

Efecto bioestimulante de *Macrocyctis pyrifera* en esporas de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad contra *Chloridea virescens*

Biostimulant effect of *Macrocyctis pyrifera* on *Metarhizium anisopliae* spores and its pathogenicity against *Chloridea virescens*

Lucía Araceli Manzanarez Jiménez ¹✉ 

¹ Departamento de Biotecnología Agrícola, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México.

ABSTRACT

The biostimulant effect of *Macrocyctis pyrifera* on *Metarhizium anisopliae* spores was evaluated in its growth, sporulation, viability, and pathogenicity against *Chloridea virescens*. Nine concentrations were prepared at $1 \times 10^{7,8,9}$ spores/mL, with 5 %, 10 % and 20 % algae in SDA, plus three positive check, and incubated at 150 r.p.m, 28 °C, 80 % relative humidity and 8 h of light. Pathogenicity was tested on larvae two days after hatching. *M. pyrifera* had biostimulant effect on *M. anisopliae*, improving growth with 5 % and 10 %, to 4.91 $\mu\text{m}/\text{d}$, and with 20 % to 4.84 $\mu\text{m}/\text{d}$. Viability was around 99 % in germinated spores at 24 h for all treatments, the total sporulation was 6×10^6 to 6.7×10^8 , and with only fungus from 3×10^6 to 3.4×10^7 spores/mL. The highest mortality was 91.5 ± 2.5 % at 43.3 ± 1.3 h, and with only fungus, 80 ± 3 % at 70 ± 5 h. This work is a contribution to pest control with entomopathogenic fungi improved with extracts of marine origin. It is recommended to evaluate these treatments in conventional crop.

Keywords: Biotechnology, microorganisms, sustainable development

RESUMEN

Se evaluó el efecto bioestimulante de *Macrocyctis pyrifera* en esporas de *Metarhizium anisopliae*, en su crecimiento, esporulación, viabilidad y patogenicidad contra *Chloridea virescens*. Se prepararon nueve concentraciones a $1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL con 5 %, 10 % y 20 % de alga en SDA, más tres controles positivos, y se incubaron a 150 r.p.m, 28 °C, 80 % de humedad relativa y 8 h luz, la patogenicidad se probó sobre larvas de dos días de eclosión. *M. pyrifera* tuvo efecto bioestimulante en *M. anisopliae*, y mejoró con 5 % y 10 %, con crecimiento de 4.91 $\mu\text{m}/\text{d}$, y con 20 % 4.84 $\mu\text{m}/\text{d}$, la viabilidad fue alrededor de 99 % esporas germinadas a las 24 h en todos los tratamientos, la esporulación total fue 6×10^6 a 6.7×10^8 , y con solo hongo de 3×10^6 a 3.4×10^7 esporas/mL, la mortalidad más alta fue 91.5 ± 2.5 % a las 43.3 ± 1.3 h, y con solo hongo fue 80 ± 3 % a las 70 ± 5 h. Este trabajo es un aporte al control de plagas con hongos entomopatógenos mejorados con extractos de origen marino, se recomienda evaluar estos tratamientos en cultivo convencional.

Palabras clave: Biotecnología, microorganismos, desarrollo sostenible

INTRODUCCION

Los hongos entomopatógenos atacan insectos y ácaros, entre los géneros más estudiados se encuentran *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Isaria* spp. (= *Paecilomyces*), y *Lecanicillium* spp. (= *Verticillium*), los cuales producen conidios o esporas, responsables de causar la infección y dispersión de los hongos en el ambiente (Alatorre y Tamayo, 2020). *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (1883) es un hongo, generalista, filamentoso, saprofito y parásito, que crece en el suelo, en la rizosfera de las plantas y cadáveres de artrópodos, desarrolla hifas que dan origen al micelio y conidios patógenos que causan la enfermedad "muscardina verde" en insectos, su uso como agente de control biológico de plagas, no compromete la sanidad de los cultivos agrícolas y el ambiente (Inglis *et al.*, 2012; Zelaya-Molina *et al.*, 2022).

En México, el control biológico con hongos entomopatógenos y otros microorganismos es limitado, debido su efecto bioinsecticida prolongado, comparado con el rápido efecto de los insecticidas convencionales, lo anterior, ha influido en el incremento de un mayor uso de productos químicos, impactando en las poblaciones de insectos benéficos, y la microbiota del suelo (Archuleta-Torres, 2012; Zelaya-Molina *et al.*, 2022). Este escenario ha propiciado la búsqueda de cepas nativas de microorganismos entomopatógenos con actividad insecticida, coadyuvada con polímeros naturales y otros microorganismos con efecto sinérgico, para aumentar su persistencia en el ambiente.

