens</i> con atrayente Captor.....	51
Figura 36. Gráfica de normalidad de los tratamientos en campo.....	52
Figura 37. Gráfica de normalidad con los datos transformados con Box Cox.....	52
Figura 38. Gráfica de medias con los datos transformados con Box Cox.	53

Índice de cuadros

Cuadro 1. Diseño experimental del Bioensayo 1.....	36
Cuadro 2. Diseño experimental del Bioensayo 2.....	37
Cuadro 3. Resultados en liofilizados.....	43
Cuadro 4. Resultados de extractos crudos.....	43
Cuadro 5. Análisis de Varianza.....	53

RESUMEN

La mortalidad de adultos de cría masiva de *Anastrepha ludens* Loew (Díptera: Tephritidae) con los extractos metanólicos y etanólicos de las semillas de *Ricinus communis*, así como de los extractos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* fue evaluada bajo condiciones de laboratorio y campo. El estudio consintió en caracterizar primeramente los extractos metanólicos y etanólicos obtenidos de las semillas de *R. communis* por medio de pruebas fitoquímicas para identificar el tipo de metabolitos secundarios y para los extractos de *B. bassiana* se determinó la actividad enzimática y la concentración de metabolitos. En condiciones de laboratorio se evaluó la mortalidad que causaban los extractos de ricino y de *B. bassiana* en tres concentraciones: 300, 600 y 900 ppm. El experimento en campo se realizó en estaciones cebo evaluándose los extractos metanólicos de ricino en 6 hectáreas de mango Ataulfo, en Tapachula, Chiapas y se determinó el número de moscas capturadas. Se presentó en el experimento *in vitro* un 100% de mortalidad en los extractos metanólicos de ricino a una concentración de 900 ppm a los 7 días de evaluación y se encontró con una CL₅₀ de 264 ppm, de igual modo con los extractos etanólicos se alcanzó el 100% de mortalidad con un tiempo más prolongado, hasta los 10 días de evaluación, siendo la CL₅₀ de 279 ppm. La mortalidad disminuyó con los extractos metanólicos con la concentración de 600 ppm a 92.5% y con los extractos etanólicos disminuyó a 87.5%, con la dosis de 300 ppm la mortalidad para los extractos metanólicos y etanólicos fue de 72.5% en ambos casos. El tratamiento *in vitro* con los extractos de *B. bassiana* no presentó actividad insecticida en ninguna de las tres dosis en adultos de *A. ludens*. Los resultados del experimento en campo del número de moscas capturadas mostraron de acuerdo a la diferencia de medias, que el tratamiento de extractos metanólicos de ricino resultó ser el más efectivo $\alpha=0.01$, ($p=0.018$), $F=26.46$. Este estudio demostró que los extractos de *R. communis* tienen el potencial para ser aplicados en estaciones cebo en el control de *A. ludens* debido a sus propiedades insecticidas.

I. INTRODUCCIÓN

La sanidad de los frutales de clima tropical y subtropical se ha visto afectada por el complejo de moscas nativas de la fruta: *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha striata* y *Anastrepha serpentina* (Sookar *et al.*, 2014).

La mosca mexicana de la fruta *A. ludens* afecta alrededor de 20 hospedantes primarios y está presente en Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (NOM-075-FITO-1997).

El daño que *A. ludens* ocasiona son pérdidas en la producción de frutales (Loera, 2009), ya que aumenta los costos de producción, disminuye la calidad y la sanidad de las frutas y dificulta la comercialización nacional y de exportación (USDA, 2015). Las regulaciones nacionales fitosanitarias que se aplican para su control en campo son el manejo mecánico, el biológico, el autocida y el químico, este último es el más recurrente y se utiliza el insecticida organofosforado malatión, el cual ocasiona la resistencia de la plaga, así como daños al medio ambiente, a la fauna silvestre y a la salud humana (Díaz-Fleischer *et al.*, 2017).

Derivado de los problemas directos e indirectos que esta plaga ocasiona, es importante proponer innovadoras alternativas con enfoques agroecológicos, como son los extractos vegetales (Rampadarath y Puchooa, 2016) y los extractos crudos de hongos entomopatógenos (Sánchez-Pérez *et al.*, 2016; Marín-Cruz *et al.*, 2017).

Este estudio tiene el objetivo de evaluar el efecto insecticida de los metabolitos secundarios de las semillas de la planta de ricino, así como de los metabolitos secundarios y enzimas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en *A. ludens*, bajo condiciones de laboratorio y en campo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Anastrepha*

2.1.1 Distribución mundial y nacional del complejo de moscas nativas de la fruta

Mundial

Se encuentra ausente en Asia, África, Europa y Oceanía. En América está presente en México, USA (Texas), Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua (SINAVEF, 2017).

Nacional

De acuerdo a la NOM-075-FITO-1997, por la que se establecen los requisitos y especificaciones para la movilización de frutos hospederos de moscas de la fruta, se reconocen los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Sur de Tamaulipas (los municipios de Gómez Farías, Ocampo, Xicoténcatl, Cd. Mante, Antiguo Morelos, Nuevo Morelos, Altamira, Tampico y Cd. Madero), Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas, como zonas bajo control fitosanitario.

Una zona bajo control fitosanitario se define como un área geográfica determinada, en la que se aplican medidas fitosanitarias a fin de controlar, combatir, erradicar o disminuir la incidencia o presencia de una plaga, en un período y para una especie vegetal específica.

2.1.2 Importancia económica de las moscas de la fruta

En la fruticultura mexicana se cultiva una amplia variedad de especies frutales debido a la diversidad climática (Ayala *et al.*, 2011). Sin embargo, la sanidad de los frutales principalmente de clima tropical y subtropical se ha visto afectada por las plagas de importancia económica: *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha striata* y *Anastrepha serpentina* (Sookar *et al.*, 2014).

El complejo *Anastrepha* tiene como hospedantes a las familias botánicas: Rutaceae, Rosaceae, Clusiaceae, Anacardiaceae, Mirtaceae, Punicaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Oxalidaceae, Sapotaceae, Malpighiaceae, Moraceae y Anonaceae y cada especie de moscas afectan alrededor de veinte especies diferentes, lo cual genera pérdidas en la producción e incremento de los costos del control de la plaga, también se presentan restricciones en la comercialización nacional y de exportación, así como el mantenimiento de instalaciones para el tratamiento de frutas irradiadas.

La producción de frutales hospedantes de moscas nativas de la fruta en México (chirimoya, zapote, lima, naranja, toronja, mandarina, membrillo, durazno, mamey, mango, guayaba, granada, ciruela, caimito, carambolo, tejocote, níspero, nanche, higo y capulín) en 2010 fue de 6,974,868.73 toneladas, disminuyó en 2012 a 6,420,135.51 toneladas y aumentó en 2014 a 7,333,359.64 toneladas y 2016 7,840,167.66 toneladas como se muestra en la Figura 1.

En 2016 la exportación de frutas hospederas de las Áreas Libres de Moscas de la Fruta representó un valor comercial aproximado 772 millones de pesos, de la cuales se exportaron 41 mil 831 toneladas de mango y 40 mil 418 toneladas de cítricos dulces (Ramírez y Ramírez, 2016).

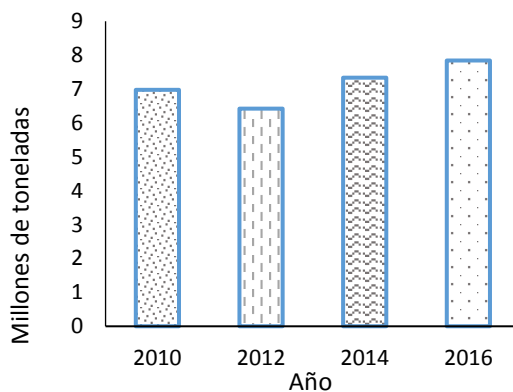


Figura 1. Producción de frutales hospedantes de moscas nativas de la fruta (SIAP, 2019)

2.1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *A. ludens* está conformado por las etapas de huevo, larva, pupa y adulto.

- a) Huevo: el ciclo comienza cuando la hembra oviposita en la fruta hospedera. Celedonio-Hurtado y colaboradores (1988) determinaron la duración de la etapa de huevo a través de la cría masiva, utilizando como material de oviposición malla de nylon revestida de parafina verde, la etapa duró aproximadamente 3 días.
Por otro lado, Domínguez y colaboradores (2010), utilizaron como material de oviposición una tela cubierta con una fina capa de silicón, ellos reportaron 4 días del periodo de huevo.
- b) Larva: atraviesan por tres estadios y en todos ellos permanecen en el fruto hospedero alimentándose de él. Domínguez y colaboradores (2010) reportan que el periodo larval bajo condiciones de cría controladas es de 9 días y que los niveles óptimos de recuperación de huevo a larva van del 60% al 70%. Así mismo, Orozco-Dávila y colaboradores (2006) determinaron que el periodo larval es de 10 días.
- c) Pupa: las larvas del tercer estadio salen del fruto hospedero y se entierran en el suelo para pupar, en condiciones de laboratorio el periodo de pupación se lleva a cabo en sustratos como vermiculita, arena, aserrín y salvado de arroz o trigo. El periodo pupal puede durar de 13 a 14 días y los porcentajes aceptables de transformación de pupa a adulto van del 75 al 95% (Domínguez *et al.*, 2010).
- d) Adultos: emergen de la pupa iniciando el período de preoviposición, en el cual buscan alimento, este periodo dura de 8 a 10 días. La hembra puede ovipositar más de 1,500 huevos durante su vida (Weems *et al.*, 2001).

2.1.4 Morfología de *Anastrepha ludens*

En la Figura 2 se puede observar el ciclo de vida completo de *A. ludens* que consiste en huevo, larva, pupa y adulto. El huevo mide de longitud entre 1.37 y 1.60 mm, de ancho entre 0.18 y 0.21 mm, es de color blanco. Las larvas tienen una longitud de 9 a 11 mm, son color blanco o amarillas cremosas. La pupa es cilíndrica de 5.5 a 7.5 mm de longitud y de 2 a 3.25 mm de diámetro, tienen coloración pálida a rojo oscuro, con 11 segmentos.

El adulto tiene los espiráculos posteriores café rojizo localizados bajo la línea media horizontal. Su cabeza tiene las genas y carina facial moderadamente desarrollada y longitud antenal moderada. En el tórax tiene macrosedas castaño negruzcas o totalmente negras; con una franja delgada clara que se va ensanchando hacia la parte posterior y dos franjas más a los lados que van de la sutura transversa. Sus alas tienen bandas de color café amarillento pálido. En las hembras el ovipositor es de 3.4 a 4.7 mm de longitud (Loera, 2009).



Figura 2. Huevo, larva, pupa y adulto de *A. ludens*

2.1.5 Signos y Síntomas

Los síntomas en los frutos son difíciles de detectar en las primeras etapas de la infestación. Puede haber mucho daño dentro de la fruta antes de que se observen los síntomas externos, a menudo se ven redes de túneles acompañados de podredumbre (Figura 3), las frutas muy dulces pueden producir un exudado azucarado (CABI, 2017).

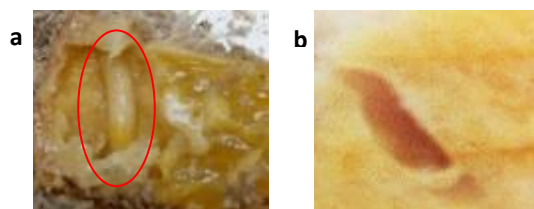


Figura 3. a) Larva de *A. ludens* en naranja; b) síntoma de *A. ludens* en guayaba

2.1.6 Dispersión

La dispersión de *A. ludens* está asociada a la temperatura del ambiente (Vanoye-Eligio *et al.*, 2015), además depende de la fenología y disponibilidad de los hospedantes por lo que pueden existir poblaciones de manera irregular y constante a lo largo de un período de tiempo (Sosa-Armenta *et al.*, 2017).

El clima del país se ubica en dos áreas bien diferenciadas, separadas por el Trópico de Cáncer. Este paralelo separa climáticamente al país en una zona tropical y una zona templada, la zona tropical es en la que *Anastrepha* se distribuye como se observa en la Figura 4.

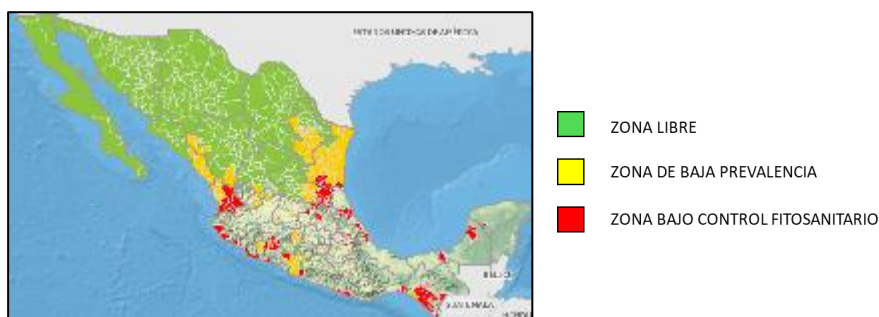


Figura 4. Distribución de *Anastrepha* spp.
Fuente: SINAVEF, 2019

2.1.7 Control de moscas de la fruta

En México a través de la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta (CNMF), se presenta el manejo integrado para el control del complejo *Anastrepha*, el cual está compuesto por el control químico, biológico, mecánico y autocida, estos métodos se detallan a continuación (SENASICA, 2017).

a) Control mecánico: consiste en recolectar los frutos susceptibles a infestación o ya infestados en áreas de producción, de traspatio, parques y/o áreas abandonadas. La recolecta puede ser con fines correctivos (cuando se hayan detectado larvas en fruta) o preventivos (se recolecta de fruta de los hospederos silvestres y criollos, así como de áreas donde en años anteriores se haya detectado la plaga).

Posteriormente los frutos son trasladados, destruidos en una fosa y cubiertos con una capa de cal. Otra actividad del control mecánico es la poda de árboles hospedantes silvestres y criollos en áreas urbanas para evitar la fructificación.

b) Control biológico: es la interacción entre plaga y enemigo natural, lo que implica la supresión de tipo densidad-dependiente y genera la regulación de poblaciones en equilibrio. Para el control biológico de moscas de la fruta se utiliza el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), es una avispa que deposita sus huevos en los adultos de moscas de la fruta.

c) Bioinsecticida: Para moscas de la fruta se utiliza el producto comercial GF-120 en áreas urbanas y de asentamientos humanos. Este producto contiene proteína hidrolizada, acetato de amonio y aditivos tales como azúcar, polietilenglicol, polisorbato y aceite de soja. El principal componente del GF-120, es el Spinosad el cual es un metabolito que tiene capacidad insecticida y se obtiene de la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (Manrakhan *et al.*, 2015).

d) Control autocida: también llamada la técnica del insecto estéril, consiste en utilizar insectos plaga para combatir a su misma especie aprovechando sus cópulas en un área determinada, esto se lleva a cabo a través de la cría, esterilización y liberación masiva de moscas de la fruta.

Los insectos estériles machos son liberados y compiten para aparearse con las hembras silvestres, por lo que se producen cópulas estériles, lo que a largo plazo tiende a disminuir las poblaciones silvestres.

e) Control químico: es el más utilizado en campo y tiene el objetivo de suprimir poblaciones de moscas de la fruta en estado adulto, se emplean los cebos selectivos y las estaciones cebo, el insecticida utilizado es malatión.

Los principales problemas que se asocian al uso de malatión en la agricultura son la residualidad en los alimentos, la resistencia de los insectos, los problemas en el medio ambiente y riesgos a la salud humana (Fuentes-Matus *et al.*, 2010).

Con el malatión normalmente se mezcla un atrayente para las moscas. El atrayente que sugiere la campaña nacional contra moscas de la fruta es el Captor, el cual es 33% en peso equivale a 360 g i.a./L.

El Captor es proteína hidrolizada, derivada de aminoácidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas vegetales. Se presenta en forma de concentrado soluble y se usa para el trampeo y control de moscas de la fruta. Su densidad es de 1.22-1.28 Kg/L, es totalmente soluble en agua y el pH es de 3.5-4.5 en solución al 10% p/p (TRIDENTE, 2018).

2.2 Bioplaguicidas botánicos

De acuerdo con Silva y colaboradores (2002) en la agricultura, el uso de extractos botánicos es un método biorracional de fitoprotección que permite la sostenibilidad de los agroecosistemas. Las plantas e insectos para coexistir han generado estrategias ofensivas y defensivas, en el caso de las plantas, éstas han desarrollado compuestos como los metabolitos secundarios (MS) que pueden tener efectos insecticidas sobre insectos (Senthil-Nathan, 2015).

Las plantas particularmente destinan una cantidad significativa del carbono y energía que asimilan a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios o de asimilación de nutrientes, a esta variedad de moléculas se les denomina metabolitos secundarios (MS), su producción puede estar restringida a un género de plantas, a una familia, a algunas especies y a las condiciones ambientales a las que esté sometida la planta, las principales rutas de biosíntesis de MS derivan del metabolismo primario del carbono (Avalos y Pérez-Urria, 2009).

Los MS son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda, 2003).

Los MS se pueden clasificar en: Terpenos, los cuales provocan repelencia o inapetencia, en este grupo están las hormonas, pigmentos, esteroides, latex y aceites esenciales; Compuestos fenólicos, actúan como antialimentarios o tóxicos, en este grupo están las cumarinas, flavonoides, lignina y taninos; Glicósidos, pueden ser tóxicos o repelentes, en este grupo

están las saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos; Alcaloides, principalmente tienen efectos tóxicos (Nava-Pérez *et al.*, 2012).

También los MS se pueden clasificar en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda, 2003).

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999). Esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas.

Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del Shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de MS puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también MS que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y Gatehouse, 1999).

La síntesis de MS depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides, sesquiterpenos y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

2.3 Ricino

La planta de ricino o higuera pertenece al Reino: Plantae; Orden: Malpighiales; Familia: Euphorbiaceae; Sub Familia: Acalyphoideae; Tribu: Acalypheae; Sub Tribu: Ricininae; Género: *Ricinus*; Especie: *communis*

Las diferentes partes botánicas de la planta de ricino se observan en la Figura 5. El ricino es anual o perenne según las condiciones ambientales. Su altura es de 2 m hasta 10 m. Su raíz es pivotante y tiene un tallo principal recto. Las hojas son alternas y pecioladas. La planta es monoica y generalmente unisexual.

Las flores son apétalas, las masculinas presentan un pedúnculo y cáliz de 5 sépalos desiguales soldados en la base y numerosos filamentos, las femeninas están formadas por un cáliz de 5 sépalos, un estilo y tres estigmas bífidos y un ovario con tres carpelos con un óvulo en cada uno lo que originara tres semillas, la pared del ovario está cubierta con espinas verdes y suaves.

Es halógama y anemófila por lo que tiene un alto índice de entrecruzamiento y la polinización se lleva principalmente por el viento. Los frutos inmaduros son verdes y algunas veces rojos, los estigmas permanecen en el fruto en forma leñosa.

Las semillas son de forma oval aplastada, redondeadas en un extremo y de color variable que suele ser gris con manchas rojizas y parduzcas, su tamaño va de 0.5 a 1.5 cm de largo; la semilla tiene un embrión pequeño con dos cotiledones delgados. El albumen es blando, compacto y en él se encuentra el aceite (Robles, 1980).

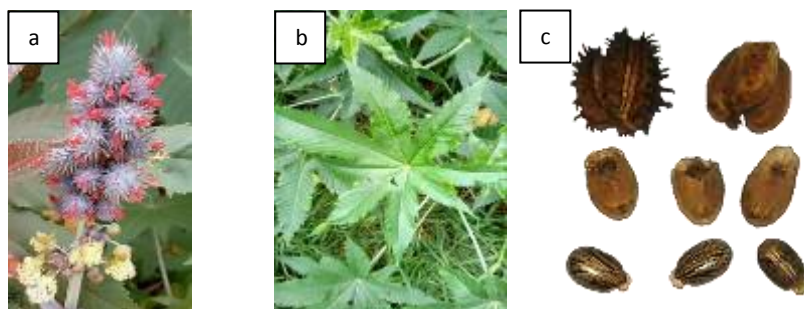


Figura 5. a) Inflorescencia; b) hojas; c) semillas

2.3.1 Distribución

El ricino es un arbusto perenne originario del este de África, cultivado desde hace varios miles de años en Egipto y ampliamente naturalizado alrededor del mundo. Actualmente la planta está presente en zonas con disturbio antrópico o natural como bordes de caminos, asentamientos humanos y zonas riparias (Garcillán y Rebman, 2016).

En México se siembra una superficie de 2,157 ha con una producción de 1,818 toneladas y un rendimiento de 1.79 (ton/ha). Los únicos estados productores de la planta de ricino reportados son Sonora con la mayor superficie sembrada con 1,537 ha y el estado de Sinaloa con una superficie de 620 ha (SIAP, 2015).

2.3.1 Metabolitos secundarios presentes en las semillas de ricino

En las semillas de la planta de *R. communis* se han identificado diversos metabolitos secundarios como son los fenoles que se han obtenido con extractos metanólicos, clorofórmicos y hexánicos; los flavonoides con extractos acuosos, metanólicos, clorofórmicos y hexánicos; las saponinas con extractos acuosos, metanólicos, clorofórmicos, hexánicos y de éter de petróleo; los alcaloides con extractos clorofórmicos, hexánicos; los terpenos con extractos acuosos, metanólicos, clorofórmicos, hexánicos y de éter de petróleo; los taninos con metanólicos, clorofórmicos y hexánicos (More y Pandhure, 2014; Ashwathy y Sheela, 2016; Aziz *et al.*, 2016). Los alcaloides son obtenidos solamente por disolventes polares.

Otros estudios se han enfocado en identificar específicamente los componentes de las semillas de *R. communis*. Estos componentes incluyen ácidos grasos como ácido ricinoleico, palmítico, oleico, linoleico, linolenico, ácido esteárico y ácido dihidroxiesteárico (Nangbes *et al.*, 2013). Rahmati y colaboradores (2015) identificaron glucósidos saponinicos, ricina, antocianinas, esteroides, calcio, hierro, vitamina A y C utilizando metanol como solvente. Por otro lado, Aziz y colaboradores (2016) identificaron ácido ricinoleico y ácido palmítico utilizando hexano como solvente.

2.3.2 Usos de la planta de *R. communis* como bioinsecticida

De los extractos de semilla de *R. communis*, se han investigado los efectos insecticidas sobre diferentes órdenes de insectos plaga bajo condiciones de laboratorio. En larvas de *Spodoptera frugiperda* con extractos metanólicos se obtuvo un 0% de viabilidad larval en las concentraciones de 16,000 y 9,600 ppm, con respecto a la viabilidad larval resulto en un 36% y 75% con 1,600 ppm y 560 ppm respectivamente, la viabilidad pupal fue de 76.9% a 1,600 ppm (Ramos-López *et al.*, 2010).

Así mismo en larvas de *Plutella xylostella* con extractos etanólicos, el aceite de ricino al 10% tuvo efecto larvicida en el 3er instar y hubo deformación de las alas y las piernas del 44% al 79%; la emergencia de adultos al 5% de aceite fue de $57.72 \pm 72\%$ en toxicidad tóxica (Tounou *et al.*, 2011).

Bactrocera zonata es una mosca de la fruta o mosca del melocotón, en la que se evaluó bajo condiciones de laboratorio la actividad insecticida en larvas con extractos metanólicos, de acetato de etilo y de éter de petróleo, de diferentes partes de la planta de ricino. Los resultados mostraron que el mejor efecto larvicida se obtuvo con los disolventes polares (metanol y acetato de etilo) de las hojas maduras con 100% de mortalidad larval y pericarpio inmaduro con 93.33% de mortalidad larval después de las 72 h de aplicación (Rampadarath y Puchooa, 2016)

Rhagoletis zoqui o la mosca del nogal de Castilla, es otra mosca de la fruta, la investigación en *R. zoqui* es la única en la que se han evaluado extractos de ricino en una especie de la familia Tephritidae en campo. Dicha investigación se llevó a cabo en dos huertos experimentales de producción de nogal de Castilla en el estado de Puebla, México (Torija-Torres *et al.*, 2014).

En otra investigación se evaluaron los extractos acuosos *R. communis*, *Argemone mexicana* y el colorante Floxin-B y se compararon con el insecticida comercial Malation®. Se utilizaron Trampas tipo Mc Phail y botellas de Pet para capturar a la plaga y se midió la eficiencia de los tratamientos con el índice de captura: Moscas/Trampa/Día (M.T.D.) durante tres meses. Los

resultados mostraron que el insecticida comercial tuvo el mayor índice de captura y el segundo tratamiento más eficiente después del comercial fue el extracto de *R. communis*.

En otra investigación se aplicaron en la dieta de adultos *A. ludens* los extractos etanólicos de las especies vegetales *Magnolia schiedeana* (Vásquez-Morales *et al.*, 2015) y *M. dealbata* (Flores-Estevez *et al.*, 2013), ambas especies vegetales se encuentran en peligro de extinción y tienen una producción limitada de semillas, por lo que el aprovechamiento de recursos botánicos debe tener un plan de manejo que permita la sostenibilidad del recurso y que esté disponible para su uso.

Los resultados en la investigación con *M. schiedeana* mostraron que los extractos de la semilla y de la sarcotesta de la semilla tenían efectos insecticidas, ya que las hojas, flores, corteza y folículos no mostraron actividad biológica significativa. En la investigación con *M. dealbata* solamente los extractos de la sarcotesta seca tuvieron efecto insecticida sobre el adulto de *A. ludens*.

2.4 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) han sido ampliamente utilizados en la agricultura Faria y Wraight (2007) reconocieron 110 productos comerciales, de los cuales el 40% son de *Beauveria bassiana* y el 39% de *Metarhizium anisopliae*. El resto de los productos fueron de *B. brongniartii*, *Isaria fumosorosea*, *I. farinosus*, *Lecanicillium longisporum* y *L. muscarium*. Los HE tienen la capacidad de infectar a diversas especies de insectos de los órdenes como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae y Embioptera (Holder y Keyhani, 2005; Zimmermann, 2007). Los HE tienen mecanismos de acción únicos que les permiten atravesar la cutícula e infectar al insecto hospedero, por esa razón son usados como bioinsecticidas de contacto.

Los HE se consideran que no son tóxicos en mamíferos, aves, plantas y son seguros para el medio ambiente y la salud humana (Ragavendran *et al.*, 2017).

En la actualidad el uso y la comercialización de los HE se lleva a cabo a través de conidios, sin embargo, a través del conocimiento de su biología, se han seguido explorando nuevas formas de producción y aplicación en el campo.

