

Actividad de extractos de plantas y hongos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba (*Conotrachelus dimidiatus* Champion) Coleóptera: Curculionidae

Activity of plants extracts and entomopathogenic fungi for the control of the guava weevil (*Conotrachelus dimidiatus* Champion) Coleoptera: Curculionidae

Ernesto Cerna-Chávez¹, Karla Vanessa De Lira-Ramos¹, Yisa María Ochoa-Fuentes¹, Juan Carlos Delgado-Ortiz^{*2}, Melchor Cepeda-Siller¹, Ernesto González-Gaona³

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Calzada Antonio Narro No. 1923 col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

² Catedrático CONACYT- Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Calzada Antonio Narro No. 1923 col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Pabellón, Carretera Aguascalientes-Zacatecas km 32.5, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México. CP. 20660. México.

RESUMEN

El picudo de la guayaba es el principal problema fitosanitario, ocasionando pérdidas del 60 % en la producción; el principal método de control del picudo de la guayaba es la aplicación de insecticidas químicos como el paratión metílico y el malatión. El objetivo del estudio fue evaluar la eficiencia de hongos entomopatógenos en combinación con diferentes extractos vegetales en el control de *Conotrachelus dimidiatus* bajo condiciones de laboratorio. Se evaluó la efectividad biológica de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, la susceptibilidad del picudo de la guayaba a extractos vegetales, así como la compatibilidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con los extractos vegetales (pimienta y semilla de jícama) para el control del picudo. Se calculó la CL_{50} de las cepas que presentaron mayor patogenicidad sobre los adultos de *C. dimidiatus*, posteriormente estos fueron expuestos a las CL_{50} y concentraciones subletales de los extractos. Los resultados demostraron que las cepas de *B. bassiana* fueron patogénicas para el insecto. El extracto de pimienta y semilla de jícama mostraron actividad insecticida con al menos un 80 % de mortalidad. Las mezclas entre los hongos y los extractos registraron mortalidades del 90 %.

Palabras Clave: Concentración subletal, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, mortalidad, *Pachyrhizus erosus* y *Piper nigrum*.

SUMMARY

The guava weevil is the main phytosanitary problem, causing production losses of up to 60 %. The main control method of the guava weevil is the application of chemical insecticides such as methyl parathion and malathion. The objective of the study was to evaluate the efficiency of entomopathogenic fungi in combination with different plant extracts in the control of *Conotrachelus dimidiatus* under laboratory conditions. We evaluated the biological effectiveness of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* native strains, the susceptibility of the guava weevil to vegetable ex-

tracts (pepper and jicama seed), as well as the compatibility of *B. bassiana* and *M. anisopliae* with the vegetable extracts for weevil control. The strains LC_{50} was calculated, from the strains that presented greater pathogenicity on adults of *C. dimidiatus*, later these were exposed to the LC_{50} and sublethal concentrations of the extracts. The results showed that the *B. bassiana* strains were pathogenic for the insect. Pepper extract and jicama seed showed insecticidal activity. Mixtures between fungi and extracts recorded mortalities of 90 %.

Key words: LC_{50} , sublethal concentration, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, mortality, *Pachyrhizus erosus* and *Piper nigrum*.

INTRODUCCIÓN

En México se tiene registrada una superficie de 23 mil hectáreas destinadas al cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.), distribuidas en 20 entidades federativas. Las regiones productoras más importantes se localizan en los estados de Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas, representando el 90 % de la superficie total (SIAP, 2018).

El principal problema fitosanitario que afecta al cultivo es el picudo de la guayaba *Conotrachelus dimidiatus* (Champion), generando daños en el fruto a partir de la oviposuras de las hembras y la fermentación de los frutos derivado del desarrollo de las larvas al interior de los frutos (Vargas-Madriz et al., 2016; 2018). Si no se le controla oportunamente a *C. dimidiatus* puede ocasionar pérdidas del hasta 60 % de la producción; siendo que se encuentra ampliamente distribuido en el estado de Morelos (Muñiz y González, 1982), Aguascalientes, Zacatecas (Tafuya et al., 2010), Tabasco (Sánchez-Soto, 2011), además se tiene registro de su distribución en la zona guayabera de Jalisco y Querétaro donde causó la pérdida total de la producción (Vargas-Madriz et al., 2016). Por otro lado, en Aguascalientes y Guanajuato se registró la presencia de otra especie *Conotrachelus copalensis* (Salas-Araiza y Romero-Nápoles, 2012).

*Autor para correspondencia: Juan Carlos Delgado-Ortiz
Correo electrónico: moe_788@hotmail.com