Una alternativa para lograrlo, es el uso de bioestimulantes que potencialicen su crecimiento y patogenicidad sobre los insectos, como *Macrocyctis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, 1820 (Laminariales: Phaeophyceae), conocida como quelpo o alga café, rica en carbohidratos, minerales (Mg^{+2} , Ca^{+2} , P^{+5} , K^{+1}), vitaminas (tocoferol, B_1 y B_{12}), con capacidad para estimular el crecimiento vegetal de las plantas a través de mecanismos como fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de minerales (Hernández-Carmona *et al.*, 2012). En México *M. pyrifera* crece de manera silvestre en la costa oeste de la península de Baja California, desde Tijuana, B.C.N., hasta Bahía Asunción, B.C.S., y se cosecha de forma manual para producir extractos líquidos por métodos hidrotermales en condiciones alcalinas, neutras y ácidas (Hernández-Herrera *et al.*, 2018), su colecta genera alrededor de 31,835 millones de t/año, de esta producción, el 7 % se obtiene en México y Chile (FAO, 2018).

*Autor para correspondencia: Lucía Araceli Manzanarez Jiménez

Correo-e: lmanzanarezji800@alumno.ipn.mx

Recibido: 4 de Mayo de 2024

Aceptado: 13 de Junio de 2024

Publicado: 31 de Julio de 2024

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto bioestimulante de un extracto líquido de *M. pyrifer* en esporas del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* a diferentes concentraciones, sobre larvas de dos días de eclosión del gusano del fruto en tomate *Chloridea virescens* F. = *Heliothis virescens* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae), con base en su crecimiento, germinación, concentración, y patogenicidad, en condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioinsecticidas del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional en Guasave, Sinaloa, México, de marzo a junio de 2023.

Origen de *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae se aisló de muestras de suelo agrícola en el laboratorio de bioinsecticidas del CIIDIR IPN Sinaloa, y se identificó por la morfología de sus conidios y por métodos moleculares mediante la extracción de ADN genómico de micelio, amplificando las regiones ITS1, 5.8S, ITS2 de ARNr, utilizando los cebadores ITS1F-ITS4 (Archuleta-Torres, 2012).

Colecta de *Macrocyrtis pyrifer* y preparación del extracto

M. pyrifer se colectó en las costas de Baja California Sur, el extracto líquido se obtuvo en el Laboratorio de Química de Algas del CICIMAR IPN, en La Paz, B.C.S. México, mediante extracción alcalina (Hernández-Carmona *et al.*, 2012).

Preparación de las concentraciones de esporas de *M. anisopliae*

Las esporas en polvo de *M. anisopliae*, se propagaron en arroz precosido, inoculado con un cultivo líquido del hongo, donde se adicionaron sales minerales y carbono. Se incubó a 28 °C, humedad relativa de 80 %, 8 horas luz, durante 14 d, las esporas cosechadas se almacenaron a 4 °C (Manzanarez-Jiménez y García-Gutiérrez, 2020). Las concentraciones iniciales se prepararon a partir de tubos cónicos con tapa de rosca de 15 mL, donde se vertió 0.01 gramos de esporas en 10 mL de Tween® 80 al 0.05 %, enseguida se mezclaron en un vortex y se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} en microtubos de 1000 µL, para obtener las concentraciones a 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 esporas/mL.

Cultivo de *M. anisopliae* con *M. pyrifer*

En matraces de 50 mL, se prepararon 20 mL de caldo dextrosa sabouraud (SDA) y se agregaron las concentraciones correspondientes de *M. anisopliae* ($1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL), y el extracto líquido de alga *M. pyrifer* (5 % 10 % y 20 %), más tres controles positivos con solo hongo, y se cultivaron en una incubadora de agitación (LAB Companion, SR-600R) a 150 r.p.m., 28 °C, humedad relativa de 80 %, y 10 h luz, durante cinco días.