2.5 *Beauveria bassiana*

Reino: Fungi; División: Ascomycota; Clase: Deuteromycetes; Orden: Hypocreales; Familia: Clavicipitaceae; Género: *Beauveria*; Especie: *Beauveria bassiana*

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* es cosmopolita y habita naturalmente en el suelo, es un patógeno necrotrófico facultativo (Mascarin y Jaronski, 2016). Los órdenes de insectos en los que se ha encontrado a *B. bassiana* son Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae y Embioptera. Sin embargo, a pesar de que *B. bassiana* es patógeno de un gran número de artrópodos, se sabe que la mayoría de los aislamientos de este hongo tienen un rango restringido de hospedantes (Zimmermann, 2007).

2.5.1 Importancia económica

De acuerdo a The Bioag Alliance of Monsanto and Novozymes Research Program en 2016, el mercado microbiano en 2014 se acercó a US\$1.8 billiones, en contra parte del mercado de químicos con aproximadamente US\$240 billiones. El mercado de biopesticidas en su conjunto alcanzará los US\$6.600 millones en 2020, según la perspectiva de acceso libre de Markets and Markets de 2015 (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017).

En México existen productos comerciales de *B. bassiana*, sin embargo únicamente se vende en forma de conidios. Algunos productos comerciales que se pueden encontrar en el mercado son: Bea-SIN® y se recomienda para Mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*); PHC® BEA TRON®, se recomienda para *Bemisia tabaco*, *Phyllophaga* spp. *Hypothenemus hempei*, *Acigona loftini* y *Aeneolamo* spp; BASSIANIL®, se recomienda para *Anthonomus* sp. *Metamasius* sp. *Ancognatha* sp. *Phyllophaga* sp. *Ryncophorus* sp. *Collaria* sp. *Cosmopolites* sp. *Ryncophorus* sp. *Metamasius* sp; *Hypothenemus hampei*; *Empoasca* sp; *Corytucha* sp; Trips sp; BotaniGard®, se recomienda para Mosca blanca, trips, pulgones, araña roja y

lepidópteros. TRI-SIN® CE es un producto comercial que contiene varios microorganismos: *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae*, la recomendación es para usarlo en Paratrioza (*Bactericera cockerelli*); BB SOLENA® se recomienda para Gallina Ciega, Gusano alfilerillo, Pulgón. Barrenador, Mosca blanca, Mosquito verde, Ácaro (Araña roja), Cochinilla; MYCO-RALIS® se recomienda para *Bemisia tabaci* y *Aeneolamia postica*; ATENTO® *Bemisia tabaci*.

2.5.2 Patogenicidad de *Beauveria bassiana*

Los insectos viven en diferentes ecosistemas por lo que están expuestos a factores abióticos y bióticos que pueden ser perjudiciales para ellos, por ello poseen diversos mecanismos innatos de defensa que los protegen contra estos factores. Dentro de los diferentes mecanismos que son necesarios para su sobrevivencia, están las barreras físicas como la cutícula, defensas humorales que incluyen la inducción de una variedad de péptidos antimicrobianos (Shai *et al.*, 1999), lectinas y la cascada de la profenoloxidasa; además también están las defensas celulares que incluyen fagocitosis, agregación de hemocitos y encapsulación de patógenos (Moreno, 2010).

El inicio de la interacción entre *B. bassiana* y su hospedero sucede cuando los conidios entran en contacto con la cutícula del insecto, la cantidad de conidios adheridos es dependiente de la mortalidad resultante, por ello es vital que tantos conidios como sea posible se adhieran a la cutícula (Butt *et al.*, 2016), la cual dependiendo de la especie hospedante tendrá diferentes características como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. La cutícula es de vital importancia para el insecto porque le da forma, le aporta medios de locomoción, es impermeable al agua, puede servir como reservorio de alimento temporal y es fundamental al ser la primera barrera física a agentes patógenos (Vincent y Wegst, 2004).

Una vez que los conidios se colocan en la superficie cuticular, sucede la adsorción mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica, dentro de estos receptores están las hidrofobinas, que son determinadas por los genes *hyd1* y *hyd2* (Zhang *et al.*, 2011).

Posterior a la adherencia la espora germina (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2011) y después ocurre la penetración a través dos mecanismos combinados. El primer mecanismo es la acción mecánica a través del desarrollo y la formación del haustorio y la segunda es por la acción de enzimas hidrolíticas que se encargan de degradar los componentes de la cutícula, estas enzimas son conocidas como lipasas, proteasas, quitinasas, fosfolipasas C y catalasas (Butt *et al.*, 2016).

Los lípidos que se encuentran en la cutícula, protegen al insecto de la pérdida de agua y de agentes dañinos, esos lípidos son hidrocarburos de cadena larga, ácidos grasos y ésteres de cera, las enzimas lipasas tienen la función de degradar estos compuestos (Ali *et al.*, 2014). Las proteínas de la cutícula, las degradan las proteasas y se basan en la serina proteasa de tipo subtilisina Pr1, y la proteasa de tripsina tipo Pr2 (Bagga *et al.* 2004; Dias *et al.*, 2008). Ya que la cutícula del insecto contiene también quitina la cual es un polímero, las enzimas quitinasas la degradan (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014).

Una vez superada la barrera estructural, el hongo prolifera con la formación de hifas y blastosporas que llegan al tejido muscular, al sistema nervioso, a los ojos, al cerebro, a las glándulas salivales, a los palpos maxilares, al intestino, a los túbulos de Malpighi y a la hemolinfa (Ishii *et al.*, 2017).

Para evitar la respuesta inmune del insecto, el HE produce MS que actúan en la destrucción de tejidos internos, el agotamiento de nutrientes, causan parálisis y lentitud por acciones neuromusculares (Pinnamaneni y Potineni, 2010; Mascarín y Jaronski, 2016). Los metabolitos como respuestas insectistáticas también generan cambios conductuales y de alimentación, pérdida de peso y de fecundidad (Zimmermann, 2007), inhiben el crecimiento de microorganismos competidores (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2016) o producen malformaciones (Marín-Cruz *et al.*, 2017).

Una vez que el huésped muere, el hongo emerge del cadáver, produciendo conidios aéreos en la superficie, esto sucede cuando las condiciones ambientales, especialmente la humedad, se lo permiten. Los conidios aéreos pueden ser diseminados por el viento, las salpicaduras de lluvia y otros factores bióticos y abióticos (Mascarín y Jaronski, 2016).

2.5.3 *Beauveria bassiana* como control biológico en moscas de la fruta

Los conidios de *B. bassiana* han sido probados en *A. ludens*, Toledo y colaboradores (2006) evaluaron la mortalidad en adultos aplicando los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en la dieta de *A. ludens* adultas bajo condiciones de laboratorio, los resultados mostraron que las cepas Bb16 con una concentración de conidios 5.13×10^5 causaron 100 % de mortalidad en un tiempo letal medio (LT₅₀) de 2.82 días, la cepa Bb26 con una concentración de conidios 1.05×10^8 causó 98% de mortalidad en un tiempo letal medio (LT₅₀) de 3.74 días y la cepa B18 con una concentración de conidios 1.40×10^8 causó 86% de mortalidad. Con una concentración menor, la mortalidad fue del 100% y en menor tiempo que una concentración mayor de conidios, sin embargo las cepas fueron diferentes, por lo que debe considerarse ese factor, debido a que hay diferencias de virulencia entre cepas distintas a pesar de ser de la misma especie.

También De la Rosa y colaboradores (2002), evaluaron los conidios de *B. bassiana* en larvas, pupas y hembras adultas de *A. ludens* bajo condiciones de laboratorio, sus resultados obtenidos determinaron que las cepas aplicadas en estado de larva causaron 2-8% de mortalidad y en pupas 0%, sin embargo, los niveles de mortalidad fueron altos en los adultos con 100, 98 y 98% de las cepas Bb16 (LT₅₀ 2.8 días), Bb24 (LT₅₀ 4.2 días) y Bb 26 (LT₅₀ 3.7 días), respectivamente.

Adicionalmente Wilson y colaboradores (2017) estudiaron bajo condiciones de laboratorio el efecto de los conidios de *B. bassiana* colocados en el suelo con diferentes condiciones de textura, humedad y temperatura y evaluaron la mortalidad de adultos. Sus resultados mostraron que con 800 mg del formulado de conidios/kg de suelo ocurrió 79.8% de mortalidad, en suelo areno-arcilloso y areno-limoso con 64.0% de mortalidad, con 12% de humedad se registró el 79.8% de mortalidad.

Así mismo en un estudio (Sánchez-Roblero *et al.*, 2012) se evaluó el efecto de *B. bassiana* en el desarrollo del ovario y en el potencial reproductivo de *A. ludens*. Los resultados mostraron que *B. bassiana* provocó una mortalidad del 85% en hembras, la infección no afectó

significativamente el desarrollo ovárico de las hembras tratadas, aunque hubo una reducción en la cantidad de ovocitos basales maduros.

2.5.4 Extractos crudos de hongos entomopatógenos

La forma en que comúnmente se utilizan los hongos entomopatógenos en la agricultura son los conidios, estas estructuras de los hongos tienen limitantes en términos de aplicación práctica, por lo que se han desarrollado investigaciones para la obtención de extractos crudos principalmente del hongo *B. bassiana*.

Se han utilizado los metabolitos secundarios o las enzimas de *B. bassiana* con diferentes objetivos. Por ejemplo, se ha estudiado a los metabolitos secundarios de *B. bassiana* para la actividad antifúngica sobre los géneros *Alternaria*, *Glomerella*, *Rhizopus*, *Chrysosporium*, *Rhizoctonia*, *Myrethecium* y *Fusarium* (Reddy *et al.*, 2010).

También se han utilizado las enzimas de la especie *Isaria fumosorosea* en la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) bajo condiciones de laboratorio, los extractos enzimáticos aplicados en la dieta fueron potentes anti-alimenticios al reducir las tasas de alimentación y el peso de las larvas (Ali *et al.*, 2010).

2.5.5 Producción de extractos de *B. bassiana*

La fermentación se ha utilizado para la producción de una amplia variedad de compuestos debido a sus ventajas económicas y ambientales, el descubrimiento de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos ha resultado en la exploración adicional de la fermentación como una técnica de producción para estos compuestos.

Las técnicas y procesos se han ido modificando para maximizar la productividad, de estas técnicas han surgido la fermentación sumergida (SmF) y la fermentación en estado sólido (SSF) (Ravichandran y Vimala, 2012).

La técnica de fermentación de estado sólido SSF es aquella donde el crecimiento de microorganismos se realiza en condiciones controladas en ausencia de agua libre. Las ventajas de utilizar esta técnica son: bajas posibilidades de contaminación por bacterias y levaduras, facilita la dispersión, hay aprovechamiento uniforme del medio y se pueden

reducir los costos de producción (Renge *et al.*, 2012). La obtención de enzimas y metabolitos secundarios de los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* ha sido llevada a cabo a través de la utilización de un medio de fermentación sólido (Barranco-Florido *et al.*, 2009; Ortiz-Urquiza *et al.*, 2013; Chávez *et al.*, 2014; Sánchez-Pérez *et al.*, 2016).

2.5.6 Aplicación de extractos crudos

Existen diversos estudios realizados con los extractos crudos de hongos entomopatógenos como para el control de diversos insectos plaga, es necesario destacar que todos estos estudios han sido únicamente probados bajo condiciones de laboratorio y nunca han sido probados en ninguna especie de moscas de la fruta. Los extractos crudos de *B. bassiana* han sido aplicados por inyección en *Cyclocephala lunulata* (Coleoptera: Melolonthidae: Dynastinae), los resultados mostraron 100% de mortalidad con un tiempo de muerte de 1.2 días (Sánchez-Pérez *et al.*, 2016). En *Phyllophaga* spp. se inyectaron los metabolitos secundarios y se observaron durante 10 días las larvas, los resultados fueron del 100% de mortalidad a los ocho días (Chávez *et al.*, 2014), así mismo en *Galleria mellonella* se inyectaron los extractos crudos de *M. anisopliae* (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2013).

En el picudo del nopal (*M. spinolae*) las larvas fueron sumergidas en el extracto crudo de *B. bassiana* por 10 segundos, este ensayo causó el 29.17% de mortalidad en 3.87 días (Sánchez-Pérez *et al.*, 2016). Los extractos crudos de *B. bassiana* han sido administrados a través del alimento con hojas de alfalfa en larvas de *Spodoptera littoralis*, adicionalmente se asperjaron tópicamente a las larvas, el tratamiento tópico no causó mortalidad (Resquín-Romero *et al.*, 2016). Murugesan y colaboradores (2009) colocaron larvas del tercer instar de *Aedes aegypti* en 100 mL de agua destilada con 10–100 μ /mL de extracto crudo de *Trichophyton mentagrophytes*, la concentración de 100 μ /mL obtuvo un 90% de mortalidad a los tres días.

Marín-Cruz y colaboradores (2017) aplicaron extractos de *B. bassiana* en *Bradysia impatiens*, estas aplicaciones fueron sobre papel absorbente y en la dieta, la actividad insecticida se evaluó por 8 días y la actividad insectistática por 20 días, los resultados mostraron que a los

20 días la mortalidad por metabolitos fue del 47.5% y en adultos se obtuvo un 65% de malformaciones.

En otra investigación con *Spodoptera littoralis*, al evaluar los extractos crudos de *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp., los resultados mostraron que *M. anisopliae* tuvo una mortalidad entre el 82.5% al 100% y con *B. bassiana*, la mortalidad tuvo un rango del 20% a 35% (Quesada-Moraga *et al.*, 2006).

En gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) se inyectaron los extractos crudos y se registró el 100% de mortalidad a los ocho días de aplicación (Chávez *et al.*, 2014).

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La utilización de extractos metanólicos y etanólicos de ricino y extractos crudos de *B. bassiana*, tendrán efecto insecticida sobre adultos de *Anastrepha ludens* bajo condiciones de laboratorio y en campo?

IV. HIPÓTESIS

1. Los extractos metanólicos y etanólicos de *R. communis*, así como los extractos crudos de *B. bassiana* ocasionan efectos insecticidas en adultos de *A. ludens* en condiciones de laboratorio
2. Los extractos metanólicos de *R. communis* utilizados en estaciones cebo tienen un efecto insecticida mejor al malatión con respecto al número de moscas capturadas

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto insecticida de las semillas de ricino (*Ricinus communis* L.), así como de enzimas y metabolitos de *Beauveria bassiana*, para el control de *Anastrepha ludens* (Díptera: Tephritidae), *in vitro* y en campo.

Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos secundarios de los extractos metanólicos y etanólicos de las semillas de *R. communis*
2. Determinar la actividad enzimática y la concentración de los metabolitos de *B. bassiana*
3. Valorar el efecto insecticida de los extractos de ricino (*R. communis* L.), así como de extractos enzimáticos y de metabolitos de *B. bassiana* en *A. ludens* bajo condiciones de laboratorio
4. Evaluar el número de moscas capturadas de los extractos de semillas de ricino en adultos de cría masiva de *A. ludens* en campo

VI. METODOLOGÍA

6.1 Ricino

6.1.1 Material botánico

Se colectaron las semillas de dos plantas de ricino ubicadas en la Ciudad de México con coordenadas (Sistema Geodésico Mundial) Latitud: 13° 29' 29.601", Longitud: 99° 10' 16.387". Las semillas se trasladaron al Laboratorio de Fisiología y Tecnología de Cultivos de la UAM-X, para retirar su endocarpio como se muestra en la Figura 6.

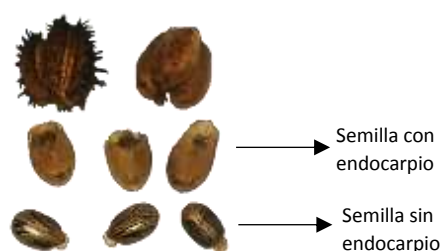


Figura 6. Semillas maduras de *R. communis*

6.1.2 Obtención de extractos de semilla de *R. communis*

Se molieron 100 g de semilla en una trituradora marca MOULINEX^{MR} y se maceraron en 200 ml de metanol y etanol respectivamente por 48 horas en frascos de vidrio color ámbar (Rahmati *et al.*, 2015).

Transcurrido ese tiempo, el producto resultante se colocó sobre malla de cielo y se exprimó para retirar los fragmentos grandes de semilla, seguidamente el producto se filtró al vacío con una membrana Millipore de 0.45 µm.

Después se pasó por un Rotavapor BUCHI[®] a una temperatura de 45°C durante 50 minutos para evaporar el metanol y etanol (Figura 7). Como producto final se obtuvo aceite, el cual se refrigeró a 4°C para su conservación (Ramos-López *et al.*, 2010; Rampadarath y Puchooa, 2016).



Figura 7. Rota-evaporación de extractos de ricino

6.1.3 Pruebas fitoquímicas

Al aceite obtenido de la maceración con metanol y etanol, se le realizaron pruebas fitoquímicas, con el propósito de conocer la presencia de saponinas, terpenos, fenoles y alcaloides. Con respecto a las saponinas se colocaron 1 ml del extracto con 5 ml agua destilada en un tubo de ensayo y se calentó en baño maría por 3 minutos, el resultado da positivo si hay presencia de pequeñas burbujas cremosas; para terpenos se colocó 1 ml de extracto más 1 ml de cloroformo más 2 ml de anhídrido acético más 1-2 gotas de ácido sulfúrico concentrado en un tubo de ensayo, el resultado da positivo si la mezcla se torna de color rosa o roja (More y Pandhure, 2014).

Con respecto a los fenoles con la técnica de Cloruro férrico, se le añaden 5 ml de extracto más 10 gotas de cloruro férrico al 5% en un tubo de ensayo y se calienta la mezcla en baño maría durante 10 minutos y se deja enfriar durante 4 minutos, el resultado da positivo si la mezcla es de color verde oscuro (Inayor e Ibraheem, 2014).

En relación con los alcaloides se utilizó la prueba de Mayer, se añadió 1 ml de extracto y se agregó gota por gota el Reactivo de Mayer (bicloruro de mercurio $HgCl_2$ 1,35 g más yoduro de potasio KI 5 (4.69) g por cada 100 ml agua destilada) en un tubo de ensayo, el resultado da positivo si hay un precipitado blanco o amarillo claro (Hussein *et al.*, 2016).

6.2 *Beauveria bassiana*

6.2.1 Extractos crudos de *Beauveria bassiana*

- Siembra de *B. bassiana* en medio sólido de superficie

El aislado UAM-I de *B. bassiana* perteneciente al Cepario del laboratorio de Biotecnología la UAM-X, creció en un matraz de 250 ml en un medio de cultivo Agar Dextrosa Saboraud (ADS) durante 15 días a 25°C. Posteriormente se agregaron 50 ml de Tween 80 AL 0.05% y se recolectaron los conidios con un agitador magnético por 5 minutos dentro de una campana de flujo marca Clean Air Center®. Este procedimiento se repitió para cada matraz y el contenido obtenido de todos los matraces se guardó en envases estériles de 250 ml a 4°C, el procedimiento se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Proceso de siembra de *B. bassiana* a) crecimiento de *B. bassiana* en ADS; b) cosecha de conidios de *B. bassiana*; c) conidios de *B. bassiana* suspendidos en Tween

6.2.2 Fermentación sólida de *B. bassiana*

En un matraz Erlenmeyer de 1,000 ml se colocaron 46.67 g de bagazo de caña, 11.25 g de caparazón de camarón molido, 1.125 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.225 g de MgSO_4 , 0.1875 g de NaCl, 2.8125 g de KH_2PO_4 , 0.01875 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00525 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.006 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g de sacarosa y 155 ml de agua destilada. Las condiciones del cultivo fueron humedad inicial 75%, pH 5 y temperatura 25 °C. El inóculo de *B. bassiana* contuvo 1×10^7 esporas $(\text{g peso húmedo})^{-1}$. Dentro de una campana de flujo laminar, en un matraz de 1,000 ml se mezclaron todos los componentes uniformemente. Se dejó el cultivo por nueve días en una estufa a 25°C para obtener los metabolitos secundarios (Barranco *et al.*, 2009).

6.2.3 Obtención de extracto crudo de *B. bassiana*

Transcurridos los nueve días, al cultivo sólido se le agregó agua destilada en una relación de 1:1 (p:v). El contenido de la fermentación se exprimió a través de malla de cielo y se obtuvo como producto final el extracto crudo. Después el extracto crudo se centrifugó a 10,000 rpm en una centrifuga marca Du Pont Instruments® a 4°C durante 10 minutos, este procedimiento se repitió una vez más. Posteriormente se filtró al vacío el sobrenadante con una membrana Millipore de 0.45 μm . En seguida en tubos Centricon®, se agregaron por cada uno 13 ml del extracto crudo en la parte superior del tubo y se centrifugaron en una centrifuga marca Beckman® a 3,000 rpm a 8°C durante 20 minutos. En la parte superior del tubo Centricon® quedaron las proteínas mayores a 10 kDa y en la parte inferior los metabolitos. Se recuperaron las enzimas y los metabolitos y se congelaron a -20°C. Finalmente los extractos enzimáticos y de metabolitos se liofilizaron para su conservación en una liofilizadora LABCONCOA® bajo condiciones de presión y de temperatura a 0.090 mBar y -40°C como se muestra en la Figura 9 (Marín-Cruz *et al.*, 2017).

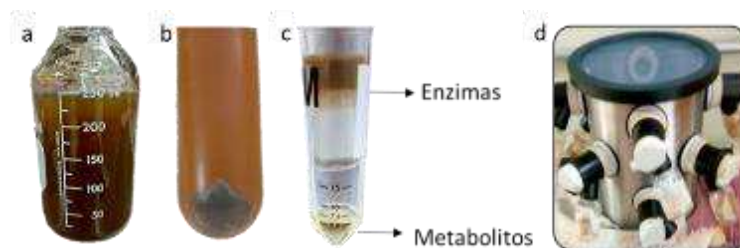


Figura 9. a) Extracto crudo; b) extracto crudo después de centrifugarse a 10,000 rpm; c) enzimas y metabolitos después de centrifugarse a 3,000 rpm; d) liofilización de extractos enzimáticos y de metabolitos

6.2.4 Determinación de la actividad enzimática y proteína total

A los extractos centrifugados y a los liofilizados, se les determinó la actividad enzimática y proteolítica

- Actividad quitinolítica

Para la actividad quitinolítica se modificó el método de Coudron y colaboradores (1984), en lugar de quitibiosa, se utilizó como sustrato *p*-nitrofenol N-acetil-b-D-glucosaminida (Sigma Chemical Co). Para el ensayo enzimático se tomó extracto enzimático, al cual se le agregó agua y amortiguador de citrato-fosfato 0.2 M (pH 5.6) y sustrato *p*-nitrofenol N-acetil-b-D-glucosaminida. La reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C con una agitación de 180 rpm. Se detuvo la reacción al agregar 1 ml de NaOH 0.02 M. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un mmol de *p*-nitrofenol min⁻¹ (g de cutícula)⁻¹ ml⁻¹ del medio de cultivo bajo condiciones específicas a una D.O. de 400 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, el blanco contenía agua, amortiguador y sustrato. La curva estándar se obtuvo por diluciones de *p*-nitrofenol (Anexo 1).

- Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó por el método Azocoll (Chavira *et al.*, 1984). Una unidad enzimática (U.E.) se definió como el cambio de 0.1 unidades de absorbancia por min⁻¹ (g de cutícula)⁻¹ ml⁻¹ del medio de cultivo y fue leído a una D.O. de 520 nm (Anexo 2).

- Proteína total

La determinación de proteína fue realizada por el método modificado de Lowry (Shakir *et al.*, 1994), utilizando como estándar albúmina serina de bovino (BSA). Para determinar la

concentración de proteínas de la muestra se construyó una curva estándar a partir de la solución patrón (BSA) (2 mg/mL) (Anexo 1).

6.3 Bioensayos en laboratorio

Se realizaron tres bioensayos en el laboratorio de Biodemografía, en una estancia de investigación en el Colegio de la Frontera Sur en Tapachula, Chiapas de abril a junio de 2018.

El material biológico en estado de pupa fue obtenido de las instalaciones de cría masiva de Moscafrut (SAGARPA-IICA) ubicada en Metapa de Domínguez, Chiapas, México. En la planta de cría masiva, los huevos eran de una colonia establecida de acuerdo a la metodología descrita por (Stevens, 1991) y Domínguez *et al.*, (2010), una vez que los huevos eclosionaron, las larvas se alimentaron de una dieta texturizada a base de almidones pregelatinizados y posteriormente las larvas pasaron a su estado de pupa durante 14 días (Rivera *et al.*, 2012). Para el experimento en campo, las pupas fueron irradiadas en la planta Moscafrut previo a ser entregadas con rayos gamma con una dosis de 80 Gy usando un irradiador JS 7400 con ⁶⁰Co (Nordion International Inc., Peterborough, Ontario, Canada), a 25°C en condiciones de hipoxia, como se lleva a cabo regularmente en el programa de cría masiva.

Las pupas de *A. ludens* (dos días antes de la emergencia a adultos) se colectaron para su posterior traslado. Durante el período de emergencia, los adultos fueron alimentados con 2 g de azúcar estándar y agua.

6.3.1 Bioensayo de evaluación de mortalidad de *A. ludens* con extractos de ricino y *B. bassiana*

Se adicionaron en el alimento los tratamientos que se muestran en el Cuadro 1. El alimento consistía en 2 gramos de proteína hidrolítica enzimática marca MP Biomedicals™ más azúcar estándar en una proporción 3:1 (Flores *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2016). El alimento se colocó en una tapa de refresco con aproximadamente 1.5 cm de diámetro circular y 1 cm de profundidad. Se colocó aproximadamente de 2 a 3 g de algodón en cada tapa para que el tratamiento no quedara abajo como se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Dieta estándar de mosca de la fruta

Se evaluó la mortalidad cada 12 horas durante 10 días, en 20 individuos de *A. ludens*, 10 hembras y 10 machos por repetición, con seis repeticiones por tratamiento.

En este experimento el análisis estadístico que se utilizó para evaluar la normalidad fue la prueba de Anderson-Darling y para conocer la homocedasticidad se utilizó la prueba de Levene. Para el caso en que no hubo dichos supuestos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis en los tratamientos de ricino, malatión y dieta estándar. El paquete estadístico que se utilizó para analizar los datos fue Minitab 18.0.

La respuesta a la dosis de mortalidad de los extractos metanólicos y etanólicos a 900 ppm se sometió a un análisis de Probit para determinar las concentraciones letales medias (CL₅₀) que matan al 50% de los adultos de *A. ludens* tratados.