El principal método de control del picudo de la guayaba se basa en la aplicación de insecticidas químicos como el paratión metílico y el malatión (Vargas-Madriz *et al.*, 2018), siendo ya se han determinado la presencia de organofosforados como el disulfotón en frutas como: la guayaba, papaya y mango (Jaramillo *et al.*, 2016); por lo que el control biológico, es una alternativa con potencial especialmente en la utilización de hongos entomopatógenos, los cuales se han tratado de implementar en el manejo de este cultivo, sin embargo, no se han obtenido resultados satisfactorios debido a la aplicación incorrecta (González *et al.*, 2008). Los hongos entomopatógenos se caracterizan por ser versátiles, debido a su infectividad por contacto y a su amplio rango de huéspedes que a menudo resultan en epizootias naturales (Vega *et al.*, 2009). Los hongos que habitan el suelo, como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, se consideran agentes de control biológico prometedores para el control de plagas (Leger *et al.*, 1996). Estos hongos se han usado con éxito en el control de *Conotrachelus nenuphar* ocasionando mortalidad del 89 % (Alston *et al.*, 2005); en larvas de *Curculio nucum* L. se registró un rango de mortalidad de 52-80 % con *M. anisopliae* y de 40-52 % para *B. bassiana* (Batalla-Carrera *et al.*, 2013); se ha registrado en *Curculio caryae* una mortalidad del 95 % a los tres días posteriores a la aplicación de *B. bassiana* (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004); así como *B. bassiana* ocasionó el 100 % de mortalidad en *Callosobruchus maculatus* a los seis días después de la aplicación del tratamiento. Mientras que *M. anisopliae* alcanza el 100% de mortalidad en ocho días posteriores al tratamiento (Cherry *et al.*, 2005).

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas tiene la ventaja de no contaminar debido a que estas sustancias son degradadas rápidamente en el ambiente (Iannacone y Lamas, 2002). Se conocen más de 1,600 especies de plantas con propiedades insecticidas, atrayentes, repelentes, estimulantes o inhibitorias de la ovoposición y la alimentación y como confusores sexuales (Silva *et al.*, 2003). Por ejemplo, se reporta que la rotenona se extrae de oleorresinas de la semilla de jícama (*Pachyrhizus erosus*) y que actúan como insecticida para el control del gorgojo (*Acanthoscelides obtectus*) del frijol almacenado (Andrés *et al.*, 2009). También se ha reportado en *Piper nigrum* L. compuestos como alcaloides, amidas, compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides, con potencial para el control de plagas y enfermedades (Shirley *et al.*, 2017); ocasionando mortalidad del 80% en poblaciones del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) (Salvadores *et al.*, 2007).

Es necesario el estudio de la interacción con extractos vegetales y hongos entomopatógenos, debido a que algunos extractos vegetales influyen en parámetros como el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación de conidios y en ocasiones se origina una compatibilidad entre ellos (Mertz *et al.*, 2010; Formentini *et al.*, 2014), en la búsqueda de alternativas para el manejo de *Sitobion avenae* (Fab.) se ha evaluado la compatibilidad entre extractos vegetales (eucalipto y neem) y hongos entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*); con las cual no solo se ha incrementado

la mortalidad del insecto; sino que también se ha alterado negativamente la fecundidad de *S. avenae* (Ali *et al.*, 2018). Por otro lado, estudios recientes demostraron la eficiencia de aislados de *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. en combinación con aceite vegetal de girasol la cual incrementó la mortalidad de *Conotrachelus psidii* en un rango del 57.3-95.3 % en comparación con la aplicación de los hongos solos (Brito *et al.*, 2008). Debido a que el manejo tradicional de *Conotrachelus dimidiatus* se basa en el control químico, la búsqueda de alternativas para su manejo se vuelve vital, derivado de la residualidad de los insecticidas en la fruta. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de tratamientos con hongos entomopatógenos en combinación con diferentes concentraciones de extractos vegetales en el control de *Conotrachelus dimidiatus* bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de insectos

Se recolectaron adultos de *C. dimidiatus* durante los meses de junio y julio del 2018 en huertas de guayaba de la localidad de Colomos, municipio de Calvillo, Aguascalientes (21° 52' 33.9" L, 102° 39' 39.8", 1,728 msnm). Se depositaron en recipientes de plástico de 15 cm de diámetro por 25 cm de alto y se mantuvieron con una dieta a base de guayaba fresca y hojas de guayabo (Brito *et al.*, 2008) en una cámara bioclimática (marca Binder®) a una humedad relativa de 30% y fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad a 25°C en el día y 24°C durante la noche, la crianza de los insectos se desarrolló en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro campus Saltillo. La identificación del insecto fue realizada en base a las características reportadas por (Muñiz-Vélez y González, 1982; Salas-Araiza y Romero-Nápoles, 2012) insectos de color rojizo con pubescencia densa de color amarilla en forma de "V" invertida en el pronoto que se extiende hasta el húmero, crestas elitrales, mesosterno cóncavo entre las coxas medias, así como la distribución regular de puntos más o menos profundos en el metasterno.

Extractos vegetales

La semilla de jícama (*Pachyrhizus erosus*) y la pimienta (*Piper nigrum* L.) se adquirieron en el mercado local de Saltillo. Ambos materiales se trituraron en un molino (Hamilton Beach® modelo Custom Grind™ Deluxe) hasta obtener un polvo fino, y se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes cerrados en oscuridad hasta su uso.

La extracción se realizó con el sistema Soxhlet, de acuerdo a la técnica propuesta por Biswas *et al.* (2013), en una relación 1:4 de material vegetal finamente molido (62.5 g) y etanol (250 mL). El solvente se llevó a ebullición generando un flujo continuo sobre el material vegetal situado en la cámara de extracción a una temperatura de 65 °C durante cinco ciclos. Una vez obtenido el extracto, se colocó en frascos ámbar y se refrigeró a una temperatura de 4 °C.