Evaluación del crecimiento, germinación y concentración de esporas

El crecimiento del hongo se evaluó a partir de las primeras 24 h de cultivo; en un portaobjetos se colocaron 10 µL del cultivo líquido con 1 µL de azul de algodón para identificar las estructuras del hongo y se cubrieron con un cubreobjetos, después con el objetivo 40 X de un microscopio óptico (Primo Star Carl Zeiss®), se midió la longitud de las hifas en micras. La viabilidad de esporas se midió en medio PDA, en cada caja de cultivo del tratamiento correspondiente se agregaron 50 µL de azul de algodón cargados en una micropipeta (Labmate Pro®), después se extrajo 1 cm² del cultivo del hongo, y se colocó al centro en un portaobjetos, enseguida se cubrió con un cubreobjetos, y se contó el número de esporas germinadas, notando que su tamaño fuera dos veces mayor al tamaño de su tubo germinal. La concentración total de esporas de los tratamientos, se evaluó mediante diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} , que se contaron en cámara de Neubauer (Inglis *et al.* 2012). Todos los tratamientos contaron con cinco unidades experimentales y tres repeticiones. Las variables evaluadas fueron crecimiento del hongo (longitud en micras), germinación de esporas a las 24 h, y concentración total de esporas a los cinco días.

Bioensayo de patogenicidad

Las larvas de dos días de eclosión se individualizaron en cámaras húmedas hechas con cajas petri (60 × 15 mm), con una base de papel filtro humedecido con 0.5 mL de agua destilada, donde se colocó 1 g de dieta artificial, inoculada con 10 µL del tratamiento correspondiente y se sellaron con cinta Parafilm. Las cajas se incubaron a 27 ± 1 °C, humedad relativa > 80 % y 8 h luz. La mortalidad se evaluó cada 24 h, durante cinco días (Tabla 1).

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó en un diseño completamente al azar. Los datos de crecimiento, esporulación, viabilidad y mortalidad de larvas se presentan en promedios \pm desviación estándar. Las variables se analizaron con el estadístico ANOVA, y las diferencias entre los tratamientos se establecieron con una comparación de medias con la prueba de Tukey

Tabla 1. Tratamientos y su concentración en el bioensayo de patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Chloridea virescens*. El bioensayo contó con 30 unidades experimentales por tratamiento y se replicó tres veces, bajo las mismas condiciones experimentales

Table 1. Treatments and their concentration in the pathogenicity bioassay of *Metarhizium anisopliae* against *Chloridea virescens* larvae. The bioassay had 30 experimental units per treatment and was replicated three times, under the same experimental conditions.

Tratamientos	Concentraciones
T1	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de <i>M. anisopliae</i> + 5 % <i>M. pyrifer</i>
T2	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de <i>M. anisopliae</i> + 10 % <i>M. pyrifer</i>
T3	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de <i>M. anisopliae</i> + 20 % <i>M. pyrifer</i>
T4	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de <i>M. anisopliae</i> en 10 mL de Tween 80 al 0.05%
T5	Agua destilada

($p \leq 0.05$) (SAS Institute 2009). El tiempo letal medio en que los tratamientos mataron a la mitad de la población de larvas se determinó mediante un análisis Probit (Finney, 1964).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del crecimiento, germinación y concentración de esporas

El extracto de *M. pyrifera* tuvo efecto bioestimulante en el crecimiento, viabilidad, esporulación y patogenicidad del hongo, en el medio de cultivo líquido.

Los hongos que fueron tratados con 5 %, 10 % y 20 % de extracto líquido de *M. pyrifera* como estrategia para mejorar su crecimiento y concentración mostraron datos de crecimiento significativamente mayores con respecto al control positivo ($F = 30958.03 = 2.80$; $gl = 3,32$; $p = 0.00$), ($F = 33833.03 = 2.90$; $gl = 4,41$; $p = 0.00$), respectivamente (Tabla 2).

En los tratamientos del hongo con 5 % y 10 % de extracto líquido de *M. pyrifera*, las hifas crecieron en promedio 4.91 $\mu\text{m}/\text{día}$ y con 20 % 4.84 $\mu\text{m}/\text{d}$, en los tratamientos con solo hongo estos valores fueron de 2.00 a 2.11 $\mu\text{m}/\text{d}$. Estos resultados concuerdan con Manzanarez-Jiménez *et al.* (2021)

quienes encontraron crecimiento fúngico de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *M. anisopiliae* en un cultivo sólido a base de almidón y dextrosa con 2 % de extracto semi-líquido de *M. pyrifera*. Por su parte, Hernández-Herrera *et al.* (2014) informaron de la germinación de semillas y crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), y frijol mungo (*Vigna radiata* L.) R. Wilezek, con extractos de algas de la familia Laminariaceae (algas cafés). Los resultados de los trabajos anteriores refuerzan la idea de sinergia entre microorganismos compatibles, para incrementar el crecimiento y la persistencia de éstos en cultivos agrícolas, y el control biológico de plagas de insectos. En este trabajo, las concentraciones $\leq 20\%$ de extracto líquido de *M. pyrifera* benefició el crecimiento, germinación y concentración del hongo *M. anisopiliae* en un cultivo líquido, y mejoró con 5 % y 10 %, estos resultados son prometedores para promover el uso de bioestimulantes y superar las limitaciones por efecto de la luz solar y la falta de humedad relativa en los hongos entomopatógenos, como lo informaron Manzanarez-Jiménez *et al.* (2021), quienes evaluaron la persistencia de una formulación de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopiliae* con

Tabla 2. Efecto de esporas de *Metarhizium anisopiliae* con extracto *Macrocystis pyrifera*, en el crecimiento de hifas, y esporulación total del hongo.