Cuadro 1. Diseño experimental del Bioensayo 1

Tratamiento	Concentraciones
Extractos metanólicos de ricino	300,600 y 900 ppm
Extractos etanólicos de ricino	300,600 y 900 ppm
Liofilizados enzimáticos de <i>B. bassiana</i>	300,600 y 900 ppm
Liofilizados de metabolitos de <i>B. bassiana</i>	300,600 y 900 ppm
Testigo positivo: malatión*	1 ml
Testigo negativo: Dieta estándar**	2 g dieta estándar

* Malatión 200 µl/100 ml agua;

**dieta estándar azúcar y levadura proporción 3:1

6.3.2 Bioensayo de evaluación de Captor en la mortalidad de *A. ludens*

Este bioensayo consistió en probar si el atrayente Captor provoca la muerte de adultos de *A. ludens*, para evitar el sesgo a la investigación de la fase siguiente de campo, ya que el atrayente Captor fue el que se seleccionó para dicha fase, porque es el atrayente que propone el Manual para el Control de Moscas de la Fruta.

En este bioensayo se aplicaron los tratamientos que se muestran en el Cuadro 2 (Figura 11) en 20 individuos, 10 hembras y 10 machos por repetición. Fueron cuatro repeticiones por tratamiento. Se evaluó la mortalidad cada 24 horas durante 10 días.

Para el análisis estadístico, la prueba estadística para evaluar la normalidad que se utilizó fue la prueba de Anderson-Darling. La prueba que se utilizó para evaluar la homocedasticidad fue la de Levene. Para el caso en que no hubo dichos supuestos, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis en los tratamientos. El paquete estadístico que se utilizó para analizar los datos fue Minitab 18.0.

Cuadro 2. Diseño experimental del bioensayo 2

Tratamiento	Dosis
Azúcar	2g
Azúcar y captor	2g y 1,280 ppm
Azúcar, captor, extractos metanólicos de ricino	2g + 1,280 ppm + 900 ppm
Captor y extractos metanólicos de ricino	1,280 ppm + 900 ppm
Azúcar, captor y liofilizados de enzimas de <i>B. bassiana</i>	2g + 1,280 ppm + 1500 ppm
Azúcar, captor y liofilizados de metabolitos de <i>B. bassiana</i>	2g + 1,280 ppm + 1500 ppm



Figura 11. Tratamientos del bioensayo de Captor

6.4 Experimento en campo

El área de estudio fue en la huerta de mango Ataulfo de 6 ha del Señor Hilario Huerta ubicada en el Ejido el Manzano en Tapachula, Chiapas, México, con coordenadas: 14°45'46.02"N, 92°17'02.84"O, situado a 41 msnm. Esta área tiene un clima tropical con una precipitación promedio anual de 2450 mm y una temporada de lluvias desde finales de abril hasta noviembre, la temperatura promedio anual es de 26.2 °C, siendo abril y mayo los meses más calurosos (García, 2004).

Diseño de estaciones cebo. Se utilizaron botellas de PET transparentes con una capacidad de 600 ml (Figura 12) en las que se realizaron dos aberturas en forma de ventana de 7 cm de

largo y 4 de ancho en cada lado de la botella, a una altura de la botella de 1/4, respectivamente (SENASICA, 2017). La tapa fue perforada para introducir a manera de gancho 30 cm de alambre galvanizado.



Figura 12. Estación cebo con el tratamiento

Preparación de los tratamientos. Se utilizaron en total 36 estaciones cebo por cada tratamiento. Los tratamientos siguieron los componentes que recomienda el Manual de Control Químico de SENASICA (2017). El primer tratamiento consistió en 60 ml agua más 42 ml de captor más 12 ml de propilenglicol más 2,485 ppm (3 ml) de ricino. El segundo tratamiento estuvo compuesto por 60 ml agua más 42 ml de captor más 12 ml de propilenglicol más 3,690 ppm (3 ml) de malatión. El testigo solo consistió en estaciones cebo con agua.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño experimental de cuadrado latino con tres factores de bloque, uno de sitio con tres niveles, otro de rotación con tres niveles y el de los tratamientos con tres niveles (Figura 13). Entre cada bloque había una distancia de 30 metros. En total había 9 parcelas (bloques) en las que los tratamientos fueron distribuidos. La variable que se evaluó durante 10 días fue la de Número de Moscas Capturadas (NMC) (Utgés *et al.*, 2011), entre mayor número de moscas capturadas menor efectividad del tratamiento.



M: Malatión
T: Testigo
R: Ricino

Figura 13. Distribución de tratamientos en huerta de mango

Colocación de estaciones cebo. Cada estación se colocó en un árbol de mango a una altura aproximada de 4 a 6 metros y a 2/3 de la copa del árbol. La orientación de las trampas se eligió al inicio del experimento, protegidas de la exposición al sol, con el propósito de mantener la misma orientación durante el desarrollo del trabajo y disminuir algún error experimental que esto pudiese causar. Las estaciones cebo se colocaron con una varilla extensora de aluminio con gancho de acero.

Liberación de moscas adultas de cría masiva. Dos días previos a la liberación se estimó el número de pupas en base al peso y se colocaron 20 g de pupas en una bolsa de papel de 35x20x30 cm y se les colocó dentro de la bolsa de papel una tira de papel (Figura 14) que contenía azúcar (Hernández *et al.* 2005) para que las moscas que fueran emergiendo se alimentaran.



Figura 14. Tira de papel con azúcar

Así mismo se realizaron tres controles de calidad pupal durante cada liberación en: celdillas, en bote y en campo con una bolsa de papel (SENASICA, 2012).

- Calidad pupal en celdillas: En 5 cajas de 6x4 celdillas se colocaron 100 pupas (Figura 15) y se observó a los dos días de colocadas, la emergencia y el sexo de los adultos emergidos. Y se registraron los datos.



Figura 15. Calidad Pupal en celdillas

- Calidad pupal en bote: En botes de plástico de un litro se colocaron 100 pupas (Figura 16) y se observó a los dos días de colocadas, la emergencia de los adultos y se registraron los datos.



Figura 16. Calidad pupal en bote

- Calidad pupal en campo: En una bolsa de papel se colocaron 100 pupas (Figura 17) y se llevó el día de la liberación para los tratamientos, se liberaron los adultos emergidos, se contabilizaron las pupas no emergidas y se registraron los datos.



Figura 17. Calidad pupal en bolsa

En total se realizaron tres liberaciones, con el fin de rotar los tratamientos y reducir el efecto de parcela. Después de cada liberación se revisaban las estaciones cebo con la finalidad de comprobar el estado de los tratamientos.

Se liberaron a las 6 am en las 6 ha, un total de 75,000 moscas hembras (41%) y machos (59%) considerando un 80% de emergencia total (SENASICA, 2017).

Por cada repetición (bloque) se liberaron aproximadamente 8,333 moscas. La liberación en cada bloque se realizó en cuatro puntos formando un cuadrado. Cada mosca liberada fue marcada en la cabeza con un marcador fluorescente color rosa Day-Glo (A-11 Aurora Pink DayGlo®, Cleveland, OH), para poder identificarla posteriormente como parte del experimento (Ruíz *et al.*, 2012).



Figura 18. Macho adulto estéril marcado

- **Recaptura de moscas que sobrevivieron a los tratamientos:** Un día posterior a la liberación se colocó en un árbol de mango en el centro de cada parcela una trampa Multilure con 20 ml de Ceratrap® (Figura 19) por cada repetición, en total fueron 9 trampas, para atraer las moscas que seguían vivas después de la exposición de las moscas a los tratamientos. La metodología seguida fue de liberación y recuperación de puntos centrales (Utgés *et al.*, 2011). El criterio es entre mayor número de moscas capturadas por Ceratrap® menor efectividad del tratamiento.

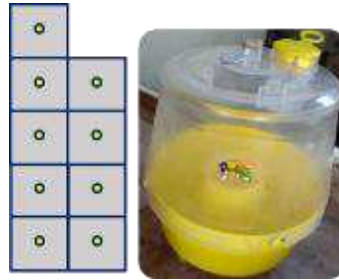


Figura 19. a) Distribución de trampas Multilure; b) trampa Multilure

- **Revisión de trampas Multilure con Ceratrap®:** Las trampas fueron revisadas al día siguiente de su colocación y hasta los 10 días, para la recolección de las moscas capturadas. Después de cada revisión se realizó el recambio de las soluciones CeraTrap®, para las siguientes rotaciones de liberación. Los insectos recolectados se vaciaron en frascos con alcohol al 70% para su transporte al Laboratorio de Biodemografía.
- **Análisis estadístico.** La prueba estadística para evaluar la normalidad que se utilizó fue la prueba de Anderson-Darling. Para el caso en que no hubiera normalidad, se transformarían los datos o se utilizaría una prueba no paramétrica. El paquete estadístico que se utilizó para analizar los datos fue Minitab 18.0.

VII. Resultados y discusión

7.1 Pruebas fitoquímicas en *Ricinus communis*

De acuerdo a las diferentes pruebas fitoquímicas realizadas (Figura 20), los resultados obtenidos mostraron que los extractos metanólicos y etanólicos fueron positivos a saponinas, terpenos, fenoles y alcaloides.

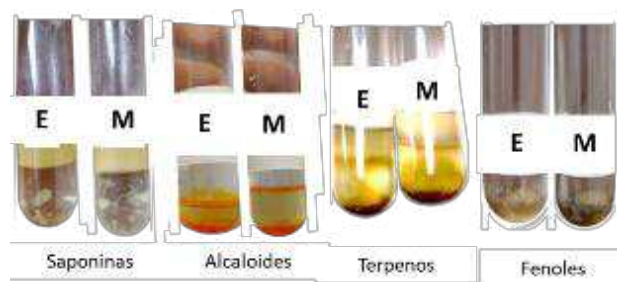


Figura 20. Pruebas fitoquímicas de extractos metanólicos y etanólicos

Éstos concuerdan con los resultados de More y Pandhure (2014), que mostraron que los extractos metanólicos de las semillas de *R. communis*, contenían saponinas y flavonoides, esteroides, terpenoides, taninos, alcaloides Indol, carbohidratos y glucósidos. Así mismo Inayor e Ibraheem (2014) encontraron en extractos clorofórmicos de semillas de ricino fenoles y saponinas. Por otro lado, Aziz y colaboradores (2016) en extractos hexánicos se obtuvieron: alcaloides, terpenoides, glucósidos cardíacos, taninos, esteroides y saponinas, esos resultados muestran que el tipo de disolvente utilizado es un factor que determina los metabolitos que se obtienen, así como la concentración en la que se encuentran, porque para que una sustancia disuelva a otra es necesaria la compatibilidad de sus estructuras moleculares, por ello se suelen emplear disolventes de diferentes polaridades, los solventes no polares son mejores para disolver los compuestos no polares, mientras que los disolventes más polares son mejores para disolver los compuestos polares (Tiwari *et al.*, 2011)

Los metabolitos que se encontraron en los extractos metanólicos y etanólicos en esta investigación están asociados con efectos tóxicos, repelentes, de inapetencia o evitan la oviposición (Nava-Pérez *et al.*, 2012), lo que sugiere que estos metabolitos en conjunto o de forma individual actúan en el insecto objetivo causándole su muerte (Hussein *et al.*, 2016).

Rahmati y colaboradores (2015), encontraron ricina en las semillas de ricino, ésta es parte del grupo de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de tipo 2 y se conocen

principalmente por su actividad insecticida (Pita *et al.*, 2004). La ricina se concentra en el endospermo de la semilla, y se sabe que es uno de los compuestos naturales más venenosos (El-Nikhely *et al.*, 2007).

7.2 Enzimas y metabolitos de *Beauveria bassiana*

Con la fermentación sólida se obtuvo crecimiento uniforme del micelio del hongo como se observa en la Figura 21.

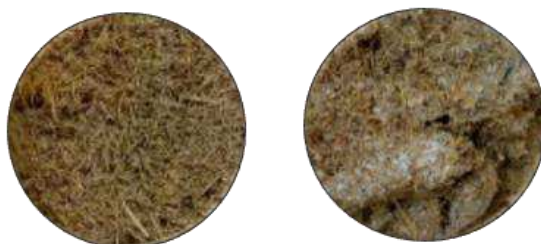


Figura 21. Crecimiento del hongo en el cultivo sólido

En los extractos crudos y liofilizados de *B. bassiana*, hay actividad enzimática de proteasas y quitinasas, así como de metabolitos secundarios determinados por el método de Lowry, Como se puede observar en el cuadro 3 y 4, en los extractos liofilizados, la actividad enzimática y el contenido de proteína disminuyeron.

Cuadro 3. Resultados en liofilizados

Prueba	Resultado
Actividad quitinolítica	0.0103 ± 0.0024 U.I
Actividad proteolítica	0.048 ± 0.07 U.I
Contenido de proteína	158.50 ± 70.5 mg/prot

Cuadro 4. Resultados en extractos crudos

Tipo	Resultado
Actividad quitinolítica	0.058 ± 0.002 U.I
Actividad proteolítica	0.318 ± 0.083 U.I
Contenido de proteína	413.5 ± 230.1 mg/prot

Las proteasas y quitinasas son enzimas importantes en el proceso de patogénesis., ya que rompen el primer mecanismo de defensa del insecto, la cutícula que esta compuesta por lípidos, proteínas y quitina (Zimmermann, 2007).

Por otro lado, los metabolitos de bajo peso molecular son péptidos que pueden ser beauvericina, beauverólidos, basiacidina, etc. Estos metabolitos intervienen en la destrucción de tejidos internos y el agotamiento de nutrientes y pueden causar síntomas en el comportamiento del insecto como la parálisis parcial o general y la lentitud por acciones neuromusculares (Pinnamaneni y Potineni, 2010), cambios conductuales y de alimentación, pérdida de peso, fecundidad o malformaciones (Zimmermann, 2007).

Marín-Cruz y colaboradores (2017) aplicaron extractos crudos, enzimáticos, metabolitos secundarios y conidios de *B. bassiana* en *Bradysia impatiens*, los resultados mostraron que a los 20 días de evaluación, la mortalidad por metabolitos secundarios fue del 47.5% y en adultos se obtuvo un 65% de malformaciones, esto sugiere que los metabolitos tienen un efecto más prolongado con respecto a la mortalidad, pero al observar el porcentaje de malformaciones estas pueden representar una disminución de la población de la plaga en un periodo de tiempo determinado.

7.3 Efecto insecticida de ricino y *B. bassiana* en *A. ludens* in vitro

Al evaluar los extractos de ricino metanólicos y etanólicos en tres concentraciones diferentes, así como los extractos liofilizados de enzimas y de metabolitos de *B. bassiana*, los extractos metanólicos y etanólicos de ricino, presentaron una mortalidad en las tres concentraciones evaluadas superior al 70%. Los extractos etanólicos de ricino comenzaron a actuar desde el primer día y desde el segundo día los metanólicos.

Por otro lado, el porcentaje de mortalidad de los extractos de *B. bassiana* en las tres concentraciones evaluadas fue menor al 0.83%, igual al 0.83% del testigo negativo que consistía en la dieta estándar (Figura 31). Con *B. bassiana* las hembras pusieron huevos, tal como sucedió en el testigo negativo en el que también se puede observar la presencia de huevos, esto fue contrario a lo observado en los extractos de ricino, en los que no hubo presencia de huevos, lo que quiere decir que con la dieta estándar y los liofilizados, los insectos tenían condiciones propicias para reproducirse, ya que se ha observado que para la oviposición en cría masiva se utiliza azúcar y proteína hidrolizada (3:1), para la puesta de huevos (Flores *et al.*, 2012).



Figura 22. Huevos de *A. ludens* con tratamiento de liofilizados de metabolitos y enzimas

Para el caso en que *B. bassiana* no causó mortalidad con los liofilizados, puede deberse a que posiblemente los extractos liofilizados les sirve como fuente de alimento, ya que algo similar sucede en la cría masiva, porque la levadura inactiva en polvo, es el único ingrediente disponible como fuente de proteína (Hernández *et al.*, 2016), ejemplos de ello han sido la soya hidrolizada (Chan *et al.*, 1990), proteína hidrolizada y levaduras enriquecidas (Chang, 2009).

Sin embargo el control con conidios de *B. bassiana* en *A. ludens* es efectivo, como lo reporta Toledo y colaboradores (2006), al evaluar la mortalidad en adultos aplicando los conidios de *B. bassiana* en la dieta de los adultos, los resultados mostraron que las cepas Bb16 causaron 100 % de mortalidad en un tiempo letal medio (LT₅₀) de 2.82 días, la cepa Bb26 con una concentración de conidios causó 98% de mortalidad en un tiempo letal medio (LT₅₀) de 3.74 días y la cepa B18 causó 86% de mortalidad, esto muestra que diferencias de virulencia entre cepas distintas a pesar de ser de la misma especie.

También De la Rosa y colaboradores (2002), evaluaron los conidios de *B. bassiana* en larvas, pupas y hembras adultas de *A. ludens* bajo condiciones de laboratorio, sus resultados obtenidos determinaron que las cepas aplicadas en estado de larva causaron 2-8% de mortalidad y en pupas 0%, sin embargo, los niveles de mortalidad fueron altos en los adultos con 100, 98 y 98% de las cepas Bb16 (LT₅₀ 2.8 días), Bb24 (LT₅₀ 4.2 días) y Bb 26 (LT₅₀ 3.7 días), respectivamente.

Los conidios aplicados a 800 mg de conidios/kg de suelo con diferentes condiciones de textura, humedad y temperatura, resultó en una mortalidad de 79.8% en suelo arenoso y 64.0% en suelo arenoso-limoso; con 12% de humedad se registró el 79.8% de

mortalidad (Wilson y colaboradores (2017)). Con efectos insectistáticos los conidios reducen la cantidad de ovocitos basales maduros (Sánchez-Roblero *et al.*, 2012)

Con la prueba Anderson-Darling se analizó la normalidad de los datos de los tratamientos de ricino, que fueron los que sí presentaron mortalidad. Los resultados mostraron que no había normalidad de los datos ($p < 0.005$) ($\alpha = 0.05$) como se observa en la Figura 23.

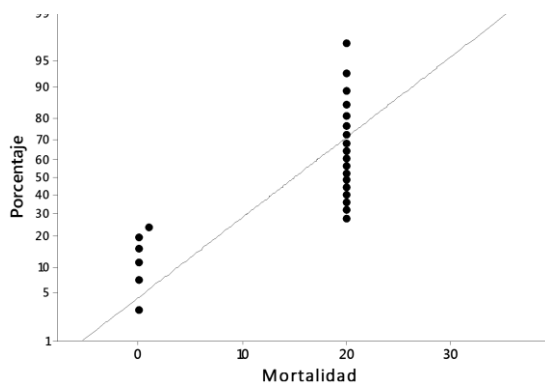


Figura 23. Gráfica de normalidad de ricino, malatión y dieta estándar con la prueba de Anderson-Darling

De acuerdo al análisis de Kruskal-Wallis los tratamientos de ricino, malatión y dieta estándar fueron diferentes entre sí ($P < 0.0047$) ($\alpha = 0.05$), Los extractos metanólicos a 900 ppm tuvieron un 100% de mortalidad en los individuos evaluados como se observa en la Figura 24, en un período máximo de 7 días, el efecto de mortalidad se comenzó a observar desde el segundo día de exposición al tratamiento.

Los extractos etanólicos a 900 ppm obtuvieron un 100% de mortalidad, que lo alcanzaron hasta los 10 días (Figura 25). Todos los tratamientos de ricino tuvieron una mortalidad superior al 70% y desde el primer día de exposición se observó mortalidad. Los extractos metanólicos y etanólicos de ricino a 600 ppm tuvieron una mortalidad superior al 80%, pero no alcanzaron el 100% de mortalidad (Figura 26 y 27) y con la dosis de 300 ppm hubo una mortalidad del 70% aproximadamente para ambos extractos (Figura 28 y 29). Esto quiere decir que entre más alta la concentración de ricino más mortalidad alcanzó y a 900 ppm para ambos extractos el 100% de los individuos de la muestra evaluada murió entre los 7 y 10 días. Con respecto al testigo positivo (malatión) todos los individuos murieron al tercer día (Figura 30) y en el testigo negativo solo hubo 0.83% de mortalidad (Figura 31).

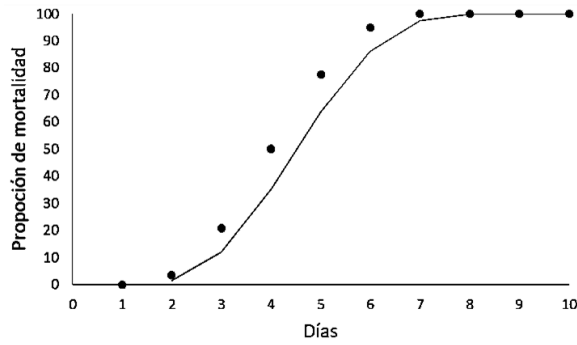


Figura 24. Proporción de mortalidad de extractos Metanólicos a 900 ppm

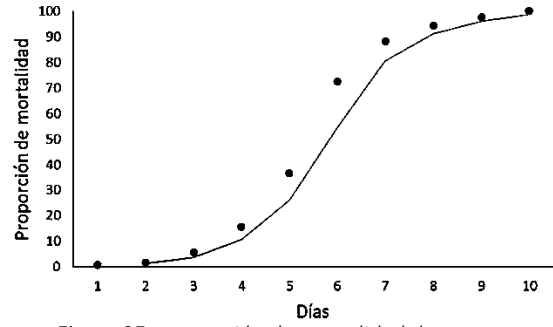


Figura 25. Proporción de mortalidad de extractos Etanólicos a 900 ppm

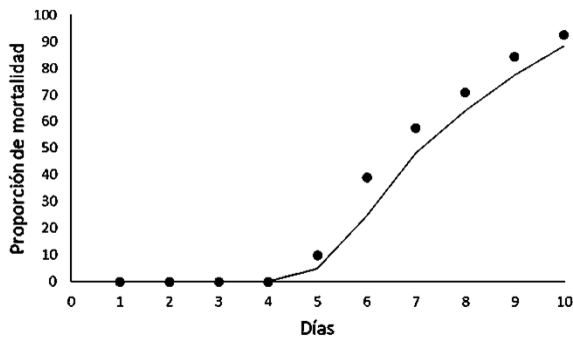


Figura 26. Proporción de mortalidad de extractos Metanólicos a 600 ppm

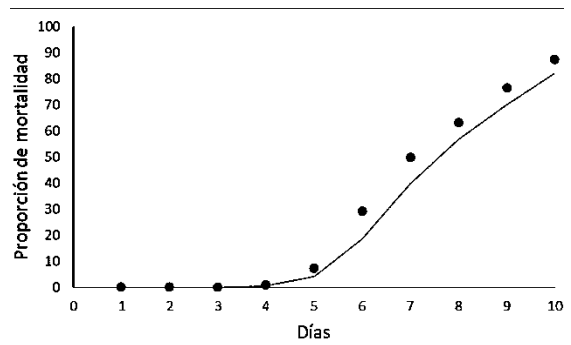


Figura 27. Proporción de mortalidad de extractos Etanólicos a 600 ppm

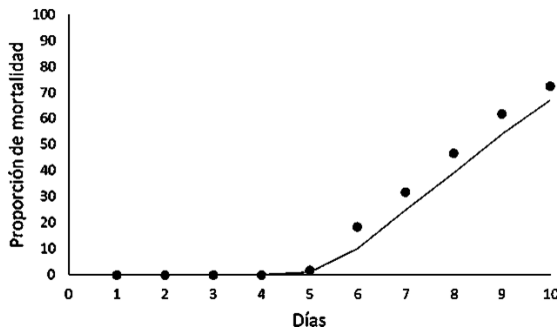


Figura 28. Proporción de mortalidad de extractos Metanólicos a 300 ppm

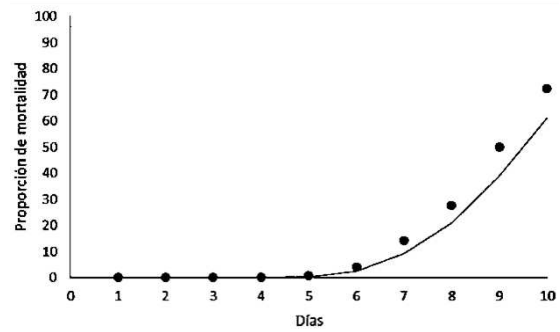


Figura 29. Proporción de mortalidad de extractos Etanólicos a 300 ppm

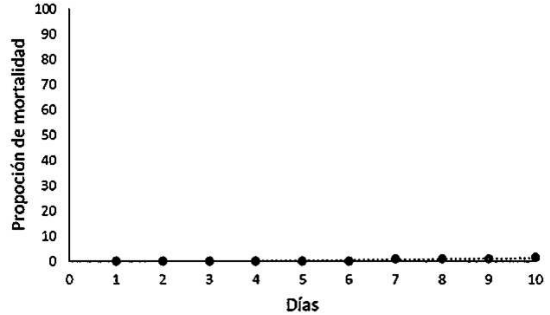
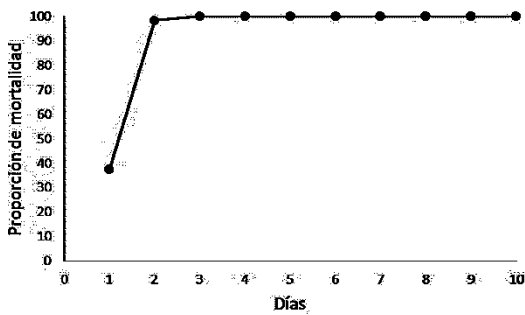


Figura 30. Proporción de mortalidad de malati3n

Figura 31. Proporción de mortalidad de dieta estandar

El tiempo para alcanzar la mortalidad depende principalmente de la forma de aplicaci3n, la plaga objetivo y la dosis empleada, como se puede observar en los diferentes estudios empleando semillas de *R. communis*, por ejemplo con larvas de la mosca del melocot3n *Bactrocera zonata* (D3ptera), al evaluar la actividad insecticida de extractos metan3licos de pericarpio inmaduro de semilla, se alcanz3 un 100 % de mortalidad a las 72 horas de la aplicaci3n (Rampadarath y Puchooa, 2016), en otro estudio el per3odo de tiempo para alcanzar el 100% de mortalidad con extractos metan3licos de semillas de *R. communis* fue hasta los 14 d3as en *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) (Hussein *et al.*, 2016).