Selección de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* patógenas para *C. dimidiatus*

Los aislamientos de *Beauveria bassiana* (BbC2, BbC4, BbC18, BbC20) y dos de *Metarhizium anisopliae* (MaC10 y MaC21), fueron proporcionados por el laboratorio de toxicología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; las cuales se cultivaron en cajas Petri que contenían medio Agar Papa Dextrosa adicionado con 0.04 % de extracto de levadura (PDAY), a 25 ± 2 °C. Se prepararon las suspensiones de esporas como lo indica Quintela y McCoy (1997), las cuales se dispusieron en matraces Erlenmeyer conteniendo 50 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0.05 %. La concentración de la suspensión de esporas se determinó en un hemocitómetro, ajustándose a 1×10^5 , 1×10^7 y 3×10^8 conidios/mL.

Para cada repetición se seleccionaron diez insectos adultos sin sexar con tres repeticiones por tratamiento, tomando para los ensayos a los insectos que mostraron una mayor movilidad y que no presentaban movilidad anormal. Los adultos se sumergieron en las suspensiones de esporas fúngicas durante 30 s, y se colocaron en papel secante por 3-5 minutos para retirar el exceso de humedad y posteriormente se mantuvieron en cajas Petri revestidas con papel filtro (Quintela y McCoy, 1997) en la cámara bioclimática, bajo las condiciones descritas anteriormente. Se registró la mortalidad de los picudos cada 24 h durante 10 días después de la inoculación. Para confirmar la muerte por infección del hongo, los insectos muertos se colocaron en hipoclorito de sodio al 5 % durante 30 s y se enjuagaron en tres ocasiones, antes de colocarlos en cámaras húmedas a 25 °C (Brito et al., 2008). Con los datos obtenidos se estimó el porcentaje de mortalidad corregida (MC) con la fórmula de Abbott (1925) $[MC = ((\% \text{ Mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}) / (100 - \% \text{ mortalidad testigo})) * 100]$, en los tratamientos que así lo requirieron, siendo el porcentaje de mortalidad el criterio de selección

Actividad insecticida de extractos vegetales contra *C. dimidiatus*

Para la preparación de las diferentes concentraciones de los extractos; los extractos crudos obtenidos se considerados al 100 %, del cual se preparó una concentración madre al 80 % (v/v) con agua destilada estéril, esta concentración se diluyó en series al 50 %. Las concentraciones finales evaluadas fueron 80 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2.5 % y 1.25 % más un testigo negativo con agua destilada estéril. A todos los tratamientos se les agregó Tween 80 (0.05 %, v/v). Los adultos se sumergieron en las preparaciones durante 30 s, y se colocaron en papel secante por 3-5 minutos para retirar el exceso de humedad y posteriormente se mantuvieron en cajas Petri revestidas con papel filtro; a temperatura de 25 ± 1 °C, con una humedad relativa de 30 % y fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad (Quintela y McCoy, 1997). Se hicieron observaciones de comportamiento (locomoción y alimentación) y mortalidad cada 24 h durante tres días (Brito et al., 2008). Se ajustaron los datos de mortalidad como se indicó en la sección anterior. Las líneas de respuesta dosis-mortalidad para

cada extracto se obtuvieron mediante regresiones lineales y análisis estadístico Probit y así determinar las CL_{50} y las dosis sub-letales CL_{25} y CL_{10} para continuar con el bioensayo de combinación de extractos vegetales con hongo entomopatógenos.

Aplicación de los hongos patógenos en combinación de los extractos vegetales sobre *C. dimidiatus*

Todas las preparaciones de las combinaciones de los entomopatógenos (a 1×10^8 conidios/mL) y los extractos de plantas (CL_{50} y dosis subletales) se hicieron en Tween 80 (0.05 %) (Quintela y McCoy, 1997). Una concentración subletal a aquella que no causa mortalidad de los insectos, pero que provoca un aumento en la susceptibilidad del huésped a las infecciones fúngicas (Brito et al., 2008).

Para cada tratamiento (dosis subletal/hongo entomopatógeno), para cada repetición se seleccionaron diez insectos adultos con tres repeticiones por tratamiento. Los insectos se trataron como se indicó anteriormente, sumergiéndolos por 30 segundos en una preparación que contenía la mezcla de la suspensión de esporas y de los extractos vegetales. Las condiciones del ensayo y el registro de mortalidad se realizaron como se indicó anteriormente. La mortalidad de los insectos en los tratamientos fue ajustada con la fórmula de Abbott (1925). Adicionalmente, se confirmó la micosis de los insectos muertos, colocando los insectos muertos en cámaras húmedas. Los datos de la mortalidad se sometieron a un análisis Probit por el método de máxima verosimilitud para determinar la CL_{50} y el tiempo letal medio (TL_{50}) para cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis de datos

Las evaluaciones fueron realizadas bajo un diseño completamente al azar, las líneas de respuesta dosis-mortalidad para cada extracto se obtuvieron mediante regresiones lineales y análisis estadístico Probit. Los datos de mortalidad se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ utilizando con el software estadístico SAS System V.9.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de *B. bassiana* y *M. anisopliae* patógenas para *C. dimidiatus*

Los resultados de las seis cepas de hongos entomopatógenos evaluadas, solo tres cepas de *B. bassiana* fueron patógenas a *C. dimidiatus*. Estas tres cepas mostraron variaciones en su virulencia, siendo la cepa BbC4 (en concentración de 3×10^8 conidios/mL) la que ocasionó la mayor mortalidad (53 %), seguida por la cepa BbC18 con 27 % y por último la cepa BbC20 con 19 %, mientras que las cepas BbC2, MaC10 y MaC21 no mostraron patogenicidad. En el Tabla 1 se muestran las CL_{50} de las cepas de *B. bassiana* patógenas al picudo. Con base a los resultados obtenidos, las cepas seleccionadas para probar la actividad insecticida de las mezclas de esporas fúngicas y extractos vegetales fueron: BbC4, BbC18 y BbC20.