Table 2. Effect of *Metarhizium anisopiliae* spores with extract of *Macrocystis pyrifera* on hyphal growth, and total sporulation of the fungus.

Concentración inicial	Crecimiento del hongo $\mu\text{m}/\text{día}$			Esporulación total esporas/mL		
	T1: 5%					
1x10 ⁷	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tratamiento	4.91 ± 0.0 ^a	4.92 ± 0.0 ^a	4.91 ± 0.0 ^a	6.3 × 10 ⁷ ^a	6.4 × 10 ⁸ ^a	6.4 × 10 ⁸ ^a
Control	2.02 ± 0.0 ^b	2.02 ± 0.0 ^b	2.02 ± 0.0 ^b	3.1 × 10 ⁸ ^b	3.2 × 10 ⁷ ^b	3.2 × 10 ⁶ ^b
	T2: 10%					
Tratamiento	4.91 ± 0.0 ^a	4.91 ± 0.0 ^a	4.92 ± 0.00 ^a	6 × 10 ⁶ ^a	6 × 10 ⁷ ^a	6.2 × 10 ⁷ ^a
Control	2.01 ± 0.0 ^b	2.01 ± 0.0 ^b	2.01 ± 0.0 ^b	3 × 10 ⁶ ^b	3 × 10 ⁶ ^b	3.3 × 10 ⁵ ^b
	T3: 20%					
Tratamiento	4.85 ± 0.1 ^b	4.84 ± 0.1 ^b	4.84 ± 0.1 ^b	6.2 × 10 ⁸ ^a	6.7 × 10 ⁷ ^a	6 × 10 ⁸ ^a
Control	2.00 ± 0.0 ^c	2.00 ± 0.0 ^c	2.00 ± 0.0 ^c	3.2 × 10 ⁸ ^b	3 × 10 ⁷ ^b	3 × 10 ⁶ ^b
	T1: 5 %					
1x10 ⁸	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tratamiento	4.92 ± 0.0 ^a	4.91 ± 0.0 ^a	4.91 ± 0.0 ^a	6.7 × 10 ⁷ ^a	6.9 × 10 ⁸ ^a	6.8 × 10 ⁸ ^a
Control	2.10 ± 0.0 ^c	2.02 ± 0.0 ^c	2.01 ± 0.0 ^c	3.1 × 10 ⁸ ^b	3.3 × 10 ⁷ ^b	3 × 10 ⁶ ^b
	T2: 10 %					
Tratamiento	4.91 ± 0.0 ^a	4.92 ± 0.0 ^a	4.92 ± 0.00 ^a	6.2 × 10 ⁶ ^a	6.4 × 10 ⁷ ^a	6.2 × 10 ⁷ ^a
Control	2.12 ± 0.0 ^c	2.11 ± 0.0 ^c	2.01 ± 0.0 ^c	3.4 × 10 ⁶ ^b	3 × 10 ⁶ ^b	3.3 × 10 ⁵ ^b
	T3: 20 %					
Tratamiento	4.72 ± 0.1 ^b	4.69 ± 0.1 ^b	4.71 ± 0.1 ^b	6.5 × 10 ⁸ ^a	6.9 × 10 ⁸ ^a	6.2 × 10 ⁸ ^a
Control	2.00 ± 0.0 ^c	2.00 ± 0.0 ^c	2.00 ± 0.0 ^c	3.1 × 10 ⁸ ^b	3.4 × 10 ⁷ ^b	3.3 × 10 ⁶ ^b
	T1: 5 %					
1x10 ⁹	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tratamiento	4.90 ± 0.0 ^a	4.91 ± 0.0 ^a	4.90 ± 0.0 ^a	6.8 × 10 ⁷ ^a	6.8 × 10 ⁸ ^a	6.6 × 10 ⁸ ^a
Control	2.10 ± 0.0 ^c	2.02 ± 0.0 ^c	2.01 ± 0.0 ^c	3.1 × 10 ⁸ ^b	3.3 × 10 ⁷ ^b	3 × 10 ⁶ ^b
	T3: 10 %					
Tratamiento	4.93 ± 0.0 ^a	4.91 ± 0.0 ^a	4.92 ± 0.00 ^a	6.6 × 10 ⁶ ^a	6.5 × 10 ⁷ ^a	6.6 × 10 ⁷ ^a
Control	2.10 ± 0.0 ^c	2.11 ± 0.0 ^c	2.11 ± 0.0 ^c	3.2 × 10 ⁶ ^b	3.3 × 10 ⁶ ^b	3.3 × 10 ⁵ ^b
	T3: 20 %					
Tratamiento	4.69 ± 0.1 ^b	4.67 ± 0.1 ^b	4.70 ± 0.1 ^b	6.2 × 10 ⁸ ^a	6.2 × 10 ⁷ ^a	6.4 × 10 ⁸ ^a
Control	2.00 ± 0.0 ^c	2.00 ± 0.0 ^c	2.00 ± 0.0 ^c	3.1 × 10 ⁸ ^b	3.4 × 10 ⁷ ^b	3.3 × 10 ⁶ ^b