En vectores como *C. quinquefasciatus* (D3ptera), *Anopheles stephensi* (D3ptera) y *Anopheles albopictus* (D3ptera), el tiempo de mortalidad para alcanzar el 100% fue antes de 24 h, en este m3todo las larvas fueron sumergidas en agua de estanque con el extracto (Mandal, 2010). Con larvas de la palomilla dorso de diamante, la aplicaci3n t3pica de aceite al 10% caus3 una mortalidad del 100% en 1.02 d3as y la aplicaci3n por ingesti3n fue en 1.01 d3as. Al comparar las investigaciones previas, se puede determinar que el rango de tiempo de mortalidad en que los extractos de ricino act3an en un insecto var3a de las 24 horas hasta a los 14 d3as, para el caso de esta investigaci3n los extractos de ricino actuaron desde el primer d3a de exposici3n y hasta los 10 d3as.

Un aspecto fundamental en la aplicaci3n de un nuevo insecticida es la dosis requerida para controlar la poblaci3n, para conocer dicha dosis se utiliza el an3lisis Probit, este procedimiento mide la relaci3n entre la intensidad de un est3mulo y la proporci3n de casos que presentan una cierta respuesta a dicho est3mulo. Con respecto a los resultados del an3lisis Probit en esta investigaci3n de los extractos metan3licos a 900 ppm, la Concentraci3n Letal Media (CL₅₀) fue de 264.474 ppm (Figura 32) y para los extractos etan3licos a 900 ppm, la CL₅₀ fue de 279.611 ppm (Figura 33). Por lo que en el caso de los extractos etan3licos se requiere de 15.13 ppm m3s, para matar el 50% de la poblaci3n objetivo.

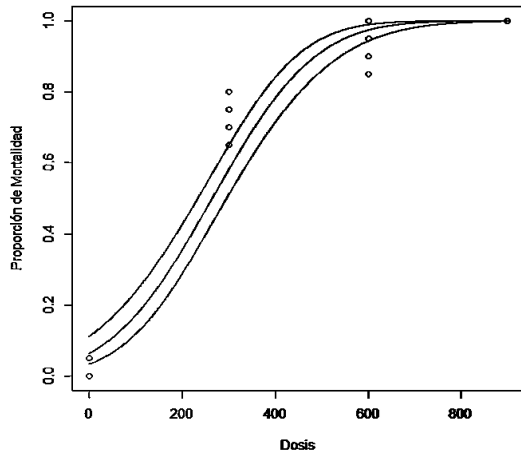


Figura 32. Análisis Probit de extractos metanólicos a 900 ppm

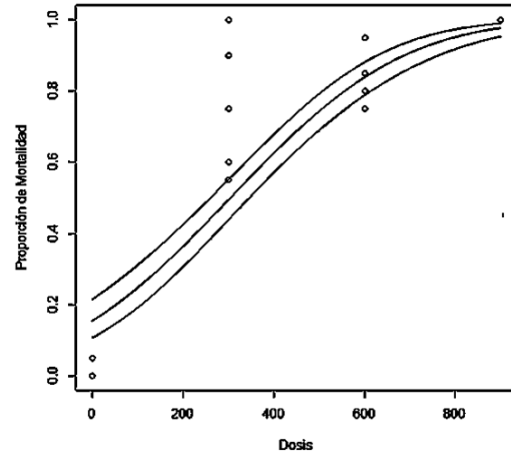


Figura 33. Análisis Probit de extractos metanólicos a 900 ppm

Ramos-López y colaboradores (2010), evaluaron la actividad insecticida de extractos metanólicos de semillas de *R. communis* en larvas de *S. frugiperda* (Coleoptera), sus resultados mostraron que en concentraciones entre 16,000 y 9,600 ppm se obtuvo un 0% de viabilidad larval. En contraste, los resultados de esta investigación, muestran que para alcanzar el 100% de mortalidad en adultos de *A. ludens* se requiere de una dosis menor (900 ppm).

En una investigación con el mosquito *Aedes aegypti* (Parra *et al.*, 2007), se evaluaron los extractos de material vegetal seco de higuera, la CL₅₀ fue de 860 ppm, menor a la presentada en este trabajo.

El tiempo en que se logra el 100 % de mortalidad es fundamental para el control de *A. ludens* en campo, debido a que la madurez ovárica de la mosca hembra es de 9 días (Dickens *et al.*, 1982) y de acuerdo a Thomas (2003), la hembra no se vuelve grávida hasta los 11 días, por lo que el control antes de 9 a 11 días es fundamental para evitar la reproducción de la mosca. En esta investigación los tratamientos con ricino mataron al 100% de la muestra en un periodo de 1 a 7 días, para los extractos metanólicos y de 1 a 10 días para los extractos etanólicos.

7.4 Calidad pupal

Los resultados de emergencia pupal por la técnica de celdillas fue que en total emergieron en promedio 84.33%, con un sexado promedio de 37.3 hembras y 47 machos por cada 100 individuos, lo que concuerda con el Manual de Control de Calidad de Moscas de las Frutas Estériles (SENASICA, 2012), ya que se menciona que el porcentaje aceptable de emergencia de pupa a adulto es del 70 al 80%. En la calidad de bote en total emergieron 89.83% y en la calidad de campo en total emergieron el 81.88%.

7.5 Efecto del atrayente Captor en la mortalidad de *A. ludens*

Al realizar el experimento con Captor para comprobar si éste causaba mortalidad en los adultos de *A. ludens*, se evaluó la normalidad de los datos del número de moscas muertas con la prueba de Anderson-Darling, los resultados (Figura 34) mostraron que no había normalidad de los datos ($p < 0.005$) ($\alpha = 0.05$).

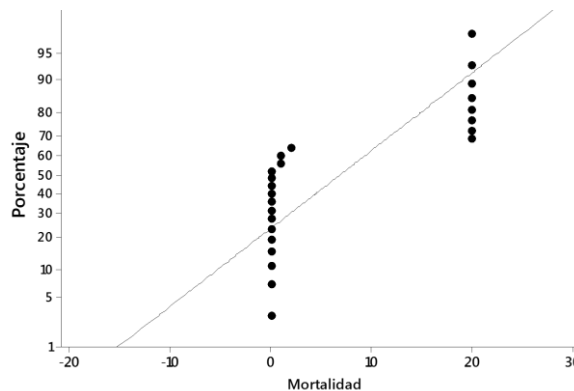


Figura 34. Gráfica de normalidad de los tratamientos con Captor con la prueba de Anderson-Darling

Con respecto a la prueba de Levene los resultados mostraron que había homocedasticidad ($p < 0.654$) ($\alpha = 0.05$). Para que se pueda realizar un análisis paramétrico como el análisis de varianza es necesario que no haya homocedasticidad, es decir que no haya igualdad de varianzas y que haya normalidad, por lo tanto, para este experimento se utilizó una prueba no paramétrica.

De acuerdo a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, los resultados mostraron que los tratamientos fueron diferentes entre sí ($P < 0.008$) ($\alpha = 0.05$).

En relación al porcentaje de mortalidad (Figura 35) los tratamientos que contenían ricino tuvieron un 100%, el tratamiento con enzimas de *B. bassiana* tuvo 0.83% igual que el testigo (azúcar) y el tratamiento de azúcar más Captor, el tratamiento con captor más metabolitos no tuvo ningún efecto de mortalidad, por lo que se determina que el Captor no causa mortalidad en *A. ludens* a diferencia de ricino. Eso puede deberse a que el Captor es un formulado de proteína vegetal que se utiliza como atrayente alimenticio, similar al alimento de la cría masiva.

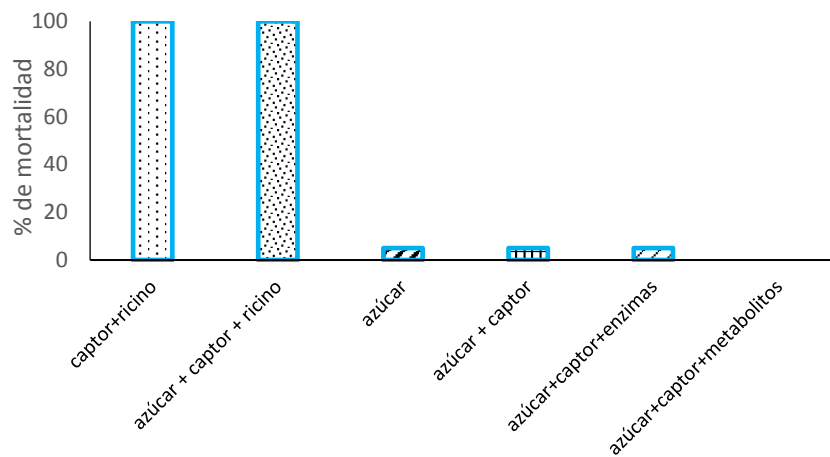


Figura 35. Porcentaje de mortalidad de *Anastrepha ludens* con atrayente Captor

7.6 Efecto de extractos de ricino en campo

Los datos del número de moscas capturadas recabados en campo de las pruebas con ricino, fueron analizados para determinar su distribución (Figura 36) por lo que se evaluó la normalidad de los datos con la prueba de Anderson-Darling, los resultados mostraron que no había normalidad de los datos ($p < 0.005$) ($\alpha = 0.05$).

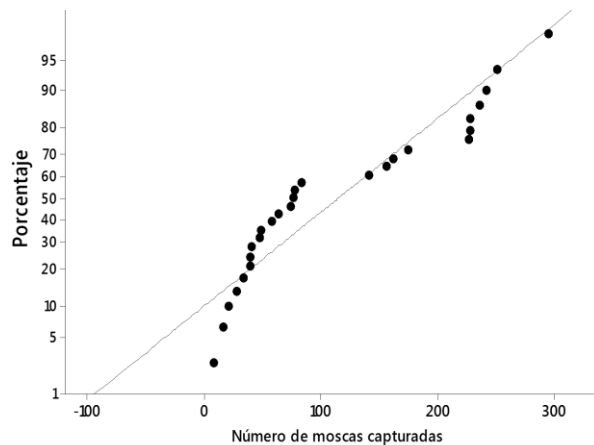


Figura 36. Gráfica de normalidad de los tratamientos en campo con la prueba de Anderson-Darling

Con respecto a la prueba de Levene, los resultados mostraron que existía homocedasticidad ($p < 0.795$) ($\alpha = 0.05$). Para que se pueda realizar un análisis paramétrico como el análisis de varianza es necesario que no haya homocedasticidad, es decir que no haya igualdad de varianzas y que haya normalidad. Por lo tanto, se procedió a hacer una transformación de Box Cox. Box y Cox (1964) propusieron una familia de funciones de potencia para la variable de respuesta con el objetivo de garantizar el cumplimiento de todos los supuestos de un modelo lineal, es decir: $Y \sim N(X\beta, \sigma^2 I)$. Estas transformaciones combinan el objetivo de encontrar una relación simple, con homogeneidad de varianzas, mejorando la normalidad. Por ende, al hacer la transformación Box-Cox a los datos de mortalidad, se comportaron de forma normal ($p < 0.309$) ($\alpha = 0.05$), como se observa en la Figura 37.

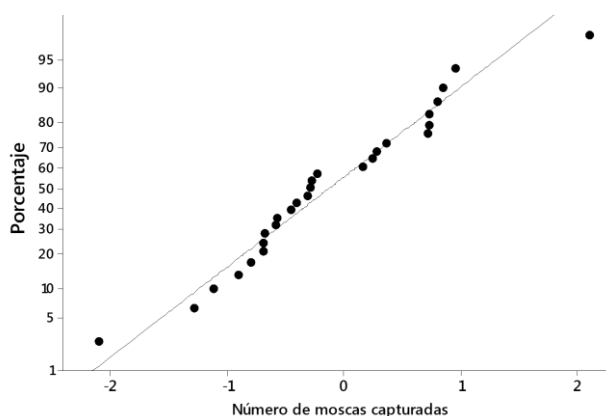


Figura 37. Gráfica de normalidad con los datos transformados con Box Cox

Posteriormente se empleó un Análisis de varianza con el ajuste del modelo lineal general, por ser el diseño experimental de esta investigación de Cuadrado Latino con tres factores de

bloque: uno de sitio con tres niveles, otro de rotación con tres niveles y el de los tratamientos con tres niveles (Cuadro 5). Los resultados mostraron que al menos una de las medias de los tratamientos eran diferentes ($p < 0.036$) ($\alpha = 0.05$). El criterio de efectividad de los tratamientos es que entre mayor número de moscas capturadas por Ceratrap® menor efectividad del tratamiento. Como se observa en la Figura 38, en donde estaban las estaciones cebo con los tratamientos de ricino fue donde menos moscas se capturaron, seguido de malatión.

Cuadro 5. Análisis de Varianza

Bloques	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Punto	2	46376878	23188439	53.97	0.018193
Rotación	2	1309563027	654781514	1523.86	0.000656
Tratamientos	2	22742770	11371385	26.46	0.036411
Error	2	859375	429688		
Total	8	1379542050			

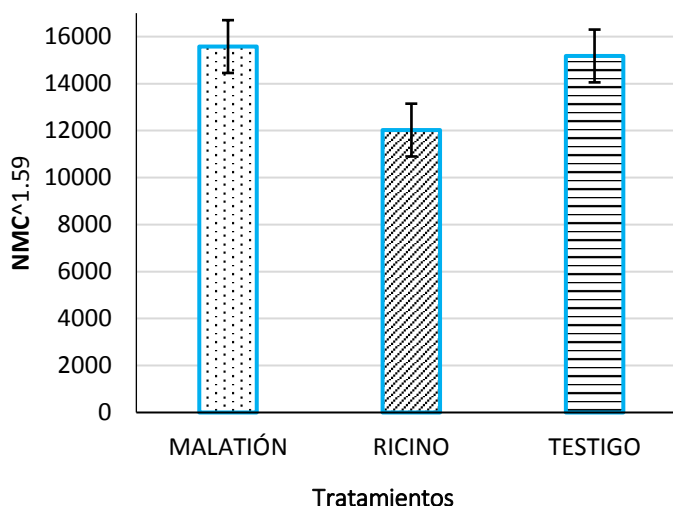


Figura 38. Gráfica de medias con los datos transformados con Box Cox

La distribución de moscas de cría masiva liberadas no se ve afectada por el tratamiento de la dieta, el sexo o la reproducción, sino por las condiciones ambientales, como la cobertura de vegetación o la sombra. Una única investigación con extractos acuosos de ricino, se desarrolló en huertos experimentales de nogal de Castilla en la mosca de la fruta de la familia Tephritidae *Rhagoletis zoqui* (Torija-Torres *et al.*, 2014), se evaluaron los extractos acuosos de *R. communis*, *Argemone mexicana* y el colorante Floxin-B y se compararon con el insecticida comercial Malation®, los resultados mostraron que el insecticida comercial tuvo el mayor índice de captura, y el segundo tratamiento más eficiente después del comercial

fue el extracto de *R. communis*, esto difiere de lo encontrado en esta investigación al ser el extracto de ricino el más efectivo. Se destaca que los extractos de ricino acuosos fueron obtenidos a partir de semillas maduras, sin embargo, en esa investigación, no se realizaron pruebas para evaluar la presencia de los metabolitos secundarios del extracto. More y Pandhure (2014), encontraron en extractos acuosos de semillas de ricino esteroides, terpenos, flavonoides, alcaloides Indol, carbohidratos, glucosidos y saponinas.

Las moscas en especial los tefrítidos, utilizan el olfato, para localizar lugares esenciales como frutos hospederos específicos para su oviposición (Liu *et al.*, 2016), el objetivo de cebos es utilizar sustancias para capturar las moscas que responden mediante receptores olfativos a compuestos volátiles, los extractos de plantas comúnmente contienen estos compuestos volátiles y mezclados con atrayentes como el Captor 300, pudo ser más atrayente para la mosca.

En el mercado hay otros tipos de atrayentes como el CeraTrap®, éste captura un número de moscas mayor que el atrayente Captor 300, sin embargo atrae más enemigos naturales (Lasa y Cruz, 2014) y tiene un costo más elevado, por lo que su uso se reduce solamente al trampeo, para conocer la densidad de moscas de una zona específica (SENASICA, 2017).

Algunas alternativas a los insecticidas convencionales que se han utilizado en campo, es por ejemplo el Spinosad el cual es un fermentado de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa* (Thompson *et al.* 2000), dentro de sus ventajas está que tiene baja toxicidad en mamíferos, sin embargo dentro de sus desventajas es que se ha observado que con aplicaciones recurrentes (>10 años), se han presentado problemas de resistencia (Kakani *et al.* 2010), y en algunos casos daño sobre enemigos naturales (Ruiz *et al.*, 2008) y polinizadores (Rendon *et al.*, 2000), además tiene baja persistencia del producto en el ambiente al degradarse por fotólisis (Thompson *et al.*, 2000) y por niveles altos de humedad (Revis *et al.*, 2004), así mismo tiene baja eficacia en el grado de saciedad de adultos que se han alimentado previamente de alguna fuente proteica o de carbohidratos (Mangan, 2009

Es por esta razón que el manejo integrado de plagas debe incluir diversas alternativas como los extractos botánicos y dentro de sus ventajas es que contienen mezclas de sustancias

activas que exhiben diversos mecanismos de acción, lo que disminuye las posibilidades de generar resistencia en las plagas (Pavela, 2016). Sin embargo, se deben considerar las condiciones ambientales y la densidad de hospederos, así como a factores de mortalidad (Flores-Breceda *et al.*, 2009). Además, es importante considerar que dependiendo el tipo de formulaciones es la atracción y la mortalidad resultante (Urbaneja *et al.*, 2009).

VIII. CONCLUSIONES

A través de las pruebas de actividad enzimática y contenido de proteína, se determinó que los extractos crudos y liofilizados de *Beauveria bassiana* tienen enzimas proteolíticas y quitinolíticas; así como contenido de metabolitos, los cuales fueron obtenidos mediante fermentación sólida.

La fermentación sólida a la que se le añadió caparazón de camarón, es una técnica innovadora, porque el caparazón le aporta un medio más natural al hongo para su desarrollo, debido a que contiene proteínas, lípidos y quitina que es similar a la cutícula de un insecto, lo que le permite conservar su patogenicidad a lo largo del tiempo y expresar su virulencia.

El testigo negativo o dieta estándar tuvo del 0 al 0.83% de mortalidad, igual que los extractos de *B. bassiana*, que, durante los 10 días de evaluación, no causaron una mortalidad superior al 0.83%. La biología de la plaga fue un factor fundamental en el resultado de los tratamientos con *B. bassiana*, porque se observó que *A. ludens* tiene la capacidad de sintetizar las proteínas que son suministradas por el alimento, ya que representan el único ingrediente disponible como fuente de proteína. Sin embargo, existen antecedentes de que los conidios de *B. bassiana* son efectivos para causarle mortalidad a esta plaga.

Con respecto al ricino y de acuerdo a las pruebas fitoquímicas, los extractos metanólicos y etanólicos contienen los metabolitos secundarios: saponinas, taninos, fenoles y alcaloides, éstos en conjunto o de forma individual tuvieron efecto en los adultos de *A. ludens* causándole su muerte de 2 a 7 días para el caso de los extractos metanólicos a 900 ppm y de 1 a 10 días para los etanólicos a 900 ppm. Con dosis más bajas de 600 ppm y 300 ppm a los 10 días no se alcanzó el 100% de mortalidad, pero si una mortalidad superior al 70%.

Para que un bioinsecticida pueda ser efectivo se debe considerar la forma de aplicación, la plaga objetivo y la dosis empleada. En *A. ludens* para matar el 50% de la población CL_{50} con

los extractos metanólicos a 900 ppm, se deben emplear 264.474 ppm y para los extractos etanólicos a 900 ppm se deben aplicar 279.611 ppm.

La emergencia pupal para las liberaciones en campo estaban en el rango óptimo que marca SENASICA, ya que estuvieron en un rango de emergencia del 81.88% a 89.83%, y el porcentaje aceptable va del 70 al 80%.

El atrayente Captor que se utilizó en el experimento de campo, no causa mortalidad en adultos de *A. ludens* a diferencia de ricino, porque en el bioensayo los tratamientos que contenían ricino tuvieron un 100% y los que tenían Captor pero sin ricino la mortalidad fue del 0 al 0.83%.

El tratamiento de ricino en campo resultó ser el más efectivo de acuerdo al número de moscas capturadas, por lo que debe seguir siendo estudiado para su posterior aplicación.

El testigo positivo o malatión en las pruebas *in vitro* mató a todos los individuos al tercer día, sin embargo este insecticida sintético ocasiona daños a la salud humana y el medio ambiente, así como resistencia de las plagas, por lo que su uso debe eventualmente ir desapareciendo, dando lugar a insecticidas menos nocivos como los extractos vegetales o los hongos entomopatógenos, los cuales son alternativas que al contener mezclas de diversas sustancias activas que exhiben diversos mecanismos de acción, se disminuyen las posibilidades de generar resistencia en las plagas y para su aplicación se deben considerar las condiciones ambientales, la densidad de los hospederos, el tipo de formulación, la biología de la plaga y el modo de acción.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S., Huang, Z. y Ren, S. 2010. Production of Cuticle Degrading Enzymes by *Isaria fumosorosea* and Their Evaluation as a Biocontrol Agent against Diamondback Moth. *Journal of Pest Sciences*, 83:361-370.
- Ali, S., Ren, S., y Huang Z. 2014. Extracellular lipase of an entomopathogenic fungus effecting larvae of a scale insect. *Journal of Basic Microbiology*. 54: 1148–1159.
- Ashwathy, G. y Sheela, D. 2016. Evaluation of the Antiulcer Properties of Castor Plants Indigenous to Kerala. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 5:423-426.
- Avalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2:119-145.
- Ayala, G.A., Olan, M. y Carrera, C. B. 2011. ¿Es competitivo el subsector de frutas en México? *Revista Fuente* 9: 151-164.
- Aziz, S., Rabniwaz, A., y Ghani, K. S. 2016. Phytochemical and Biological Screening of *Ricinus communis* Seed Oil Grown Wild in Jammu & Kashmir. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5:89-92.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S. E., y St. Leger, R. J. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324: 159–169.
- Barranco-Florido, J. E., Bustamante-Camilo, P., Mayorga-Reyes, L., Martínez-Cruz, P. y Azaola, M. A. 2009. β -N Acetylglucosaminidase Production by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* ATCC 26854 by Solid-State Fermentation Utilizing Shrimp Shell. *Interciencia*, 34: 356-360.
- Butt, T., Coates, J., Dubovskiy, I. y Ratcliffe, N. 2016. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *Advances in Genetics*, 94: 307-364.
- CABI. 2017. *Anastrepha ludens* (Mexican fruit fly). Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/5654> [Consulta: 08 de noviembre de 2017].
- Celedonio-Hurtado H., Liedo, P., Aluja, M., y Guillen, J. 1988. Demography of *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* and *A. serpentina* (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 71:110-119.
- Chan, H., Hansen, J. y Tam, S. 1990. Larval diets from different protein sources for Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 83: 1954-1958.
- Chang, C. L. 2009. Evaluation of yeast and yeast products in larval and adult diets for the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, and adult diets for the medfly, *Ceratitis capitata*, and the melon fly, *Bactrocera curcurbitae*. *Journal of Insect Science*. 9: 9-23.
- Chávez, I. E.; Rodríguez, N. S.; Sánchez, P. L. de C.; Hamdan, P. A. y Barranco, F. J. E. 2014. Actividad insecticida *in vitro* de extracto crudo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre larvas de *Phyllophaga* spp. (Harris). *Revista de Protección Vegetal* 29: 226-230.
- Chavira, R, Burnett, T. J. y Hageman, J. H. 1984. Assaying proteinases with azocoll Analytical Biochemistry. 136, 446-450.

- Coudron, T. A., Kroha, M. J. y Ignoffo, C. M. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Comprehensive Biochemistry Physiology*. 79B, 339-348.
- De la Rosa, W., López, F. L. y Liedo, P. 2002. *Beauveria bassiana* as a Pathogen of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Economic Entomology*, 95: 36-43.
- Dias, B. A., Neves, P. M. O. J., Furlaneto-Maia, L. y Furlaneto, M. C. 2008. Cuticle-degrading Proteases Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the Presence of Coffee Berry Borer Cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 301–306.
- Díaz-Fleischer, F., Pérez-Staples, D., Cabrera-Mireles, H., Montoya, H. y Liedo, P. 2017. Novel insecticides and bait stations for the control of *Anastrepha* fruit flies in mango orchards. *Journal of Pest Science*, 90:865–872.
- Dickens, J. C., Solis, E. y Hart, W. G. 1982. Sexual development and mating behavior of the mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew). *Southwestern Entomologist*, 7: 9-15.
- Domínguez, J., T. Artiaga-López, E. Solís, y E. Hernández. 2010. Métodos de colonización y cría masiva, pp. 259–276. In: P. Montoya, J. Toledo & E. Hernández [Eds.]. *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*. S y G. Editores. México D.F. 395 pp.
- Edwards, R., y Gatehouse, A. 1999. Secondary metabolism. 193-218. En: Lea, P., y Leegood, R. (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. 384.
- El-Nikhely, N., Helmy, M., Saeed, H., Shama, L. y El-Rahman, Z. 2007. Ricin A Chain from *Ricinus sanguineus*: DNA Sequence, Structure and Toxicity. *The protein journal*. 26: 481-489.
- Faria, M. y Wraight, S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237–256.
- Flores, H., Hernández E. y Toledo, J. 2012. Desarrollo de un sistema de cría artificial para *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera:Tephritidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 28: 321:340.
- Flores-Breceda, S., Gómez-Escobar, E. y Montoya-Gerardo, P. 2009. Estimación de la densidad poblacional de *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae) mediante la captura de adultos en trampas Multilure cebadas con proteína hidrolizada. *Entomología Mexicana*, 516-519.
- Flores-Estévez, N., Vasquez-Morales, S. G., Cano-Medina, T., Sánchez-Velásquez, L. R., Noa-Carrazana, J. C. y Díaz-Fleischer, F. 2013. Insecticidal activity of raw ethanolic extracts from *Magnolia dealbata* Zucc on a tephritid pest. *Journal of Environmental Science and Health*, 48:582–586.
- Fuentes-Matus, C., Vega y León, S., Díaz-González, G., Noa-Pérez, M., y Gutiérrez- Tolentino, R. 2010. Determinación de residuos de malatión y malaoxón en mango de las variedades Ataulfo y Tommy Atkins producidos en Chahuities, Oaxaca. *Agrociencia*, 44:215- 223.

- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Adaptado a las condiciones de la República Mexicana). Edit. Universidad Nacional Autónoma de México. 5a. Ed. México, D. F. 90.
- Garcillán, P. y Rebman, J. 2016. Nota sobre los primeros registros históricos de dos plantas invasoras en la península de Baja California: crónica del misionero jesuita Miguel del Barco. *Acta Botanica Mexicana*, 115:43-49.
- Hernández, E., Flores-Breceda, M. Sosa-Iturbe, L. y Ezquivel, H. 2005. Tamaño de unidad muestral y número de repeticiones para la estimación de los parámetros de desarrollo de *Anastrepha obliqua* y *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 44: 155-164.
- Hernández, E., Rivera, P., Aceituno, M., Aguilar-Laparra, R., Quintero-Fong, L. y Orozco-Davila, D. 2016. Eficiencia de levaduras para la cría masiva de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Acta Zoologica Mexicana* 32: 240-252.
- Holder, D. y Keyhani, N. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 5260–5266.
- Hussein, H., Ubaid, J. y Hameed, I. 2016. Insecticidal activity of methanolic seeds extract of *Ricinus communis* on adult of *Callosobruchus maculatus* (Coleopteran: Brauchidae) and analysis of its phytochemical composition. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8:1385-1397.
- Inayor, B. N. e Ibraheem, O. 2014. Assessing *Ricinus communis* L. (castor) whole plant parts for Phenolics and Saponins constituents for Medicinal and Pharmaceutical applications. *International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3: 815-826.
- Ishii, M., Kanuka, H., Badolo, A., Sagnon, N., Guelbeogo, W. M., Koike, M y Aiuchi, D. 2017. Proboscis infection route of *Beauveria bassiana* triggers early death of Anopheles mosquito. *Scientific Reports*, 7: 1-10.
- Kakani, E., Zygouridis, N., Tsoumani, K., Seraphides, N., Zalom, F. y Mathiopoulos, k. 2010. Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Management Science*, 66: 447-453.
- Lasa, R. y Cruz, A. 2014. Efficacy of new commercial traps and the lure Ceratrap® against *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 97: 1369-1377.
- Liu, Z., Smagghe, G., Lei, Z. y J. J. Wang. 2016. Identification of Male-and Female-Specific Olfaction Genes in Antennae of the Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis*). *Plos One*, 11: 1-19.
- Loera, G. J. 2009. Ficha técnica *Anastrepha ludens* (Loew.) Mosca mexicana de la fruta. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/249395/Anastrepha_ludens_Loew.pdf [Consulta: 16 de mayo de 2019].
- Lowry, H. O., Rosebrough, N. J., Farr, L. A. y Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

- Mandal, S. 2010. Exploration of larvicidal and adult emergence inhibition activities of *Ricinus communis* seed extract against three potential mosquito vectors in Kolkata, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3:605–609.
- Mangan, R. 2009. Effects of bait age and prior protein feeding on cumulative time-dependent mortality of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) exposed to GF-120 spinosad baits. *Journal of Economic Entomology*, 102: 1157-1163.
- Manrakhan, A. Stephen, P. R. y Cronje, P. J. R. 2015. Phytotoxic effect of GF-120 NF fruit fly bait on fruit of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Nadorcott): influence of bait characteristics and fruit maturity stage. *Crop Protection* 78: 48–53.
- Marín-Cruz, V., Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Flrido, J., y 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: 329-340.
- Mascarin, G. M. y Jaronski, S. T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 177-202.
- More, P. y Pandhure, N. 2014. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity in *Ricinus communis* L. Gulab Rathod. *Periodic Research*, 3:49-51.
- Moreno, G. M. 2010. Mecanismo de respuesta inmune en insectos. Disponible en: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/239/Articulos/SistemaInmuneInsectos/SistemaInmuneInsectos2.html> [Consulta: 12 de enero de 2019].
- Muñiz-Paredes, F., Hernández, M., y Loera, O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33: 57-66.
- Murugesan, A.G., Sathesh, P. C. y Selvakumar, C. 2009. Biolarvicidal activity of extracellular metabolites of the keratinophilic fungus *Trichophyton mentagrophytes* against larvae of *Aedes aegypti* - a major vector for chikungunya and dengue. *Folia Microbiologica* 54: 213–216.
- Nangbes, J. G., Nvau, J. B., Buba, W. M., y Zukdimma, A. N. 2013. Extraction and characterization of castor (*Ricinus communis*) seed oil. *The International Journal of Engineering and Science*, 2:105 –109.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., y Vázquez-Montoya, E. L. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable Ra Ximhai*, 8:17-29.
- NOM-075-FITO-1997 (Norma Oficial Mexicana). 1998. Por la que se establecen los requisitos y especificaciones para la movilización de frutos hospederos de moscas de la fruta. SAGARPA. DOF (Diario Oficial de la Federación, publicada el 16 de marzo de 1998).
- Orozco-Davila, D., Hernández, R., Solís, E., Quintero, L. y Domínguez, J. 2006. Establishment of a colony of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under relaxed mass-rearing conditions in Mexico fruit flies of economic importance: from basic to applied knowledge. Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance 10-15 September 2006, Salvador, Brazil pp. 335-339.
- Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N. O. 2016. Chapter Six - Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects, Ed: Brian Lovett, Raymond J. St. Leger, en: *Advances in Genetics, Academic Press*, 94:165-249.

- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N. O. y Quesada-Moraga, E. 2013. Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 23:1199–1212.
- Pavela, R. 2016. History, Presence and Perspective of Using Plant Extracts as Commercial Botanical Insecticides and Farm Products for Protection against Insects - a Review. *Plant Protection Science*, 4: 229–241.
- Pinnamaneni, R. y Potineni, K. 2010. Mechanisms involved in the entomopathogenesis of *Beauveria bassiana*. *Asian Journal of Environmental Science*, 5: 65-74.
- Pita, R., Anadón, A., Martínez, M. 2004. Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. Departamento de Toxicología y Farmacología. *Revista de Toxicología*, 21: 51-56.
- Quesada-Moraga, E., Carrasco-Díaz, A., Santiago-Álvarez, C. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) *Journal of Applied Entomology*, 130: 442–452.
- Quilici, S. Atiama-Nurbel, T., y Thierry B. 2014. Plant Odors as Fruit Fly Attractants. En: Shelly, T., Epsky, N., Jang, E., Reyes-Flores, J. y Vargas, R. (Ed), *Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, USA, pp. 433.
- Ragavendran, C., Dubey, N. y Natarajan, D. 2017. *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *The Royal Society of Chemistry Advances*, 7: 3838–3851.
- Rahmati, H. Salehi, S. Malekpour, A. y Farhangi, F. 2015. Antimicrobial Activity of Castor Oil Plant (*Ricinus communis*) Seeds Extract Against Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*. 11: 9-12.
- Ramírez y Ramírez, F., Hernández, L. R. A., Bello, R. A., Sánchez, G. F., Cárdenas, L. J. y Hernández, L. F. 2016. 24 años de la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta en México: Avances y retos. Disponible en http://9twwh.senasa.gob.ar/sites/default/files/posters_web/s1/S1_462_1_Bello%20Rivera_24%20a%C3%B1os%20de%20la%20campa%C3%B1a.pdf. [Consulta: 05 de enero de 2019].
- Ramos-López, M. A., Pérez, G. S., Rodríguez-Hernández. C., Guevara-Fefer, P., y Zavala-Sánchez. M. A. 2010. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *African Journal of Biotechnology*, 9: 1359-1365.
- Rampadarath, S. y Puchooa, D. 2016. *In vitro* antimicrobial and larvicidal properties of wild *Ricinus communis* L. in Mauritius. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6: 100–107.
- Ravichandran, S. y Vimala, R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3: 480 486.

- Reddy, P. N. Kumar, D. Pathan, A. y Bobbarala, V. 2010. Antifungal Efficacy of Secondary Metabolites from Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana*. *Journal of Pharmacy Research*, 3: 854 – 856.
- Rendon, P., Jeronimo, F., Ibarra, J., Acajalon, F. y Tween, G. 2000. Efectividad del producto Success 0.02 CB en el control de moscas de las frutas y su efecto sobre abejas *Apis mellifera* L. USDA APHIS PPQ Report. <http://moscamedguatemala.org.gt/2014/doc/3.2.EfectividadProductoSobreAbejas.pdf>
- Renge, V. C., Khedkar, S. V. and Nandurkar, N. R. 2012. Enzyme Synthesis by Fermentation Method: A Review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2: 585-590.
- Resquín-Romero, G. Garrido-Jurado, I. y Quesada-Moraga, E. 2016. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 92: 101-110.
- Revis, H., Miller, N., y Vargas, R. 2004. Effects of aging and dilution on attraction and toxicity of GF-120 fruit fly bait spray for melon fly control in Hawaii. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1659-1665.
- Rivera, J., Hernández, E., Toledo, J., Bravo, B., Salvador, M., y Gomez, Y., 2012. Optimización del proceso de cría de *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) utilizando una dieta larvaria a base de almidón pre-gelatinizado. *Acta zoológica mexicana*, 28(1): 102-117.
- Robles, S. R. 1980. Producción de oleaginosas y textiles. Ed. LIMUSA. México. 507-518.
- Ruiz, L., Flores, S., Cancino, J., Arredondo, J., Valle, J., Díaz-Fleischer, F., y Williams, T. 2008. Lethal and sublethal effects of spinosad-based GF-120 bait on the tephritid parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological control*, 44: 296-304.
- Ruiz, L., López, L., López, G., Arredondo, J. 2012. Determinación de la dosis óptima de colorante para el pintado de pupas de *Anastrepha obliqua*, *A. ludens* cepa bisexual y cepa sexada genéticamente Tapachula. Disponible en: <http://www.programamoscamed.mx/EIS/biblioteca/libros/informes/Programaa%20d%20trabajo%202013%20DM%20.pdf> [Consulta: 03 de junio de 2019].
- Ruiz-Sánchez, E., Chan-Cupul, W., Pérez-Gutiérrez, A., Cristóbal-Alejo, J., Uch-Vazquez, B., Tun-Suárez, J., Munguía-Rosales, R. 2011. Crecimiento, esporulación y germinación *in vitro* de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. *Revista mexicana de micología*, 33: 9-15.
- Sánchez-Pérez, L., Barranco-Florido, J., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J., y Ramos-López, M. 2014. Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, 2: 65-76.
- Sánchez-Pérez, L., Rodríguez-Navarro, S., Marín-Cruz, V. H., Ramos-López, M. A., Palma, R. A. y 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.
- Sánchez-Roblero, D., Huerta-Palacios, G., Valle, J., Gómez, J., y Toledo, J. 2012. Effect of *Beauveria bassiana* on the ovarian development and reproductive potential of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science & Technology* 22: 1075-1091.

- Shakir, F.K., Audilet, D., Drake III, A.J. y Shakir, K.M. 1994. A rapid protein determination by modification of the Lowry procedure. *Analytical Biochemistry*, 216: 232-233.
- SENASICA, 2012. Manual de Control de Calidad de Moscas de las Frutas Estériles. Disponible en: publico.senasica.gob.mx. Consultada el 09 de septiembre de 2019.
- SENASICA. 2017. Estrategia Operativa Moscas Nativas de la Fruta. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/estrategia-operativa-moscas-nativas-de-la-fruta>. Consultada el 24 de junio de 2019.
- Senthil-Nathan, S. 2015. *A review of biopesticides and their mode of action against insect pests*. Environmental Sustainability. Springer: India, 49-63.
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21: 355-363.
- Shai, Y. 1999 Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 55–70
- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, anuario estadístico de la producción agrícola. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp. Consultado el '6 de junio de 2019.
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J. C. y Rodríguez, D. 2002. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa en el control de plagas. *Revista Manejo integrado de plagas*, 66:4-12.
- SINAVEF. 2017. Mapa dinámico fitosanitario. Disponible en: <http://www.sinavef.gob.mx/MDF/>. Consultada el 17 de abril de 2019.
- Sookar, P., Alleck, M., Ahseek, N. y Bhagwant, S. 2014. Sterile male peach fruit flies, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae), as a potential vector of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in a SIT programme. *African Entomology* 22: 488-498.
- Sosa-Armenta, J. M., López-Martínez, V., Villegas-Torres, O. G., Juárez-López, P., y Burgos-Solorio, A. 2017. Dinámica Poblacional de Moscas de la Fruta en Quintana Roo, México. *Southwestern Entomologist*, 42:275-282.
- Stevens, L. 1991. Manual of Standard Operating Procedures (SOP) for the Mass-Rearing and Sterilization of the Mexican Fruit Fly, *Anastrepha ludens* (Loew). USDA-APHIS, South Central Region, Mission, Texas. 39 pp.
- Thomas, D. B. 2003. Reproductive phenology of the Mexican fruit fly, *A. ludens* in the Sierra Madre Oriental, Northern Mexico. *Neotropical Entomology*, 32: 385-397.
- Thompson, G., Dutton, R., Y Sparks, T. 2000. Spinosad—a case study: an example from a natural product discovery programme. *Pest Management Science*, 56: 696-702.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G y Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1:98-106.
- Toledo, J., Liedo, P., Flores, S., Montoya, P., Campos, S. E., y Villaseñor, A. 2006. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: a novel approach. *7 International symposium on fruit flies of economic importance: from basic to applied knowledge*, Brazil.

- Torija-Torres, A., Huerta-De la Peña, A., y Aragón-García, A. 2014. Evaluación de dos extractos vegetales y el colorante phloxine-b, para la captura de la mosca del nogal de Castilla, en Puebla, México. *Ra Ximhai*, 10: 9-22.
- Tounou, A. K., Gbénonchi, M., Sadate, A., Komi, A., Dieudonné, G. Y. M., y Komla, S. 2011. Bioinsecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions. *Journal of Applied Biosciences*, 43: 2899-2914.
- TRIDENTE, 2018. Captor 300. Disponible en: https://www.tridente.com.mx/media/agrproducts/HdS_CAPTOR_300.pdf. [Consultada el 01 de septiembre de 2019].
- Utgés, M. E., Vilardi, J. C., Oropeza, A., Toledo, J., y Liedo, P. 2011. Pre-release diet effect on field survival and dispersal of *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 137:163–177.
- Urbaneja, A., Chueca, P., Montón, H., Pascual-Ruiz, S., Dembilio, O., Vanaclocha, P., Abad-Moyano, R., Pina, T., Castañera, P. 2009. Chemical alternatives to malathion for controlling *Ceratitis capitata*, (Diptera: Tephritidae) and their side effects on natural enemies in Spanish Citrus Orchards. *J. Journal of Economic Entomology*, 102: 144–151.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2015. Invasive Fruit Flies Impact You/Las plagas de moscas de la fruta lo afectan a usted. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/publications/plant_health/2015/bro_fruit_flies.pdf [Consulta: 03 de junio de 2019].
- Vanoye-Eligio, V., Pérez-Castañeda, R., Gaona-García, G., Lara-Villalón, M., y Barrientos Lozano, L. 2015. Fluctuación poblacional de *Anastrepha ludens* en la región de Santa Engracia, Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6:1078-1091.
- Vásquez-Morales, G. S., Flores-Estévez N., Sánchez-Velásquez, L. R., Pineda-López, M., Viveros-Viveros, H. y Díaz-Fleischer, F. 2015. Bioprospecting of botanical insecticides: The case of ethanol extracts of *Magnolia schiedeana* Schl. applied to a Tephritid, fruit fly *Anastrepha ludens* Loew.
- Vincent, J. F. V y Wegst, U. G. K. 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development*, 33:187–199.
- Weems H. V. Jr., J. B. Heppner, G. J. Steck, T. R. Fasulo, and J. L. Nation. 2001. Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Entomology Circular No. 16*. EENY-201. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. 5p.
- Wilson, W. M., Ibarra, J. E., Oropeza, A., Hernández, M. A., Toledo-Hernández, R. A., y Toledo, J. 2017. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults during emergence from soil treated with *Beauveria bassiana* under various texture, humidity, and temperature conditions. *Florida Entomologist*, 100: 503-508.
- Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. 1-17. En: Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews*. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374.
- Zhang, S., Xia, Y., y Keyhani, N. O., 2011. Contribution of the *gas1* gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, encoding a putative

glycosylphosphatidylinositol-anchored beta-1,3-glucanoyltransferase, to conidial thermotolerance and virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2676–2684.

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553–596.

X. Anexos

11.1 Preparación de los reactivos y curva estándar de la actividad quitinolítica

Para la actividad quitinolítica se modificó el método de Coudron y colaboradores (1984), en lugar de quitibiosa, se utilizó como sustrato *p*-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma Chemical Co) 1 mg/ml. Para el ensayo enzimático en tubos de ensayo se tomaron 50 μ l del extracto enzimático, se agregaron 150 μ l de agua destilada y 200 μ l de amortiguador de citrato-fosfato 0.2 M (pH 5.6) y 200 μ l de 1.0 mg ml⁻¹ del sustrato *p*-nitro-fenol-N-acetil- β -D-glucosamina. La reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C con una agitación de 180 rpm. Se detuvo la reacción al agregar 1 ml de NaOH 0.02 M. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un mmol de *p*-nitrofenol min⁻¹ (g de cutícula)⁻¹ ml⁻¹ del medio de cultivo bajo condiciones específicas a una D.O. de 400 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, el blanco contenía 200 ml de agua, 200 ml de amortiguador y 200 ml del sustrato. La curva estándar se obtuvo por diluciones de *p*-nitrofenol, se muestra en la Figura 31.

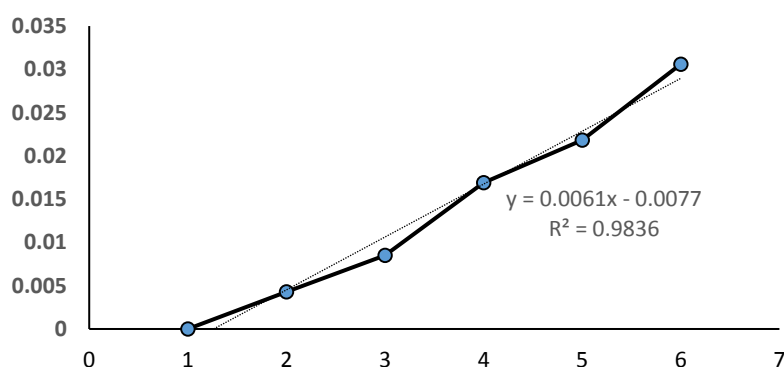


Figura 31. Curva estándar de *p*-nitrofenol

11.2 Preparación de los reactivos de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó por el método Azocoll (Chavira *et al.*, 1984). Por triplicado se pesó una cantidad de 10 mg de Azocoll por cada tubo de ensayo y fue suspendido en 1 ml de amortiguador glicina-NaOH 0.2 M (pH 8.5), se agregó 3.9 ml de agua destilada y 0.1 ml de extracto enzimático en un matraz Erlenmeyer de 25 ml. Además, se realizó un blanco que contenía Azocoll, amortiguador y agua. Las muestras se dejaron en una

incubadora orbital marca GALLENKAMP a 180 rpm a 37°C por 30 minutos, posteriormente se filtraron las muestras para detener la reacción. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/VIS Cary 50 a una longitud de onda de 520 nm. Una unidad enzimática (U.E.) se definió como el cambio de 0.1 unidades de absorbancia por min^{-1} ($\text{g de cutícula}^{-1}$) ml^{-1} del medio de cultivo y fue leído a una D.O. de 520 nm.

11.3 Preparación de reactivos y curva estándar de Lowry.

En seis tubos de ensaye se agregaron 0, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750 y 1 ml de solución final de albúmina, más 1, 0.875, 0.750, 0.500, 0.250 y 0 ml de agua destilada, más 1 ml de extractos de metabolitos y enzimas, más 3 ml de reactivo D*, se dejaron reposar las mezclas 10 minutos. Posteriormente se agregó 0.3 ml de indicador folin 1:1 y se dejó reposar de 35-36 minutos. Después se leyó en el espectro fotómetro UV/VIS marca Cary 50 a 540 nm.

*Para obtener el reactivo D, se mezclaron 50 ml del reactivo C, más 0.5 ml del reactivo A y 0.5 del reactivo B. Reactivo A: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua, reactivo B: Tartrato doble de sodio y potasio al 2% en agua, reactivo C: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N (4g de NaOH más 20 g Na_2CO_3 en 1,000ml de agua). La curva estándar se obtuvo a partir de la solución patrón (BSA), como se muestra en la Figura 32

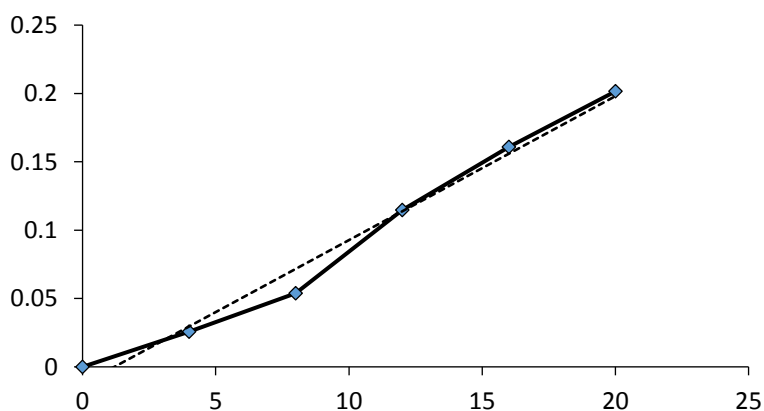


Figura 32. Curva estándar de *p*-nitrofenol

XI. PRODUCTOS DE TRABAJO

Cursos y Congresos

- Participación como integrante en el Comité Organizador Local del V Encuentro Nacional de Productores y Experimentadores en Producción Orgánica Alternativa



- Curso "Higiene y Bienestar animal" de Módulo Jean Monnet. Comisión Europea



- Reconocimiento de ponencia en el XLI Congreso Nacional de Control Biológico y XXIX Curso Nacional de Control Biológico



- Asistencia al 10th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, held at Tapachula, Chiapas



- Participación como miembro del Comité Organizador del 10th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, held at Tapachula, Chiapas, México



- Participación como evaluadora de Carteles en el Congreso de Investigación del Módulo Conocimiento y Sociedad



- Presentación del cartel en el V Encuentro Internacional sobre Biotecnología



V Encuentro Internacional sobre
Biotecnología en la UATx
2-5 de Diciembre de 2018, Tlaxcala, México.

Estimados autores,

Martínez Fiel Nelly, Pacheco, A. Y San Juan, N. Nava V. Flores, A. Ramírez, J. F.

Las comunicaciones que su trabajo titulado "EVALUACIÓN DE EXTRACTOS METABÓLICOS Y ETANÓLICOS DE *Rhinus communis* (Malpighiales: Euphorbiaceae) EN *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)" ha sido aceptado para presentarse en la modalidad de cartel de 18:00-19:00 h el día miércoles 5 de diciembre de 2018 en el Centro Cultural Universitario (CCU, campus rectoría, Avenida Universidad No. 1, Col. La Loma Xicoténcatl, Ciudad de Tlaxcala, Tlax., CP. 90070, México), de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. Favor de colocar su cartel en la mampara C9 el día miércoles 5 de diciembre a las 8:30 am. Los carteles serán de 120 cm de largo x 90 cm de ancho en PAPEL (80 gramos de peso), en formato libre, considerando todas las secciones que se indican en el resumen. Al menos uno de los autores deberá estar presente junto a su cartel en el horario indicado para la sesión, y deberá recibir su mensaje al finalizar la misma.

Agradecemos su valiosa participación, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE,
"Por la Cultura a la Justicia Social"
Tlaxcala, México, el 17 de noviembre de 2018.


Dra. Constanza Sánchez
Presidenta del Comité Organizador
IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx
Tlaxcala, México



- Estancia de Investigación en El Colegio de la Frontera Sur



Tapachula, Chis. a 22 de marzo de 2018

Nelly Martínez Fiel
Maestría en Ciencias Agropecuarias
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

Me es muy grato informarle que ha sido aceptada para realizar una estancia de investigación en nuestro laboratorio de moscas de la fruta, en El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Tapachula.

La investigación a realizar forma parte de su protocolo de tesis de maestría con el título "Estudio de la actividad insecticida de extractos metabólicos de ricino (*Rhinus communis* L.) y extractos crudos de *Broussonetia hassiana* en *Anastrepha ludens*, *in vitro* y en campo". En particular se abocará a la etapa dos de dicho protocolo en donde se hará la evaluación en laboratorio de los extractos obtenidos por usted en la primera etapa de su investigación. Consideramos que contamos con los recursos de infraestructura y material biológico para poder realizar esta fase experimental.

El periodo para esta estancia será el 9 de abril al 15 de junio de 2018.

Atentamente

Dra. Lidia Fernández
Investigador Titular C

EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR
Carretera Tapachula-Santiago Atitlán, S.S. Tapachula, Chiapas. 90730 México.
Tel: (992) 626 9600 Ext. 547 Fax: (992) 626 3608
Email: psc@ecosur.mx

- Constancia de conferencia “Hongos entomopatógenos y experiencias en la Maestría en Ciencias Agropecuarias de UAM-X”



ARTÍCULOS

11.1 Artículo de revisión en proceso de envío

BIOPLAGUICIDAS FÚNGICOS Y BOTÁNICOS EN EL MANEJO SOSTENIBLE DE PLAGAS EN LA AGRICULTURA MODERNA

Nelly Martínez-Fiel¹, Verónica Nava- Rodríguez², Antonio Flores-Macías², Juan Esteban Barranco-Flórido³

¹Maestría en Ciencias Agropecuarias. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán. C. P. 04960 Ciudad de México.

²Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán. C. P. 04960 Ciudad de México. ⁴Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán.

C. P. 04960 Ciudad de México. barranco@correo.xoc.uam.mx

Resumen

El uso en el manejo integrado de plagas de los hongos entomopatógenos y de las plantas es un método biorracional de fitoprotección que permite la sostenibilidad de los agroecosistemas, ya que los metabolitos de ambos organismos, pueden tener efectos insecticidas o pueden inhibir el desarrollo, comportamiento, fertilidad y fecundidad; y a su vez, los componentes de estos bioplaguicidas tienen baja residualidad en el ambiente. El conocimiento de las relaciones y procesos biológicos de los hongos y plantas con los insectos es fundamental, ya que se pueden aprovechar los metabolitos secundarios que producen naturalmente, para la creación de bioinsecticidas que sean amigables con el medio ambiente. Es necesario además seguir avanzando sobre los nuevos métodos avanzados de compartimentación y formulación para permitir un mejor control sobre la disponibilidad y la actividad de los bioplaguicidas. Para que el uso de los bioinsecticidas botánicos y fúngicos sea cada vez más frecuente por parte de los agricultores, es necesario tomar en cuenta la forma de producción más eficiente, la comercialización y la vida útil y de almacenamiento, la bioseguridad, el registro del producto desarrollado y la entrega de esta tecnología. Además el producto tiene que ser eficaz con la plaga y debe producirse masivamente a bajos costos para que pueda competir con los productos existentes y con ello obtener un beneficio aceptable de la inversión en investigación y desarrollo.