Tabla 1. CL₅₀ de cepas patogénicas de *Beauveria* sp. para *C. dimidiatus*.
Table 1. CL₅₀ of pathogenic *Beauveria* sp. strains for *C. dimidiatus*.

Cepa*	CL ₅₀ ^{ab}	Intervalo de confianza al 95 %	Ecuación de regresión
BbC4	2.0 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸ - 5 x 10 ⁸	y=0.61x+0.07
BbC18	1.7 x 10 ¹⁰	1 x 10 ⁹ - 1.6 x 10 ¹³	y=0.54x+0.06
BbC20	8.0 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹ - 4.6 x 10 ¹²	y=2.35x+0.28

^a CL₅₀: Concentración letal 50. ^b concentración expresada en conidias mL⁻¹.
 * Las cepas BbC2, MaC10 y MaC21 no mostraron patogenicidad sobre *C. dimidiatus*.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cherry et al. (2005) en donde confirmaron una mayor mortalidad de insectos *C. maculatus* tratados con *B. bassiana* fue mayor (100 %) que los tratados con *M. anisopliae* (83 %). Se han reportado efectos de *B. bassiana* en otros curculiónidos, como el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* L. (Coleóptera: Curculionidae), en el cual causó una mortalidad del 75.8 % a concentración de 3.9x10⁷ conidias/mL, después de 25 días de la aplicación del tratamiento (Sheeba et al., 2001). Por otra parte, se ha reportado que el picudo de la guayaba (*C. psidii*) muestra una alta tolerancia a las infecciones fúngicas, dado que en estudios previos se observó que aislados de *B. bassiana* causaron mortalidad variable de 48-73 % (Brito et al., 2008).

Actividad insecticida, CL₅₀ y concentraciones subletales de extractos vegetales contra *C. dimidiatus*

La mortalidad que fue registrada para el extracto crudo de pimienta al 40 % fue superior al 80 % mientras que con el extracto de semilla de jícama se obtuvo una mortalidad del 82.8 %. En la Tabla 2, se muestran los valores estimados para las CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₀ de los extractos crudos de pimienta y semilla de jícama.

Con respecto a la actividad insecticida de los extractos de pimienta, se han aislado varias amidas con actividad insecticida, tales como la pipericida, (*E, E*) -*N*- (2-metilpropil) -2,4,12-tridecadienamida, y (*E, E, E*) -11- (1,3-benzodioxol-5) yl) -*N*- (2-metilpropil) - 2,4,10-undecatrien-amida (Miyakado et al., 1989; Su y Horvat, 1981). Estos han causado efectos tóxicos para las moscas domésticas (*Musca domestica* L.), gorgojos del arroz (*Sitophilus oryzae* L.) y el gorgojo del caupí (*Callosobruchus maculatus* F.) (Scott y McKibben, 1978; Su y Horvat, 1981). Además, se han registrado en el gorgojo del

Tabla 2. CL₁₀, CL₂₅ y CL₅₀ estimadas para los extractos vegetales con actividad insecticida sobre *C. dimidiatus*.

Table 2. Estimated CL₁₀, CL₂₅ y CL₅₀ for plant extracts with insecticidal activity on *C. dimidiatus*.

Extracto	CL ₅₀ ^a	Intervalo de confianza 95 %	CL ₂₅ ^b	CL ₁₀ ^c	Ecuación de la regresión
Semilla de Jícama	48.91	20.96-1387	30.39	19.81	y=1.38x+0.84
Pimienta	19.88	17.57-22.76	11.16	6.64	y=0.09x+0.07

^a CL₅₀: Concentración letal 50. ^b CL₂₅: Concentración letal 25. ^c CL₁₀: Concentración letal 10.

maíz (*Sitophilus zeamais*) porcentajes de mortalidad de 83-100 % a concentraciones del 1-4 % (Salvadores et al., 2007). En adultos de *Sitophilus zeamais* se ha reportado un 79.25 % de repelencia con extractos de pimienta, con relación al testigo (Assis Cardoso et al., 2014).

Con el extracto de semilla de jícama al 80 % se presentó una mortalidad de 82.76 %; además, se observó una disminución en la alimentación en los insectos tratados, en comparación con la actividad de los insectos del testigo. En ambos extractos, las concentraciones que causaron los mayores porcentajes de mortalidad fueron mayores a los valores reportados por Andrés et al. (2009), quienes encontraron que la rotenona de las oleorresinas de la semilla de jícama en concentraciones de 0.05 y 0.06 g/mL, controlaron en semilla de frijol almacenado la incidencia de *Acanthoscelides obtectus* (Say.) en 95 y 100 %, respectivamente. La rotenona es el principal metabolito secundario presente en las oleorresinas extraídas de las semillas de jícama que presentan acción por contacto, ingestión o como repelente. Este flavonoide actúa en la mitocondria inhibiendo el transporte de electrones del NADH para la fosforilación de ADP a ATP, por lo tanto, el insecto disminuye el consumo de oxígeno, sufre depresión respiratoria y ataxia que causa convulsiones, parálisis y muerte (Silva et al., 2002). En otro estudio, González et al. (2008) realizaron experimentos en campo contra adultos de *C. dimidiatus*, registrando un nivel de control similar al producido con malatión y la mezcla de ajo + semilla de jícama (7.25 y 6.98 % de fruta dañada, respectivamente) comparado con los testigos que presentaron niveles de daño del 28 % en la fruta.