aceite mineral y extracto semi-líquido de *M. pyrifera* sobre plantas de tomate de invernadero en condiciones de baja humedad relativa, encontrando esporas de éstos hongos adheridas en hojas de la planta de tomate a los 14 días después de haber sido aplicados. Manzanarez-Jiménez *et al.* (2022), encontraron alta tolerancia a la temperatura de esporas de *M. anisopliae* formuladas con extracto semi-líquido de origen marino y otros polisacáridos en microcápsulas procesadas en un secador de rocío.

Los valores de concentración total de esporas con *M. pyrifera*, fueron 6×10^6 a 6.7×10^8 , y con solo hongo de 3×10^6 a 3.4×10^7 esporas/mL, estos resultados promueven la producción de esporas coadyuvadas con extractos de origen marino, ya que una mayor disponibilidad de inóculo resulta competitivo para producir esporas en polvo mediante esquemas biotecnológicos desde el ámbito comercial, sin embargo, desde la perspectiva de disponibilidad de esporas para causar la muerte de los insectos, en esta trabajo se comprobó que en las concentraciones evaluadas no presentaron diferencias estadísticas significativas en las variables evaluadas ($F_{31151.05} = 2.89$; $gl = 3,72$; $p = 0.08$) (Tabla 2).

La germinación del hongo no registró datos significativos entre el hongo con extracto de *M. pyrifera* y el hongo solo, todos los tratamientos tuvieron alrededor de 99 % de esporas germinadas a las 24 h ($F_{35642.05} = 2.80$; $gl = 3,81$; $p = 0.07$), (Tabla 3), estos resultados muestran la capacidad de *M. anisopliae* para reproducirse a partir del crecimiento de las hifas, y originar nueva esporas, con la posibilidad de iniciar nuevos ciclos de infección sobre los insectos.

Tabla 3. Germinación de esporas de *Metarhizium anisopliae* en extracto de *Macrocystis pyrifera*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$). Los datos muestran los promedios de las réplicas experimentales \pm la desviación estándar.

Table 3. Spore germination of *Metarhizium anisopliae* in *Macrocystis pyrifera* extract. Different letters indicate statistical differences between treatments ($\alpha = 0.05$). Data show means of experimental replicates \pm standard deviation.