Introducción

Las plagas agrícolas representan una gran cantidad de tiempo, esfuerzo y gastos económicos para reducir su efecto, actualmente se estima que un 40% del suministro mundial de alimentos se pierde debido a éstas (FAO, 2008). La cantidad de pérdidas causadas por las plagas depende de factores como la especie cultivada, el clima, las condiciones edafológicas, la nutrición vegetal, la densidad de la población de la plaga o la baja incidencia de sus enemigos naturales (Grzywacz *et al.*, 2014). Una plaga agrícola se define como cualquier organismo que genere una disminución en la calidad o el rendimiento de un cultivo o cosecha en una cantidad tal que esté por encima del umbral económico (Pérez y Consuegra, 2004). Dicho umbral económico es el máximo nivel poblacional tolerable sin que la plaga ocasione daño económico y dentro del cual se debe aplicar un método de control para prevenir que la población creciente logre alcanzar el nivel de daño económico (Badii, 2007).

El control de plagas ha sido tan antiguo como el comienzo de la agricultura, pero no fue hasta la década del cuarenta del siglo XIX con el descubrimiento del DDT (p-diclorodifeniltricloroetano) y otros compuestos organoclorados, que empezó la producción de insecticidas sintéticos con un futuro

aparentemente prometedor; esto abrió la puerta a la búsqueda de nuevos compuestos de síntesis, como los organofosforados, los carbamatos y los piretroides (Pérez, 2013). En la actualidad los métodos de control más ampliamente utilizados siguen siendo los insecticidas sintéticos, los cuales han desempeñado un rol importante en el desarrollo de la agricultura, pero al mismo tiempo su uso frecuente ha generado en el ser humano efectos negativos en su salud (Stoytcheva, 2011). Según la estimación de la OMS, cada año se producen 3 millones de casos de intoxicación por plaguicidas, lo que ocasiona más de 250,000 muertes, principalmente debido a un mal manejo y aplicación o por intoxicación intencional (Stoytcheva, 2011). Además de los problemas a los seres humanos, los insecticidas sintéticos han generado resistencia de las plagas, contaminación del agua, suelo y aire, lo que transfiere residuos químicos a lo largo de la cadena alimentaria, reduciendo la biodiversidad, destruyendo vida marina y aves por desarrollar defectos genéticos contribuyentes en generaciones posteriores (Pavela 2016).

Debido a los efectos negativos de los insecticidas convencionales, se ha impulsado la búsqueda de diferentes estrategias para el control bajo un manejo integrado de plagas (MIP), sobre el cual se consideran varias estrategias como son: controles culturales, mecánicos, legales, biológicos, químicos, etc., de tal forma que se integran en la toma de decisiones y resultan compatibles con el medio ambiente, son económicamente viables y socialmente aceptadas (Shenk y Kogan, 2003).

En la actualidad se comercializan productos biorracionales como los bioinsecticidas de origen vegetal y fúngico) que presentan un perfil toxicológico diferente a los convencionales, lo cual los hace más aptos para programas de MIP (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2012).

Los insecticidas botánicos pueden proporcionar un control eficiente de las plagas debido al uso de los metabolitos secundarios (MS) que las plantas sintetizan como parte de su autodefensa (Miresmailli e Isman, 2014). Estos MS se pueden aislar utilizando diversos métodos de extracción, de esta forma los extractos de plantas se han convertido en sustancias activas de los denominados insecticidas botánicos (IBs) (Tiwari *et al.*, 2011). Se consideran IBs tradicionales aquellos que no se distribuyen comercialmente y que son elaborados por los productores de acuerdo a su conocimiento tradicional que ha sido transmitido de generación en generación y que por lo regular las plantas utilizadas son locales, en otro grupo se encuentran los productos fabricados comercialmente (Pavela, 2016). Los insecticidas botánicos pueden tener diferentes modos de acción actuando en el sistema nervioso, en la producción de energía, en el sistema endocrino, en el desarrollo del integumento o en el balance hídrico (Shivanandappa y Rajashekar, 2014).

Otra alternativa biorracional son los hongos entomopatógenos (HE), los cuales son agentes de control biológico ampliamente disponibles y dentro de los géneros más utilizados están *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Isaria* spp. y *Lecanicillium* spp. (Borges *et al.*, 2010). Estos hongos tienen mecanismos de acción únicos que les permiten atravesar la cutícula e infectar al insecto hospedero, por esa razón son usados como bioinsecticidas de contacto (Télez *et al.*, 2009). A través de la fermentación se han obtenido extractos que contienen los metabolitos y enzimas de los HE y se ha investigado que tienen efectos insecticidas e insectistáticos en plagas agrícolas (Marín-Cruz *et al.*, 2017).

En la actualidad el conocimiento empírico tradicional sobre el control de plagas resultó aparentemente desplazado por un conocimiento tecnológico, dando origen a la llamada agricultura moderna, ahora resulta fundamental que ambas prácticas sean llevadas a cabo bajo una conciencia agroecológica. Este documento presenta la importancia del uso de los bioinsecticidas fúngicos y botánicos en la agricultura moderna, así como de los avances y barreras en su producción para la aplicación en campo.

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos (HE) han sido ampliamente utilizados en la agricultura. Faria y Wraight (2007) reconocieron 110 productos comerciales, de los cuales el 40% son de *Beauveria bassiana* y el 39% de *Metarhizium anisopliae*. El resto de los productos fueron de *B. brongniartii*, *Isaria fumosorosea*, *I. farinosus*, *Lecanicillium longisporum* y *L. muscarium*. Los HE tienen la capacidad de infectar a diversas especies de insectos de los órdenes como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae y Embioptera (Holder y Keyhani, 2005; Zimmermann, 2007). Los HE se consideran que no son tóxicos en mamíferos, aves, plantas y son seguros para el medio ambiente y la salud humana (Ragavendran *et al.*, 2017).

El inicio de la interacción del HE y su hospedero sucede cuando los conidios entran en contacto con la cutícula del insecto, la cantidad de conidios adheridos es dependiente de la mortalidad resultante, por ello es vital que tantos conidios como sea posible se adhieran a la cutícula (Butt *et al.*, 2016). Una vez que los conidios se adhieren en la superficie cuticular, sucede la adsorción mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoprotéica, dentro de estos receptores están las hidrofobinas, que son determinadas por los genes *hyd1* y *hyd2* (Zhang *et al.*, 2011), posterior a la adherencia la espora germina (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2011) y después ocurre la penetración a través dos mecanismos combinados. El primer mecanismo es la acción mecánica a través del desarrollo y la formación del haustorio y la segunda es por la acción de enzimas hidrolíticas que se encargan de degradar los componentes de la cutícula, estas enzimas son conocidas como lipasas, proteasas, quitinasas, fosfolipasas C y catalasas (Butt *et al.*, 2016). Los lípidos que se encuentran en la cutícula, protegen al insecto de la pérdida de agua y de agentes dañinos, esos lípidos son hidrocarburos de cadena larga, ácidos grasos y ésteres de cera, las enzimas lipasas tienen la función de degradar estos compuestos (Ali *et al.*, 2014). Las proteínas de la cutícula, las degradan las proteasas y se basan en la serina proteasa de tipo subtilisina Pr1, y la proteasa de tripsina tipo Pr2 (Bagga *et al.* 2004; Dias *et al.*, 2008). Ya que la cutícula del insecto contiene también quitina la cual es un polímero, las enzimas quitinasas la degradan (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014).

Una vez superada la barrera estructural, los HE proliferan con la formación de hifas y blastosporas que llegan al tejido muscular, al sistema nervioso, a los ojos, al cerebro, a las glándulas salivales, a los palpos maxilares, al intestino, a los túbulos de Malpighi y a la hemolinfa (Ishii *et al.*, 2017). Para evitar la respuesta inmune del insecto, el HE produce metabolitos secundarios (MS) que actúan en la destrucción de tejidos internos, el agotamiento de nutrientes, causan parálisis y lentitud por acciones neuromusculares (Pinnamaneni y Potineni, 2010; Mascarín y Jaronski, 2016), así como cambios conductuales y de alimentación, pérdida de peso y de fecundidad (Zimmermann, 2007), inhiben el crecimiento de microorganismos competidores (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2016) o producen malformaciones (Marín-Cruz *et al.*, 2017). Una vez que el huésped muere, el hongo emerge del cadáver, produciendo conidios aéreos en la superficie, esto sucede cuando las condiciones ambientales, especialmente la humedad, se lo permiten. Los conidios aéreos pueden ser diseminados por el viento, las salpicaduras de lluvia y otros factores bióticos y abióticos (Mascarín y Jaronski, 2016).

En la actualidad el uso y la comercialización de los HE se lleva a cabo a través de conidios, sin embargo a través del conocimiento de su biología, se han seguido explorando nuevas formas de producción y aplicación en el campo. Recientes investigaciones se han enfocado en utilizar las sustancias que los HE secretan, tales como las enzimas y MS que están presentes en el proceso natural de patogénesis y que causan efectos insecticidas o insectistáticos (no se genera en un principio la muerte pero si

alteraciones de tipo físico o conductual en el insecto) (Lozano-Tovar *et al.*, 2013; Marín-Cruz *et al.*, 2017).

INSECTICIDAS BOTÁNICOS

Las plantas han desarrollado metabolitos secundarios (MS) que son usados como bioinsecticidas en la agricultura (Chandler *et al.*, 2011). Los MS de las plantas, son moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos; sin embargo, a la especie como tal le permite establecer una relación ecológica con su ambiente (Chacón y Esquinca, 2009). Su producción puede estar restringida a un género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. Las principales rutas de biosíntesis de MS derivan del metabolismo primario del carbono. Los insecticidas botánicos (IBs) pueden actuar como repelentes, agentes disuasorios o antialimentarios, tóxicos, retardantes del crecimiento y atrayentes (Rajashekar *et al.*, 2012). Los IBs pueden ser aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, glucósidos, ésteres y ácidos grasos.

Uno de los insecticidas botánicos más utilizados es la Nicotina, la cual es un alcaloide obtenido del follaje del tabaco (*Nicotiana tabacum*) y es un tóxico sináptico que imita al neurotransmisor acetilcolina y causa síntomas de envenenamiento similares a los observados con insecticidas organofosforados y carbamatos (El-Wakeil, 2013). La nicotina libre, penetra en el cuerpo del insecto, donde está mayormente ionizado y solo una fracción en la forma libre puede alcanzar el área objetivo en el sistema nervioso central, debido a la presencia de la barrera impermeable a los iones, la nicotina se ioniza de nuevo y la forma iónica interactúa con los receptores nicotínicos (Yamamoto, 1999). Las piretrinas son otro insecticida botánico, se obtienen a partir de la planta *Chrysanthemum cinerariifolium* e interrumpen el proceso de intercambio de iones sodio y potasio en las fibras nerviosas de los insectos, provocando la transmisión anormal de los impulsos nerviosos.

Además de efectos insecticidas, los MS pueden tener efectos antialimentarios y pueden ser encontrados en los terpenoides (Isman, 2002). Ejemplos de plantas con este efecto son: *Melia azedarach* (Carpinella *et al.*, 2003), *Thymus vulgaris*, *Vernonia species*, *Polygonum hydropiper*, *Pinus spp.*, *Ajuga remota*, *Azadirachta indica*, *Digitalis purpurea*, *Withania somnifera*, *Allium porrum*, *Strychnos nuxvomica*, *Lycopersicon esculentum*, *Pastinaca sativa*, *Podohyllum peltatum*, *Gaultheria procumbens* (Isman, 2002). Otro ejemplo puede ser la actividad repelente, que se presenta en plantas que tienen compuestos con mal olor o efectos irritantes, lo que provoca que los insectos se alejen de ellos (Peterson y Coats, 2001). Los aceites esenciales pueden tener este efecto debido a que son mezclas volátiles de hidrocarburos con una diversidad de grupos funcionales, y su actividad repelente se ha relacionado con la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos, entre los géneros de plantas más utilizadas con este fin están *Cymbopogon spp.*, *Ocimum spp.* y *Eucalyptus spp.*, los compuestos individuales presentes en estas mezclas con alta actividad repelente incluyen a-pineno, limoneno, citronelol, citronelal, alcanfor y timo (Nerio *et al.*, 2010).

PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE EXTRACTOS BOTÁNICOS Y FÚNGICOS

Con los bioprocesos se han desarrollado nuevas formas de obtener enzimas, MS y esporas de los HE. La primer fase para la producción de los HE comienza con colocar el inóculo en un sustrato para fermentar con las condiciones adecuadas para el crecimiento. El HE suele ser aislado del suelo y bajo un proceso de selección, se obtiene el HE de interés. Con la fermentación, los HE pueden ser producidos en grandes cantidades. Las fermentaciones pueden ser de tipo sólida o líquida. En estado líquida la fermentación utiliza sustratos solubles, debido a que los sustratos se utilizan con rapidez y necesitan ser suplementados constantemente con nutrientes, esta técnica de fermentación es más

adecuada para bacterias que requieren de alto contenido de humedad (Ravichandran y Vimala, 2012). La fermentación en estado sólido (FS) se define como un proceso de fermentación en el que los microorganismos crecen en materiales sólidos sin la presencia de agua libre. Las ventajas de utilizar la FS son que existen bajas posibilidades de contaminación por bacterias y levaduras, facilita la dispersión del hongo, hay aprovechamiento uniforme del medio, se pueden reducir los costos de producción, la aireación se logra fácilmente, además los rendimientos son confiables y reproducibles (Wang y Yang, 2007; Renge *et al.*, 2012). Para la adopción de la FS se han utilizado diferentes sustratos utilizando productos, subproductos o residuos agroindustriales, particularmente aquellos que no poseen un valor alimenticio significativo y de bajo costo, por ejemplo granos de cebada, trigo, maíz, sorgo, salvado de trigo y de arroz (Gortari y Hours, 2016).

Al utilizar los sustratos anteriormente mencionados no se simula el ambiente natural del crecimiento del hongo, por lo que no se permite una expresión genética completa, lo que puede generar que con el paso del tiempo se pierda virulencia, por ello se han realizado investigaciones para el aislamiento y la obtención de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y quitinasas, así como MS de *B. bassiana* y *Verticillium lecanii* a través de la utilización de un medio de FS, en el cual se ha recurrido al caparazón de camarón (Rao *et al.*, 2006; Barranco-Florido *et al.*, 2009). El caparazón como componente activo de la FS incorpora quitina, Carbono, carbonato de calcio, proteínas, lípidos y pigmentos (Mohammed *et al.*, 2013), por lo que de ser un residuo industrial éste es aprovechado en la producción de HE. Con los sustratos convencionales la mayoría de los genes secundarios de los MS permanecen en silencio durante el cultivo en laboratorio en medios artificiales y requieren situaciones específicas que inducen su expresión, como las que proporciona un entorno más natural (Pedrini, 2017), por ello el caparazón de camarón le permite expresar los genes de virulencia que el hongo tiene en su proceso natural de patogénesis.

Así como con los HE, los IBs también han hecho uso de la biotecnología. Para la producción de los MS, el primer paso es la recolección del material vegetal a utilizar, pueden ser de plantas cultivadas *in situ* (selección de cultivos de plantas que producen un metabolito en particular), cultivos *in vitro* de células y tejidos, cultivos de células en suspensión (compuestos de agregados celulares indiferenciados con un diámetro de 40-200 μM) y cultivo de raíces transformadas (estas raíces transformadas pueden ser cortadas y cultivadas indefinidamente bajo condiciones estériles) (Chacón y Esquinca, 2009). Para incrementar la producción de MS, la primera estrategia es la selección y mejoramiento de la línea celular y la utilización de ingenierías genética y metabólica (Zabala *et al.*, 2009). Una vez que se tiene el material vegetal, se procede a escoger el solvente, tomando en cuenta principalmente su polaridad, los tipos y la cantidad de fitoquímicos que se pretenden obtener, la velocidad de extracción, la facilidad de manipulación posterior de los extractos y la toxicidad. Existen solventes polares y solventes no polares, el ejemplo clásico de un solvente polar es el agua, también los alcoholes de bajo peso molecular pertenecen a esta categoría. Los solventes no polares son sustancias químicas o una mezcla de las mismas, que son capaces de disolver sustancias no hidrosolubles, algunos disolventes de este tipo son: éter dietílico, cloroformo, benceno, tolueno, xileno, cetonas, hexano, ciclohexano y tetracloruro de carbono (Murov, 2016). Una vez que el material vegetal se coloca sobre el solvente durante un tiempo determinado, se utilizan diferentes métodos de extracción, entre estos métodos está el método Soxhlet, la maceración, la infusión y la percolación. El método de extracción elegido debe tomar en cuenta la duración, el disolvente, el pH del disolvente y el tamaño de partícula de los tejidos vegetales (Tiwari *et al.*, 2011).

APLICACIÓN DE EXTRACTOS BOTÁNICOS Y FUNGICOS EN PLAGAS AGRÍCOLAS

En insectos los extractos crudos de HE los han evaluado por ejemplo Resquín-Romero y colaboradores (2016), ellos evaluaron los extractos crudos de *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. en el segundo instar larval de *Spodoptera littoralis*, la aplicación fue a través del alimento. Los resultados mostraron que *M. brunneum* obtuvo la mayor mortalidad, con un 83.3% en 5.1 días, por otro lado *B. pseudobassiana* y *B. bassiana* también causaron mortalidad entre el 50% y el 66.7%. En otra investigación con *Spodoptera littoralis*, al evaluar los extractos crudos de *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp., los resultados mostraron que *M. anisopliae* tuvo una mortalidad entre el 82.5% al 100% y con *B. bassiana*, la mortalidad tuvo un rango del 20 a 35% (Quesada-Moraga *et al.*, 2006). Otra investigación que se destaca por que la obtención de los extractos crudos fue utilizando el caparazón de camarón Sánchez-Pérez y col. (2016), ocurrió inyectando en larvas de *Cyclocephala lunulata* extractos enzimáticos, conidios y combinados (extractos enzimáticos y conidios), los resultados mostraron 100% de mortalidad, así mismo se evaluaron por contacto en adultos del picudo del nopal (*Metamasius spinolae*), extractos enzimáticos, conidios y combinados (extractos enzimáticos y conidios), los resultados obtenidos fue una mortalidad del 29% con extractos enzimáticos, con conidios del 27% y con la combinación un 31%. En gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) se inyectaron los extractos crudos y se registró el 100% de mortalidad a los ocho días de aplicación (Chávez *et al.*, 2014). Marín-Cruz y col. (2017) aplicaron extractos crudos, enzimáticos, MS y conidios de *B. bassiana* en *Bradysia impatiens*, estos extractos fueron de la misma manera obtenidos a partir de un sustrato de caparazón de camarón. Las aplicaciones fueron sobre papel absorbente y en la dieta, los resultados mostraron que a los 20 días de evaluación, la mortalidad por MS fue del 47.5% y en adultos se obtuvo un 65% de malformaciones, esto sugiere que los MS tienen un efecto más prolongado con respecto a la mortalidad, pero al observar el porcentaje de malformaciones estas pueden representar una disminución de la población de la plaga en un periodo de tiempo determinado.

Otras aplicaciones de los extractos crudos en la agricultura han sido dirigidas no solo a insectos plaga sino a bacterias y hongos fitopatógenos, por ejemplo Reddy y colaboradores (2010), evaluaron los extractos crudos de acetato de etilo de *B. bassiana* bajo condiciones de laboratorio sobre diferentes hongos fitopatógenos, los resultados mostraron que *B. bassiana* tuvo poca actividad antifúngica en las especies: *Aspergillus niger* y no tuvo ningún efecto en *Alternaria tenuissima*, sin embargo hubo una buena respuesta de actividad antifúngica sobre *Alternaria solani*, *Glomerella cingulata*, *Rhizopus oryzae*, *Chrysosporium tropicum*, *Rhizoctonia solani*, *Myrethecium roridum* y *Fusarium oxysporum*. En otra investigación se evaluaron también los extractos crudos de *B. bassiana* en otros hongos fitopatógenos: *Alternaria tenuis*, *Fusarium avenaceum* y *F. graminearum*, sin mostrar diferencia significativa, sin embargo con los hongos: *Aspergillus paraziticus*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum* hubo diferencia significativa (Sahab, 2012). Además también se investigaron los extractos crudos de *B. bassiana* en los hongos fitopatógenos *Verticillium dahliae* y *Phytophthora* spp, obteniendo como resultado un 100% de inhibición en el crecimiento micelial de esos hongos fitopatógenos (Lozano-Tovar *et al.*, 2013). Esto nos indica que los HE tiene potencial para ser utilizados en campo para controlar hongos fitopatógenos, pero es necesario investigar sobre que especies es posible inducir el efecto de inhibición y esto dependerá del HE, el cultivo agrícola y el hongo fitopatógeno, ya que como se puede ver en las investigaciones realizadas, un mismo HE no puede inhibir cualquier especie.

Para el caso de bacterias se ha evaluado la beauvericina en: *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*, *Paenibacillus alvei*, *P. azotofixans*, *P. macquariensis*, *P. pulvifaciens*, *P. validus*, *Eubacterium bifforme*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. productus*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Clostridium perfringens* y en cada caso se observó actividad antibacteriana (Castlebury *et al.*, 1999). En otro estudio (Sahab, 2012), se evaluaron los extractos crudos de acetato de etilo de *B. bassiana*

en *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp., en todos los casos se reportó que hubo actividad antibacteriana, sin embargo la bacteria más susceptible fue *S. aureus*, mientras que la menos susceptible fue *B. subtilis*.

Para el caso de la aplicación de los extractos botánicos en los insectos, éstos han tenido efectos sobre el sistema nervioso, el sistema digestivo (Acheuk y Doumandji-Mitiche, 2013) y el sistema inmune (Zibae, 2011), además pueden bloquear la síntesis y liberación de hormonas de la muda de la glándula protorácica, lo que lleva a una ecdisis incompleta en insectos inmaduros y en insectos adultos conduce a la esterilidad (Isman, 2006); así mismo por con el uso de aceites esenciales de *Citrus aurantium*, *Eruca sativa*, *Zingiber officinale* y *Origanum majorana* contra *Rhyzopertha dominica* se han demostrado daños en el ADN debido a alteraciones en el sistema enzimático (acetilcolinesterasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa y fenol oxidasa), proteína total y concentración de ADN (Qari et al., 2017).

Debido a las relaciones naturales de las plantas con su entorno, diversas plantas han desarrollado los MS necesarios que pueden afectar a uno a muchos insectos, algunos ejemplos de investigaciones se muestran en el Cuadro 1., la correlación que tienen esas investigaciones es que el daño provocado por los MS a su hospedero depende de la parte de la planta de donde son obtenidos los MS, el método de extracción, el estadio del insecto, la dosis y forma de aplicación, así como de las condiciones medio ambientales en que son aplicados.

Cuadro 1. Investigaciones del efecto insecticida de plantas sobre insectos plaga o vectores

Planta	Insecto	Referencia
<i>Trachyspermum</i> sp.	<i>Aedes aegypti</i> ; <i>Culex quinquefasciatus</i>	Tripathi et al., 2000
<i>Lavandula hybrid</i> ; <i>Rosmarinus officinalis</i> ; <i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Acanthoscelides obtectus</i>	Papachristos et al., 2004
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Trips, mosca blanca	Pavela, 2016
<i>Ricinus communis</i>	<i>Anopheles subpictus</i> Grassi; <i>Culex tritaeniorhynchus</i> ; <i>Bactrocera zonata</i> ; <i>Hippobosca maculata</i> ; <i>Anopheles gambiae</i> ; <i>Rhagoletis zoqui</i> ; <i>Spodoptera frugiperda</i> ; <i>Plutella xylostella</i>	Zahir et al., 2009; Rampadarath y Puchooa, 2016; Zahir, et al., 2010; Wachira et al., 2014; Torija-Torres et al., 2014; Ramos-López et al., 2010 Tounou et al., 2011
<i>Artemisia herbaalba</i> ; <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; <i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Myzus persicae</i>	Billal et al., 2015
<i>Tamarindus indica</i> ; <i>Azadirachta indica</i> ; <i>Cucumis sativus</i> ; <i>Enhydra fluctuans</i> ; <i>Clerodendrum viscosum</i> ; <i>Andrographis peniculata</i> ; <i>Mantisalca duriaei</i> ; <i>Rhaponticum acaule</i>	<i>Tribolium castaneum</i> <i>Tribolium confusum</i>	Mostafa et al., 2012 Amin et al., 2012 Boussaada et al., 2008

<i>Daphne mucronata; Tagetes minuta; Calotropis procera; Boenninghausenia albiflora; Eucalyptus sideroxylon; Cinnamomum camphora; Isodon rugosus</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Khan <i>et al.</i> , 2017
<i>Piper sarmentosum</i>	<i>Sitophilus oryzae; Rhyzopertha dominica; Plodia interpunctella;</i>	Hematpoor <i>et al.</i> , 2017

BARRERAS DE LA COMERCIALIZACIÓN DE LOS BIOPLAGUICIDAS

Los bioinsecticidas fúngicos y botánicos muestran una variedad de aspectos positivos, principalmente en la seguridad ambiental, debido a que las sustancias activas son MS que son degradados fácil y rápidamente por mecanismos naturales como la temperatura, la luz y la accesibilidad al oxígeno atmosférico (Turek y Stintzing, 2013). Otro aspecto positivo es que generalmente contienen mezclas de sustancias activas de acción sinérgica, que en el caso de las plantas la combinación de MS y en el caso de los HE con los extractos crudos de la fermentación son los diversos depsipéptidos que exhiben diversos mecanismos de acción, lo que disminuye las posibilidades de generar resistencia de las plagas (Pavela, 2016). La acción sinérgica es fundamental, ya que de solo existir un componente, puede ocasionar más fácilmente la resistencia de la plaga, como lo demostró Feng e Isman (1995), al experimentar con dos líneas de la plaga *Myzus persicae* tratadas con azadirachtin (aza) puro y un extracto de semilla de neem (NSE), que después de 40 generaciones la línea aza-seleccionada había desarrollado una resistencia nueve veces mayor, mientras que la línea seleccionada por NSE no lo hizo, lo que indica que una mezcla de componentes activos en un insecticida botánico (NSE), reduce el desarrollo de resistencia en comparación con lo esperado con un solo ingrediente activo (aza puro). La resistencia de los HE también ha sido evaluada, por ejemplo en *Galleria mellonella* se evaluó bajo presión selectiva el HE *B. bassiana*, las larvas de la 25ª generación mostraron resistencia, esos resultados nos indican la importancia de incorporar los bioinsecticidas a los programas de manejo integrado de plagas, ya que estos pueden contribuir mitigando o retrasando el desarrollo de resistencia en las poblaciones de plagas (Khater, 2012).