Aplicación de los hongos entomopatógenos en combinación de los extractos vegetales sobre *C. dimidiatus*

Las cepas de *B. bassiana* (BbC4, BbC18 y BbC20) mostraron una interacción positiva cuando fueron evaluadas de manera simultánea con las CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₀ de los extractos vegetales. La combinación de las cepas con el extracto de pimienta aumentó significativamente ($p < 0.05$) la mortalidad en comparación de la aplicación individual de los hongos (BbC18 y BbC20). Mientras que, en combinación de los hongos con las CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₀ del extracto de semilla de jícama, se observó una mortalidad de 90 % (Tabla 3), siendo las combinaciones de los BbC18 y BbC20 con las CL₂₅ y CL₁₀ las que superaron la mortalidad registrada en los insectos únicamente tratados con *B. bassiana*. Adicionalmente se observó un cambio en el comportamiento de los insectos como un menor consumo de alimento y menor movilidad. Esto pudo deberse a que este hongo produce toxinas como la bassianolide que actúa como factores de virulencia y la beauvericina que es tóxica para algunos insectos, y que se ha reportado juega un papel significativo en la virulencia (Vega et al., 2012).

Brito et al. (2008), señalan que es poco probable que las aplicaciones de hongos entomopatógenos por sí solas sean eficientes para el control del gorgojo de la guayaba *C. psidii*, dada su alta tolerancia a las inoculaciones fúngicas en condiciones ideales de laboratorio; sin embargo, Brito et al.

Tabla 3. Mortalidad de adultos de *C. dimidiatus* infectados con *B. bassiana* en combinación con extractos de pimienta o semilla de jícama.**Table 3.** Mortality of adult *C. dimidiatus* infected with *B. bassiana* in combination with pepper extract or jicama seeds.

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad (media \pm SD)	
	Pimienta	Semilla de jícama
CL ₅₀ + BbC4	60.0 \pm 10.00 bc	66.67 \pm 20.81 abc
CL ₂₅ + BbC4	13.33 \pm 5.77 d	36.67 \pm 11.54 bcd
CL ₁₀ + BbC4	23.33 \pm 23.09 d	16.67 \pm 11.54 d
CL ₅₀ + BbC18	83.33 \pm 11.54 ab	76.67 \pm 5.77 ab
CL ₂₅ + BbC18	30.0 \pm 10.0 cd	40.00 \pm 26.45 bcd
CL ₁₀ + BbC18	40.0 \pm 0 cd	43.33 \pm 15.27 abcd
CL ₅₀ + BbC20	93.33 \pm 5.77 a	90.00 \pm 10.00a
CL ₂₅ + BbC20	36.66 \pm 15.27 cd	26.67 \pm 15.27 cd
CL ₁₀ + BbC20	13.33 \pm 5.77d	23.33 \pm 25.16 cd

* Valores en la misma columna seguidos con la misma letra no presentan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$). SD=Desviación estándar.

(2008) obtuvieron aumentos significativos en la mortalidad y la velocidad de muerte del hospedador utilizando aceite vegetal e imidacloprid. Por su parte, Malik et al. (2016) lograron una mortalidad del 100 % en el picudo rojo de las palmeras (*Rhynchophorus ferrugineus*) después de 15 días de tratamiento con *B. bassiana* (1×10^6 conidios/mL) en combinación con imidacloprid (1 μ L/L). Estos estudios sugieren que el uso de simultáneo de un insecticida químico mejora la patogenicidad de los hongos entomopatógenos. Ya se ha establecido que los insecticidas sintéticos causan cambios fisiológicos o estrés químico en los insectos y posteriormente, las esporas de los hongos penetran fácilmente en la cutícula del insecto y la penetración exitosa produce un crecimiento vegetativo del hongo que afecta la nutrición y finalmente causan la muerte (Inglis et al., 2001; Shahina et al., 2009).

El estudio de Jaramillo et al. (2005) reportaron el efecto aditivo de aplicaciones conjuntas de imidacloprid y *M. anisopliae* para el control del insecto *Cyrtomenus bergi*. Estos autores encontraron un aumento en la mortalidad del 40 % al 88 % cuando se combinó el hongo con este insecticida (imidacloprid). Además, se ha reportado que la combinación de extracto de higuera/extracto de Chile/*B. bassiana* redujo poblaciones de *Sphenarium purpurascens* Charp en un 81 % en condiciones de campo (Jorge et al., 2016), aunque también se ha demostrado que en altas concentraciones inhibe la germinación y disminuye la viabilidad de las conidios de *B. bassiana* (Mamprim et al., 2014).