Repetición	Tratamientos	Germinación de esporas (%) 24 h		
		1×10^7	1×10^8	1×10^9
5%				
1	Tratamiento	99.0 \pm 1.82 ^a	99.0 \pm 0.11 ^a	99.4 \pm 0.22 ^a
	Control	99.7 \pm 0.22 ^a	99.3 \pm 1.40 ^a	99.7 \pm 1.67 ^a
2	Tratamiento	99.8 \pm 0.81 ^a	99.4 \pm 0.89 ^a	99.8 \pm 1.30 ^a
	Control	99.8 \pm 1.30 ^a	99.4 \pm 0.89 ^a	99.7 \pm 1.67 ^a
3	Tratamiento	99.7 \pm 0.71 ^a	99.3 \pm 1.41 ^a	99.4 \pm 1.14 ^a
	Control	99.6 \pm 1.82 ^a	99.3 \pm 1.87 ^a	99.8 \pm 1.30 ^a
10%				
1	Tratamiento	99.6 \pm 1.82 ^a	99.0 \pm 1.41 ^a	99.2 \pm 1.22 ^a
	Control	99.3 \pm 1.22 ^a	99.3 \pm 1.40 ^a	99.6 \pm 0.67 ^a
2	Tratamiento	99.8 \pm 1.81 ^a	99.4 \pm 1.30 ^a	99.5 \pm 0.30 ^a
	Control	99.8 \pm 1.43 ^a	99.4 \pm 1.40 ^a	99.6 \pm 1.87 ^a
3	Tratamiento	99.9 \pm 1.21 ^a	99.3 \pm 1.47 ^a	99.6 \pm 1.24 ^a
	Control	99.8 \pm 1.15 ^a	99.3 \pm 1.20 ^a	99.6 \pm 1.40 ^a
20%				
1	Tratamiento	99.8 \pm 1.40 ^a	99.5 \pm 1.20 ^a	99.4 \pm 1.52 ^a
	Control	99.9 \pm 1.30 ^a	99.4 \pm 1.22 ^a	99.7 \pm 1.82 ^a
2	Tratamiento	99.6 \pm 1.16 ^a	99.3 \pm 1.49 ^a	99.8 \pm 1.12 ^a
	Control	99.4 \pm 1.31 ^a	99.4 \pm 1.49 ^a	99.7 \pm 1.23 ^a
3	Tratamiento	99.4 \pm 0.89 ^a	99.6 \pm 1.51 ^a	99.4 \pm 1.20 ^a
	Control	99.3 \pm 1.22 ^a	99.4 \pm 1.47 ^a	99.8 \pm 1.24 ^a

Bioensayo de patogenicidad

La patogenicidad de los tratamientos de hongo con *M. pyrifera* presentó diferencia significativa con respecto al control positivo y negativo ($F = 30766.01 = 2.60$; $gl = 3,42$; $p = 0.00$) (Tabla 4, Figura 1).

Los hongos entomopatógenos pueden ser aplicados directamente sobre el cultivo infestado con la plaga, mediante suspensiones mezcladas con un surfactante, para mejorar la dispersión de esporas, sin embargo, es importante mejorar las técnicas de liberación en campo y el uso de coadyuvantes para incrementar su actividad bioinsecticida sobre las poblaciones de insectos. Al respecto, el uso de aceites vegetales y

Tabla 4. Mortalidad de larvas de *Chloridea virescens* y tiempo letal medio (TL₅₀) por efecto de los tratamientos aplicados. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$). Los datos muestran los promedios de las réplicas experimentales \pm la desviación estándar. H+E* = *M. anisopliae* + extracto de macro-alga. H* = *M. anisopliae*. TL50* = tiempo transcurrido entre la aplicación de los tratamientos y el momento en que muere el 50% de la población de insectos.

Table 4. Mortality of *Chloridea virescens* larvae and average lethal time (TL₅₀) due to the effect of the treatments applied. Different letters indicate significant statistical differences between treatments ($\alpha = 0.05$). The data show the averages of the experimental replicates \pm the standard deviation. H+E* = *M. anisopliae* + macro-algae extract. H* = *M. anisopliae*. TL50* = is the time elapsed between the application of the treatments and the moment in which 50 % of the insect population dies.

Tratamientos	Mortalidad (%) al día 5			TL ₅₀ * horas
$1 \times 10^{7,8,9}$ H + E* 5 %	91 \pm 2 ^a	90 \pm 3 ^a	91 \pm 1 ^a	42.0 \pm 1
$1 \times 10^{7,8,9}$ H + E* 10 %	92 \pm 3 ^a	91 \pm 4 ^a	93 \pm 2 ^a	44.0 \pm 1
$1 \times 10^{7,8,9}$ H + E* 20 %	92 \pm 3 ^a	92 \pm 3 ^a	92 \pm 3 ^a	44.0 \pm 2
$1 \times 10^{7,8,9}$ H (C+)	80 \pm 3 ^b	81 \pm 3 ^b	80 \pm 2 ^b	70.0 \pm 5
Agua destilada (C-)	00 \pm 0 ^c	00 \pm 0 ^c	00 \pm 0 ^c	00.0 \pm 0