A pesar de las ventajas que tienen los bioinsecticidas, las barreras principales para su comercialización exitosa están en:

Material vegetal e inóculo. Es necesario tomar en cuenta que las plantas con potencial para ser utilizadas en la agricultura por sus propiedades insecticidas deben poder ser cultivadas de forma convencional o *in vitro* de tal manera que puedan proporcionar una cantidad suficiente de material de alta calidad adecuado para el aislamiento de sustancias activas. En la actualidad se fabrican solo a partir de unas pocas especies de plantas que proporcionan rendimientos suficientemente altos. Por ello la investigación de nuevos componentes de plantas, especialmente las que se encuentran en las áreas agrícolas *in situ* pueden ser aprovechadas para contribuir al equilibrio y sostenibilidad del agroecosistema, lo mismo sucede con los HE, ya que la virulencia y efectividad de un HE está dada por la relación dentro del ecosistema en el que se encuentra el HE y su hospedero. Se debe considerar la cantidad del inoculante, la calidad y la capacidad de reducir el tiempo para alcanzar la producción máxima de conidios (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017), en el caso de utilizar extractos crudos, se debe considerar que al no ser las estructuras vivas del HE (conidios), no se pueden reproducir en campo, por ello es necesario tomar en cuenta contar con la cantidad suficiente de extractos crudos previos al ciclo de cultivo.

Regulación. Un problema al que se enfrentan tanto los potenciales como los actuales productores de bioinsecticidas es el proceso de registro de los productos desarrollados, el cual es costoso y prolongado (Grzywacz *et al.* 2014). El registro de un producto es un proceso oficial mediante el cual se examinan los bioinsecticidas para determinar su toxicidad y riesgos para el humano y otros mamíferos (cáncer, efectos teratogénicos y mutagénicos) y sus posibles efectos ambientales, teniendo en cuenta sus propiedades físico-químicas (estado físico, color, olor, pH), información toxicológica-toxicidad oral y dérmica aguda DL₅₀, irritación primaria en ojos y piel (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2012). Los países en desarrollo tienen poca capacidad de personal e infraestructura para realizar pruebas múltiples de bioinsecticidas y suelen adoptar criterios normativos utilizados en otros países como el de la Agencia de Protección del Ambiente (EPA), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD), el Departamento de Agricultura de los E.U.A (USDA) y la Unión Europea y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Toriello y Mier 2007), todos los procesos lentos y costosos ha llevado a que los bioinsecticidas solo sean utilizados en cultivos de mercados especializados como la producción orgánica certificada. Además en muchas jurisdicciones, no se hace distinción entre plaguicidas sintéticos y bioplaguicidas, por lo que el tiempo para que los bioplaguicidas lleguen al mercado se prolonga, considerando que la mayoría de los componentes se caracterizan por una baja toxicidad para los mamíferos, efectos reducidos sobre los organismos no dirigidos y una persistencia ambiental mínima (El-Wakeil, 2013).

La calidad. La calidad de los bioplaguicidas debe mejorarse para garantizar su efecto y tiempo de acción, así como la estabilidad; por ejemplo, la composición de los aceites esenciales de las plantas está influenciada, por la estación, la geografía, el tiempo de cosecha, el quimiotipo de las especies y los métodos de extracción; además se sabe que una vez que los MS han sido removidos resultado de métodos de extracción, sus constituyentes son propensos a daños oxidativos, transformaciones químicas o reacciones de polimerización y con el paso del tiempo, pueden perder algunos de sus atributos, como el olor, el sabor, el color y la consistencia (Miresmailli e Isman, 2014). En el caso de los HE, al utilizar su forma convencional de aplicación (conidios), se requieren condiciones específicas de temperatura, humedad y duración de la luz solar, durante su aplicación en campo, sino los conidios mueren y su eficacia se reduce significativamente (Khan *et al.*, 2012). En un esfuerzo por aumentar la eficacia biológica y calidad de los bioplaguicidas, se ha utilizado la nanotecnología, la cual busca el desarrollo de una formulación nanoencapsulada de propiedades de liberación lenta con mayor solubilidad, permeabilidad y estabilidad, sin embargo la falta de conocimiento del mecanismo de síntesis y la falta de un análisis de costo-beneficio de los materiales de nanoencapsulación han dificultado su aplicación, además de que se necesita mayor investigación del comportamiento de dichos materiales y su destino final en el medio ambiente, lo que ayudará al establecimiento de un marco regulatorio para su comercialización (Nuruzzaman *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

Los extractos crudos obtenidos por fermentación sólida, muestran un gran potencial para el manejo agroecológico de plagas y enfermedades, así mismo es importante seguir desarrollando investigación para la producción en grandes cantidades, tomando en cuenta aspectos como una adecuada vida útil y de almacenamiento, tecnología aplicativa eficiente, con bioseguridad y registro del producto desarrollado, así mismo es requerida su evaluación en campo en diferentes plagas, cultivos y condiciones ambientales.

Las aplicaciones de extractos fúngicos y botánicos se han reportado en diversos insectos plaga, por sus diferentes efectos como insecticidas, inhibidores del crecimiento y antialimentarios, el uso de

estos bioinsecticidas permite a la mezcla sinérgica de los componentes de los extractos, reducir el desarrollo de resistencia o de desensibilización.

Así mismo la investigación es necesaria para seguir incursionando en los métodos de extracción económicamente viables y que permitan tener un mejor control de los componentes, así como en conocer los componentes y su modo de acción.

Para que los bioinsecticidas puedan ser comercializados competitivamente y exitosamente a gran escala en el futuro se requiere de organizar las fuentes naturales de suministro, desarrollar controles de calidad, adoptar estrategias de estandarización y modificar las restricciones regulatorias.

Finalmente todos los que componen la cadena agroalimentaria deben adquirir confianza en los bioinsecticidas que en un principio pueden no producir un efecto inmediato, sin embargo tiene ventajas que los hacen a futuro controles esenciales en el manejo integrado de plagas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acheuk, F. y Doumandji-Mitiche, B. 2013. Insecticidal activity of alkaloids extract of *Pergularia tomentosa* (Asclepiadaceae) against fifth instar larvae of *Locusta migratoria cinerascens* (Fabricius 1781) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*. 3: 8-13
- Ali, S., Ren, S., y Huang Z. 2014. Extracellular lipase of an entomopathogenic fungus effecting larvae of a scale insect. *Journal of Basic Microbiology*. 54: 1148–1159
- Amin, R., Mondol, R., Rahman, F., Alam, J., Habib, R., Hossain T. 2012. Evaluation of insecticidal activity of three plant extracts against adult *Tribolium castaneum* (Herbst). *Biologija*, 58: 37–41
- Badii, M., Landeros, J., y Cerda, E. 2007. Manejo Sustentable de Plagas o Manejo Integral de Plagas: Un apoyo al desarrollo sustentable. *Cultura Científica y Tecnológica*, 23: 13-30
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S. E., y St. Leger, R. J. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324: 159–169
- Barranco-Flrido, J. E., Bustamante-Camilo, P., Mayorga-Reyes, L., Martínez-Cruz, P. y Azaola, M. A. 2009. β -N Acetylglucosaminidase Production by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* ATCC 26854 by Solid-State Fermentation Utilizing Shrimp Shell. *Interciencia*, 34: 356-360
- Billal, NIA., Naama, Frah. y Imane, Azoui. 2015. Insecticidal activity of three plants extracts against *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) and their phytochemical screening. *Acta agriculturae Slovenica*, 105: 261– 267
- Borges, D., Díaz, O., San-Juan, N. y Gómez, E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de Azúcar Cuba*, 44: 49-55
- Boussaada, O., Kame, M. B. H., Ammar, S., Haouas, D., Mighri, Z., Helal A. N. 2008. Insecticidal activity of some Asteraceae plant extracts against *Tribolium confusum*. *Bulletin of Insectology*, 61: 283-289
- Butt, T., Coates, J., Dubovskiy, I. y Ratcliffe, N. 2016. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *Advances in Genetics*, 94: 307-364
- Carpinella, M.C., Defago, M.T., Valladares, G. y Palacios S. M. 2003. Antifeedant and insecticide properties of a limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 369–374

- Castlebury, L. A., Sutherland, J. B., Tanner, L. A., Henderson, A. L. and Cerniglia, C. E. 1999. Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15: 131–133
- Chacón, C. y Esquinca, G. 2009. Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Lacandonia*, 3: 59-66
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., y Grant, W. P. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366: 1987–1998
- Chávez, I. E.; Rodríguez, N. S.; Sánchez, P. L. de C.; Hamdan, P. A. y Barranco, F. J. E. 2014. Actividad insecticida *in vitro* de extracto crudo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre larvas de *Phyllophaga* spp. (Harris). *Revista de Protección Vegetal* 29: 226-230
- Dias, B., Neves, P., Furlaneto-Maia, L., y Furlaneto, M. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 301-306
- El-Wakeil, N. 2013. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. *Gesunde Pflanzen*, 65 :125–149
- FAO (2008). El cambio climático, las plagas y las enfermedades transfronterizas. [Online]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0142s/i0142S06.pdf>
- Faria, M. y Wraight, S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237–256
- Feng, R. e Isman. M. B. 1995. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Experientia*, 51: 831–833
- García-Gutiérrez, C. y González-Maldonado, M. 2012. Uso de biorracionales para el control de plagas de hortalizas en el norte de Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8: 31-45
- Gortari, M. C. y Hours, R. A. 2016. *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876: producción de conidias en cultivos sobre sustratos sólidos y evaluación de su actividad sobre *Nacobbus aberrans* en plantas de tomate. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 115: 239-249
- Grzywacz, D., Stevenson, C., Mushobozi, L., Belmain, S., Wilson, K. 2014. The use of indigenous ecological resources for pest control in Africa. *Food Security*, 6: 71–86
- Hematpoor, A., Liew, S. Y., Azirun, M. S., y Awang, K. 2017. Insecticidal activity and the mechanism of action of three phenylpropanoids isolated from the roots of *Piper sarmentosum* Roxb. *Scientific reports*, 7: 12576
- Holder, D. y Keyhani, N. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 5260–5266
- Ishii, M., Kanuka, H., Badolo, A., Sagnon, N., Guelbeogo, W. M., Koike, M y Aiuchi, D. 2017. Proboscis infection route of *Beauveria bassiana* triggers early death of Anopheles mosquito. *Scientific Reports*, 7: 1-10
- Isman, M. 2002. Insect antifeedants. *Pesticide Outlook*, 13: 152-157
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51:45–66
- Khan, S., Taning, N. T. C., Bonneure, E., Mangelinckx, S., Smagghe, G., y Shah, M. M. 2017. Insecticidal activity of plant-derived extracts against different economically important pest insects. *Phytoparasitica*, 45: 113–124

- Khan, S., Guo, L., Maimaiti, Y., Mijit, M., Qiu, D. 2012. Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent. *Molecular Plant Breeding*, 3: 63-79
- Khater, H. F. 2012. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. *Pharmacology*, 3: 641-655
- Lozano-Tovar, M.D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Trapero-Casas, 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., Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Florida, J., y 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: 329-340
- Mascarin, M. y Jaronski, T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 177-202
- Miresmailli, S. e Isman, M. 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in plant science*. 19: 29-35
- Mohammed, M. H., Williams, P. A. y Tverezovskaya, O. 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids*, 31: 166-171
- Mostafa, M., Hossain, H., Hossain, M. A., Biswas, P. K. y Haque, M. Z. 2012. Insecticidal activity of plant extracts against *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3:80-84
- Muñiz-Paredes, F., Hernández, M., y Loera, O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33: 57-66
- Murov S. 2016. Properties of Organic Solvents. Disponible en: <http://murov.info/orgsolvents.htm> [Consulta: 05 de febrero de 2019].
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., y Stashenko, E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101: 372-378
- Nuruzzaman, M., Rahman, M. M., Liu, Y. y Naidu, R. 2016. Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64:1447-1483
- Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N.O. 2016. Chapter Six - Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects, Ed: Brian Lovett, Raymond J. St. Leger, en: *Advances in Genetics, Academic Press*, 94:165-249
- Papachristos, D. P., Karamanoli, K., Stamopoulos, D. C., y Menkissoglu-Spiroudi, U. 2004. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus*. *Pest Management Science*, 60: 514-520
- Pavela, R. 2016. History, Presence and Perspective of Using Plant Extracts as Commercial Botanical Insecticides and Farm Products for Protection against Insects - a Review. *Plant Protection Science*, 4: 229-241
- Pedrini, N. 2017. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. *Fungal Biology*, 122: 538-545
- Pérez, E., Ruiz, M., Schneider, M., Autino, C., Romanelli, G. 2013. La química verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas agrícolas. *Ciencia en Desarrollo*, 4: 83-91
- Pérez, N y Consuegra, N. 2004. Manejo ecológico de plagas. La Habana, Cuba: Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural CEDAR. 296.
- Peterson, C.Y. y Coats, J. 2001. Insect repellents. Past, present and future. *Pesticide Outlook*, 12: 154-158

- Pinnamaneni, R. y Potineni, K. 2010. Mechanisms involved in the entomopathogenesis of *Beauveria bassiana*. *Asian Journal of Environmental Science*, 5: 65-74
- Qari, S. H., Nilly, A. H., Abdel-Fattah, A. H., y Shehawy, A. A. 2017. Assessment of DNA damage and biochemical responses in *Rhyzopertha dominica* exposed to some plant volatile oils. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 12: 87–96
- Quesada-Moraga, E., Carrasco-Díaz, A., Santiago-Álvarez, C., 2006. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 130: 442–452
- Ragavendran, C., Dubey, N. y Natarajan, D. 2017. *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *The Royal Society of Chemistry Advances*, 7: 3838–3851
- Rajashekar, Y., Bakthavatsalam, N., y Shivanandappa, T. 2012. Botanicals as grain protectants. *Psyche*, 2012: 1–13
- Ramos-López, M. A., Pérez, G. S., Rodríguez-Hernández, C., Guevara-Fefer, P., y Zavala-Sánchez, M. A. 2010. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *African Journal of Biotechnology*, 9: 1359-1365
- Rampadarath, S. y Puchooa, D. 2016. *In vitro* antimicrobial and larvicidal properties of wild *Ricinus communis* L. in Mauritius. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6: 100–107
- Rao, Y. K., Lu, S. Liu, B. y Tzenget, Y. 2006. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochemical Engineering Journal*, 28: 57–66
- Ravichandran, S. y Vimala, R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3: 480 486
- Reddy, P. N. Kumar, D. Pathan, A. y Bobbarala, V. 2010. Antifungal Efficacy of Secondary Metabolites from Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana*. *Journal of Pharmacy Research*, 3: 854 – 856
- Renge, V. C., Khedkar, S. V. and Nandurkar, N. R. 2012. Enzyme Synthesis by Fermentation Method: A Review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2: 585-590
- Resquín-Romero, G. Garrido-Jurado, I. y Quesada-Moraga, E. 2016. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 92: 101-110
- Ruiz-Sánchez, E., Chan-Cupul, W., Pérez-Gutiérrez, A., Cristóbal-Alejo, J., Uch-Vazquez, B., Tun-Suárez, J., Munguía-Rosales, R. 2011. Crecimiento, esporulación y germinación *in vitro* de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. *Revista mexicana de micología*, 33: 9-15
- Sahab, A. F. 2012. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Sciences Research*, 8: 1441–1444
- Sánchez-Pérez, L., Barranco-Florido, J., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J., y Ramos-López, M. 2014. Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, 2: 65-76
- Sánchez-Pérez, L., Rodríguez-Navarro, S., Marín-Cruz, V. H., Ramos-López, M. A., Palma, R. A. y 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

- Shenk, M y Kogan, M. 2003. Rol de los insecticidas en el manejo integrado de plagas, en: *Bases para el manejo racional de insecticidas*, Fundación para la Innovación Agraria, Chillán: 31-49
- Shivanandappa, T. y Rajashekar Y. 2014. Mode of Action of Plant-Derived Natural Insecticides, en: *Singh D. (eds) Advances in Plant Biopesticides*. Springer, New Delhi, 323-345
- Stoytcheva, M. 2011. Pesticides in the modern world – effects of pesticide exposure. InTech, Rijeka, Croatia.
- Téllez, A., Cruz, G., Mercado, A. y Asaff, A. 2009. Mecanismos de Acción y Respuesta en la Relación de Hongos Entomopatógenos e Insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30: 73-80
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G y Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1: 98-106
- Toriello, C. y Mier, T. 2007. Bioseguridad de Agentes de Control Biológico. Capítulo 12, pp. 179-187, en: *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México, 303
- Torija-Torres, A., Huerta-De la Peña, A., y Aragón-García, A. 2014. Evaluación de dos extractos vegetales y el colorante phloxine-b, para la captura de la mosca del nogal de Castilla, en Puebla, México. *Ra Ximhai*, 10: 9-22
- Tounou, A. K., Gbénonchi, M., Sadate, A., Komi, A., Dieudonné, G. Y. M., y Komla, S. 2011. Bioinsecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions. *Journal of Applied Biosciences*, 43: 2899-2914
- Tripathi, A. K., Prajapati, V., Aggarwal, K. K., Kumar, S., Kukreja, A. K., Dwivedi, S., y Singh, A. K. 2000. Effects of volatile oil constituents of *Mentha* species against stored grain pests, *Callosobrunchus maculatus* and *Tribolium castaneum*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22: 549–556
- Turek, C. y Stintzing, F. C., 2013. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 40–53
- Wachira, S. W., Omar, S., Jacob, J. W., Wahome, M., Alborn, H. T., Spring, D. R., Masiga, K. D. Torto, B. 2014. Toxicity of six plant extracts and two pyridone alkaloids from *Ricinus communis* against the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors*, 7: 312-319
- Wang, L. y Yang, S. 2007. Solid State Fermentation and Its Applications, en: *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, Elsevier, Amsterdam, 465-489
- Yamamoto I, Casida JE, eds. 1999. *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Tokyo: Springer-Verlag. 300.
- Zabala, M., Velásquez, M., Cardona, A., Flórez, J., y Vallejo, C. 2009. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62: 4881-4895.
- Zahir, A. A., Rahuman, A. A., Kamaraj, C., Bagavan, A., Elango, G., Sangaran, A. y Kumar, S. B. 2009. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. *Parasitology Research*, 105: 453-461
- Zahir, A.A., Rahuman, A.A., Bagavan, A., Santhoshkumar, T., Mohamed, R. R., Kamaraj, C., Rajakumar, G., Elango, G., Jayaseelan, C. y Marimuthu, S. 2010. Evaluation of botanical extracts against *Haemaphysalis bispinosa* Neumann and *Hippobosca maculata* Leach. *Parasitology Research*, 107: 585-592
- Zhang, S., Xia, Y., y Keyhani, N. O., 2011. Contribution of the *gas1* gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, encoding a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored beta-1,3-glucanosyltransferase, to conidial thermotolerance and virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2676– 2684
- Zibae A. 2011. Botanical insecticides and their effects on insect biochemistry and immunity, pesticides in the world. In: Stoytcheva M.(Ed), *Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. InTech, Croatia, pp.55-68
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553–596

11.2 Artículo científico en proceso de envío

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE *Ricinus communis* EN ADULTOS ESTÉRILES DE CRÍA MASIVA DE *Anastrepha ludens* Loew (Díptera: Tephritidae) *IN VITRO* Y EN CAMPO

Martínez-Fiel, N^a., Nava-Rodríguez, V^a., Flores-Macías, A^a., Liedo-Fernández, P^b., Oropeza-Cabrera, A^b., Toledo-Arreola, J^b., Barranco-Florida J^a

^aDivisión de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco, Ciudad de México, México. ^bDepartamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente, El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México

RESUMEN

La mortalidad causada por los extractos metanólicos y etanólicos de las semillas de *Ricinus communis* fue evaluada en adultos de cría masiva de *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) bajo condiciones de laboratorio y de campo. En el experimento *in vitro*, se evaluaron los extractos metanólicos y etanólicos en tres concentraciones: 300, 600 y 900 ppm. En el experimento en campo se probaron en trampas Multilure los extractos metanólicos de ricino en 6 hectáreas de mango Ataulfo, en Tapachula, Chiapas y se evaluó el número de moscas capturadas (NMC). Los resultados del experimento *in vitro* mostraron que el 100% de mortalidad se presentó en los extractos metanólicos a 900 ppm a los 7 días de evaluación y se encontró que la CL₅₀ fue de 264 ppm, así mismo con los extractos etanólicos se alcanzó el 100% de mortalidad con un periodo más prolongado, hasta los 10 días de evaluación, siendo la CL₅₀ de 279 ppm. El porcentaje de mortalidad disminuyó en la concentración de 600 ppm con 92.5% y con los extractos etanólicos fue de 87.5%, con la dosis de 300 ppm la mortalidad para los extractos metanólicos y etanólicos fue de 72.5% en ambos casos. Los resultados del experimento en campo del NMC mostraron que, de acuerdo a la diferencia de medias, el tratamiento de extractos metanólicos de ricino resultó ser el más efectivo. En este estudio se demostró que los extractos de semilla de *R. communis* obtenidos a partir de metanol y etanol contienen metabolitos secundarios que tienen el potencial para ser aplicados por ingestión en trampas en campo en el control de *A. ludens*, debido a sus propiedades insecticidas.

Palabras clave: *Extractos botánicos, moscas de la fruta, insecticida, metanol, etanol*

INTRODUCCIÓN

La mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew), es una de las plagas más importantes que limitan el desarrollo de la fruticultura en México, afecta principalmente a cítricos y mango, además es responsable de los daños directos en la calidad de las frutas y las pérdidas indirectas como resultado de las restricciones por las cuarentenas que muchos países imponen a la importación de fruta en las áreas infestadas (Aluja, 1994). El control de esta plaga se lleva a cabo a través de un manejo integrado que incluye la técnica del insecto estéril (Orozco-Dávila *et al.*, 2016), control biológico (Wilson *et al.*, 2017) y control químico (Gazit y Akiva, 2017). En el control químico se utiliza malatión, un insecticida organofosforado que ocasiona resistencia en las plagas, daña al medio ambiente, a la fauna silvestre y a la salud humana (Díaz-Fleischer *et al.*, 2017). Las estrategias de control pueden ser mejoradas para reducir el impacto ambiental, entre estas alternativas están los insecticidas botánicos, los cuales proporcionan un control eficaz de las plagas con los metabolitos secundarios que las plantas sintetizan como mecanismo de su autodefensa (Miresmailli e Isman, 2014). Entre las ventajas que ofrecen los insecticidas botánicos, son que al contener mezclas de sustancias con acción sinérgica se disminuyen las posibilidades de que las plagas generen resistencia a corto plazo (Pavela, 2016) y que los residuos se degraden de manera fácil y rápida por la interacción con factores como la temperatura, la luz, el oxígeno atmosférico y la degradación microbiana (Turek y Stintzing, 2013).

La planta de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo, está presente en zonas con disturbio antrópico o natural como bordes de caminos, asentamientos humanos y zonas riparias (Garcillán y Rebman, 2016). De las diferentes partes de la planta, las semillas han sido las más utilizadas, ya que de ellas se extrae el aceite de ricino, el cual tiene múltiples aplicaciones como combustible y biodiesel, como material polimérico, en jabones, ceras o grasas, adicionalmente el aceite de ricino ha sido usado para el control de insectos plaga en diferentes cultivos (Tounou *et al.*, 2011; Rampadarath y Puchooa, 2016). A pesar de que la planta de *R. communis* es bien conocida en la agricultura por sus propiedades insecticidas y de que tiene la ventaja que es de distribución mundial, los estudios en campo con esta planta para el control de moscas de la fruta son escasos (Torija-Torres *et al.*, 2014). Los efectos que *R. communis* causa sobre los insectos son de tipo tóxicos (Ramos-López *et al.*, 2010) o pueden afectar la oviposición y el desarrollo del insecto en alas y patas (Tounou *et al.*, 2011). De los extractos de semillas de higuierilla se han identificado los siguientes metabolitos: fenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides, terpenos y taninos (Alugah e Ibraheem, 2014; Aziz *et al.*, 2016). Sin embargo, uno de los metabolitos específicos a los que se le atribuyen las propiedades insecticidas es al alcaloide de la ricinina (Ramos-López *et al.*, 2010).

El objetivo de este estudio fue evaluar la mortalidad de las semillas de *Ricinus communis* en adultos de cría masiva de *Anastrepha ludens* en condiciones de laboratorio y en campo

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los frutos secos de la planta de ricino silvestre (*R. communis*) se recolectaron en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (19°16'58.21" N, 99°06'11.08" O). Las semillas fueron retiradas de su endocarpio, se almacenaron en un recipiente hermético y se mantuvieron a temperatura ambiente para su posterior uso.

Preparación de los extractos

100 gramos de semilla molida se mezclaron con 200 ml de metanol y etanol respectivamente en botellas de vidrio de 200 ml de capacidad y se dejaron durante 48 horas a temperatura ambiente en oscuridad total, el macerado se exprimió a través de malla de cielo y luego se filtró con papel de filtro Whatman No. 1 (Mandal, 2010). Los solventes fueron eliminados con un Rotavapor BUCHI® a una temperatura de 45°C durante 50 minutos (Ramos-López *et al.*, 2010), como producto final se obtuvo aceite, el cual se refrigeró a 4°C para su conservación (Rampadarath y Puchooa, 2016). El rendimiento de aceite obtenido de 100 g de semilla molida fue de 35 ml con metanol y con etanol fue de 32 ml.

Pruebas fitoquímicas en los extractos

Las pruebas fitoquímicas se realizaron en los extractos metanólicos y etanólicos de *R. communis*, para determinar la presencia de: alcaloides con la prueba de Dragondroff's, saponinas con la técnica de baño maría, fenoles con la técnica de cloruro férrico al 5% y terpenos con la técnica de cloroformo (Inayor e Ibraheem, 2014; More y Pandhure, 2014; Aziz *et al.*, 2016).

Material biológico

El material biológico es estado de pupa fue obtenido de las instalaciones de cría masiva de Moscafrut (SAGARPA-IICA) ubicada en Metapa de Domínguez, Chiapas, México. En la planta de cría masiva, los huevos eran de una colonia establecida de acuerdo a la metodología descrita por (Stevens, 1991) y Domínguez *et al.*, (2010), una vez que los huevos eclosionaron, las larvas se alimentaron de una dieta texturizada a base de almidones pregelatinizados y posteriormente las larvas pasaron a su estado de pupa durante 14 días (Rivera *et al.*, 2012). Las pupas fueron irradiadas con rayos gamma con una dosis de 80 Gy usando un irradiador JS 7400 con 60Co (Nordion International Inc., Peterborough, Ontario, Canada), a 25°C en condiciones de hipoxia, como se lleva a cabo regularmente en el programa de cría masiva. Las pupas de *A. ludens* (dos días antes de la emergencia a adultos) se colectaron para su posterior traslado. Durante el período de emergencia, los adultos fueron alimentados con 2 g de azúcar estándar y agua.