Cabe destacar que Ali et al. (2018), al evaluar la compatibilidad de extractos vegetales (eucalipto y neem) con hongos entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*), para el control de *S. avenae* obtuvieron mortalidad de 54-87 % en las mezclas, así como un efecto negativo en la fecundidad al ser tratadas con *B. bassiana*/extracto de eucalipto.

Los aislamientos de *B. bassiana* en combinación con las CL₅₀ de pimienta y semilla de jícama mostraron diferencias en los valores de TL₅₀ con respecto a las dosis subletales,

requiriendo un menor tiempo de muerte a la CL₅₀ de ambos extractos (Tabla 4). Los menores tiempos de respuesta se observaron con la combinación CL₅₀+BbC20 (extracto de pimienta), siendo un tiempo de 5.8 días para el extracto de pimienta y de 3.8 días para el tratamiento con semilla de jícama. Estos valores son similares con lo reportado por Brito et al. (2008), para el control de *C. psidii*, donde ellos registraron valores de 5.3-8.9 días en aislados de *B. bassiana* en combinación con un insecticida químico (imidacloprid). Sin embargo, Suárez-Gómez (2009) estimó un TL₅₀ para *B. bassiana* sobre *Sitophilus zeamais* de seis días después de la aplicación a una concentración de 1×10^6 conidios/mL. Los aislamientos de hongos entomopatógenos con TL₅₀ mayores de 14 días se consideran no patogénicos (Samuels et al., 1989). Debido a que los TL₅₀ de las dosis subletales con el extracto de semilla de jícama en este estudio, se registraron por debajo de los valores reportados, por se consideran favorables para el control del picudo. Lo anterior concuerda con los efectos sinérgicos reportados por Quintela y McCoy (1997), quienes analizaron la sinergia entre combinaciones de entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) y el imidacloprid, logrando reducir el tiempo letal (TL₅₀) en poblaciones de *Diaprepes abbreviatus* hasta en 2.0 y 2.5 días. Asimismo, obtuvieron un 96 % de mortalidad en combinación de *B. bassiana* con 500 ppm de imidacloprid.

Tabla 4. Tiempo letal (TL₅₀) para cepas de *B. bassiana* en combinación con extractos vegetales sobre el adulto de *C. dimidiatus*.**Table 4.** Lethal time (TL₅₀) for the combination of *B. bassiana* strains with plant extracts on adult *C. dimidiatus*.

Tratamiento	TL ₅₀ (Días)	Intervalo de confianza 95 %	Intervalo de confianza 95 %	
			Pimienta	Semilla de jícama
CL ₅₀ + BbC4	14.4	(7.8 - 32.2)	4.7	(3.7 - 5.8)
CL ₂₅ + BbC4	17.3	(13.8 - 28)	8.6	(8.2 - 9.2)
CL ₁₀ + BbC4	100	(30.2 - 523.5)	9.2	(8.8 - 9.7)
CL ₅₀ + BbC18	7.95	(6.2 - 13.29)	5.5	(3.7 - 8.4)
CL ₂₅ + BbC18	8.9	(8.4 - 9.5)	8.9	(8.4 - 9.5)
CL ₁₀ + BbC18	10.2	(9.7 - 11)	7.9	(7.5 - 8.4)
CL ₅₀ + BbC20	5.8	(5.1 - 6.7)	3.8	(2.7 - 4.9)
CL ₂₅ + BbC20	12.4	(11.1 - 14.6)	8.3	(7.8 - 8.8)
CL ₁₀ + BbC20	50	(27.5 - 190)	9.2	(8.7 - 10)

CONCLUSIONES

Las combinaciones entre los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y los extractos vegetales de pimienta y semilla de jícama mostraron ser eficientes para el control de picudo de la guayaba bajo condiciones de laboratorio, siendo la cepa BbC20 la que registró la mayor mortalidad al ser combinada con los extractos vegetales. Los TL₅₀ de las dosis subletales con el extracto de semilla de jícama fueron menores a los reportados en la literatura, por lo que se consideran favorables para el control del picudo. Por lo cual se sugiere

continuar los estudios de compatibilidad y analizar el efecto de estas mezclas en poblaciones directamente en campo para evaluar su potencial control de la plaga.