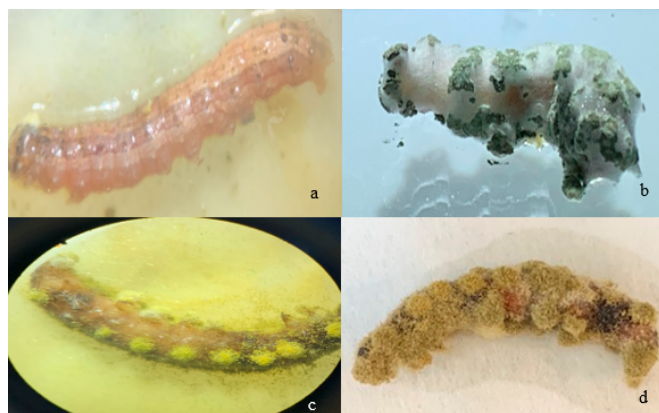


Figura 1. Efecto de los hongos con extracto líquido de alga *Macrocyctis pyrifera* en larvas *Chloridea virescens*. Imágenes representativas del bioensayo de patogenicidad de los tratamientos aplicados, donde se aprecia el crecimiento del hongo sobre el cuerpo de las larvas a) Larva muerta por efecto del hongo y el alga, de seis días posttratamiento, b) Crecimiento del hongo de diez días sobre el cuerpo del insecto, en color blanco, y en algunas partes se observa color verde, c) Cuerpo de una larva de 14 días, con micelio, d) Cuerpo momificado de larva a los 18 días.

Figure 1. Effect of fungi with *Macrocyctis pyrifera* algae liquid extract on *Chloridea virescens* larvae. Pictures of pathogenicity bioassay of the applied treatments are shown, where the evolution of fungus growth on the insects body is showing, a) Dead larva by effect of the fungus and the alga at 6-day post-treatment, b) Growth of the 10-day-old fungus on the body of the insect, in white, and in some in green, c) Body of a 14-day-old larva, with mycelium, d) Mummified body 18-day old larva.

minerales, así como polímeros a base de glucosa y proteínas de origen animal, y vegetal, son materiales recomendados para proteger las esporas del hongo de condiciones adversas y mejorar su actividad biológica (Vega-Aquino *et al.*, 2010). En este trabajo la patogenicidad del hongo con el extracto líquido de *M. pyrifer* sobre larvas de *C. virescens* fue efectiva, las larvas murieron en un tiempo corto, comparado con el hongo sin alga, estos resultados con acordes a los reportados por Manzanarez-Jiménez *et al.* (2022), quienes informaron mortalidad superior al 50 % de larvas de mayor edad de *C. virescens*, por efecto de esporas de *M. anisopliae* liberadas de una matriz de maltodextrina y otra de gelatina bovina, adheridas a la cutícula de las larvas muertas, lo cual resulta importante para el control biológico con hongos entomopatógenos, ya que su disponibilidad en el cuerpo del insecto ayuda a dispersar las esporas e infectar a un mayor número de insectos (Vega-Aquino *et al.*, 2010; Inglis *et al.*, 2012).

El efecto de *M. pyrifer* en las esporas del hongo *M. anisopliae* evaluadas en este trabajo, mostró potencial para ser utilizado en beneficio del crecimiento, viabilidad, esporulación y patogenicidad del hongo en condiciones controladas, estos resultados son prometedores para aumentar la persistencia del hongo en la rizosfera (García *et al.*, 2011), en las hojas de las plantas y en condiciones ambientales de baja humedad relativa (Manzanarez-Jiménez *et al.*, 2021; Manzanarez-Jiménez *et al.*, 2022), así como para el control de *C. virescens*, cuyas poblaciones tienen habilidad para desarrollar resistencia a algunos productos químicos usados para su control (Terán-Vargas *et al.*, 2005), y capacidad para desarrollarse rápidamente en el cultivo (Manzanarez-Jiménez *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

El extracto líquido de origen marino de alga café *M. pyrifer* a bajas concentraciones benefició el crecimiento, viabilidad, esporulación y patogenicidad del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* contra *C. virescens*. Las concentraciones del hongo evaluadas en este trabajo no afectaron las variables evaluadas. La mortalidad de larvas fue mayor con el hongo con *M. pyrifer* y el tiempo letal medio fue más corto. Este trabajo es un aporte al control biológico de plagas con hongos entomopatógenos tratados con extracto líquidos de origen marino, de amplia disponibilidad en el ambiente y ricos en nutrientes, como una alternativa para aumentar la actividad bioinsecticida de agentes de control biológico de insectos en cultivos agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

A CONAHCYT por la beca otorgada para estudio de "Estancias posdoctorales por México 2022 (3) en la modalidad: Estancia Posdoctoral Académica a la Doctora Lucía Araceli Manzanarez Jiménez, con el proyecto "Desarrollo de nuevos bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos para el control de plagas en tomate y chile en Sinaloa", y a CIIDIR IPN unidad Sinaloa.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos, no tener conflictos de intereses con la presente publicación.