Ensayo de laboratorio

- Área de estudio. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) en Tapachula, Chiapas, México, en el Laboratorio de Biodemografía.
- Diseño experimental. La unidad experimental consistió en un recipiente plástico de 40x25x20 cm. Se realizaron 6 repeticiones de cada tratamiento con 20 adultos por cada

unidad experimental (10 hembras y 10 machos) seleccionados al azar de menos de 24 h después de la emergencia. Las condiciones ambientales de laboratorio durante el experimento fueron 26 ± 1 °C, con $70 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR) y un fotoperiodo de 12:12 h L:O. Se evaluaron tres concentraciones de los extractos de ricino a 300, 600 y 900 ppm y fueron colocados con 2 g de la dieta estándar de la mosca de cría masiva la cual es una mezcla de azúcar y levadura hidrolizada en una proporción de 3:1. Los tratamientos fueron puestos dentro de las unidades experimentales, con el fin de que las moscas se alimentaran de los tratamientos durante los 10 días de duración de evaluación. El control negativo solo contenía la dieta estándar y el control positivo consistía en 100 μ L de malatión por mL^{-1} de agua destilada mezclado con la dieta en las mismas condiciones. La mortalidad se evaluó contando el número de moscas muertas cada 12 horas.

- Análisis estadístico. La respuesta a la dosis de mortalidad de los extractos metanólicos y etanólicos a 900 ppm se sometió a un análisis de Probit para determinar las concentraciones letales que matan al 50% de los adultos tratados (CL_{50}). Los datos obtenidos de mortalidad de todos los tratamientos se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad (Shapiro-Wilk y Levene), debido a que no presentaron estos supuestos, se procedió a analizarlos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. El programa estadístico utilizado fue Minitab® versión 18.0.

Ensayo en campo

- Área de estudio. Huerta de mango Ataulfo de 6 ha del Señor Hilario Huerta ubicada en el Ejido el Manzano en Tapachula, Chiapas, México. El área de trabajo se ubica en las coordenadas: $14^{\circ}45'46.02''\text{N}$, $92^{\circ}17'02.84''\text{O}$, situado a 41 msnm. Esta área tiene un clima tropical con una precipitación promedio anual de 2450 mm y una temporada de lluvias desde finales de abril hasta noviembre, la temperatura promedio anual es de 26.2 °C, siendo abril y mayo los meses más calurosos (García, 2004). El clima prevaleciente en el momento de este estudio fue caluroso con lluvias.
- Diseño de estaciones cebo. Se utilizaron botellas de PET transparentes con una capacidad de 600 ml, en las que se realizaron dos aberturas en forma de ventana de 7 cm de largo y 4 de ancho en cada lado de la botella, a una altura de la botella de 1/4, respectivamente (SENASICA, 2012). La tapa fue perforada para introducir a manera de gancho 30 cm de alambre galvanizado
- Preparación de los tratamientos. Se utilizaron en total 36 estaciones cebo por cada tratamiento. Los tratamientos siguieron los componentes que recomienda el Manual de Control Químico de SENASICA (2012). El primer tratamiento fue de los extractos metanólicos: 60 ml agua + 42 ml de captor + 12 ml de propilenglicol + 3 ml de extracto de ricino y el segundo tratamiento fue el que convencionalmente se utiliza en campo con 60 ml agua + 42 ml de captor + 12 ml de propilenglicol + 3 ml malatión.
- Diseño experimental. Se utilizó un diseño experimental de cuadrado latino con tres factores de bloque, uno de sitio con tres niveles, otro de rotación con tres niveles y el de los tratamientos con tres niveles. Entre cada bloque había una distancia de 30 metros. En total había 9 parcelas (bloques) en las que los tratamientos fueron distribuidos. La variable que se evaluó durante 10 días fue la de Número de Moscas Capturadas (NMC), entre mayor

número de moscas capturadas menor efectividad del tratamiento. Se sabe que después del décimo día, la captura de moscas se reduce a casi cero (Utgés *et al.*, 2011).

- Colocación de estaciones cebo. Cada estación se colocó en un árbol de mango a una altura aproximada de 4 a 6 metros y a 2/3 de la copa del árbol, La orientación de las trampas se eligió al inicio del experimento, protegidas de la exposición al sol, con el propósito de mantener la misma orientación durante el desarrollo del trabajo y disminuir algún error experimental que esto pudiese causar. Las trampas se colocaron con una varilla extensora de aluminio con gancho de acero.
- Liberación de moscas adultas de cría masiva. Dos días previos a la liberación se estimó el número de pupas en base al peso y se colocaron 20 g de pupas en una bolsa de papel de 35x20x30 cm y se les colocó dentro una tira de papel que contenía azúcar (Hernández *et al.* 2007) para que las moscas que fueran emergiendo se alimentaran. Así mismo se realizaron tres controles de calidad pupal en celdillas, en bote y en campo con una bolsa de papel.

En total se realizaron tres liberaciones, con el fin de rotar los tratamientos y reducir el efecto de parcela. Se liberaron a las 6 a.m. en las 6 ha, un total de 75,000 moscas hembras (41%) y machos (59%) considerando un 80% de emergencia total. Por cada repetición (parcela) se liberaron aproximadamente 8,333 moscas. La liberación en cada parcela se realizó en cuatro putos formando un cuadrado. Cabe destacar que cada mosca liberada fue marcada en la cabeza con un marcador fluorescente color rosa, para poder identificarla posteriormente como parte del experimento.

Un día posterior a la liberación se colocó en un árbol de mango en el centro de cada parcela una trampa Multilure con 20 ml de Ceratrap® por cada repetición, en total fueron 9 trampas, para atraer las moscas que seguían vivas después de la exposición de las moscas a los tratamientos. La metodología seguida fue de liberación y recuperación de puntos centrales (Utgés *et al.*, 2011).

- Revisión de trampas Multilure con Ceratrap®. Las trampas fueron revisadas al día siguiente de su colocación y hasta los 10 días, para la recolección de las moscas capturadas. Después de cada revisión se realizó el recambio de las soluciones CeraTrap®. Los insectos recolectados se vaciaron en frascos con alcohol al 70 % para su transporte al laboratorio de Biodemografía.
- Análisis estadístico. Los datos del NMC no cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad por lo que se transformaron mediante la familia de transformación de Box-Cox y se graficaron, lo que permitió ver cual tratamiento es diferente respecto al NMC por la diferencia de medias.

RESULTADOS

Pruebas fitoquímicas

Los resultados obtenidos de las pruebas fitoquímicas revelaron que las semillas de *R. communis* contienen alcaloides, saponinas, fenoles y terpenos, tanto para los extractos obtenidos con metanol, así como con etanol.

Ensayo *In vitro*

Los resultados mostraron diferencia significativa entre las concentraciones ($P < 0.000001$) ($\alpha = 0.05$). El tiempo para alcanzar el 100% de mortalidad en los tratamientos fue a los 3 días con malatión, con extractos metanólicos a 900 ppm fue a los 7 días y con extractos etanólicos a 900 ppm fue hasta los 10 días de evaluación (Fig. 1). Cuando la dosis disminuye la mortalidad también es decir, para los extractos metanólicos y etanólicos a 600 ppm con extractos metanólicos la mortalidad fue de 92.5% y con los etanólicos fue de 87.5% a los 10 días de evaluación, con la dosis más baja de 300 ppm el porcentaje de mortalidad a los 10 días de evaluación fue de 72.5% para ambos extractos. Los resultados del análisis Probit para la CL_{50} de los extractos metanólicos fue de 264.474 ppm, y para los extractos etanólicos fue de 279.611 ppm.

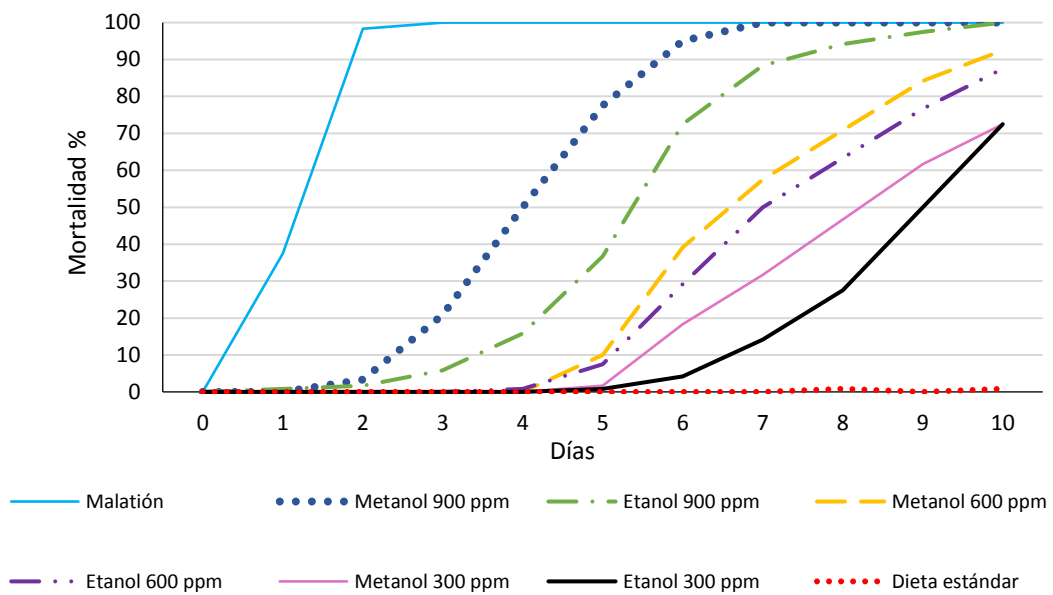


Figura 1. % de mortalidad de *A. ludens* con los diferentes tratamientos evaluados

Ensayo en campo

Como se puede ver en la Figura 2, el menor número de captura fue en el tratamiento de ricino, por lo que aparentemente este resultó ser más efectivo.

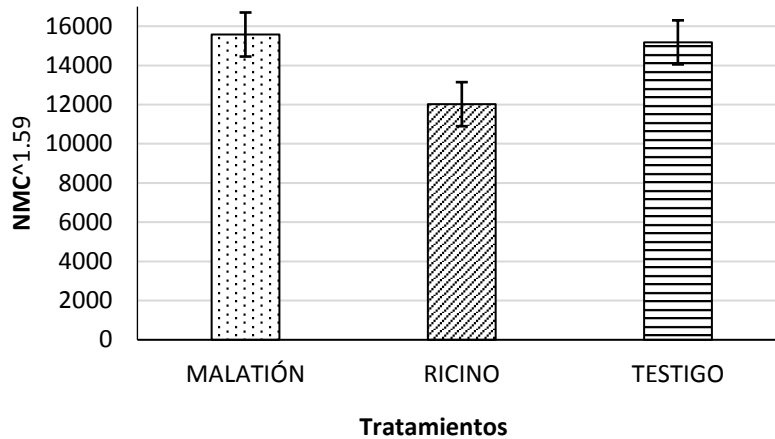


Figura 2. Número de moscas capturadas con transformación BoxCox

DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas fitoquímicas de esta investigación concuerdan con los resultados de More y Pandhure (2014), ya que ellos encontraron que los extractos metanólicos de las semillas de *R. communis*, contenían saponinas y flavonoides, esteroides, terpenoides, taninos, alcaloides Indol, carbohidratos y glucósidos; así mismo Inayor e Ibraheem (2014) encontraron en extractos de semillas fenoles y saponinas, utilizando un solvente de polaridad media el cual fue cloroformo. Por otro lado, Aziz y colaboradores encontraron con extractos de n-Hexano (solvente no polar): alcaloides, terpenoides, glucósidos cardíacos, taninos, esteroides y saponinas. Los metabolitos que se encontraron en los extractos metanólicos y etanólicos en esta investigación y los que están reportados por dichos autores están asociados con efectos tóxicos, repelentes, de inapetencia o evitan la oviposición (Nava-Pérez *et al.*, 2012), lo que sugiere que estos metabolitos en conjunto o de forma individual actúan en el insecto objetivo causándole su muerte (Hussein *et al.*, 2016). La toxicidad que tiene la planta de *R. communis* se atribuye a la presencia de ricina, que es una glicoproteína concentrada en el endospermo de la semilla, y se sabe que es uno de los compuestos naturales más venenosos (El-Nikhely *et al.*, 2007).

El tiempo para alcanzar la mortalidad depende principalmente de la forma de aplicación, la plaga objetivo y la dosis empleada, como se puede observar en los diferentes estudios empleando semillas de *R. communis*, por ejemplo con larvas de la mosca del melocotón *Bactrocera zonata* (Díptera), al evaluar la actividad insecticida de extractos metanólicos de pericarpio inmaduro de semilla, un 100% de mortalidad se alcanzó a las 72 h de la aplicación (Rampadarath y Puchooa, 2016), en otro estudio el período de tiempo para alcanzar el 100% de mortalidad con extractos metanólicos de semillas de *R. communis* fue hasta los 14 días en *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) (Hussein *et al.*, 2016). En vectores como *C. quinquefasciatus* (Díptera), *An. Stephensi* (Díptera) y *Ae. Albopictus* (Díptera) el tiempo de mortalidad para alcanzar el 100% fue antes de 24 h, en este método las larvas fueron

sumergidas en agua de estanque con el extracto (Mandal, 2010). Con larvas de la palomilla dorso de diamante, la aplicación tópica de aceite al 10% causó una mortalidad del 100% en 1.02 días y la aplicación por ingestión fue en 1.01 días. Al comparar las investigaciones previas podemos observar que el rango de tiempo de mortalidad en que los extractos actúan en un insecto varía de las 24 horas hasta a los 14 días.

Otro aspecto fundamental en la aplicación de un nuevo insecticida es la dosis requerida para controlar la población. Ramos-López y col. (2010), evaluaron la actividad insecticida de extractos metanólicos de semillas de *R. communis* en larvas de *S. frugiperda* (Coleoptera), sus resultados mostraron que en concentraciones entre 16,000 y 9,600 ppm se obtuvo un 0% de viabilidad larval. En contraste, los resultados de esta investigación, muestran que para alcanzar el 100% de mortalidad en adultos de *A. ludens* se requiere de una dosis menor (900 ppm). En una investigación con el mosquito *Aedes aegypti* (Parra *et al.*, 2007), se evaluaron los extractos de material vegetal seco de *R. communis*, la concentración letal media fue de 860 ppm, menor a la presentada en este trabajo.

Para el caso particular de *A. ludens*, la duración del período de tiempo hasta alcanzar la máxima mortalidad del tratamiento se debe considerar para el control en campo, ya que el control con estaciones cebo se debe llevar a cabo después de la emergencia pupal y hasta los 11 días aproximadamente, para evitar la reproducción de la mosca, ya que durante esos 11 días las moscas únicamente se alimentan y posterior a ese período, alcanzan la madurez sexual (Dickens *et al.*, 1982; Thomas, 2003).

Se sabe que la distribución de moscas de cría masiva liberadas no se ve afectada por el tratamiento de la dieta, el sexo o la reproducción, sino por las condiciones ambientales, como la cobertura de vegetación o la sombra. En la única investigación con extractos de ricino en una especie de mosca de la fruta de la familia Tephritidae (*Rhagoletis zoqui*) en huertos experimentales de nogal de Castilla (Torija-Torres *et al.*, 2014), evaluaron los extractos acuosos de *R. communis*, *Argemone mexicana* y el colorante Floxin-B y se compararon con el insecticida comercial Malation®, los resultados mostraron que el insecticida comercial tuvo el mayor índice de captura, y el segundo tratamiento más eficiente después del comercial fue el extracto de *R. communis*, esto difiere de lo encontrado en esta investigación al ser el extracto de ricino el más efectivo. Esto puede ser debido a que las moscas en especial los tefrítidos, utilizan el sentido del olfato, para localizar lugares esenciales como frutos hospederos específicos para su oviposición (Liu *et al.*, 2016), y el uso de cebos es utilizar sustancias con el objetivo de capturar las moscas que responden mediante receptores olfativos a compuestos volátiles, los extractos de plantas comúnmente contienen estos compuestos volátiles y mezclados con atrayentes como el Captor 300 que es proteína hidrolizada (aminoácidos derivados de la hidrólisis de proteínas vegetales), pudo ser más atrayente para la mosca. En el mercado hay otros tipo de atrayentes como el CeraTrap® que se sabe que captura más que captor 300 CeraTrap, sin embargo atrae más enemigos naturales (Lasa y Cruz, 2014). Adicionalmente en *Bactrocera* spp., otra especie de

mosca de la fruta, se ha demostrado que ricino es una planta no hospedera atractiva para machos y hembras (Quilici, 2014).

Algunas alternativas a los insecticidas convencionales que se han utilizado en campo, es por ejemplo el Spinosad el cual es un fermentado de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa* Mertz & Yao (Thompson *et al.* 2000), dentro de sus ventajas está que tiene baja toxicidad en mamíferos, sin embargo dentro de sus desventajas es que se ha observado que con aplicaciones recurrentes (>10 años), se han presentado problemas de resistencia (Kakani *et al.* 2010), y en algunos casos daño sobre enemigos naturales (Ruiz *et al.*, 2008) y polinizadores (Rendon *et al.*, 2000), además tiene baja persistencia del producto en el ambiente al degradarse por fotólisis (Thompson *et al.*, 2000) y por niveles altos de humedad (Revis *et al.*, 2004), así mismo tiene baja eficacia en el grado de saciedad de adultos que se han alimentado previamente de alguna fuente proteica o de carbohidratos (Mangan, 2009). Es por esta razón que el manejo integrado de plagas debe incluir diversas alternativas como los extractos botánicos y dentro de sus ventajas es que contienen mezclas de sustancias activas que exhiben diversos mecanismos de acción, lo que disminuye las posibilidades de generar resistencia de las plaga (Pavela, 2016).

CONCLUSIONES

En esta investigación se encontró que los extractos de *R. communis* contienen metabolitos como los alcaloides, saponinas, fenoles y terpenos. Al evaluar su efecto en adultos de cría masiva de *A. ludens*, los extractos metanólicos y etanólicos muestran un alto potencial insecticida para ser considerados como una alternativa en el manejo integrado de esta plaga.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Planta Moscafrut de SENASICA por el préstamo de material biológico de *Anastrepha ludens*. Al Colegio de la Frontera Sur campus Tapachula. Esta investigación fue respaldada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Nelly Martínez Fiel beneficiaria de beca de posgrado.

REFERENCIAS

- Alugah, C. I. y Ibraheem, O. 2014. Whole plant screenings for flavonoid and tannins contents in castor plant (*Ricinus communis* L.) and evaluation of their biological activities. *International Journal of Herbal Medicine*, 2:68-76.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology*, 39: 155–178.
- Alves, T., Murcia, A., Wanumen, A., Wanderley-Teixeira., V. Teixeira, A., Ortiz, A. y Medina, P. 2019. Composition and Toxicity of a Mixture of Essential Oils against Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 112:164–172.
- Aziz, S., Rabniwaz, A., y Ghani, K. S. 2016. Phytochemical and biological screening of *Ricinus communis* seed oil grown wild in Jammu & Kashmir *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5:89-92.

- Díaz-Fleischer, F., Pérez-Staples, D., Cabrera-Mireles, H., Montoya, H. y Liedo, P. 2017. Novel insecticides and bait stations for the control of *Anastrepha* fruit flies in mango orchards. *Journal of Pest Science*, 90:865–872.
- Dickens, J. C., Solís, E. y Hart, W. G. 1982. Sexual development and mating behavior of the mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew). *Southwestern Entomologist*, 7: 9-15.
- Domínguez, J., T. Artiaga-López, E. Solís, y E. Hernández. 2010. *Métodos de colonización y cría masiva*, pp. 259–276. In: P. Montoya, J. Toledo & E. Hernández [Eds.]. Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo. S y G. Editores. México D.F. 395 pp.
- El-Nikhely, N., Helmy, M. Saeed, H.M., Shama, L. A. A. y ElRahman, Z. A, 2007. Ricin a chain from *Ricinus sanguineus*: DNA sequence, structure and toxicity. *Protein Journal*, 26: 481-489.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Adaptado a las condiciones de la República Mexicana). Edit. Universidad Nacional Autónoma de México. 5a. Ed. México, D. F. 90.
- Garcillán, P. y Rebman, J. 2016. Nota sobre los primeros registros históricos de dos plantas invasoras en la península de Baja California: crónica del misionero jesuita Miguel del Barco. *Acta Botanica Mexicana*, 115:43-49.
- Gazit, Y. y Akiva, R. 2017. Toxicity of Malathion and Spinosad to *Bactrocera zonata* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 100:385-389.
- Hernández, E., Orozco, D., Flores, S., y Domínguez, J. 2007. Dispersal and longevity of wild and mass-reared *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 90: 123–135
- Hussein, H., Ubaid, J. y Hameed, I. 2016. Insecticidal activity of methanolic seeds extract of *Ricinus communis* on adult of *Callosobruchus maculatus* (Coleopteran: Brauchidae) and analysis of its phytochemical composition. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8:1385-1397.
- Inayor, B. N. e Ibraheem, O. 2014. Assessing *Ricinus communis* L. (castor) whole plant parts for phenolics and saponins constituents for medicinal and pharmaceutical applications. *International Journal of Advances In Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3:815-826.
- Kakani, E., Zygouridis, N., Tsoumani, K., Seraphides, N., Zalom, F. y Mathiopoulos, k. 2010. Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Management Science*, 66: 447-453
- Lasa, R. y Cruz, A. 2014. Efficacy of new commercial traps and the lure Ceratrap® against *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 97: 1369-1377
- Mandal, S. 2010. Exploration of larvicidal and adult emergence inhibition activities of *Ricinus communis* seed extract against three potential mosquito vectors in Kolkata, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3:605–609.
- Mangan, R. 2009. Effects of bait age and prior protein feeding on cumulative time-dependent mortality of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) exposed to GF-120 spinosad baits. *Journal of Economic Entomology*, 102: 1157-1163
- Miresmailli, S., e Isman M. 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in Plant Sciences*, 19:29-35.
- More, P. y Pandhure, N. 2014. Phytochemical Analysis and antibacterial activity in *Ricinus communis* L. Gulab Rathod. *Periodic Research*, 3:49-51.

- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., y Vázquez-Montoya, E. L. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable Ra Ximhai*, 8:17-29.
- Orozco-Dávila, D., Quintero, L., Hernández, E., Solís, E., Artiaga, T., Hernández, R., Ortega, C. y Montoya, P. 2017. Mass rearing and sterile insect releases for the control of *Anastrepha* spp. pests in Mexico – a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 164: 176-187.
- Parra, H. G., García P. C., y Cotes, T. J. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Med.* 21:47-54.
- Pavela, R. 2016. History, Presence and Perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects -a Review. *Plant Protection Science*, 4: 229–41
- Ramos-López, M. A., Pérez, G. S., Rodríguez-Hernández. C., Guevara-Fefer, P., y Zavala-Sánchez. M. A. 2010. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *African Journal of Biotechnology* 9: 1359-1365
- Rampadarath, S. y Puchooa, D. 2016. In vitro antimicrobial and larvicidal properties of wild *Ricinus communis* L. in Mauritius. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6: 100–107
- Rendon, P., Jeronimo, F., Ibarra, J., Acajalon, F. y Tween, G. 2000. Efectividad del producto Success 0.02 CB en el control de moscas de las frutas y su efecto sobre abejas *Apis mellifera* L. USDA APHIS PPQ Report. <http://moscamedguatemala.org.gt/2014/doc/3.2.EfectividadProductoSobreAbejas.pdf>
- Revis, H., Miller, N., y Vargas, R. 2004. Effects of aging and dilution on attraction and toxicity of GF-120 fruit fly bait spray for melon fly control in Hawaii. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1659-1665
- Rivera, J., Hernández, E., Toledo, J., Bravo, B., Salvador, M., y Gomez, Y., 2012. Optimización del proceso de cría de *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) utilizando una dieta larvaria a base de almidón pre-gelatinizado. *Acta zoológica mexicana*, 28(1): 102-117.
- Ruiz, L., Flores, S., Cancino, J., Arredondo, J., Valle, J., Díaz-Fleischer, F., y Williams, T. 2008. Lethal and sublethal effects of spinosad-based GF-120 bait on the tephritid parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological control*, 44: 296-304
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2012. Manual técnico para las operaciones de campo de la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta. México.
- Shahid, A., Asma, R., Habib-ur-Rehman, Kh. y Shakil Ghani. 2016. Phytochemical and biological screening of *Ricinus communis* seed oil grown wild in Jammu & Kashmir. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5:89-92
- Shai, Y. 1999 Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462:55–70
- Stevens, L. 1991. *Manual of Standard Operating Procedures (SOP) for the Mass-Rearing and Sterilization of the Mexican Fruit Fly, Anastrepha ludens (Loew)*. USDA-APHIS, South Central Region, Mission, Texas. 39 pp.
- Thomas, D. B. 2003. Reproductive phenology of the Mexican fruit fly, *A. ludens* in the Sierra Madre Oriental, Northern Mexico. *Neotropical Entomology*, 32:385-397
- Thompson, G., Dutton, R., Y Sparks, T. 2000. Spinosad—a case study: an example from a natural product discovery programme. *Pest Management Science*, 56: 696-702
- Torija-Torres, A., Huerta-De la Peña, A., y Aragón-García, A. 2014. Evaluación de dos extractos vegetales y el colorante phloxine-b, para la captura de la mosca del nogal de Castilla, en Puebla, México. *Ra Ximhai*, 10: 9-22.

- Tounou, A. K., Gbénonchi, M., Sadate, A., Komi, A., Dieudonné, G. Y. M., y Komla, S. 2011. Bioinsecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions. *Journal of Applied Biosciences* 43: 2899-2914
- Turek, C. y Stintzing, F.C. 2013. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12:40–53.
- Utgés, M. E., Vilardi, J. C., Oropeza, A., Toledo, J., y Liedo, P. 2011. Pre-release diet effect on field survival and dispersal of *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 137: 163–177.
- Wilson, W. M., Ibarra, J. E., Oropeza, A., Hernández, M. A., Toledo-Hernández, R. A., y Toledo, J. 2017. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults during emergence from soil treated with *Beauveria bassiana* under various texture, humidity, and temperature conditions. *Florida Entomologist*, 100: 503-508.