REFERENCIAS

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economy Entomology*. 18: 265-267. DOI: [org/10.1093/jee/18.2.265a](https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a)
- Ali, S., Farooqi, M.A., Sajjad, A., Ullah, M.I., Qureshi, A.K., Siddique, B., Waheed, W., Sarfraz, M. y Asghar, A. 2018. Compatibility of entomopathogenic fungi and botanical extracts against the wheat aphid *Sitobion avenae* (Fab.) (Hemiptera: Aphididae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 28: 1-6. doi: [org/10.1186/s41938-018-0101-9](https://doi.org/10.1186/s41938-018-0101-9)
- Alston, D., Rangel, D., Lacey, L., Golez, H., Kim, J. y Roberts, D. 2005. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biological Control*. 35(2): 163-171. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2005.06.011](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.06.011)
- Andrés, M., Lucio, J., Juárez-Goiz, J., Muñiz, R., Hernández, S. y Elos, M. 2009. Oleoresina de jícama para controlar *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleóptera: Bruchidae) en semilla de frijol. *Agronomía Mesoamericana*. (20): 59-69. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_mesov20n01_059.pdf
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., Santamaria, S. y García del Pino, F. 2013. Isolation and virulence of entomopathogenic fungi against larvae of hazelnut weevil *Curculio nucum* (Coleoptera, Curculionidae) and the effects of combining *Metarhizium anisopliae* with entomopathogenic nematodes in the laboratory. *Biocontrol Science and Technology*. 23(1): 101-125. DOI: [org/10.1080/09583157.2012.741681](https://doi.org/10.1080/09583157.2012.741681)
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D. y Yadav, A. 2013. Antimicrobial activities of leaf extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *International Journal of Microbiology*. 2013: 1-7. DOI: [org/10.1155/2013/746165](https://doi.org/10.1155/2013/746165)
- Brito, E., De Paula, A., Vieira, L., Dolinski, C. y Samuels, R. 2008. Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*. 18(7): 665-673. DOI: [10.1080/09583150802195965](https://doi.org/10.1080/09583150802195965)
- Cherry, A., Abalo, P. y Hell, K. 2005. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*. 41(3): 295-309. DOI: [org/10.1016/j.jspr.2004.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.04.002)
- Assis, F., Silva, P., Queiroga, V., Figueiredo, A., Cárdenas, N. y Rojas, A. 2014. Eficiencia de extractos vegetales como insecticida sobre *Sitophilus zeamais* en granos de maíz almacenados. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 23(2): 57-62. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542014000200010
- Formentini, M., Alves, L., Da Silva, F. y Mamprim, A. 2014. *In vitro* assay of alternative phytosanitary products and plant extracts on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Clavicipitaceae). *Revista Brasileira de Agroecologia*. 9(1): 195-204. Disponible en: <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/13329>
- Suárez-Gómez, H. 2009. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae) plaga de maíz almacenado. *Intropica: Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*. 4(1): 47-53. Disponible en: <https://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/138>
- González, G., Lozano, G., España, L., Tafoya, R., Padilla, R., Perales, C. y Juárez, M. 2008. Estrategias de manejo orgánico – biológico del picudo de la guayaba (*Conotrachelus* spp). Folleto Técnico Núm. 39. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Pabellón, Pabellón de Arteaga, Ags. México. http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2576/Estrategias%20de%20manejo%20organico_biologico%20del%20picudo%20de%20la%20guayaba%20conotrachelus%20spp.pdf?sequence=1
- Iannaccone, J. y Lamas, G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. (65): 92-101 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/263467252_EFECTO_DE_DOS_EXTRACTOS_BOTANICOS_Y_UN_INSECTICIDA_CONVENCIONAL SOBRE_EL_DEPREDADOR_CHRYSOPERLA_EXTERNA
- Inglis, G., Goettel, M., Butt, M. y Strasser A. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: *Fungi as Biocontrol Agents*. T.M. Butt, C. Jackson y N. Magan (eds). pp. 24-69. Wallingford, UK. CAB International. DOI: [10.1079/9780851993560.0023](https://doi.org/10.1079/9780851993560.0023)
- Jaramillo, J., Borgemeister, C., Ebssa, L., Gaigl, A., Tobón, R. y Zimmermann, G. 2005. Effects of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Foreschner (Hemiptera: Cydnidae). *Biological Control*. 34 (1): 12-20. DOI: [org/10.1016/j.biocontrol.2005.03.021](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.03.021)
- Jaramillo-Colorado, B.E., Palacio-Herrera, F., Pérez-Sierra, I. 2016. Residuos de pesticidas organofosforados en frutas obtenidas de plazas de mercado y supermercados en Cartagena, Colombia. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 25 (4): 39-46. DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.14440.47363>
- Jorge, V., de los Ángeles, M., Aragón García, A., Bibbins Martínez, M.D., Castillo Hernández, D., Galicia, N. y Pérez Torres, B.C. 2016. Control de *Sphenarium purpurascens* con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(2): 235-247. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000200235
- Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. y Roberts, D. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Science*. 93: 6349-6354. DOI: [10.1073/pnas.93.13.6349](https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349)
- Malik, M., Manzoor, M., Ali, H., Muhammad, A., Ul, S., Qasim, M., Ahmad, N., Idrees, A., Muhammm, A. y Saqib, H. 2016. Evaluation of imidacloprid and entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 4: 262-268. Disponible en: <http://www.entomoljournal.com/archives/?year=2016&vol=4&issue=1&ArticleId=814>