REFERENCIAS

- Alatorre, R. R., y Tamayo, M. F. 2020. Protozoarios-microsporidia y hongos entomopatógenos. En J. Arredondo-Bernal, F. Tamayo-Mejía, y L. Rodríguez del Bosque. Eds., *Fundamento y práctica del control biológico de plagas y enfermedades* (pp. 187-238). Montecillo, Texcoco, Estado de México: Editorial del Colegio de Postgraduados, 1ra edición.
- Archuleta-Torres, A. 2012. *Caracterización morfológica y molecular de Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin y Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin de suelos cultivados y no impactados en el norte de Sinaloa*. Tesis de Maestría. Guasave, Sinaloa, México: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional.
- FAO. 2018. *The global status of seaweed production, trade and utilization*. Globefish Research Programme Volume 124. Rome. 120 pp Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Finney, D. J. 1978. *Statistical method in biological assay*. 3rd ed. D. J. Finney, Eds. New York: Cambridge University Press, p. 508.
- García, J., Posadas, J., Peticari, A., y Lecuona, R. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research*, 51, 22-27.
- Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y., Arvizu-Higuera, D., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, Y., y Muñoz-Ochoa, M. 2012. Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(2), 155-168.
- Hernández-Herrera, R., Santacruz-Ruvalcaba, F., Briceño-Domínguez, D., Di Filippo-Herrera, D., y Hernández-Carmona, G. 2018. Seaweed as potential plant growth stimulants for agriculture in Mexico. *Hidrobiológica*, 28(1), 129-140.
- Hernández-Herrera, R., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M., Norrie, J., y Hernández-Carmona, G. 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *J Appl Phycol*, 26, 619-628.
- Inglis, G. D., J. Enkerli, y M. S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, pp. 189-253. En L. Lacey [ed.], *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Academic Press, Londres.
- Manzanarez-Jiménez, L., y García-Gutiérrez, C. 2020. Producción de esporas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* por cultivo bifásico y su patogenicidad contra *Heliiothis virescens* F. En SEPI-UPIIICSA-IPN, M. Cruz-Antonio, C. Merlo-Zapata, y C. Máquez-Sánchez, Eds., *Memorias: 4to Congreso Nacional de Investigación Interdisciplinaria. Enfrentando Retos Emergentes de Ciencia y Tecnología* (pp. 123-126). Ciudad de México: Ecoe Ediciones México.
- Manzanarez-Jiménez, L., García-Gutiérrez, C., Flores-Zamora, G., Graciano-Obeso, A., y Luis, Leal-Jiménez. 2021. *Desarrollo, hábitos y daño de Chloridea virescens en tomate rojo cultivado en transpatio*. En Memorias del XLIII Congreso Nacional de Control Biológico. M. España-Luna, B. Rodríguez-Veléz, y H. González-Hernández, Eds. Chihuahua, Chihuahua. Sociedad Mexicana de Control Biológico, A.C.

- Manzanarez-Jiménez, L., García-Gutiérrez, C., Rosas-García, N., Luna-González, A., y Ortega-Avilés, M. 2022. Formulaciones micro encapsuladas de *Metarhizium anisopliae* contra el Gusano tabacalero. *Southwestern Entomologist*, 47(4), 895-902.
- Manzanarez-Jiménez, L., García-Gutiérrez, C., Verdugo-Mancillas, L., y Hernández-Carmona, G. 2021. Viabilidad de conidias de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en medio de cultivo con extracto de *Macrocystis pyrifera* (L.). En CNRG-INIFAP, *Memorias Agroevento Microorganismos para el Desarrollo*. 2da ed., Vol. 1, p. 141. Ciudad de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Manzanarez-Jiménez, L., Rosas-García, N., Luna-González, A., Escobedo-Bonilla, C., y García-Gutiérrez, C. 2021. Evaluación de formulaciones en aceites de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* contra *Chloridea virescens* F. *Southwestern Entomologist*, 46(2), 503-510.
- SAS Institute. 2009. *STAT/SAS User's Guide*, 9.0. ed. SAS Institute Cary, NC, pp.67.
- Terán-Vargas, A., Rodríguez, J., Blanco, C., Martínez-Carrillo, J., Cibrián-Tovar, J., Sánchez-Arroyo, H., L A Rodríguez-del-Bosque y Stanley, D. 2005. Bollgard cotton and resistance of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to conventional insecticides in southern Tamaulipas, Mexico. *J Econ Entomol*, 98(6), 2203-2209.
- Vega-Aquino, P., Sanchez-Peña, S., y Blanco, A. C. 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(3), 145-149.
- Zelaya-Molina, L., Chávez-Díaz, I., de los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C., Ruíz-Ramírez, S., y Rojas-Anaya, E. 2022. Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(7), 69-79.