- Mamprim, A., Angeli, L., Silva, F., Formentini, M., Castilho, C. y Barbosa, R. 2014. Efecto de productos fitosanitarios sobre parámetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae). *Revista de Protección Vegetal*. 29(2): 128-136. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n2/rpv08214.pdf>
- Mertz, N., Alves, L., Marcomini, A., de Oliveira, D. y dos Santos, J. 2010. Efeito de produtos fitossanitários naturais sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *in vitro*. *BioAssa*. 5(3): 1-10. DOI: 10.14295/BA.v5.0.71
- Miyakado, M., Nakayama, M. y Ohno, N. 1989. Insecticidal unsaturated isobutylamides: from natural products to agrochemical leads. In: *Insecticides of Plant Origin*. J.T. Arnason, B.J.R. Philogene y P. Morand (ed). pp 183-187. Washington, D.C. *ACS symposium Series*. DOI: 10.1021/bk-1989-0387.ch013
- Muñiz, V. y González, R. 1982. *Conotrachelus dimidiatus* Champ, "el picudo de la guayaba" en Morelos, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 26: 9-35.
- Quintela, E.D. y McCoy, A.W. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environmental Entomology*. 26(5): 1173-1182. DOI: [org/10.1093/ee/26.5.1173](https://doi.org/10.1093/ee/26.5.1173)
- Salas-Araiza, M. y Romero-Nápoles, J. 2012. Species of *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae) associated to the guava and new species description. *Revista Colombiana de Entomología*. 38(1): 124-127. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882012000100022
- Salvadores, Y., Silva, G., Tapia, M. y Hepp, R. 2007. Spices powders for the control of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, in stored wheat. *Agricultura Técnica*. 67(2): 147-154. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/27789504_Spices_powders_for_the_control_of_maize_weevil_Sitophilus_zeamais_Motschulsky_in_stored_wheat
- Samuels, K., Heale, J. y Llewellyn, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53: 25-31. DOI: [org/10.1016/0022-2011\(89\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90070-0)
- Sánchez-Soto, S. 2011. Campeón de *Conotrachelus dimidiatus* (Coleoptera: Curculionidae): el picudo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) en Tabasco, México. *Boletín Museo de Entomología de la Universidad Valle*. 12: 17-18
- Scott, W. y McKibben, G., 1978. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. *Journal of Economic Entomology*. 71: 343-344. DOI: [org/10.1093/jee/71.2.343](https://doi.org/10.1093/jee/71.2.343)
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. [Consultado 05 noviembre 2019] Disponible en: <http://www.siap.s.gob.mx/>
- Shahina F., Salma J., Mehreen G., Bhatti M. y Tabassum K. 2009. Rearing of *Rhynchophorus ferrugineus* in laboratory and field conditions for carrying out various efficacy studies using EPNs. *Pakistan Journal of Nematology*. 27: 219-228. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237547519_Rearing_of_Rhynchophorus_ferrugineus_in_laboratory_and_field_conditions_for_carrying_out_various_efficacy_studies_using_EPNs
- Shapiro-Ilan, D., Cottrell, T. E., Gardner, W. A. 2004. Trunk perimeter applications of *Beauveria bassiana* to suppress adult *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science*. 39 (3): 337-349. Doi: doi.org/10.18474/0749-8004-39.3.337
- Sheeba, G., Seshadri, S., Raja, N., Janarthanan, S. y Ignacimuthu, S. 2001. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Applied Entomology and Zoology*. 36: 117-120. DOI: [org/10.1303/aez.2001.117](https://doi.org/10.1303/aez.2001.117)
- Shirley, F., Yamaguchi, L., Kato, M., Lemos, O., Xavier, L., Maia, J., Ramos, A., Setzer, W. y Silva, J. 2017. Secondary metabolic profiles of two cultivars of *Piper nigrum* (black pepper) resulting from infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *International Journal of Molecular Science*. 18 (12): 1-17. DOI: 10.3390/ijms18122434.
- Silva, G., Lagunes, A. y Rodríguez-Sánchez, J. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. *Ciencia e Investigación Agraria*. 30(3): 153-160. Disponible en: <https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/26775>
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J. y Rodríguez, D. 2002. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa en el manejo de insectos. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 66: 4-12. Disponible en: <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6414/A2008e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Su, H. y Horvat, R. 1981. Isolation, identification and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 29: 115-118. DOI: [org/10.1021/jf00103a029](https://doi.org/10.1021/jf00103a029)
- Tafoya, F., C. Perales, E. González, y H. G. Calyecac. 2010. Fruit damage patterns caused by ovipositing females of *Conotrachelus dimidiatus* (Coleoptera: Curculionidae) in guava trees. *Psyche: A Journal of Entomology*. 2010: 1-4. DOI: 10.1155/2010/819532
- Vargas-Madriz, H., Azuara-Domínguez, A., Juan-Lara, J., Ibarra-Cortés, K., Grifaldo-Alcántara, P., Talavera-Villarreal, A., Tafoya-Rangel, F. y Lázaro-Dzul, M. 2018. Picudo de la guayaba *Conotrachelus dimidiatus* (Champion) una plaga de importancia económica para el cultivo de guayaba *Psidium guajava* L. en México. *Revista Mexicana de Fitosanidad*. 2(3): 25-38. Disponible en: [http://www.revimexfito.com.mx/files1/Remef%202_3/REMEFI_2\(3\)_25-38_2018.pdf](http://www.revimexfito.com.mx/files1/Remef%202_3/REMEFI_2(3)_25-38_2018.pdf)
- Vargas-Madriz, H., Martínez-Damian T., Lázaro-Dzul, M., Terán-Vargas, A. y Azuara-Domínguez, A. 2016. New distribution registry of guava weevil, *Conotrachelus dimidiatus* Champion, in Guava (*Psidium guajava* L.) in Mexico. *Southwestern Entomologist*. 41(3): 883-886. DOI: [org/10.3958/059.041.0332](https://doi.org/10.3958/059.041.0332)
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M., Maniania, N., Monzón, A., Ownley, B., Pell, J., Rangel, D. y Roy, H. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2: 149-159. DOI: [org/10.1016/j.funeco.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001)
- Vega, F., Meyling, N., Luangsa-ard, J. y Blackwell, M. 2012. Fungal Entomopathogens. En: *Insect pathology*. F. E. Vega y H. K. Kaya (ed). pp 171-220. DOI: 10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3.